



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ADRIANNE DOS SANTOS FREITAS

**FILOGENIA MOLECULAR E MITOGENÔMICA DE *MENTICIRRHUS* GILL,  
1861 (SCIAENIDAE: PERCIFORMES)**

BELÉM - PARÁ  
2021

ADRIANNE DOS SANTOS FREITAS

**FILOGENIA MOLECULAR E MITOGENÔMICA DE *MENTICIRRHUS* GILL,  
1861 (SCIAENIDAE: PERCIFORMES)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará, como requisito final para obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Profª. Dra. Iracilda Sampaio

BELÉM – PARÁ

2021

Data da defesa: 09/06 /2021

Conceito: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio  
Universidade Federal do Pará (Orientadora)

---

Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha  
Universidade Federal do Pará – Membro Titular

---

Prof. Dr. Marcelo Nazareno Vallinoto de Souza  
Universidade Federal do Pará – Membro Titular

---

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena  
Universidade Federal do Pará – Membro Titular

---

Prof. Dr. João Bráulio de Luna Sales  
Universidade Federal do Pará – Membro Titular

Belém – Pará

2021

## DEDICATÓRIA

Dedico minha tese de doutorado aos meus pais João Nascimento (*in memoriam*) e Maria da Conceição dos Santos Freitas, e à minha filha Isabel Freitas Alcântara, como prova de meu amor e gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (UFPA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo;

Agradeço imensamente aos meus queridos mestres prof. Dra. Iracilda Sampaio e Prof. Dr. Horacio Schneider (*in memoriam*) por terem sido tão maravilhosos durante todos esses anos de parceria, que começou ainda na graduação. Sempre muito generosos e preocupados com o futuro de seus alunos, são fonte de inspiração. Serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim. Obrigada por toda confiança depositada e, enquanto eu viver, serei grata por tudo!

Agradeço ao Dr. Arturo Ângulo, Universidad da Costa Rica, por ter me recebido em sua casa e se disponibilizado sempre em colaborar com este trabalho, seja com boas discussões como busca de amostras. Gracias, compañero!

Agradeço ao grupo do Prof. Dr. Omar Dominguez, da Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo (México), pelas duas vezes que me receberam tão bem, e disponibilizaram amostras de sua coleção ictiológica muito valiosas para esta tese e de outros de nosso grupo. Gracias!

Obrigada à banca que examinou o projeto de qualificação pelas críticas que objetivaram a melhoria deste trabalho: Prof. Dr. Igor Hamoy, Prof. Dr. Luis Fernando da Silva Rodrigues Filho e Profa. Dra. Simoni Santos

Em especial, sou grata a minha família, que sempre foi a fonte de toda minha dedicação. Meus pais, João Nascimento (*in memoriam*) e Conceição Freitas, que me criaram para ser livre e independente, que me mostraram o caminho certo a ser trilhado, sempre com honestidade e perseverança.

Aos meus irmãos, Andréa, André Luís e Andrelle, que convivi toda minha infância e que estiveram sempre por perto, segurando “as pontas” na minha ausência. Amo vocês!

Agradeço ao meu esposo Iuri Alcântara, pelas inúmeras vezes que tornou meus dias mais leves, pelas palavras de incentivo, apoio, e por ter construído comigo uma família, que se solidificou com a chegada da nossa filha, Isabel, o meu bem mais precioso!

Agradeço aos amigos que dividiram a vida e os dias no laboratório nestes últimos anos. Tiraram dúvidas, deram ideias, dividiram risos e lágrimas: Priscila Santos, Ana Carla,

Adriano Maciel, Roney Silva, Aline Cutrim, Isabela Brcko, João Bráulio, Tarcia Fernanda, Adam Bessa, Aurycéia Guimarães e Fabiola Seabra. Adoro vocês!! E em especial, agradeço ao Jeferson Carneiro, que muito contribuiu em várias fases dessa tese, tirando dúvidas, discutindo dados e incentivando a conclusão do trabalho. Obrigada também à Luciana Watanabe, Fernanda Gomes e Yrlene Ferreira por toda ajuda durante a etapa laboratorial de sequenciamento. Meninas vocês foram maravilhosas!

Obrigada a todos que me deram apoio durante as coletas e disciplinas, me recebendo em suas casas e que se tornaram bons amigos: Prof. Dra. Andrea Marrero (Florianópolis), Francisco Martinez (México), Eloísa Torres (México), Carolina Mendez (Costa Rica), Mariana Frade (Espírito Santo), Reydson Rafael (Belém), Mariana Mazza (Belém) e Aurycéia Guimarães (Bragança).

Agradeço também aos pescadores que colaboraram doando amostras e que não imaginam o quanto foram importantes para eu chegar até aqui!

Obrigadas a todos que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui!

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>4</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>13</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>14</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1. Regiões Biogeográficas Marinhas Tropicais</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2. Utilização de Marcadores Moleculares na Sistemática</b> .....	<b>18</b>
<b>1.3. Características gerais da família Sciaenidae com ênfase em <i>Menticirrhus</i></b> .....	<b>21</b>
1.3.1. Aspectos Gerais do Gênero <i>Menticirrhus</i> .....	22
1.3.2. Distribuição das Espécies de <i>Menticirrhus</i> .....	25
1.3.3. Estudos Taxonômicos, Filogenéticos e Filogeográficos em <i>Menticirrhus</i> .....	26
<b>1.4. Justificativa</b> .....	<b>31</b>
<b>1.5. OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
1.5.1. Objetivo geral .....	32
1.5.2. Objetivos específicos .....	32
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>38</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>40</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>41</b>
<b>2. MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>42</b>
<b>2.1. Sampling</b> .....	<b>42</b>
<b>2.2. Laboratory Procedures</b> .....	<b>44</b>
<b>2.3. Sequence Editing and database</b> .....	<b>46</b>
<b>2.4. Phylogenetic Analyses</b> .....	<b>46</b>
<b>2.5. Estimation of Divergence Time</b> .....	<b>46</b>

<b>3. RESULTS</b> .....	<b>47</b>
<b>3.1. Phylogenetic Relationships and Time of Divergence</b> .....	<b>47</b>
<b>4. DISCUSSION</b> .....	<b>49</b>
<b>5. CONCLUSION</b> .....	<b>52</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>57</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>59</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>60</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>60</b>
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	<b>60</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>64</b>
<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>67</b>
<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	<b>68</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>70</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>79</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μl: microlitros;

BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees;

Cyt b: Citocromo b;

cm: centímetro;

COI: Citocromo Oxidase I;

DNA: Ácido Desoxirribonucleico;

DNTP: Desoxirribonucleotídeo Fosfatado;

EGR1: Gene de Ativação de Recombinação 1

EGR2B: Gene de Resposta ao Crescimento Precoce 2B (*EGR2B*).

ESS: Effective Sample Size;

EUA: Estados Unidos da América;

Fig: Figura

HCl: Ácido clorídrico;

HPD: Highest Posterior Density;

IB: Inferência Bayesiana;

IUCN: União Internacional para Conservação da Natureza;

KCl: Cloreto de potássio;

Ma: Milhões de anos;

MCMC: Cadeias de Markov Monte Carlo;

MEGA: Molecular Evolutionary Genetic Analysis;

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio;

Min: minutos;

mM: milimolar;

MPEG: Museu Paraense Emílio Goeldi;

MRCA: ancestral comum mais recente;

mtDNA: DNA mitocondrial

MV: Máxima Verossimilhança;

PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony

Pb: Pares de bases;

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase;

PEG: Polietileno glicol;

RAG: Gene de Ativação de Recombinação 1 (*RAG1*),

RH: Rodopsina

RAxML: Randomized Axelerated Maximum Likelihood;

RNA: Ácido Ribonucleico;

RC: Região Controle;

rRNA: Ácido Ribonucleico Ribossomal;

seg: segundos;

tRNA: Ácido Ribonucleico Transportador;

UCR: Universidad de Costa Rica;

UFPA: Universidade Federal do Pará;

UMSNH: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo;

UNMDP: Universidade Nacional de Mar del Plata.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** O Pacífico Oriental Tropical. Fonte: Robertson e Allen (2015)..... 16
- Figura 2.** Topografia terrestre da Grande Caribe. Fonte: Robertson and Van Tassell (2019).  
..... 17
- Figura 3.** Localização do Istmo do Panamá. Fonte: Google ..... 18
- Figura 4.** Genoma Mitocondrial de *Menticirrhus littoralis* gerado por Circos implementado no Mitofish a partir dos dados de Freitas et al., (2020)..... 20
- Figura 5.** Desenho esquemático com algumas espécies de *Menticirrhus*. Fonte: FishBase  
..... 22
- Figura 6.** Características morfológicas de *Menticirrhus* segundo Chao (1978). A: Vista ventral da boca de *M. saxatilis*. B: Otólito de *M. saxatilis* (B: vista superfície interna, B': superfície externa, b: vista lateral). C: Bexiga natatória de *M. saxatilis*. D: Poros do focinho de *M. americanus*. E: único barbilhão na mandíbula..... 24
- Figura 7.** Distribuição das espécies de *Mentricirrhus*. As cores nos mapas estão relacionadas aos nomes das espécies na legenda. .... 25
- Figura 8.** Hipótese filogenética da posição de *Menticirrhus* em Sciaenidae segundo (Chao, 1978)..... 26
- Figura 9.** Cladograma das relações filogenéticas entre gêneros do subgrupo C3 de Sciaenidae, segundo Sasaki (1989). .... 27

### CAPÍTULO I

- Figure 1.** Phylogenetic relationships of the genus *Menticirrhus* based on DNA sequences of six molecular markers (COI, Cyt b, RAG1, RH, EGR1 and EGR2B). The numbers on nodes refer to bootstrap and posterior probability values for the ML (a) and BI (b) trees, respectively.....48
- Figure 2.** Estimation of divergence time among *Menticirrhus* species. The stars correspond to the calibration points in the molecular clock.....49

## CAPÍTULO II

**Figure 1.** The Maximum Likelihood topology of the Sciaenidae, based on the mitogenome, showing the phylogenetic position of *M. littoralis* (in red). Numbers at nodes represent bootstrap values in percentage. Values below 70% are not shown. The tree is rooted with *Lutjanus rivulatus* and *Sparus aurata*. GB is the GenBank Accession Number. ....63

## CAPÍTULO III

**Figure 1.** The Maximum Likelihood topology of the Sciaenidae, based on the mitogenome, showing the phylogenetic position of *M. martinicensis* (in red). Numbers at nodes represent bootstrap values in percentage. Values below 70% are not shown. The tree is rooted with *Monotaxis grandoculis*, *Dicentrauchus labrax* and *Sparus aurata*. GB is the GenBank Accession Number. ....72

**Figure S1.** The organization of the mitochondrial genome of *M. martinicensis* created by Circos. The innermost circle represents GC% per every 5bp of the mitogenome; the darker lines are, the higher their GC% are. ....73

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Table 1.** List of *Menticirrhus* species and their respective specimen codes, institutions where the tissues are stored and geographic origin of analyzed specimens.....43

**Table 2.** Molecular markers and primers used in the study with their respective references..... 45

### CAPÍTULO III

Table S1. List of species included in the phylogenetic analysis, with the respective accession numbers. ....74

Table S2. Primers used to amplify the *M. martinicensis* mitochondrial genome. ....75

Table S3. Scheme of data partition and evolutionary models. .... 76

Table S4. Base composition of the *M. martinicensis* mitochondrial genome. .... 77

Table S5. Characteristics of the mitochondrial genome of *M. martinicensis*. .... 78

## RESUMO

*Menticirrhus* (Sciaenidae) inclui 12 espécies de peixes marinhos e/ou estuarinos, conhecidos popularmente como betara e papa terra, e são distribuídos na zona costeira dos oceanos Atlântico ocidental e Pacífico oriental. Filogeneticamente, o gênero ocupa diferentes posições nas topologias propostas para Sciaenidae e muito pouco se sabe sobre as suas relações interespecíficas. De fato, as filogenias pretéritas foram baseadas em dados de matrizes de caracteres morfológicos e/ou com base em um número reduzido de genes. Contudo, com desenvolvimento da bioinformática e da biologia molecular, a utilização de dados genômicos nesse tipo de abordagem vem fornecendo novas visões sobre a sistemática e a história evolutiva dos peixes. Nesse sentido, objetivamos investigar as relações filogenéticas dentro de *Menticirrhus* a partir de uma abordagem multiloci, bem como descrever o genoma mitocondrial das espécies *M. martinicensis* e *M. littoralis*, posicionando o gênero na família Sciaenidae com base em 15 marcadores moleculares desse genoma. Os resultados sugerem que o gênero é monofilético e que o ancestral comum mais recente de *Menticirrhus* viveu durante o Mioceno. Os dados mostram ainda que a formação do Istmo do Panamá parece ter influenciado na cladogênese de espécies do Atlântico e Pacífico. A hipótese filogenética é de que há dois clados principais, o clado 1 exclusivamente com espécies do Pacífico (*M. panamensis*, *M. ophicephalus*, *M. nasus* e *M. paitensis*), que provavelmente devido a insuficiência de dados não foi possível inferir as relações de parentesco entre elas, e o clado 2 com espécies que ocorrem dos dois lados do Istmo (*M. undulatus*, *M. elongatus*, *M. littoralis*, *M. cuiaranensis*, *M. gracilis*, *M. saxatilis* e *M. martinicensis* e *M. americanus*), e suas relações foram recuperadas com altos valores de suporte estatístico. Finalmente, a partir das informações do genoma mitocondrial, observamos uma relação próxima entre *Menticirrhus* e *Paralichthys*.

**Palavras-chave:** *Menticirrhus*, mtDNA, Filogenia.

## ABSTRACT

*Menticirrhus* are marine and / or estuarine fish, popularly known as betara and papa terra, and representatives of the family Sciaenidae. The genus has 12 species described and distributed in the coastal zone of the western Atlantic and eastern Pacific oceans. Phylogenetically, *Menticirrhus* occupies different positions in the topologies proposed for Sciaenidae and very little is known about the relationships of inter-specific relatives. Genetic data has been widely generated for many organisms and the availability of complete genomes provides a new field for inference about the evolutionary history of fish, particularly. Thus, the purpose of this study is to investigate the phylogenetic relationships between *Menticirrhus* species from a multiloci approach, as well as to describe the mitochondrial genome of two species of the genus, *M. martinicensis* and *M. littoralis*, placing the genus in the family based on 15 molecular markers of this genome. The results suggest that the genus is monophyletic and that its most recent common ancestor of *Menticirrhus* lived during the Miocene, and that the formation of the Isthmus of Panama appears to have influenced the cladogenesis of Atlantic and Pacific species. The phylogenetic hypothesis is that there are two main clades, clade 1 exclusively with Pacific species (*M. panamensis*, *M. ophicephalus*, *M. nasus* and *M. paitensis*), which probably due to insufficient data it was not possible to infer the relationships of kinship between them, and clade 2, with species that occur on both sides of the Isthmus (*M. undulatus*, *M. elongatus*, *M. littoralis*, *M. cuiaranensis*, *M. gracilis*, *M. saxatilis* and *M. martinicensis* and *M. americanus*), supported with high values of statistical support. Finally, from the information from the mitochondrial genome, we observe the next relationship between *Menticirrhus* and *Paralonchurus*.

Keyword: *Menticirrhus*, mtDNA, Phylogeny.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Regiões Biogeográficas Marinhas Tropicais

O Pacífico Oriental Tropical (TEP) e Atlântico Ocidental tropical (TWA) são dois dos quatro principais centros de biodiversidade marinha tropical. A primeira Região Biogeográfica, correspondente a Região Zoogeográfica do Pacífico Oriental de Brusca (1980), compreendendo a área da Baía de Magdalena, abrangendo a costa sul da Baixa Califórnia e o Golfo da Califórnia, ao norte do Peru, e inclui cinco ilhas e grupos de ilhas (Fig. 1). Segundo Günther (1868) esta área já esteve conectada Atlântico Ocidental, antes da interrupção dessa ligação com fechamento total do Istmo do Panamá.



Figura 1. O Pacífico Oriental Tropical. Fonte: Robertson e Allen (2015).



O Atlântico Oeste Tropical (TWA) inclui a região biogeográfica marinha chamada Grande Caribe (*Greater Caribbean*), que compreende a costa centro-leste da Flórida, o Golfo do México, costa da América Central e norte da América do Sul até Trinidad (Fig. 2) e o Brasil (BRIGGS, 1974).



**Figura 2.** Topografia terrestre da Grande Caribe. Fonte: Robertson and Van Tassell (2019).

Durante o Mioceno, há cerca de 12 Ma, iniciou um processo gradual de formação de uma barreira na região do Panamá, conhecida Istmo do Panamá (COLLINS et al., 1996) (Fig. 3). Esta barreira física fechou completamente a ligação entre o Atlântico e Pacífico, há 3 milhões de anos (JACKSON; BUDD; COATES, 1996), isolou populações marinhas do Atlântico e Pacífico, e permitiu a conexão da fauna terrestre entre as américas, evento conhecido como “Grande Intercambio Americano” (Lessios, 2008). Vale ressaltar que a presença do Istmo é considerada um importante evento vicariante, responsável por processos de especiação em peixes. (Bernardi et al., 2008; Swart et al., 2015).



