

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

RAFAEL MINA PIERGIORGE

Caracterização Molecular e Demografia Histórica de Populações do Camarão Sete-Barbas - *Xiphopenaeus Kroyeri* - (Heller 1889) do Sudoeste do Atlântico Por Meio de Polimorfismos de Microsatélites e do Gene COI

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Computacional e Sistemas

Orientador: Dr. Fernando Araújo Monteiro

RIO DE JANEIRO
Abril de 2013

Piergiorgio, Rafael Mina

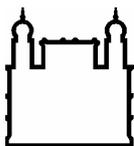
Caracterização Molecular e Demografia Histórica de Populações do Camarão Sete-Barbas - *Xiphopenaeus Kroyeri* - (Heller 1889) do Sudoeste do Atlântico Por Meio de Polimorfismos de Microssatélites e do Gene COI/ Rafael Mina Piergiorgio. – Rio de Janeiro: 2013.

Dissertação de Mestrado em Biologia Computacional e Sistemas, área de concentração em Genômica funcional, evolução e filogenômica.

Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 2013

1. Genética de Populações 2. Citocromo c oxidase I 3. Genética pesqueira. 4. espécies crípticas



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

RAFAEL MINA PIERGIORGE

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DEMOGRAFIA HISTÓRICA DE POPULAÇÕES DO CAMARÃO SETE-BARBAS - *XIPHOPENAEUS KROYERI* - (HELLER 1889) DO SUDOESTE DO ATLÂNTICO POR MEIO DE POLIMORFISMOS DE MICROSSATÉLITES E DO GENE COI

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Araújo Monteiro

Aprovado em: ____ / ____ / ____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Renata Schama Lellis - Presidente

Prof. Dr. Carolina Tavares Schumann

Dr. Anderson Vilasboa de Vasconcellos

Prof. Dr. Marcos Paulo Catanho de Souza

RIO DE JANEIRO, 25 DE ABRIL DE 2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz Piergiorge e Maria Helena Mina, que com muito amor e carinho fizeram o possível e o impossível para me verem feliz. Agradeço muito aos dois, pois sem o apoio de ambos eu não estaria perto de concluir esta etapa da minha vida.

Ao meu orientador, Fernando Monteiro e a professora Jaqueline Gusmão – UERJ pelo apoio durante o projeto.

À Karina Alessandra Morelli e Márcio Pávan pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|------------|---|
| Figura 1.1 | Morfologia externa de um exemplar de <i>X. kroyeri</i> retirado de Pérez-Farfante (1988). 4 |
| Figura 1.2 | Amplitude da distribuição geográfica das duas espécies do gênero <i>Xiphopenaeus</i> : <i>X. riveti</i> está representada em verde e <i>X. kroyeri</i> em vermelho. 5 |
| Figura 1.3 | Distribuição geográfica da espécie <i>X. kroyeri</i> após a revisão morfológica realizada por Pérez Farfante e Kensley (1997). 6 |
| Figura 1.4 | Padrões eletroforéticos espécie-específicos para as duas espécies crípticas <i>Xiphopenaeus</i> , após a digestão enzimática com as duas enzimas (<i>Hinfl</i> e <i>Hincll</i> ; Gusmão <i>et al.</i> , 2013; modificado a partir de Gusmão e Solé-Cava, 2002). Padrão “A” de <i>Hinfl Xiphopenaeus</i> sp. I; padrão “E” <i>Xiphopenaeus</i> sp. II; <i>Hincll</i>) Padrão “D” <i>Xiphopenaeus</i> sp. I; Padrão “C” <i>Xiphopenaeus</i> sp. II. 7 |
| Figura 1.5 | Mapa indicando a distribuição conhecida de <i>Xiphopenaeus</i> spp.. Os pontos de ocorrência apenas de <i>Xiphopenaeus</i> sp. I estão representados “sinais de mais”; os “quadrados” representam as localidades em que as espécies ocorrem em simpatria; <i>Xiphopenaeus</i> sp.III está representada por “triângulos”. Localidades: 1) São Luís/MA (Maggioni, comunicação pessoal); 2) Natal/NA (Gusmão <i>et al.</i> , 2006); 3) Poças/BA (Gusmão <i>et al.</i> , 2006); 4) Ilhéus/BA (Piergiorgio, 2010); 5) Caravelas/BA (Gusmão <i>et al.</i> , 2006; Piergiorgio, 2010); 6) Guarapari/ES (Francisco, 2009); 7) Nova Almeida/ES (Gusmão <i>et al.</i> , 2006; Piergiorgio, 2010); 8) Arraial do Cabo/RJ (Gusmão <i>et al.</i> , 2006); 9) Macaé/RJ (Francisco, 2009); 10) Angra dos Reis/RJ (Francisco, 2009); 11) Ubatuba/SP (Gusmão <i>et al.</i> , 2006; Francisco, 2009; Piergiorgio, 2010); 12) Santos/SP (Piergiorgio, 2010); 13) Cananéia/SP (Francisco, 2009; Piergiorgio, 2010); 14) Guaratuba/PR (Maggioni, comunicação pessoal); 15) São Francisco do Sul/SC (Francisco, 2009); 16) Itajaí/SC (Francisco, 2009); 17) Barra Velha/SC (Piergiorgio, 2010); 18) Camboriú/SC (Piergiorgio, 2010); 19) Venezuela (Gusmão <i>et al.</i> , 2006); 20) Panamá (Gusmão <i>et al.</i> , 2006). 9 |
| Figura 1.6 | Dados referentes à captura do camarão sete-barbas na costa brasileira no período compreendido entre 1960-2010 (FAO, 2010). 12 |
| Figura 1.7 | Divisões biogeográficas do ambiente costeiro em ecorregiões proposta por Spalding <i>et al.</i> , (2007). 19 |

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 3.1 | Exemplos de embarcações utilizadas na pesca artesanal de camarões em Cananéia/SP | 22 |
| Figura 3.2 | Mapa indicando as localidades estudadas no presente trabalho. 1) Natal/RN; 2) Poças/BA; 3) Ilhéus/BA; 4) Caravelas/BA; 5) Nova Almeida/ES; 6) Atafona/RJ 7) Arraial do Cabo/RJ; 8) Ubatuba/SP; 9) Santos/SP; 10) Cananéia/SP; 11) Barra Velha/SC; 12) Camboriú/SC; 13) Venezuela; 14) Panamá. | 22 |
| Figura 3.3 | Árvore de NJ de partida evidenciando o relacionamento dos haplótipos de COI. Em detalhe está o valor de s calculado para o conjunto de dados ($s = 14$). Legenda: BA (Poças), CA (Caravelas), NA (Nova Almeida), AT (Atafona), CB (Camboriú), VEN (Venezuela), SP (Ubatuba) e UB (Ubatuba). | 33 |
| Figura 3.4 | As duas hipóteses testadas para origem populacional através do s de Slatkin e Maddison. A) Hipótese de formação gradual das populações, no sentido Norte-Sul; B) Origem simultânea. | 34 |
| Figura 4.1 | Redes de haplótipos de sequências do gene COI geradas através do programa Network para (A) <i>Xiphopenaeus</i> sp. I e (B) <i>Xiphopenaeus</i> sp. II. O tamanho do círculo é proporcional a frequência do haplótipo e as cores representam cada localidade. Cada linha corresponde a um único passo mutacional, exceto as duas maiores em <i>Xiphopenaeus</i> sp. II que correspondem a dois passos mutacionais. (*) Localidades estudadas por Maggioni (Maggioni, comunicação pessoal). | 45 |
| Figura 4.2 | Árvore de Neighbor Joining de <i>Xiphopenaeus</i> spp. baseada em distâncias Kimura 2-parâmetros; Valores abaixo dos ramos: teste estatístico de bootstrap (valores > 70). | 46 |
| Figura 4.3 | Gráfico com os resultados da PCA para <i>Xiphopenaeus</i> sp. I: análise com todas as localidades (esquerda) e após a remoção de Poças e Venezuela (direita). Legenda: pop 1 (POCA: Poças); pop 2 (NVAL: Nova Almeida); pop 3 (UBAT: Ubatuba); pop 4 (VENE: Venezuela); pop 5 (CARA: Caravelas); pop 6 (CAMB: Camboriú); pop 7 (SANT: Santos); pop 8 (ILH: Ilhéus); pop 9 (ATAF: Atafona); pop 10 (CANA: Cananéia). | 52 |
| Figura 4.4 | <i>Mismatch distribution</i> para os grupos significativos para o teste de neutralidade de <i>Xiphopenaeus</i> sp. I, segundo o modelo de expansão demográfica e geográfica. A) (1-2) Valores significativos no teste de neutralidade para a hipótese de seis grupos; B) (1-2) agrupamento significativo segundo a hipótese de 3 grupos. | 55 |
| Figura 4.5 | Dendrograma de UPGMA construído a partir dos valores a de F_{ST} . | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | | Página |
|------------|---|---------------|
| Tabela 3.1 | Amostras de <i>Xiphopenaeus</i> spp. da coleção de DNA do LGPESC-UERJ utilizadas para as análises com cada um dos três marcadores moleculares estudados. Fonte: [1] Gusmão <i>et al.</i> , 2006; [2] Piergiorgio, 2010. As barras verticais “ ” separam os números de amostras de <i>Xiphopenaeus</i> sp. I e <i>Xiphopenaeus</i> sp. II. | 23 |
| Tabela 3.2 | <i>Primers</i> heterólogos de EPIC usados no trabalho. | 24 |
| Tabela 3.3 | Agrupamentos populacionais construídos para a análise de variância molecular (AMOVA) de <i>Xiphopenaeus</i> sp. I. As cores e os parênteses representam as localidades. | 30 |
| Tabela 3.4 | <i>Primers</i> de microssatélites usados no trabalho; <i>primers</i> específicos para <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> (Xkro) e heterólogos (Rcon, Lvan) que resultam em ampliações positivas em <i>X. kroyeri</i> em testes de amplificação cruzada. Em todas as reações foi utilizado 1,5mM de MgCl ₂ . Temperatura de anelamento (Ta). | 36 |
| Tabela 3.5 | Agrupamentos testados para a análise de variância molecular (AMOVA). | 38 |
| Tabela 4.1 | Resumo dos resultados obtidos nas padronizações para amplificação dos íntrons de Amilase e Fator de alongamento. | 39 |
| Tabela 4.2 | Distribuição dos haplótipos por localidade nas duas espécies de <i>Xiphopenaeus</i> . A-J) Haplótipos identificados por Gusmão e colaboradores (2006); 1.1–1.8) Haplótipos de <i>Xiphopenaeus</i> sp. I identificados neste trabalho; 2.1-2.5) Haplótipos de <i>Xiphopenaeus</i> sp. II identificados neste trabalho. | 42 |
| Tabela 4.3 | Medidas de diversidade genética de populações de <i>Xiphopenaeus</i> sp. I. | 43 |
| Tabela 4.4 | Medidas de diversidade genética de populações de <i>Xiphopenaeus</i> sp. II. | 43 |
| Tabela 4.5 | Valores de estruturação genética das populações de <i>Xiphopenaeus</i> sp. I (Φ_{ST}). Em negrito estão representados os valores significativos após a correção de múltiplos testes (** - $P < 0,0011$). Acima da diagonal estão os valores de migrantes calculados a partir de Φ_{ST} . | 47 |
| Tabela 4.6 | Valores da estatística Φ encontrados para os seis agrupamentos populacionais testados <i>a priori</i> (AMOVA) para a espécie <i>Xiphopenaeus</i> sp. I. | 48 |
| Tabela 4.7 | Agrupamentos obtidos <i>a posteriori</i> para a espécie | 49 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| | <i>Xiphopenaeus</i> sp. I, por meio da análise espacial de variância molecular (SAMOVA). | |
| Tabela 4.8 | Valores da estatística Φ , provenientes de oito agrupamentos populacionais obtidos <i>a posteriori</i> (SAMOVA) para a espécie <i>Xiphopenaeus</i> sp. I. | 50 |
| Tabela 4.9 | Testes de neutralidade com os dois agrupamentos testados: três gupos e seis grupos. Nível de significância $p=0,05$ para D de Tajima e 0.02 para o F de Fu; (*) e (**): Valores significativos. | 54 |
| Tabela 4.10 | Tempo estimado de expansão, Segundo os modelos de expansão demográfica e geográfica para a hipótese de seis grupos. | 55 |
| Tabela 4.11 | Valores significativos para as hipóteses testadas para o s Slatkin e Maddison (1989). Ne – Tamanho efetivo populacional; Hipóteses: [1] – origem gradual e [2] fragmentação. | 56 |
| Tabela 4.12 | Ajustes de amplificação dos dez <i>loci</i> de microssatélites selecionados para as duas espécies. (-): amplificações negativas; (*) <i>loci</i> ainda não testados. | 58 |
| Tabela 4.13 | Caracterização genética dos três loci de microssatélites para as quatro populações de <i>Xiphopenaeus</i> sp. I. N – Número amostral; Na – Número de alelos; Ne – Número efetivo de alelos; Ho – Heterozigosidade observada; He – Heterozigosidade esperada; F_{IS} – Coeficiente de endocruzamento; P_{HW} – Significância para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. | 59 |
| Tabela 4.14 | Frequências alélicas dos três <i>loci</i> de microssatélites observadas nas quatro populações. | 60 |
| Tabela 4.15 | Valores de F_{ST} par a par entre as populações de <i>Xiphopenaeus</i> sp. I. Os valores de F_{ST} estão abaixo da diagonal e os de R_{ST} acima (* $p < 0,0001$). | 60 |
| Tabela 4.16 | Valores de identidade genética entre populações de <i>Xiphopenaeus</i> sp. I. | 60 |
| Tabela 4.17 | Valores estruturação genética das populações de <i>Xiphopenaeus</i> sp. I obtidos a partir da AMOVA. À esquerda: valores de F_{ST} ; À direita: valores de R_{ST} . Os valores entre colchetes representam os códigos dos agrupamentos testados. | 61 |

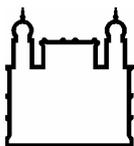
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMOVA – Análise de variância molecular
ATAF – Atafona
CANA – Cananéia
CAMB – Camboriú
CARA – Caravelas
CEPSUL – Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Sudeste e Sul
COI – Citocromo c oxidase subunidade I
DNA – Ácido desoxirribonucléico
EPIC - *Exon-primed intron-crossing*
FAO – *Food and Agriculture Organization*
FST – índice de fixação de Wright
H – Diversidade haplotípica
He – Heterozigosidade esperada
Ho – Heterozigosidade observada
ILH – Ilhéus
K – Comprimento da sequência
mtDNA – DNA mitocondrial
N – Tamanho amostral
NVAL – Nova Almeida
Ne – Tamanho efetivo populacional
PANA – Panamá
PCA – Análise de Componente Principal
PCR – reação em cadeia da polimerase
POCA – Poças
PPS - *Sea Surface Salinity*
RFLP - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição
SANT – Santos
SAMOVA – Análise espacial de variância molecular
sp. – espécie
spp. – espécies
UBAT – Ubatuba
VENE – Venezuel
X. – *Xiphopenaeus*
 Φ – índice de variância análogo ao índice de fixação de Wright.
 π – Diversidade nucleotídica
 μ – micro

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1. INTRODUÇÃO | 4 |
| 1.1 HISTÓRICO | 4 |
| 1.2 CICLO DE VIDA | 10 |
| 1.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA | 11 |
| 1.4 GENÉTICA PESQUEIRA | 13 |
| 1.4.1 DNA MITOCONDRIAL E O GENE CITOCROMO C OXIDASE SUBUNIDADE I | 15 |
| 1.4.2 REGIÕES REPETITIVAS DE MICROSSATÉLITES DO GENOMA NUCLEAR | 16 |
| 1.4.3 POLIMORFISMOS DE TAMANHO EM ÍNTRONS DE GENES NUCLEARES (EPIC; EXON- PRIMED INTRON-CROSSING) | 17 |
| 1.5 AMBIENTE MARINHO | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS | 20 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 3.1 AMOSTRAGEM | 21 |
| 3.2 ANÁLISE DE EPICS | 24 |
| 3.2.1 AMPLIFICAÇÃO PELA PCR | 24 |
| 3.2.2 ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EPIC | 25 |
| 3.3 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE MITOCONDRIAL COI | 26 |
| 3.3.1 AMPLIFICAÇÃO PELA PCR | 26 |
| 3.3.2 SEQUENCIAMENTO, EDIÇÃO E ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS | 26 |
| 3.3.3 ANÁLISES DE VARIABILIDADE GENÉTICA E FILOGENIA MOLECULAR | 28 |
| 3.3.4 ANÁLISES POPULACIONAIS | 28 |
| 3.3.5 DEMOGRAFIA HISTÓRICA | 30 |
| 3.4 ANÁLISE DE <i>LOCI</i> MICROSSATÉLITES | 35 |
| 3.4.1 AJUSTES PARA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR | 35 |
| 3.4.2 GENOTIPAGENS E ANÁLISE DE POLIMORFISMOS | 37 |
| 3.4.3 ANÁLISES POPULACIONAIS | 37 |
| 4. RESULTADOS | 39 |
| 4.1 ANÁLISE DE EPICS | 39 |
| 4.1.1 AMPLIFICAÇÃO PELA PCR | 39 |
| 4.1.2 ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE TAMANHO | 39 |
| 4.3 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE MITOCONDRIAL COI | 40 |
| 4.3.1 ANÁLISES DE VARIABILIDADE GENÉTICA | 40 |
| 4.3.2 ANÁLISES POPULACIONAIS | 47 |
| 4.3.3 DEMOGRAFIA HISTÓRICA | 52 |
| 4.4 ANÁLISE DE <i>LOCI</i> MICROSSATÉLITES | 57 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.1 AJUSTES PARA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR | 57 |
| 4.4.2 ANÁLISE DE DADOS | 58 |
| 5. DISCUSSÃO | 62 |
| 5.1. SISTEMÁTICA MOLECULAR | 62 |
| 5.2. GENÉTICA DE POPULAÇÕES E DEMOGRAFIA HISTÓRICA | 64 |
| 6. CONCLUSÕES | 70 |
| 7. REFERÊNCIAS | 71 |



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DEMOGRAFIA HISTÓRICA DE POPULAÇÕES DO CAMARÃO SETE-BARBAS - *XIPHOPENAEUS KROYERI* - (HELLER 1889) DO SUDOESTE DO ATLÂNTICO POR MEIO DE POLIMORFISMOS DE MICROSSATÉLITES E DO GENE COI

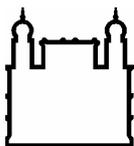
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rafael Mina Piergiorge

