

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E FENÉTICAS ENTRE ALGUMAS ESPÉCIES  
BRASILEIRAS DO GÊNERO *ACHIRUS* (PLEURONECTIFORMES:  
ACHIRIDAE) BASEADAS NO ESTUDO DE ISOENZIMAS

Maria Elisabeth de Araújo

ABSTRACT

Phylogenetic and phenetic relationships among some Brazilian species of the genus *Achirus* (Pleuronectiformes: Achiridae) based on isoenzymes studies. Phenetic and cladistic analyses were made on genetic data obtained by starch gel electrophoresis of isoenzymes in order to produce phylogenetic hypotheses for 5 species of *Achirus*, and 7 others species (used as out-group) of 4 genera from 3 families of pleuronectiform fishes from the coast of Paraíba and the Tocantins river (State of Pará). Ten enzyme systems were analyzed as the result of the translation of 15 gene loci. For the phenetic analysis, a matrix of pairwise genetic identities was computed from which an UPGMA dendrogram was constructed. For the cladistic analyses, two different approaches were used: the first one was to consider the allele as a binary character, which was analyzed using a Wagner parsimony algorithm ("implicit enumeration" analysis of the HENNIG 86 program); the other approach was to use the locus as a character, and treat the alleles as its different states in a transformation series, where mutation, fixation and elimination of each allele were treated as evolutionary novelties, and the heterozygotes were used as clues for the ordering of the series. The phylogenetic position of the species of *Symphurus*, *Citharichthys* and *Etropus*, as well as the relationships between these species and the group *Achirus-Trinectes* were the same both in the phenetic and in the cladistic analyses. Conversely, the position of *A. achirus* and *Trinectes paulistanus* in relation to the other four species of *Achirus* studied was ambiguous, depending on the approach used. In this case the transformation series analysis produced the tree which, together with one of the two most parsimonious Wagner trees, was most consistent with the conventional taxonomy of the family. Two species of *Achirus* and one of *Citharichthys*, collected in the State of Pará, are different from those of Paraíba and probably represent three new species.

**Keywords:** isoenzymes, zymograms, cladistic analysis, phenetics, Pleuronectiformes, *Achirus*.

**Descritores:** isoenzimas, zimogramas, análise cladística, fenética, Pleuronectiformes, *Achirus*.

INTRODUÇÃO

As relações filogenéticas dentro do gênero *Achirus* são desconhecidas, como acontece para outras espécies de Pleuronectiformes, e mesmo as posições das famílias dentro da ordem ainda não estão bem definidas (LAUDER e LIEM, 1983; CHAPLEAU, 1993). A sistemática dos linguados brasileiros (com cerca de 35 espécies

conhecidas) particularmente é ainda muito confusa, principalmente quanto às espécies de Soleidae (CARVALHO et al., 1968).

LAUDER e LIEM (1983) apresentam uma proposta de relações filogenéticas para a ordem Pleuronectiformes, onde as quatro famílias que ocorrem no Brasil: Pleuronectidae, Bothidae, Soleidae e Cynoglossidae formam um grupo monofilético, incluindo a família Rhombosoleidae (embora não figure no cladograma do citado trabalho). A monofilia do grupo está baseada na perda dos dentes do vômer e na fusão das membranas branquiostegais.

HENSLEY e AHLSTROM (1983) resumem as idéias de diversos autores sobre as relações de Pleuronectiformes na forma de um cladograma baseado num modelo que chamaram de "Regan-Norman", que é sustentado pelos trabalhos de REGAN (1910, 1929) e NORMAN (1934). Estes trabalhos foram modificados por estudos mais recentes (HUBBS, 1945; AMAOKA, 1969, *apud* HENSLEY e AHLSTROM, 1983; FUTCH, 1977; HENSLEY, 1977). HENSLEY e AHLSTROM (1983) discutem o modelo "Regan-Norman" com base em caracteres dos ovos, das larvas e dos adultos.

CHAPLEAU (1993) polarizou 39 caracteres morfológicos, principalmente osteológicos, obtendo 18 árvores igualmente parcimoniosas, e discutiu detalhadamente a de consenso, que foi dividida em 7 linhagens. A linhagem I assegura a monofilia de Psettoidei e está separada da linhagem II, que contém os outros linguados. A linhagem III compartilha o arco hemal fundido com o centro da 2ª vértebra pré-ural, ocorrendo uma reversão desta característica em Achiridae. A politomia desta linhagem deve-se ao conhecimento insuficiente das interrelações dos grupos que a compõem, segundo o autor. Na linhagem IV, a ausência do arco e espinho neural na 1ª vértebra é uma sinapomorfia do grupo. Os linguados da linhagem VI (Soleidae, Achiridae e Cynoglossidae) e VII (Soleidae e Cynoglossidae) formam grupos monofiléticos com base em 3 e 7 autapomorfias, respectivamente.

Apesar de alguns autores considerarem Pleuronectiformes um grupo polifilético, principalmente devido à subordem Psettoidei, a maioria concorda com sua monofilia (CHAPLEAU, 1993). Este autor sustenta a monofilia por três caracteres sinapomórficos: assimetria do crânio associada à migração ocular, posição avançada da nadadeira dorsal sobre o crânio e a presença de *recessus orbitalis*.

Na análise cladística da ordem Pleuronectiformes, CHAPLEAU e KEAST (1988) refutam o *status* monofilético de Soleidae, com base principalmente na dextralidade de todas as espécies, e mostram que cada subfamília de Soleidae (Achirinae e Soleinae) é monofilética e consideram que elas devem ser elevadas ao nível de família. Para esses autores, Soleinae está mais estreitamente aparentada com Cynoglossidae do que com Achirinae.

A propósito, o catálogo de gêneros de peixes recentes (ESCHMEYER, 1990) aceita a validade da família Achiridae, na qual posiciona os gêneros *Achirus* e *Trinectes*, entre outros.

CHAPLEAU (1993) segue a classificação apresentada no trabalho de HENSLEY e AHLSTROM (1983), além de apontar o citado trabalho como a síntese mais recente na classificação, filogenia e morfologia larval dos Pleuronectiformes, e o seu artigo como o primeiro a analisar cladisticamente as interrelações em Pleuronectiformes, com

exceção daquele de LAUDER e LIEM (1983), que se baseou em dados limitados.

A sistemática bioquímica tem sido largamente usada em todo o mundo (BUTH, 1984; SITES et al., 1984). Ela vem servindo como instrumento para identificação de espécies não resolvidas pela sistemática clássica (BUCKLIN e HEDGECOCK, 1982; ALAYSE, 1987; SOLÉ-CAVA e LEVY, 1987), e na determinação de relações filogenéticas dos grupos (BAVERSTOCK et al., 1979; BUTH, 1984; HUDON e GUDERLEY, 1984; MENDES e BIANCONCINI, 1989).

Os caracteres bioquímicos são comumente tratados através de métodos fenéticos que unem os grupos por índices de similaridade ou identidade gênica. Estes métodos têm sido freqüentemente criticados porque a "não metricidade" das medidas de distância mais empregadas as torna inconvenientes para a dedução de árvores filogenéticas (SCHEEPMARKER et al., 1988). Para MURPHY (1993) o uso de distância para a obtenção de "cladogramas" nada mais é que "fenogramas" expressando uma quantidade mínima de distorções como uma representação bidimensional de uma matriz de dados. CROTHER (1990) questionou os métodos baseados em freqüências gênicas por serem temporariamente instáveis, podendo resultar em hipóteses erradas de reconstrução filogenética. O problema, segundo este autor, está em dar o mesmo peso aos eventos de mutações genéticas e aos mecanismos não-hereditários, como seleção natural e deriva, que podem alterar as freqüências. Além disso, tanto o coeficiente de distância de NEI (1972) quanto o método de agrupamento não ponderado de pares (UPGMA) (SOKAL e SNEATH, 1973) requerem a admissão de taxas evolutivas homogêneas (BUTH, 1984; ROGERS, 1986). Contudo, os valores de distância e identidade gênica de NEI (combinados ou não com o método UPGMA) têm sido largamente usados por diversos autores de estudo de especiação e de estimativa do tempo de divergência (SBORDONI et al., 1980; SIEGISMUND et al., 1985; BERT, 1986, *apud* SCHEEPMARKER et al., 1988).

O tratamento do alelo como caráter foi primeiramente usado por MICKEVICH e JOHNSON (1976), que empregaram um esquema de codificação, onde cada alelo é reconhecido como um caráter com dois estados possíveis: presente (se sua freqüência for maior que 0,05) ou ausente (menor que 0,05) (BUTH, 1984).

Na metodologia de análise de PATTON e AVISE (1983), cinco categorias agruparam diferentes tipos de eletromorfos (através do estudo de locos), dentro de uma visão cladística, conforme segue: (1) presença de um único eletromorfo, (2) uma vez determinado o caráter plesiomórfico, os outros eletromorfos definem estados de caracteres autapomórficos ou, (3) definem grupos monofiléticos distintos indicados por sinapomorfias ou, (4) grupos monofiléticos "ambíguos" definidos por sinapomorfias e (5) plesiomórfico não determinado. SITES et al. (1984), por sua vez, utilizaram dois critérios para determinar os estágios ancestral e derivado dos caracteres. No primeiro, o caráter compartilhado pelo "out-group" e "in-group" foi considerado simplesiomórfico. No segundo, o eletromorfo mais comum no "in-group" era o ancestral. Todos os eletromorfos remanescentes foram tratados como autapomórficos ou sinapomórficos.

MURPHY (1993) afirmou que, apesar da codificação dos "alelos independentes" (MICKEVICH e MITTER, 1981, *apud* MURPHY, 1993) ter sido considerada inválida, ainda persiste como método dominante e contestou os autores por considerarem que

os estados dos caracteres são "combinações alélicas"; uma vez que os ganhos e perdas têm o mesmo peso e a probabilidade de falsear os nós que agrupam os eventos de perda por homoplasia é alta. Assim, MURPHY (1993) redefiniu o estado apomórfico para dados aloenzimáticos e propôs um "modelo de mutação" de arranjos alélicos, onde tanto o heterozigoto, quanto o homozigoto apomórfico são considerados o mesmo estado (devido à presença do alelo apomórfico) e o descreveu usando quatro estágios e denominando-o de "quadraphenic evaluation procedure". Contudo, MURPHY (1993) admitiu que o seu modelo é, na prática, difícil de ser empregado.

Alguns outros pontos são discutidos na análise cladística de caracteres eletroforéticos, como o fato do peso dado a um eletromorfo raro ser o mesmo de um abundante (PATTON e AVISE, 1983) ou a dificuldade de estabelecer os estágios primitivo e derivado de caracteres bioquímicos (BRUSH, 1979). O número relativamente pequeno de sinapomorfias não apresenta problemas quanto ao grau de confiança de cladogramas construídos a partir de dados eletroforéticos se há séries de transformação bem definidas (SITES et al., 1984). BUTH et al. (1984, *apud* PATTON e AVISE, 1983) constatarem que, apesar de raramente as séries de transformação serem raramente estabelecidas, elas foram usadas com êxito para inferir nas relações filéticas intergenéticas a partir de dados eletroforéticos em pássaros (AVISE et al., 1980) e mamíferos (PATTON et al., 1981; HONEYCUTT e WILLIAMS, 1982, *apud* PATTON e AVISE, 1983). As preocupações sobre o erro amostral e o "perigo" da falta de alelos importantes para a filogenia (sinapomorfias), discutidas por SWOFFORD e BERLOCHER (1987), permanecem e requerem estudos futuros, afirmou MURPHY (1993).

Este trabalho objetiva: (a) usar padrões eletroforéticos de isoenzimas para a formulação de hipóteses de relações filogenéticas entre as espécies marinhas e de água doce brasileiras do gênero *Achirus*, (b) comparar as hipóteses de interrelações entre as espécies estudadas obtidas na análise fenética e filogenética dos dados eletroforéticos, (c) caracterizar morfológicamente as espécies aqui estudadas, uma vez que suas identificações, com base na literatura, são por vezes duvidosas, e (d) utilizar os eletromorfos para identificar as espécies crípticas, no caso *Achirus* e *Citharichthys* oriundos do Pará.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os peixes utilizados para este trabalho foram coletados nos estuários e mangues dos Rios da Ribeira (Município de Livramento) e Paraíba (Municípios de Cabedelo e Santa Rita), nas proximidades da Ilha do Stuart (Municípios de Cabedelo e Santa Rita, Paraíba), na costa da cidade de João Pessoa (Paraíba), aproximadamente 7° S e 35° W, e no Rio Tocantins, à montante da Represa de Tucuruí (Município de Cametá, Pará), aproximadamente 2,5° S e 50,5° W (Tab. 1).

A captura dos peixes foi realizada com arrastos de 20 a 50 metros de extensão em cada lance ao longo da margem do estuário ou da praia, preferencialmente na maré zero. Os peixes coletados foram imediatamente acondicionados num recipiente de isopor contendo gelo até chegar ao Laboratório de Ictiologia do Departamento de Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba, em João Pessoa (PB), onde

TABELA 1 – Dados sobre a data e o local das coletas realizadas neste estudo.

N <sup>o</sup>	Data	Local
01	14.vi.88	Praia de Ponta do Mato, Mun. Cabedelo, PB
02	18.vi.88	Praia do Jacaré, Mun. Cabedelo, PB
03	21.vi.88	Praia do Jacaré, Mun. Cabedelo, PB
04	07.vii.88	Ilha Santa, Mun. Santa Rita, PB
05	07.vii.88	Rio Paraíba, Mun. Cabedelo e Santa Rita, PB
06	08.vii.88	Rio Paraíba, Mun. Cabedelo e Santa Rita, PB
07	18.ii.89	Rio da Ribeira, Mun. Livramento, PB
08	22.ii.89	Rio Paraíba, Mun. Cabedelo, PB
09	09-16.v.89	Rio Tocantins, Mun. Cametá, PA
10	02.vi.89	Praia de Tambaú, Mun. João Pessoa, PB
11	03.vi.89	Rio Paraíba, Mun. Cabedelo, PB
12	05.vi.89	Praia de Tambaú, Mun. João Pessoa, PB
13	06.vi.89	Praia de Tambaú, Mun. João Pessoa, PB
14	13.vi.89	Rio Paraíba, Mun. Cabedelo, PB
15	06.x.89	Rio Tocantins, Mun. Cametá, PA
16	22.ii.90	Praia Formosa, Mun. Cabedelo, PB
17*	22.ii.90	Rio Paraíba, Mun. Cabedelo e Santa Rita, PB
18*	10.iii.90	Praia de Tambaú, Mun. João Pessoa, PB
19*	16.iii.90	Praia de Tambaú, Mun. João Pessoa, PB

\*Coletas para tentar igualar o tamanho das amostras por espécie.

permaneciam congelados no freezer à temperatura de  $-18$  a  $-20$  °C. Como as eletroforeses foram realizadas no Laboratório de Genética Marinha do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal Fluminense (UFF), em Niterói (RJ), o transporte aéreo dos exemplares foi feito em recipiente de isopor contendo gelo seco. O mesmo tratamento foi dado aos peixes oriundos do Pará, porém utilizando-se gelo comum.