Figura 3. Localização do Isthmo do Panamá. Fonte: Google

Segundo Lessios (2008), o fluxo atual, a salinidade, a temperatura e a produtividade primária do Pacífico e do Atlântico também foram afetadas pelo soerguimento do Isthmo, fazendo com que espécies marinhas não extintas pelo evento tenham divergido e traçado suas próprias trajetórias evolutivas.

As espécies separadas preteritamente pelo soerguimento dos Isthmo são denominadas por Jordan (1908) de espécies geminadas (espécies gêmeas), cada uma representando a outra em lados opostos de uma barreira, como pode ser o caso de espécies de peixes que vivem dos dois lados do Isthmo do Panamá. Provavelmente, as populações viviam essencialmente nas mesmas condições e eram consideradas similares nas duas margens do istmo, mas sofreram mudanças no final do Mioceno devido sua ascensão, e posteriormente tornaram-se duas espécies reconhecíveis. Dentre outros vários exemplos podemos citar *Menticirrhus littoralis* (na costa do Atlântico) e *M. elongatus* (na costa do Pacífico)

## 1.2. Utilização de Marcadores Moleculares na Sistemática

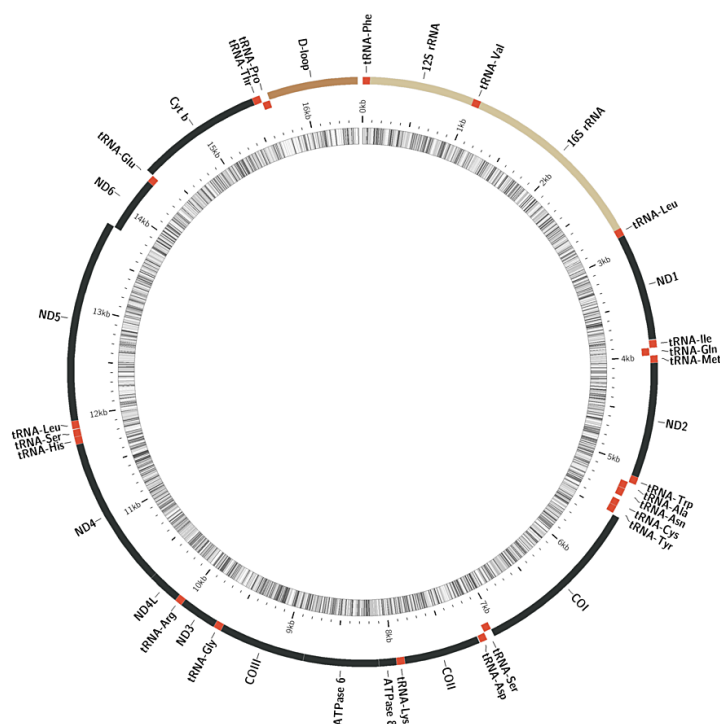
Devido aos avanços tecnológicos das últimas décadas, como o sequenciamento de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) e o aprimoramento na área da bioinformática, muitos estudos em diversos campos da biologia foram desenvolvidos, como as filogenias moleculares e de genética de populações. As sequências de DNA se tornaram as principais

fontes de informação para o entendimento das relações genéticas e evolutivas entre os organismos (HAJIBABAEI et al., 2007).

Antes da era molecular as filogenias eram inferidas com base em características morfológicas, fisiológicas, comportamentais ou qualquer outra passível de observação. No entanto, estudos taxonômicos baseados exclusivamente em caracteres morfológicos, por exemplo, podem ser limitados para tratar algumas questões como no caso de espécies crípticas (HEBERT et al., 2003).

Estudos que buscavam avaliar grau de estruturação genética intra e interpopulacional frequentemente usavam marcadores enzimáticos e endonucleases de restrição, até o surgimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) os anos 80 (STEPIEN e KOCHER, 1997). Esta técnica aliada ao uso do DNA presente nas mitocôndrias (mtDNA) como marcador molecular na década de 70, produziu grandes impactos nos estudos moleculares da genética de populações e evolução (AVISE; LANSMAN; SHADE, 1979; BROWN; GEORGE; WILSON, 1979). Segundo Avise et al., (1987), os marcadores moleculares mitocondriais apresentam aspectos relevantes para estudos filogenéticos como: estrutura genética simples, sem DNA repetitivo, íntrons, elementos transponíveis e pseudogenes; fácil de isolar; herança sem recombinação ou outro rearranjo genético; evolução rápida; e estar presente distintivamente em uma variedade de organismos.

Estruturalmente, o mtDNA constitui uma molécula compacta de DNA circular em fita dupla com cerca de 16.500 pares de bases (CLARK-WALKER, 1985; MORITZ; DOWLING; BROWN, 1987). Possui 37 regiões gênicas, sendo 13 genes codificadores de proteínas, os quais correspondem a 90% deste genoma, 22 RNAs transportadores (tRNAs), dois RNAs ribossômicos (12S e 16S rRNA); apresenta ainda uma região não codificadora chamada de Região Controle (MEYER, 1993), também conhecida por Dloop, rica em conteúdo de AT e importante por conter os promotores de transcrição de cadeia leve (L) e pesada (H) (Clayton, 1982) (Figura 4).



**Figura 4.** Genoma Mitocondrial de *Menticirrhus littoralis* gerado por Circos implementado no Mitofish a partir dos dados de Freitas et al., (2020).

O DNA mitocondrial apresenta estrutura e organização similar em peixes (Prosdocimi et al., 2012), assim como em outros vertebrados (ANDERSON et al., 1981; ZHANG et al., 2005). As várias regiões do mtDNA apresentam diferentes taxas mutacionais, o que possibilita a aplicação em diferentes abordagens, utilizando os marcadores para solucionar diferentes problemáticas dentro da ictiofauna, como estudos de estrutura genética populacional, filogenéticos e filogeográficos (GOMES et al., 2008; WATANABE et al., 2014), em especial entre os cianídeos (SANTOS et al., 2003, 2006; BARBOSA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; FREITAS et al., 2017; DA SILVA et al., 2018).

Por exemplo, o gene *COI* (Citocromo Oxidase subunidade I) possui cerca de 1.550 pb e ganhou destaque entre os marcadores moleculares quando Hebert et al., (2003) propuseram que um fragmento de cerca de 650 pb deste marcador poderia servir como um sistema de identificação animal, um tipo de código de barras da vida, o DNA barcoding. Ele apresenta uma das menores taxas de substituição não-sinônima e uma das maiores em relação à substituição sinônima do genoma mitocondrial, sendo 22 vezes maior que em genes

nucleares (SACONNE et al., 1999) e têm sido usados para discriminar espécies crípticas (ZEMPLAK et al., 2009; GUIMARÃES-COSTA et al., 2016).

Assim como o *COI*, o *Cyt b* também têm aplicabilidade em análises a nível de espécie e família, se mostrando útil em reconstruções filogenéticas e filogeográficas em peixes (KARTAVTSEV e LEE, 2006; KARTAVTSEV et al., 2007; LIVI; SOLA; CROSETTI, 2011). De fato, inferências filogenéticas envolvendo todos os marcadores mitocondriais têm sido realizadas em vários grupos de peixes, como feito por Yamanoue et al., (2007) que utilizaram as 37 regiões gênicas deste genoma para posicionar os Tetradontiformes entre os teleósteos.

Embora o DNA mitocondrial apresente taxa de evolução mais acelerada do que o DNA nuclear, por exemplo, o fato dos genes serem de origem uniparental (haplotípica), isso lhe confere limitação, uma vez que fornecem apenas uma estimativa da árvore de espécie (MOORE, 1995).

Os genes mitocondriais são indicados para estimar eventos mais recentes, e os genes nucleares, por terem um maior nível de conservação, podem inferir sobre o ancestral de um clado em uma escala maior de tempo. Nesse sentido, para tentar reduzir os erros nas filogenias, é recomendável associar dados mitocondriais e nucleares, como observado em estudos filogenéticos realizados em peixes ciclídeos (Fabrin et al., 2014).

Lo et al. (2015) utilizaram seis marcadores moleculares (*COI*, *Cyt b*, *RH*, *RAG1*, *EGR1* e *EGR2B*) para acessar a filogenia de Sciaenidae, investigar a origem, bem como testar as hipóteses que podem explicar os atuais padrões biogeográficos do grupo.

### **1.3. Características gerais da família Sciaenidae com ênfase em *Menticirrhus***

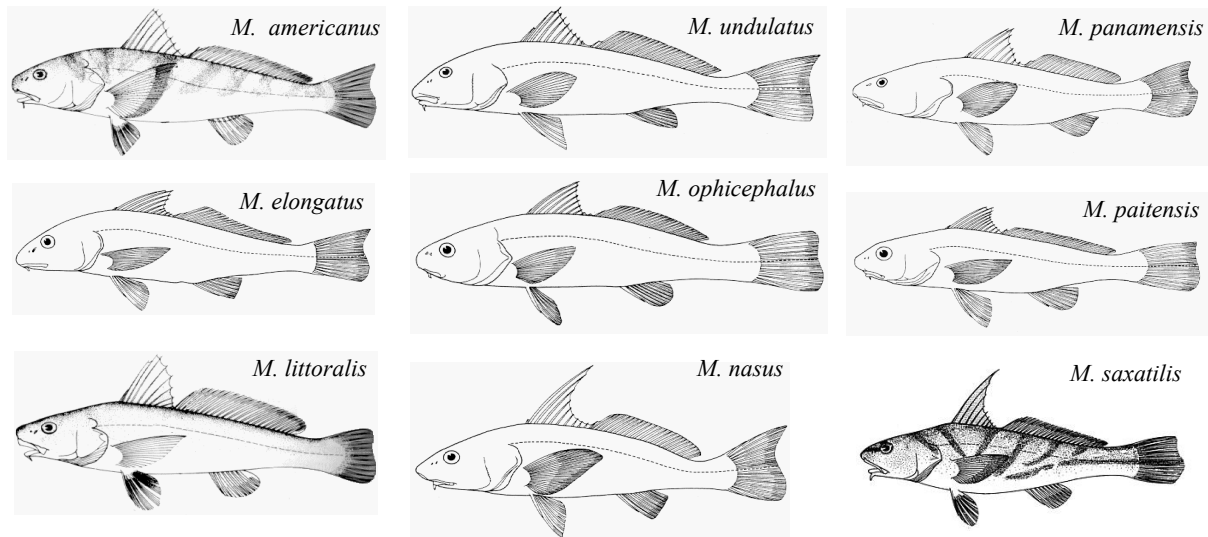
Nelson; Grande; Wilson (2016) reconhecem 85 ordens e 536 famílias de peixes, dentre elas está Sciaenidae. Os peixes desta família são popularmente conhecidos como pescadas e corvinas, originalmente marinhos e estuarinos, compreendem cerca de 67 gêneros e cerca de 294 espécies distribuídas nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico, com alguns representantes dulcícolas nas Américas (CHAO et al., 2015; FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2020).

Os cianídeos se caracterizam morfologicamente pela presença de duas nadadeiras dorsais diferentes (uma porção com espinho e outra sem) e contínuas; uma linha lateral que se estende até o fim da nadadeira caudal; presença de grandes otólitos; e bexiga natatória

bem desenvolvida, exceto em *Menticirrhus*, que funciona como um órgão de ressonância produzindo um som característico decorrente das vibrações produzidas por músculos que estão ligados a ela (CHAO, 1978; MENEZES e FIGUEIREDO, 1980; NELSON, 2006).

### 1.3.1. Aspectos Gerais do Gênero *Menticirrhus*

O gênero *Menticirrhus*, descrito por Gill em 1871, é um dos 21 gêneros que representam à família Sciaenidae no Atlântico Ocidental, e é constituído por 12 espécies de peixes marinhos que estão distribuídas em regiões tropicais e temperadas no Atlântico e no Pacífico. Destas, seis espécies podem ser encontradas no leste do Oceano Pacífico (*M. elongatus*, *M. nasus*, *M. ophicephalus*, *M. paitensis*, *M. panamensis* e *M. undulatus*), seis no oeste do Atlântico (*M. americanus*, *M. martinicensis*, *M. littoralis*, *M. gracilis*, *M. cuiaranensis* e *M. saxatilis*) e 13 espécies nominais são reconhecidas como sinônimos juniores (Fig. 5) (CHAO, 1978; MARCENIUK et al., 2020; FRICKE, 2020).

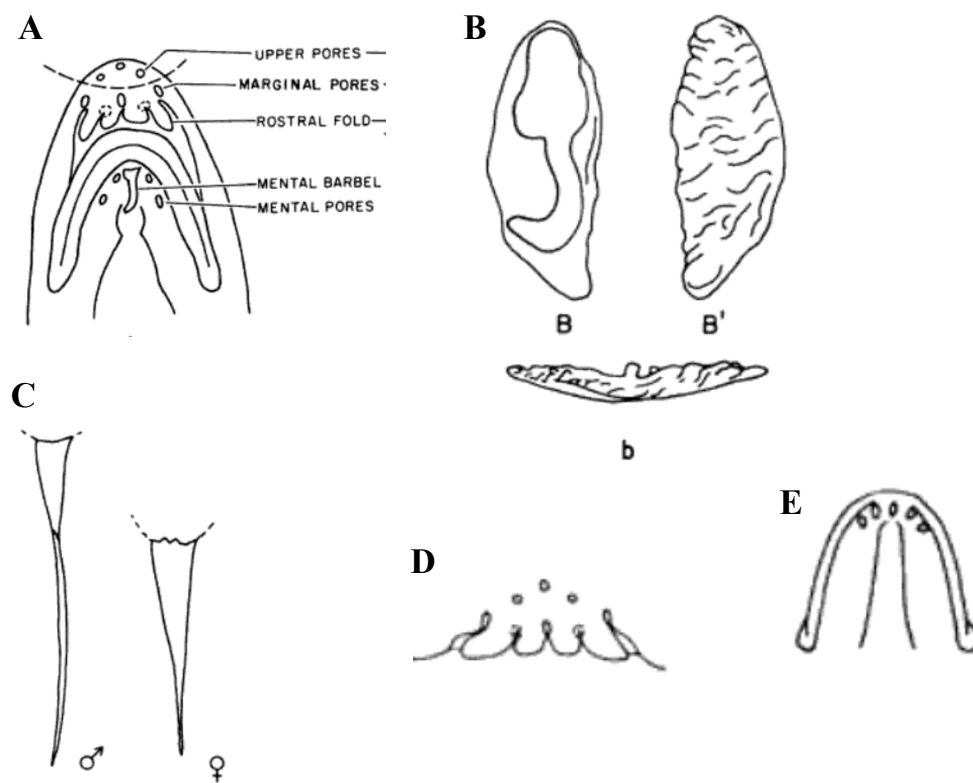


**Figura 5.** Desenho esquemático com algumas espécies de *Menticirrhus*. Fonte: FishBase

Popularmente conhecidos como papa terra e betarra, esses peixes demersais são encontrados em fundos arenosos e lamosos da região litorânea. São comuns na pesca comercial e recreativa, além de comporem a fauna acompanhante na pesca de arrasto de camarão (MENEZES e FIGUEIREDO, 1980; CHAO et al., 2015). São carnívoros e apresentam hábito alimentar bastante diversificado, alimentando-se principalmente de anfípodas, poliquetas e crustáceos (RODRIGUES e VIEIRA, 2010).

A similaridade morfológica é grande entre os cianídeos em geral, o que em alguns casos, pode levar a subestimativa da diversidade do grupo, e essa dificuldade em identificar as espécies da família se estende ao gênero *Menticirrhus*. Alguns caracteres têm sido usados com frequência na tentativa de distinguir as espécies e traçar hipóteses filogenética entre elas (CHAO, 1978; SASAKI, 1989; MARCENIUK et al., 2020).

As espécies de *Menticirrhus* em geral apresentam corpo alongado, recoberto por escamas ctenóides de tamanhos variáveis, as quais já foram usadas para diferenciar espécies, como *M. americanus* e *M. littoralis* (Menezes e Figueiredo, 1980). Essas espécies se diferenciam dos demais cianídeos por apresentarem um único barbilhão curto e rígido na porção anterior da mandíbula com dois poros laterais e um poro apical, quanto ao otólito e morfologia da bexiga natatória, a qual é atrofiada nos indivíduos juvenis e vestigial nos adultos (Fig. 6).