Xiphopenaeus kroyeri (Heller, 1862), é uma das espécies brasileiras mais importantes comercialmente, sendo explorada em toda a costa, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. A partir da década de 60 sua exploração apresentou um grande crescimento, com oscilações até a década de 80. No entanto, após a década de 80 ocorreu um grande declínio na captura e, no período de 1990–1994, estão registrados os mais baixos valores das últimas décadas. Desde então o recurso encontra-se no limite de sustentabilidade. Em 2006, foram identificadas duas espécies crípticas em *Xiphopenaeus* no Atlântico. Entretanto, os órgãos responsáveis desconsideraram essa informação, o que provavelmente acarretará consequências graves para uma ou ambas as espécies. O presente trabalho teve como objetivos: (1) ajustar as condições de amplificação de loci EPIC e caracterizar populações das duas espécies; (2) realizar análise populacional e demográfica histórica de *Xiphopenaeus* sp. I, em dez pontos ao longo da costa, através de polimorfismos do gene COI; e (3) ajustar as condições de amplificação de loci microssatélites e analisar quatro populações do Brasil. Apesar de resultarem em amplificações, os marcadores EPIC foram monomórficos nas duas espécies. Em relação ao marcador COI, oito novos haplótipos foram observados para *Xiphopenaeus* sp. I e cinco para *Xiphopenaeus* sp. II, totalizando quinze e oito haplótipos descritos, respectivamente. Apesar da identificação de novos haplótipos, o sistema de identificação molecular descrito para a identificação das espécies, continua válido. As análises de Φ apontaram que a população de Caracas (Venezuela) é geneticamente diferenciada das localidades brasileiras, enquanto que, no Brasil, Poças é diferente de Ubatuba, Santos e Cananéia. Por meio de análises de variância, confirmou-se a existência de uma separação pela ressurgência próxima de Cabo Frio. Foi verificado também que *Xiphopenaeus* sp. I sofreu expansão há 99,57 mil anos, provavelmente na última glaciação. Com microssatélites, apenas as análises de variância resultaram em valores significativos. Ao fim do estudo, os dados obtidos foram agrupados com informações prévias e foi construída uma distribuição consensual para a espécie. Todos esses resultados trazem importantes contribuições para o manejo de *Xiphopenaeus* spp, pois, além da existência de duas espécies, *Xiphopenaeus* sp. I é constituída por pelo menos

oito estoques geneticamente diferenciados. Este é o primeiro trabalho a realizar uma amostragem tão ampla em um estudo populacional da espécie. Além disso, os dados produzidos servirão como parâmetro de comparação para outros estudos de organismos marinhos da região.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DEMOGRAFIA HISTÓRICA DE POPULAÇÕES DO CAMARÃO SETE-BARBAS - *XIPHOPENAEUS KROYERI* - (HELLER 1889) DO SUDOESTE DO ATLÂNTICO POR MEIO DE POLIMORFISMOS DE MICROSSATÉLITES E DO GENE COI

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rafael Mina Piergiorge

Xiphopenaeus kroyeri (Heller, 1862), is one of Brazil's most important commercial species being exploited across the coast mostly in the South and Southeast. From the 60's its exploitation showed large growth, with fluctuations up to the 80, but after the 80's there was a huge decline in the catch and in the period 1990-1994, are recorded the lowest values of decades. Since then the resource is within the limits of sustainability. In 2006 were identified two cryptic species in *Xiphopenaeus* in the Atlantic. However, the agencies responsible disregard this information, which probably will result in consequences for one or both species. This study focus to: (1) optimize the amplification conditions of EPIC loci and characterize populations of the two species, (2) perform analysis of historical demographic and population *Xiphopenaeus* sp. I, in ten points along the coast, through COI gene polymorphisms, and (3) standardize the amplification conditions of microsatellite loci and analyze four populations of Brazil. Despite the amplifications, EPIC markers were monomorphic in both species. In COI marker, eight new haplotypes were observed for *Xiphopenaeus* sp. I and five *Xiphopenaeus* sp. II, totaling three eight haplotypes. Even with the identification of new haplotypes, the identification system described for molecular identification of species remains valid. The Φ analysis showed that Venezuela is differentiated from Brazilian localities, while in Brazil Poças is different from Ubatuba, Santos and Cananéia. Through variance analysis was confirmed the existence of a separation next of the upwelling in Cabo Frio. We also noticed that *Xiphopenaeus* sp. I expanded on 99,570 years ago, probably in the last glaciation. Using microsatellites markers, the variance analysis was the only with significant values. At the end of this study, the data were clustered with previous informations and the consensus distribution was constructed for the species. All these results supply contributions to management of *Xiphopenaeus* spp., because beyond the existence of two species, *Xiphopenaeus* sp. I consists of at least eight genetically different stocks. This is the first work to perform as wide a sampling in a study population of the species. In addition, the data produced will serve as a point of reference for other studies of marine organisms in the region.

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Xiphopenaeus kroyeri (Heller, 1862), popularmente conhecido no Brasil como camarão sete-barbas, pertence à família Penaeidae. Esta espécie é facilmente identificada pelo rostro sinuoso, normalmente com cinco dentes rostrais, e pelos longos pereópodes (Figura 1.1). Foi inicialmente descrita como pertencente ao gênero *Penaeus* e, em 1869, após uma revisão taxonômica foi transferida para o gênero *Xiphopenaeus*, passando a se chamar *X. kroyeri* (Smith, 1896).

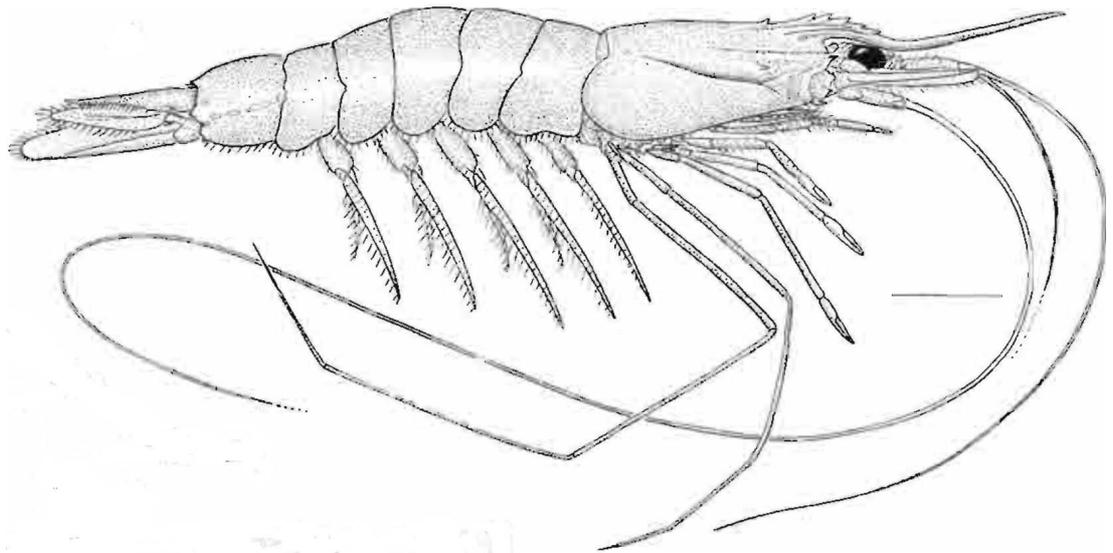


Figura 1.1: Morfologia externa de um exemplar de *X. kroyeri* retirado de Pérez-Farfante (1988).

O gênero *Xiphopenaeus* (Smith, 1869), por sua vez, foi descrito como monotípico, incluindo apenas a espécie *X. hartii* (Smith, 1869). Em 1869, Smith, ao comparar espécimes de *Penaeus kroyeri*, identificados por Heller (1862), com *X. hartii*, concluiu que se tratavam de exemplares de uma mesma espécie. Após a revisão, além da transferência de gênero, a espécie *X. hartii* foi sinonimizada a *X. kroyeri*, restabelecendo o caráter monotípico do gênero.

Em 1907, Bouvier descreveu uma segunda espécie pertencente ao gênero *Xiphopenaeus*, chamada *X. riveti*, cuja distribuição se restringia ao Oceano Pacífico,

de Paita, no Peru, até Sinamoa, no México (Figura 1.2). A diagnose da espécie era feita (dentre outras características morfológicas), pela presença de um rostro levemente arqueado com quatro dentes desiguais.

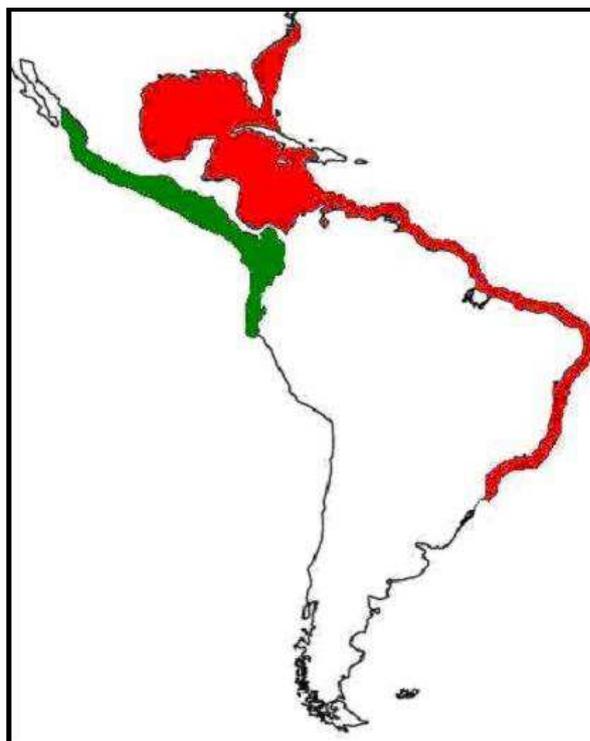


Figura 1.2: Amplitude da distribuição geográfica das duas espécies do gênero *Xiphopenaeus*: *X. riveti* está representada em verde e *X. kroyeri* em vermelho.

Pérez Farfante e Kensley (1997), em uma revisão morfológica do gênero, consideraram a espécie do Pacífico um sinônimo júnior de *X. kroyeri*. Deste modo, os espécimes encontrados no Atlântico e Pacífico foram considerados como pertencentes à mesma espécie e o gênero tornou-se novamente monotípico. Como consequência, a distribuição da espécie *X. kroyeri* foi ampliada, desde a Carolina do Norte (Estados Unidos) até Florianópolis (Brasil) no Oceano Atlântico, e de Sinamoa (México) até Paita (Peru), no Pacífico (Figura 1.3). Em 2002, D’Incao *et al.*, registraram a ocorrência da espécie no Rio Grande do Sul (Brasil).

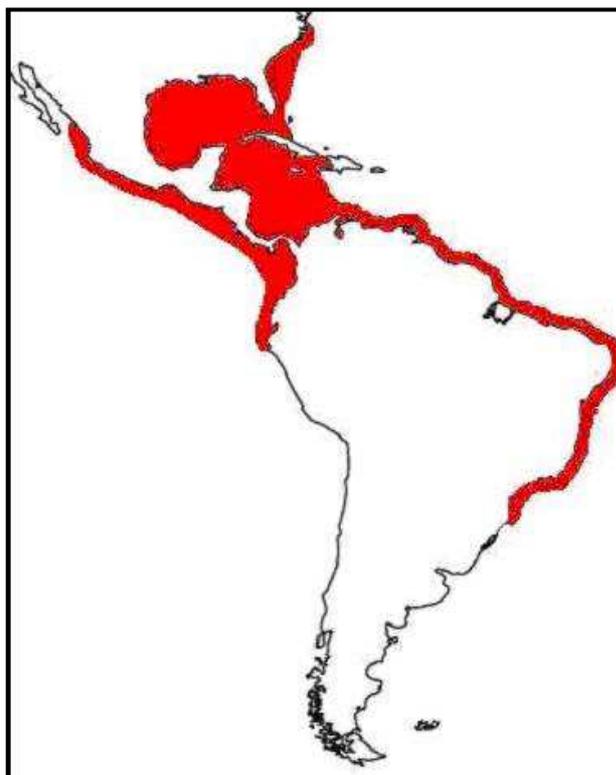


Figura 1.3: Distribuição geográfica da espécie *X. kroyeri* após a revisão morfológica realizada por Pérez Farfante e Kensley (1997).

Gusmão e Solé-Cava (2002), utilizaram PCR/RFLP do gene mitocondrial COI (citocromo c oxidase subunidade 1) para desenvolver um sistema de identificação molecular para sete espécies comerciais de camarões marinhos brasileiros. Este sistema molecular permitiu identificar com segurança materiais processados, que muitas vezes não contêm os caracteres morfológicos diagnósticos das espécies. Nesse estudo, detectou-se a presença de dois haplótipos distintos em populações de camarões sete-barbas: um padrão de PCR/RFLP (AD) foi encontrado em amostras coletadas no Espírito Santo e Rio de Janeiro, e um outro (EC) detectado apenas em Natal (Figura 1.4). Este resultado indicou a possível presença de duas espécies crípticas de *Xiphopenaeus* na costa brasileira.

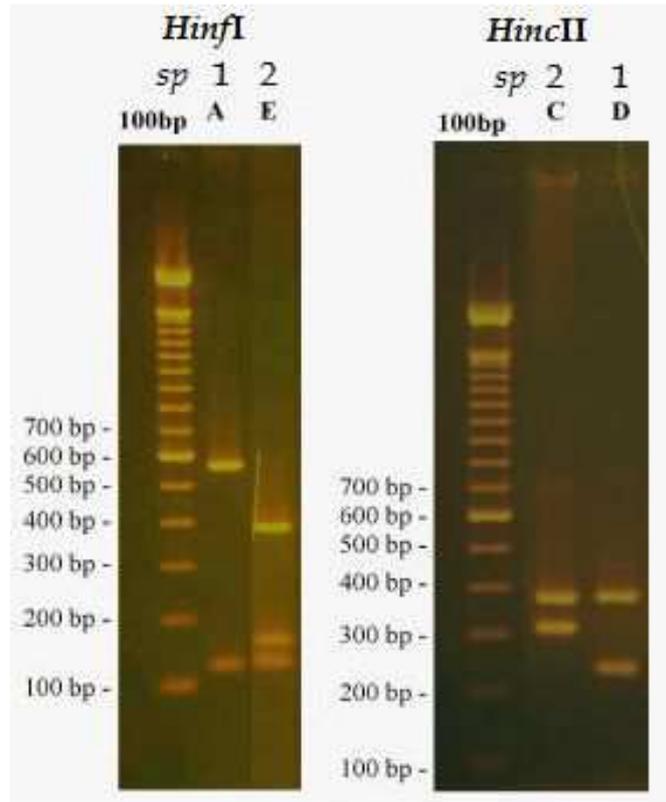


Figura 1.4: Padrões eletroforéticos espécie-específicos para as duas espécies crípticas *Xiphopenaeus*, após a digestão enzimática com as duas enzimas (*Hinfl* e *HincII*; Gusmão *et al.*, 2013; modificado a partir de Gusmão e Solé-Cava, 2002). Padrão “A” de *Hinfl* *Xiphopenaeus* sp. I; padrão “E” *Xiphopenaeus* sp. II; *HincII*) Padrão “D” *Xiphopenaeus* sp. I; Padrão “C” *Xiphopenaeus* sp. II.

Em 2006, Gusmão e colaboradores realizaram um estudo abrangente de populações brasileiras de camarão sete-barbas, utilizando o sistema de identificação por PCR/RFLP (Gusmão e Solé-Cava, 2002), sequenciamento do gene mitocondrial COI e análise isoenzimática. O estudo confirmou a existência de duas espécies crípticas de *Xiphopenaeus* no Atlântico, *Xiphopenaeus* sp. I e *Xiphopenaeus* sp. II, além de confirmar a existência de uma terceira espécie no Pacífico (*Xiphopenaeus* sp. III), considerada *X. riveti*.

Análises isoenzimáticas de populações do litoral brasileiro revelaram deficiência de heterozigotos na população de Ubatuba e, por meio de análise multivariada, foi confirmada a existência de dois grupos de indivíduos: o primeiro compreende indivíduos de Arraial do Cabo, Ubatuba, Nova Almeida, Caravelas, Poças, Natal e Caracas (Venezuela), e o segundo, apenas indivíduos de Ubatuba e Natal.

As análises de sequências *COI* mostraram que as amostras identificadas como pertencentes aos padrões de PCR/RFLP AD e EC correspondem, na verdade, a duas espécies crípticas de *Xiphopenaeus* na costa Oeste do Atlântico. Os padrões de AD e EC foram, respectivamente, designados *Xiphopenaeus* sp I e *Xiphopenaeus* sp II. De todas as localidades estudadas, *Xiphopenaeus* sp. I foi observado em todos os pontos de coleta, desde Caracas (Venezuela) até Ubatuba. *Xiphopenaeus* sp. II apresentou distribuição descontínua, encontrada apenas em Ubatuba/SP e Natal/RN. Foram identificados sete haplótipos para a espécie I, três para a espécie II e quatro para *Xiphopenaeus* sp. III (Pacífico).

Recentemente, Francisco (2009) propôs um sistema de identificação molecular por PCR baseado na metodologia de Gusmão e Solé-Cava (2002) para identificação das duas espécies da costa brasileira, e realizou um estudo populacional da *Xiphopenaeus* sp. I nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, empregando marcadores microssatélites.

Os resultados encontrados quanto à distribuição geográfica das duas espécies corroboraram resultados anteriores, tendo sido acrescentado mais um ponto de ocorrência para a espécie II, Cananéia/SP (Figura 1.5).

Em 2010, com o intuito de mapear a distribuição das espécies crípticas de *Xiphopenaeus* do Atlântico, Piergiorgio analisou 74 sequências de *Xiphopenaeus* spp. e observou três novos haplótipos em *Xiphopenaeus* sp. I e um em *Xiphopenaeus* sp. II. Mesmo com a baixa variação nucleotídica encontrada nas espécies, 0,0010 e 0,0002, foi constatada a utilidade deste marcador para elucidar eventos demográficos. A distribuição conhecida das espécies está apresentada na figura 1.5.

