

Phylogenetic relationships of selected genera of Lutjanidae inferred from mitochondrial regions, with a note on the taxonomic status of *Pinjalo pinjalo*

Relaciones filogenéticas de algunos géneros de la familia Lutjanidae inferidas a partir de regiones mitocondriales, con una nota sobre la taxonomía de *Pinjalo pinjalo*

Cecilia Chu¹, Mohammed Rizman-Idid^{1,2*}, Chong Ving Ching^{1,2}

¹ Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Lembah Pantai, Kuala Lumpur, Malaysia.

² Institute of Ocean and Earth Sciences, University of Malaya, 50603 Lembah Pantai, Kuala Lumpur, Malaysia.

* Corresponding author. Email: rizman@um.edu.my

ABSTRACT. Phylogenetic relationships of 43 species in 11 genera, representing four subfamilies of the family Lutjanidae and two genera of the family Caesionidae, were inferred using mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome c oxidase subunit I (COI). Further assessment using the mtDNA control region (CR) was carried out to infer the relationship between the Indian and western Pacific types of *Lutjanus russellii* collected from the coast of Peninsular Malaysia. A total of 11 and 12 species were sequenced for COI and CR genes, respectively. Clade formation reflects, to some extent, the species groupings based on morphological characteristics and their biogeography. The close phylogenetic relationship between *Pinjalo pinjalo* and the *Lutjanus* red snappers (*Lutjanus malabaricus* and *Lutjanus sebae*) warrants a taxonomic revision of the former as the two genera are currently separated based on non-exclusive morphological characters. A sequence divergence of 4.2% between the Indian and western Pacific types of *L. russellii* as well as the morphological and biogeographical differences may suggest two separate species.

Key words: *Lutjanus*, *Pinjalo*, COI, barcoding, taxonomic revision.

RESUMEN. Las relaciones filogenéticas de 43 especies pertenecientes a 11 géneros, representando cuatro subfamilias de la familia Lutjanidae y dos géneros de la familia Caesionidae, fueron inferidas a partir del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI). Además, se usó la región control (RC) del ADN mitocondrial para inferir la filogenia entre los tipos de *Lutjanus russellii* del océano Índico y el Pacífico occidental recolectados en las costas de la península de Malasia. Se generaron secuencias de COI (11 especies) y RC (12 especies). Los clados generados concuerdan con las agrupaciones propuestas anteriormente basadas en la morfología y biogeografía de las especies. La relación filogenética cercana entre *Pinjalo pinjalo* y los pargos rojos *Lutjanus malabaricus* y *Lutjanus sebae* justifica la revisión taxonómica de los mismos ya que los caracteres morfológicos empleados para diferenciar ambos géneros son ambiguos. La divergencia de las secuencias (4.2%) entre los dos tipos de *L. russellii* (Índico y Pacífico occidental), así como la caracterización morfológica y la información biogeográfica permiten sugerir que son dos especies distintas.

Palabras clave: *Lutjanus*, *Pinjalo*, COI, código de barras genético, revisión taxonómica.

INTRODUCTION

About 112 species of snappers (family Lutjanidae) are reported to exist in the warm seas of the Indian Ocean and the tropical and subtropical parts of the western Pacific Ocean (Masuda 1984). The largest species diversity occurs in the genus *Lutjanus*, with 64 out of a total of 72 species found in the subfamily Lutjaninae (Anderson and Allen 2001). Lutjaninae is composed of the genera *Lutjanus*, *Pinjalo*, *Macolor*, *Ocyurus*, and *Rhomboplites*, the last two being monotypic genera found only in western Atlantic waters (Allen 1985). Malaysian snappers are represented by 38 species in 10 genera, which include *Lutjanus*, *Pinjalo*, and *Macolor* (Chong *et al.* 2010).

INTRODUCCIÓN

Alrededor de 112 especies de pargos (familia Lutjanidae) habitan en las aguas templadas del océano Índico y en las partes tropicales y subtropicales del océano Pacífico occidental (Masuda 1984). El género *Lutjanus* presenta la mayor diversidad de especies, con 64 del total de 72 especies de la subfamilia Lutjaninae (Anderson y Allen 2001). Esta subfamilia está compuesta por los géneros *Lutjanus*, *Pinjalo*, *Macolor*, *Ocyurus* y *Rhomboplites*, los últimos dos siendo géneros monotípicos que sólo se encuentran en aguas del Atlántico occidental (Allen 1985). Los pargos de Malasia están representados por 38 especies pertenecientes a 10 géneros, entre ellos *Lutjanus*, *Pinjalo* y *Macolor* (Chong *et al.* 2010).

Previously, Johnson (1980) suggested monophyly of *Lutjanus* species based on their primitive and derivative morphological characters, but recent DNA sequence based phylogenies have rendered the genus *Lutjanus* as paraphyletic due to the phylogenetic associations of some *Lutjanus* species with other genera of the families Lutjanidae and Caesionidae (Chow and Walsh 1992, Miller and Cribb 2007, Gold *et al.* 2011).

In the present study, we hypothesize that the genus *Pinjalo* is related to *Lutjanus*, specifically *Pinjalo pinjalo* to *Lutjanus malabaricus* and *Lutjanus sebae*. Morphologically, the red *Pinjalo* snapper resembles the two *Lutjanus* red snappers and has been often misidentified as the latter (Zhang *et al.* 2006). Phylogenetic affinities between the Indian Ocean (with body stripes) and the western Pacific (without body stripes) types of *Lutjanus russellii* were also investigated as the two types have never been stated in previous phylogenetic studies.

The mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (COI) was used to barcode and infer phylogenetic relationships of Lutjanidae, since many sequences are available for comparison from previous studies (Ward and Holmes 2007, Steinke *et al.* 2009, Victor *et al.* 2009, Asgharian *et al.* 2011, Gold *et al.* 2011, Lakra *et al.* 2011, Zhang and Hanner 2011). The relationship between the two conspecifics of *L. russellii* was further investigated using the mitochondrial DNA control region (CR) sequence since it better resolves relationships among populations, subspecies, or recently diverged species (Parker *et al.* 1998, Shaw *et al.* 2000).

MATERIALS AND METHODS

Sampling

A total of 441 snapper specimens were collected between August 2009 and December 2010 from the coastal waters of Peninsular Malaysia and neighboring islands using trawl nets, hook and lines, and traps. Fish from known locations were also purchased from commercial and artisanal landing sites. Muscle tissues or fin clips of each collected specimen were preserved immediately in 95% ethanol in the field, before keeping whole specimens in 10% formalin, which were subsequently measured, photographed, and identified following the identification keys of Anderson and Allen (2001). Two to five specimens of each of the 10 *Lutjanus* species (*L. argentimaculatus*, *L. carponotatus*, *L. fulviflamma*, *L. johnii*, *L. lutjanus*, *L. madras*, *L. malabaricus*, *L. quinquelineatus*, *L. sebae*, and *L. vitta*) and one *Pinjalo* species (*P. pinjalo*) were used for the phylogenetic study. For *L. russellii*, a total of 15 specimens (12 Indian and 3 western Pacific) were used for the phylogenetic study.

DNA extraction

Ethanol-preserved tissue samples were digested using 10 mg L⁻¹ proteinase K, in 300 µL extraction buffer with 2%

Johnson (1980) propuso la monofilia de las especies del género *Lutjanus* con base en sus caracteres morfológicos primitivos y derivados, pero las recientes filogenias basadas en las secuencias de ADN han sugerido que este género es parafilético debido a las asociaciones filogenéticas de algunas especies de *Lutjanus* con otros géneros de las familias Lutjanidae y Caesionidae (Chow y Walsh 1992, Miller y Cribb 2007, Gold *et al.* 2011).