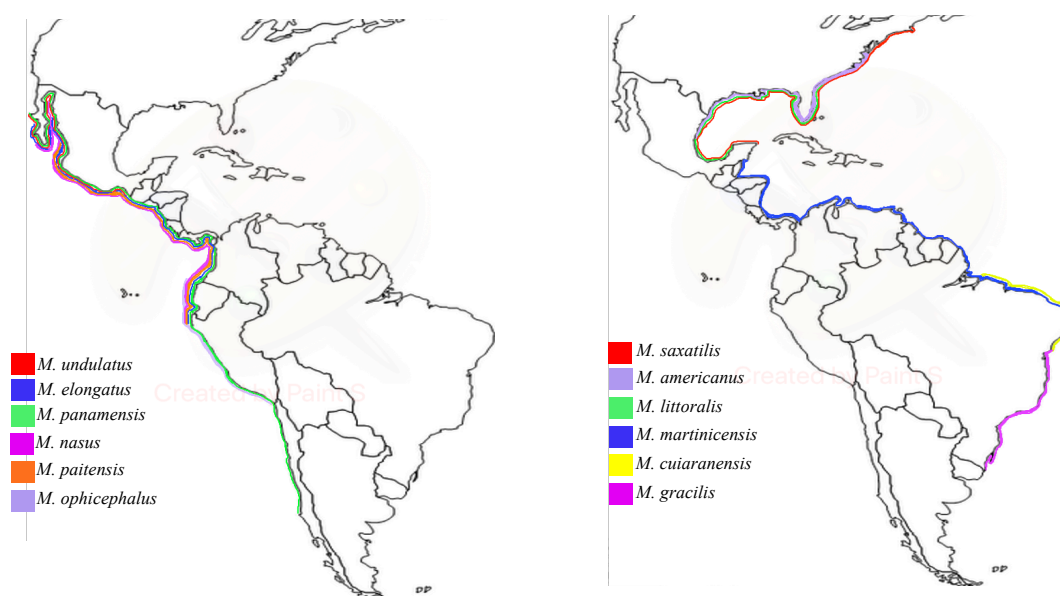
**Figura 6**

Características morfológicas de *Menticirrhus* segundo Chao (1978). A: Vista ventral da boca de *M. saxatilis*. B: Otólito de *M. saxatilis* (B: vista superfície interna, B': superfície externa, b: vista lateral). C: Bexiga natatória de *M. saxatilis*. D: Poros do focinho de *M. americanus*. E: único barbilhão na mandíbula



### 1.3.2. Distribuição das Espécies de *Menticirrhus*

Das 12 espécies de *Menticirrhus*, seis podem ser encontradas no Atlântico ocidental e seis no Pacífico oriental, sendo que a grande maioria ocorre em simpatria (Fig. 7).



**Figura 7.** Distribuição das espécies de *Menticirrhus*. As cores nos mapas se referem as espécies na legenda.

As espécies presentes no Atlântico ocidental, em geral apresentam curtas áreas de distribuição. A espécie *M. americanus* (Linnaeus, 1758), por exemplo, está restrita a costa leste dos Estados Unidos e Golfo do México; *M. cuiaranensis* pode ser encontrada nas costas norte e nordeste do Brasil; *M. gracilis* (Cuvier, 1830), no sudeste e sul da costa brasileira; *M. littoralis* (Holbrook, 1860) da costa leste dos Estados Unidos ao Golfo do México; *M. martinicensis* (Cuvier, 1830) do Caribe a costa do Atlântico sul; e *M. saxatilis* (Block & Schneider, 1801), que habita águas costeiras do sul da Flórida (EUA) ao Golfo do México (CHAO, 1978; MARCENIUK et al., 2020).

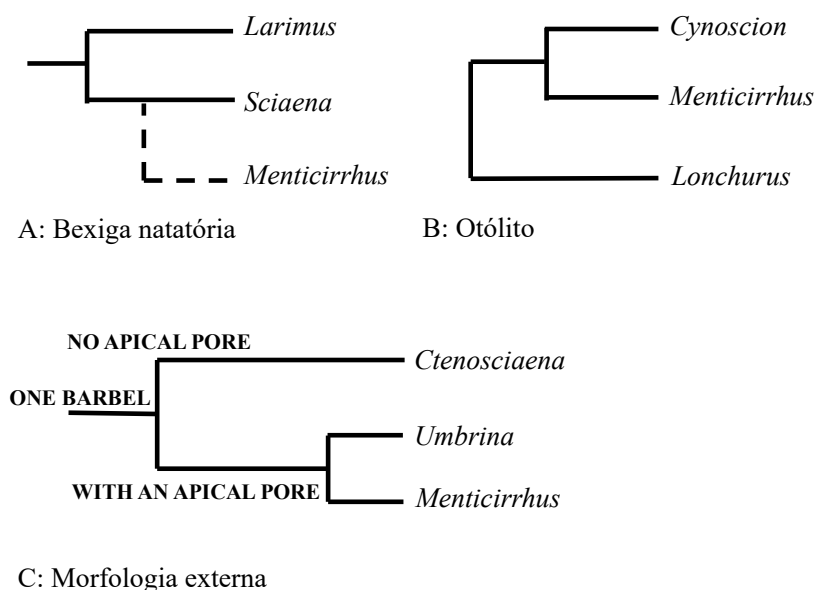
No Pacífico Leste também há espécies que apresentam distribuição mais restrita, como é o caso de *M. ophicephalus* (Jenyns, 1842), presente apenas do Equador ao Chile, enquanto, que *M. undulatus* (Girard, 1854) ocorre da Califórnia (Estados Unidos) e Baixa Califórnia (México). Por outro lado, há espécies que exibem ampla distribuição, como é o

caso de *M. elongatus* (Günther, 1864) que ocorre da Baixa Califórnia e parte do Golfo da Califórnia (México) ao Peru; *M. paitensis* (Hildebrand, 1946) distribuída do Golfo da Califórnia (México) a Paita (Peru); *M. nasus* (Günther, 1868), abrange a Baixa Califórnia, Golfo da Califórnia ao Peru; e *M. panamensis* (Steindachner, 1876), encontrada na Baixa Califórnia, Golfo da Califórnia, no México, ao Chile (ROBERTSON e ALLEN, 2015).

### 1.3.3. Estudos Taxonômicos, Filogenéticos e Filogeográficos em *Menticirrhus*

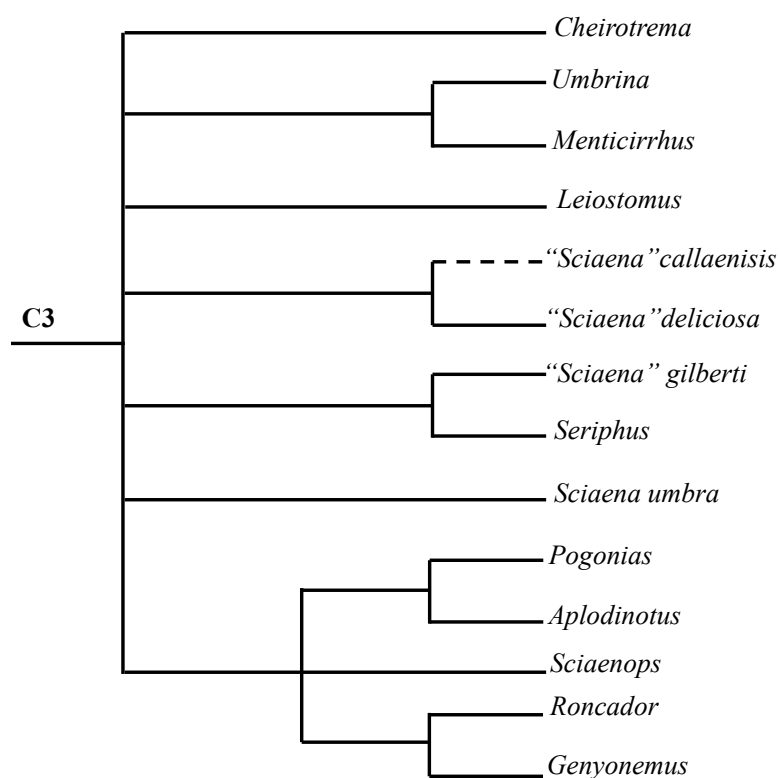
Analisando o sistema acústico - laterais (poros), a bexiga natatória e músculos percussores e otólito sacular, Trewavas (1977) agrupou 65 espécies de cianídeos do Indo - Oeste do Pacífico em 27 gêneros e 10 tribos, e dentre outros, sugeriu que os gêneros do Novo Mundo (*Sciaena*, *Umbrina* e provavelmente *Menticirrhus*) são a base da subfamília Sciaeninae e dentro desta da tribo Sciaenini.

Chao (1978) se propôs a esclarecer limites genéricos, definir grupos supragenéricos, descrevendo as tendências evolutivas dos Sciaenidae do Atlântico ocidental, analisando caracteres como morfologia externa da bexiga natatória e do otólito em 21 gêneros e 57 espécies. O autor reconheceu *Menticirrhus* como um dos 11 grupos supragenéricos analisando três (*M. americanus*, *M. littoralis* e *M. saxatilis*) das seis espécies atualmente descritas para a área, e intimamente relacionado a *Paralonchurus/Lonchurus*. Contudo, a posição filogenética do gênero na família variou de acordo com o caráter observado (Fig. 8).



**Figura 8.** Hipóteses filogenéticas da posição de *Menticirrhus* em Sciaenidae baseadas em caracteres morfológicos segundo Chao (1978).

A revisão da sistemática de Sciaenidae feita por Sasaki (1989) analisou uma série de caracteres osteológicos e miológicos em 87 espécies provenientes de 60 gêneros amplamente distribuídos, e subdividiu a família em quatro grupos com base em sinapomorfias: grupo I, II, III e IV. O gênero *Menticirrhus* surge em uma politomia dentro do subgrupo III juntamente com *Cheilotrema*, *Umbrina*, *Leiostomus*, "*Sciaena*" *callaensis*, "*S.*" *deliciosa*, "*S.*" *gilberti*, *Seriphus*, *Sciaena umbra*, *Pogonias*, *Aplodinotus*, *Sciaenops*, *Roncador* e *Genyonemus*. Embora tenha sido um amplo estudo envolvendo um grande número de táxons, muitas das relações filogenéticas dentro e entre os subgrupos permaneceram incertas (Fig. 9).



**Figura 9.** Cladograma das relações filogenéticas entre gêneros do subgrupo C3 de Sciaenidae, segundo Sasaki (1989).

Do ponto de vista molecular, vários estudos têm sido desenvolvidos em Sciaenidae. Muitas vezes, as relações filogenéticas entre os cianídeos são inferidas com base em alguns poucos marcadores moleculares e, naqueles que incluem o gênero *Menticirrhus*, um número reduzido de espécies é amostrado. A exemplo, temos o trabalho de Vinson et al., (2004) que analisaram, com uso do gene mitocondrial 16S, a relação filogenética entre 15 espécies de oito gêneros da Sciaenidae do estuário do Rio Caeté, no norte do Brasil. A politomia do grupo de cianídeos do Atlântico Sul analisados não permite fazer inferências sobre as relações filogenéticas entre os gêneros, inclusive para *Menticirrhus*. No caso deste gênero, os autores chamam atenção para a divergência nucleotídica de 8,3% entre *M. martinicensis* e *M. cuiaranensis*, que é maior do que os valores de divergência intergenérica na família, e sugerem um estudo mais detalhado que inclua todas as demais espécies do gênero *Menticirrhus*, distribuídas no Atlântico e no Pacífico, para compreender melhor o tempo e o modo da evolução das espécies congênicas.

As relações filogenéticas entre os cianídeos do Atlântico Sul Ocidental também foram investigada por Santos et al., (2013), com dados nucleares e mitocondriais (Tmo-4C4, COI e rRNA 16S). Incluindo as duas espécies de *Menticirrhus* que ocorrem na área amostrada, o gênero foi apontado como monofilético e proximamente relacionado ao clado que inclui *Ctenosciaena* e *Plagioscion*, além de ocupar a posição basal em relação aos demais gêneros estudados. Este estudo também sugere que *Cynoscion* não é monofilético, a existência de dois grupos distintos em *Stellifer*, a relação próxima entre *Lonchurus* e *Paralonchurus*, e a diversificação de populações de *Larimus breviceps*.

O estudo filogenético mais amplo feito com Sciaenidae atualmente é o de Lo et al., (2015), o qual por meio de uma abordagem multiloci (COI, Cyt b, Rag1, Rodopsina, EGR1 e EGR2B), e incluindo um número superior de táxons (93 espécies de 52 gêneros), inferiu as relações filogenéticas e a história biogeográfica dos cianídeos. Os dados mostram que a provável origem de Sciaenidae ocorreu há cerca de 27,3 Ma (Oligoceno tardio), com um primeiro processo de expansão transoceânica (incluindo a linhagem 3 e *Pogonias*) há cerca de 21,3 Ma e uma segunda expansão, há 20,6 Ma, que deu origem ao ramo que contém as linhagens de *Aplodinotus*, *Menticirrhus* e uma terceira linhagem, a linhagem 11, proposta por Chao (1978). Nesse estudo, identificaram 15 linhagens bem apoiadas, algumas das quais não haviam sido reconhecidas até então, e inferiram a monofilia de *Menticirrhus* (*M. americanus* e *M. undulatus*), corroborando trabalhos anteriores.

Posteriormente, Freitas et al., (2020) descreveram o genoma mitocondrial de *Menticirrhus cuiaranensis* e inferiram as relações filogenéticas entre 24 espécies de Sciaenidae distribuídas em diferentes regiões, baseados em 15 marcadores moleculares mitocondriais (13 codificantes de proteína e 2 rRNAs). Na árvore filogenética, *Menticirrhus* aparece posicionado como grupo-irmão dos demais cianídeos amostrados.

Uma revisão taxonômica recente sobre *Menticirrhus*, com dados morfológicos e do gene *COI*, sugeriu a existência de três complexos de espécies entre as amostras: o complexo *Menticirrhus americanus*, *M. littoralis* e *M. nasus*, além de descrever uma nova espécie na costa brasileira, *M. cuiaranensis* (MARCENIUK et al., 2020). Este estudo redefiniu os limites geográficos das espécies: *M. americanus* passou a ocupar a área que compreende a costa dos Estados Unidos e Golfo do México, e *M. martinicensis* ocupando a área que vai do Caribe até a Argentina (área que antes era ocupada por *M. americanus*). Já *M. littoralis* ficou restrita à área que compreende o leste dos Estados Unidos até o Golfo do México, e *M. gracilis* que pode ser encontrada no sul e sudeste brasileiro, e *M. cuiaranensis* nos litorais norte, nordeste e leste do Brasil (áreas que anteriormente eram ocupadas por *M. littoralis*). De acordo com os autores, as amostras de *M. nasus* do Golfo da Califórnia diferem em cerca de 5% de distância genética para a amostra do Peru. A hipótese filogenética para o gênero é a existência de 13 linhagens e 3 grupos: um clado contendo [*M. americanus*+ *M. martinicensis* + *M. saxatilis*]; outro clado com [*M. elongatus* + *M. undulatus*+ *M. cuiaranensis* + *M. littoralis* + *M. gracilis*]; e o terceiro agrupamento incluindo [*M. panamensis* + *M. nasus* + *M. ophicephalus* + *M. paitensis*].

Análises filogeográficas para os cianídeos têm revelado uma diversidade subestimada na família. A subestruturação genética observada em *Macrodon* e *Ophioscion* (SANTOS et al., 2006, 2003; RODRIGUES et al., 2014; DA SILVA et al., 2018), por exemplo, revelaram uma problemática que merecia atenção. Pelo fato de haver entre os *Menticirrhus*, espécies com ampla distribuição geográfica, e essas espécies ocorrerem em regiões onde já havia sido mostrada divergência genética elevada na família, alguns estudos filogeográficos também foram desenvolvidos para o gênero.

Márquez et al., (2013) investigaram a estrutura genética populacional em *M. gracilis* de 4 pontos amostrais de São Paulo a costa Atlântica do Uruguai, utilizando sequências da Região Controle do DNA mitocondrial de 27 espécimes. Os resultados mostraram ausência

de estruturação genética entre as populações, com compartilhamento de haplótipos entre as amostras. A presença em águas uruguaias amplia a área de ocorrência da espécie.

Em 2017, Freitas e colaboradores publicaram um estudo filogeográfico com *Menticirrhus martinicensis* (previamente chamada de *M. americanus*) de 11 localidades ao longo da costa do Atlântico sul ocidental e, também por meio das informações presentes na Região Controle do DNA mitocondrial, verificaram a ocorrência de três grupos genéticos distintos de populações: o grupo I constituído por populações das regiões Norte e Nordeste do Brasil; o grupo II contendo as populações do Sudeste e Sul brasileiras e o grupo III com as populações do Uruguai. A maior diversidade genética foi apresentada pelo grupo I. Como o isolamento pela distância não foi capaz de explicar a diversidade observada entre as populações de *M. martinicensis* da costa brasileira, os fatores hidrodinâmicos e físico químicos da água na região de cadeia Vitória-Trindade foram apontados com a possível barreira relativa ao fluxo gênico entre os grupos I e II. Em relação à clara separação das populações do Uruguai das do Brasil, o padrão de padrão de temperatura e salinidade causado pela presença da Zona de Convergência Brasil/Malvinas poderiam explicar o isolamento entre os grupos do Brasil e o grupo III, como o que foi visto por Rodrigues et al., (2014). Os resultados observados por Freitas et al., (2017) para as amostras do Espírito Santo ao Rio da Prata foram corroborados por Márquez et al., (2017).