O número de indivíduos capturados por espécie para cada coleta, encontra-se na Tab. 2. As enzimas testadas estão apresentadas na Tab. 3, que indica o número de indivíduos por espécie para cada tecido e enzima estudados.

Sempre que possível, o número mínimo de 15 indivíduos por espécie foi utilizado para o estudo morfológico. O número de indivíduos estudado para cada espécie está de acordo com o necessário para a análise de identidade gênica, de 2 a 8, apesar de ser pequeno para estimativas de nível de variação gênica, de 5 a 12 (GORMAN e RENZI, 1978).

Antes de se iniciar a retirada dos tecidos para as eletroforeses, os indivíduos foram medidos e suas características morfológicas externas anotadas para permitir a identificação das espécies. Foram utilizadas principalmente as chaves de identificação de espécies de MENEZES e FIGUEIREDO (1994), para as espécies de Soleidae e Bothidae, e a de MUNROE (1987), para aquelas de Cynoglossidae, e comparadas com

TABELA 2 – Distribuição do número de indivíduos por espécie em cada coleta, utilizando a convenção especificada na Tab. 1. ((Aa) *A. achirus*, (Ad) *A. declivis*, (Al) *A. lineatus*, (Asp1) *Achirus* sp 1, (Asp2) *Achirus* sp 2, (Tp) *T. paulistanus*, (Cs) *C. spilopterus*, (Csp) *Citharichthys* sp. (Ec) *E. crossotus*, (Sp) *S. plagusia*, (St) *S. tessellatus*. A coluna da esquerda (Lo) identifica o local de coleta dos espécimes).

Lo	Aa	Ad	Al	Asp1	Asp2	Tp	Cs	Csp	Ec	Sp	St	Total
01		02	04									06
02	01		04								03	08
03											01	01
04							16					16
05	04	07	11			04	02			02	20	50
06	01											01
07	06		13									19
08	12						08				02	22
09				03	01			11				15
10							03		02		03	08
11	03						07					10
12			05						02	02		09
13		03	05			16	01		02	20	14	61
14						10	08					18
15					02							02
16										01		01
17			03			03					03	09
18		02							03	03		08
19						03						03
Total	27	14	35	03	03	36	45	11	09	28	46	257

as chaves de CARVALHO et al. (1968), CERVIGÓN (1966, 1982), CHABANAUD (1940, 1941), GUITART (1979), GUTHERZ (1978), RANDALL e VERGARA (1978), RIBEIRO (1915) e ROUX (1973).

As indicações das medidas usadas no estudo morfométrico de todos os linguados de um representante da família Soleidae, encontra-se na Fig. 1. Além das medidas morfométricas, os exemplares apresentaram o número de raios das nadadeiras e de linhas ou bandas transversais contados, sempre que estas características foram consideradas importantes para a identificação dos espécimes. Em todos os exemplares também foram observados coloração, formato do corpo e das nadadeiras, tipo de escamas, continuidade ou não das nadadeiras dorsal com a caudal e anal e posição dos olhos. Todos os exemplares aqui estudados encontram-se tombados na Coleção de Ictiologia da UFPB sob os números de 2032 a 2099.

Amostras de músculo estriado e fígado foram retiradas, envolvidas em plástico fino autocolante e papel alumínio e guardadas a aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da eletroforese. Para obtenção dos homogenados, pequenas amostras foram maceradas com igual quantidade de água destilada, usando-se bastões de vidro em orifícios de 4mm de diâmetro e 3mm de profundidade numa placa de acrílico posta sobre um recipiente plástico contendo gelo para evitar a desnaturação das proteínas.

TABELA 3 – Número de exemplares estudados eletroforeticamente, por tecidos e enzimas. (Os nomes das espécies estão abreviados conforme Tab. 2. Os números entre parênteses indicam a quantidade de exemplares analisados. (M) músculo, (F) fígado, (TEC) tecido, (ENZ) enzima. As enzimas abreviadas e citadas nesta tabela constam na Tab. 4).

TEC	ENZ/SP	ESPÉCIES										
		Aa (15)	Ad (11)	Al (26)	Asp1 (03)	Asp2 (03)	Tp (09)	Cs (24)	Csp (05)	Ec (06)	Sp (10)	St (33)
F	ACP	07	06	10	02	03	09	09	03	09	07	10
F	D-EST	07	02	10	02	03	11	08	03	08	07	10
F	GDH	07	03	08	03	03	08	03	01	02	06	03
M	a-GPD	08	03	04	02	01	08	05	03	01	03	03
F	GOT	07	03	07	02	01	07	05	04	02	06	07
M	IDH	06	06	10	02	02	11	07	04	09	07	10
M	LDH	08	05	07	02	03	03	02	00	07	03	06
M	ME	08	03	07	01	01	08	05	04	02	07	07
M	PGD	08	03	07	01	01	08	05	02	02	02	07
M	PGI	08	03	07	02	01	08	05	04	02	03	07

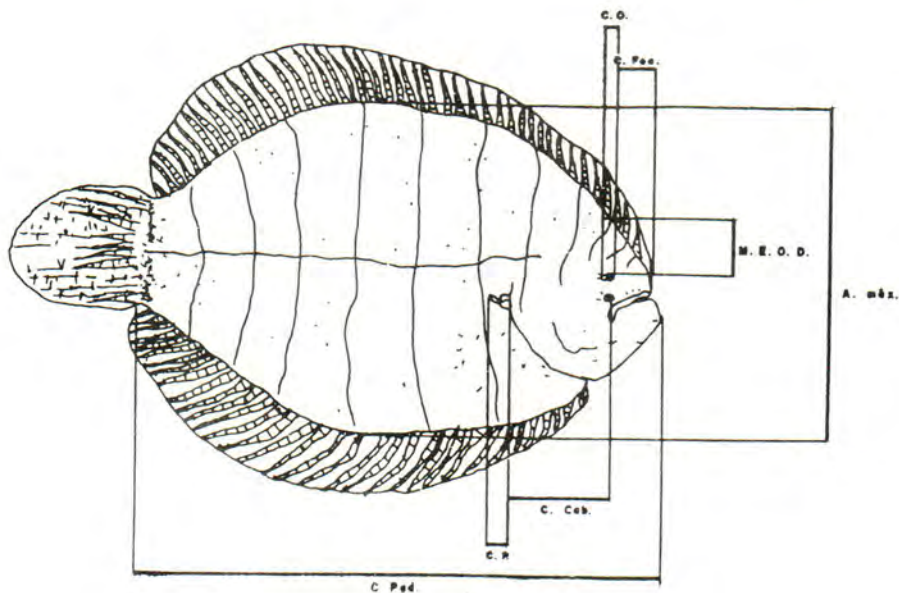


FIGURA 1 – Medidas utilizadas no estudo morfométrico. (C. Pad., comprimento padrão; C. Cab., comprimento da cabeça; C. Foc., comprimento do focinho; C. P., comprimento da nadadeira peitoral; C. O., comprimento do olho; A. máx., altura máxima; M.E.O.D., medida entre o olho e a nadadeira dorsal).

A metodologia utilizada neste trabalho foi eletroforese horizontal em gel de amido a 12,5% desenvolvido por SMITHIES (1955, 1959), com a posterior coloração histoquímica específica para cada sistema isoenzimático estudado.

O sistema de tampão usado para as cubas foi TC 8,0: Tris (0,2M), ácido cítrico (0,02M), água destilada (1l) descrito por WARD e BEARDMORE (1981). Foram diluídos 8,5ml deste tampão em 212ml de água destilada para a preparação do gel. As eletroforeses transcorreram a uma temperatura média de 4 °C dentro de um refrigerador. O sistema de placa com gel e cubas foi ligado a uma fonte de corrente contínua (marca Permatron). A eletroforese manteve-se sob potência constante de 3W até a chegada do azul de bromofenol à extremidade anódica, usualmente após cinco horas de corrida. O limite de 3W foi escolhido para evitar o aquecimento do gel pelo efeito Joule.

A escolha dos tecidos a serem testados em uma ou outra espécie deveu-se tanto aos conhecimentos prévios sobre especificidade tissular em Pleuronectiformes (MARKERT e HOLMES, 1969), quanto aos testes iniciais realizados no laboratório da Universidade Federal Fluminense. Nestes testes, amostras de músculo esquelético, fígado e coração de três representantes de cada espécie estudada foram submetidos a eletroforese, sendo os dois primeiros selecionados por apresentar melhor resolução. O número de indivíduos por espécie e por enzima estudados para músculo esquelético ou fígado estão na Tab. 3. O nome, a abreviatura, a estrutura terciária e os números seguiram a recomendação do IUBNCE (1978) para as enzimas estudadas (Tab. 4). A estrutura está baseada nos padrões observados nos heterozigotos. Nas enzimas monoméricas, a estrutura terciária é inferida dos dados da literatura para outras espécies de peixes.

TABELA 4 – Relação dos nomes, abreviações, estruturas e número, segundo IUBNCE (1980), das enzimas estudadas. (N.C.E. = "Number of the Comm. Enzymes"; (mono) monomérica, (di) dimérica, (tetra) tetramérica).

Nome da Enzima	Abrev.	N.C.E.	Estrutura
Esterases-D	D-EST	3.1.1.1	Di
Enzima málica	ME	1.1.1.40	Tetra
Fosfatases ácidas	ACP	3.1.3.2	Mono/Di
Fosfoglicose isomerase	PGI	5.3.1.9	Di
Fosfogluconato desidrogenase	6-PGD	1.1.1.44	Di
Glicerol-3-fosfato desidrogenase	a-GPD	1.1.1.8	Tetra
Glutamato desidrogenase	GDH	1.4.1.3	Mono/Di
Glutâmico-oxalacético-	GOT	2.6.1.1	Di
Isocitrato desidrogenase	IDH	1.1.1.42	Di
Lactato desidrogenase	LDH	1.1.1.27	Tetra

Inicialmente foram testadas as seguintes enzimas: aspartato aminotransferase (AAT), catalase (CAT), enzima málica (ME), fosfatases ácidas (ACP), fosfoglicose iso-



merase (PGI), fosfogliconato desidrogenase (PGD), fosfoglicomutase (PGM), glutamato desidrogenase (GDH),  $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase ( $\alpha$ -GPD), hexoquinase (HK), isocitrato desidrogenase (IDH), lactato desidrogenase (LDH), leucina aminopeptidase (LAP), malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD) e xantina oxidase (XOD). Seguem, de forma resumida, as fórmulas das soluções reveladoras (HARRIS e HOPKINSON, 1978) para as enzimas cujos zimogramas apresentaram maior facilidade de interpretação.

- 30ml de Tris (hidroximetil aminometano) maleato (0,2 M, pH 5,7); 20mg de metilumbeliferil acetato dissolvido em 0,5ml de acetona. Visualizar sob luz ultravioleta (300nm).
- 30ml de Tris HCl (ácido clorídrico) (0,02M, pH 8,0); 50mg de malato de sódio; 8mg de NADP (nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato); 10mg de  $MgCl_2$  (cloreto de magnésio); 5mg de MTT (metil tiazol tetrazolium); 1mg de PMS (fenazina metossulfato).
- 30ml de citrato (0,05M, pH 4,5); 30mg de  $\alpha$ -naftil fosfato.
- 30mg de "fast garnet" GBC.
- 30ml de Tris HCl (0,02M, pH 8,0); 25mg de frutose-6-fosfato; 25mg de  $MgCl_2$ ; 3mg de NADP; 5mg de MTT, 25 $\mu$ l de G6PDH; 1mg de PMS.
- 30ml de Tris HCl (0,02M, pH 8,0); 20mg de fosfogluconato de bário; 5mg de NADP; 10mg de  $MgCl_2$ ; 5mg de MTT; 1mg de PMS.
- 30ml de Tris HCl (0,02M, pH 8,0), 150mg de  $\alpha$ -glicerofosfato de sódio; 10mg de  $MgCl_2$ ; 15mg de NAD (nicotinamina adenina dinucleotídeo); 5mg de MTT; 1mg de PMS.
- 30ml de Tris HCl (0,02M, pH 8,0), 200mg de glutamato de sódio; 20mg de NAD; 5mg de  $MgCl_2$ ; 5mg de MTT; 1mg de PMS.
- 30ml de Tris HCl (0,02M, pH 8,0); 80mg de aspartato de sódio; 30mg de  $\alpha$ -cetoglutarato de sódio; 5mg de piridoxal 5-P; 80mg de polivinil pirlodona; 50mg de "fast blue" BB.
- 30ml de Tris HCl (0,02M, pH 8,0); 30mg de isocitrato; 5mg de MnCl (cloreto de manganês); 5mg de NADP; 5mg de MTT; 1mg de PMS.
- 30ml de Tris HCl (0,02M, pH 8,0); 15mg de NAD; 7mg de MTT; 1mg de PMS; 100 $\mu$ l de lactato de sódio.

O desenho das bandas era feito quando elas estavam fortes o bastante para serem identificadas no gel. A solução reveladora era então trocada pela fixadora, para estacionar a reação. A solução de fixação utilizada era o ácido acético a 7% para as desidrogenases ou uma solução de 5 partes de  $H_2O$  destilada, 5 de metanol e 1 de ácido acético para as outras enzimas.

Alguns géis foram fotografados como forma de documentação, porém a nitidez das bandas pode se perder neste método. Assim, os géis foram diafanizados entre duas folhas de papel celofane previamente embebidas em glicerol a 10% por um período mínimo de 2h. Esse conjunto foi então estendido em placa de vidro, de maneira que não formasse bolhas de ar. Os géis fixados dessa maneira podem ser estocados a seco por longos períodos de tempo (NUMACHI, 1981). As frequências genotípicas das populações foram obtidas por contagem direta nos géis (Tabs. 11 e 12). A partir destas

freqüências foram calculadas as freqüências gênicas (Tab. 13) para cada loco e cada espécie da seguinte forma:

$$f_{A_{xy}} = [2 fAA_{xy} + \sum(fAZ_{xy})]/2N, \text{ onde}$$

$f_{A_{xy}}$ : freqüência do alelo A no loco x na espécie y.

$fAA_{xy}$ : freqüência de homocigotos para o alelo A.

$\sum(fAZ_{xy})$ : somatório das freqüências de heterocigotos entre o alelo A e os outros alelos do loco.

N: número de indivíduos na amostra.