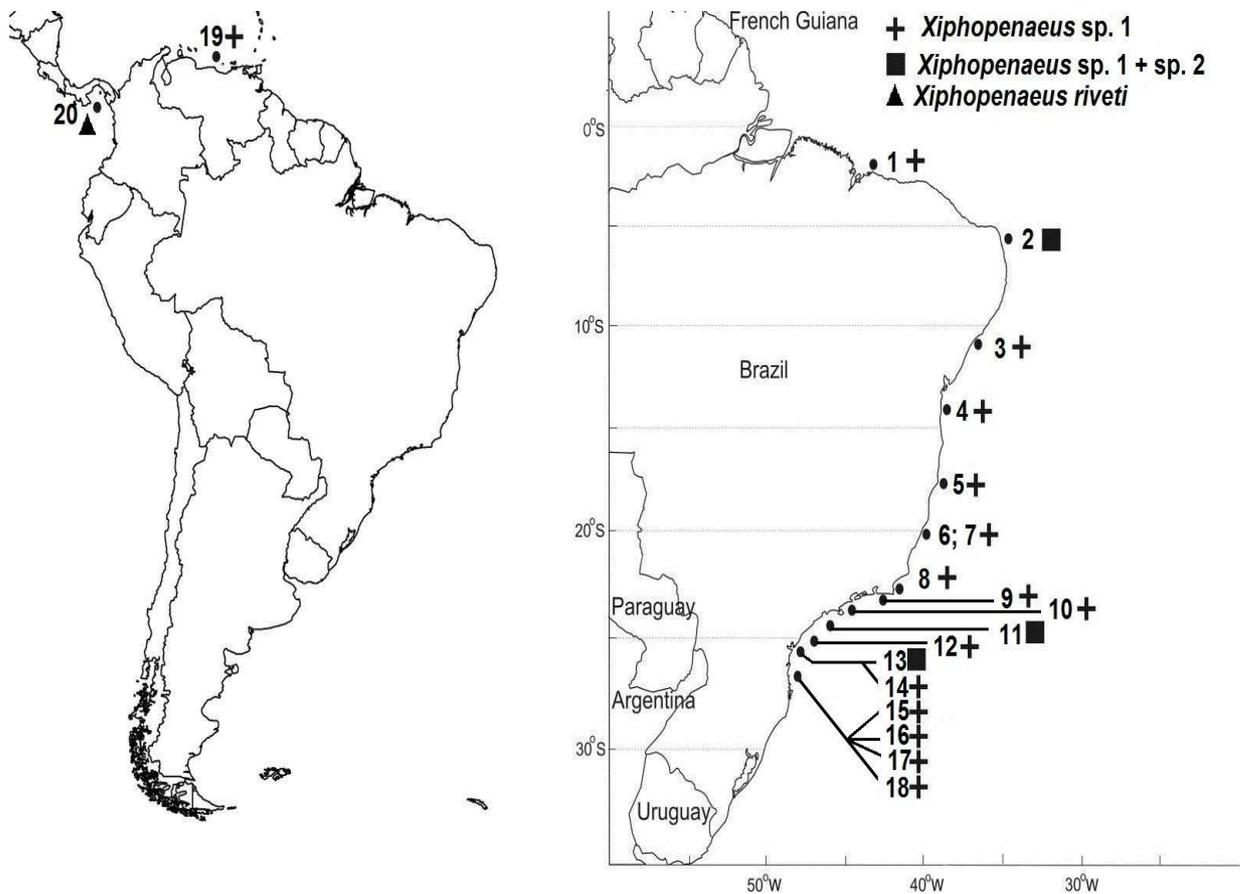


Figura 1.5: Mapa indicando a distribuição conhecida de *Xiphopenaeus* spp.. Os pontos de ocorrência apenas de *Xiphopenaeus* sp. I estão representados “sinais de mais”; os “quadrados” representam as localidades em que as espécies ocorrem em simpatria; *Xiphopenaeus* sp.III está representada por “triângulos”. Localidades: 1) São Luís/MA (Maggioni, comunicação pessoal); 2) Natal/NA (Gusmão *et al.*, 2006); 3) Poças/BA (Gusmão *et al.*, 2006); 4) Ilhéus/BA (Piergiorgio, 2010); 5) Caravelas/BA (Gusmão *et al.*, 2006; Piergiorgio, 2010); 6) Guarapari/ES (Francisco, 2009); 7) Nova Almeida/ES (Gusmão *et al.*, 2006; Piergiorgio, 2010); 8) Arraial do Cabo/RJ (Gusmão *et al.*, 2006); 9) Macaé/RJ (Francisco, 2009); 10) Angra dos Reis/RJ (Francisco, 2009); 11) Ubatuba/SP (Gusmão *et al.*, 2006; Francisco, 2009; Piergiorgio, 2010); 12) Santos/SP (Piergiorgio, 2010); 13) Cananéia/SP (Francisco, 2009; Piergiorgio, 2010); 14) Guaratuba/PR (Maggioni, comunicação pessoal); 15) São Francisco do Sul/SC (Francisco, 2009); 16) Itajaí/SC (Francisco, 2009); 17) Barra Velha/SC (Piergiorgio, 2010); 18) Camboriú/SC (Piergiorgio, 2010); 19) Venezuela (Gusmão *et al.*, 2006); 20) Panamá (Gusmão *et al.*, 2006).

1.2 CICLO DE VIDA

O ciclo biológico de *Xiphopenaeus kroyeri* ocorre em torno de 18 meses (Neiva e Wise, 1963) e é composto por seis fases: fase adulta, na qual ocorre a reprodução, fases larvais (náuplio, protozoa, mysis), fase pós-larval e fase juvenil. Em relação à maturação de estruturas sexuais, a maturidade é alcançada mais rapidamente em machos (Mota-Alves e Rodrigues, 1977), porém as fêmeas atingem maiores dimensões (Boschi, 1969; Branco *et al.*, 1999; Mota-Alves e Rodrigues, 1977; Nakagaki e Negreiros-Fransozo, 1998).

Diferente de outros camarões peneídeos (i.e. *Farfantepenaeus brasiliensis*), o camarão sete-barbas não necessita de estuários para completar o seu ciclo biológico (Valentini *et al.*, 1991; Rodrigues *et al.*, 1993). Apesar de *X. kroyeri* ser considerado não dependente de estuário para completar seu ciclo de vida, já foram observados indivíduos nestes ambientes (Nakagaki e Negreiros-Fransozo, 1998) e, durante os períodos de seca, em rios (Williams, 1965), mas tanto a elevada presença da espécie em ambientes estuarinos quanto em ambientes fluviais pode estar associada com a salinidade (Branco, 1999).

A distribuição de *X. kroyeri* é restrita a áreas com faixas de temperatura e salinidade de 21.2 – 27.8°C e 31.062 – 37.252 PPS (Ocean Biogeographic Information System – IOBIS; Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC). Estudos mostraram que alterações sazonais em fatores abióticos ampliam as diferenças nas proporções de machos e fêmeas (Mota-Alves e Rodrigues, 1977; Nakagaki e Negreiros-Fransozo, 1998; Paiva *et al.*, 1971).

Na região de Ubatuba, localidade onde foi verificada a ocorrência das duas espécies, o camarão sete-barbas apresenta um ciclo reprodutivo que se estende por todo o ano, mas possui dois picos reprodutivos, um na primavera e outro no outono (Nakagaki e Negreiros-Fransozo, 1998). Castro (1997) relacionou a sazonalidade no padrão reprodutivo de *X. kroyeri* com a disponibilidade de alimentos para as larvas. No entanto, não é descartada a possibilidade dos dois picos estarem relacionados com a reprodução de espécies diferentes.

Em um estudo acerca da dinâmica populacional e distribuição ecológica no estuário de Santos, foi considerado que a desova de *X. kroyeri* não ocorre em águas profundas, contrariando outros autores (Mota-Alves e Rodrigues, 1977), e sim em

locais mais rasos, devido à disponibilidade de alimento para as larvas. Além disso, não foi verificada uma separação de habitats ao longo do ciclo de vida, já que juvenis e adultos ocupam o mesmo habitat (Heckler, 2010). O mesmo padrão de estruturação foi observado para a espécie na região Sul do Brasil (Branco, 2005).

Dall *et al.*, (1990) descreveram os ciclos biológicos dos camarões, classificando-os em quatro tipos:

Tipo I – Ciclo estuarino, no qual a biologia inteira da espécie ocorre em regiões estuarinas.

Tipo II – Ciclo dependente de estuários, onde os juvenis migram para estuários costa devido à preferência de recursos.

Tipo III – Ciclo costeiro e oceânico, no qual a reprodução ocorre em mar aberto e as pós-larvas migram para a costa.

Tipo IV – Ciclo oceânico ou de mar aberto, no qual o ciclo biológico ocorre inteiramente na região oceânica.

O ciclo de *X. kroyeri* foi considerado como dependente de estuários, sendo, portanto, classificado como do tipo II. Porém, outros autores classificam o ciclo biológico da espécie como sendo o tipo III, não necessitando dessas regiões para completarem o ciclo (Valentini *et al.*, 1991; Rodrigues *et al.*, 1993). O recrutamento e a reprodução ocorrem ao longo de todo o ano, mas ocorrem picos reprodutivos durante dezembro e maio, e de juvenis em dezembro e janeiro (Rodrigues *et al.*, 1993; Nakagaki e Negreiros-Fransozo, 1998; Branco *et al.*, 1999; Branco, 2005; Castro *et al.*, 2005).

1.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A pesca camaroneira é uma das principais atividades pesqueiras em diversos países e membros da família penaeidae estão entre as espécies que mais

proporcionam lucro para os países exploradores (Paiva, 2004). No Brasil, *Xiphopenaeus kroyeri* é pescado ao longo de toda costa e nas regiões Sudeste e Sul, corresponde a uma das duas espécies mais importantes (D'Incao *et al.*, 2002).

Entre o período de 1960 e 1981 foi observado crescimento na captura de camarão sete-barbas, com pequenas oscilações. Durante a primeira metade da década de 80, os valores ultrapassaram a marca de 15.000 toneladas, porém entre 1982 e 1994 a produção média anual do recurso foi marcada por uma grande redução, com indicativos significativos de sobre-exploração nas regiões Sudeste e Sul. No período de 1990-1994, a captura de *X. kroyeri* foi inferior a 6.000 toneladas, o valor mais baixo das últimas décadas, sendo superior apenas aos anos de 1960-61 e 1963 (FAO, 2010) (Figura 1.6). Esta redução pode ser explicada pela diminuição na captura de outras espécies importantes economicamente e, buscando-se novas espécies que atendessem as exigências do mercado, o camarão sete-barbas teve a sua captura aumentada nos anos anteriores (Costa *et al.*, 2007). No entanto, a partir de 1995 é observado novamente aumento nas capturas da espécie.

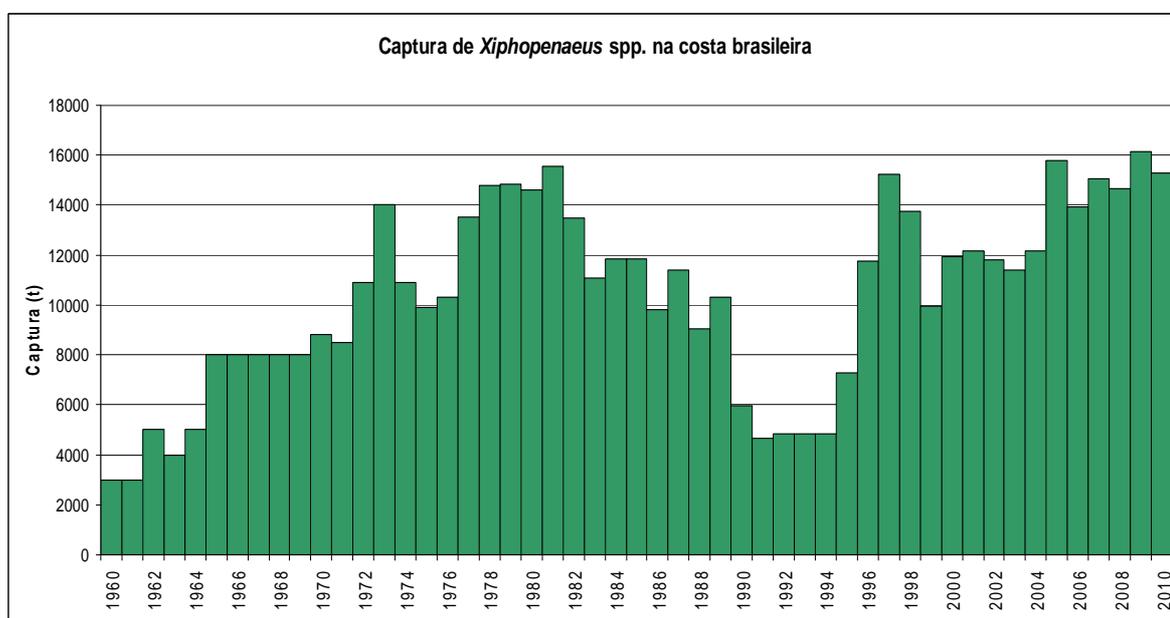


Figura 1.6: Dados referentes à captura do camarão sete-barbas na costa brasileira no período compreendido entre 1960-2010 (FAO, 2010).

As variações na captura da espécie podem estar relacionadas ao grande esforço de pesca decorrente da década de 80, mas podem ter sido (e ainda estar sendo) influenciadas por medidas adotadas para a preservação das espécies brasileiras. Segundo Souza (2008), uma das medidas pioneiras para o controle da pesca do camarão-sete-barbas foi tomada em 1969, quando a utilização de redes tipo arrastão de porta, com mais de 12 metros de comprimento na tralha superior foi proibida, assim como de malhas inferiores a 15 mm entre-nós contíguos. Posteriormente, em 1983 foi instituído o período de defeso (posto em prática apenas no ano seguinte), como medida adotada para proteger as populações do camarão rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis*). Mais tarde naquele ano, foi implementado o período de defeso para as demais espécies comerciais de camarões do Sul e Sudeste do país, passando por pequenas modificações desde então.

Segundo o CEPESUL, a pesca de *X. kroyeri* (assim como a de outras espécies demersais), é realizada mediante a utilização de duas redes cônicas puxadas por uma única embarcação, denominado arrasto duplo. Este equipamento é muito utilizado nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, embora seja considerada de natureza predatória, pois pode resultar na captura acidental de outras espécies (i.e. tartarugas, cetáceos; Branco, 2005; Silva *et al.*, 2010).

1.4 GENÉTICA PESQUEIRA

O ramo da genética pesqueira estuda a variabilidade genética de populações de importância comercial, visando gerar subsídios para a conservação e uso sustentável dos recursos pesqueiros. Os estudos atuam no reconhecimento de estoques pesqueiros, seus tamanhos e limites de distribuição. A delimitação das subpopulações pode ser realizada através de dados genéticos, citogenéticos, marcação e recaptura, morfológicos, dados de captura, imunogenética e parasitologia (Begg e Waldman, 1999)

Embora o conceito de “estoque” seja fundamental para a conservação dos recursos pesqueiros, existem diversas definições para o termo. Segundo Hilborn e Walters (1992), estoques são grupos arbitrários grandes o suficiente, auto-sustentáveis e onde os membros de cada grupo compartilham histórias de vidas

similares. Os estoques podem ser também considerados como subpopulações, agrupamentos geneticamente auto-sustentáveis, em que os estoques são uma fração de uma população, em que os indivíduos apresentam similaridades impostas pelo ambiente. O conceito proposto por Ovenden (1990) combina informação genética, reconhecimento de limites geográficos e considera as populações como auto recrutantes.

Em relação à *Xiphopenaeus kroyeri*, poucos trabalhos analisaram a estruturação dos estoques pesqueiros. Voloch e Solé-Cava (2005), observaram padrões de estruturação genética no sudeste do Brasil, utilizando 10 *loci* isoenzimáticos. Foram detectadas diferenças significativas ($F_{ST} = 0,223$) entre Ubatuba/SP e as populações de Nova Almeida/ES e Cabo Frio/RJ. A população de Ubatuba, no entanto, apresentou desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg em dois loci, devido à grande deficiência observada de heterozigotos ($H_o = 0,000$).

Em 2006, Gusmão e colaboradores realizaram uma investigação ampla de cinco populações: Natal, Poças, Nova Almeida, Cabo Frio e Ubatuba, utilizando análises de isoenzimas, PCR/RFLP e análises de sequências do gene mitocondrial COI (Gusmão *et al.*, 2006). Em decorrência de cinco *loci* diagnósticos presentes em indivíduos das populações de Natal e Ubatuba, foram observadas taxas elevadas de deficiências de heterozigotos ($F_{IS} = 0,575$, $P < 0,05$), alertando para a existência de espécies diferentes do camarão sete-barbas em simpatria em Natal e Ubatuba.

Além disso, os resultados de PCR/RFLP e sequenciamento, de diferentes populações do Atlântico e Pacífico, confirmaram a presença de duas espécies crípticas de *Xiphopenaeus* no Atlântico, nomeadas *Xiphopenaeus* sp. I e *Xiphopenaeus* sp. II, e uma terceira espécie no Pacífico, *Xiphopenaeus* sp. III, considerada *X. riveti* Bouvier (1907) por Gusmão *et al.* (2006).

As análises de sequências do gene COI mostraram altos níveis de divergência entre as espécies do Atlântico (12%), apesar da grande similaridade morfológica. As duas espécies do Atlântico exibiram diferentes distribuições ao longo da costa e a amplitude da distribuição geográfica das duas espécies não foi completamente elucidada.

Francisco (2009) realizou um estudo populacional da espécie I nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, empregando marcadores microssatélites. A análise molecular revelou uma maior variabilidade genética ($H_o = 0,029$ a $0,735$) nas

populações de *Xiphopenaeus* sp. I nas regiões Sul e Sudeste do que a encontrada por Gusmão e colaboradores, (2006) através de marcadores aloenzimáticos ($H_o = 0,019$ a $0,114$). Além disso, no trabalho não foi observada estruturação populacional em *Xiphopenaeus* sp. I, sendo necessários novos estudos em outras localidades para uma melhor compreensão da estruturação dos estoques.

A constatação da presença de duas espécies crípticas de *Xiphopenaeus* na costa brasileira é um fato ainda pouco difundido, especialmente fora da comunidade científica especializada. Dessa forma, os estudos sobre a biologia da espécie, as estatísticas pesqueiras e os dados do próprio IBAMA e da FAO (2010), ainda desconsideram a existência de mais de uma espécie no Oceano Atlântico. O camarão sete-barbas, depois do camarão rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis*), é o segundo recurso pesqueiro mais importante das regiões sul e sudeste do Brasil, tendo sido incluído na lista de espécies sobreexploradas em 2004 (DOU, 2004). Este fato, aliado a existência de espécies crípticas, que são exploradas de forma indiscriminada, evidencia a importância de que seja feita a caracterização dos estoques genéticos das duas espécies na costa brasileira.

Os resultados produzidos em estudos populacionais anteriores são ainda incipientes e contraditórios quanto à estruturação genética dos estoques das duas espécies. Além disso, a distribuição geográfica das espécies na costa brasileira ainda não foi plenamente esclarecida.

1.4.1 DNA MITOCONDRIAL E O GENE CITOCROMO C OXIDASE SUBUNIDADE I

O mtDNA é geralmente uma molécula circular de herança exclusivamente materna, que não sofre recombinação genética e apresenta uma taxa evolutiva diferente do DNA nuclear. Por apresentar múltiplas cópias por célula, seus genes são adequados para estudos forenses e trabalhos com material antigo, geralmente degradado. A molécula possui tamanho variado entre grupos, com tamanho na faixa de 16.000pb em camarões (Peregrino-Uriarte *et al.*, 2009).

Dos genes mitocondriais utilizados em estudos populacionais e de sistemática molecular, destaca-se o Citocromo c Oxidase I (COI). Por ser relativamente

conservado dentro das espécies e variar entre espécies, possibilita sua utilização para a resolução de problemas filogenéticos e sistemática molecular de grupos próximos (Cristescu e Hebert, 2002; Koenemann *et al.*, 2010; Palumbi e Baker, 1994; Hebert *et al.*, 2004). No entanto, a variação encontrada dentro de algumas espécies possibilita a realização em estudos populacionais e filogeográficos (Laurenzano *et al.*, 2012; Russ *et al.*, 2010).

Em camarões peneídeos, o gene mitocondrial COI tem sido usado em estudos filogenéticos e de genética pesqueira e identificação molecular de espécies crípticas (Piergiorgio, 2010; Li *et al.*, 2009; Russ *et al.*, 2010; Gusmão *et al.*, 2006). Em função de sua grande utilidade para identificação de espécies, em 2003, a região foi selecionada por Hebert e colaboradores como ferramenta para estudos de sistemática molecular em metazoários (projeto DNA barcoding; Hebert *et al.*, 2003).