#### 1.4. Justificativa

Os cianídeos pertencem a uma grande família de peixes, com aproximadamente 300 espécies distribuídas nos oceanos Atlântico e Pacífico. Os estudos filogenéticos que buscam reconstruir a relação de parentesco entre elas não compreendem nem metade da sua diversidade, além de estarem voltados para a compreensão das relações intrafamiliares, e incluem gêneros pouco representados, como é o caso de *Menticirrhus*

Atualmente, são propostas 12 espécies de *Menticirrhus*, em um cenário filogenético ainda controversa na família Sciaenidae, possivelmente devido ao número de táxons amostrados e/ou caracteres utilizados nos diferentes estudos. Na publicação com a maior número de espécies congênicas, as relações filogenéticas entre elas não são discutidas e um consenso em relação à sua posição ainda não foi alcançado.

Com o avanço da tecnologia, os estudos moleculares no campo da biologia tornaram-se mais robustos. Cada vez mais informação é gerada e disponibilizada em bancos de dados públicos, permitindo a elaboração de novas hipóteses, que até então não eram possíveis, sobre a história evolutiva dos organismos.

A descrição de genomas mitocondriais de peixes tem aumentado significativamente nos últimos anos, e filogenias baseadas nesses dados têm sido propostas, inclusive para Sciaenidae. Contudo, atualmente, estão disponíveis em bancos de dados genômicos, cerca de 32 mitogenomas de cianídeos, dos quais apenas um é de *Menticirrhus*, descrito pelos dados gerados pela presente tese, o que é ainda incipiente quando comparado a biodiversidade da família. Apesar do aumento no número de dados dessa natureza ser desafiador, é de fundamental importância para elucidar uma série de questões dentro do grupo, uma vez que os marcadores moleculares mitocondriais são comprovadamente eficientes e comumente utilizados em estudos filogenéticos, filogeográficos e identificação taxonômica dentro da ictiofauna.

Nesse sentido, torna-se necessária uma investigação mais aprofundada sobre esse grupo de peixes, por meio de análises mais robustas e que possibilitem fazer inferências filogenéticas precisas entre as espécies. Assim é possível assegurar o monofiletismo do gênero e propor a sua posição dentro da família.

## 1.5. OBJETIVOS

### 1.5.1. *Objetivo geral*

- ✓ Inferir as relações filogenéticas interespecífica de *Menticirrhus*; descrever os genomas mitocondriais de *M. cuiaranensis* e *M. martinicensis*, e posicionar o gênero na família Sciaenidae com base no genoma mitocondrial;

### 1.5.2. *Objetivos específicos*

- ✓ Testar a monofilia do gênero *Menticirrhus*;
- ✓ Testar a monofilia das espécies de *Menticirrhus* atualmente reconhecidas;
- ✓ Estimar tempo de divergência entre os clados intragenéricos;
- ✓ Estimar as distâncias genéticas entre os táxons;
- ✓ Inferir o papel da formação do Istmo do Panamá na história evolutiva de *Menticirrhus*.
- ✓ Verificar a composição e arranjo estrutural do genoma mitocondrial de *M. cuiaranensis*;
- ✓ Verificar a composição e arranjo estrutural do genoma mitocondrial de *M. martinicensis*;
- ✓ Posicionar o gênero *Menticirrhus* na família Sciaenidae a partir dos mitogenomas disponíveis;
- ✓ Descrever primers para amplificação de regiões do genoma de cianídeos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, p. 457–465, 1981.
- AVISE, J.C. *et al.* Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual review of ecology and systematics**, v.18, p. 489–522, 1987.
- AVISE, J.C.; LANSMAN, R. A.; SHADE, R. O. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. **Genetics**, v. 92, p. 279–295, 1979.
- BARBOSA, A. J. B *et al.* Molecular phylogeny of weakfish species of the *Stellifer* group (Sciaenidae, Perciformes) of the Western South Atlantic based on mitochondrial and nuclear data. **PLoS one**, v. 9, p. 1–8, 2014.
- BERNARDI, G. *et al.* 2008. Molecular ecology, speciation, and evolution of the reef fish genus *Anisotremus*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, p. 929–935, 2008.
- BRIGGS, J. C. Operation of Zoogeographic Barriers. **Systematic Biology**, v.23, p. 248–256, 1974.
- BROWN, W. M.; GEORGE, Jr. M.; WILSON, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 1967–1971, 1979.
- BRUSCA, R. C. **Common intertidal invertebrates of the Gulf of California**. Second edition. University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA. 1980.
- CHAO, L. N. **A Basis for Classifying Western Atlantic Sciaenidae (Teleostei: Perciformes)**, NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) Technical Report NMFS (National Marine Fisheries Service) Circular, v. 415, p. 1–64, 1978.
- CHAO, N. L. *et al.* A popular and potentially sustainable fishery resource under pressure—extinction risk and conservation of Brazilian Sciaenidae (Teleostei: Perciformes). **Global Ecology and Conservation**, v. 4, p. 117–126, 2015.
- CLARK-WALKER, G. D. Basis of diversity in mitochondrial DNAs, In: CAVALIER-SMITH, T. (Ed.). **The Evolution of Genome Size**. New York: Wiley, p. 277–297, 1985.
- CLAYTON, D. A. Replication of Animal Mitochondrial DNA. **Cell**, v. 28, p. 693–705, 1982.
- COLLINS, L. S *et al.* The late Miocene Panama isthmian strait. **Geology**, v. 24, p. 687–690, 1996.

DA SILVA, T. F. et al. Phylogeny of the subfamily Stelliferinae suggests speciation in *Ophioscion* Gill, 1863 (Sciaenidae: Perciformes) in the western South Atlantic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 125, p. 51–61, 2018.

FABRIN, T. M. C. et al. A utilização de marcadores na filogenia dos ciclídeos (Teleostei: Perciformes): uma análise cienciométrica. **Enciclopedia Biosfera**, v. 10, p. 3118–3128, 2014.

FREITAS, A. et al. The complete mitochondrial genome of *Menticirrhus littoralis* (Sciaenidae, Perciformes) and its phylogeny. **Mitochondrial DNA Part B** v. 5, p. 2286–2287, 2020.

FREITAS, A. S. et al. The mitochondrial control region reveals genetic structure in southern kingcroaker populations on the coast of the Southwestern Atlantic. **Fisheries Research**, v. 191, p. 87–94, 2017.

FRICKE, R., ESCHMEYER, W. N. & VAN DER LAAN, R. (eds). Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, References. Available at <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> (Electronic version accessed 4 August 2020).

GOMES, G. et al. Can *Lutjanus purpureus* (South red snapper) be “legally” considered a red snapper (*Lutjanus campechanus*)? **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 372–376, 2008.

GUIMARÃES-COSTA, A. et al. Molecular evidence of two new species of *Eleotris* (Gobiiformes: Eleotridae) in the western Atlantic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 98, p. 52–56, 2016.

GÜNTHER, A. C. L. G. Catalogue of the Fishes in the British Museum. London: The Trustees. v. 7, 1868.

HAJIBABAEI, M. et al. DNA barcoding : how it complements taxonomy , molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 4, 2007. [doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001](https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001)

HEBERT, P. D. N et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceeding of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, p. 313–321, 2003.

JACKSON, J. B. C.; BUDD, A. F.; COATES, A. G. Eds. **Evolution and Environment in Tropical America**. Chicago: Univ. Chicago Press. p. 1- 425, 1996.

JORDAN, D. S. The law of geminate species. **The American Naturalist**, v. 42, n. 494, p. 73–80, 1908.

KARTAVTSEV, Y. P. et al. Complete mitochondrial genome of the bullhead torrent catfish, *Liobagrus obesus* (Siluriformes, Amblycipididae): Genome description and phylogenetic considerations inferred from the Cyt b and 16S rRNA genes. **Gene**, v. 396, p.

13–27, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.01.027>

KARTAVTSEV, Y. P.; LEE, J. S.. Analysis of nucleotide diversity at genes Cyt-b and Co-1 on population, species, and genera levels. Applicability of DNA and allozyme data in the genetics of speciation. **Genetika**, v. 42, p. 437–461, 2006.

LESSIOS, H. A. The great American schism: divergence of marine organisms after the rise of the Central American Isthmus. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 39, p. 63–91, 2008.

LIVI, S.; SOLA, L.; CROSETTI, D. Phylogeographic relationships among worldwide populations of the cosmopolitan marine species, the striped gray mullet (*Mugil cephalus*), investigated by partial cytochrome b gene sequences. **Biochemical Systematics Ecology**, v. 39, p. 121–131, 2011.

LO, P.-C. et al. A multi-gene dataset reveals a tropical New World origin and Early Miocene diversification of croakers (Perciformes: Sciaenidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 88, p. 132–143, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.03.025>

MARCENIUK, A. P. et al. Taxonomic revision of the *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) and *M. littoralis* (Holbrook, 1847) (Percomorphacea: Sciaenidae) species complexes from the western Atlantic. **Zootaxa**, v. 4822, p. 301–333, 2020.

MÁRQUEZ, A.; PEREIRA, A. N.; SOLÉ-CAVA, A. M. Confirmación molecular y diversidad genética de *Menticirrhus littoralis* (Osteichthyes, Sciaenidae) en aguas uruguayas. **Bol. la Soc. Zoológica del Uruguay**, v. 22, p. 32–38, 2013.

MÁRQUEZ, A. et al. Deep genetic divergence in the Southern kingcroaker *Menticirrhus americanus* in its southernmost distribution. *Brazilian J. Oceanogr.* v. 65, p. 515–519, 2017.

MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV Teleostei.** São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1980.

MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. **Biochemistry and molecular biology of fishes**, v. 2, p. 1–38, 1993.

MOORE, W. S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. **Evolution** (N. Y). v. 49, p. 718–726, 1995.

MORITZ, C.; DOWLING, T.; BROWN, W. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual review of ecology and systematics**, p. 269–292, 1987. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001413>

NELSON, J. S. **Fishes of the world.** 4. New York: John Wiley and Sons, Inc., 2006.

NELSON, Joseph S.; GRANDE, Terry C.; WILSON, Mark V. H. **Fishes of the World.**

John Wiley & Sons, 2016.

PROSDOCIMI, F. et al. The complete mitochondrial genome of two recently derived species of the fish genus *Nannoperca* (Perciformes, Percichthyidae). **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 3, p. 2767–2772, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1034-5>

ROBERTSON, D. R.; ALLEN, G.R., 2015. **Shorefishes of the Tropical Eastern Pacific: Online information system**. Version 2.0 Smithsonian Tropical Research Institute, Balboa, Panamá, 2015.

ROBERTSON, D. R.; VAN TASSELL, J. **Shorefishes of the Greater Caribbean: Online information system**. Version 2.0. Smithsonian Tropical Research Institute, Balboa, Panamá, 2019.

RODRIGUES, F. L.; VIEIRA, J. P. Feeding strategy of *Menticirrhus americanus* and *Menticirrhus littoralis* (Perciformes: Sciaenidae) juveniles in a sandy beach surf zone of southern Brazil. **Zoologia (Curitiba)**, v. 27, n. 6, p. 873-880, 2010.

RODRIGUES, R. et al. Mitochondrial DNA reveals population structuring in *Macrodon atricauda* (Perciformes: Sciaenidae): a study covering the whole geographic distribution of the species in the southwestern Atlantic. **Mitochondrial DNA**, v. 25, p. 150–156, 2014. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.792053>

SACCONE, C. et al. Evolutionary genomics in Metazoa : the mitochondrial DNA as a model system. **Gene**, v. 238, n. 1, p. 195–209, 1999.

SANTOS, S. et al. Molecular phylogeny of the western South Atlantic Sciaenidae based on mitochondrial and nuclear data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 66, p. 423–428, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.09.020>

SANTOS, S. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. **Molecular Ecology**, v.15, p. 4361–4373, 2006.

SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 151–161, 2003.

SASAKI, K. Phylogeny of the family Sciaenidae, with notes on its zoogeography (Teleostei, Perciformes). **Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University**. v.36, p. 1–137, 1989.

STEPIEN, C. A.; KOCHER, T. D. Molecules and morphology in studies of fish evolution. **Molecular systematics of fishes**, p. 1–11, 1997.

SWART, B. L. et al. Molecular systematics and biogeography of the circumglobally distributed genus *Seriola* (Pisces: Carangidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**.

v. 93, p. 274-280, 2015.

TREWAVAS, E. The Sciaenid Fishes (Croakers Or Drums) of The Indo-West-Pacific, **Trans. Zool. Soc. Lond**, v. 33, p. 253-541, 1977.

VINSON, C. et al. Sciaenidae fish of the Caete River estuary, Northern Brazil: mitochondrial DNA suggests explosive radiation for the Western Atlantic assemblage. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 174–180, 2004.

WATANABE, L. A. et al. The past and present of an estuarine-resident fish, the “four-eyed fish” *Anableps anableps* (Cyprinodontiformes, Anablepidae), revealed by mtDNA sequences. **PLoS one**, v.9, n. 7, e101727, 2014.

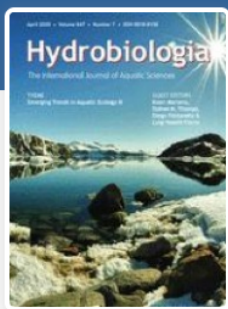
YAMANOUE, Y. et al. Phylogenetic position of tetraodontiform fishes within the higher teleosts: Bayesian inferences based on 44 whole mitochondrial genome sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, p. 89–101, 2007.

ZEMPLAK, T. S. et al. DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. **Molecular Ecology Research**, v. 9, 237–242, 2009.

ZHANG, P. et al. The complete mitochondrial genome of a tree frog, *Polypedates megacephalus* (Amphibia: Anura: Rhacophoridae), and a novel gene organization in living amphibians. **Gene**, v. 346, 133–143, 2005.

## CAPÍTULO I

Este artigo trata sobre as relações filogenéticas interespecíficas em *Menticirrhus*. Nós pretendemos submetê-lo a revista *Hydrobiologia* e seguiremos o estilo de referências e citações que ela recomenda. Para referências citadas no texto é usado o sistema nome e ano, como por exemplo (Freitas, 2017), e para a lista de referências os periódicos não são abreviados, apenas números de volume (não edições) são fornecidos e apenas fontes normais são usadas, sem negrito ou itálico.



# Hydrobiologia

The International Journal of Aquatic Sciences

**A robust multiloci molecular phylogeny of *Menticirrhus* (Sciaenidae, Perciformes)**

Adrienne dos Santos Freitas<sup>a\*</sup>, Jeferson Carneiro<sup>a,b</sup>, Arturo Angulo<sup>c</sup>, Omar Dominguez<sup>d</sup>, Horacio Schneider<sup>a,b</sup>, Iracilda Sampaio<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>*Centro de Genômica e Biologia de Sistema, Universidade Federal do Pará (UFPA). Avenida Augusto Corrêa, 01, 66075-110, Belém, Pará, Brazil.*

<sup>b</sup>*Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Instituto de Estudos Costeiros. Alameda Leandro Ribeiro s/n, 68600-000, Bragança, Pará, Brazil.*

<sup>c</sup>*Museo de Zoología y Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad de Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 11501–2060, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.*

<sup>d</sup>*Faculdade de Biologia, Universidade Michoacana San Nicolás Hidalgo, Morelia, Mexico.*

\*Corresponding author: Centro de Genômica e Biologia de Sistema, Universidade Federal do Pará (UFPA). Avenida Augusto Corrêa, 01, 66075-110, Belém, Pará, Brazil. Phone: +55 91983642168.

E-mail: [adrienne.freitas@soure.ufpa.br](mailto:adrienne.freitas@soure.ufpa.br)

## ABSTRACT

*Menticirrhus* is one of 67 genera in the family Sciaenidae, encompassing 12 recognized species distributed in the Atlantic and Pacific oceans. The interspecific phylogenetic relationships in *Menticirrhus* are poorly defined since studies involving a large number of congeneric species are absent. Based on data from six molecular markers (COI, Cyt b, EGR1, RAG1, RH, and EGR2B), we corroborated the monophyletic status of *Menticirrhus* and identified two highly supported main clades (1: *M. undulatus*, *M. elongatus*, *M. littoralis*, *M. cuiaranensis*, *M. gracilis*, *M. saxatilis*, *M. americanus* and *M. martinicensis*, and 2: *M. panamensis*, *M. ophicephalus*, *M. nasus* and *M. paitensis*). The interrelationships among species from clade 1 were well supported in all topologies. On the other hand, the phylogenetic relationships within clade 2 remained unclear because of the low support values on nodes. The analysis of divergence time suggested that the genus emerged during the Middle Miocene and several recent diversifications (about 2 Ma) were responsible for the emergence of *M. americanus*, *M. martinicensis*, *M. undulatus*, *M. elongatus*, *M. ophicephalus* and *M. nasus*. This report is the most robust phylogenetic analysis carried out in *Menticirrhus* so far and the present findings fill an important gap for the better understanding of the evolutionary relationships in this genus and the systematics of Sciaenidae fishes.