En el presente trabajo planteamos la hipótesis de que el género *Pinjalo* está relacionado con el género *Lutjanus*, específicamente la especie *Pinjalo pinjalo* con las especies *Lutjanus malabaricus* y *Lutjanus sebae*. Estas tres especies se parecen morfológicamente y *P. pinjalo* con frecuencia ha sido erróneamente identificada (Zhang *et al.* 2006). También se estudiaron las afinidades filogenéticas entre *Lutjanus russellii* del océano Índico (con rayas corporales) y del Pacífico occidental (sin rayas corporales) ya que aparentemente nunca se han mencionado los dos tipos en otros trabajos filogenéticos.

Se usó el gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI) para obtener el código de barra genético e inferir las relaciones filogenéticas de Lutjanidae, ya que es posible realizar comparaciones con varias secuencias obtenidas en trabajos previos (Ward y Holmes 2007, Steinke *et al.* 2009, Victor *et al.* 2009, Asgharian *et al.* 2011, Gold *et al.* 2011, Lakra *et al.* 2011, Zhang y Hanner 2011). Además, se examinó la relación entre los dos conespecíficos de *L. russellii* mediante la secuencia de la región control (RC) del ADN mitocondrial porque resuelve mejor las relaciones entre poblaciones, subspecies o especies recientemente divergidas (Parker *et al.* 1998, Shaw *et al.* 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Entre agosto de 2009 y diciembre de 2010 se capturaron 441 especímenes de pargos de las aguas costeras de la península de Malasia e islas vecinas con redes de arrastre, caña y anzuelo, y trampas. También se adquirieron peces procedentes de sitios conocidos en puntos de desembarques comerciales y artesanales. En el campo, inmediatamente se preservaron muestras de tejido muscular o aleta de cada espécimen en etanol al 95%. Los especímenes enteros fueron preservados en formalina al 10% y subsecuentemente fueron medidos, fotografiados e identificados según las claves de identificación de Anderson y Allen (2001). Para el estudio filogenético se usaron de dos a cinco especímenes de cada una de las 10 especies de *Lutjanus* (*L. argentimaculatus*, *L. carponotatus*, *L. fulviflamma*, *L. johnii*, *L. lutjanus*, *L. madras*, *L. malabaricus*, *L. quinquelineatus*, *L. sebae* y *L. vitta*) y una especie de *Pinjalo* (*P. pinjalo*). Para el estudio filogenético de *L. russellii*, se usaron 15 especímenes (12 del tipo Índico y 3 del Pacífico occidental).

sodium dodecyl sulfate (SDS). DNA was extracted using the modified phenol–chloroform method (Taggart *et al.* 1992).

PCR amplification and sequencing

The partial fragment of the COI gene was amplified using the barcoding primers FishF1, FishR1, FishF2, and FishR2 (Ward *et al.* 2005). We prepared 50 μL of polymerase chain reaction (PCR) mixtures containing 5 μL of 10 \times PCR buffer, 5 mM MgCl_2 , 0.05 mM dNTP mix, 0.1 μM of each primer, and 1.2 U *Taq* polymerase (Fermentas), with 5–10 ng of each template DNA. PCR was performed using a MultiGene TC9600-G thermal cycler (Labnet International Inc.). Initial denaturation step was at 95 °C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 0.5 min, annealing at 54 °C for 0.5 min, and elongation at 72 °C for 1 min. The cycles ended with a final elongation step at 72 °C for 10 min and held at 4 °C.

The left domain of CR was amplified using primers Pro889U20 and TDKD1291L21 (Salini *et al.* 2006). The 50 μL PCR mixtures included 5 μL of 10 \times PCR buffer, 5 mM MgCl_2 , 0.4 mM dNTP mix, 0.8 μM of each primer, and 4 U *Taq* polymerase (Fermentas), with 5–10 ng of each template DNA. PCR was performed using an Eppendorf Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The initial denaturation for PCR was at 94 °C for 1.5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 5 s, annealing at 50 °C for 0.5 min, and elongation steps at 72 °C for 0.5 min. Final elongation was at 72 °C for 5 min and held at 4 °C.

The PCR products were purified using the GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas), following the manufacturer's protocol. Forward and reverse sequencing of the purified PCR products was performed using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem).

Sequence analysis

The DNA sequences were checked and edited using Sequence Scanner (Applied Biosystems) to create a consensus sequence for each specimen and they were deposited in GenBank. With the inclusion of reference sequences from GenBank, multiple sequence alignment and analysis of nucleotide variation of COI and CR sequences was done in MEGA4.0 (Tamura *et al.* 2007). All DNA sequences analyzed in this study are listed in table 1.

Phylogenetic analyses

The evolutionary model for COI sequences was chosen based on the Akaike Information Criterion (AIC) using Modeltest3.7 (Posada and Crandall 1998), whereas the corrected AIC was adopted for CR sequences in jModeltest (Posada 2008). By incorporating the respective evolutionary models, phylogenetic trees were constructed separately for both sets of sequences by Bayesian inference analysis. The

Extracción de ADN

Las muestras de tejido preservadas en etanol fueron digeridas con 10 mg L^{-1} de proteinase K, en 300 μL de tampón de extracción con dodecil sulfato sódico (SDS) al 2%. El ADN fue extraído mediante el método modificado de fenol–cloroformo (Taggart *et al.* 1992).

Amplificación y secuenciación de ADN

Se amplificó un fragmento parcial del gen COI con los cebadores FishF1, FishR1, FishF2 y FishR2 (Ward *et al.* 2005). Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se usó una mezcla con un volumen final de 50 μL que contenía 5 μL de amortiguador para PCR 10 \times , 5 mM de MgCl_2 , 0.05 mM de dNTPs, 0.1 μM de cada uno de los cebadores y 1.2 U de *Taq* polimerasa (Fermentas), con 5–10 ng de cada plantilla de ADN. La PCR se realizó en un termociclador MultiGene TC9600-G (Labnet International Inc.). Las condiciones de amplificación fueron desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 0.5 min, hibridación a 54 °C durante 0.5 min, extensión a 72 °C durante 1 min, y una extensión final a 72 °C durante 10 min y mantenida a 4 °C.

El dominio izquierdo de RC se amplificó con los cebadores Pro889U20 y TDKD1291L21 (Salini *et al.* 2006). Para la PCR se usó una mezcla con un volumen final de 50 μL que contenía 5 μL de amortiguador para PCR 10 \times , 5 mM de MgCl_2 , 0.4 mM de dNTPs, 0.8 μM de cada cebador y 4 U de *Taq* polimerasa (Fermentas), con 5–10 ng de cada plantilla de ADN. La PCR se realizó en un termociclador (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). La desnaturalización inicial para la PCR fue a 94 °C durante 1.5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 5 s, hibridación a 50 °C durante 0.5 min, extensión a 72 °C durante 0.5 min, y una extensión final a 72 °C durante 5 min y mantenida a 4 °C.

Los productos de PCR fueron purificados con un kit comercial (GeneJET PCR Purification Kit, Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación en ambos sentidos de los productos purificados se realizó con el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem).

Análisis de secuencias

Las secuencias de ADN se revisaron y editaron con el programa Sequence Scanner (Applied Biosystems) para generar una secuencia consenso para cada espécimen, y se depositaron en GenBank. Con la inclusión de las secuencias de referencia de GenBank, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias y un análisis de la variación de nucleótidos de las secuencias de COI y RC con el programa MEGA4.0 (Tamura *et al.* 2007). Todas las secuencias de ADN analizadas en este estudio se muestran en la tabla 1.

Table 1. List of species and corresponding GenBank accession numbers for the cytochrome c oxidase subunit I (COI) and control region sequences analyzed in this study.

Tabla 1. Lista de especies y números de accesoión de GenBank correspondientes a las secuencias de citocromo c oxidasa subunidad I (COI) y la región control analizadas en este trabajo.