1.4.2 REGIÕES REPETITIVAS DE MICROSSATÉLITES DO GENOMA NUCLEAR

O DNA nuclear de organismos eucariontes é uma molécula linear encontrada no núcleo das células. Possui taxa de evolução mais lenta do que o mtDNA, apresenta herança biparental, sofre recombinação e modificação na própria estrutura, o que influencia a taxa que os genes são transcritos e traduzidos em proteínas (Caccone *et al.*, 2004).

Dentre as regiões nucleares, destacam-se as repetições curtas e altamente variáveis, denominadas microssatélites. Microssatélites são unidades repetitivas *em tandem* no DNA, que apresentam grande utilidade para estudos populacionais e forenses (Góes *et al.*, 2002). Esses marcadores são unidades repetitivas de 1 a 6 nucleotídeos, com elevadas taxas mutacionais, e os alelos são caracterizados de acordo com o tamanho dos fragmentos (Litt e Luty, 1989; DeWoody e Avise, 2000). Os *loci* são definidos segundo o *motif*, tipo de sequência repetida *em tandem*, podendo ser mono, di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídeo, que evoluem por *slippage* durante e recombinação entre as fitas DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

São marcadores co-dominantes, geralmente multialélicos (possibilitam a distinção de genótipos homocigotos dominantes de heterocigotos) (Goldstein e Schlotterer, 1999), são distribuídos por todo o genoma e flanqueados por regiões

conservadas, o que possibilita a amplificação através da técnica de PCR (Weber e May, 1989).

Nos últimos anos, conjuntos de *primers* de microssatélites foram desenvolvidos para o gênero *Xiphopenaeus* (Francisco *et al.*, 2009). Cinco loci específicos foram desenvolvidos para *Xiphopenaeus* sp. I, mas *primers* heterólogos já foram testados para o gênero, resultando em amplificações positivas. No entanto, nenhum artigo publicado utilizou esses marcadores para análises populacionais das espécies de *Xiphopenaeus*.

1.4.3 POLIMORFISMOS DE TAMANHO EM ÍNTRONS DE GENES NUCLEARES (*EPIC; EXON- PRIMED INTRON-CROSSING*)

Dentre as regiões nucleares utilizadas em estudos populacionais, podem ser citados os polimorfismos em íntrons (Touriya *et al.*, 2003). Diversos íntrons de genes nucleares foram identificados a partir de DNA genômico e cDNA de espécies de camarões penaeídeos, e polimorfismos de tamanho dos fragmentos amplificados foram detectados em *Litopenaeus vannamei* e *Penaeus monodon* (France *et al.*, 1999; Bierne *et al.*, 2000). A amplificação específica é feita usando-se *primers* que pareiam nos éxons, técnica conhecida como “exon-primed intron-crossing PCR (EPIC-PCR; Palumbi, 1995). Alguns *primers* específicos para análises de EPIC-PCR, com alta variabilidade, já foram usados em estudos populacionais de camarões peneídeos (Bierne *et al.*, 2000).

1.5 AMBIENTE MARINHO

A costa brasileira é influenciada por três correntes marítimas: a Corrente da Costa Norte do Brasil (CCNB); a Corrente do Brasil (CB); e a Corrente das Malvinas (CM). As correntes da costa norte e do Brasil são correntes de temperatura e salinidade altas e pobres em sais nutrientes, formadas a partir da corrente sul equatorial, próxima a João Pessoa (PB). Já a Corrente das Malvinas possui alta concentração de nutrientes e baixa temperatura e salinidade, flui de sul para norte, encontra-se com a Corrente do Brasil e resulta na Convergência Subtropical.

Segundo Spalding *et al.*, (2007), os fatores físicos possibilitam dividir as regiões costeiras em reinos, províncias e ecorregiões. As ecorregiões são as menores divisões do ambiente marinho e podem ser delimitados por uma variedade de fatores, por exemplo, tipo de sedimentos, ressurgência, fluxo de nutrientes e temperatura. No Brasil são encontradas nove ecorregiões (Figura 1.7).

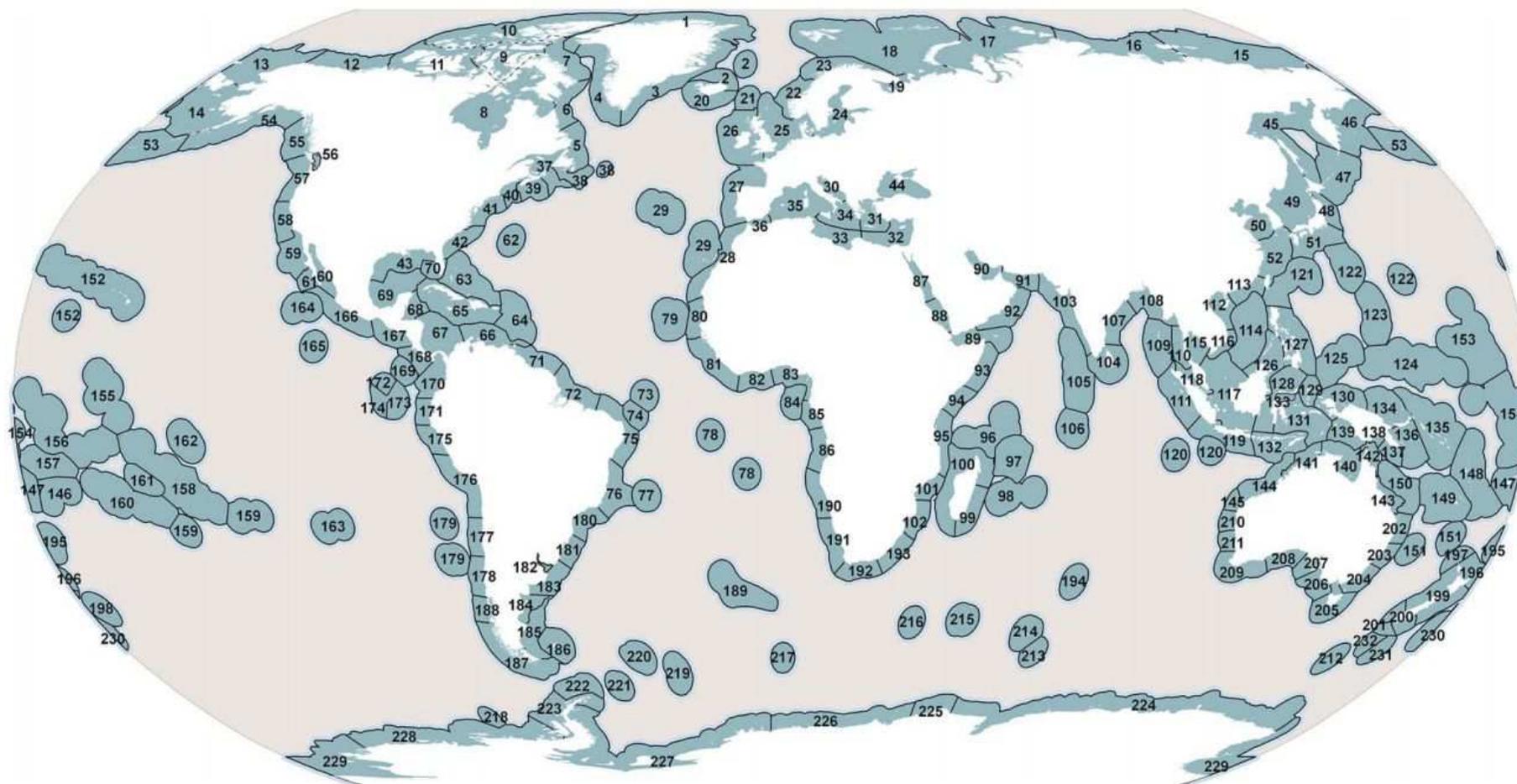


Figura 1.7: Divisões biogeográficas do ambiente costeiro em ecorregiões proposta por Spalding *et al.*, (2007).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

2.1.1 ANÁLISE POPULACIONAL E DEMOGRÁFICA

- Caracterizar geneticamente os estoques de pesca de *Xiphopenaeus kroyeri* do Atlântico, utilizando análise de polimorfismos de microssatélites, EPIC e análise de seqüências do gene mitocondrial COI, gerando dados que forneçam subsídios para a exploração sustentável e conservação dos recursos pesqueiros.
- Investigar os padrões evolutivos que moldaram a variação genética presente nas populações de *Xiphopenaeus* spp. e os eventos históricos e demográficos que levaram a atual distribuição geográfica de *Xiphopenaeus* sp. I.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ajustar as condições de amplificação por PCR de amostras da espécie I e II, empregando os *primers* de microssatélites e EPIC já descritos na literatura.
- Analisar a variabilidade genética em populações representativas da amplitude de distribuição da espécie ao longo da costa brasileira empregando análise de loci microssatélites e de seqüências mitocondriais do gene COI.
- Delimitar os estoques genéticos de pesca das duas espécies na costa brasileira, por meio de análises com os dois marcadores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

As amostras de *Xiphopenaeus* analisadas neste trabalho pertencem à coleção de DNA do Laboratório de Genética Pesqueira e da Conservação (LGPesC - UERJ). Os espécimes foram obtidos diretamente de pescadores, imediatamente após o desembarque de pequenas embarcações (Figura 3.1), em nove localidades: Ilhéus (–14°46'S –39°01'W; BA), Caravelas (–17°44'S –39°15'W ; BA), Nova Almeida (–20°03'S –40°11'W; ES), Atafona (–21°37'S –41°0'W; RJ), Ubatuba (–23°26'S –45°04'W; SP), Santos (–23°58' –46° 19'; SP), Cananéia (–25°02'S – 47°55'W; SP), Barra Velha (–26°37', –48°40'; SC) e Balneário Camboriú (–26°59'07"S –48°35'58"W; SC) foram obtidas entre setembro de 2008 e junho de 2010 (Figura 3.2) (Tabela 3.1).

Nove amostras de Natal (–5°52'S –35°10'W; RN), oito da Venezuela (10°36'N –66°59'W), quatro de Poços (-11°46'S 37°32'W; BA), duas de Nova Almeida, quatro de Ubatuba (–23°26'S –45°04'W; SP), duas de Arraial do Cabo (–22°58'S –42°01'W; RJ) e três de Caravelas, amostradas por Gusmão e colaboradores (2006) também foram incluídas nas análises populacionais. Quatro sequências oriundas do Panamá (8°53'N –79°35'W) foram usadas em análises filogenéticas (número de acesso: DQ084377.1; DQ084378.1; DQ084379.1; DQ084380.1; Gusmão *et al.*, 2006).



Figura 3.1: Exemplos de embarcações utilizadas na pesca artesanal de camarões em Cananéia/SP.

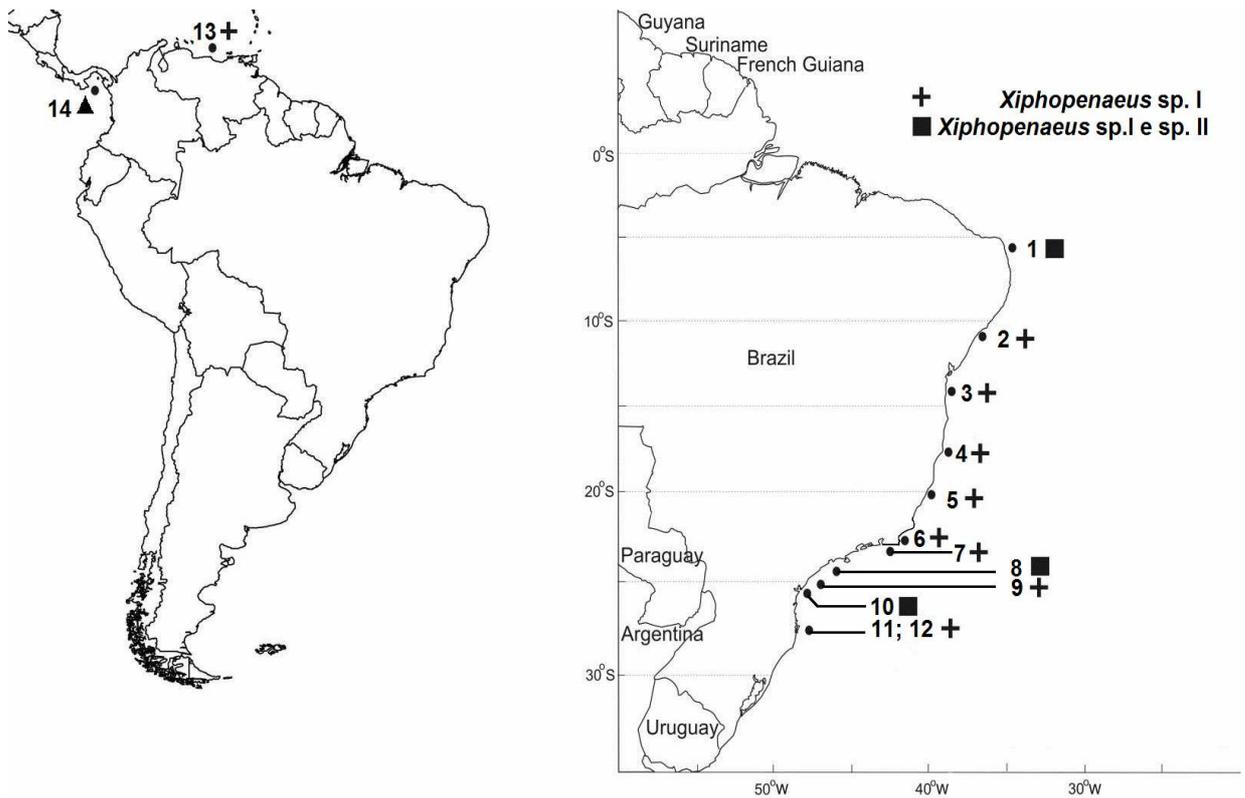


Figura 3.2: Mapa indicando as localidades estudadas no presente trabalho. 1) Natal/RN; 2) Poças/BA; 3) Ilhéus/BA; 4) Caravelas/BA; 5) Nova Almeida/ES; 6) Atafona/RJ 7) Arraial do Cabo/RJ; 8) Ubatuba/SP; 9) Santos/SP; 10) Cananéia/SP; 11) Barra Velha/SC; 12) Camboriú/SC; 13) Venezuela; 14) Panamá.

Tabela 3.1: Amostras de *Xiphopenaeus* spp. da coleção de DNA do LGPESC-UERJ utilizadas para as análises com cada um dos três marcadores moleculares estudados. Fonte: [1] Gusmão *et al.*, 2006; [2] Piergiorgio, 2010. As barras verticais “|” separam os números de amostras de *Xiphopenaeus* sp. I e *Xiphopenaeus* sp. II.

| Localidade | Código da Localidade | Fonte | Data da Coleta | Marcador molecular (Número de indivíduos) | | |
|-------------|----------------------|-------|----------------|--|-------|-----------------|
| | | | | COI | EPIC | Microssatélites |
| Panamá | PANA | 1 | 2001 | (4) | | |
| Venezuela | VENE | 1 | 2001 | (7) | - | |
| Natal | NATA | 1 | 02/2001 | (1 8) | (- 4) | |
| Poças | POCA | 1 | 09/2002 | (4) | - | |
| Ilhéus | ILH | 2 | 07/2009 | (10) | (4) | |
| Caravelas | CARA | 1 | 2001 | (3) | - | |
| Caravelas | CARA | 2 | 07/2009 | (8) | (4) | (29) |
| N. Almeida | NVAL | 1 | 2001 | (2) | - | |
| N. Almeida | NVAL | 2 | 03/2009 | (11) | (4) | |
| Atafona | ATAF | 2 | 09/2008 | (10) | (4) | (32) |
| A. do Cabo | ARRA | 1 | 2001 | (2) | - | |
| Ubatuba | UBAT | 1 | 2001 | (2 2) | (- 4) | |
| Ubatuba | UBAT | 2 | 12/2009 | (22 14) | (4 4) | (23) |
| Santos | SANT | 2 | 12/2008 | (10) | (4) | |
| Cananéia | CANA | 2 | 06/2010 | (10 4) | (4 4) | (29) |
| B. Velha | BARR | 2 | 07/2009 | (1) | (4) | |
| B. Camboriú | CAMB | 2 | 2010 | (11) | (4) | (32) |
| Total | | | | 145 | 52 | 145 |

3.2 ANÁLISE DE EPICS

3.2.1 AMPLIFICAÇÃO PELA PCR

A) TRIAGEM DE MARCADORES EPIC-PCR PARA ESTUDOS POPULACIONAIS DE XIPHOPENAEUS SPP.:

Foram testados em exemplares das duas espécies de *Xiphopenaeus* três pares de iniciadores heterólogos, descritos na literatura para a amplificação de íntrons (EPIC-PCR) de diferentes genes de espécies de camarões peneídeos. As sequências dos *primers* utilizados e fonte bibliográfica estão listadas na tabela 3.2:

Tabela 3.2: *Primers* heterólogos de EPIC usados no trabalho.

| Primers | Sequência do Primer (5'-3') | Fonte |
|------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Am2b2F | 5'-GGCGATAAGTTGTCTTACACC-3'; | <u>Bierne <i>et al.</i>, 2000</u> |
| Am2b3R | 5'-AGCCCTCTCCCCAGTTCCTGC-3' | |
| PmEf2-F | 5'-GTCTTCGTGCAGGAGAACTCG-3'; | <u>Bierne <i>et al.</i>, 2000</u> |
| PmEf2-R | 5'-GAGGGCGAGTTCTCGTCACTCCAGC-3' | |
| DecapANT-F | 5'-CCTCTTGAYTTGCKCGAAC-3'; | <u>Teske e Beheregaray, 2009</u> |
| DecapANT-R | 5'-TCATCATGCGCCTACGCAC-3' | |

As reações de amplificação dos íntrons dos genes amilase e fator de alongamento-2 foram feitas em um termociclador Veriti 96 Well thermalcycler (Applied Biosystems) em um volume de 20 µL por reação contendo 2µL de tampão 10X (Invitrogen), 0,5 µM de dNTP, 0,5 µM de cada primer, 2,5 µM de MgCl₂, 1U de Taq polimerase (Invitrogen), e 50 ng de DNA molde. As condições de ciclagem descritas por Atarhouch *et al.*, (2007) foram otimizadas para a análise das espécies brasileiras. Duas temperaturas de pareamento dos *primers* foram testadas, 52 e 54°C. As ciclagens consistiram de 3 minutos de desnaturação a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto de

desnaturação a 94 C, 1 minuto de pareamento a 52/54 C e 1 minuto de extensão e 20 segundos a 72 C.

As reações de amplificação do íntron do gene adenina nucleotídeo translocase foram conduzidas em um termociclador Veriti 96 Well thermalcycler (Applied Biosystems) em um volume de 30  L por reação contendo 3  L de tampão 10X (Biotools), 0,5  M de dNTP, 0,5  M de cada primer, 2,5  M de MgCl₂, 1U de Taq polimerase (Biotools), e 50-100 ng de DNA molde. As condições de ciclagem descritas por Teske e Beheregaray (2009) foram otimizadas para a análise das espécies brasileiras. As ciclagens consistiram de 3 minutos de desnaturação a 94 C, 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94 C, 40 segundos de pareamento a 56 C, 45 segundos de extensão a 72 C e uma etapa final de extensão a 72 C por 3 minutos. Foram testadas temperaturas de pareamento de 50  a 55 C.