As freqüências gênicas obtidas foram usadas para o cálculo de índices de identidade gênica para eliminar o desvio do estudo corrigido de pequenas amostras (NEI, 1978). A análise fenética, nesse caso, é interpretada como refletindo um padrão evolutivo baseado-se na hipótese do relógio molecular (THORPE, 1982, 1983).

Para a análise dos dados genéticos foi usado o programa BIOSYS (SWOFFORD e SELANDER, 1981). As matrizes de identidade foram usadas para a construção de dendrogramas através do método das médias não ponderadas (UPGMA) (SNEATH e SOKAL, 1973). A escolha de UPGMA deveu-se principalmente à sua maior precisão em relação a outros métodos fenéticos de estimativas de filogenia (ROHLF e WOOTEN, 1988), além de ser o método mais empregado em sistemática bioquímica.

Os locos das espécies de *Achirus* foram tratados como caracteres e comparados com aqueles de *Trinectes* e *Symphurus*, *Citharichthys* e *Etropus*, que são considerados como grupo-irmão e grupos externos, respectivamente, de acordo com estudos de LAUDER e LIEM (1983) para as famílias correspondentes. BAVERSTOCK et al. (1979), WHITT (1987), MUNROE (1987), MOREIRA (1989) e MURPHY (1993) concordam que o critério mais adequado ao tratamento cladístico de padrões eletroforéticos é aquele do "out-group". Portanto, a polarização dos caracteres seguiu os métodos de comparação com os grupos externos ou "out-groups", segundo WATROUS e WHEELER (1981) e MADDISON et al. (1984).

Para o estudo cladístico, dois métodos diferentes foram usados: o primeiro considera o alelo como um caráter binário, que foi analisado usando o algoritmo de parcimônia de Wagner (FARRIS, 1970), através da enumeração implícita do programa HENNIG 86. Este método, apesar de simples, tem sido criticado por violar o pressuposto da independência dos caracteres (MURPHY e ROGERS, 1982; BUTH, 1984; MURPHY, 1993). O segundo método utiliza o loco como um caráter e trata os alelos como estágios diferentes de uma série de transformação, onde os heterocigotos são os indicadores das mutações e o critério do "out-group".

Para a obtenção da série de transformação dos alelos em cada loco, os seguintes critérios foram adotados:

- 1) O alelo presente nas espécies estudadas e nos "out-groups" foi considerado como o mais plesiomórfico.
- 2) O aparecimento de um novo alelo a partir da mutação do alelo mais plesio-

mórfico foi evidenciado pelos indivíduos heterozigotos, constituindo o estado intermediário (heterozigoto) da série de transformação do alelo.

- 3) Quando não houve representante heterozigoto, a série de transformação foi baseada na congruência dos outros caracteres isoenzimáticos e na obediência à subordinação dos grupos.
- 4) A fixação do novo alelo implicou na eliminação do alelo mais plesiomórfico e foi considerada como o estado mais apomórfico da série.
- 5) Em alguns casos, a série de transformação continuou passando de um segundo alelo para um terceiro, quarto, quinto e assim por diante, através de mutações sucessivas. Neste caso, a série foi interpretada de acordo com a subordinação dos grupos.
- 6) Em outros casos, quando um passo evolutivo (mutação do alelo) foi verificado para um único grupo, o caráter foi tratado como uma autapomorfia para o mesmo.
- 7) Quando um único alelo originou mais de um alelo em momentos evolutivos distintos, cada mutação iniciou uma série de transformação independente.
- 8) Quando um alelo apomórfico caracterizou um determinado grupo monofilético e um dos grupos subordinados apresentou um alelo mais plesiomórfico, o caráter foi tratado como uma reversão<sup>(1)</sup>.
- 9) Os caracteres mais plesiomórficos das séries de transformação e comuns tanto ao "in-group" como ao "out-group" foram indicados no cladograma, pois podiam tratar-se de sinapomorfias em seus níveis basais.
- 10) Quando não foi possível determinar o estado plesiomórfico, apenas os caracteres autapomórficos foram usados para sustentar os grupos monofiléticos e assinalados no cladograma construído a partir dos caracteres cujas séries de transformação foram analisadas, como sugerido por PATTON e AVISE (1983).

A Tab. 16 apresenta as séries de transformação fornecidas neste trabalho. A primeira coluna indica a possível mutação dos alelos, enquanto a segunda refere-se à eliminação do alelo plesiomórfico ou à fixação do alelo apomórfico. Como este trabalho envolve um estudo populacional, entende-se por eliminação de um alelo a modificação de sua frequência gênica abaixo de um nível detectável pela técnica utilizada.

## RESULTADOS

### 1. Dados merísticos e morfométricos

Os dados merísticos e morfométricos foram agrupados por famílias, mesmo que o pequeno número de espécies estudadas possa não representá-las. As tabelas de números 5 a 10 encontram-se organizadas da seguinte maneira: o primeiro valor é a média, os valores mínimo e máximo encontram-se em forma de intervalo, entre parênteses, e o último valor representa o número de indivíduos amostrados para aquela medida ou contagem especificada na linha da tabela. Os dados merísticos de *Achirus* e

*Trinectes* (Tab. 5) e de *Citharichthys*, *Etropus* e *Symphurus* (Tab. 6) estão apresentados apenas quando usados para identificá-los. O mesmo procedimento foi adotado para os dados morfológicos (Tabs. 7 e 8) e para as proporções morfométricas (Tabs. 9 e 10).

TABELA 5 – Dados merísticos das espécies estudadas da família Soleidae. (Os nomes das espécies estão abreviados conforme a Tab. 2; N° ind. = número de indivíduos; N° D. = número de raios da nadadeira dorsal, N° A. = número de raios da nadadeira anal; N° P. = número de raios da nadadeira peitoral; L. tr. = número de linhas transversais no padrão de coloração. \* = nadadeira peitoral ausente no lado cego).

	Aa	Ad	Al	Asp1	Asp2	Tp
N° ind.	21	14	40	03	03	22
N° D	62(60-65)21	57(56-59)14	53(50-57)35	60(56-65)03	54(54-56)03	56(54-59)15
N° A	47(45-50)15	44(41-45)13	41(39-44)35	46(43-50)03	41(41-41)03	42(42-44)15
N° P*	04(02-05)17	04(03-05)10	04(03-06)40	02(01-03)03	02(02-02)03	01(00-02)22
L. tr.	15(14-17)11	13(11-16)08	13(09-15)10	15(14-17)03	10(08-13)02	12(12-15)15

TABELA 6 – Dados merísticos das espécies estudadas das famílias Bothidae e Cynoglossidae. (N° ind. = número de indivíduos; N° D. = número de raios da nadadeira dorsal; N° A. = número de raios da nadadeira anal; N° P. = número de raios da nadadeira peitoral; N° V. = número de raios da nadadeira ventral; B. tr. = bandas transversais; Esc. l. = escamas na linha lateral; Branqu. = número de rastros branquiais no 1° arco inferior. \* = nadadeira peitoral ausente no lado cego).

	<i>Citharichthys spilopterus</i>	<i>Citharichthys sp</i>	<i>Etropus crossotus</i>	<i>Symphurus plagusia</i>	<i>Symphurus tessellatus</i>
N° ind.	33	07	13	03	03
N° D.	78(75-82)33	77(75-77)07	83(79-86)13	96(95-98)03	102(98-107)03
N° A.	60(57-65)16	58(55-64)07	65(63-67)13	78(77-79)03	80(78-86)03
N° P.*	09(08-10)06	10(10-11)04	10(09-11)09	—	—
N° V.	07(06-08)05	05(05-05)05	06(06-06)09	04(04-04)03	04(04-04)03
B. tr.	—	—	—	14(13-14)03	08(07-08)03
Esc. l.	46(41-51)17	44(40-52)03	46(44-46)11	—	—
Branqu.	11(10-12)07	11(10-12)05	07(07-08)09	—	—

TABELA 7 – Dados morfométricos (cm) das espécies estudadas da família Soleidae. (N° ind. = número de indivíduos, C. pd. = comprimento padrão; A. max. = altura máxima; C. cab. = comprimento da cabeça; C. foc. = comprimento do focinho; C.P. = comprimento da nadadeira peitoral; C. o. = comprimento do olho).

	<i>A achirus</i>	<i>A declivis</i>	<i>A lineatus</i>	<i>Achirus sp 1</i>	<i>Achirus sp 2</i>	<i>T paulistanus</i>
N° ind.	26	14	48	03	03	33
C pd	13,3(8,1-18,2)26	9,7(6,5-11,1)14	7,8(5,5-11,3)48	6,2(5,0-7,2)03	17,8(17,2-18,8)03	7,9(6,4-13,5)33
A max	7,9(4,4-10,4)19	5,4(3,3-6,2)13	4,4(2,3-5,6)40	3,6(3,1-4,4)03	10,8(10,7-11,0)03	4,5(2,8-5,5)26
C cab	3,4(1,9-4,2)19	2,4(1,2-2,9)13	1,9(1,1-2,7)40	1,7(1,4-2,0)03	4,9(4,8-4,9)03	2,1(1,5-3,6)26
C foc	1,0(0,6-1,4)19	0,8(0,4-0,9)13	0,6(0,3-0,8)40	0,5(0,3-0,7)03	1,5(1,4-1,7)03	0,8(0,5-1,0)25
C P	0,5(0,2-0,6)22	0,5(0,3-0,7)09	0,5(0,3-0,8)38	0,3(0,2-0,4)03	0,5(0,3-0,6)03	0,1(0,0-0,2)18
C o	0,4(0,2-0,6)24	0,3(0,2-0,4)10	0,3(0,1-0,4)41	0,3(0,2-0,4)03	0,5(0,5-0,6)03	0,2(0,2-0,4)26

TABELA 8 – Dados morfométricos (cm) das espécies estudadas das famílias Bothidae e Cynoglossidae. (N<sup>o</sup> ind. = número de indivíduos; C. pd. = comprimento padrão; A. max. = altura máxima; C. cab. = comprimento da cabeça; C. foc. = comprimento do focinho; C. o. = comprimento do olho; C. mxl. = comprimento da maxila; M.E.O.D. = medida entre o olho superior e a origem da nadadeira dorsal).

	<i>Citharichthys spilopterus</i>	<i>Citharichthys</i> sp	<i>Etropus crossotus</i>	<i>Symphurus plagusia</i>	<i>Symphurus tessellatus</i>
N <sup>o</sup> ind.	50	11	13	27	45
C. pd.	7,9(4,7-15,7)50	5,6(2,9-10,0)11	8,3(5,7-9,4)13	10,0(6,0-12,4)27	11,8(7,2-15,8)45
A max	3,1(2,1-5,9)43	2,5(0,9-4,6)10	4,1(2,7-4,9)13	2,8(1,6-4,9)21	2,9(1,6-4,7)38
C. cab.	2,0(1,2-3,7)31	1,5(0,7-2,5)10	1,8(1,2-2,1)13	1,8(1,1-2,4)19	2,2(1,0-2,8)21
C. foc.	0,6(0,2-0,8)15	0,4(0,3-0,5)05	0,3(0,3-0,4)09	0,5(0,3-0,6)19	0,5(0,4-0,7)20
C. o.	0,4(0,2-0,7)49	0,4(0,2-0,5)10	0,5(0,5-0,6)13	0,2(0,1-0,3)19	0,2(0,1-0,3)18
C. mxl.	0,8(0,4-1,5)16	0,9(0,8-1,0)04	0,6(0,5-0,7)07	—	—
M.E.O.D.	—	—	—	0,5(0,3-0,7)09	0,5(0,3-0,5)08

TABELA 9 – Proporções morfométricas das espécies estudadas da família Soleidae. (N<sup>o</sup> ind. = número de indivíduos; proporções entre: C. pd./A. max. = comprimento padrão e a altura máxima; C. cab./C. o. = comprimentos da cabeça e do olho; C. foc./C. o. = comprimentos do focinho e do olho; C. o./C. P. = comprimentos do olho e da nadadeira peitoral).

PROP MORF	<i>A. achirus</i>	<i>A. declivis</i>	<i>A. lineatus</i>	<i>Achirus</i> sp 1	<i>Achirus</i> sp 2	<i>T. paulstanus</i>
N <sup>o</sup> ind	15	05	15	03	03	15
C. pd /A. max	1,9(1,5-2,1)	1,9(1,4-2,3)	1,9(1,4-2,5)	1,6(1,6-1,7)	1,6(1,6-1,7)	1,9(1,7-2,5)
C. cab/C. o.	8,8(6,6-11,7)	7,2(6,0-8,0)	6,4(5,4-7,3)	5,2(4,9-5,6)	9,4(8,8-9,8)	7,0(6,0-8,0)
C. foc/C. o.	2,5(1,8-3,3)	2,4(2,0-2,7)	2,0(1,5-2,8)	1,6(1,2-1,8)	3,0(2,5-3,4)	2,7(2,0-3,6)
C. o/C. P.	1,0(0,8-1,1)	0,6(0,4-0,7)	0,6(0,4-1,0)	1,3(1,0-2,0)	1,2(0,9-1,8)	—

TABELA 10 – Proporções morfométricas das espécies estudadas da família Bothidae. (N<sup>o</sup> ind. = número de indivíduos; proporções entre: C. pd./A. max. = comprimento padrão e a altura máxima; C. cab./C. o. = comprimentos da cabeça e do olho; C. foc./C. o. = comprimentos do focinho e do olho; C. o./C. P. = comprimentos do olho e da nadadeira peitoral).

	<i>Citharichthys spilopterus</i>	<i>Citharichthys</i> sp	<i>Etropus crossotus</i>
N <sup>o</sup> ind.	15	10	13
C. pd /A. max.	2,8(2,0-3,1)	2,4(2,0-3,3)	2,0(1,8-2,2)
C. cab/C. o.	5,0(4,0-5,8)	4,1(3,3-5,0)	3,6(3,1-4,4)
C. foc/C. o.	1,2(0,8-1,4)	1,0(0,7-1,1)	0,6(0,5-0,8)

## 2. Caracterização morfológica das espécies estudadas

### *Achirus achirus* (Linnaeus, 1758)

O corpo tem um formato arredondado, sendo sua altura máxima relativamente maior que a das outras espécies da família. As escamas são fortemente ctenóides e apresentam cirros escuros. A linha lateral é praticamente reta, elevando-se um pouco na região da cabeça. Uma característica marcante para esta espécie é a nadadeira

peitoral cujo comprimento não ultrapassa ao diâmetro do olho. O lado zenital normalmente tem coloração escura em tom marrom, com manchas nítidas e arredondadas, relativamente maiores e mais raras do que em outras espécies estudadas na família Soleidae. Estas manchas estão também presentes nas nadadeiras ímpares, porém com contornos difusos e maiores que as manchas do corpo. Existem listras transversais irregulares e pouco distintas devido às manchas. No lado cego, a cor predominante é creme e pode ocorrer uma mancha (de cor escura fosca) que ocupa de 1/3 a 1/4 da porção posterior do corpo. Em raros exemplares, esta mancha acompanha as bases das nadadeiras dorsal e anal.