Genus	Species	Collection locality	Accession No.	
			COI	Control region
<i>Aphareus</i>	<i>A. rutilans</i>	Australia	EF609285 ^a	
		Mozambique	HQ561493 ^h	
<i>Apsilus</i>	<i>A. dentatus</i>	Puerto Rico	HQ162409 ^b	
		Puerto Rico	HQ162410 ^b	
<i>Caesio</i>	<i>C. caeruleaurea</i>	South China Sea	FJ237658 ^h	
		South China Sea	FJ237659 ^h	
<i>Etelis</i>	<i>E. carbunculus</i>	Australia	EF609353 ^a	
		New Caledonia		JQ965375 ^h
		New Caledonia		JQ965383 ^h
<i>Macolor</i>	<i>M. niger</i>	Philippines	FJ583628 ^c	
		Philippines	FJ583629 ^c	
		Australia	EF609403 ^a	
<i>Ocyurus</i>	<i>O. chrysurus</i>	No information	EU752125 ^h	
		Central America	FJ998489 ^d	
<i>Pinjalo</i>	<i>P. pinjalo</i>	Malaysia	JN208389 ⁱ	JN208460 ⁱ
		Malaysia	JN208390 ⁱ	JN208461 ⁱ
		Malaysia	JN208391 ⁱ	JN208462 ⁱ
		Malaysia	JN208392 ⁱ	JN208463 ⁱ
<i>Pristipomoides</i>	<i>P. multidentis</i>	Australia	EF609436 ^a	
	<i>P. typus</i>	Australia	EF609438 ^a	
<i>Pterocaesio</i>	<i>P. diagramma</i>	Japan	JF952832 ^e	
<i>Symphoricthys</i>	<i>S. spilurus</i>	Philippines	FJ584135 ^c	
<i>Lutjanus</i>	<i>L. adetii</i>	Australia	EF609393 ^a	
		Mexico	GU225349 ^h	
	<i>L. analis</i>	No information	EU752111 ^h	
		No information	EU752112 ^h	
	<i>L. argentimaculatus</i>	China	EU502685 ^h	
		China	EU502686 ^h	
		Malaysia		JN208549 ⁱ
	<i>L. bengalensis</i>	Malaysia		JN208550 ⁱ
		South Africa	HQ561528 ^h	
	<i>L. bohar</i>	South China Sea	EU600137 ^h	
		Australia	EF609394 ^a	
	<i>L. buccanella</i>	Japan	JF952787 ^e	
		Virgin Islands	FJ998462 ^d	
<i>L. carponotatus</i>	Virgin Islands	FJ998465 ^d		
	Malaysia	JN208417 ⁱ	JN208494 ⁱ	
	Malaysia	JN208418 ⁱ		
<i>L. cyanopterus</i>	Malaysia	JN208419 ⁱ	JN208495 ⁱ	
	Australia	EF609395 ^a		
	Virgin Islands	GQ329867 ^d		

(Continued)

Genus	Species	Collection locality	Accession No.	
			COI	Control region
	<i>L. ehrenbergii</i>	Iran	HQ149873 ^f	
		Iran	HQ149874 ^f	
		Iran	HQ149875 ^f	
	<i>L. fulviflamma</i>	Malaysia	JN208403 ⁱ	JN208477 ⁱ
		Malaysia	JN208404 ⁱ	JN208478 ⁱ
		Malaysia	JN208405 ⁱ	JN208479 ⁱ
		Iran	HQ149876 ^f	
		Iran	HQ149877 ^f	
	<i>L. griseus</i>	USA	GU224930 ^h	
		USA	JN021304 ^h	
	<i>L. jocu</i>	Central America	FJ998474 ^d	
		Virgin Islands	FJ998476 ^d	
	<i>L. johnii</i>	Malaysia	JN208440 ⁱ	JN208517 ⁱ
		Malaysia	JN208435 ⁱ	JN208522 ⁱ
		Malaysia	JN208451 ⁱ	JN208530 ⁱ
		Malaysia	JN208449 ⁱ	JN208532 ⁱ
		Australia	EF609396 ^a	
	<i>L. kasmira</i>	China	FJ416614 ^h	
		South Africa	GU805021 ^h	
		South China Sea	EU600138 ^h	
	<i>L. lemniscatus</i>	Australia	EF609397 ^a	
	<i>L. lutjanus</i>	Malaysia	JN208429 ⁱ	JN208508 ⁱ
		Malaysia	JN208430 ⁱ	JN208509 ⁱ
		Malaysia	JN208431 ⁱ	JN208510 ⁱ
		Malaysia	JN208432 ⁱ	JN208511 ⁱ
		Iran	HQ149880 ^f	
	<i>L. madras</i>	Malaysia	JN208425 ⁱ	JN208504 ⁱ
		Malaysia	JN208426 ⁱ	JN208505 ⁱ
		Malaysia	JN208427 ⁱ	JN208506 ⁱ
		Malaysia	JN208428 ⁱ	JN208507 ⁱ
	<i>L. mahogoni</i>	Central America	FJ998477 ^d	
		Virgin Islands	FJ998480 ^d	
	<i>L. malabaricus</i>	Malaysia	JN208393 ⁱ	JN208464 ⁱ
		Malaysia	JN208394 ⁱ	JN208466 ⁱ
		Malaysia	JN208395 ⁱ	
		Malaysia	JN208396 ⁱ	
		Malaysia	JN208397 ⁱ	JN208469 ⁱ
		Malaysia		JN208470 ⁱ
		Australia	EF609398 ^a	
	<i>L. notatus</i>	South Africa	HQ561527 ^h	
	<i>L. novemfasciatus</i>	Mexico	GU440386 ^h	
	<i>L. peru</i>	No information	EU752116 ^h	
		No information	EU752117 ^h	
<i>Lutjanus</i>	<i>L. purpureus</i>	No information	EU752118 ^h	
		USA	JN021305 ^h	

(Continued)

Genus	Species	Collection locality	Accession No.	
			COI	Control region
	<i>L. quinquelineatus</i>	Malaysia	JN208400 ⁱ	JN208474 ⁱ
		Malaysia	JN208401 ⁱ	JN208475 ⁱ
		Malaysia	JN208402 ⁱ	JN208476 ⁱ
		Australia	EF609399 ^a	
		Japan	JF952789 ^e	
	<i>L. rivulatus</i>	South Africa	DQ885029 ^h	
	<i>L. russellii</i> (Indian Ocean)	Malaysia	JN208406 ⁱ	JN208480 ⁱ
		Malaysia	JN208407 ⁱ	JN208481 ⁱ
		Malaysia	JN208408 ⁱ	JN208482 ⁱ
		Malaysia	JN208409 ⁱ	JN208483 ⁱ
		Malaysia	JN208410 ⁱ	JN208484 ⁱ
		Malaysia	JN208411 ⁱ	JN208485 ⁱ
		Malaysia	JN208412 ⁱ	JN208486 ⁱ
		Malaysia	JN208413 ⁱ	JN208487 ⁱ
		Malaysia		JN208488 ⁱ
		Malaysia		JN208489 ⁱ
		Malaysia		JN208490 ⁱ
		Malaysia		JN208491 ⁱ
		India	EU148540 ^g	
	<i>L. russellii</i> (W Pacific)	Malaysia	JN208414 ⁱ	
		Malaysia	JN208415 ⁱ	
		Malaysia	JN208416 ⁱ	JN208492 ⁱ
		Malaysia		JN208493 ⁱ
	<i>L. sebae</i>	Malaysia	JN208398 ⁱ	JN208472 ⁱ
		Malaysia	JN208399 ⁱ	JN208473 ⁱ
		Australia	EF609401 ^a	
	<i>L. stellatus</i>	China	EU502688 ^h	
		South China Sea	EU600132 ^h	
		South China Sea	EU600133 ^h	
	<i>L. synagris</i>	USA	JN021307 ^h	
		USA	JN021308 ^h	
	<i>L. vitta</i>	Malaysia	JN208420 ⁱ	JN208496 ⁱ
		Malaysia	JN208421 ⁱ	
		Malaysia	JN208422 ⁱ	
		Malaysia	JN208423 ⁱ	JN208499 ⁱ
		Malaysia	JN208424 ⁱ	JN208500 ⁱ
		Malaysia		JN208501 ⁱ
	<i>L. vivanus</i>	Australia	EF609402 ^a	
		Mexico	GU225380 ^h	
		Virgin Islands	FJ998485 ^d	
No. of sequences			115	52

^a Ward and Holmes (2007); ^b Gold *et al.* (2011); ^c Steinke *et al.* (2009); ^d Victor *et al.* (2009); ^e Zhang and Hanner (2011); ^f Asgharian *et al.* (2011); ^g Lakra *et al.* (2011); ^h unpublised sources; ⁱ this study.