3.2.2 ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EPIC

Os produtos de amplificação foram analisados primeiramente em géis de agarose 3%, para verificar o sucesso da amplificação. Em uma etapa subsequente, as combinações de *primers* que produziram amplificações positivas para as duas espécies foram testadas para diversos indivíduos para verificar a existência de polimorfismos de tamanho. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida 10% (150V; 3h), corado com nitrato de prata e fotografado, ou, alternativamente, 8 L do produto de amplificação foram analisados no equipamento Qiaxcel (QUIAGEN).

3.3 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE MITOCONDRIAL COI

3.3.1 AMPLIFICAÇÃO PELA PCR

Um fragmento de 677pb a 5' do gene mitocondrial COI foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR), usando os iniciadores COI_f [5'-CCTG CAGGAGGAGGAGA(C/T)CC-3'] e COI₀ [5'-TAAGCGTCTGGGTAGTCTGA(A/G)TA(T/G)CG-3'] descritos por Palumbi e Benzie (1991) e Baldwin *et al.*, (1998), respectivamente, segundo as condições de amplificação e ciclagem descritas por Gusmão e Solé-Cava (2002). Foram utilizados 50ng de DNA molde, 1 unidade de Taq polimerase (Biotools), 200mM de cada dinucleotídeo, 1,5mM de MgCl₂, 125mM de cada oligonucleotídeo iniciador, em 2μL de tampão de PCR 1x (Biotools), em um volume total de 50μl por reação. As amplificações foram conduzidas em um termociclador PTC-100 (MJ Research) programado para uma etapa de desnaturação a 94°C por 3 minutos seguida de 40 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de pareamento a 51°C, 45 segundos de extensão a 72°C e uma etapa final de 5 minutos de extensão a 72°C. Controles negativos com H₂O Milli Q no lugar do DNA molde foram incluídos em todas as amplificações. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio ou Gel Red™.

3.3.2 SEQUENCIAMENTO, EDIÇÃO E ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS

Cinquenta espécimes de *Xiphopenaeus* spp. foram sequenciados para confirmação da identificação molecular por PCR-RFLP e utilização nas análises populacionais de *Xiphopenaeus* spp. As reações de sequenciamento consistiram em 2μL de DNA molde (5-20 ng), 1,5μL de Tampão Applied Biosystems 5x, 1μL de BigDye (Applied Biosystems) e água Milli-Q q.s.p para o volume final de 20μL.

As reações foram conduzidas em um termociclador Veriti Well 96 (Applied Biosystems), utilizando a seguinte programação de ciclagem: 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 10 segundos e 60°C por 4 minutos . O sequenciamento das duas fitas de DNA foi realizado em sequenciador automático (ABI3130). As sequências foram editadas e alinhadas no programa Bioedit (Hall, 1999). As sequências foram analisadas em conjunto com as 74 de Piergiorgio (2010) e 21 de Gusmão e colaboradores (2006), totalizando 145 amostras. Os alinhamentos foram inspecionados visualmente e, para confirmar a amplificação do produto correto e descartar a possível amplificação de pseudogenes ou NUMTs (*nuclear mitochondrial DNA*; Lopez *et al.*, 1994), foi feita a tradução das sequências editadas na proteína correspondente usando o programa Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011), não tendo sido observados códons de parada ou *indels* nas sequências alinhadas.

3.3.3 ANÁLISES DE VARIABILIDADE GENÉTICA E FILOGENIA MOLECULAR

A análise dos dados foi feita utilizando as 50 sequências parciais do gene mitocondrial COI geradas neste trabalho em conjunto com nove haplótipos representando outras 95 sequências de *Xiphopenaeus* spp. depositadas no GenBank, com os seguintes códigos de acesso: DQ084367-DQ084380, AY135200.1 (Gusmão *et al.*, 2006; Maggioni, comunicação pessoal). Foram calculados os valores de diversidade haplotípica (H), diversidade nucleotídica (π) e determinados os números de sequências existentes em cada espécie (K) e o número de sítios polimórficos (S).

A composição nucleotídica para cada espécie foi calculada usando o programa MEGA 5. As diversidades haplotípica e nucleotídica, bem como número de haplótipos e sítios polimórficos foram calculados usando o programa DNASP 4.0 (Rozas, 2003).

A análise filogenética foi realizada usando o programa MEGA 5. Foi gerada uma árvore de Neighbor Joining (Saitou e Nei, 1987) empregando o modelo de distância Kimura-2 parâmetros (Kimura, 1980) e a consistência da topologia da árvore foi verificada através do teste estatístico de Bootstrap (Felsenstein, 1985). Sequências de *Metapenaeus ensis* (FJ435651) foram usadas como grupo externo. Também foram calculadas as distâncias interespecíficas e intraespecíficas.

3.3.4 ANÁLISES POPULACIONAIS

As amostras de *Xiphopenaeus* sp. II não foram utilizadas nas análises populacionais a seguir, devido ao reduzido número. Também foram excluídas as localidades de Arraial do Cabo, Poças, Barra Velha e Natal das análises populacionais de *Xiphopenaeus* sp. I, por conta do reduzido tamanho amostral.

O F_{ST} é um índice genético derivado da estatística F de Wright, também conhecido como índice de fixação. O método utiliza a heterozigosidade como ponto de partida para encontrar diferenças entre as subpopulações, através da variabilidade total e a encontrada em cada subpopulação. Reduções na heterozigosidade devido à

estruturação podem ser quantificadas com o teste. O índice de fixação varia de 0 a 1, sendo (0) ausência de estruturação populacional, valores intermediários apontam para a presença de fluxo gênico e o valor (1) corresponde a populações completamente diferenciadas. É o antecessor de vários outros testes de diferenciação populacional, como AMOVA e R_{ST} .

A análise de Variância Molecular (AMOVA) é um método baseado em hipóteses sobre diferenciação molecular, estimando estruturas a partir de dados moleculares. O teste é uma variação da estatística F de Fisher, porém assumindo a existência múltiplos grupos hierárquicos e utilizando informação molecular para inferir a estruturação. A variação dos componentes pode ser utilizada para realizar uma estatística análoga à estatística F, denominada Estatística (Φ) (Excoffier, *et al.*, 1992; Excoffier, 2001). Os valores da estatística (Φ) foram calculados através do programa Arlequin e, posteriormente, realizada a correção de múltiplos testes de Bonferroni (1936).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada segundo a hipótese de separação de duas populações (Norte e Sul), devido a fatores físicos (ressurgência) próximos à região de Cabo Frio (Rio de Janeiro). Geralmente as áreas de ressurgência possuem grande riqueza de nutrientes, devido ao afloramento de águas mais profundas (Moreira, 1971). Para testar se as condições abióticas nessa região funcionariam como uma barreira para o fluxo gênico entre populações ao Norte e ao Sul de Cabo Frio, diferentes cenários de agrupamentos foram testados por AMOVA (Tabela 3.3).

Através do programa SAMOVA 1.0 (Spatial Analysis of Molecular Variance – Análise Espacial de Variância Molecular) (Dupanloup *et al.*, 2002) foram criados grupos hierárquicos a posteriori. O programa gera uma análise similar à AMOVA, porém, não é necessário informar *a priori* os grupos a serem testados, apenas o número de grupos que serão verificados e informar a coordenada geográfica das localidades.

O programa utiliza os dados de sequências e informações de coordenadas geográficas dos pontos de coletas, retornando os valores de Φ e a significância estatística. A análise é útil para reconhecer pontos que funcionam como barreiras ao fluxo gênico, através das distâncias entre as localidades e da variação genética das

amostras. Com base nos resultados encontrados, a hipótese inicial foi refinada, considerando subdivisões dentro dos dois grupos inicialmente propostos.

Com o intuito de testar a correlação entre distância geográfica e genética, foi realizado o teste de Mantel (Mantel, 1967) no programa Arlequin 3.5. No programa GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2012) foi realizada a análise de componentes principais (PCA).

Tabela 3.3: Agrupamentos populacionais construídos para a análise de variância molecular (AMOVA) de *Xiphopenaeus* sp.l. As cores e os parênteses representam as localidades.

| Agrupamentos testados | Grupos |
|--|-----------------|
| (CAMB+CANA+SANT+UBAT) X (ATAF+NVAL+CARA+ILH+POCA+VENE) | 2 grupos |
| (CAMB+CANA+SANT+UBAT) X (ATAF+NVAL+CARA+ILH+POCA) X (VENE) | 3 grupos |
| (CAMB+CANA+SANT+UBAT) X (ATAF+NVAL+CARA+ILH) X (POCA) X (VENE) | 4 grupos |
| (CAMB+CANA+SANT+UBAT) X (ATAF+NVAL) X (CARA+ILH) X (POCA) X (VENE) | 5 grupos |
| (CAMB) X (CANA+SANT+UBAT) X (ATAF+NVAL) X (CARA+ILH) X (POCA) X (VENE) | 6 grupos |
| (CAMB) X (CANA+SANT) X (UBAT) X (ATAF+NVAL) X (CARA+ILH) X (POCA) X (VENE) | 7 grupos |

3.3.5 DEMOGRAFIA HISTÓRICA

As sequências produzidas neste estudo, em conjunto com as disponíveis no GenBank, foram usadas para construir duas redes de haplótipos, uma para cada espécie, por meio do programa Network 4.6.1.0 (Fluxus Technology Ltd, 1999-2012). Foram utilizados os algoritmos de Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999) e de parcimônia e a consistência dos resultados foi testada através de variações no parâmetro epsilon

(0-50), na taxa de transversão e transição (10:30), sendo atribuído peso ao caractere de acordo com a posição no códon (20, 30 e 10 para 1ª, 2ª e 3ª, respectivamente). Uma rede de parcimônia também foi construída com o programa TCS (Clement *et al.*, 2000).

Os testes de neutralidade D de Tajima e F de Fu foram calculados usando o programa Arlequin 3.5, seguindo os resultados de estruturação populacional encontrados nos testes anteriores (F_{ST} , PCA, AMOVA e SAMOVA).

Os valores negativos e significativos encontrados para o D de Tajima (1989) e o F de Fu (1995) são interpretados como desvios na taxa de evolução do marcador, segundo a teoria neutra da evolução molecular. Essa teoria foi inicialmente proposta por Kimura (1968) e considera uma população de tamanho finito na qual a diversidade genética encontrada não influencia no sucesso reprodutivo da espécie. Além disso, a quantidade de variação em uma população é mantida por meio de um equilíbrio existente entre alelos novos que surgem por mutação e alelos que são perdidos devido à deriva genética. Alterações na taxa de evolução neutra são indicativos de eventos históricos como gargalos populacionais, expansões populacionais ou ação de seleção natural, servindo como ferramentas para estudos demográficos.

O teste de Tajima é baseado no modelo de sítios infinitos sem recombinação. A significância da estatística D é testada através de amostragens aleatórias, segundo a hipótese de neutralidade seletiva e equilíbrio populacional, usando uma simulação de coalescência adaptada partir Hudson (1990). Vale ressaltar que valores significativos podem ser causados por outros fatores, como expansão populacional, *bottleneck*, ou variação nas taxas mutacionais.

A estatística F é mais sensível na detecção de eventos de expansões populacionais, que geralmente resultam em grandes valores negativos de F (Fu, 1997). A significância estatística é testada por meio de amostragens aleatórias, segundo a hipótese de neutralidade seletiva e equilíbrio populacional, através de uma simulação de coalescência adaptada a partir de Hudson (1990). O autor do teste observou que o valor 5% só é válido para valores $p < 0,02$, pois 2% equivale ao valor de corte de 5% nesta distribuição estatística.

Os grupos que apresentaram valores significativos nos testes de neutralidade foram representados através do teste *mismatch distribution* e os resultados foram

utilizados para datar a expansão populacional, segundo os modelos de expansão espacial e demográfica. O resultado foi plotado e a expansão foi calculada em anos (t), segundo a seguinte fórmula: $t = \tau/2\mu$. O cálculo foi feito segundo a equação de Roger e Harpending (1992), onde $\mu = 2\mu_0.k$, μ_0 é a taxa mutacional por sítio e por nucleotídeo e k é o comprimento da sequência nucleotídica. Segundo Roger e Harpending (1992), por meio da análise de *mismatch distribution* é possível compreender o passado das populações, pois cada localidade apresenta uma curva característica de diferenças nucleotídicas que reflete sua história demográfica. Foi utilizada a taxa mutacional de 1,4%/ Ma calculada para Alpheidæ (Knowlton e Weigt, 1998).

O programa Mesquite versão 2.75 (Maddison e Maddison, 2011) foi utilizado para calcular o coeficiente s de Slatkin e Maddison (1989), com o objetivo de testar duas hipóteses para a origem das populações: origem gradual (considerando as populações ao norte como mais antigas) e fragmentação (origem simultânea). Foi utilizado um haplótipo de cada tipo por população evolutiva, com o intuito de reduzir a variância da análise. Esse coeficiente representa o número de mudanças parcimoniosas em uma linhagem.

Segundo os autores, o tamanho efetivo populacional afeta a significância do teste, por conta disso, as duas hipóteses foram testadas variando o tempo de coalescência (10.000, 100.000, 1.000.000, 3.000.000 e 6.000.000 gerações) e o tamanho efetivo populacional (1.000, 10.000, 100.000 e 1.000.000). Utilizou-se uma árvore de NJ como partida para a análise (Figura 3.3) e duas representando as hipóteses (Figura 3.4). Foram consideradas cinco populações estruturadas: Venezuela; Poças/BA; Nordeste (Ilhéus/BA e Caravelas/BA), Sudeste (Nova Almeida/ES e Atafona/RJ) e Sudeste/Sul (Ubatuba/SP, Santos/SP, Cananéia/SP e Balneário Camboriú/SC).

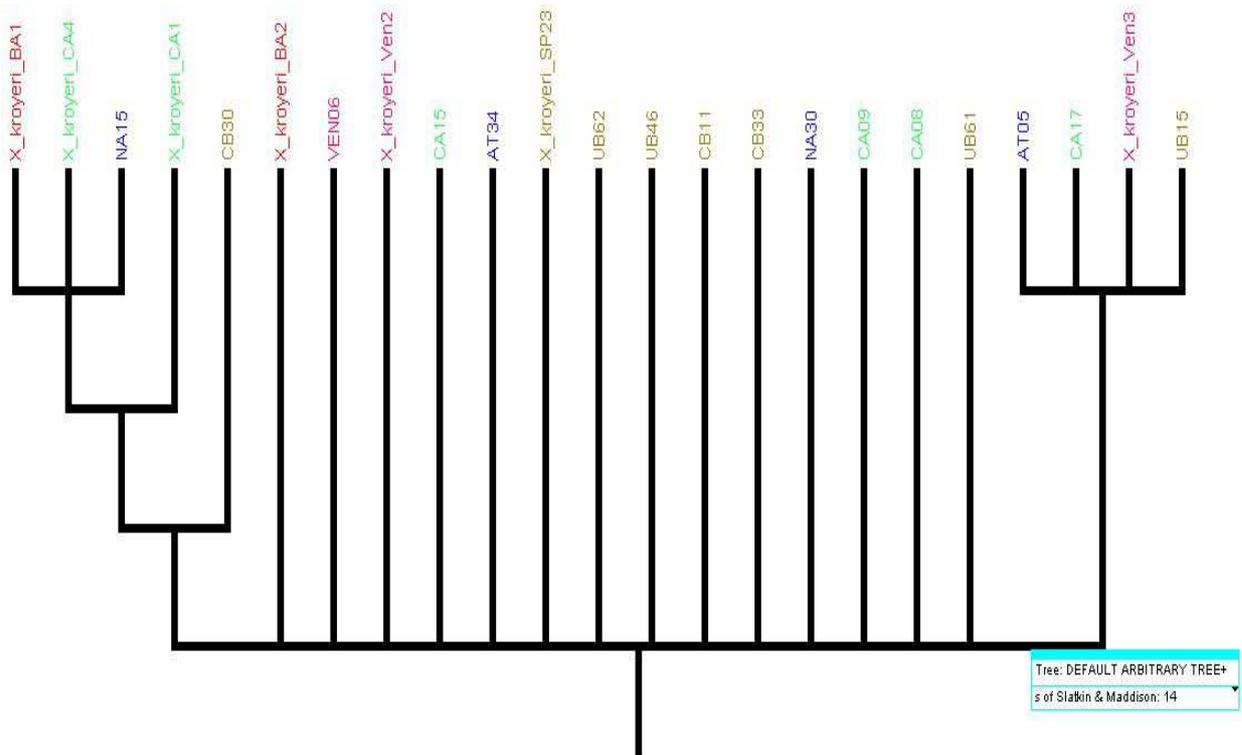


Figura 3.3: Árvore de NJ de partida evidenciando o relacionamento dos haplótipos de COI. Em detalhe está o valor de s calculado para o conjunto de dados ($s = 14$).
 Legenda: BA (Poças), CA (Caravelas), NA (Nova Almeida), AT (Atafona), CB (Camboriu), VEN (Venezuela), SP (Ubatuba) e UB (Ubatuba).