*Achirus declivis* Chabanaud, 1940

O corpo dos indivíduos desta espécie é ovalado e menos alto que em *A. achirus*. As escamas são ctenóides, intercaladas com cirros escuros e longos. A linha lateral origina-se próxima ao olho superior, seguindo reta até a nadadeira caudal, apenas elevando-se um pouco na altura do pré-opérculo. O comprimento da peitoral sempre supera o diâmetro do olho. Os raios desta nadadeira distribuem-se em formato de "V", sendo o(s) mediano(s) relativamente maior(es). O lado zenital tem coloração marrom clara, podendo também ser escura. Em geral, a nadadeira peitoral é nitidamente mais escura e a nadadeira caudal clara, contrastando com o colorido do corpo e das outras nadadeiras. Esta característica é bem marcante para esta espécie. As manchas arredondadas são difusas, só se destacando na nadadeira caudal de alguns exemplares. Suas linhas transversais são bem finas e nítidas, destacando-se facilmente da coloração do corpo, geralmente mais claro que nas outras espécies de *Achirus*. O lado cego tem coloração bem clara e pode haver uma mancha escura (sombreada) que chega a ocupar até a metade da região posterior do corpo. Raramente esta mancha acompanha as nadadeiras ímpares, como em outras espécies da família.

*Achirus lineatus* (Linnaeus, 1758)

Seu corpo é semelhante àquele descrito para *A. declivis*, quanto ao seu formato ovalado. As escamas são ctenóides. A linha lateral, em geral, é reta ao longo do corpo e levemente curva na cabeça; porém pode ser ondulada nesta região em alguns indivíduos. O comprimento da nadadeira peitoral ultrapassa bastante o do diâmetro do olho. O raio ou raios centrais desta nadadeira são destacadamente maiores que os demais. O lado zenital normalmente é de tom marrom, mas pode apresentar-se em tons areia ou verde escuro. Esta espécie apresenta um padrão de colorido bastante variável, o que dificulta a utilização deste caráter para a sua separação das outras do gênero. O corpo, no lado zenital, tem manchas arredondadas, geralmente nítidas, pequenas e abundantes. Quando elas não estão bem visíveis no corpo, se destacam nas nadadeiras ímpares, principalmente na nadadeira caudal por ser mais clara que as outras. Raramente a nadadeira peitoral se destaca do colorido do corpo por ser mais escura. As linhas transversais geralmente não são nítidas, confundindo-se com as manchas. O

lado nadiral tem coloração creme e apresenta regiões pardas na porção caudal (que pode atingir de 1/4 a 1/3 da região).

#### *Achirus* sp 1

Esta espécie é bem semelhante a *A. achirus* no seu aspecto geral. O corpo é arredondado e coberto por escamas fortemente ctenóides e cirros pouco evidentes. A linha lateral é bem visível e se origina na borda do olho superior, ficando com um formato curvo na cabeça e seguindo depois em linha reta até o final da caudal. O comprimento da nadadeira peitoral não ultrapassa o diâmetro do olho. Sua coloração é bastante escura no lado zenital e não se nota a presença de manchas arredondadas nítidas nem difusas no lado cego. O número de linhas transversais e dos raios das nadadeiras são próximos aos de *A. achirus* (Tab. 4). Porém, os outros valores merísticos e morfométricos proporcionais são menores em *Achirus* sp 1.

#### *Achirus* sp 2

Esta é a espécie mais distinta do gênero. Seu corpo tem um aspecto bem carnoso e um formato que lembra um losango com ângulos suaves. A região próxima ao início da nadadeira dorsal, na cabeça, tende a ser ligeiramente convexa. Os olhos são diminutos, quase encobertos pela derme. As escamas são fortemente ctenóides e os cirros zenitais, pretos longos. A linha lateral é reta, ligeiramente curva na região da cabeça. O comprimento da nadadeira peitoral não ultrapassa o diâmetro do olho. O lado colorido apresenta uma tonalidade que varia de marrom claro a escuro. As manchas arredondadas e negras são difusas, destacando-se um pouco na nadadeira caudal. O lado nadiral tem coloração clara e uniforme. Em apenas um indivíduo, dentre três estudados aqui, foi observada uma mancha escura próxima à nadadeira caudal no lado cego.

#### *Trinectes paulistanus* (Ribeiro, 1915)

O corpo é bem mais alongado que o dos representantes de *Achirus*. Sua forma chega a ser bem "*oblonga, quase perfeitamente parabólica*" (RIBEIRO, 1915). Os olhos são bem destacados, pouco encobertos pela derme, ao contrário do que acontece no gênero *Achirus*. A abertura branquial é bem menor que em *Achirus*, não atingindo o nível do olho inferior. As escamas são ctenóides e os cirros estão visíveis no lado nadiral na região da cabeça. A linha lateral é reta. A nadadeira peitoral, quando presente, é rudimentar, com um ou dois raios. No entanto, apenas um, dos 33 exemplares estudados, apresenta dois raios. Esta nadadeira rudimentar e seu comprimento não ultrapassa o diâmetro do olho. A coloração no lado zenital é uniforme e varia de verde oliva a marrom. Não ocorreram manchas nítidas neste lado. Raramente ocorrem manchas escuras no corpo e nas nadadeiras, apenas se destacam na caudal. As linhas transversais são bem nítidas e finas, contrastando facilmente com o colorido do corpo. Em alguns casos, estas linhas nascem duplas na região dorsal, mas apenas uma alcança a região ventral. A face cega é pigmentada.

*Citharichthys spilopterus* Günther, 1862

O corpo tem uma forma oval e um focinho diminuto, cujo tamanho praticamente se iguala ao diâmetro do olho. O espaço interorbital se resume a uma crista óssea. A boca é relativamente grande, alcançando o nível correspondente à metade do olho inferior. Os maxilares formam uma diagonal reta que se destaca do contorno geral do corpo. Os dentes do maxilar são conspícuos na região mediana. As escamas são fracamente ctenóides. A linha lateral origina-se na altura do opérculo, desce suavemente logo em seguida e continua reta até a nadadeira caudal. As escamas desta linha destacam-se bastante das outras. Esta espécie tem coloração marrom claro e não se verificam manchas arredondadas ou linhas transversais, apenas uma pigmentação difusa nas escamas zenitais.

*Citharichthys* sp

O corpo tem uma forma oval e seu perfil dorsal sofre uma reentrância acima do nível do olho superior. A altura do corpo é maior, o focinho é menor, o maxilar não chega a atingir o nível da metade da órbita do olho inferior e os olhos se encontram ainda mais próximos entre si, quando comparados com os da espécie com *C. spilopterus*. A boca, os dentes e a forma dos maxilares são praticamente iguais nessas duas espécies. As escamas que recobrem as duas espécies de *Citharichthys* estudadas são do mesmo tipo. A linha lateral também tem a mesma forma, porém não é tão visível em *Citharichthys* sp. O lado pigmentado de *Citharichthys* sp varia em tons de marrom claro a areia. Não se verificam manchas ou linhas, apenas uma pigmentação escura na borda das escamas zenitais. *Citharichthys* sp e *C. spilopterus* também se diferenciam por seus dados merísticos e morfométricos (Tabs. 6, 8 e 10).

*Etropus crossotus* Jordan e Gilbert, 1882

O corpo é oval e mais alto que em *Citharichthys*. A cabeça é minúscula e o focinho diminuto, ficando os olhos, as narinas e a boca muito próximos. O perfil da cabeça acompanha a linha da curvatura dorsal do corpo. O opérculo, como no gênero *Citharichthys*, tem uma forma curva e uma ponta em "v" logo acima da nadadeira peitoral. A distância máxima entre o maxilar e o olho superior é maior do que em *Citharichthys*. Em *Etropus*, os olhos são relativamente grandes, estando separados apenas por uma crista óssea. A boca é muito pequena e os rastros branquiais são menos pontiagudos, mais curtos e em menor número, quando comparados com os de *Citharichthys*. As escamas são ctenóides no lado zenital e ciclóides ou fracamente ctenóides no outro lado. Os cirros são raros e só foram encontrados na borda do opérculo. A linha lateral é reta. O lado pigmentado varia de tons marrom claro a areia, com pigmentos marrom ou verde, facilmente visíveis quando os peixes ainda estão vivos. Não ocorrem manchas ou listras transversais. A nadadeira dorsal se origina no lado cego, na altura das narinas. Os raios das nadadeiras são segmentados e bem evidentes. A nadadeira peitoral ocorre nos dois lados.



*Symphurus plagusia* (Bloch e Schneider, 1801)

O corpo é bem fusiforme. O focinho levemente pontiagudo. A margem posterior da mandíbula atinge a margem posterior do olho ou a ultrapassa. A boca é recurvada ventralmente e os lábios não são nitidamente carnosos. As escamas são ctenóides e têm o bordo externo escuro. Não ocorrem cirros dérmicos. A linha lateral, quando presente, é bem discreta e ocorre apenas no lado zenital. Os representantes desta espécie têm um colorido que varia de tom creme a marrom claro no lado zenital, com bandas transversais mais escuras, numerosas e difusas. A cavidade opercular apresenta pouco ou nenhum pigmento e na margem interna do opérculo há uma mancha esparsa. Os raios posteriores das nadadeiras dorsal, anal e caudal (1/3 posterior do corpo) têm coloração alternada entre claro e escuro. A região escura normalmente acompanha as nadadeiras ímpares em ambos os lados. A nadadeira dorsal se origina antes do olho.

*Symphurus tessellatus* (Quoy e Gaimard 1824)

De um modo geral, esta espécie tem o corpo e as nadadeiras semelhantes aos de *S. plagusia*. Porém, alguns caracteres diagnósticos foram encontrados. A margem posterior da mandíbula alcança o centro do olho inferior ou a margem posterior da pupila, em *S. tessellatus*. Esta espécie tem uma coloração marrom mais escura no lado zenital que a espécie anterior. Os raios posteriores das nadadeiras dorsal, anal e caudal são negros. Suas bandas transversais são mais evidentes, contrastando melhor com o fundo, e são relativamente mais largas e em menor número. A parede interna opercular é densamente pigmentada no lado ocular e há uma mancha negra na superfície externa do opérculo. A margem da nadadeira dorsal está à frente da pupila ou da metade do olho, sempre posterior, quando comparada à origem da nadadeira dorsal de *S. plagusia*.

### 3. Dados eletroforéticos

Os desenhos dos padrões eletroforéticos (zimogramas) das enzimas ACP, D-EST, GDH, GOT, a-GPD, IDH, LDH, ME, PGD e PGI, estão representados nas Figs. 2 a 11, respectivamente. Quando ocorre mais de um zimograma para a mesma espécie, padrões polimórficos são indicados. Em algumas representações esquemáticas traçou-se uma linha separando grupos de alelos no sentido horizontal para facilitar a visualização dos diferentes locos.

Foram analisados 77 caracteres bioquímicos obtidos a partir dos resultados fornecidos por 10 enzimas e 15 locos das 11 espécies em evidência. Os resultados obtidos de frequências gênicas e genotípicas das enzimas e espécies estudadas estão sumariados nas Tabs. 11, 12 e 13.

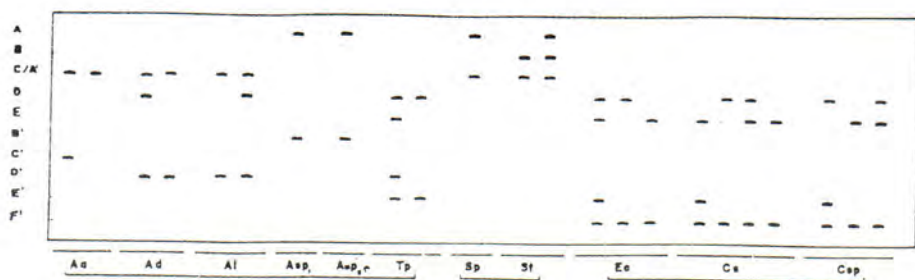


FIGURA 2 – Padrões eletroforéticos de ACP obtidos em fígado para as espécies estudadas.

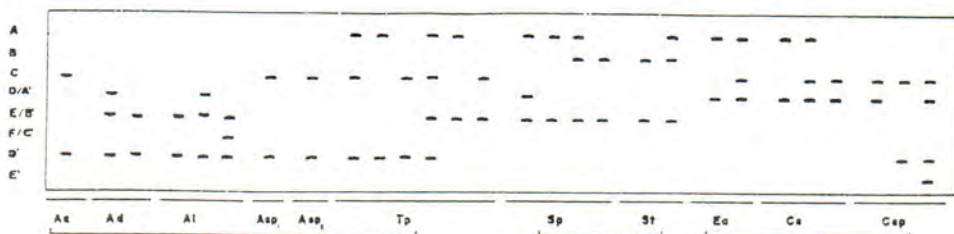


FIGURA 3 – Padrões eletroforéticos de D-EST obtidos em fígado para as espécies estudadas.

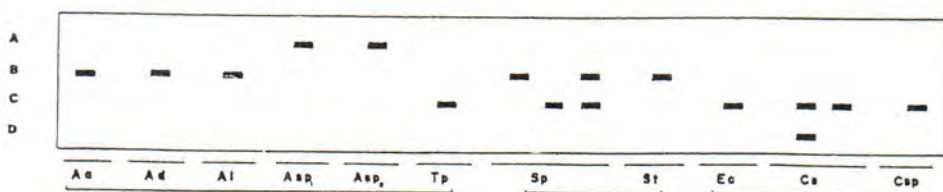


FIGURA 4 – Padrões eletroforéticos de GDH obtidos em fígado para as espécies estudadas.

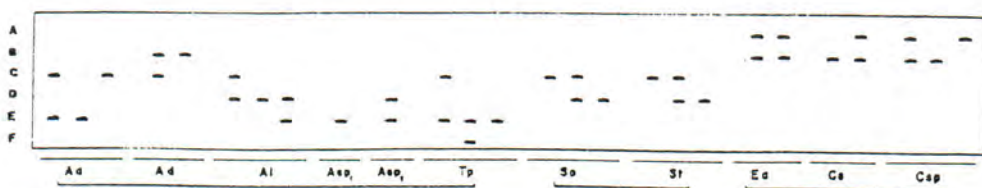


FIGURA 5 – Padrões eletroforéticos de GOT obtidos em fígado para as espécies estudadas.