Bayesian analysis was implemented in MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) over 8,000,000 generations via four Markov Chain Monte Carlo chains, with tree sampling every 100 generations. Only branches with more than 0.70 posterior probabilities were considered. The COI-based phylogenetic tree was rooted with *Aphareus rutilans* (subfamily Etelinae) with the addition of the genera *Pristipomoides* and *Etelis* (subfamily Etelinae), *Apsilus* (subfamily Apsilinae), and *Symphorichthys* (subfamily Paradicichthyinae) to achieve better tree resolution among the Lutjaninae species. For the CR-based phylogenetic tree, *Etelis carbunculus* was used to root the tree.

RESULTS

DNA sequence variation

A total of 48 COI sequences were directly obtained from this study, disregarding two specimens of *L. argentimaculatus* that failed to amplify for COI. The 606 bp COI sequence alignment contained 219 variable sites, of which 212 were parsimony informative. The transition/transversion ratio was 2.9. G-bias was observed at both the second and third codon positions of COI with nucleotide compositions A = 24.9%, C = 28.8%, G = 18.4%, and T = 27.9%.

The CR sequence alignment was 461 bp in length, which includes 14 to 76 bp sized indels. There were 276 variable and 269 parsimony informative sites with transition/transversion ratio of 0.78. The bases were fractioned as A = 35.7%, C = 19.6%, G = 13.8%, and T = 30.9%.

Evolutionary model

The Modeltest result suggested the Tamura–Nei evolutionary model with invariable and gamma distribution (TrN + I + G; I = 0.6289; G = 1.3905) for COI sequences, whereas for the CR sequences, the program jModeltest suggested the three-parameter model with invariable sites and gamma distribution (TPM3uf + I + G; I = 0.2940; G = 1.2110). Base frequencies for COI were 0.2899, 0.3106, 0.1216 and 0.2779 for A, C, G, and T, respectively, with incorporated rate matrix for the substitution model in the Bayesian inference analysis: [A-C] = 1.0000; [A-G] = 19.1232; [A-T] = 1.0000; [C-G] = 1.0000; [C-T] = 11.1862; [G-T] = 1.0000. Unequal base frequencies were also observed in CR, with 0.3801, 0.2024, 0.1120, and 0.3056 for A, C, G, and T, respectively. The incorporated rate matrix for CR was [A-C] = 0.6564; [A-G] = 3.9776; [A-T] = 1.0000; [C-G] = 0.6564; [C-T] = 3.9776; [G-T] = 1.0000.

COI-based phylogenetic tree

The COI phylogram shows that the subfamilies Etelinae, Apsilinae, and Paradicichthyinae are basal to Lutjaninae (fig. 1). All species in Lutjaninae are monophyletic except

Análisis filogenético

El modelo de evolución para las secuencias de COI se escogió con base en el Criterio de Información de Akaike (AIC) mediante el programa Modeltest3.7 (Posada y Crandall 1998), mientras que para las secuencias de RC se usó el AIC corregido con el paquete jModeltest (Posada 2008). Al incorporar los modelos de evolución respectivos, se construyeron árboles filogenéticos por separado para ambos conjuntos de secuencias mediante un análisis de inferencia bayesiana. El análisis bayesiano se llevó a cabo en MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist 2001) con cuatro cadenas de Markov Monte Carlo por 8,000,000 generaciones, muestreando un árbol cada 100 generaciones. Sólo se consideraron las ramas con probabilidades posteriores superiores a 0.70. El árbol filogenético basado en las secuencias de COI fue arraigado con *Aphareus rutilans* (subfamilia Etelinae), con la adición de los géneros *Pristipomoides* y *Etelis* (subfamilia Etelinae), *Apsilus* (subfamilia Apsilinae) y *Symphorichthys* (subfamilia Paradicichthyinae) para lograr una mejor resolución de las especies de la subfamilia Lutjaninae. El árbol filogenético basado en las secuencias de RC fue arraigado con *Etelis carbunculus*.

RESULTADOS

Variación de las secuencias de ADN

Se obtuvieron 48 secuencias de COI, sin considerar dos especímenes de *L. argentimaculatus* para los cuales no se logró la amplificación de COI. La alineación de la secuencia de 606 pb de COI presentó 219 sitios variables, de los cuales 212 fueron parsimoniosamente informativos. La razón transición/transversión fue de 2.9. Se observó sesgo hacia G en tanto la segunda como la tercera posición del codón de COI. Las proporciones de las bases fueron A = 24.9%, C = 28.8%, G = 18.4% y T = 27.9%.

La alineación de la secuencia de RC fue de 461 pb de largo, que incluye inserciones/eliminaciones de 14 a 76 pb. Se observaron 276 sitios variables y 269 sitios parsimoniosamente informativos. La razón transición/transversión fue de 0.78. Las proporciones de las bases fueron A = 35.7%, C = 19.6%, G = 13.8% y T = 30.9%.

Modelo de evolución

Para las secuencias de COI, el programa Modeltest sugirió el modelo de evolución de Tamura–Nei con una proporción de sitios invariantes y distribución gamma (TrN + I + G; I = 0.6289; G = 1.3905). Para las secuencias de RC, el programa jModeltest sugirió el modelo de tres parámetros con una proporción de sitios invariantes y distribución gamma (TPM3uf + I + G; I = 0.2940; G = 1.2110). Las frecuencias de las bases para COI fueron 0.2899, 0.3106, 0.1216 y 0.2779 para A, C, G y T, respectivamente, con una matriz

for *L. bohar* because *L. bohar* (EF609394) did not cluster with its conspecific *L. bohar* (JF952787).

The Lutjaninae species were defined into six major clades, based on a combination of well-supported branches and previous clade definitions (Miller and Cribb 2007, Victor *et al.* 2009, Wang *et al.* 2010, Gold *et al.* 2011). Clades A–E are supported with over 0.90 posterior probabilities, whereas clade F with only 0.73. Branching order is resolved for clades A–C; however, clades D–F form a polytomy. Clade A consists of *P. pinjalo*, *L. malabaricus*, *L. adetii*, and *L. sebae*, with an average sequence divergence of 12.9% (± 1.2); the lowest sequence divergence is 11.8% between *L. adetii* and *L. malabaricus*, while the highest is 14.0% between *P. pinjalo* and *L. sebae*. Clade B consists of *Macolor niger* and two species of the family Caesionidae (*Pterocaesio diagramma* and *Caesio caerulaurea*), with an average sequence divergence of 10.9% (± 0.4). Clades C and D comprise *Lutjanus* species from the western Atlantic and eastern Pacific, whereas the *Lutjanus* species in clades E and F are mostly from the western Pacific and Indian Ocean. *Ocyurus chrysurus* is found in clade C with *L. analis*, *L. buccanella*, *L. synagris*, *L. mahogoni*, *L. vivanus*, *L. purpureus*, and *L. peru*, with an average sequence divergence of 6.3% (± 0.6), ranging from 1.9% to 8.9%. Clade D only contains *L. griseus*, *L. jocu*, and *L. apodus*. The interspecies divergences in clade D are the lowest observed amongst the Lutjaninae species, with an average sequence divergence of 2.5% (± 1.4), ranging from 1.0% to 3.1%. Clade E contains *L. lemniscatus*, *L. lutjanus*, *L. vitta*, *L. madras*, *L. fulviflamma*, *L. ehrenbergii*, *L. carponotatus*, and both types of *L. russellii*, with an average sequence divergence of 9.0% (± 0.6), ranging from 6.1% to 11.9%. The maximum divergence in clade E is shared between both types of *L. russellii* with *L. madras*. A separate branching between the Indian and western Pacific types of *L. russellii* is supported by 4.2% pairwise sequence divergence. The western Atlantic *L. cyanopterus* and eastern Pacific *L. novemfasciatus* cluster unexpectedly in clade F together with the following western Pacific *Lutjanus*: *L. rivulatus*, *L. stellatus*, *L. johnii*, *L. bohar* (JF952787), *L. quinquelineatus*, *L. notatus*, *L. kasmira*, *L. bengalensis*, and *L. argentimaculatus*; the average sequence divergence is 12.4% (± 0.8). In clade F, the lowest sequence divergence is 2.9% between *L. novemfasciatus* and *L. cyanopterus*, whereas sequence divergences between the western Pacific *Lutjanus* range from 5.2% to 16.4%.