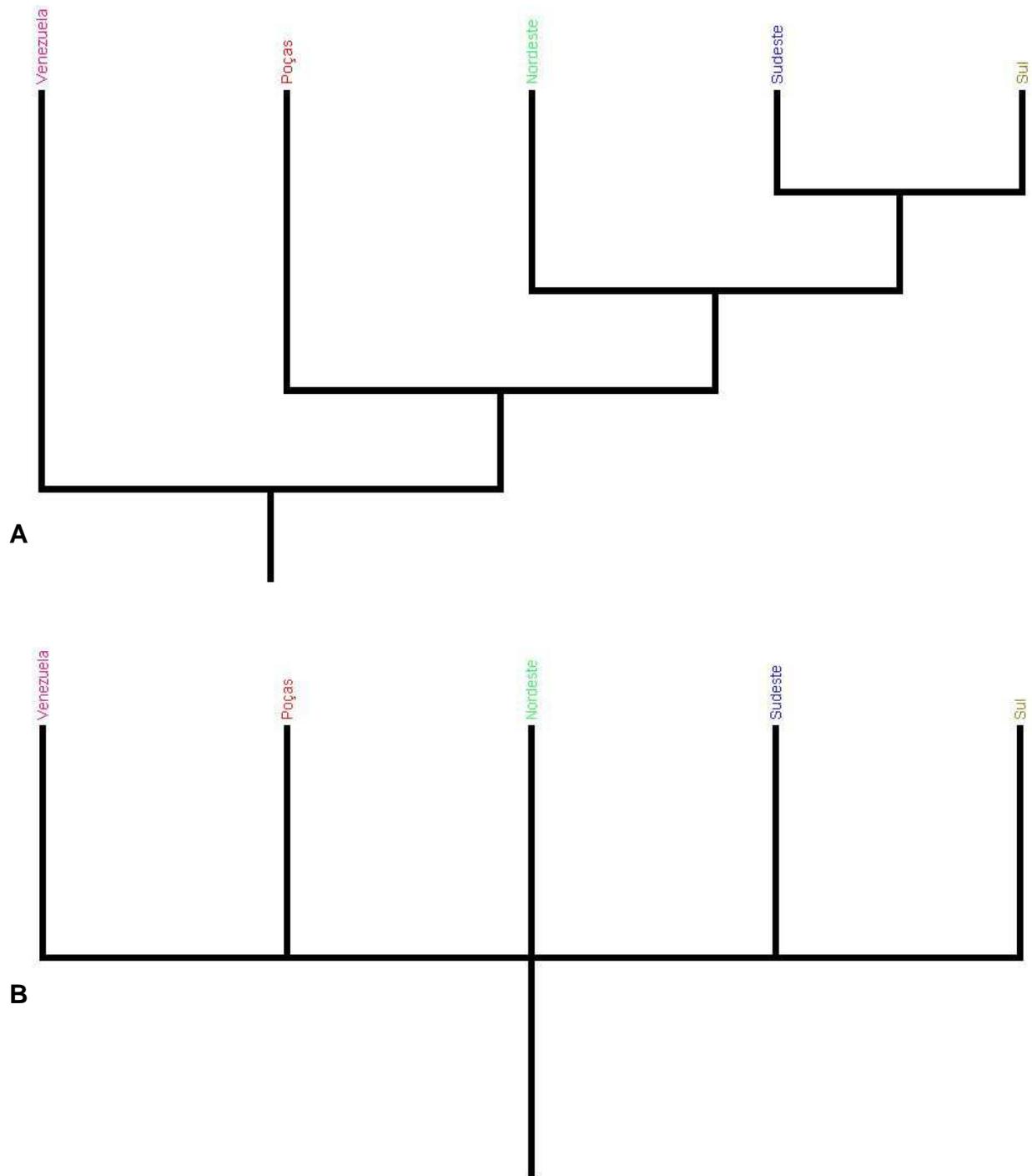


Figura 3.4: As duas hipóteses testadas para origem populacional através do s de Slatkin e Maddison. **A)** Hipótese de formação gradual das populações, no sentido Norte-Sul; **B)** Origem simultânea.

3.4 ANÁLISE DE *LOC*/MICROSSATÉLITES

3.4.1 AJUSTES PARA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR

Para as análises de microssatélites foram selecionadas cinco localidades do banco de DNA: Caravelas (–17°44'S –39°15'W; BA), Atafona (–21°37'S –41°0'W; RJ), Ubatuba (–23°26'S –45°04'W; SP), Cananéia (–25°02'S –47°55'W; SP) e Balneário Camboriú (–26°59'07"S –48°35'58"W; SC). Foi adotada a metodologia de Schuelke (2000). Esse protocolo consiste na utilização de um iniciador universal marcado com um fluoróforo, denominado M13 (5'-ACATTTTGCTGCCGGTCA-3'), complementar a uma sequência de 18pb (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'), acrescida à porção 5' dos *primers* forward. Foram usados quatro espécimes de três populações (Caravelas, Atafona e Camboriú) para cada espécie e marcador, objetivando testar as melhores condições de amplificação para cada marcador. Para as amostras de *Xiphopenaeus* sp. II foram utilizadas apenas as localidades de Ubatuba e Cananéia. Foram testados os seguintes *loci* da literatura : Xkro10 – Xkro14; Rcon6 – Rcon7; Lvan6 – Lvan10 (Tabela 3.4).

A amplificação das reações de PCR foi realizada em um termociclador Veriti (Applied Biosystems), em 10 µl, utilizando 20ng de DNA, 0.04 µM de iniciador F e 0.16 µM de iniciadores R e M13, 0,15µM de dNTP, e tampão de reação 1x, em um volume final de 10µl. As condições de ciclagem foram feitas segundo Francisco *et al.*, (2009), variando apenas a temperatura de pareamento dos *primers*. Foram testados gradientes de temperaturas de 49°C – 58°C, duas concentrações de MgCl₂ (1,5mM e 2,5mM), duas concentrações de Taq polimerase (1U e 0,5U) e quatro fluorocromos para cada loco (6-FAM, NED, PET e VIC).

Tabela 3.4. *Primers* de microssatélites usados no trabalho; *primers* específicos para *Xiphopenaeus kroyeri* (Xkro) e heterólogos (Rcon, Lvan) que resultam em ampliações positivas em *X. kroyeri* em testes de amplificação cruzada. Em todas as reações foi utilizado 1,5mM de MgCl₂. Temperatura de anelamento (Ta).

| Locus/ nº GenBank | Sequência do Primer (5'-3') | Motif | Ta | Fonte |
|-------------------|--|---|------|--------------------------------|
| Xkro10/EU559719 | F: GTGTTGAGACGAAACATGG R: CGACCTAGAGAATGTAGGCA | (TC) ₈ | 55.6 | Francisco <i>et al.</i> , 2009 |
| Xkro11/EU559720 | F: CGATAGCATCTACCTCTTCC R: ACAGAGGGTATTTCACTTCATC | (CTTCCT) ₉ | 55.6 | Francisco <i>et al.</i> , 2009 |
| Xkro13/EU559722 | F: CACGCTCATATACACTCACA R: GAACTGCAGGTGGTGAAGTC | (CA) ₆ | 55 | Francisco <i>et al.</i> , 2009 |
| Xkro14/ - | F: GAATGATTGCCTGGATTAAG R: ACTCCGTATCAAGTCG | (GATT) ₄ | 49 | Francisco, 2009 |
| Rcon06/EU59716 | F: GTTGCTTATTGCTGAACC R: GACAACGCCGACTATAAC | (GTT) ₁₂ | 57,8 | Francisco <i>et al.</i> , 2009 |
| Rcon07/EU59717 | F: AATAGGATTCGATACGC R: AGCAAAAAGTCTGCGTTC | (GTTT) ₅ | 48,1 | Francisco <i>et al.</i> , 2009 |
| Lvan06/DQ988334 | F: TAGATCCGTTTAAGTCACA R: GTATAATGTCTGAATGCTCAC | (TATC) ₂ ... (TGTC) ₃ ...(TGTC) ₃ | 53 | Freitas <i>et al.</i> , 2007 |
| Lvan08 /DQ988336 | F: CTTACAGAGTTGGATAG R: CGATAAGGAAACTGACATTG | (AGC) ₈ | 53 | Freitas <i>et al.</i> , 2007 |
| Lvan09 /DQ988337 | F: ATCTCGATAAGGAAACTGAC R: GACAGGTTTGTCTTCACAG | (TGC) ₉ | 51 | Freitas <i>et al.</i> , 2007 |
| Lvan10 /DQ988335 | F: ATAAGAAGGTCGTTTCTCTC R: AATACGACTCAACTATAGGG | (A) ₄ (AG) ₆ (AAAG) ₃ (A) ₆ | 53 | Freitas <i>et al.</i> , 2007 |

3.4.2 GENOTIPAGENS E ANÁLISE DE POLIMORFISMOS

Após os testes iniciais de padronização, cinco *loci* produziram ampliações satisfatórias em *Xiphopenaeus spp.*. Os produtos de amplificação de 145 indivíduos de cinco populações foram genotipados para verificar a presença de polimorfismos. Os produtos de amplificação marcados com fluorescência foram analisados no sequenciador automático ABI3130 da Plataforma Genômica Multiusuária do IBRAG-UERJ. As reações de genotipagem consistiram em: 8,75 µL de formamida Hi-di, 1 µL de produto de amplificação e 0,25 µL do marcador de peso molecular Lis500. As análises de fragmentos e a caracterização alélica foram feitas usando o programa Peak Scanner versão 1.0 (Applied Biosystems).

3.4.3 ANÁLISES POPULACIONAIS

As análises populacionais de microssatélites foram feitas usando três dos cinco *loci* selecionados na etapa anterior e um total de 113 indivíduos de quatro populações: Caravelas/BA, Atafona/RJ, Ubatuba/SP e Cananéia/SP.

Com o intuito de testar se os alelos dos *loci* estudados apresentam desequilíbrio de ligação, foi utilizado o programa Arlequin 3.5, com correção sequencial de Bonferroni. O desequilíbrio de ligação é a associação não aleatória de alelos de dois ou mais *loci*, que apresentam frequência maior ou menor, do que seria esperado com a segregação aleatória dos alelos. A quantidade de desequilíbrio de ligação depende da diferença entre as frequências alélicas observadas e esperadas (Silva, 2001).

A análise dos dados de genética populacional básica foi feita com os programas Arlequin 3.5, GenAlEx 6.5 e Msa 1.0 (Dieringer e Schlötterer, 2003). No GenAlEx 6.5 foi estimada a identidade genética de Nei. O nível de diferenciação entre as populações foi estimado a partir do índice de endocruzamento (F_{IS}). Através do programa Arlequin 3.5 foi estimado o índice R_{ST} , análogo ao F_{ST} , proposto por Slatkin (1995) para análise de microssatélites, com correção de Bonferroni. A comparação das populações nos diversos pontos de coleta e a estimativa do nível de heterogeneidade populacional para

cada espécie foram feitas por análise molecular de variância (Tabela 3.5) (AMOVA; Excoffier, 1994).

Tabela 3.5: Agrupamentos testados para a análise de variância molecular (AMOVA).

| Código | Agrupamentos testados | Grupos |
|---------------|-------------------------------|---------------|
| 1 | (CARA+ATAF) x (UBAT+CANA) | 2 grupos |
| 2 | (CARA+ATAF+UBAT) X (CANA) | 2 grupos |
| 3 | (CARA) x (ATAF) x (UBAT+CANA) | 3 grupos |

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE EPICS

4.1.1 AMPLIFICAÇÃO PELA PCR

As duas espécies apresentaram amplificações positivas para íntrons dos genes amilase e fator de alongamento-2 (FA), utilizando uma temperatura de pareamento de 52°C. Entretanto, apenas *Xiphopenaeus* sp. I teve o íntron de FA amplificado com sucesso, na temperatura de pareamento de 54°C. Utilizando a temperatura de pareamento 55°C foram obtidas amplificações positivas para as duas espécies com o gene ANT. Dos três pares de iniciadores testados, apenas, amilase (AMY), fator de alongamento – (FA) e adenina nucleotídeo translocase (ANT), resultaram em amplificações positivas e os demais produziram resultados negativos (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Resumo dos resultados obtidos nas padronizações para amplificação dos íntrons de Amilase e Fator de alongamento.

| | (+) Amplificação Positiva; (-) Amplificação Negativa | | | |
|--------------------------|---|--------------|--------------------------|--------------|
| | PCR | | | |
| | Programa 1 (54°C) | | Programa 2 (52°C) | |
| | Amilase | F. A. | Amilase | F. A. |
| <i>X. kroyeri</i> sp. I | + | + | + | + |
| <i>X. kroyeri</i> sp. II | + | - | + | + |

4.1.2 ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE TAMANHO

Após os testes iniciais os *primers* que resultaram em amplificações positivas foram usados em uma análise preliminar de polimorfismos. Foram analisados 4 espécimes de 9 populações para o íntron FA, 4 espécimes de 8 populações para o

íntron AMY e 3 espécimes de 9 populações para ANT. Apesar de ter resultado em ampliações positivas para as duas espécies, os íntrons de ANT, FA e AMY não apresentaram polimorfismos de tamanho, sendo monomórficos entre todos os espécimes analisados para as duas espécies.

4.3 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE MITOCONDRIAL COI

4.3.1 ANÁLISES DE VARIABILIDADE GENÉTICA

Foram analisadas 117 sequências de espécimes de *Xiphopenaeus* sp. I e 28 de *Xiphopenaeus* sp. II. As sequências de COI obtidas confirmaram resultados anteriores de identificação baseados em PCR-RFLP. A distância genética (p-distance) foi de 12% entre espécimes das duas espécies do Atlântico, 0,7% para variação intraespecífica de *Xiphopenaeus* sp. I e de 0,2% para *Xiphopenaeus* sp. II.

Oito novos haplótipos foram observados em oito espécimes, que mostraram variação em um único sítio, das localidades de Ubatuba/SP, Caravelas/BA e Camboriú/SC, totalizando quinze haplótipos identificados para *Xiphopenaeus* sp. I. Cinco novos haplótipos foram identificados para *Xiphopenaeus* sp. II nas localidades de Natal, Ubatuba e Cananéia (Tabela 4.2). O haplótipo mais frequente para *Xiphopenaeus* sp. I corresponde ao designado como "A" no trabalho de Gusmão *et al.*, (2006), ocorrendo em 84,2% dos espécimes estudados e, em *Xiphopenaeus* sp. II foi o haplótipo denominado "H" pelos mesmos autores citados anteriormente (94,12%). Os haplótipos "A" e "H" foram encontrados em todas as localidades estudadas.

Treze sítios variáveis (S) foram observados para *Xiphopenaeus* sp. I, enquanto foram observados apenas nove para *Xiphopenaeus* sp. II. Os valores de diversidade haplotípica (H) para *Xiphopenaeus* sp. I variaram de 0 (Santos / SP) a 0,714 (Ilhéus / BA) e a diversidade haplotípica de todas as localidades foi 0,517; o valor de H para *Xiphopenaeus* sp. II variou de 0 a 0,5 (Cananéia e Ubatuba / SP; Natal/RN) e a total foi 0,118. A diversidade nucleotídica (π) para *Xiphopenaeus* sp. I variou de 0 a 0,002

(Santos / SP e Ilhéus / BA) e (π) total 0,001 (Tabela 4.3) para *Xiphopenaeus* sp. II o valor de (π) e (π) total foi 0,0001 (Tabela 4.4). A distância (p-distance) dentro de cada espécie foi 0,3% para *Xiphopenaeus* sp. I e *Xiphopenaeus* sp. II. As variações entre os grupos foram: 10% entre *Xiphopenaeus* sp.III e *Xiphopenaeus* sp. II, 11 % entre *Xiphopenaeus* sp.III e *Xiphopenaeus* sp. I e 12% entre *Xiphopenaeus* sp. I e *Xiphopenaeus* sp. II.

Tabela 4.2: Distribuição dos haplótipos por localidade nas duas espécies de *Xiphopenaeus*. A-J) Haplótipos identificados por Gusmão e colaboradores (2006); 1.1–1.8) Haplótipos de *Xiphopenaeus* sp. I identificados neste trabalho; 2.1-2.5) Haplótipos de *Xiphopenaeus* sp. II identificados neste trabalho.

| Haplótipos encontrados por localidade | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------|---|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|----------------------------|-----|-----|-----|-----|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| Localidade | <i>Xiphopenaeus</i> sp. I | | | | | | | | | | <i>Xiphopenaeus</i> sp. II | | | | | | | | | | | | | |
| | A | B | C | D | E | F | G | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 1.4 | 1.5 | 1.6 | 1.7 | 1.8 | H | I | J | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | 2.5 | |
| Venezuela | X | X | X | | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Natal | X | | | | X | | | | | | | | | | | | X | X | X | | | | X | X |
| Poças | X | | | X | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ilhéus | X | | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Caravelas | X | | X | X | X | X | X | | | | X | | X | | | | | | | | | | | |
| N. Almeida | X | | X | X | X | X | | | | | | X | | | | | | | | | | | | |
| Atafona | X | | X | X | | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arraial | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ubatuba | X | | X | X | | | | | | X | | | | | X | | X | | X | X | | | | |
| Santos | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cananéia | X | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | X | | |
| B. Velha | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Camboriú | X | | | | | | | X | X | | | | | | | | X | | | | | | | |

Tabela 4.3: Medidas de diversidade genética de populações de *Xiphopenaeus* sp. I.

| População | N | H | π | Nh | S |
|--------------------|----|--------|--------|----|---|
| Venezuela | 7 | 0,5238 | 0,0014 | 3 | 2 |
| Poças | 4 | 0,5000 | 0,0028 | 2 | 3 |
| Ilhéus | 10 | 0,6000 | 0,0029 | 3 | 4 |
| Caravelas | 14 | 0,6813 | 0,0026 | 6 | 6 |
| Nova Almeida | 13 | 0,3376 | 0,0020 | 4 | 5 |
| Atafona | 10 | 0,5111 | 0,0017 | 3 | 4 |
| Ubatuba | 22 | 0,3376 | 0,0006 | 5 | 4 |
| Santos | 10 | 0,0000 | 0,0000 | 1 | 0 |
| Cananéia | 10 | 0,0000 | 0,0000 | 1 | 0 |
| Balneário Camboriú | 11 | 0,4909 | 0,0013 | 4 | 4 |

N – Número de indivíduos; H – Diversidade haplotípica; π - Diversidade nucleotídica; Nh - Número de haplótipos; S - Número de sítios polimórficos.

Tabela 4.4: Medidas de diversidade genética de populações de *Xiphopenaeus* sp. II.

| População | N | H | π | Nh | S |
|-----------|----|-------|--------|----|---|
| Natal | 8 | 0,786 | 0,0022 | 5 | 5 |
| Ubatuba | 16 | 0,205 | 0,0005 | 3 | 3 |
| Cananéia | 4 | 0,500 | 0,0009 | 2 | 1 |

As redes de haplótipos estão representadas na Figura 4.1. A distribuição dos haplótipos das duas espécies resultou em duas redes em forma de estrela, indicando expansão populacional em ambas as espécies. Além do haplótipo central, três outros haplótipos foram compartilhados entre indivíduos em *Xiphopenaeus* sp. I. No entanto, nenhum haplótipo além do central foi compartilhado entre espécimes e localidades para *Xiphopenaeus* sp. II. Com todas as variações testadas as redes das duas espécies apresentaram uma única topologia, o que sustenta a confiabilidade nos resultados.

Apesar da observação de novos haplótipos o sistema de identificação molecular proposto por Gusmão e Solé-Cava (2002) continua válido, com os haplótipos novos agrupando com as sequências já descritas das duas respectivas espécies (Figura 4.2).