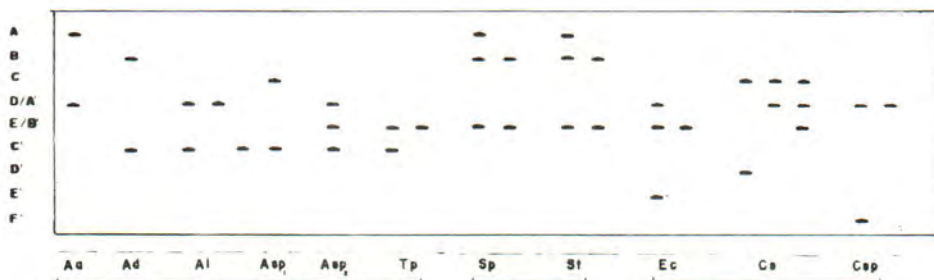


FIGURA 6 – Padrões eletroforéticos de a-GPD obtidos em músculo para as espécies estudadas.

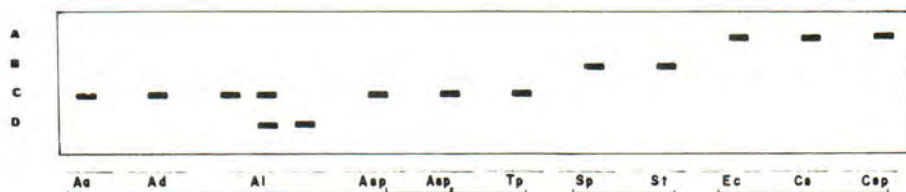


FIGURA 7 – Padrões eletroforéticos de IDH obtidos em músculo para as espécies estudadas.

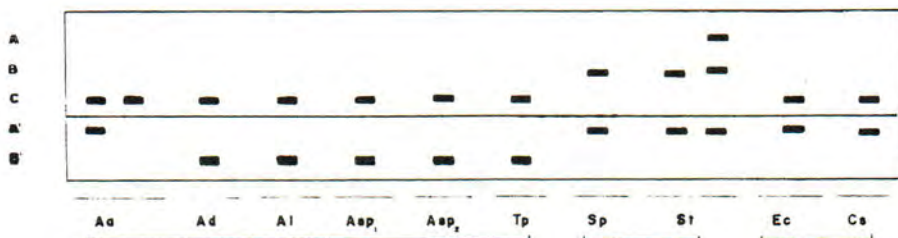


FIGURA 8 – Padrões eletroforéticos de LDH obtidos em músculo para as espécies estudadas.

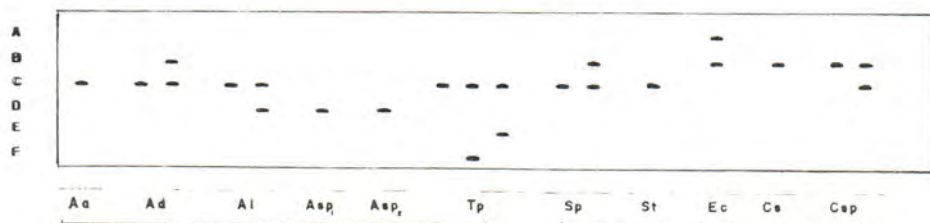


FIGURA 9 – Padrões eletroforéticos de ME obtidos em músculo para as espécies estudadas.

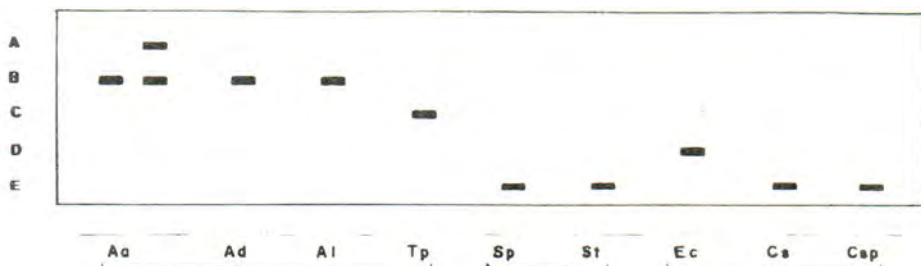


FIGURA 10 – Padrões eletroforéticos de PGD obtidos em músculo para as espécies estudadas.

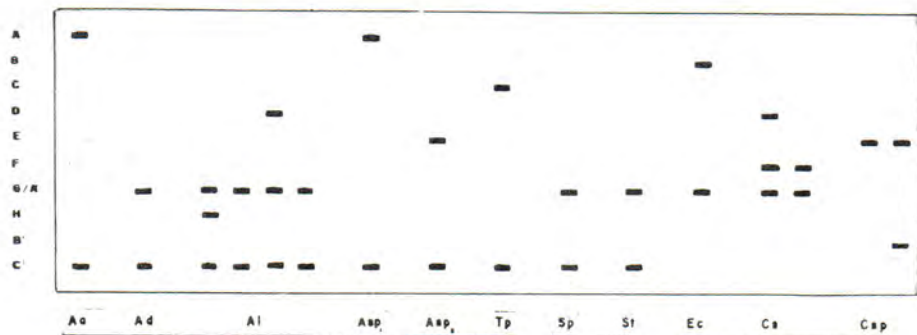


FIGURA 11 – Padrões eletroforéticos de PGI obtidos em músculo para as espécies estudadas.

TABELA 11 – Frequências genotípicas das enzimas estudadas para as espécies analisadas da família Soleidae (Os nomes das espécies estão abreviados conforme Tab. 2).

Locos	Aa	Ad	Al	Asp1	Asp2	Tp
ACP-1	CC=07	CC=04 CD=01	CC=07 CD=03	AA=02	AA=03	DD=06 DE=03
ACP-2	CC=07	DD=06	DD=10	BB=02	BB=03	DE=01 EE=02
D-EST-1	CC=07	DE=01 EE=01	DE=03 EE=07	CC=02	CC=03	AC=03 AA=06 CC=02
D-EST-2	DD=07	DD=02	DD=09 CD=01	DD=02	DD=03	DD=08 BD=02 BB=01
GDH	BB=07	BB=03	BB=08	AA=03	AA=03	CC=08
a-GPD-1	AA=08	BB=03	DD=07	CC=02	DE=01	EE=08
a-GPD-2	AA=08	CC=03	CC=04	CC=02	CC=01	CC=03
GOT	CE=04 CC=01 EE=02	BC=02 BB=01	CD=02 DD=04 DE=01	EE=02	DE=01	CE=04 EF=01 EE=02
IDH	CC=06	CC=06	CC=04 CD=05 DD=01	CC=02	CC=02	CC=11
LDH-1	CC=08	CC=05	CC=07	CC=02	CC=02	CC=03
LDH-2	CC=07	BB=05	BB=02	BB=02	BB=03	BB=03
ME	GG=08	BC=01 CC=02	CC=04 CD=03	DD=01	DD=01	CC=04 CE=02 CF=02
PGD	AB=01 BB=07	BB=03	BB=07	FF=01	GG=01	CC=08
PGI-1	AA=08	GG=03	DG=03 GH=01 GG=03	AA=02	EE=01	CC=08
PGI-2	CC=08	CC=03	CC=07	CC=02	CD=01	CC=08

TABELA 12 – Frequências genotípicas dos zimogramas das enzimas estudadas para as espécies analisadas das famílias Bothidae e Cynoglossidae. (Os nomes das espécies estão abreviados conforme Tab. 2).

Locos	Cs	Csp	Ec	Sp	St
ACP-1	DE=04 DD=02 FE=02	DD=01 DE=01 EF=01	DE=03 DD=04 EE=01	AA=07	AB=02 BB=08
ACP-2	EF=01 FF=06	EF=01 FF=02	EF=01 FF=08	AA=07	AA=10
D-EST-1	AC=02 AA=01 CC=05	CC=02 CD=02	AC=01 AA=01	AA=03 AB=02 BB=01	AB=01 BB=09
D-EST-2	AA=03	DD=02 BE=01	AA=02	AB=01 BB=05	BB=07
GDH	CC=02 CD=01	CC=01	DD=02	CC=02 BC=02 BB=02	BB=03
a-GPD-1	CC=01 CD=04	DD=03	DE=01 EE=01	AB=01 BB=02	AB=01 BB=02
a-GPD-2	DD=01	FF=01	EE=01	BB=03	BB=03
GOT	AB=03 BB=02	AA=01 BB=01 AB=02	AB=02	CC=03 CD=02 DD=01	CC=02 CD=03 DD=02
IDH	AA=07	AA=04	AA=09	BB=07	BB=10
LDH-1	CC=02	—	CC=07	BB=03	AB=01 BB=05
LDH-2	AA=02	—	AA=07	AA=03	AA=03
ME	BB=05	BB=02 BC=02	AB=02	BC=03 CC=04	CC=07
PGD	EE=05	EE=02	DD=02	EE=02	EE=07
PGI-1	DF=02 FF=03	EE=04	BB=02	GG=03	GG=07
PGI-2	AA=05	BB=01	AA=02	CC=03	CC=03

TABELA 13 – Frequências gênicas dos alelos em 15 locos para cada espécie estudada.

LOCUS	Sp	St	Tp	Cs	Ec	Csp	Aa	Al	Ad	Asp 1	Asp 2
ACP-1											
(N)	7	10	3	7	9	3	7	10	6	2	3
A	1,000	,100	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	1,000	1,000
B	,000	,900	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
C	,000	,000	,000	,000	,000	,000	1,000	,850	,900	,000	,000
D	,000	,000	,833	,500	,688	,500	,000	,150	,100	,000	,000
E	,000	,000	,167	,500	,313	,500	,000	,000	,000	,000	,000
ACP-2											
(N)	7	10	3	7	9	3	7	10	6	2	3
A	1,000	1,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
B	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	1,000	1,000
C	,000	,000	,000	,000	,000	,000	1,000	,000	,000	,000	,000
D	,000	,000	,167	,000	,000	,000	,000	1,000	1,000	,000	,000



TABELA 13 – Continuação.

LOCUS	Sp	St	Tp	Cs	Ec	Csp	Aa	Al	Ad	Asp 1	Asp 2
IDH-1											
(N)	7	10	11	7	9	4	6	10	6	2	2
A	,000	,000	,000	1,000	1,000	1,000	,000	,000	,000	,000	,000
B	1,000	1,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
C	,000	,000	1,000	,000	,000	,000	1,000	,650	1,000	1,000	1,000
D	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,350	,000	,000	,000
LDH-1											
(N)	3	6	3	2	7	0	8	7	5	2	2
A	,000	,083	,000	,000	,000		,000	,000	,000	,000	,000
B	1,000	,917	,000	,000	,000		,000	,000	,000	,000	,000
C	,000	,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
D	,000	,000	,000	,000	,000		,000	,000	,000	,000	,000
LDH-2											
(N)	3	3	3	2	7	0	7	7	5	2	3
A	1,000	1,000	,000	1,000	1,000		,000	,000	,000	,000	,000
B	,000	,000	1,000	,000	,000		,000	1,000	1,000	1,000	1,000
C	,000	,000	,000	,000	,000		,000	,000	,000	,000	,000
ME-1											
(N)	7	7	8	5	2	4	8	7	3	2	1
A	,000	,000	,000	,000	,500	,000	,000	,000	,000	,000	,000
B	,214	,000	,000	,000	,500	,750	,000	,000	,167	,000	,000
C	,786	,000	,750	,000	,000	,250	,000	,786	,833	,000	,000
D	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,214	,000	,000	,000
E	,000	,000	,125	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
F	,000	,000	,125	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
PGD-1											
(N)	2	7	8	5	2	2	8	7	3	0	0
A	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,063	,000	,000		
B	,000	,000	,000	,000	,000	,000	938	,000	,000		
C	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000		
D	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000		
E	1,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000		
F	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000		
G	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000		
PGI-1											
(N)	3	3	8	5	2	4	8	7	3	2	1
A	,000	,000	,000	,000	,000	,000	1,000	,000	,000	1,000	,000
B	,000	,000	,000	,000	1,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
C	,000	,000	1,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
D	,000	,000	,000	200	,000	,000	,000	,214	,000	,000	,000
E	,000	,000	,000	,000	,000	1,000	,000	,000	,000	,000	1,000
F	,000	,000	,000	800	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
G	1,000	1,000	,000	,000	,000	,000	,000	,714	1,000	,000	,000
H	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,071	,000	,000	,000

TABELA 13 – Continuação.

LOCUS	Sp	St	Tp	Cs	Ec	Csp	Aa	Al	Ad	Asp 1	Asp 2
PGI-2											
(N)	3	3	8	5	2	1	8	7	3	2	1
A	,000	,000	,000	1,000	1,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
B	,000	,000	,000	,000	,000	1,000	,000	,000	,000	,000	,000
C	1,000	1,000	1,000	,000	,000	,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

A Tab. 14 mostra a matriz de identidades gênicas simples (NEI, 1972) e não-viciadas (NEI, 1978). Como as amostras usadas neste estudo foram, algumas vezes, de pequeno tamanho, os valores que devem ser usados na construção dos dendogramas são aqueles que se encontram abaixo da diagonal da matriz. A matriz de dados codificados binariamente dos dados de isoenzimas das espécies estudadas encontra-se na Tab. 15.

A Fig. 12 representa o dendograma para as espécies estudadas, com a escala de identidade gênica não-viciada (NEI, 1978).

Os dois cladogramas (Figs. 13 e 14) são tidos como mais parcimoniosos dentre todos os arranjos possíveis, analisados pela rotina de enumeração implícita do programa HENNIG 86. Os índices de consistência e retenção e o tamanho das árvores foram, respectivamente, 65, 67 e 112.

Com base nos princípios de HENNIG (1966), o cladograma (Fig. 15) traz alguns dos caracteres isoenzimáticos interpretados manualmente. A construção deste cladograma baseou-se na otimização das séries de transformação dos alelos para cada espécie. A escolha do grupo-irmão e grupos externos baseou-se nos estudos de LAUDER e LIEM (1983). O resultado destes autores foi o mesmo obtido no presente trabalho, para nível de família.

TABELA 14 – Matriz de identidades gênicas simples (NEI, 1972 acima da diagonal) e não viciada (NEI, 1978 abaixo da diagonal) entre as espécies estudadas.