Apart from *L. bohar* (16.3%), intraspecies divergences of the Lutjaninae range from 0.0% to 1.9%, with an average of 0.3% (± 0.1). Without considering *L. cyanopterus* and *L. novemfasciatus*, the interspecies divergences of Lutjaninae between western Atlantic species (range: 1.0–12.7%; average: 8.4% ± 0.9) are comparatively lower than those between the western Pacific species (range: 5.2–20.6%; average: 14.1% ± 0.3).

de tasa incorporada para el modelo de sustitución en el análisis bayesiano: [A–C] = 1.0000; [A–G] = 19.1232; [A–T] = 1.0000; [C–G] = 1.0000; [C–T] = 11.1862; [G–T] = 1.0000. También se observaron frecuencias desiguales de las bases en RC, de 0.3801, 0.2024, 0.1120 y 0.3056 para A, C, G y T, respectivamente. La matriz de tasa incorporada para RC fue [A–C] = 0.6564; [A–G] = 3.9776; [A–T] = 1.0000; [C–G] = 0.6564; [C–T] = 3.9776; [G–T] = 1.0000.

Árbol filogenético basado en las secuencias de COI

El filograma de COI muestra que las subfamilias Etelinae, Apsilinae y Paradichthyinae ocupan una posición basal respecto a Lutjaninae (fig. 1). Todas las especies de la subfamilia Lutjaninae forman un clado monofilético excepto *L. bohar*, ya que *L. bohar* (EF609394) no se agrupó con su conespecífico *L. bohar* (JF952787).

Las especies de la subfamilia Lutjaninae se agruparon en seis clados principales con base en una combinación de ramas bien sostenidas y definiciones previas de clados (Miller y Cribb 2007, Victor *et al.* 2009, Wang *et al.* 2010, Gold *et al.* 2011). Los clados A–E están sostenidos con probabilidades posteriores superiores a 0.90, mientras que el clado F con sólo 0.73. El orden de ramificación se resolvió para los clados A–C; sin embargo, los clados D–F forman una politomía. El clado A agrupa *P. pinjalo*, *L. malabaricus*, *L. adetii* y *L. sebae*, con una divergencia promedio de las secuencias de 12.9% (± 1.2); la menor divergencia fue 11.85% entre *L. adetii* y *L. malabaricus*, y la mayor fue 14.0% entre *P. pinjalo* y *L. sebae*. El clado B consiste de *Macolor niger* y dos especies de la familia Caesionidae (*Pterocaesio diagramma* y *Caesio caerulaurea*), con una divergencia promedio de las secuencias de 10.9% (± 0.4). Los clados C y D contienen las especies de *Lutjanus* del Atlántico occidental y el Pacífico oriental, mientras que las especies de *Lutjanus* en los clados E y F son principalmente del Pacífico occidental y el océano Índico. *Ocyurus chrysurus* se encuentra en el clado C junto con *L. analis*, *L. buccanella*, *L. synagris*, *L. mahogoni*, *L. vivanus*, *L. purpureus* y *L. peru*; la divergencia de las secuencias varía de 1.9% a 8.9%, con una divergencia promedio de 6.3% (± 0.6). El clado D contiene sólo a *L. griseus*, *L. jocu* y *L. apodus*; la divergencia interespecífica de las secuencias varía de 1.0% a 3.1%, con una divergencia promedio de 2.5% (± 1.4). El clado E contiene a *L. lemniscatus*, *L. lutjanus*, *L. vitta*, *L. madras*, *L. fulviflamma*, *L. ehrenbergii*, *L. carponotatus* y ambos tipos de *L. russellii*; la divergencia entre especies varía de 6.1% a 11.9%, con una divergencia promedio de 9.0% (± 0.6). En el clado E, la mayor divergencia es compartida por ambos tipos de *L. russellii* con *L. madras*. Una ramificación entre *L. russellii* del océano Índico y el Pacífico occidental es apoyada por una divergencia de secuencias por pares de 4.2%. En el clado F, *L. cyanopterus* del Atlántico occidental y *L. novemfasciatus*

CR-based phylogenetic tree

The CR phylogram (fig. 2) indicates the monophyly and affinities of 12 Lutjaninae species, with three well supported clades corresponding to clades A, E, and F in the COI phylogeny (fig. 1). The tree affirms the clustering of *P. pinjalo*, *L. malabaricus*, and *L. sebae* as a clade (clade A). In clade E, the two types of *L. russellii* cluster with *L. carponotatus*, *L. fulviflamma*, *L. lutjanus*, *L. madras*, and *L. vitta*, whereas clade F contains *L. argentimaculatus*, *L. quinquelineatus*, and *L. johnii*.

The CR tree also shows the separation of the two types of *L. russellii*, with pairwise sequence divergence of 10.8%. The intraspecific divergences of other species range from 0.5% to 6.7%, with an average of 1.8% (± 0.8).

DISCUSSION

The present COI phylogeny is congruent with phylogenies of Lutjanidae from other studies that used different mitochondrial and nuclear genes (Miller and Cribb 2007, Guo *et al.* 2007, Wang *et al.* 2010, Gold *et al.* 2011). Our clades A, C, D, and F of Lutjaninae correspond to clades A, C, D, and F of Gold *et al.* (2011), whereas our clades B and E correspond to species clusters in Miller and Cribb (2007). Additionally we propose the basal position of Paradicichthyinae to Lutjaninae, in addition to Apsilinae and Etelinae (Johnson 1980, Gold *et al.* 2011).

Despite having fewer taxa in the CR phylogeny, we found that affinities between species are congruent with those inferred by COI. Such congruence between CR and other mitochondrial genes may indicate a lower effect of homoplasy in CR, as previously reported (Bernatchez and Danzmann 1993, Zhu *et al.* 1994), and thus the usefulness of CR for testing phylogenetic relationships between closely related species of Lutjaninae.