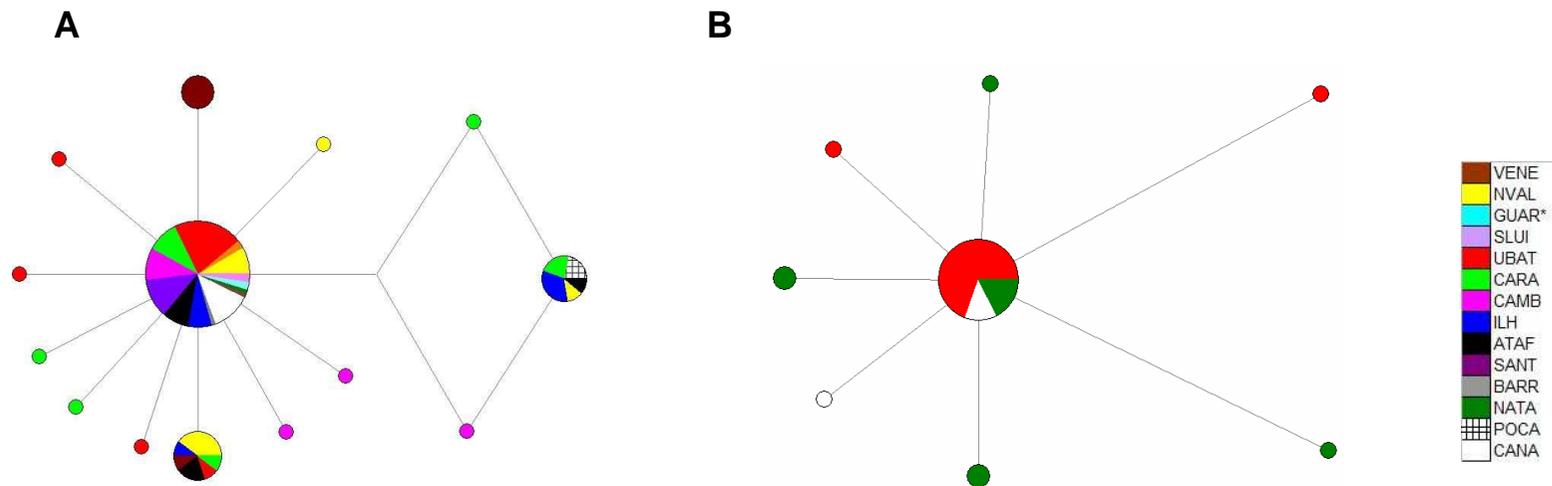


Figura 4.1: Redes de haplótipos de seqüências do gene COI geradas através do programa Network para (A) *Xiphopenaeus* sp. I e (B) *Xiphopenaeus* sp. II. O tamanho do círculo é proporcional a frequência do haplótipo e as cores representam cada localidade. Cada linha corresponde a um único passo mutacional, exceto as duas maiores em *Xiphopenaeus* sp. II que correspondem a dois passos mutacionais. (*) Localidades estudadas por Maggioni (Maggioni, comunicação pessoal).

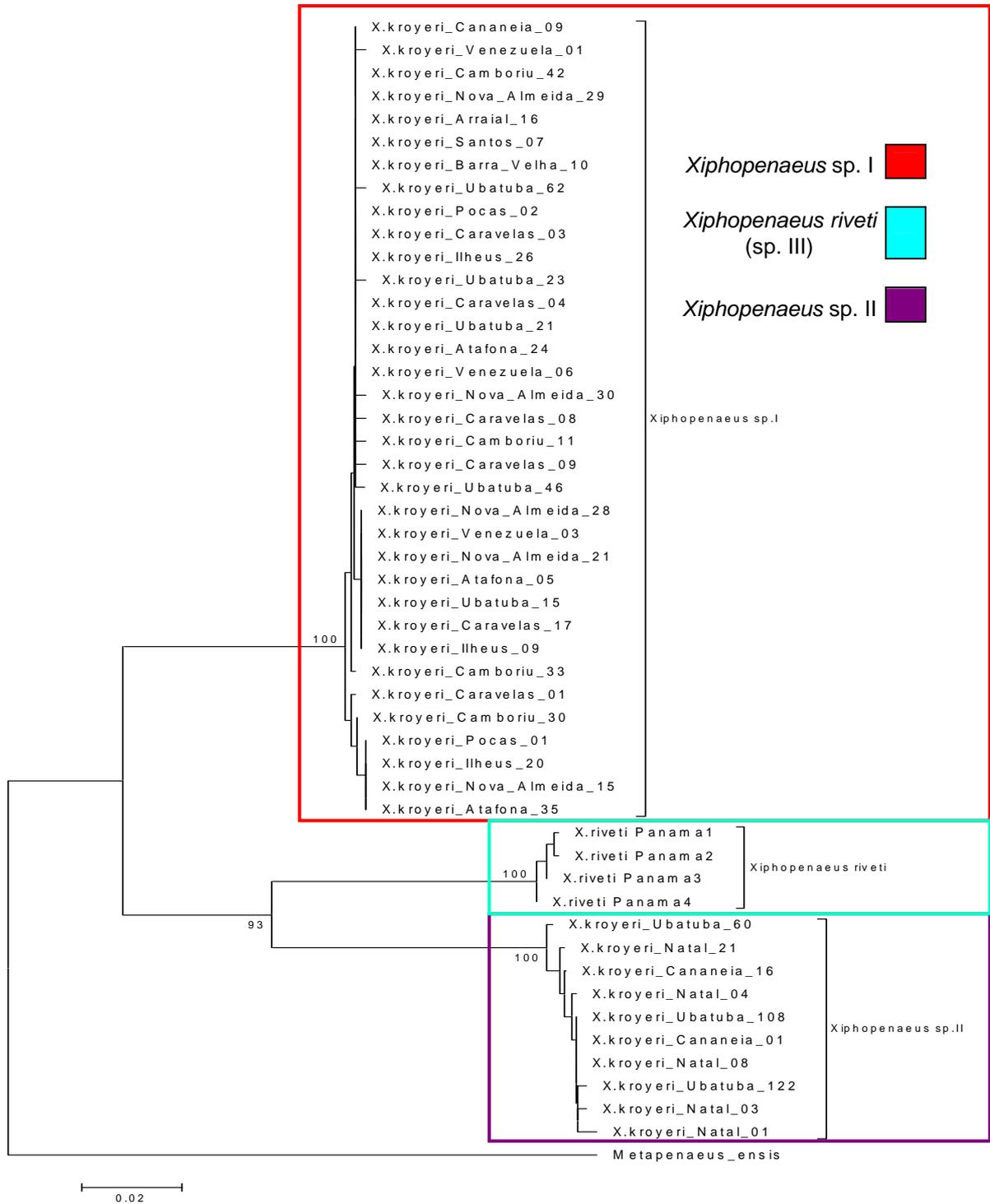


Figura 4.2: Árvore de Neighbor Joining de *Xiphopenaenus* spp. baseada em distâncias Kimura 2-parâmetros; Valores abaixo dos ramos: teste estatístico de bootstrap (valores > 70).

4.3.2 ANÁLISES POPULACIONAIS

Nas análises de estruturação populacional de *Xiphopenaeus* sp. I, as estimativas de Φ_{ST} resultaram apenas em valores significativamente diferentes de zero nas comparações entre Venezuela e as demais localidades ($P < 0,0011$) e entre Poças-Ubatuba, Poças-Santos e Poças-Cananéia (Tabela 4.5). Esse resultado indica homogeneidade populacional de *Xiphopenaeus* sp. I abaixo de Poças/BA, provavelmente por conta de elevado fluxo gênico.

Já nas análises de variância, a maior variação foi encontrada dentro das populações. Segundo o modelo de dois grupos, tanto para a AMOVA quanto SAMOVA, não existem diferenças significativas entre os grupos. No entanto, exceto pelo agrupamento com cinco grupos, os demais agrupamentos foram significativos para a AMOVA (Tabela 4.6), enquanto apenas mais de quatro grupos foram significativos para a SAMOVA (Tabela 4.7 e Tabela 4.8). Esses resultados corroboram a divisão populacional barreira biogeográfica, acima e abaixo da ressurgência.

Tabela 4.5: Valores de estruturação genética das populações de *Xiphopenaeus* sp. I (Φ_{ST}). Em negrito estão representados os valores significativos após a correção de múltiplos testes (** - $P < 0,0011$). Acima da diagonal estão os valores de migrantes calculados a partir de Φ_{ST} .

| Localidades | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------|---------|---------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|----------|----------|
| 1- VENE | | 0.249 | 1.006 | 1.189 | 1.067 | 1.006 | 0.467 | 0.309 | 0.309 | 0.775 |
| 2- POCA | 0.667** | | 2.308 | 0.983 | 0.457 | 0.488 | 0.156 | 0.115 | 0.115 | 0.350 |
| 3- ILH | 0.332** | 0.178 | | ∞ | 7.833 | 249.5 | 1.627 | 2.000 | 2.000 | 5.993 |
| 4- CARA | 0.296** | 0.337 | 0.000 | | 30.75 | ∞ | 4.550 | 7.564 | 7.564 | 124.5 |
| 5- NVAL | 0.319** | 0.522 | 0.060 | 0.016 | | ∞ | 5.181 | 4.819 | 4.819 | 9.916 |
| 6- ATAF | 0.332** | 0.506 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | | 13.01 | 10.86 | 10.86 | ∞ |
| 7- UBAT | 0.517** | 0.762** | 0.235 | 0.099 | 0.088 | 0.037 | | ∞ | ∞ | 28.91 |
| 8- SANT | 0.618** | 0.812** | 0.200 | 0.062 | 0.094 | 0.044 | 0.000 | | ∞ | ∞ |
| 9- CANA | 0.618** | 0.812** | 0.200 | 0.062 | 0.094 | 0.044 | 0.000 | 0.000 | | ∞ |
| 10- CAMB | 0.392** | 0.588 | 0.077 | 0.004 | 0.048 | 0.000 | 0.017 | 0.000 | 0.000 | |

Tabela 4.6: Valores da estatística Φ encontrados para os seis agrupamentos populacionais testados *a priori* (AMOVA) para a espécie *Xiphopenaeus* sp. I.

| Hipótese: 2 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
|-------------------------------------|------------------|----------------|----------------|--------------------------------------|
| Entre regiões | 0.03272 | 6.54 | NS | $\Phi_{CT} = 0.06536$ |
| Entre populações dentro das regiões | 0.08010 | 16.00 | ** | $\Phi_{SC} = 0.17121$ |
| Dentro das populações | 0.38778 | 77.46 | *** | $\Phi_{ST} = 0.22537$ |
| Hipótese: 3 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
| Entre regiões | 0.09011 | 17.34 | * | $\Phi_{CT} = 0.17340$ |
| Entre populações dentro das regiões | 0.04178 | 8.04 | NS | $\Phi_{SC} = 0.09726$ |
| Dentro das populações | 0.38778 | 74.62 | *** | $\Phi_{ST} = 0.25380$ |
| Hipótese: 4 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
| Entre regiões | 0.15446 | 28.70 | *** | $\Phi_{CT} = 0.28703$ |
| Entre populações dentro das regiões | -0.00411 | -0.76 | NS | $\Phi_{SC} = -0.01072$ |
| Dentro das populações | 0.38778 | 72.06 | *** | $\Phi_{ST} = 0.27938$ |
| Hipótese: 5 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
| Entre regiões | -0.03300 | -6.71 | NS | $\Phi_{CT} = -0.06706$ |
| Entre populações dentro das regiões | 0.31051 | 63.10 | *** | $\Phi_{SC} = 0.59134$ |
| Dentro das populações | 0.21458 | 43.61 | *** | $\Phi_{ST} = 0.56394$ |
| Hipótese: 6 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
| Entre regiões | 0.14192 | 27.88 | *** | $\Phi_{CT} = 0.27885$ |
| Entre populações dentro das regiões | -0.02189 | -4.30 | NS | $\Phi_{SC} = -0.05964$ |
| Dentro das populações | 0.38893 | 76.42 | *** | $\Phi_{ST} = 0.23584$ |
| Hipótese: 7 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
| Entre regiões | 0.13096 | 26.36 | *** | $\Phi_{CT} = 0.26364$ |
| Entre populações dentro das regiões | -0.02314 | -4.66 | NS | $\Phi_{SC} = 0.26364$ |
| Dentro das populações | 0.38893 | 78.30 | *** | $\Phi_{ST} = 0.21705$ |

NS – Não significativo

* - $P < 0,05$

** - $P < 0,001$

*** - $P < 0,0001$

Tabela 4.7: Agrupamentos obtidos a posteriori para a espécie *Xiphopenaeus* sp. I, por meio da análise espacial de variância molecular (SAMOVA).

| Agrupamentos testados | Grupos |
|--|----------|
| (CAMB+CANA+SANT+UBAT+ATAF+NVAL+CARA+ILH+VENE) x (POCA) | 2 grupos |
| (CAMB+CANA+SANT+UBAT+ATAF+NVAL+CARA+ILH) X (VENE) x (POCA) | 3 grupos |
| (CAMB+CANA+SANT+UBAT+VENE+ATAF+NVAL) X (CARA) X (ILH) X (POCA) | 4 grupos |
| (CAMB+CANA+SANT+UBAT+ATAF+NVAL) X (CARA) X (ILH) X (POCA) x (VENE) | 5 grupos |
| (CAMB+CANA+SANT+UBAT+ATAF) X (NVAL) X (CARA) X (ILH) X (POCA) x (VENE) | 6 grupos |
| (CAMB+CANA+SANT+UBAT) X (ATAF) X (NVAL) X (CARA) X (ILH) X (POCA) x (VENE) | 7 grupos |
| (CANA+SANT) X (CAMB) X (UBAT) X (ATAF+NVAL) X (CARA) X (ILH) X (POCA) x (VENE) | 8 grupos |
| (CANA+SANT) X (CAMB) X (UBAT) X (ATAF) X (NVAL) X (CARA) X (ILH) X (POCA) x (VENE) | 9 grupos |

Tabela 4.8: Valores da estatística Φ , provenientes de oito agrupamentos populacionais obtidos *a posteriori* (SAMOVA) para a espécie *Xiphopenaeus* sp. I.

| Hipótese: 2 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
|-------------------------------------|------------------|----------------|----------------|--------------------------------------|
| Entre regiões | 0.60448 | 57.94 | NS | $\Phi_{CT} = 0.57938$ |
| Entre populações dentro das regiões | 0.05105 | 4.89 | *** | $\Phi_{SC} = 0.11633$ |
| Dentro das populações | 0.38778 | 37.17 | *** | $\Phi_{ST} = 0.62832$ |
| Hipótese: 3 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
| Entre regiões | 0.38203 | 48.41 | NS | $\Phi_{CT} = 0.48406$ |
| Entre populações dentro das regiões | 0.01941 | 2.46 | *** | $\Phi_{SC} = 0.04767$ |
| Dentro das populações | 0.38778 | 49.13 | *** | $\Phi_{ST} = 0.50865$ |
| Hipótese: 4 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
| Entre regiões | 0.12507 | 22.63 | NS | $\Phi_{CT} = 0.22633$ |
| Entre populações dentro das regiões | 0.03976 | 7.19 | *** | $\Phi_{SC} = 0.09299$ |
| Dentro das populações | 0.38778 | 70.17 | *** | $\Phi_{ST} = 0.29828$ |
| Hipótese: 5 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
| Entre regiões | 0.17832 | 31.65 | ** | $\Phi_{CT} = 0.31652$ |
| Entre populações dentro das regiões | -0.00272 | -0.48 | ** | $\Phi_{SC} = -0.00706$ |
| Dentro das populações | 0.38778 | 68.83 | *** | $\Phi_{ST} = 0.31170$ |
| Hipótese: 6 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
| Entre regiões | 0.15639 | 29.49 | * | $\Phi_{CT} = 0.29487$ |
| Entre populações dentro das regiões | -0.01379 | -2.60 | *** | $\Phi_{SC} = -0.03688$ |
| Dentro das populações | 0.38778 | 73.11 | *** | $\Phi_{ST} = 0.26886$ |
| Hipótese: 7 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
| Entre regiões | 0.14575 | 28.40 | * | $\Phi_{CT} = 0.05534$ |
| Entre populações dentro das regiões | -0.02033 | -3.96 | NS | $\Phi_{SC} = 0.24438$ |
| Dentro das populações | 0.38778 | 75.56 | *** | $\Phi_{ST} = 0.28400$ |
| Hipótese: 8 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
| Entre regiões | 0.13565 | 27.57 | *** | $\Phi_{CT} = 0.27565$ |
| Entre populações dentro das regiões | -0.03133 | -6.37 | *** | $\Phi_{SC} = -0.08790$ |
| Dentro das populações | 0.38778 | 78.80 | *** | $\Phi_{ST} = 0.21198$ |
| Hipótese: 9 grupos | Variância | % total | p-valor | Estatística Φ |
| Entre regiões | 0.13993 | 28.62 | *** | $\Phi_{CT} = 0.28620$ |
| Entre populações dentro das regiões | -0.03878 | -7.93 | NS | $\Phi_{SC} = -0.11111$ |
| Dentro das populações | 0.38778 | 79.31 | NS | $\Phi_{ST} = 0.20688$ |

NS – Não significativo

* - $P < 0,05$

** - $P < 0,001$

*** - $P < 0,0001$

Nos resultados da análise de componentes principais (PCA), ao analisar todas as localidades, foram encontrados três grupos, Poças, Venezuela e as demais localidades. No entanto, foi observada uma leve diferenciação das localidades Atafona e Nova Almeida, em relação às demais. Ao repetir a análise, porém removendo Poças e Venezuela, em função da grande distância genética entre as demais localidades, foram encontrados três agrupamentos: Caravelas + Ilhéus; Atafona + Nova Almeida; Ubatuba + Santos + Cananéia + Balneário Camboriú (Figura 4.3). Esse resultado corrobora a hipótese de divisão populacional por meio da região biogeográfica de Cabo Frio.

Em relação à análise espacial (Mantel), foi verificado ao nível de significância de 5%, que as populações não estão estruturadas segundo o modelo de isolamento por distância. Isso significa que as distâncias geográficas existentes entre as localidades não estão positivamente correlacionadas com as distâncias genéticas entre populações.

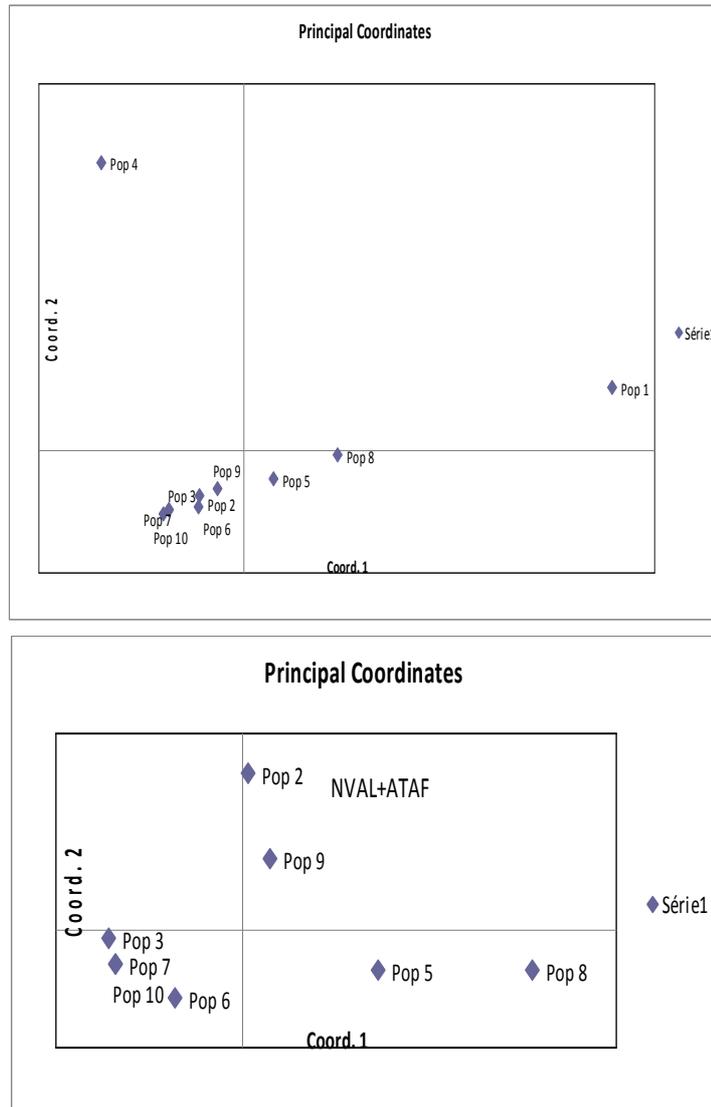


Figura 4.3: Gráfico com os resultados da PCA para *Xiphopenaeus* sp. I: análise com todas as localidades (esquerda) e após a remoção de Poças e Venezuela (direita). Legenda: pop 1 (POCA: Poças); pop 2 (NVAL: Nova Almeida); pop 3 (UBAT: Ubatuba); pop 4 (VENE: Venezuela); pop 5 (CARA: Caravelas); pop 6 (CAMB: Camboriú); pop 7 (SANT: Santos); pop 8 (ILH: Ilhéus); pop 9 (ATAF: Atafona); pop 10 (CANA: Cananéia).