**Keywords:** Systematics; *M. americanus*; Mitochondrial DNA; Nuclear DNA; Speciation.



## 1. INTRODUCTION

The family Sciaenidae (order Perciformes) encompasses a large group of fishes, known as croakers or drums, widespread throughout tropical and subtropical waters. Currently, 294 species from 67 genera are recognized in this family, mostly inhabiting marine ecosystems with a few freshwater representatives (Chao, 1978; Fricke, 2020). The sciaenids are morphologically similar, but they can be distinguished from other taxa by the presence of large otoliths, a lateral line that extends from the head up to the end of the caudal fin and well-developed swim bladder (Trewavas, 1962; Chao, 1978), excepting for the species of *Menticirrhus* in which the swim bladder is vestigial or absent (Chao, 1978; Figueiredo and Menezes, 1980).

The genus *Menticirrhus* was described by Gill in 1861 and encompasses 12 valid species. Six of them are found in Eastern Pacific: *M. elongatus* (Günther, 1864), *M. nasus* (Günther, 1868), *M. ophicephalus* (Jenyns, 1840), *M. paitensis* Hildebrand, 1946, *M. panamensis* (Steindachner, 1876) and *M. undulatus* (Girard, 1854); while the remaining one are distributed along Western Atlantic: *M. americanus* (Linnaeus, 1758), *M. littoralis* (Holbrook, 1847), *M. saxatilis* (Bloch & Schneider, 1801), *M. cuiaranensis* Marceniuk, 2020, *M. gracilis* (Cuvier, 1830) and *M. martinicensis* (Cuvier, 1830). This is a group of demersal fish, inhabiting coastal water and feeding on small invertebrates. Most species are caught in recreational fishing and usually compose a by-catch in shrimp fisheries, being found for sale in local markets (Figueiredo and Menezes, 1980; Maia et al., 2016).

Most studies in *Menticirrhus* are focused on ecological aspects (Freitas et al., 2011; Anderson et al., 2012; Rondineli et al., 2018; Carvalho et al., 2020), while taxonomic and phylogenetic approaches are still scarce for this group. So far, the few reports that included *Menticirrhus* species in phylogenetic analyses were directed to infer the relationships of the family Sciaenidae or included few representatives of this genus (Chao 1978; Santos et al., 2013; Lo et al., 2015; Marceniuk et al., 2020). In addition, studies based on DNA sequences revealed high interspecific diversity and intraspecific structuring in *Menticirrhus* (Vinson et al., 2004; Freitas et al., 2017).

Furthermore, the remarkable morphological similarity among *Menticirrhus* species might underestimate the actual diversity of this genus. Recently, Marceniuk et al., (2020) revised the taxonomic status of *Menticirrhus* using morphological traits and DNA sequences

based on COI gene, proposing three species complexes: (1) *Menticirrhus americanus*, (2) *Menticirrhus littoralis* and (3) *Menticirrhus nasus*. In this study, the authors also recognized the species status to putative synonym taxa (*M. martinicensis* and *M. gracilis*, a former synonym of *M. americanus* and *M. littoralis*, respectively) and identified a new species for the Brazilian coast (*M. cuiaranensis*). Nonetheless, the interspecific relationships of *Menticirrhus* remained unknown. In this context, the goal of the present study was to infer the phylogenetic relationships of *Menticirrhus* encompassing the 12 recognized species in this genus and based on multiloci approach that included both mitochondrial (*COI* and *Cyt b*) and nuclear (*RAG1*, *Rhodopsin*, *EGR1* and *EGR2B*) markers.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Sampling

A total of 35 specimens of *Menticirrhus* collected in different locations were analyzed: *M. americanus* (n=3), *M. martinicensis* (n= 8), *M. littoralis* (n=3), *M. cuiaranensis* (n=5), *M. gracilis* (n=2), *M. elongatus* (n=4), *M. nasus* (n=3), *M. paitensis* (n=5) and *M. panamensis* (n=2). The species were identified based on the specialized literature (Chao, 1978; Bussing and López, 1999; Figueredo and Menezes, 1980). Fragments of muscle tissue stored in 100% ethanol were used to isolate DNA samples. All specimens and tissues are deposited in ichthyological collections (Table 1).

**Table 1.** List of *Menticirrhus* species and their respective specimen codes, institutions where the tissues are stored and geographic origin of analyzed specimens.

<b>Species</b>	<b>Code</b>	<b>Institution</b>	<b>Locality</b>
<i>M. americanus</i>	MeMx08	UMSNH	Tamiahua, Veracruz, México
	MeMx13	UMSNH	Tamiahua, Veracruz, México
	MeMx14	UMSNH	Tamiahua, Veracruz, México
<i>M. martinicensis</i>	MAPA84	UFPA	Ajuruteua, Pará, Brasil
	MAPi20	UFPA	Parnaíba, Piauí, Brasil
	MamCE01	UFPA	Fortaleza, Ceará, Brasil
	MamCE02	UFPA	Fortaleza, Ceará, Brasil
	MAPb49	UFPA	Lucena, Paraíba, Brasil
	MABA19	UFPA	Valença, Bahia, Brasil
	MeRS07	UFPA	Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil
	UNMDP-T 2102	UNMDP	Laguna Mar Chiquita, Buenos Aires, Argentina
<i>M. elongatus</i>	MelonCR41	UCR	Agua Buena, Puntarenas, Costa Rica
	MECR64	UFPA	Puntarenas, Puntarenas, Costa Rica
	10985	UMSNH	La Saladita, Michoacán, México
	11489	UMSNH	Pichilinguillo, Michoacán, México
<i>M. littoralis</i>	MeMx20	UMSNH	Tamiahua, Veracruz, México
	MeMx21	UMSNH	Tamiahua, Veracruz, México
	MeMx22	UMSNH	Tamiahua, Veracruz, México
<i>M. cuiaranensis</i>	MLPA06	UFPA	Ajuruteua, Pará, Brasil
	MLPA07	UFPA	Ajuruteua, Pará, Brasil
	MliCE01	UFPA	Fortaleza, Ceará, Brasil
	MliCE02	UFPA	Fortaleza, Ceará, Brasil
	MLPB08	UFPA	Lucena, Paraíba, Brasil
<i>M. gracilis</i>	MLISC01	UFPA	Florianópolis, Santa Catarina, Brasil
	MeRS05	UFPA	Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil
<i>M. nasus</i>	MNCR79	UFPA	Puntarenas, Puntarenas, Costa Rica
	MNCR83	UFPA	Puntarenas, Puntarenas, Costa Rica
	MePN7	UFPA	Panamá City, Panamá
<i>M. paitensis</i>	MelonCR98	UCR	Savegre de Aguirre, Puntarenas, Costa Rica
	MelonCR136	UCR	Uvita, Puntarenas, Costa Rica
	Mpait1	UFPA	Puntarenas, Puntarenas, Costa Rica
	Mpait2	UFPA	Puntarenas, Puntarenas, Costa Rica
	12287	UMSNH	Nexpa, Michoacán, México
<i>M. panamensis</i>	MpanaCR78	UCR	Isla Zacate, Puntarenas, Costa Rica
	MPCR90	UFPA	Puntarenas, Puntarenas, Costa Rica

UMSNH: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (México); UFPA: Universidade Federal do Pará (Brasil); UNMDP: Universidad Nacional de Mar del Plata (Argentina); UCR: Universidad de Costa Rica (Costa Rica).

Additional sequences of *Menticirrhus* (*M. saxatilis*, *M. ophicephalus* and *M. undulatus*), as well as other taxa were included as external groups in phylogenetic analyses using the public Genbank database (Supplementary Table1). Therefore, we included the species *Aplodinotus grunniens* Rafinesque, 1819, *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890), *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) and *A. japonicus* (Temminck and Schlegel, 1843) since these species composed a polytomy with *Menticirrhus* in one of the clades of the family Sciaenidae (Lo et al., 2015), and *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) from the family Moronidae, which according to Chen et al. (2007), is closely related to Sciaenidae.

## 2.2. Laboratory Procedures

The total DNA was isolated using the commercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), following the manufacturer's recommendations. Six molecular markers were selected in the present analyses, including two mitochondrial sequences - Cytochrome Oxidase Subunit I (*COI*) and Cytochrome b (*Cyt b*) – and four nuclear regions: Rhodopsin (RH), Recombination Activation Gene 1 (*RAG1*), Early Growth Response Gene 1 (*EGR1*) and Early Growth Response Gene 2B (*EGR2B*) (Table 2).

The amplification via polymerase chain reaction (PCR) encompassed an initial denaturation step at 95 °C for 4 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing for 45 s and extension at 72 °C for 45 s, plus a final extension step at 72 °C for 5 min. Each PCR comprised 2 µl of dNTPs (1.25 mM), 1.25 µl of buffer (10x), 0.5 µl of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µl of each primer (50 ng/µl), 1 µl of template DNA (100 ng/µl), 0.1 µl of Taq DNA polymerase (5U/ µl) and purified water to a final volume of 15 µl.

The PCR products were purified with polyethylene glycol (PEG 8000) and ethanol (Paithankar and Prasad, 1991) and the reaction sequencing followed the dideoxy method using BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The sequences were read in ABI 3500 XL Genetic Analyzer Automatic sequencer (Applied Biosystems).

**Table 2.** Molecular markers and primers used in the study with their respective references.

<b>Locus/Primer</b>	<b>Primer sequence (5'-3')</b>	<b>Reference</b>
<b><i>COI</i></b>		
Fish F1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	Ward et al., 2005
Fish F1	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	Ward et al., 2005
<b><i>Cyt b</i></b>		
FishcytB F	ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAAC	Sevilla et al., 2007
TruccytB R	CCGACTTCCGGATTACAAGACCG	Sevilla et al., 2007
<b><i>RAG1</i></b>		
R1 2533F	CTGAGCTGCAGTCAGTACCATAAGATGT	López et al., 2004
R1 4090R	CTGAGTCCTTGTGAGCTTCCATRAAYTT	López et al., 2004
<b><i>Rhodopsin</i></b>		
RH 1F	ATGAACGGCACAGARGGAC	Chen et al., 2013
RH 1039R	TGCTTGTTTCATGCAGATGTAGA	Chen <i>et al.</i> , 2003
<b><i>EGR1</i></b>		
E1 290F	TMTCTTACACAGGCCGYTTCAC	Chen et al., 2008
E1 1118R	CTTCTTGTCCTTCTGCCGYAGRT	Chen et al., 2013
<b><i>EGR2</i></b>		
E2B ex1PcoF	CYAAAACCTTTGGAGAAAGTGC	Lo et al., 2015
E2B 1121R	CCTCAGGTGGATTTTAGTGTGTC	Chen et al., 2013

### 2.3. Sequence Editing and database

The DNA sequences were checked and edited in the software BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). The database was aligned in the online version of Mafft 7 (Kato et al., 2019), using default settings and concatenated in SequenceMatrix 1.8 (Vaidya et al., 2011). The best scheme of data partitioning and the respective evolutionary models of each partition were estimated in PartitionFinder 2 (Lanfear et al., 2017), using Bayesian Information Criterion (BIC) for the selection of the model, considering the codon position. PartitionFinder estimated a scheme with two partitions: partition 1 with the third codon position of Cyt b and COI; and Partition 2 with RH, EGR2B, RAG1, EGR1 and the first and second codon positions of COI and Cyt b.

### 2.4. Phylogenetic Analyses

The analysis of Maximum likelihood (ML) was performed in IQ-TREE (Nguyen et al., 2015) with 1,000 searches of the most likely tree and the support values on nodes were based on 1,000 bootstrap pseudo-replicates. We applied the HKY + I + G models for partition 1 and TIM + G for partition 2. The Bayesian Inference was performed in the software MrBayes 3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) applying the evolutionary models estimated in PartitionFinder, including two independent runs with four Markov Monte Carlo (MCMC) chains (one cold and three hot), 10 million generations, sampling the parameters every 1,000 generations and 20% of burn-in. The runs were evaluated in Tracer 1.7 (Rambaut et al., 2018).

### 2.5. Estimation of Divergence Time

We estimated the divergence time among the taxa in BEAST 1.8 (Drummond et al., 2012). The markers were regarded as unlinked evolutionary models and were estimated in IQ-TREE, as follows: Tn93+I+G for COI and Cyt b, HKY+I for EGR1, and HKY+G for RAG1, RH and EGR2B. An uncorrelated relaxed clock was used to estimate the length rates in branches using Yule process as prior of the tree. The molecular clock was calibrated at three points: 20.6 million years ago (Ma), as estimated by Lo et al. (2015) for the second transoceanic expansion of the Sciaenidae that restricts the time to the most recent common ancestor (tMRCA) of the clade that includes *Aplodinotus*, *Menticirrhus* and the lineage 11; the fossil of *Argyrosomus regius* from late Langhian period (Brzobohatý et al., 2007) for

restricting the clade tMRCA [*Argyrosomus regius* + *A. japonicas*] between 13.6 Ma and 15 Ma; and 7.5 Ma suggested by Lo et al. (2015) as a minimum separation time between *Menticirrhus undulatus* and *M. americanus*. We carried out a run with 500 million generations, sampling the parameters and trees at every thousand generations. We evaluated the convergence of runs in Tracer 1.7 (Rambaut et al., 2018) considering Effective Sample Size (ESS) values above 200 as satisfactory. A 20% burn-in was used and the trees were summarized in TreeAnnotator 1.7 (Drummond et al., 2012).

All trees were visualized and edited in FigTree 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### 3. RESULTS

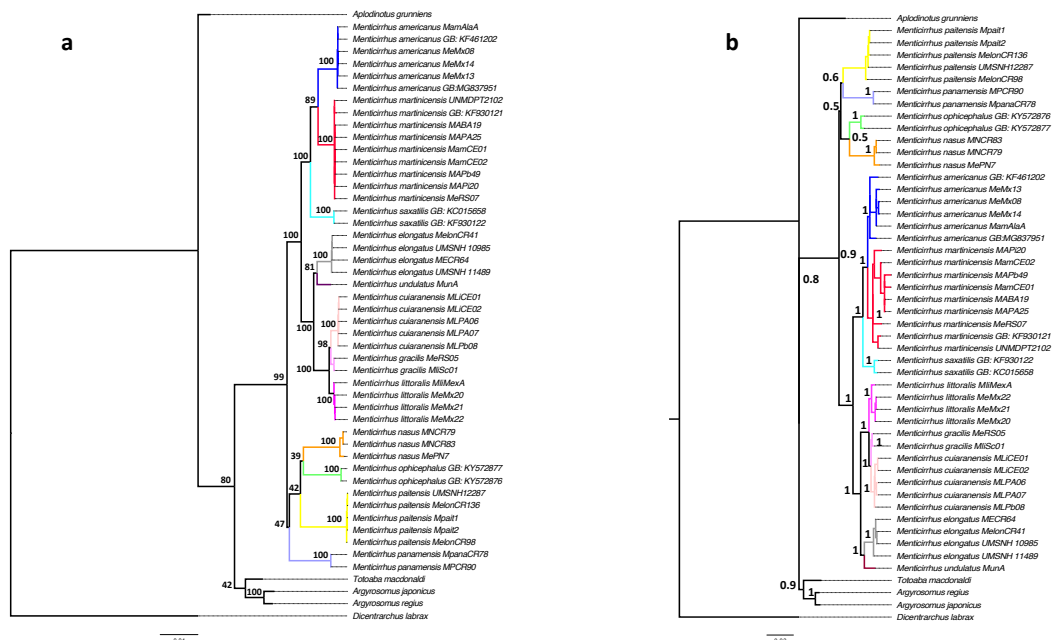
#### 3.1. Phylogenetic Relationships and Time of Divergence

The six molecular markers obtained from 50 specimens in this study generated a total database of 6,198 bp, of which 579 bp refer to COI, 1,014 to Cyt b, 828 bp to EGR1, 1,452 bp to EGR2B, 1,469 bp to RAG1 and 856 bp HR, with 1,151 variable sites and 762 informative sites for parsimony.

The phylogenetic tree based on ML and BI reliably supported with high statistic values the monophyly of *Menticirrhus*, as well as the monophyly of the current 12 species recognized in this genus (Figure 1). We recovered two main clades in *Menticirrhus*: (1) including *M. panamensis*, *M. ophicephalus*, *M. nasus* and *M. paitensis* and (2) encompassing the species *M. undulatus*, *M. elongatus*, *M. littoralis*, *M. cuiaranensis*, *M. gracilis*, *M. saxatilis*, *M. martinicensis* and *M. americanus*.

The phylogenetic relationships among the species of clade 2 were well supported in both topologies and suggest that *M. americanus* and *M. martinicensis* are sister species as well as a close relationship between this clade and *M. saxatilis*. In this clade, we also recovered *M. cuiaranensis* and *M. gracilis* as sister species being closely related to *M. littoralis*. The clade that integrates this last three species is sister of the clade [*M. undulatus* + *M. elongates*]. In clade 1, *M. nasus* and *M. ophicephalus* were recovered as sister species in both phylogenetic analyses (ML and BI) but with low support values. On the other hand, the topologies generated by ML and BI differed in relation to the position of *M. paitensis*.