Our phylogram also supports the close relationship between *L. sebae*, *L. malabaricus*, and *L. adetii* as inferred in previous studies (Guo *et al.* 2007, Miller and Cribb 2007, Wang *et al.* 2010, Gold *et al.* 2011), with the addition of *P. pinjalo* into this basal clade. In fact, *P. pinjalo* shares similar morphological characteristics with *L. malabaricus* and *L. sebae*: dorsal fin with XI spines and 13 to 14 soft rays, body depth 2.7 times in standard length, vomerine tooth patch crescentic without posterior extensions, smooth tongue, and total gill rakers ranging from 22 to 23. Based on the taxonomic keys of Lutjanidae (Anderson and Allen 2001), both *Lutjanus* and *Pinjalo* have 20 or less gill rakers on the lower limb of the first gill arch, but are separate genera based on the head profile, longitudinal scale row pattern, and the absence or presence of anterior fang-like canines. However, these distinguishing characters are not exclusive as some are shared by a few *Lutjanus* species. Head and trophic features are also usually subjected to convergent evolution (Gold *et al.* 2011) that confounds reliable taxonomic classification. Alternatively, colorations and body patterns show better correlation

del Pacífico oriental se agrupan inesperadamente con las siguientes especies de *Lutjanus* del Pacífico occidental: *L. rivulatus*, *L. stellatus*, *L. johnii*, *L. bohar* (JF952787), *L. quinquelineatus*, *L. notatus*, *L. kasmira*, *L. bengalensis* y *L. argentimaculatus*. En el clado F, la divergencia promedio fue de 12.4% (± 0.8); la menor divergencia fue de 2.9% entre *L. novemfasciatus* y *L. cyanopterus*, mientras que la divergencia entre las especies de *Lutjanus* del Pacífico occidental varía de 5.2% a 16.4%.

A excepción de *L. bohar* (16.3%), la divergencia intraespecífica de la subfamilia Lutjaninae varía de 0.0% a 1.9%, con un promedio de 0.3% (± 0.1). Sin considerar a *L. cyanopterus* y *L. novemfasciatus*, las divergencias entre las especies de Lutjaninae del Atlántico occidental (de 1.0% a 12.7%; promedio: 8.4% ± 0.9) son comparativamente menores que las divergencias entre las especies del Pacífico occidental (de 5.2% a 20.6%; promedio: 14.1% ± 0.3).

Árbol filogenético basado en las secuencias de RC

El filograma de RC (fig. 2) muestra la monofilia y las afinidades de 12 especies de la subfamilia Lutjaninae, con tres clados bien sostenidos que corresponden a los clados A, E y F en la filogenia de COI (fig. 1). El árbol confirma la agrupación de *P. pinjalo*, *L. malabaricus* y *L. sebae* en un clado (clado A). En el clado E, los dos tipos de *L. russellii* se agrupan con *L. carponotatus*, *L. fulviflamma*, *L. lutjanus*, *L. madras* y *L. vitta*, mientras que el clado F contiene a *L. argentimaculatus*, *L. quinquelineatus* y *L. johnii*.

El árbol de RC también muestra la separación de los dos tipos de *L. russellii*, con una divergencia de secuencias por pares de 10.8%. La divergencia intraespecífica de otras especies varía de 0.5% a 6.7%, con un promedio de 1.8% (± 0.8).

DISCUSIÓN

La filogenia inferida a partir de COI es congruente con las filogenias de la familia Lutjanidae obtenidas en otros estudios con diferentes genes mitocondriales y nucleares (Miller y Cribb 2007, Guo *et al.* 2007, Wang *et al.* 2010, Gold *et al.* 2011). Nuestros clados A, C, D y E de Lutjaninae corresponden a los clados A, C, D y F de Gold *et al.* (2011), mientras que nuestros clados B y E corresponden a las agrupaciones de especies de Miller y Cribb (2007). Proponemos que, además de las subfamilias Apsilinae y Etelinae (Johnson 1980, Gold *et al.* 2011), Paradicichthyinae ocupa una posición basal respecto a Lutjaninae.

A pesar de tener menos taxones en la filogenia inferida de la RC, las afinidades entre especies fueron congruentes con las inferidas a partir de COI. Esta congruencia entre la RC y otros genes mitocondriales podría indicar un menor efecto de la homoplasy en la primera, como ya ha sido documentado (Bernatchez y Danzmann 1993, Zhu *et al.* 1994), y por tanto, la utilidad de la RC para examinar la relación filogenética entre las especies de Lutjaninae estrechamente relacionadas.

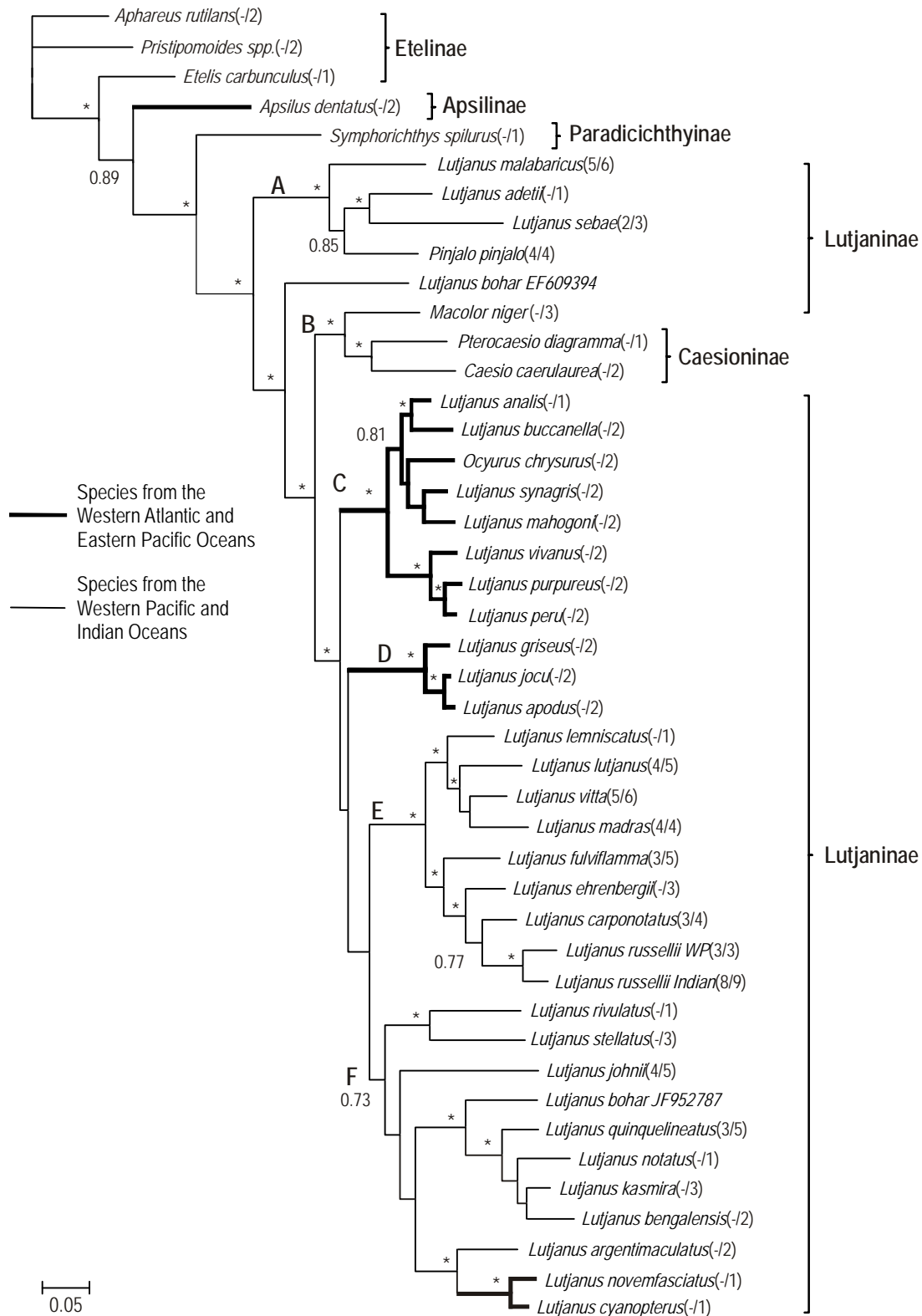


Figure 1. Bayesian phylogram of 43 species of Lutjanidae showing six clades (A–F), as inferred from cytochrome c oxidase subunit I. Posterior probabilities are shown at branch node, with asterisks indicating values higher than 0.90. The number of sequence(s) generated in this study over the total sequence(s) used in the analysis is shown in parentheses after species name.