	Sp	St	Tp	Cs	Ec	Csp	Aa	Al	Ad	Asp 1	Asp 2
Sp	*****	,898	,230	,232	,177	,149	,278	,252	,326	,145	,163
St	,886	*****	,160	,156	,081	,096	,313	,301	,357	,077	,098
Tp	,226	,159	*****	,225	,325	,220	,399	,506	,521	,492	,523
Cs	,227	,153	,222	*****	,714	,516	,208	,122	,131	,173	,149
Ec	,171	,078	,314	,689	*****	,378	,171	,109	,117	,093	,134
Csp	,145	,094	,215	,503	,363	*****	,138	,168	,125	,117	,235
Aa	,275	,311	,396	,205	,166	,136	*****	,540	,563	,448	,373
Al	,249	,298	,499	,120	,106	,165	,536	*****	,880	,427	,506
Ad	,320	,351	,512	,129	,112	,122	,556	,865	*****	,423	,438
Asp 1	,144	,076	,489	,172	,091	,115	,447	,425	,418	*****	,794
Asp 2	,162	,097	,520	,147	,131	,231	,372	,504	,433	,794	*****



TABELA 15 – Matriz original dos dados de isoenzimas das espécies estudadas. Os caracteres são os alelos, codificados binariamente, na mesma ordem apresentada na Tab. 13. (1, presença do alelo; 0, ausência do alelo; ?, alelo não pesquisado).

ESPÉCIES	CARACTERES
<i>S. plagusia</i>	1000010000011000110000110110000100000011000100010100110000000100000010001
<i>S. tessellatus</i>	11000110000110000100001000100110000100000011000100110100010000000100000010001
<i>T. paulistano</i>	00011000110101000101000100000100100000101100100010100010110010000100000001
<i>C. spilopterus</i>	0001100001110100100000011001100001001100001000001100100000000100010100100
<i>Citharichthys</i> sp	0001100001100110000110010000100000011100001000?????0110000000100001000010
<i>E. crossotus</i>	0001100001110100100000010000110000101100001000001101100000001001000000100
<i>A. achirus</i>	00100001000001000001001001000010000000101000100011000100011000100000000001
<i>A. lineatus</i>	0011000010000011001100100000100010000011100011001010011000100000010011001
<i>A. declivis</i>	0011000010000011000100100010000010000110000010001010110000100000000010001
<i>Achirus</i> sp 1	100000100000010000010100000100001000000010001000101000100?????10000000001
<i>Achirus</i> sp 2	10000010000001000001010000001100100000110001000101000100?????00001000001

A eletroforese é uma técnica poderosa para separar espécies (AVISE, 1974; SOLÉ-CAVA e THORPE, 1987). Neste trabalho, eletromorfos e suas freqüências foram usados para a identificação de espécies crípticas e para formulação de hipóteses filogenéticas.

A presença de locos diagnósticos em populações simpátricas é prova segura da existência de isolamento reprodutivo e, conseqüentemente, de diferenciação específica (AVISE, 1974; THORPE, 1979, 1983). Para populações alopatricas como as aqui estudadas, no entanto, locos diagnósticos são de valor mais limitado, pois pode-se argumentar que devido à restrição do fluxo gênico ligado à separação geográfica, alguns locos deveriam apresentar alguma diferenciação interpopulacional associada à deriva gênica ou a regime seletivo diferenciado (MAYR, 1987). No entanto, o baixo nível de identidade gênica observado entre *Achirus achirus* e *Achirus* sp 1 e *Achirus* sp 2 ( $I = 0,41$ ) e entre *Citharichthys spilopterus* e *Citharichthys* sp ( $I = 0,50$ ) está refletido em valores bem inferiores ao nível de identidade gênica ( $I$ ) encontrado entre populações coespecíficas alopatricas de peixes, que é normalmente alto, na faixa de 0,90 a 0,99 (JOHNSTON et al., 1987; SEEB e GUNDERSON, 1988). Os valores observados encontram-se dentro da faixa geralmente associada a comparações entre espécies distintas (THORPE, 1979, 1983; AVISE, 1983). Numa revisão bibliográfica que inclui comparações gênicas entre 7900 pares de espécies de vários organismos, THORPE (1983) observou que cerca de 98% de todos os valores de  $I$  encontrados entre populações coespecíficas estão acima de 0,90 e que 99,5% dos valores de  $I$  entre populações interespecíficas (tanto alopatricas, como simpátricas) estiveram abaixo deste valor.

A partir da constatação da alta diferenciação gênica de *Achirus* sp 1 e *Achirus* sp 2 com *A. achirus* e de *Citharichthys* sp com *C. spilopterus* foi feito um estudo morfológico mais detalhado, onde algumas diferenças (apresentadas nos resultados) indicam que as espécies do Pará devem ser espécies novas. Elas serão tratadas aqui por "sp". Os intervalos das medidas e contagens destas últimas estão em parte sobre

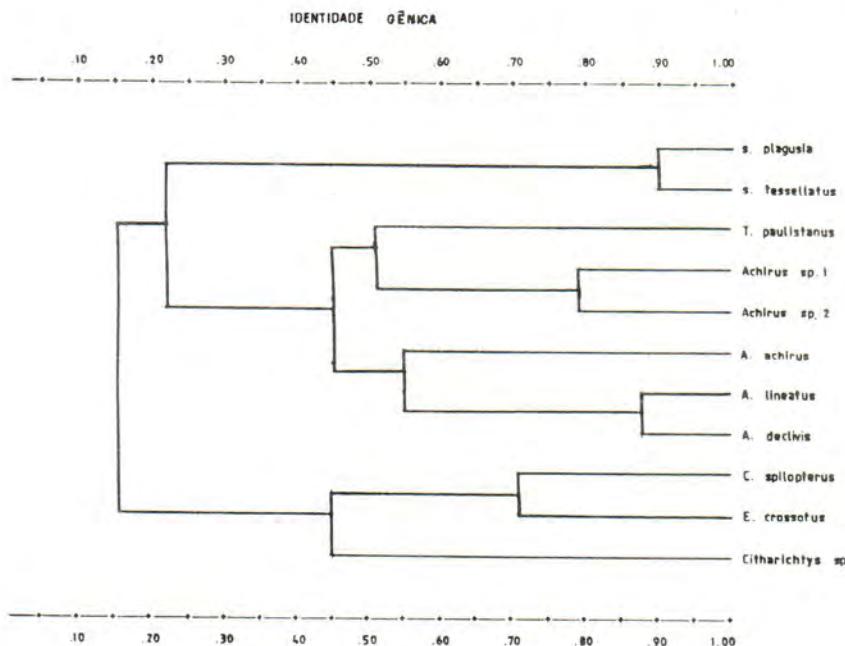


FIGURA 12 – Dendrograma obtido pelo método “UPGMA” a partir dos dados de identidade gênica não viciada, para as espécies estudadas.

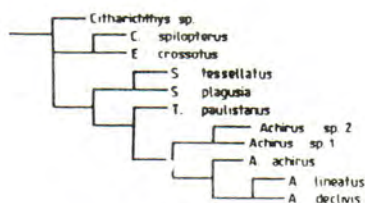


FIGURA 13 – Cladograma 1, obtido pela rotina de enumeração implícita do programa HENNIG 86.

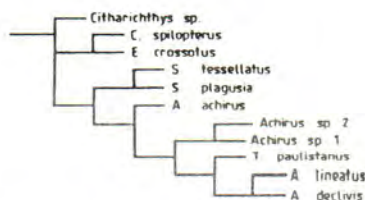


FIGURA 14 – Cladograma 2, obtido pela rotina de enumeração implícita do programa HENNIG 86.

postos àqueles obtidos para *A. achirus* e *C. spilopterus*. *Achirus* sp 2 apresenta características morfológicas mais evidentemente diferenciáveis de *A. achirus* do que de *Achirus* sp 1.

No dendrograma (Fig. 12) obtido pelo método UPGMA (SNEATH e SOKAL, 1973), as espécies *Achirus* sp 1 e *Achirus* sp 2 unem-se no ponto 0,77 da escala de identidade gênica de NEI (1978), enquanto que o ponto que as une a *A. achirus* é 0,45, estando *Achirus* sp 1 e *Achirus* sp 2 mais próxima de *T. paulistanus* (0,50) que de qualquer outra espécie de *Achirus*. Tanto nos dois cladogramas considerados mais parcimoniosos pelo programa HENNIG 86, quanto no cladograma obtido através das séries de transformações, *Achirus* sp 1 e *Achirus* sp 2 estão mais próximos entre si do que de *A. achirus*.

TABELA 16 – Séries de transformação dos caracteres estudados ((N<sup>o</sup>), número do loco; (sr. transf.), loco com série de transformação determinada; (s/ sr. transf.), loco cuja série de transformação não foi determinada).

N <sup>o</sup>	sr transf.	Reversão	Locos	s/ sr. transf.
1a*	ACP <sub>1</sub> -D→E			
1b*	ACP <sub>1</sub> -D→C	1b0	Eliminação ACP <sub>1</sub> -D	
1c*	ACP <sub>1</sub> -C→A			
1d*	ACP <sub>1</sub> -A→B			
2a*	ACP <sub>2</sub> -E→F			
2b*	ACP <sub>2</sub> -E→D	2b0	Eliminação ACP <sub>2</sub> -E	
2c*	ACP <sub>2</sub> -D→C	2c0	Eliminação ACP <sub>2</sub> -D	
2d*	ACP <sub>2</sub> -C→B	2d0	Eliminação ACP <sub>2</sub> -C	
2e*	ACP <sub>2</sub> -D→A			
3a*	D-EST <sub>1</sub> -C→A	3a0	Eliminação D-EST <sub>1</sub> -C	
3b*	D-EST <sub>1</sub> -A→B	3b0	Eliminação D-EST <sub>1</sub> -A	
3c*	D-EST <sub>1</sub> -C→D			
3d*	D-EST <sub>1</sub> -D→E			
4a*	D-EST <sub>2</sub> -D→E			
4b*	D-EST <sub>2</sub> -D→C			
4c*	D-EST <sub>2</sub> -D→B	4c0	Eliminação D-EST <sub>2</sub> -D	
4d*	D-EST <sub>2</sub> -B→A	4d0	Eliminação D-EST <sub>2</sub> -B	
5a*	GDH-C→D			
5b*	GDH-C→B	5b0	Eliminação GDH-C	
5c*	GDH-B→A	5c0	Eliminação GDH-B	
6a*	GOT-B→A			
6b*	GOT-B→C	6b0	Eliminação GOT-B	
6c*	GOT-C→D	6c0	Eliminação GOT-C	
6d*	GOT-D→E	6d0	Eliminação GOT-D	
6e*	GOT-C→E			
6f*	GOT-E→F			
7a*	IDH-A→B	7a0	Eliminação IDH-A	
7b*	IDH-B→C	7b0	Eliminação IDH-B	

TABELA 16 – Continuação.

N <sup>o</sup>	sr. transf.	Reversão	Locos	s/ sr. transf.
7c*	IDH-C→D			
8a*	LDH <sub>1</sub> -C→B	8a0	Eliminação LDH <sub>1</sub> -C	
8b*	LDH <sub>1</sub> -B→A			
9a*	LDH <sub>2</sub> -A→B	9a0	Eliminação LDH <sub>2</sub> -A	
10a*	ME-C→B	10a0	Eliminação ME-C	
10b*		10b0	Eliminação ME-B	
10c*	ME-B→A			
10d*	ME-C→D			
10e*	ME-C→E			
10f*	ME-E→F			
11a*	PGD-E→D			
11b*	PGD-E→C	11b0	Eliminação PGD-E	
11c*	PGD-C→B	11c0	Eliminação PGD-C	
11d*	PGD-B→A			
12a*	PGI <sub>2</sub> -A→B			
12b*	PGI <sub>2</sub> -A→C	12b0	Eliminação PGI <sub>2</sub> -A	
13a*				a-GPD <sub>1</sub> -A
13b*				a-GPD <sub>1</sub> -B
13c*				a-GPD <sub>1</sub> -C
13d*				a-GPD <sub>1</sub> -D
13e*				a-GPD <sub>1</sub> -E
14a*				a-GPD <sub>2</sub> -A
14b*				a-GPD <sub>2</sub> -B
14c*				a-GPD <sub>2</sub> -C
14d*				a-GPD <sub>2</sub> -D
14e*				a-GPD <sub>2</sub> -E
14f*				a-GPD <sub>2</sub> -F
15a*				PGI <sub>1</sub> -A
15b*				PGI <sub>1</sub> -B
15c*				PGI <sub>1</sub> -C
15d*				PGI <sub>1</sub> -D
15e*				PGI <sub>1</sub> -E
15f*				PGI <sub>1</sub> -F
15g*				PGI <sub>1</sub> -G

Apesar de não ter sido possível estudar todas as espécies conhecidas de *Achirus*, nem completar os grupos externos, a análise filogenética empregada neste trabalho, trata os grupos de espécies como parafiléticos, por convenção. Os representantes dos grupos estudados estão relacionados entre si, podendo vir a formar grupos "trivialmente" monofiléticos. Soleidae e Achiridae (CHAPLEAU e KEAST, 1988). Cynoglossidae, Symphurinae e Cynoglossinae (CHAPLEAU, 1988) e Bothidae (HENSLEY e AHLSTROM, 1983; CHAPLEAU, 1988) formam grupos monofiléticos. Como não há referência literária sobre a filogenia destes grupos em níveis taxonômicos

abaixo de subfamília (CHAPLEAU e KEAST, 1988). os representantes dos gêneros *Trinectes*, *Symphurus* e *Citharichthys-Etropus* foram usados como grupos externos. Estes dois últimos foram estudados e incluídos no cladograma pelo fato de estarem representados por uma possível espécie nova (*Citharichthys* sp), como ocorre para *Achirus* sp.

*Achirus* sp 1 - *Achirus* sp 2 formam um grupo que se une às demais espécies de *Achirus* oriundas da Paraíba (cladograma 1, Fig. 13). Verificou-se também que *Achirus* sp 1 e *Achirus* sp 2 são espécies distintas e as mais proximamente relacionadas (cladograma 2, Fig. 14). A diferença deste cladograma para o de número 1 deve-se à presença de *T. paulistanus* no lugar de *A. achirus*, que assume uma posição mais externa em relação às outras espécies de *Achirus*.

No cladograma 3 (Fig. 15), analisado "passo a passo", as espécies estão dispostas filogeneticamente da mesma maneira encontrada no cladograma 1. Neste cladograma, *Achirus* sp 1 e *Achirus* sp 2 formam um grupo sustentado por dez sinapomorfias, sendo seis homoplásicas. Estas duas espécies unem-se a *A. achirus*, constituindo um grupo com três sinapomorfias, onde uma é homoplásica. *Achirus* sp 1 diferencia-se de *Achirus* sp 2 por ter, a primeira, uma autapomorfia e por terem, respectivamente, duas e três homoplasias não compartilhadas entre si.