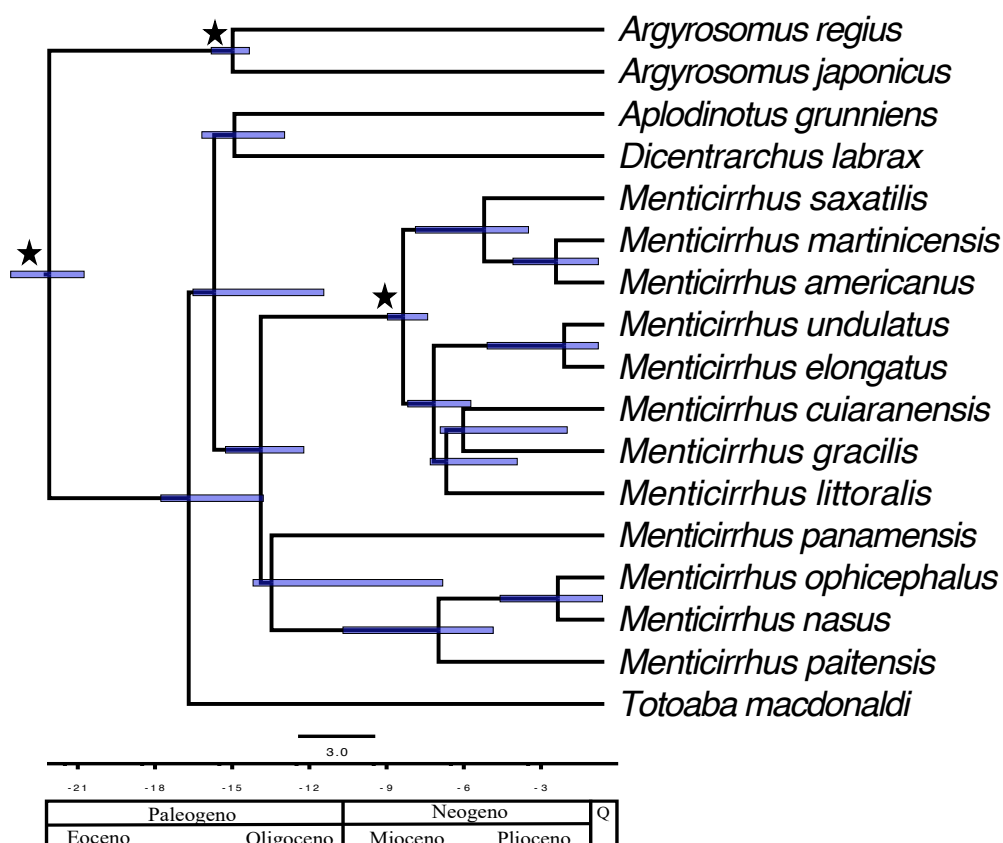
Whereas in ML inferences, this species appeared as a sister taxon of the clade [*M. nasus* + *M. ophicephalus*], in BI tree *M. paitensis* and *M. panamensis* were more closely related to each other.



**Figure 1.** Phylogenetic relationships of the genus *Menticirrhus* based on DNA sequences of six molecular markers (COI, Cyt b, RAG1, RH, EGR1 and EGR2B). The numbers on nodes refer to bootstrap and posterior probability values for the ML (a) and BI (b) trees, respectively.

Regarding to the time of divergence among clades, our estimate suggests that the most recent common ancestor (MRCA) of *Menticirrhus* emerged about 14.5 (HPD:10.4 - 15.2) million years ago, during the Middle Miocene. The two main clades appear to have diverged at 12.7 Ma (HPD: 11.1 - 14), with the diversification of clade 1 diversification starting from around 12.3 Ma (HPD: 6.0 - 13.0), being *M. panamensis* the first one to diverge. The clade 2 diverged at about 7.5 Ma originating two clades: one including *M. saxatilis*, *M. martinicensis* and *M. americanus*, and another encompassing *M. undulatus*, *M. elongatus*, *M. cuiaranensis*, *M. gracilis* and *M. littoralis*. According to this analysis, the species with the most recent divergence (< 2 Ma) were *M. martinicensis* and *M. americanus*, *M. undulatus* and *M. elongatus*, and *M. ophicephalus* and *M. nasus*. On the other hand, the species *M. littoralis*, *M. cuiaranensis* and *M. gracilis* diverged in the Atlantic Ocean at 5 Ma (Figure 2).





**Figure 2.** Estimation of divergence time among *Menticirrhus* species. The stars correspond to the calibration points in the molecular clock.

#### 4. DISCUSSION

The sciaenids represent a highly diversified fish family characterized by many uncertainties about their taxonomic, systematic and phylogenetic aspects. Here, we reported a thorough phylogeny of the genus *Menticirrhus*, a genus described in the middle of the 19<sup>th</sup> century, whose taxonomic studies have been developed almost exclusively based on morphological evidence. Formerly, nine species were recognized within *Menticirrhus*, but Marceniuk et al. (2020) revalidated two species and described a new species. In the present study, molecular information obtained from DNA sequences of mitochondrial and nuclear markers corroborated the current knowledge about the diversity of the genus, supporting the hypothesis of 12 valid species valid of *Menticirrhus*.

So far, the interspecific relationships of *Menticirrhus* were scarce since the phylogenetic reports using representatives of this genus were focused on resolving the

evolutionary relationships of Sciaenidae as a whole and included only two *Menticirrhus* species (Vinson et al., 2004; Santos et al., 2013; Lo et al., 2015). Invariably, both species have been recovered as reciprocally monophyletic groups. Later, Marceniuk et al. (2020) generated a ML tree based on COI marker, but since this inference used a single gene the relationships among taxa could not be properly inferred and, probably for this reason, these authors avoided discussing the phylogeny of *Menticirrhus*. On the other hand, the present report included information from six markers (four nuclear and two mitochondrial regions), representing therefore the most robust phylogenetic inference available in *Menticirrhus*.

The data herein obtained resolved the polytomy previously shown in the phylogenetic tree by Marceniuk et al., (2020), which lacked an outgroup. We also corroborated the cluster *M. martinicensis* + *M. americanus* + *M. saxatilis*, as well as the status of *M. elongatus* and *M. undulatus* as sister taxa in relation to the complex *Menticirrhus littoralis*, with high support values. Furthermore, the phylogenetic relationships among the species within the complex *Menticirrhus littoralis* were well defined, placing *M. cuiaranensis* as a sister group of *M. gracilis*, and this clade as closely related to *M. littoralis*.

Distinct hypotheses have been proposed about the relationships in the clade composed of *M. panamensis*, *M. nasus*, *M. ophicephalus* and *M. paitensis*. While Marceniuk et al. (2020) inferred that *M. nasus* was the first to diverge and *M. ophicephalus* should be a sister taxon of *M. paitensis*, we recovered *M. ophicephalus* and *M. nasus* as sister taxa while *M. panamensis* was less related to the other members in this clade. On the other hand, the Bayesian inference suggested a third arrangement, in which *M. ophicephalus* would be a sister group of *M. nasus*, while *M. panamensis* and *M. paitensis* should be closely related to each other. Unfortunately, the low support values on branches and the distinct position of taxa in each tree (Figure 1) hindered a reliable phylogenetic inference for this clade. Most likely, the poor resolution on nodes is related to the lack of additional genetic data in *M. ophicephalus*, once only COI sequences were available for this species, generating a large amount of missing data and incongruencies in the present analysis.

Our results also indicated that the species from Western Atlantic (*M. americanus*, *M. saxatilis*, *M. littoralis*, *M. cuiaranensis* and *M. gracilis*) are not a monophyletic group inasmuch as *M. littoralis*, *M. cuiaranensis* and *M. gracilis* composed a clade closely related to *M. undulatus* and *M. elongatus* from Eastern Pacific. Such relatedness between Atlantic and Pacific species are usually associated with taxa that have been separated by the uprising

of the Panama isthmus during Miocene, as formerly proposed for *M. littoralis* and *M. elongatus* (Jordan, 1908). Moreover, the estimated time of divergence suggested that both species were separated around 6.3 Ma (Fig. 2). Therefore, the total closure of the Panama isthmus (about 3 Ma) maintained these populations in isolation, eventually leading to allopatric speciation.

The analysis of divergence time also revealed that the most recent common ancestor (MMCA) of *Menticirrhus* appeared during Miocene around 14.5 Ma (HPD:10.4 – 15.2), while the diversification of this group has probably initiated about 12.7 Ma (HPD: 11.1 – 14). According to Lo et al., (2015), the MMCA of *Menticirrhus* has lived in Western Atlantic around 19.5 Ma, but the origin of the genus *Menticirrhus* has probably taken place in the Pacific Ocean, about 12.3 Ma.

The most recent speciation events (less than 2 Ma) were observed between *M. americanus* and *M. martinicensis*, *M. undulatus* and *M. elongatus*, and *M. ophicephalus* and *M. nasus*, i.e., after the closure of the Panama isthmus. According to previous data, several ecological, biological and historical features as well as the dynamics of the coastal regions could account for the speciation in Sciaenidae fishes, particularly those species found in Western Atlantic (da Silva et al., 2018; Pereira et al., 2009; Santos et al., 2003).

Accordingly, the evolutionary history of many coastal species might have been influenced by glacial and interglacial periods during Pleistocene that changed the seascape such as significant alterations in sea level (Durand et al., 2005). Since *M. americanus* is an estuarine species foraging over sandy bottom along the coastline (Haluch, 2008), this species could be particularly susceptible to past climate changes. In fact, the analysis of time divergence showed that the divergence between the former and *M. martinicensis* took place around 1.8 Ma. Therefore, the sea level changes during Pleistocene might have driven the population expansion and retraction of *M. americanus* along the South Atlantic coast (Freitas et al., 2017; Márquez et al., 2017).

Similar patterns of genetic structuring with divergent lineages in a single nominal taxon, including distinct “populations” between Mexico Gulf and the Caribbean, have been reported in other coastal and benthic fish groups like *Gobiomorus dormitor* (Eleotridae; Guimarães-Costa et al., 2017). Even pelagic species such as the tarpon *Megalops atlanticus* (Megalopidae; McMillen-Jackson et al., 2005) but with larvae and juveniles that depend on estuaries to develop (as also observed in *M. americanus*) or reef species like *Stegastes*

*partitus* (Pomacentridae; Sánchez et al., 2014) have been followed this pattern of divergence. In addition, the distribution of both species that compose the complex *Menticirrhus americanus*, as proposed by Marceniuk et al. (2020) fits the general biogeographic pattern reported by Robertson and Cramer (2014) for species from muddy or sandy bottoms, since *M. americanus* is restricted to the Northern Province (Southeastern coast of USA and Mexico Gulf) while *M. martinicensis* is found in Central and Southern Provinces (the Caribbean and Atlantic coast of South America). Similar events that have been inferred to explain the structuring of *M. americanus* could account for the speciation process in *M. gracilis* and *M. cuiaranensis* in Western Atlantic. According to our estimates, these species diverged from the sister taxon (*M. littoralis*) around 5.8 Ma. Furthermore, cases of speciation along the Western Atlantic coast have also been reported in *Macrodon* (Santos et al., 2003; 2006) and *Ophioscion* (da Silva et al., 2018).

## 5. CONCLUSION

This study represents most robust about phylogenetic inference among species of *Menticirrhus*. Based on a multiloci approach, we corroborate the monophyly of this genus, including the 12 species recognized so far. Moreover, we estimated the phylogenetic relationships among species of clade 2 (*M. undulatus*, *M. elongatus*, *M. littoralis*, *M. cuiaranensis*, *M. gracilis*, *M. saxatilis*, *M. martinicensis* and *M. americanus*) with high support values in all topologies. However, due to the absence of additional genetic information in *M. ophicephalus*, the relationships among species in clade 1 (*M. panamensis*, *M. ophicephalus*, *M. nasus* and *M. paitensis*) remained poorly resolved. According to the analysis of divergence time, *Menticirrhus* emerged at 14.5 Ma and has undergone two main diversification events around 12.3 Ma and 7.5 Ma.

## REFERENCES

- Brzobohatý, R., Nolf, D., Kroupa, O., 2007. Fish otoliths from the Middle Miocene of Kienberg at Mikulov, Czech Republic, Vienna Basin: their paleoenvironmental and paleogeographic significance. *Bull. l'Institut R. des Sci. Nat. Belgique, Sci. la Terre* 77, 167–196.
- Bussing, W.A., López, M.I., 1999. Peces demersales y pelágicos costeros del pacífico de Centro América meridional: guía ilustrada. *Rev. Biol. Trop.* 1–164.
- Chao, L.N., 1978. A Basis for Classifying Western Atlantic Sciaenidae (Teleostei: Perciformes). NOAA. Technical Report Circular.
- Chen, W., Ruiz-Carus, R., Ortí, G., 2007. Relationships among four genera of mojarras (Teleostei: Perciformes: Gerreidae) from the western Atlantic and their tentative placement among percomorph fishes. *J. Fish Biol.* 70, 202–218.
- da Silva, T.F., Schneider, H., Sampaio, I., Angulo, A., Brito, M.F.G., de Alcântara Santos, A.C., de Andrade Santos, J., Carvalho-Filho, A., Santos, S., 2018. Phylogeny of the subfamily Stelliferinae suggests speciation in *Ophioscion* Gill, 1863 (Sciaenidae: Perciformes) in the western South Atlantic. *Mol. Phylogenet. Evol.* 125, 51–61.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–1973.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- Durand, J.-D., Tine, M., Panfili, J., Thiaw, O.T., Lae, R., 2005. Impact of glaciations and geographic distance on the genetic structure of a tropical estuarine fish, *Ethmalosa fimbriata* (Clupeidae, S. Bowdich, 1825). *Mol. Phylogenet. Evol.* 36, 277–287.
- Figueredo, J.L., Menezes, N.A., 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. III. Teleostei (2). São Paulo, Mus. Zool. Univ. São Paulo, 90p.
- FREITAS, A. D. S. et al. The mitochondrial control region reveals genetic structure in southern kingcroaker populations on the coast of the Southwestern Atlantic. **Fisheries Research**, v. 191, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.03.008>
- Guimarães-Costa, A., Vallinoto, M., Giarrizzo, T., Angulo, A., Ruiz-Campos, G., Schneider, H., Sampaio, I., 2017. Exploring the molecular diversity of Eleotridae (Gobiiformes) using mitochondrial DNA. *J. Appl. Ichthyol.* 33, 572–578.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, in: *Nucleic Acids Symposium Series*. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., pp. 95–98.
- Haluch, C.F., 2008. Aspectos bionômicos da betara *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) na baía de Ubatuba-Enseada, São Francisco do Sul-SC, Brasil. PPG-Zoologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Parana.

Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D., 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 20, 1160–1166.

Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T., Calcott, B., 2017. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 34, 772–773.

Lo, P.-C., Liu, S.-H., Chao, N.L., Nunoo, F.K.E., Mok, H.-K., Chen, W.-J., 2015. A multi-gene dataset reveals a tropical New World origin and Early Miocene diversification of croakers (Perciformes: Sciaenidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 88, 132–143.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.03.025>.

Márquez, A., Solé-Cava, A.M., Pereira, A.N., Vasconcellos, A., Lessa, E.P., 2017. Deep genetic divergence in the Southern kingcroaker *Menticirrhus americanus* in its southernmost distribution. *Brazilian J. Oceanogr.* 65, 515–519.

McMillen-Jackson, A.L., Bert, T.M., Cruz-Lopez, H., Seyoum, S., Orsoy, T., Crabtree, R.E., 2005. Molecular genetic variation in tarpon (*Megalops atlanticus* Valenciennes) in the northern Atlantic Ocean. *Mar. Biol.* 146, 253–261.

Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Paithankar, K.R., Prasad, K.S., 1991. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res.* 19, 1346.

Pereira, A.N., Márquez, A., Marin, M., Marin, Y., 2009. Genetic evidence of two stocks of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in the Río de la Plata and oceanic front in Uruguay. *J. Fish Biol.* 75, 321–331.

Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M.A., 2018. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 67, 901–904.  
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>

Robertson, D.R., Cramer, K.L., 2014. Defining and dividing the greater Caribbean: insights from the biogeography of shorefishes. *PLoS One* 9, e102918.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>

Sánchez, C.A.V., España, H.P., Madrid, R.R., Monreal, D.S., González, J.E.A., 2014. Subtle genetic connectivity between Mexican Caribbean and south-western Gulf of Mexico reefs: the case of the bicolor damselfish, *Stegastes partitus*. *Coral Reefs* 33, 241–251.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467.

Santos, S., de Fátima Gomes, M., dos Santos Ferreira, A.R., Sampaio, I., Schneider, H., 2013. Molecular phylogeny of the western South Atlantic Sciaenidae based on mitochondrial and nuclear data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 423–428.