Figura 1. Filograma de 43 especies de la familia Lutjanidae con seis clados (A–F), inferido mediante análisis bayesiano del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I. Las probabilidades posteriores se muestran en los nodos de ramificación; los asteriscos indican valores superiores a 0.90. Después del nombre de la especie se muestra entre paréntesis el número de secuencia(s) generadas en este estudio sobre el total de secuencia(s) usadas en el análisis.

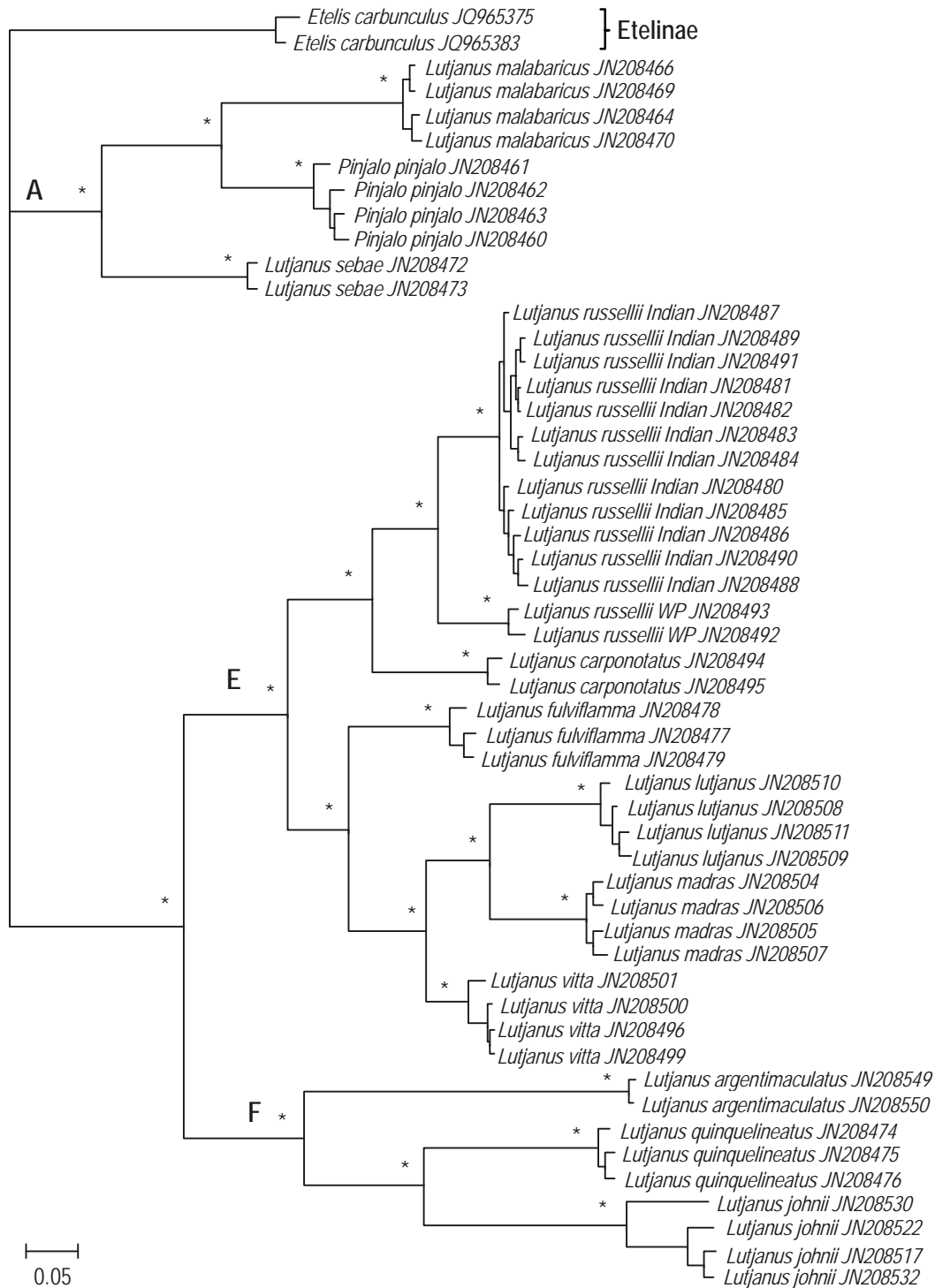


Figure 2. Bayesian phylogram of 12 species of Lutjaninae inferred from the control region. Clades A, E, and F correspond to the respective clades in figure 1. The asteriks at the branch nodes indicate posterior probabilities higher than 0.90.

Figura 2. Filograma de 12 especies de la subfamilia Lutjaninae, inferido mediante análisis bayesiano de la región control. Los clados A, E y F corresponden a los clados respectivos en la figura 1. Los asteriscos en los nodos de ramificación indican probabilidades posteriores superiores a 0.90.

to phylogenetic relationships (Shaw *et al.* 2000, Wang *et al.* 2010), as also observed between *P. pinjalo*, *L. malabaricus*, and *L. sebae*.

While the affinities among *L. russellii*, *L. fulviflamma*, *L. carponotatus* and *L. vitta* have been reported in Miller and Cribb (2007), we have further separated the two types of *L. russellii*. The 4.2% divergence in COI sequences between the two conspecifics of *L. russellii* supports the recognition for separate species (Avise 2000, Zhang and Hanner 2011). Our CR phylogeny also confirms such separation with expectedly higher divergences. Besides being geographically separated, the adults of the Indian type of *L. russellii* have body stripes, whereas the adults of the western Pacific type of *L. russellii* lack body stripes (Anderson and Allen 2001). Therefore, the Indian and western Pacific types of *L. russellii* should be recognized as two separate species based on the high level of divergences, geographical separation, and morphological dissimilarities.

The basal clades in our tree represent species distributed in the western Pacific, which is in accordance with the suggestion that western Atlantic species are derived from Indo-Pacific lineage (Miller and Cribb 2007, Gold *et al.* 2011). The relatively low interspecies divergence between the western Atlantic species of Lutjaninae also indicates their recent divergences as compared to other species from the western Pacific.

In summary, the phylogenetic tree inferred using COI and CR supports the monophyly of all the *Lutjanus* species analyzed except for the two “types” of *L. bohar*. We propose that *P. pinjalo* be subsumed into *Lutjanus* as molecular and morphological evidences have revealed the close affinity of *P. pinjalo* with the *Lutjanus* red snappers. Further research using both mitochondrial and nuclear genes to clarify whether the two types of *L. russellii* are different species is also warranted.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was fully funded by the University of Malaya through UMRG and PPP research grants (RG032/09SUS and PS225/2009C, respectively). Our appreciation goes to all the fishermen and lab-mates that assisted in the sampling of specimens.