Nos cladogramas 1 e 3, as espécies estudadas de *Achirus* formam um grupo sustentado por quatro sinapomorfias, sendo duas homoplásicas. *A. lineatus* une-se a *A. declivis* por cinco caracteres sinapomórficos, onde quatro são homoplásicos. O grupo *A. achirus* - *Achirus* sp 1 - *Achirus* sp 2 compartilha três caracteres sinapomórficos, sendo apenas um homoplásico. *T. paulistanus* apresenta-se como grupo-irmão do gênero *Achirus* e está sustentado por oito sinapomorfias compartilhadas pelas espécies aqui estudadas, onde apenas duas são homoplásicas.

As três espécies estudadas da família Bothidae aparecem no dendrograma como um grupo separado dos demais, como seria esperado, por eles pertencerem ao grupo sistematicamente mais externo em relação aos outros (LAUDER e LIEM, 1983). Na escala de identidade gênica as duas espécies oriundas da Paraíba, *C. spilopterus* e *E. crossotus*, estão mais próximas entre si, mesmo pertencendo a gêneros diferentes, do que de *Citharichthys* sp. *C. spilopterus* e *E. crossotus* unem-se em 0,70, enquanto *Citharichthys* sp forma um grupo com as duas outras apenas a 0,45 da escala de identidade gênica.

As análises das interrelações entre as espécies realizadas neste estudo mostram-se congruentes, na maioria das vezes. Porém, houve algumas diferenças quanto à posição de *T. paulistanus* e *A. achirus* em relação a outras espécies do gênero *Achirus*.

De acordo com CHAPLEAU e KEAST (1988), a família Soleidae (composta por duas subfamílias: Achirinae e Soleinae) constitui um grupo polifilético. Porém, para estes mesmos autores, a subfamília Achirinae é monofilética, fato que está em concordância com os resultados obtidos para as espécies de *Achirus* e *Trinectes* aqui estudadas, uma vez que estes dois gêneros, juntamente com *Gymnachirus*, constituem esta subfamília.

A apresentação e discussão de caracteres morfológicos e merísticos faz-se necessária no contexto deste trabalho, porquanto a partir da interpretação dos zimogra-



mas foi possível detectar populações não identificadas: *Achirus* sp 1, *Achirus* sp 2 e *Citharichthys* sp. Para as outras espécies estudadas o procedimento também foi o mesmo, tendo em vista a importância sistemática dos linguados, que são considerados um grupo de taxonomia confusa (LAUDER e LIEM, 1983).

CERVIGÓN (1966) diferencia *Achirus* de *Trinectes* principalmente pela presença ou não da perfuração do septo interbranquial e da nadadeira peitoral nos dois lados do corpo. No entanto, aquele autor restringe-se apenas a *T. maculatus brownii* (Günther, 1862), que não apresenta as nadadeiras peitorais. Os exemplares de *T. paulistanus* aqui examinados têm de um a dois raios na nadadeira peitoral zenital, quando presente. O mesmo fato é constatado por MENEZES e FIGUEIREDO (no prelo).

CERVIGÓN (1966) diferencia *A. lineatus* de *A. achirus* por ter a primeira um menor número de raios na nadadeira peitoral, na qual o comprimento "em nenhum caso ultrapassa o diâmetro do olho" (nossa tradução). Este fato, porém, não corresponde ao que foi observado nos exemplares aqui estudados, onde em *A. lineatus* o comprimento dessa nadadeira ultrapassa comumente o diâmetro do olho.

ROUX (1973) afirma que nenhum dos espécimes de *A. achirus* por ele estudados possui a nadadeira peitoral. Porém, ele próprio comenta que a literatura cita a presença desta nadadeira nesta espécie, fato também comprovado neste estudo, tanto na literatura consultada, quanto nos peixes amostrados.

CERVIGÓN (1982) trabalha com apenas um exemplar de *A. declivis* e caracterizou a espécie como tendo nadadeira peitoral zenital com um raio. Isto novamente não coincide com os peixes aqui examinados, cujo número de raios da peitoral zenital varia de três a cinco. Nos exemplares estudados por MENEZES e FIGUEIREDO (no prelo), o número de raios das nadadeiras peitorais foi de três ou quatro. Esses autores acreditam que *A. novoae* Cervigón, 1982, da Venezuela, seja um sinônimo de *A. declivis*.

Com relação aos dados merísticos dos espécimes do gênero *Achirus* estudados (Tab. 5), é possível notar o seguinte: *A. achirus* apresentou a contagem mais alta de raios da nadadeira dorsal, seguido de *A. declivis* e depois de *A. lineatus*. Em *Achirus* sp 1, o intervalo referente a esta contagem abrange aqueles das duas primeiras espécies, enquanto em *Achirus* sp 2, a faixa de variação do número de raios está incluída dentro do intervalo de contagem de *A. lineatus*. Essa contagem em *T. paulistanus* é semelhante à de *A. declivis*. Quanto ao número de raios da nadadeira anal, a situação para estas espécies foi a mesma, apenas com pequenas variações nas sobreposições dos intervalos.

Outra característica de valor diagnóstico, utilizada para identificar espécies do gênero *Achirus*, é o número de linhas transversais escuras que contrastam com a coloração de fundo do corpo. Os exemplares de *A. achirus* aqui estudados apresentam de 14 a 17 linhas, intervalo que abrange a contagem de 16 linhas encontrada por CERVIGÓN (1966). No entanto, SANTOS et al. (1984) observaram que o número de linhas para esta espécie variou entre 6 e 8, apenas.

Quanto ao número de linhas transversais, a seqüência (em termos de graduação decrescente de contagem) para os espécimes de Soleidae, é semelhante àquela observada para o número de raios das nadadeiras. A sobreposição das faixas de variação do número de linhas é bem maior.

Com relação aos dados morfométricos (Tab. 7), verifica-se que os maiores exemplares coletados pertencem a *Achirus* sp 2, cujo comprimento padrão variou de 17,2 a 18,8 cm. Os indivíduos de *A. achirus* também atingem estes valores, mas chegam a medir até 18,2 cm e tem como média 13,3 cm. *A. lineatus* e *T. paulistanus* apresentam comprimentos padrão médios semelhantes (7,8 e 7,9 cm, respectivamente), enquanto *A. declivis* e *Achirus* sp 1 medem em média 9,7 e 6,2 cm, respectivamente.

A mesma ordem decrescente é constatada, comparando outros dados morfométricos estudados (Tab. 7) entre as espécies, nesta seqüência: *Achirus* sp 2, *A. achirus*, *A. lineatus*, *T. paulistanus*, *A. declivis* e *Achirus* sp 1. *T. paulistanus* destaca-se das espécies de *Achirus* por apresentar a cabeça e o focinho proporcionalmente maiores e os olhos e a nadadeira peitoral menores. O comprimento desta nadadeira praticamente não varia dentro de *Achirus*.

As espécies de Soleidae estudadas, oriundas da Paraíba, apresentam o mesmo valor médio da relação comprimento padrão/altura máxima (1,9), enquanto que as duas espécies do Pará são mais altas (1,6) (Tab. 9). Nas outras relações morfométricas estudadas, comprimentos cabeça/olho, focinho/olho, olho/nadadeira peitoral, a ordem decrescente dos valores obtidos para as espécies de Soleidae, variou pouco entre elas.

MENEZES e FIGUEIREDO (no prelo) relatam a ocorrência de *A. achirus* no litoral dos estados do Pará e Maranhão, sendo que esta espécie não tem sido coletada no sudeste do Brasil. As informações fornecidas pelos próprios autores permitem identificar vários exemplares coletados na Paraíba como sendo desta espécie. No trabalho de CERVIGÓN (1966), a distribuição desta espécie abrange todo o território brasileiro.

Quanto ao gênero *Symphurus*, um problema na identificação das espécies parece ser o padrão de coloração. MENEZES e BENVENÚ (1976) caracterizam *S. plagusia* (Bloch e Schneider, 1801) por ter coloração preta nos raios do terço posterior das nadadeiras dorsal e anal, que se unem à nadadeira caudal. No entanto, este caráter é atribuído a *S. tessellatus* por MUNROE (1987), o que também coincide com os exemplares aqui estudados. As bandas transversais encontradas nos exemplares estudados de *S. plagusia* são mais finas, contrastam mais com a coloração do corpo e apresentam-se em maior número, quando comparadas com aquelas que ocorrem em *S. tessellatus* (Tab. 6).

*S. tessellatus* apresenta um número maior de raios nas nadadeiras dorsal e anal em relação a *S. plagusia*. Porém, o mesmo número de raios (quatro) é verificado na nadadeira pélvica das duas espécies (Tab. 6). Os exemplares de *S. tessellatus* aqui estudados são de maior tamanho e mais altos que os de *S. plagusia*. Outra diferença entre estas duas espécies a distância entre o olho superior e a origem da nadadeira dorsal, que é ligeiramente menor em *S. plagusia*. Num estudo detalhado sobre caracteres diagnósticos entre *S. plagusia* e *S. tessellatus*, MUNROE (1987) verifica que a última espécie tem o olho mais elíptico que a primeira. Essa característica não foi claramente observada nos exemplares de *Symphurus* pesquisados neste trabalho.

Para *E. crossotus* os números de raios das nadadeiras dorsal e anal são maiores do que nas duas outras espécies de *Citharichthys* estudadas (Tab. 6). Os intervalos dos valores desta contagem, neste gênero, sobrepõem-se entre as duas espécies, ficando *Citharichthys* sp com os valores menores. No entanto, com relação ao número



de raios da nadadeira peitoral, *C. spilopterus* tem uma contagem média menor. Os valores aqui encontrados para *C. spilopterus* coincidem com aqueles apresentados por CERVIGÓN (1966) e aproximam-se bastante dos valores obtidos por GUITART (1979). O número de raios da nadadeira pélvica manteve-se constante para *Citharichthys* sp (cinco) e para *E. crossotus* (seis), mas varia entre seis e oito para *C. spilopterus*.

Os intervalos para as contagens do número de escamas da linha lateral e de rastros branquiais no ramo inferior do primeiro arco branquial não diagnosticam as duas espécies de *Citharichthys*. Porém, a última contagem citada diferencia nitidamente os dois gêneros de Bothidae estudados. *Citharichthys* sp difere de *C. spilopterus* por apresentar valores morfométricos menores, com exceção do comprimento da maxila (Tab. 8). *E. crossotus* distingue-se das duas espécies estudadas de *Citharichthys* por ter uma cabeça visivelmente menor, principalmente o focinho e a maxila. Os seus olhos, porém, são proporcionalmente maiores que os das outras espécies estudadas.

Os dados eletroforéticos indicaram que os espécimes de *Citharichthys* coletados no Pará, provavelmente, pertencem a uma espécie nova e que *E. crossotus* e *C. spilopterus* (ambas da Paraíba) formam um grupo monofilético. Esta constatação pode, portanto, justificar o tratamento congenérico destas espécies adotado por CERVIGÓN (1966), que colocou *E. crossotus* no gênero *Citharichthys*. No entanto, faz-se necessário ampliar o estudo sistemático deste gênero.

A carência de literatura onde se tenha usado o método de polarização dos caracteres bioquímicos é grande e se desconhece trabalho que aborde uma visão cladística para as espécies aqui estudadas. Uma grande limitação da técnica eletroforética para a reconstrução de filogenias é a padronização na designação de um eletromorfo, devido à impossibilidade de se manter constantes as mesmas condições usadas em cada laboratório. MORIZOT e SICILLIANO (1983) também encontraram dificuldades para detectar homologias nos locos, ao estudarem *Xiphophorus*. Assim, ao comparar a interpretação dos zimogramas obtidos na presente pesquisa, com aqueles citados na literatura, perdem-se informações para determinar as possíveis homologias de locos ou alelos.

Alguns problemas foram encontrados neste trabalho para se obter as séries de transformações para os zimogramas. Na ausência de heterozigotos, a determinação do alelo ou loco mais plesiomórfico e as possíveis direções das mutações fazem com que a hipótese evolutiva seja difícil de ser formulada. Porém, esta dificuldade pode ser suprimida com base na sobreposição de outros caracteres isoenzimáticos estudados. Em alguns casos, as séries de transformação podem ser construídas a partir do alelo derivado para outros, numa seqüência de passos de mutações (ARAÚJO e SOLÉ-CAVA, 1993). Estas são as séries mais informativas que definem os grupos monofiléticos na árvore (PATTON e AVISE, 1983; MURPHY, 1993). Outro problema encontrado ocorre quando os dois primeiros passos da série de transformação são compartilhados por algumas espécies do "in-group" e do "out-group". Este fato sugere que o aparecimento de um dos dois passos possa ter ocorrido num grupo externo aos aqui estudados. Quando não é possível detectar onde estes dois passos ocorreram, ambos ficam assinalados, mesmo que isso não identifique cladogênese. SHAFFER et al. (1991) também desconsideraram os alelos compartilhados no "in-group" e no "out-group" e MURPHY

(1993) concluiu o mesmo quando empregou os locos como caracteres. Em teoria, um grande número de alelos diferentes estruturalmente pode ser originado por mutações independentes nos limites de um simples gene (HARRIS e HOPKINSON, 1978).

Outra dificuldade encontrada na análise cladística ocorre quando a monofilia de um grupo está sustentada por um caráter que representa uma mutação e um grupo subordinado ao maior apresenta o estado plesiomórfico. Duas hipóteses foram levantadas para este fato: (1) ocorreu uma mutação para o grupo menor, originando um novo alelo cuja mobilidade eletroforética coincidiu com aquela atribuída ao alelo mais plesiomórfico, e (2) o alelo sofreu uma "reversão" no grupo menor, readquirindo uma forma bastante similar àquela mais plesiomórfica, porém diferenciada pelo tempo e espaço que as separam, do ponto de vista ontológico. PATTON e AVISE (1983) trataram estes casos, no seu grupo III de estudo, como reversão.

O aparecimento de um novo alelo e a eliminação do mais plesiomórfico foram tratados aqui como dois eventos evolutivamente independentes, chamados respectivamente de **sintreptia** e **sinapousia** por AMORIM et al. (1993). As sintreptias provavelmente carregam mais informações filéticas que as sinapousias (MURPHY, 1993; AMORIM et al., 1993; ARAÚJO e SOLÉ-CAVA, 1993). Muito embora as análises de sinapousias exijam bastante cuidado (MURPHY, 1993; ARAÚJO e SOLÉ-CAVA, 1993), elas também podem auxiliar bastante na resolução de algumas árvores (AMORIM et al., 1993; ARAÚJO e SOLÉ-CAVA, 1993).