Santos, S., Schneider, H., Sampaio, I., 2003. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. *Genet. Mol. Biol.* 26, 151–161.

Vaidya, G., Lohman, D.J., Meier, R., 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27, 171–180.

## Appendix - Supplementary Material

TS1- Additional sequences obtained from GenBank and used in this study.

Taxa from GenBank	Code	Locality	Molecular Markers					
			<i>COI</i>	<i>Cyt B</i>	<i>RH</i>	<i>RAG1</i>	<i>EGR1</i>	<i>EGR2B</i>
<i>Menticirrhus americanus</i>	MamAlaA	Alabama, USA	KP722736	KP722647	KP723012	KP722923	KP722830	KP723103
	MamAlaB	Alabama, USA	KF461202	-	-	-	-	-
	MamBel	Belize	KF930121	-	-	-	-	-
	MamMexA	Mexico	MG837951	-	-	-	-	-
<i>Menticirrhus littoralis</i>	MliMexA	Mexico	MXV0279	-	-	-	-	-
<i>Menticirrhus ophicephalus</i>	MopA	Peru	KY572876	-	-	-	-	-
<i>Menticirrhus saxatilis</i>	MopB	Peru	KY572877	-	-	-	-	-
	MsaA	USA	KC015658	-	-	-	-	-
<i>Menticirrhus undulatus</i>	MsaB	USA	KF930122	-	-	-	-	-
	MunA	-	KP722737	KP722648	KP723013	KP722924	KP722831	KP723104
<b>Outgroup</b>								
<i>Aplodinotus grunniens</i>	-	-	KP722699	KP722606	KP722970	KP722882	KP722788	KP723062
<i>Argyrosomus japonicus</i>	-	-	KP722700	KP722607	KP722971	KP72288	KP722789	KP723063
<i>Argyrosomus regius</i>	-	-	KP722701	KP722608	KP722972	KP722884	KP722790	KP723064
<i>Totoaba macdonaldi</i>	-	-	KP722782	KP722693	KP723056	KP722963	KP722875	KP723145
<i>Dicentrarchus labrax</i>	-	-	FN689114	EU036430	Y18673	EF095651	KC442100	KC442134



## CAPÍTULO II

Neste capítulo, descrevemos o genoma mitocondrial de *Menticirrhus littoralis* e o posicionamos na família Sciaenidae com base em 15 marcadores genéticos desde genoma. O artigo está publicado no periódico *Mitochondrial DNA Part B*, sob o DOI: [doi.org/10.1080/23802359.2020.1772681](https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1772681)



**The Complete Mitochondrial Genome of *Menticirrhus littoralis* (Sciaenidae, Perciformes) and its Phylogeny**

Adrienne Freitas<sup>1</sup>, Jeferson Carneiro<sup>1,2</sup>, Aurycéia Guimarães-Costa<sup>2</sup>, Horacio Schneider<sup>1,2</sup>,  
Iracilda Sampaio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Genomics and Systems Biology Center, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil*

<sup>2</sup> *Institute of Coastal Studies, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de  
Bragança, Pará, Brazil.*

Corresponding author: Adrienne dos Santos Freitas

e-mail: [adriannefreitas@hotmail.com](mailto:adriannefreitas@hotmail.com)

Postal address: Genomics and Systems Biology Center, Universidade Federal do Pará,  
Avenida Augusto Corrêa, 66.075-110, Belém, Pará- Brasil.

**ABSTRACT**

We describe the mitochondrial genome of the *Menticirrhus littoralis* and infer the phylogenetic position of *Menticirrhus* in the family Sciaenidae. The genome contains 16,499 base pairs distributed in gene regions (13 protein-coding regions, 2 rRNAs and 22 tRNAs) and a control region (CR). Our phylogenetic analysis suggests, with strong statistical support, that *Menticirrhus* is a sister group of the other sciaenids.

Keywords: mtDNA, Phylogeny, *M. littoralis*, Fish, Perciformes

## 1. INTRODUCTION

The gulf kingfish, *Menticirrhus littoralis* (Holbrook, 1860), Perciformes of Sciaenidae, is widely distributed in the Western Atlantic, from the USA to Uruguay (Márquez et al., 2013). They are common in shallow and frequent waters as companion fauna in shrimp fishing (Menezes and Figueiredo, 1980). Previous research has been unable to define satisfactorily the phylogenetic position of the genus *Menticirrhus* in the family Sciaenidae (Chao, 1978; Sasaki, 1989; Santos et al., 2013; Lo et al., 2015), what is one of the objectives of this work besides the description of the complete mitochondrial genome of the species.

## 2. MATERIALS AND METHODS

One individual of *M. littoralis* collected in the Caeté River estuary (0 49'10" S 46 36'30" W) was used for genome sequencing and was deposited in the ichthyological collection of the Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), under voucher number MPEG 38936.

For DNA extraction was used the commercial Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega). We developed 20 primers pairs for the PCR, and we sequenced the samples by Sanger et al. (1977). The complete sequence was annotated in the MitoAnnotator (Iwasaki et al. 2013), and reevaluated the tRNAs in tRNAscan-SE1.21 (Lowe and Eddy 1997). The phylogenetic tree was based on the Maximum Likelihood in RAxMLGUI (Silvestro and Michalak 2012) using 13 PCGs and two rRNA genes.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The mitochondrial genome of *M. littoralis* (GenBank accession number: MT199157) has a total of 16,499 base pairs (bps), arranged in two rRNAs (12S and 16S), 13 protein-coding genes, 22 tRNAs, and a Control Region. The nucleotide composition of the adenine is 26.3%, 32% cytosine, 16.9% guanine and 24.8% thymine. The size, structural organization, and location of the different components of the mitogenome are consistent with those of other organisms (Anderson et al. 1981).

The start codon of all coding regions is ATG, that is, the amino acid Methionine, a variety of stop codons, and in many cases are incomplete stop codon T or TA, which can

presumably be completed to TAA via post-transcriptional polyadenylation (Ojala et al. 1981).

As in other vertebrates, the 12S and 16S ribosomal genes are located between tRNA-Phe and tRNA-Leu (UUR), and all 22 tRNAs can be folded into typical cloverleaf secondary structures, except for tRNA-Ser (AGY), which lacks the DHU stem.

The Control Region has a total length of 824 bps, and has a higher than average A + T content (62.2%) in comparison with the mitogenome as a whole (51.1%), which found to be a characteristic of the Percoidae (Xu et al. 2011).

The phylogenetics result of present study placed *M. littoralis* as a sister group of all the other sciaenids analyzed, with strong statistical support (Figure 1). This finding provide new insights into the phylogenetic position of *Menticirrhus* within the family Sciaenidae, in addition to contributing to the understanding of the evolutionary history of the sciaenids through the sequencing of fish mitogenomes.

### **Acknowledgements**

We thank Dra. Luciana Watanabe for assistance with laboratory work and Dra. Fabiola Seabra for help with taxonomy and sample processing.

### **Disclosure statement**

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

### **Data availability statement**

The whole mitochondrial genome are available at NCBI with the GenBank accession no. MT199157.

### **Funding**

This work was supported by funds provided by CAPES -PROAM 3296/2013 and CNPq (grants 306233/2009 -6 to I. Sampaio, and 369 473341/2010 -7 and 305645/2009 -9 to H. Schneider).

### **REFERENCES**

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, et al. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290 (5806): 457–465.

- ChaoLN. 1978. A basis for classifying Western Atlantic Sciaenidae (Teleostei: Perciformes). NOAA. Technical Report Circular. 415:1–64.
- IwasakiW, FukunagaT, IsagozawaR, YamadaK, MaedaY, SatohTP, SadoT, MabuchiK, TakeshimaH, MiyaM, et al. 2013. MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Mol Biol Evol.* 30 (11): 2531–2540.
- LoP-C, LiuS-H, ChaoNL, NunooFKE, MokH-K, ChenW-J. 2015. A multi-gene dataset reveals a tropical New World origin and Early Miocene diversification of croakers (Perciformes: Sciaenidae). *Mol Phylogenet Evol.* 88: 132–143.
- LoweTM, EddySR. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25 (5): 955–964.
- MárquezA, PereiraAN, Solé-CavaAM. 2013. Confirmación Molecular y Diversidad Genética de *Menticirrhus littoralis* (Osteichthyes, Sciaenidae) En Aguas Uruguayas. *Bol. la Soc. Zoológica Del Uruguay.* 22: 32–38.
- MenezesNA, FigueiredoJL. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV. Teleostei (3). São Paulo: Museu de Zoologia. Universidade de São Paulo; p. 96.
- OjalaD, MontoyaJ, AttardiG. 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondrial. *Nature.* 290 (5806): 470–474.
- SangerF, NicklenS, CoulsonAR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74 (12): 5463–5467.
- SantosS, de Fátima GomesM, dos Santos FerreiraAR, SampaioI, SchneiderH. 2013. Molecular phylogeny of the western South Atlantic Sciaenidae based on mitochondrial and nuclear data. *Mol Phylogenet Evol.* 66 (1): 423–428.
- SasakiK. 1989. Phylogeny of the family Sciaenidae, with notes on its zoogeography (Teleostei, Perciformes). *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 36 (1–2): 1–137.
- SilvestroD, MichalakI. 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Org Divers Evol.* 12 (4): 335–337.
- XuT, ChengY, SunY, ShiG, WangR. 2011. The complete mitochondrial genome of bighead croaker, *Collichthys niveatus* (Perciformes, Sciaenidae): structure of control region and phylogenetic considerations. *Mol Biol Rep.* 38 (7): 4673–4685.



### CAPÍTULO III

Este capítulo consiste em um artigo com a descrição do genoma mitocondrial de *Menticirrhus martinicensis* e posição filogenética em Sciaenidae. Este trabalho será submetido a revista científica *Mitochondrial DNA Part B*.





**The Complete Mitochondrial Genome of *Menticirrhus martinicensis* (Sciaenidae, Perciformes) and its Phylogeny**

Adrienne Freitas<sup>1</sup>, Jeferson Carneiro<sup>1,2</sup>, Iracilda Sampaio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Genomics and Systems Biology Center, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil*

<sup>2</sup> *Institute of Coastal Studies, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Bragança, Pará, Brazil.*

Corresponding author: Adrienne dos Santos Freitas

e-mail: [adriannefreitas@hotmail.com](mailto:adriannefreitas@hotmail.com)

Postal address: Genomics and Systems Biology Center, Universidade Federal do Pará, Avenida Augusto Corrêa, 66.075-110, Belém, Pará- Brasil.

### **The Complete Mitochondrial Genome of *Menticirrhus martinicensis* (Sciaenidae, Perciformes) and its Phylogeny**

We describe the mitochondrial genome of the *Menticirrhus martinicensis* and infer the phylogenetic position of *Menticirrhus* in the family Sciaenidae. The genome contains 16,504 base pairs distributed in gene regions (13 protein-coding regions, 2 rRNAs and 22 tRNAs) and a control region (CR). Our phylogenetic analysis suggests that *Menticirrhus* is monophyletic and is a sister group of the *Paralichthys*.

Keywords: mtDNA, Phylogeny, *M. martinicensis*, Fish, Perciformes

## INTRODUCTION

The specie *Menticirrhus martinicensis* (Cuvier, 1830) is one of six representatives of the genus in the western Atlantic, found in the estuarine environment from the Caribbean to Argentina (Marceniuk et al., 2020). Prior to redescription, individuals who are now *M. martinicensis* were considered *M. americanus*, which occurs from the USA to the Gulf of Mexico. These fishes are estuarine, common in sandy and muddy bottoms of the coastal zone, being targeted by both commercial fisheries and recreational anglers (Chao, 1995). Phylogeographic study with *M. americanus* detected genetic substructure on the western Atlantic coast (Freitas et al., 2017), also observed in other sciaenids that occur in the area (da Silva et al., 2018; Rodrigues et al., 2014; Santos et al., 2006, 2003). In the present study, we describe the mitochondrial genome of *M. martinicensis* and infer its phylogenetic relationship with others in the family Sciaenidae (TS1).

## MATERIAL AND METHODS

One individual of *M. martinicensis* collected in the Caeté River estuary (0 49'10" S 46 36'30" W) was used for genome sequencing and was deposited in the ichthyological collection of the Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), under voucher number MPEG 38937.

For DNA extraction was used the commercial Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega). We used 13 primer pairs designed for *M. littoralis* (Freitas et al., 2020) and 10 more specific for *M. martinicensis* for the PCR (TS2), and we sequenced the samples by Sanger et al., (1977). The complete sequence was annotated in the MitoAnnotator (Iwasaki et al., 2013), and reevaluated the tRNAs in tRNAscan-SE1.21 (Lowe and Eddy, 1997). The phylogenetic tree was based on the Maximum Likelihood in IQ-Tree (Nguyen et al., 2015) using 13 PCGs and two rRNA genes. The sequences were aligned in MAFFT online (Katoh et al., 2019), and edited manually in BioEdit (Hall, 1999). The markers were concatenated in SequenceMatrix (Vaidya et al., 2011), and PartitionFinder v. 2 (Lanfear et al., 2017) was used to identify the optimal data partitioning and evolutionary models (TS3).

## RESULTS AND DISCUSSION

The mitochondrial genome of *M. martinicensis* has a total of 16,504 base pairs (bps), arranged in two rRNAs (12S and 16S), 13 protein-coding genes, 22 tRNAs, and a Control Region (FS1). The nucleotide composition of the adenine is 26.7%, 32% cytosine, 16.7% guanine and 24.6% thymine (TS4). The size, structural organization, and location of the different components of the mitogenome are consistent with those of other organisms (Anderson et al., 1981).

The start codon of all coding regions is ATG (TS5), that is the amino acid Methionine, a variety of stop codons, and in many cases are incomplete stop codon T or TA, which can presumably be completed to TAA via post-transcriptional polyadenylation (Ojala et al., 1981).

As in other vertebrates, the 12S and 16S ribosomal genes are located between tRNA-Phe and tRNA-Leu (UUR), and all 22 tRNAs can be folded into typical cloverleaf secondary structures, except for tRNA-Ser (AGY), which lacks the DHU stem. The Control Region has a total length of 822 bps, and has a higher than average A + T content (61.9%) in comparison with the mitogenome as a whole (51.3%), which found to be a characteristic of the Percoidae (Xu et al., 2011).

We analyzed 18 of the 67 genera of Sciaenidae and inferred the phylogenetic relationships between them. The results show strong support for most branches (Fig. 1) and point to the *Menticirrhus* monophyletic status, in addition to its close relationship with *Paralichthys*, corroborating Chao (1978). The *Menticirrhus martinicensis* / *M. littoralis* clade appears as the sibling of the other analyzed sciaenids, and *Aplodinotus* as sibling group of the *Sciaenops*, however the non-significant bootstrap support, keeps *Menticirrhus* phylogenetic position in Sciaenidae uncertain as Lo et al., (2015).

**Acknowledgements**

We thank Dra. Luciana Watanabe for assistance with laboratory work and Dra. Fabiola Seabra for help with taxonomy and sample processing.

**Funding**

This work was supported by funds provided by CAPES -PROAM 3296/2013 and CNPq (grants 306233/2009 -6 to I. Sampaio, and 369 473341/2010 -7 and 305645/2009 -9 to H. Schneider).

**Disclosure of interest**

The authors report no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465.
- Chao, L.N., 1978. A basis for classifying Western Atlantic Sciaenidae (Teleostei: Perciformes). NOAA. Technical Report Circular. 415:1–64.
- Chao, N.L., 1995. Sciaenidae: Corvinas, barbiches, bombaches, corvinatas, corvinetas, corvinillas, lambes, pescadillas, roncachos, verrugatos, in: Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K.E., Niem, V.H. (Eds.), *Guía FAO Para La Identificación de Especies Para Los Fines de La Pesca: Pacífico Centro-Oriental Volumen III. Vertebrados-Parte 2*. FAO, Roma, Italia, pp. 1427–1518.
- da Silva, T.F., Schneider, H., Sampaio, I., Angulo, A., Brito, M.F.G., de Alcântara Santos, A.C., de Andrade Santos, J., Carvalho-Filho, A., Santos, S., 2018. Phylogeny of the subfamily Stelliferinae suggests speciation in *Ophioscion* Gill, 1863 (Sciaenidae: Perciformes) in the western South Atlantic. *Mol. Phylogenet. Evol.* 125, 51–61.
- Freitas, A., Carneiro, J., Guimarães-Costa, A., Schneider, H., Sampaio, I., 2020. The complete mitochondrial genome of *Menticirrhus littoralis* (Sciaenidae, Perciformes) and its phylogeny. *Mitochondrial DNA Part B* 5, 2286–2287.
- Freitas, A.D.S., da Silva, R., Sampaio, I., Schneider, H., 2017. The mitochondrial control region reveals genetic structure in southern kingcroaker populations on the coast of the Southwestern Atlantic. *Fish. Res.* 191. doi.org/10.1016/j.fishres.2017.03.008
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, in: *Nucleic Acids Symposium Series*. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., pp. 95–98.
- Iwasaki, W., Fukunaga, T., Isagozawa, R., Yamada, K., Maeda, Y., Satoh, T.P., Sado, T., Mabuchi, K., Takeshima, H., Miya, M., 2013. MitoFish and MitoAnnotator: A mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2531–2540.
- Lo, P.-C., Liu, S.-H., Chao, N.L., Nunoo, F.K.E., Mok, H.-K., Chen, W.-J., 2015. A multi-gene dataset reveals a tropical New World origin and Early Miocene diversification of croakers (Perciformes: Sciaenidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 88, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.03.025>
- Lowe, T.M., Eddy, S.R., 1997. tRNAscan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence. *Nucleic Acids Res.* 25, 955–964. <https://doi.org/10.1093/nar/25.5.955>

Marceniuk, A.P., Caires, R.A., Rotundo, M.M., Cerqueira, N.N.C.D., Siccha-Ramirez, R., Wosiacki, W.B., Oliveira, C., 2020. Taxonomic revision of the *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) and *M. littoralis* (Holbrook, 1847)(Percomorphacea: Sciaenidae) species complexes from the western Atlantic. *Zootaxa* 4822, 301–333.

Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Ojala, D., Montoya, J., Attardi, G., 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290, 470–474.

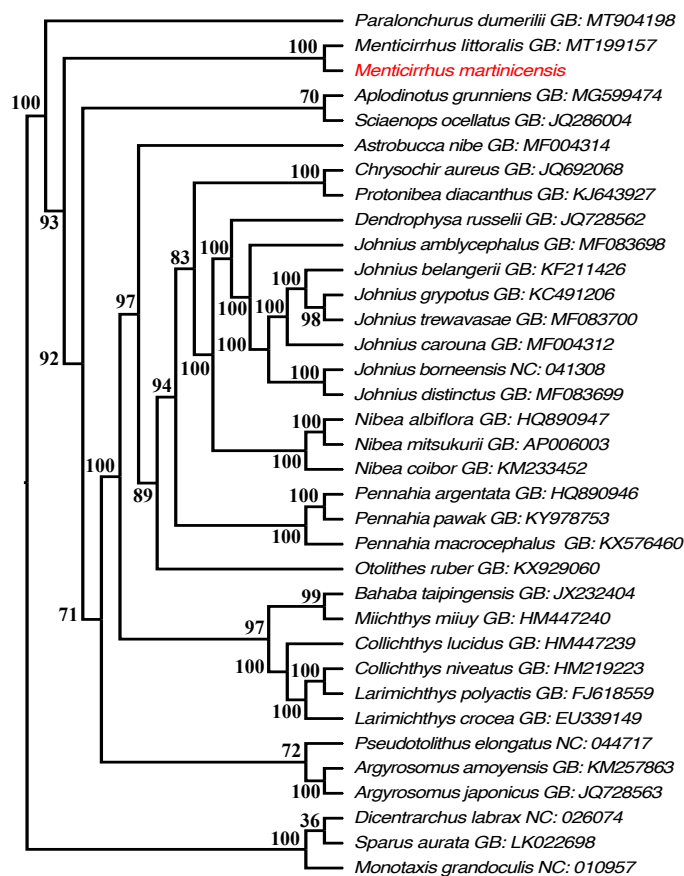
Rodrigues, R., Santos, S., Haimovici, M., Saint-Paul, U., Sampaio, I., Schneider, H., 2014. Mitochondrial DNA reveals population structuring in *Macrodon atricauda* (Perciformes: Sciaenidae): a study covering the whole geographic distribution of the species in the southwestern Atlantic. *Mitochondrial DNA* 25, 150–156. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.792053>

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467.

Santos, S., Hrbek, T., Farias, I.P., Schneider, H., Sampaio, I., 2006. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Mol. Ecol.* 15, 4361–4373.

Santos, S., Schneider, H., Sampaio, I., 2003. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. *Genet. Mol. Biol.* 26, 151–161.

Xu, T., Cheng, Y., Sun, Y., Shi, G., Wang, R., 2011. The complete mitochondrial genome of bighead croaker, *Collichthys niveatus* (Perciformes, Sciaenidae): structure of control region and phylogenetic considerations. *Mol. Biol. Rep.* 38, 4673–4685.



**Figure 1.** The Maximum Likelihood topology of the Sciaenidae, based on the mitogenome, showing the phylogenetic position of *M. martinicensis* (in red). Numbers at nodes represent bootstrap values in percentage. Values below 70% are not shown. The tree is rooted with *Monotaxis grandoculis*, *Dicentrauchus labrax* and *Sparus aurata*. GB is the GenBank Accession Number.





**Table S1.** List of species included in the phylogenetic analysis, with the respective accession numbers.

Species	Accession Number NCBI/GenBank
<i>Aplodinotus grunniens</i>	MG599474
<i>Argyrosomus amoyensis</i>	KM257863
<i>Argyrosomus japonicus</i>	JQ728563
<i>Astrobucca nibe</i>	MF004314
<i>Bahaba taipingensis</i>	JX232404
<i>Chrysochir aureus</i>	JQ692068
<i>Collichthys lucidus</i>	HM447239
<i>Collichthys niveatus</i>	HM219223
<i>Dendrophysa russelii</i>	JQ728562
<i>Dicentrarchus labrax*</i>	NC026074
<i>Johnius amblycephalus</i>	MF083698
<i>Johnius belangerii</i>	KF211426
<i>Johnius borneensis</i>	NC041308
<i>Johnius carouna</i>	MF004312
<i>Johnius distinctus</i>	MF083699
<i>Johnius grypotus</i>	KC491206
<i>Johnius trewavasae</i>	MF083700
<i>Larimichthys crocea</i>	EU339149
<i>Larimichthys polyactis</i>	FJ618559
<i>Menticirrhus littoralis</i>	MT199157
<i>Menticirrhus martinicensis</i>	This study
<i>Miichthys miiuy</i>	HM447240
<i>Monotaxis grandoculis*</i>	NC010957
<i>Nibea albiflora</i>	HQ890947
<i>Nibea coibor</i>	KM233452
<i>Nibea mitsukurii</i>	AP006003
<i>Otolithes ruber</i>	KX929060
<i>Paralonchurus dumerilii</i>	MT904198
<i>Pennahia argentata</i>	HQ890946
<i>Pennahia macrocephalus</i>	KX576460
<i>Pennahia pawak</i>	KY978753
<i>Protonibea diacanthus</i>	KJ643927
<i>Pseudolithus elongatus</i>	NC044717
<i>Sciaenops ocellatus</i>	JQ286004
<i>Sparus aurata*</i>	LK022698

\* correspond to the outgroup

**Table S2.** Primers used to amplify the *M. martinicensis* mitochondrial genome.

Primers	Fragment Size (bp)	Region of genome	Sequence (5'-3')
MLIT1F	1015	tRNA-Phe to 16S rRNA	GGCCAAGTTGCGTCCGTAATAAC
MLIT1R	-		GGGCATTCTCACAGGGGTGCGG
MLIT2F	1061	12S rRNA to 16S rRNA	CGAGGGCTTGACTGTCTCCC
MLIT2R	-		GGGGAGGAAGTGGAGGGGGCGG
MLIT3F	919	ND1 to tRNA-Met	CCCTCGCCATCATGCCACTAAT
MLIT3R	-		GCGTCAGGGTGTTGTCTGAG
MLIT4F	499	tRNA-Ile to ND2	CGCCCGACATGGCATTCCCTCG
MLIT4R	-		GGCCGATGGCCATCATGGCCC
MLIT5F	1084	ND2 to COI	GGCCTTTCCGCCAAACGAG
MLIT5R	-		GCCGAGCTGAGCAGGATGGGCC
MLIT6F	918	COI to COII	GCCCGCAGTAGCAATCCTCAC
MLIT6R	-		CCTGGTGATTGGAAGTCACT
MLIT7F	967	COII to ATPase 6	GACTTCACGGCTGCCBCCHCC
MLIT7R	-		TTTAGCTTAAAAGGCTAAYGC
MLIT8F	1129	tRNA-Lys to COIII	CGGCTTCTTCCAACCGTCATC
MLIT8R	-		CGGCAGATGTGGGCTACGGATG
MLIT10F	1136	ND3 to ND4	CACCACTTCGGATTYGAAGCRGC
MLIT10R	-		GTTGTGTGGTTTTGGCTTGCRAG
MLIT11F		ND4	AAAGCCTATCAGARACAGGBTGAAC
MLIT11R			GGAGTGGGGGGAGGGCNAGGTTGGC
MLIT12F	1395	ND4 to ND5	CTATTYTGCCTHGCCAAAYACAA
MLIT12R	-		TAGDGCKGAGACBGGNGTGGG
MLIT13F	1296	ND5 to ND6	ATYRGCTGATGAHATGGCCG
MLIT13R	-		CCTYGYTGGGHRRTTGCTTGT
MLIT15F	1242	CYT B to RC	GGYTTGAAAAACCVCCGTTGT
MLIT15R	-		GGTTTACAAGACCGRYGCTCTGA
Mame 1F		RC to 12S rRNA	GGCCAAGTTGCGTCCGTAATAAC
Mame 1R			GGGCATTCTCACAGGGGTGCGG
Mame 2F		16S rRNA to ND1	CGAGGGCTTGACTGTCTCCC
Mame 2R	-		GGGGAGGAAGTGGAGGGGGCGG
Mame 3F	721	ND2	CCCTCGCCATCATGCCACTAAT
Mame 3R	-		GCGTCAGGGTGTTGTCTGAG
Mame 4F	521	COI	CGCCCGACATGGCATTCCCTCG
Mame 4R	-		GGCCGATGGCCATCATGGCCC
Mame 5F	847	COII	GGCCTTTCCGCCAAACGAG
Mame 5R	-		GCCGAGCTGAGCAGGATGGGCC
Mame 6F	955	COIII to ND3	GCCCGCAGTAGCAATCCTCAC
Mame 6R	-		CCTGGTGATTGGAAGTCACT
Mame 7F	904	ND5	CGCCCTAACAGGAGCAGGGACCC
Mame 7R	-		GCGGCAAGGATCAGGCCA
Mame 8F	325	ND6 to CYT B	CGGCTTCTTCCAACCGTCATC
Mame 8R	-		CGGCAGATGTGGGCTACGGATG
Mame 9F	-	ND4 to ND5	CGCCCTAACAGGAGCAGGGACC
Mame 9R	-		GCGGCAAGGATCAGGCCTAGG
Mame 10F		RC to 12S rRNA	GCCCCGGGTTTTTGC GCGTTA
Mame 10R			GGGCATTCTCACAGGGGTGCGG

**Table S3.** Scheme of data partition and evolutionary models.

Subset	Best Model	Sites	Partition Names
1	SYM + I+ G	1985	COI_pos1, COI_pos1, ND4L_pos1, COII_pos1
2	GTR +I+ G	1737	ATPase8_pos2
3	TVM +I+ G	1156	ND6_pos3
4	GTR + I+G	1251	ND3_pos1, ND4_pos2, ND2_pos2, ND4L_pos2, ATP6_pos2
5	GTR + I + G	2977	COI_pos3, ND3_pos3, ND4L_pos3, COIII_pos2, ND1_pos3, ND5_pos3, ATPase6_pos3, ATPase8_pos3, ND2_pos3, ND4_pos3
6	GTR + I + G	1249	ND6_pos1, ATPase8_pos1, ND5_pos1
7	GTR + I + G	1098	COI_pos2, ND1_pos2, COIII_pos2
8	TRN + I + G	226	COII_pos2
9	HKY + I + G	226	COIII_pos3
10	GTR + I + G	538	Cyt b_pos1, ND6_pos3
11	TVM + I + G	366	Cyt b_pos2
12	K80+I+G	685	Cyt b_pos3
13	GTR + I + G	746	ND5_pos2, ND6_pos2

Pos: the position of the codon

**Table S4.** Base composition of the *M. martinicensis* mitochondrial genome.

Gene/Region	Composition (%)				
	T	C	A	G	A+T
<i>Protein coding</i>					
1st	24,6	32,2	27,1	16,2	51,7
2 nd	24,4	32,6	26,4	16,7	50,8
3 rd	25,0	31,2	26,7	17,1	51,7
Total	24,6	32,0	26,7	16,7	51,3
tRNA	20,9	26,5	31,9	20,8	54,3
sRNA	20,9	26,5	31,9	20,8	52,8
Control Region	30,3	21,4	31,6	16,7	61,9
Overall	24,6	32	26,7	16,7	51,3

**Table S5** - Characteristics of the mitochondrial genome of *M. martinicensis*.

Gene	Position		Size(bp) Nucleotids	Amin Acid	Codon		Intergenic Nucleotide**	Strand
	From	To			Start	Stop*		
tRNA <sup>Phe</sup>	1	62	62				0	H
12S rRNA	63	1017	955				0	H
tRNA <sup>Val</sup>	1018	1089	72				0	H
16S rRNA	1090	2799	1710				0	H
tRNA <sup>Leu(TAA)</sup>	2800	2873	74				0	H
ND1	2876	3847	972	324	ATG	TAA	2	H
tRNA <sup>Ile</sup>	3852	3919	68				4	H
tRNA <sup>Gln</sup>	3919	3989	71				-1	L
tRNA <sup>Met</sup>	3989	4057	69				-1	H
ND2	4058	5103	1046	348	ATG	TA-	0	H
tRNA <sup>Trp</sup>	5104	5174	71				0	H
tRNA <sup>Ala</sup>	5176	5244	69				2	L
tRNA <sup>Asn</sup>	5247	5319	73				37	L
tRNA <sup>Cys</sup>	5357	5419	66				3	L
tRNA <sup>Tyr</sup>	5423	5492	70				8	L
COI	5501	7057	1557	519	ATG	AGA	-4	H
tRNA <sup>Ser(TGA)</sup>	7053	7124	72				3	L
tRNA <sup>Asp</sup>	7128	7196	69				4	H
COII	7201	7891	691	230	ATG	T--	0	H
tRNA <sup>Lys</sup>	7892	7965	74				1	H
ATPase8	7967	8134	168	56	ATG	TAA	-8	H
ATPase6	8125	8813	688	229	ATG	TA-	0	H
COIII	8814	9598	785	261	ATG	TA-	0	H
tRNA <sup>Gly</sup>	9599	9669	71				0	H
ND3	9670	10015	346	115	ATG	T--	0	H
tRNA <sup>Arg</sup>	10016	10084	69				0	H
ND4L	10085	10381	297	99	ATG	TAA	-5	H
ND4	10375	11755	1381	460	ATG	T--	0	H
tRNA <sup>His</sup>	11756	11824	69				0	H
tRNA <sup>Ser(GCT)</sup>	11825	11892	68				4	H
tRNA <sup>Leu(TAG)</sup>	11897	11969	73				0	H
ND5	11970	13808	1839	613	ATG	TAA	-2	H
ND6	13805	14326	522	173	ATG	TAA	0	L
tRNA <sup>Glu</sup>	14327	14395	69				4	L
Cyt b	14400	15404	1005	335	ATG	TAA	135	H
tRNA <sup>Thr</sup>	15539	15610	72				2	H
tRNA <sup>Pro</sup>	15613	15682	70				0	L
Control Region	15683	16504	822					

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese reuniu uma série de informações sobre o gênero *Menticirrhus*. A partir de dados moleculares investigamos as relações filogenéticas entre as espécies, posicionamos o gênero na família Sciaenidae e descrevemos o genoma mitocondrial de duas das 12 espécies que o representam.

- *Menticirrhus* é um gênero monofilético, porém as espécies do Pacífico oriental não;
- O ancestral do gênero data de 14.5 milhões de anos atrás, durante o Mioceno;
- O soerguimento e fechamento do Istmo do Panamá foi responsável pela atual distribuição das espécies;
- Com dados multiloci corroboramos a ocorrência dos complexos *Menticirrhus americanus* e *M. littoralis* proposto por estudo anterior;
- Os *Menticirrhus* são divididos em dois principais grupos: um com *M. undulatus*, *M. elongatus*, *M. littoralis*, *M. cuiaranensis*, *M. gracilis*, *M. saxatilis*, *M. americanus* e *M. martinicensis*, que divergiu há 12.3 Ma, e outro com *M. panamensis*, *M. ophicephalus*, *M. nasus* e *M. paitensis*, com tempo de divergência estimado em 7.5 Ma;
- A primeira espécie a divergir foi *M. panamensis*;
- As relações filogenéticas interespecíficas do clado dois não foram bem apoiadas, provavelmente devido falta de dados;
- Em relação a posição filogenética de *Menticirrhus* na família Sciaenidae, de acordo com 15 marcadores mitocondriais, o gênero é irmão de *Paralonchurus*;

- O genoma mitocondrial de *M. littoralis* (atualmente *M. cuiaranensis*) possui 16,499 e a composição nucleotídica é de 26.3% de adenina, 32% de citosina, 16.9% de guanina e 24.8% de timina.
- O genoma mitocondrial de *M. martinicensis* possui 16.504 pb e a composição nucleotídica é de 26.7% de adenina, 32% de citosina, 16.7% de guanina e 24.6% de timina.