REFERENCES

- Allen GR. 1985. FAO Species Catalogue. Vol. 6. Snappers of the World. An annotated and illustrated catalogue of Lutjanid species known to date. FAO Fisheries Synopsis 6 (125), 208 pp.
- Anderson WD, Allen GR. 2001. Lutjanidae. In: Carpenter KE, Niem VH (eds.), FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes. The Living Marine Resources of the Western Central Pacific. Vol. 5. Bony Fishes, Part 3 (Menidae to Pomacentridae). FAO, Rome, pp. 2840–2918.
- Asgharian H, Sahafi HH, Ardalan AA, Shekarriz S, Elahi E. 2011. Cytochrome c oxidase subunit I barcode data of fish of the Nayband National Park in the Persian Gulf and analysis using

Nuestro filograma también apoya la relación cercana entre *L. sebae*, *L. malabaricus* y *L. adetii* inferida en estudios previos (Guo *et al.* 2007, Miller y Cribb 2007, Wang *et al.* 2010, Gold *et al.* 2011), con la inclusión de *P. pinjalo* en este clado basal. De hecho, *P. pinjalo* comparte características morfológicas similares con *L. malabaricus* y *L. sebae*: aleta dorsal con XI espinas y de 13 a 14 radios blandos, profundidad del cuerpo de 2.7 veces en la longitud estándar, parche de dientes vomerianos en forma de media luna sin una extensión posterior, lengua lisa, y total de branquiespinas de 22 a 23. Según las claves taxonómicas de la familia Lutjanidae (Anderson y Allen 2001), tanto *Lutjanus* como *Pinjalo* tienen 20 o menos branquiespinas en la rama inferior del primer arco branquial, pero son géneros independientes debido al perfil de la cabeza, patrón de las hileras longitudinales de escamas, y la ausencia o presencia de caninos acolmillados anteriores. No obstante, estos caracteres distintivos no son exclusivos ya que algunos son compartidos por varias especies de *Lutjanus*. Las características tróficas y de la cabeza también tienden a estar sujetas a evolución convergente (Gold *et al.* 2011), lo cual dificulta una clasificación taxonómica confiable. Alternativamente, los patrones corporales y de coloración muestran una mejor correlación con las relaciones filogenéticas (Shaw *et al.* 2000, Wang *et al.* 2010), como ha sido observado entre *P. pinjalo*, *L. malabaricus* y *L. sebae*.

Miller y Cribb (2007) documentaron las afinidades entre *L. russellii*, *L. fulviflamma*, *L. carponotatus* y *L. vitta*, pero en este estudio hemos separados los dos tipos de *L. russellii*. La divergencia de 4.2% en las secuencias de COI entre los dos conespecíficos de *L. russellii* apoya la sugerencia de que son dos especies distintas (Avise 2000, Zhang y Hanner 2011). Nuestra filogenia inferida de la RC también confirma dicha separación con divergencias mayores esperadas. Además de estar separados geográficamente, los adultos de *L. russellii* del océano Índico tienen rayas corporales, mientras que los adultos de *L. russellii* del Pacífico occidental no las tienen (Anderson y Allen 2001). Por lo tanto, los dos tipos de *L. russellii* deberían ser considerados dos especies distintas debido al alto grado de divergencia, la separación geográfica y las disimilitudes morfológicas.

Los clados basales en nuestro árbol representan las especies distribuidas en el Pacífico occidental, lo cual concuerda con la sugerencia de que las especies del Atlántico occidental se derivan del linaje Índico-Pacífico (Miller y Cribb 2007, Gold *et al.* 2011). La divergencia relativamente baja entre las especies de la subfamilia Lutjaninae del Atlántico occidental también indica sus divergencias recientes en comparación con las especies del Pacífico occidental.

En resumen, el árbol filogenético inferido con base en las secuencias de COI y RC apoya la monofilia de todas las especies de *Lutjanus* analizadas excepto para los dos “tipos” de *L. bohar*. Se propone que *P. pinjalo* sea incluido en el género *Lutjanus* ya que las evidencias moleculares y morfológicas muestran la afinidad cercana entre *P. pinjalo* y los pargos rojos de *Lutjanus*. Se requieren estudios adicionales con

- meta-data flag several cryptic species. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 461–472.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02989.x>
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 447 pp.
- Bernatchez L, Danzmann RG. 1993. Congruence in control-region sequence and restriction site variation in mitochondrial DNA of Brook Charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Mol. Biol. Evol.* 10: 1002–1014.
- Chong VC, Lee PKY, Lau CM. 2010. Diversity, extinction risk and conservation of Malaysian fishes. *J. Fish. Biol.* 76: 2009–2066.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02685.x>
- Chow S, Walsh PJ. 1992. Biochemical and morphometric analyses for phylogenetic relationships between seven snapper species (subfamily Lutjaninae) of the Western Atlantic. *Bull. Mar. Sci.* 50: 508–519.
- Gold JR, Volker G, Renshaw MA. 2011. Phylogenetic relationships of tropical western Atlantic snappers in subfamily Lutjaninae (Lutjanidae: Perciformes) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Biol. J. Linn. Soc.* 102: 915–929.
- Guo Y, Wang Z, Liu C, Liu L, Liu Y. 2007. Phylogenetic relationships of South China Sea snappers (genus *Lutjanus*; family Lutjanidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Mar. Biotechnol.* 9: 682–688.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10126-007-9012-6>
- Huelsenbeck JP, Ronquist FR. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Johnson GD. 1980. The limits and relationships of the Lutjanidae and associated families. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.* 24: 1–114.
- Lakra WS, Verma MS, Goswami M, Lai KK, Mohindra V, Punia P, Gopalakrishnan A, Singh KV, Ward RD, Hebert P. 2011. DNA barcoding Indian marine fishes. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 60–71.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02894.x>
- Masuda H. 1984. Genus *Lutjanus*. In: Masuda H, Amaoka K, Araga C, Uyeno T, Yoshino T (eds.), *The Fishes of the Japanese Archipelago*. Tokyo Univ. Press, Tokyo, pp. 169–170.
- Miller TL, Cribb TH. 2007. Phylogenetic relationships of some common Indo-Pacific snappers (Perciformes: Lutjanidae) based on mitochondrial DNA sequences, with comments on the taxonomic position of the Caesioninae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44: 450–460.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.10.029>
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA. 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361–382.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253–1256.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Posada D, Crandall KA. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Salini JP, Ovenden JR, Street R, Pendrey R, Haryanti, Ngurah. 2006. Genetic population structure of red snappers (*Lutjanus malabaricus* Bloch & Schneider 1801 and *Lutjanus erythropterus* Bloch 1790) in central and eastern Indonesia and northern Australia. *J. Fish Biol.* 68: 217–234.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01060.x>
- Shaw PW, Turner GF, Rizman-Idid M, Robinson RL, Carvalho GR. 2000. Genetic population structure indicates sympatric speciation of Lake Malawi pelagic cichlids. *Proc. R. Soc. Lond. (B)* 267: 2273–2280.
<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2000.1279>
- genes mitocondriales y nucleares para aclarar si los dos tipos de *L. russellii* son especies distintas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Malaya (UMRG: RG032/09SUS; PPP: PS225/2009C). Agradecemos a todos los pescadores y asistentes de laboratorio su ayuda en el muestreo de los especímenes.

Traducido al español por Christine Harris.

- Steinke D, Zemlak TS, Hebert PDN. 2009. Barcoding Nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. *PLoS ONE* 4: e6300.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006300>
- Taggart JB, Hynes RA, Prodöhl PA, Ferguson A. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.* 40: 963–965.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1992.tb02641.x>
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.
- Victor BC, Hanner R, Shivji M, Hyde J, Caldwell C. 2009. Identification of the larvae and juvenile stages of the Cubera snapper, *Lutjanus cyanopterus*, using DNA barcoding. *Zootaxa* 2215: 24–36.
- Wang ZD, Guo YS, Tan W, Li L, Tang EP, Liu CW, Liu Y. 2010. DNA barcoding, phylogenetic relationships and speciation of snappers (genus *Lutjanus*). *China Life Science* 53: 1025–1030.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11427-010-4034-0>
- Ward RD, Holmes BH. 2007. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. *Mol. Ecol. Notes* 7: 899–907.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01886.x>
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (B)* 360: 1847–1857.
<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>
- Zhang JB, Hanner R. 2011. DNA barcoding is a useful tool for identification of marine fishes from Japan. *Biochem. Syst. Ecol.* 39: 31–42.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2010.12.017>
- Zhang J, Huang H, Cai Z, Huang L. 2006. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. *Food Control* 17: 557–563.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.01.011>
- Zhu D, Jamieson BGM, Hugall A, Moritz C. 1994. Sequence evolution and phylogenetic signal in control-region and cytochrome b sequences of rainbow fishes (Melanotaeniidae). *Mol. Biol. Evol.* 11: 672–683.

Received March 2013,
 received in revised form July 2013,
 accepted October 2013.