A análise cladística dos dados bioquímicos aqui obtidos, quanto à questão conceitual da sinapomorfia, baseou-se no seguinte raciocínio: para que uma série de transformação ocorra, é necessário que um alelo "x" com frequência gênica máxima, em uma ou mais espécies, tenha sofrido uma mutação, originando um alelo "y", cuja frequência de um e outro pode variar bastante na forma de heterozigoto. Em algumas espécies, ao longo de sua história evolutiva, o alelo plesiomórfico pode desaparecer e a frequência máxima passar a ser aquela do alelo apomórfico. Quando um destes dois alelos, na forma de heterozigoto, é compartilhado por diferentes grupos, pode-se dizer que ocorre sinapomorfia neste passo evolutivo. No entanto, quando os alelos, plesiomórfico e o seu mutante, são compartilhados por diferentes grupos na forma de heterozigoto, o conceito de sinapomorfia parece não ser apropriado, tendo em vista que nenhum dos alelos fixou-se (AMORIM et al., 1993). Na determinação de séries de transformação de caracteres morfológicos, este tipo de problema parece não ocorrer, uma vez que não se tem possibilidade de identificar um "estado intermediário" entre os caracteres morfológicos homólogos, então fixados nas espécies.

#### NOTA

(<sup>1</sup>) Admite-se que reversão, neste sentido, não é assegurada como uma reversão gênica (mutação reversa) para o alelo da aloenzima, e sim como uma modificação na frequência gênica do alelo mais plesiomórfico que permaneceu numa frequência muito pequena ou ausente após o evento de derivação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio M. Solé-Cava, do Departamento de Genética da UFRJ, pela orientação competente e amizade. Ao Prof. Dr. Ricardo S. Rosa, do Departamento de Sistemática e Ecologia da UFPB, pela orientação inicial e leitura crítica do manuscrito. Ao Prof. Dr. Martin L. Christoffersen, do Departamento de Sistemática e Ecologia da UFPB, pelo incentivo e discussões referentes à análise cladística, além da leitura crítica deste trabalho. Ao Dr. José Lima de Figueiredo, do Museu de Zoologia da USP, por haver conferido a identificação dos espécimes e pela gentileza de fornecer suas chaves inéditas de Pleuronectiformes. Aos pescadores deixo registrada minha gratidão pela colaboração fundamental nas coletas e pelos ensinamentos de campo. Ao CNPq pela bolsa concedida durante o Curso de Mestrado em Ciências Biológicas, na UFPB.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAYSE, J.P. 1987 – Le complexe *Solea lascaris*: Mise en évidence par l'étude du polymorphisme enzymatique de deux espèces sympatrique en Mer d'Iroise. *Bioch Syst. Ecol.* 15(2):271-284.
- AMORIM, D.S., ARAÚJO, M.E. e SOLÉ, A.M. 1993 – Origin of evolutionary novelties and elimination of plesiomorphic alleles: some comments on limitations of the concept of synapomorphy. *Rev. Brasil. Genet.* 16(1):245-252.
- AVISE, J.C. 1974 – The systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* 23:465-481.
- AVISE, J.C. 1983 – Protein variation and phylogenetic reconstruction; pp. 103-130. In: OXFORD, G.S. e ROLLINSON, D., Eds., **Protein polymorphism: adaptative and taxonomical significance**. Acad. Press., London.
- BAVERSTOCK, P.R., COLE, S.R., RICHARDSON, B.J. e WATTS, C.H.S. 1979 – Electrophoresis and Cladistics. *Syst. Zool.* 28:214-219.
- BRUSH, A.H. 1979 – Comparison of egg-white proteins: effect of electrophoretic conditions. *Bioch. Syst. Ecol.* 7:155-165.
- BUCKLIN, A. e HEDGECOCK, D. 1982 – Biochemical genetic evidence for a third species of *Metridium* (Coelenterata: Actiniaria). *Mar. Biol.* 66:1-7.
- BUTH, D.G. 1984 – The application of electrophoretic data in systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15:501-522.
- CARVALHO, J.P., TOMMASI, L.R. e NOVELLI, M.A. 1968 – Lista dos linguados do Brasil. *Contr. Inst. Oceanogr., Ocean. Biol.*, pp. 1-26.
- CERVIGÓN, F.M. 1966 – Los peces marinos de Venezuela; pp. 784-817. Tomo II. Fund. La Salle de Ciencias Naturales, Caracas.
- CHABANAUD, P. 1940 – La 4<sup>e</sup> fente branchiale des Achiridae. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.* 12:151.
- CHABANAUD, P. 1941 – À propos de l'organe pleurogrammique des Achiridae. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.* 13:414-415.
- CHAPLEAU, F. 1988 – Comparative osteology and intergeneric relationships of the tongue soles (Pisces: Pleuronectiformes: Cynoglossidae). *Can. J. Zool.* 66:1214-1232.
- CHAPLEAU, F. 1993 – Pleuronectiform relationships: a cladistic reassessment. *Bull. Mar. Sci.* 52(1):516-540.
- CHAPLEAU, F. e KEAST, A. 1988 – A phylogenetic reassessment of the monophyletic status of the family Soleidae with comments on the suborder Soleoidei (Pisces: Pleuronectiformes). *Can. J. Zool.* 66:2797-2810.
- CROTHER, B.I. 1990 – Is "some better than none" or do allele frequencies contain phylogenetically useful information? *Cladistics* 6:277-281.

- ESCHMEYER, W.N. 1990 – Catalog of the genera of fishes. California Academy of Sciences, San Francisco, v + 697 p.
- FARRIS, J.S. 1970 – Methods for computing Wagner trees. *Syst. Zool.* 19:83-92.
- FUTCH, C.R. 1977 – Larvae of *Trichopsetta ventralis* (Pisces: Bothidae), with comments on intergeneric relationships within the Bothidae. *Bull. Mar. Sci.* 27:740-757.
- GORMAN, G.C. e RENZI Jr., J. 1979 – Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoretic studies: effects of sample size. *Copeia* 2:242-249.
- GUITART, D.J. 1979 – Sinopsis de los peces marinos de Cuba; pp.329-342.
- GUTHERZ, E.L. 1978 – Cynoglossidae. In: FISCHER, W., Ed., *FAO species identification sheets for fishery purposes. Western Central Atlantic (fishing area 31)*. FAO, Roma.
- HARRIS, H. e HOPKINSON, D.A. 1978 – *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
- HENNIG, W. 1966 – *Phylogenetic systematics*. Univ. of Illinois Press, Urbana, 325 p.
- HENSLEY, D.A. 1977 – Larval development of *Engyophrys senta* (Bothidae), with comments on intermuscular bones in flatfishes. *Bull. Mar. Sci.* 27:681-703.
- HENSLEY, D.A. e AHLSTROM, E.H. 1983 – Pleuronectiformes relationships; pp. 670-687. In: *Ontogeny and systematics of fishes (Special Publication, 1)*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Washington.
- HUBBS, C.L. 1945 – Phylogenetic position of Citharidae, a family of flatfishes. *Misc. Publ., Museum Zool. Univ. Michigan* 63:1-38.
- HUDON, J. e GUDERLEY, H. 1984 – An electrophoretic study of the phylogenetic relationships among four species of sticklebacks (Pisces: Gasterosteidae). *Can. J. Zool.* 62:2313-2316.
- INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY ON THE NOMENCLATURE AND CLASSIFICATION OF ENZYMES 1978 – *Enzyme Nomenclature. Recommendations of the nomenclature committee of the IUBNCE*. Academic Press, New York, 606 p.
- JOHNSTON, P.G., POTTER, I.C. e ROBINSON, E.S. 1987 – Electrophoretic analysis of population of the South Hemisphere lampreys *Geotria australis* and *Mordicia mordax*. *Genet.* 74:113-117.
- LAUDER, G.V. e LIEM, K.F. 1983 – The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. *Bull. Mus. Comp. Zool.* 150(3):95-197.
- MADDISON, W.P., DONOGHUE, M.J. e MADDISON, D.R. 1984 – Outgroup analysis and parsimony. *Syst. Zool.* 33:83-103.
- MARKERT, C.L. e HOLMES, R.S. 1969 – Lactate dehydrogenase isozymes of the flatfish, Pleuronectiformes: kinetic, molecular and immunological analysis. *J. Exp. Zool.* 171:85-104.
- MAYR, E. 1987 – The ontological states of species: scientific progress and philosophical terminology. *Biol. Philos.* 2:145-166.
- MENDES, E.C. e BIANCONCINI, M.S.C. 1989 – Uma visão bioquímica da filogenia dos artrópodes. *Ciênc. Cult.* 41(4):315-318.
- MENEZES, N.A. e BENVENIGNO, G.Q. 1976 – On the species of the genus *Symphurus* from the Brazilian coast, with descriptions of two new species (Osteichthyes, Pleuronectiformes, Cynoglossidae). *Pap. Av. Zool.* 30(11):137-170.
- MENEZES, N.A. e FIGUEIREDO, J.L. (no prelo). – *Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil. IV Teleostei (5)*. Museu de Zoologia da USP, São Paulo.
- MICKEVICH, M.F. e JOHNSON, M.S. 1976 – Congruence between morphological and allozyme data in evolutionary inference and character evolution. *Syst. Zool.* 25:260-270.
- MOREIRA, D.M. 1989 – *Variabilidade protéica e relacionamento filogenético intra e interespecífico em roedores fossoriais do gênero Ctenomys (Rodentia - Ctenomyidae) que ocorrem no Brasil*. Dissertação de Mestrado. UFRS, Porto Alegre, 161 p.
- MORIZOT, D.C. e SICILIANO, M.J. 1983 – Comparative gene mapping in fishes. Isozymes: current topics in biological and medical research. *Gen. Evol.* 10:261-285.

- MUNROE, T.A. 1987 – A systematic revision of Atlantic tonguefishes (*Symphurus*: Cynoglossidae: Pleuronectiformes) with a preliminary hypothesis of species group relationships. Tese de doutorado. College of William and Mary, Virginia Institute of Marine Science, Virginia.
- MURPHY, R.W. 1993 – The phylogenetic analysis of allozyme data: invalidity of coding alleles by presence/absence and recommended procedures. *Bioch. Syst. Ecol.* 21(1):25-38.
- NEI, M. 1972 – Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:282-292.
- NEI, M. 1978 – Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genet.* 89:583-590.
- NORMAN, J.R. 1934 – A systematic monograph of the flatfishes (Heterosomata), Psettoidea, Bothidae, Pleuronectidae. *Br. Mus. (Nat. Hist.)* 1:1-459.
- NUMACHI, K. 1981 – A simple method for preservation and scanning of starch gels. *Biochem. Genet.* 19:233-236.
- PATTON, J.C. e AVISE, J.C. 1983 – An empirical evaluation of qualitative Hennigian analyses of protein electrophoretic data. *J. Mol. Evol.* 19:244-254.
- REGAN, C.T. 1910 – The origin and evolution of the teleostean fishes of the order Heterosomata. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 8(6):484-496.
- REGAN, C.T. 1929 – Fishes. Heterosomata; pp 324-325. In: *Encyclopedia Britannica*, 14 ed. v. 9.
- RIBEIRO, A.M. 1915 – Fauna brasiliense, Peixes. Tomo V (Eleuterobranchios: Aspirophoros). *Arch. Mus. Nac.* 17:19-22.
- ROGERS, J.S. 1986 – Deriving phylogenetic trees from allele frequencies: a comparison of nine genetic distances. *Syst. Zool.* 35(3):297-310.
- ROHLF, F.J. e WOOLLEN, M.C. 1988 – Evaluation of the restricted maximum-likelihood method for estimating phylogenetic trees using simulated allele-frequency data. *Evolution* 42(3):581-595.
- ROUX, C. 1973 – Poissons téléostéens du Plateau Continental Brésilien. (Résultats Scientifiques des Campagnes de la "Calypso", v. 10). Masson Ed., Paris, 207 p.
- SANTOS, G.M., JÉGU, M. e MERONA, B. 1984 – Catálogo de peixes comerciais do Baixo Rio Tocantins - Projeto Tucuruí. ELETRONORTE/CNPq/INPA, Manaus, 84 p.
- SCHEEPMARKER, M., MEER, F.V.D. e PINKSTER, S. 1988 – Genetic differentiation of the Iberian amphipods *Gammarus ibericus* Margalef, 1951 and *G. gauthieri* S. Karaman, 1935, with reference to some related species in France. *Bijd. Dierk.* 58(2):205-226.
- SEEB, L.W. e GUNDERSON, D.R., 1988 – Genetic variation and population structure of Pacific Ocean perch (*Sebastes alutus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45:78-88.
- SITES Jr., J.W., BICKHAM, J.W., PYTEL, B.A., GREENBAUM, I.F. e BATES, B.A. 1984 – Biochemical characters and the reconstruction of turtle phylogenies: relationships among batagurine genera. *Syst. Zool.* 33(2):137-158.
- SMITHIES, O. 1955 – Zone electrophoresis in starch gel: group variation in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61:629-641.
- SMITHIES, O. 1959 – An improved procedure for starch gel electrophoresis. *Biochem. J.* 71:585-587.
- SNEATH, P.H.A. e SOKAL, R.R. 1973 – **Numerical taxonomy**. W.H. Freeman, San Francisco, 573 p.
- SOLÉ-CAVA, A.M. e LEVY, J. 1987 – Biochemical evidence for a third species of angel shark off the East coast of South America. *Bioch. Syst. Ecol.* 15:139-144.
- SOLÉ-CAVA, A.M. e THORPE, J.P. 1987 – The uses of electrophoresis in sponge taxonomy; pp. 243-258. in: VACELET, J. e BOURY-ESNAULT, N., Ed., *Taxonomy of Porifera*. Springer Verlag, Berlin.
- SWOFFORD, D.L. e BERLOCHER, S.H. 1987 – Inferring evolutionary trees from gene frequency data under the principle of maximum parsimony. *Syst. Zool.* 36:293-325.

- SWOFFORD, D.L. e SELANDER, R.B. 1981 – BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.* 72:281-283.
- THORPE, J.P. 1979 – Enzyme variation and taxonomy: the estimation of sampling errors in measurements of interspecific genetic similarity. *Biol. J. Linn. Soc.* 11:369-386.
- THORPE, J.P. 1982 – The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13:139-168.
- THORPE, J.P. 1983 – Enzyme variation, genetic distance and evolutionary divergence in relation to levels of taxonomic significance. Academic Press, London, 131 p.
- WARD, R.D. e BEARDMORE, J.A. 1981 – Protein variation in the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Genet. Res.* 30:45-62.
- WATROUS, L.E. e WHEELER, Q.D. 1981 – The out-group comparison method of character analysis. *Syst. Zool.* 30(1):1-11.
- WHITT, G.S. 1987 – Species differences in isozyme tissue patterns: their utility for systematic and evolutionary analyses. Isozymes: current topics in biological and medical research. *Gen. Dev. Evol.* 15:1-26.

Maria Elisabeth de Araújo  
Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza  
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
58059-900 João Pessoa, PB  
BRASIL

Endereço atual:  
SUDENE - E/CE  
Rua Rodrigues Júnior, 840  
60060-000 Fortaleza, CE  
BRASIL