4.3.3 DEMOGRAFIA HISTÓRICA

Com base nos resultados populacionais obtidos, foram construídas duas hipóteses para os testes de neutralidade (Tabela 4.9). Ambas as análises resultaram em valores negativos e significativos, indicativo de expansão populacional.

Segundo a hipótese de três grupos, foram encontrados valores negativos e significativos para F de Fu (-9,71) e D de Tajima (-1,75) para o maior agrupamento (todas as localidades, exceto Poças e Venezuela), indicativo de expansão populacional (Tabela 4.7). Na hipótese de seis grupos, foram observados valores significativos e negativos para F de Fu (-8,98) e D de Tajima (-2,24), também indicando expansão para o grupo abaixo da região de ressurgência (Ubatuba + Camboriú + Cananéia + Santos). Com esses resultados, foi realizada a *mismatch distribution* apenas para os grupos significativos para os testes de neutralidades.

Tabela 4.9: Testes de neutralidade com os dois agrupamentos testados: três grupos e seis grupos. Nível de significância $p=0,05$ para D de Tajima e $0,02$ para o F de Fu; (*) e (**): Valores significativos.

| Nº Grupos | Agrupamentos | D de Tajima | F de Fu |
|-----------------|--|---------------|----------------|
| 3 Grupos | | | |
| | VE NE | -0.27 | -0.44 |
| | PO CA | -0.75 | 1.72 |
| | ILH + CARA + ATAF + NVAL + UBAT + SANT + CANA + CAMB | -1.75* | -9.71** |
| 6 Grupos | | | |
| | VE NE | -0.27 | -0.44 |
| | PO CA | -0.75 | 1.72 |
| | ILH | 0.51 | 1.45 |
| | CARA | -0.89 | -1.92 |
| | NVAL + ATAF | -0.79 | 0.11 |
| | UBAT + CAMB + CANA+SANT | -2.24* | -8.98** |

Os resultados da análise da distribuição de diferenças entre pares de sequências (*mismatch distribution*) foram plotados em gráficos (Figura 4.4). A distribuição unimodal encontrada na hipótese de seis populações indica que expansões (demográfica e geográfica) ocorreram na população do Sul do Brasil (Ubatuba, Santos, Cananéia e Balneário Camboriú), e que a significância do agrupamento de três populações está provavelmente relacionada com Ubatuba e Balneário Camboriú, as únicas populações significativas para os testes de neutralidade. Os valores de θ_0 e θ_1 foram 0,00000 e 0,33848, respectivamente. Por meio desses resultados foram calculados os tempos decorridos desde a expansão (Tabela 4.10), que coincidem com o período da última glaciação (110-10 mil anos) (Lee *et al.*, 2006).

O valor obtido de s , a partir da árvore de relacionamento dos haplótipos (NJ), foi comparado com os valores estatísticos das hipóteses. A hipótese de formação gradual das populações foi significativa para os períodos de 10.000 e 100.000 anos (Tabela 4.11). Esses resultados corroboram os dados obtidos através da *mismatch*

distribution, em que foram verificadas expansões para os períodos de 10.000 e 100.000 anos. Os dados indicam que a hipótese Norte-Sul foi a melhor entre as testadas. Contudo, os testes s de Slatkin e Maddison para 10.000 anos ($N_e = 100.000$) e 100.000 ($N_e = 1.000.000$) para a hipótese de fragmentação resultaram em valores limítrofes (*borderline*) ao nível de 5%.

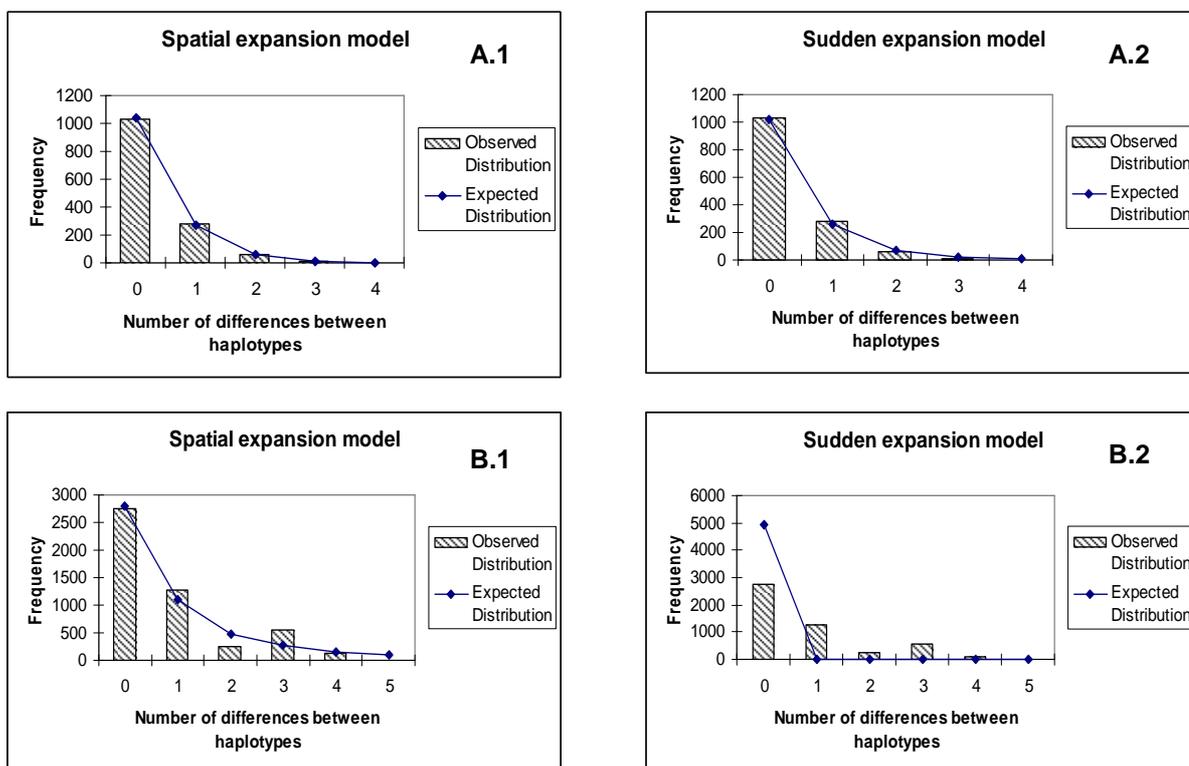


Figura 4.4: *Mismatch distribution* para os grupos significativos para o teste de neutralidade de *Xiphopenaeus* sp. I, segundo o modelo de expansão demográfica e geográfica. **A) (1-2)** Valores significativos no teste de neutralidade para a hipótese de seis grupos; **B) (1-2)** agrupamento significativo segundo a hipótese de 3 grupos.

Tabela 4.10: Tempo estimado de expansão, segundo os modelos de expansão demográfica e geográfica para a hipótese de seis grupos.

| Expansão Populacional | Tau | K | μ_0 | μ | Tempo Estimado |
|-----------------------|------|--------|---------|-------------------------|----------------|
| Geográfica | 0.33 | 538 bp | 1,4% Ma | $3,0128 \times 10^{-5}$ | 10,95 mil anos |
| Demográfica | 3.00 | 538 bp | 1,4% Ma | $3,0128 \times 10^{-5}$ | 99,57 mil anos |

Tabela 4.11: Valores significativos para as hipóteses testadas para o s Slatkin e Maddison (1989). Ne – Tamanho efetivo populacional; Hipóteses: [1] – origem gradual e [2] fragmentação.

| Anos | Ne | Hipótese | Significância |
|-------------|-----------|-----------------|----------------------|
| 10.000 | 100.000 | 1 | * |
| 10.000 | 1.000.000 | 1 | * |
| 100.000 | 1.000.000 | 1 | * |
| 10.000 | 100.000 | 2 | NS |
| 100.000 | 1.000.000 | 2 | NS |

NS – Não significativo

* - $P < 0,05$

4.4 ANÁLISE DE LOCI MICROSSATÉLITES

4.4.1 AJUSTES PARA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR

Foram usados quatro espécimes de três populações para cada espécie e marcador, objetivando testar as melhores condições de amplificação. Após os testes iniciais, os *primers* que não funcionaram foram Rcon7, para *Xiphopenaeus* sp. I e *Xiphopenaeus* sp. II, e Xkro14, para *Xiphopenaeus* sp. II. Os *primers* desenvolvidos para *Litopenaeus vannamei* (Lvan) ainda não foram testados em *Xiphopenaeus* sp. II e não resultaram em amplificações em *Xiphopenaeus* sp. I.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Veriti (Applied Biosystems), em 10 µL e as melhores amplificações foram obtidas através das seguintes condições: 20 ng de DNA molde; 0,04 µM de iniciador F; 0,16 µM de iniciadores R e M13; 2,5mM MgCl₂; 0,15 µM de dNTP; 0,5 U de GoTaq polimerase; tampão de reação 1x. As condições de ciclagem foram feitas segundo Francisco e colaboradores (2009), variando apenas a temperatura de pareamento dos *primers*. As temperaturas de amplificação ajustadas estão representadas na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Ajustes de amplificação dos dez *loci* de microssatélites selecionados para as duas espécies. (-): amplificações negativas; (*) *loci* ainda não testados.

| Locus | <i>Xiphopenaeus</i> sp. I | <i>Xiphopenaeus</i> sp. II |
|---------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Xkro10 | 55.6°C | 55.6°C |
| Xkro11 | 55.6°C | 56°C |
| Xkro13 | 57°C | 56°C |
| Xkro14 | 49°C | - |
| Rcon06 | 57.8°C | 57.8°C |
| Rcon07 | - | - |
| Lvan06 | - | * |
| Lvan08 | - | * |
| Lvan09 | - | * |
| Lvan10 | - | * |

4.4.2 ANÁLISE DE DADOS

Foram analisados ao todo 113 amostras de quatro localidades: Caravelas (28), Atafona (28), Ubatuba (29) e Cananéia (29) (Tabela 4.13). Também foram amplificadas 32 amostras de *B. Camboriú* para os três *loci*, mas por conta de dúvidas que surgiram durante a interpretação dos resultados, a população não foi incluída nas análises.

Os testes de desequilíbrio de ligação, com todos os *loci* agrupados indicaram que os *loci* Xkro10 e Xkro11 estão ligados ($p = 0,00000$). No entanto a análise com os *loci* isolados mostrou que os dois *loci* permaneceram ligados apenas na localidade de Caravelas. Em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, o locus Xkro13 não apresentou desvio significativo para nenhuma localidade, enquanto o locus Xkro10 não apresentou desvio significativo apenas na localidade de Ubatuba. A localidade de Cananéia apresentou desvios significativos para Xkro11.

Ao considerar todos os *loci*, o número total de alelos variou de oito (Ubatuba) a dez (Atafona). Os valores individuais foram um (Ubatuba) a três (Caravelas; Atafona; Cananéia) para o locus Xkro10. Para os *loci* Xkro11 e Xkro13 os números variaram de quatro (Caravelas; Cananéia) a cinco (Atafona; Ubatuba) e de dois

(todas as localidades), respectivamente. Já os valores de heterozigosidades observadas variaram de 0,037 (Cananéia) a 0,286 (Caravelas) para o locus Xkro10, de 0,500 (Atafona) a 0,905 (Cananéia) para Xkro11 e entre 0,043 (Atafona) e 0,143 (Caravelas) para Xkro13, respectivamente. As frequências dos alelos em cada população estão representadas na Tabela 4.14.

Nas comparações par a par entre populações foram observados valores significativos de F_{ST} ($p < 0,05$), sendo Caravelas e Atafona geneticamente distintas de Ubatuba e Cananéia (Figura 4.5; Tabela 4.15). Resultados similares foram encontrados por meio do método de identidade (Tabela 4.16). Além disso, o padrão observado não reflete um isolamento pela região de ressurgência. No entanto, a grande distância genética entre Cananéia e as demais localidades por ser causada pela presença de alelos nulos. Um padrão de agrupamento que não condiz com a hipótese de estruturação em função da região de ressurgência também foi encontrado pelos métodos de variância (AMOVA; Tabela 4.17). Dos três agrupamentos testados, apenas a separação de Cananéia das demais localidades foi significativa (F_{ST} e R_{ST}) e, em todos os agrupamentos, a maior parte da variação foi encontrada dentro das populações.

Tabela 4.13: Caracterização genética dos três loci de microssatélites para as quatro populações de *Xiphopenaeus* sp. I. N – Número amostral; Na – Número de alelos; Ne – Número efetivo de alelos; Ho – Heterozigosidade observada; He – Heterozigosidade esperada; F_{IS} – Coeficiente de endocruzamento; P_{HW} – Significância para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

| População | Locus | N | Na | Ne | Ho | He | F_{IS} | P_{HW} |
|-----------|--------|----|----|-------|-------|-------|-----------|----------|
| CARA | Xkro10 | 28 | 3 | 2,010 | 0,286 | 0,503 | 0.438776 | * |
| | Xkro11 | 28 | 4 | 2,583 | 0,571 | 0,613 | 0.076600 | Ns |
| | Xkro13 | 28 | 2 | 1,153 | 0,143 | 0,133 | -0.067961 | Ns |
| ATAF | Xkro10 | 28 | 3 | 1,972 | 0,250 | 0,493 | 0.499675 | ** |
| | Xkro11 | 28 | 5 | 2,462 | 0,500 | 0,594 | 0.166667 | Ns |
| | Xkro13 | 23 | 2 | 1,044 | 0,043 | 0,043 | -0.011236 | Ns |
| CANA | Xkro10 | 27 | 3 | 1,206 | 0,037 | 0,171 | 0.786720 | *** |
| | Xkro11 | 21 | 4 | 2,714 | 0,905 | 0,632 | -0.422831 | ** |
| | Xkro13 | 29 | 2 | 1,187 | 0,103 | 0,158 | 0.351044 | Ns |
| UBAT | Xkro10 | 22 | 1 | 1,046 | 0,045 | 0,044 | -0.011765 | Ns |
| | Xkro11 | 22 | 5 | 3,408 | 0,636 | 0,707 | 0.110783 | Ns |
| | Xkro13 | 22 | 2 | 1,095 | 0,091 | 0,087 | -0.036145 | Ns |

Tabela 4.14: Frequências alélicas dos três *loci* de microssatélites observadas nas quatro populações.

| Locus | Alelo | CARA | ATAF | CANA | UBAT |
|---------------|------------|-------|-------|-------|-------|
| Xkro10 | N | 28 | 28 | 27 | 22 |
| | 260 | 0,357 | 0,339 | 0,000 | 0,000 |
| | 262 | 0,607 | 0,625 | 0,074 | 0,977 |
| | 264 | 0,036 | 0,036 | 0,907 | 0,023 |
| | 266 | 0,000 | 0,000 | 0,019 | 0,000 |
| Xkro11 | N | 28 | 28 | 21 | 22 |
| | 170 | 0,286 | 0,250 | 0,429 | 0,318 |
| | 176 | 0,054 | 0,036 | 0,000 | 0,091 |
| | 182 | 0,125 | 0,125 | 0,143 | 0,091 |
| | 188 | 0,536 | 0,571 | 0,405 | 0,409 |
| | 194 | 0,000 | 0,018 | 0,024 | 0,091 |
| Xkro13 | N | 28 | 23 | 29 | 22 |
| | 160 | 0,071 | 0,022 | 0,086 | 0,045 |
| | 162 | 0,929 | 0,978 | 0,914 | 0,955 |

Tabela 4.15: Valores de F_{ST} par a par entre as populações de *Xiphopenaeus* sp. I. Os valores de F_{ST} estão abaixo da diagonal e os de R_{ST} acima (* $p < 0,0001$).

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|------|----------|----------|----------|----------|
| CARA | | -0.01593 | 0.04702 | -0.01495 |
| ATAF | -0.03155 | | 0.09155 | -0.01850 |
| CANA | 0.35460* | 0.38367* | | -0.01696 |
| UBAT | 0.10191* | 0.11220* | 0.49137* | |

Tabela 4.16: Valores de identidade genética entre populações de *Xiphopenaeus* sp. I.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------|-------|-------|-------|---|
| 1-CARA | - | | | |
| 2-ATAF | 0,998 | - | | |
| 3-CANA | 0,682 | 0,681 | - | |
| 4-UBAT | 0,930 | 0,933 | 0,612 | - |

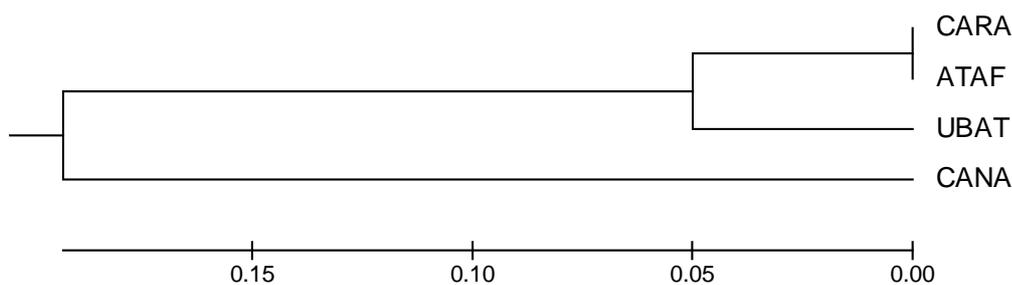


Figura 4.5: Dendrograma de UPGMA construído a partir dos valores de F_{ST} .

Tabela 4.17: Valores estruturação genética das populações de *Xiphopenaeus* sp. I obtidos a partir da AMOVA. À esquerda: valores de F_{ST} ; À direita: valores de R_{ST} . Os valores entre colchetes representam os códigos dos agrupamentos testados.

| Fonte da variação | F_{ST} | | | R_{ST} | | |
|---|------------------|-------------------|----------------------------|------------------|-------------------|----------------------------|
| | Variância | % do total | F_{ST} | Variância | % do total | R_{ST} |
| Entre Grupos [1] | 0,00464 | 0,63978 | 0,00640 | 1,80195 | 2,51826 | 0,02518 |
| Entre populações dentro dos grupos [1] | 0,17932 | 24,73682 | 0,24896* | 0,21476 | 0,30014 | 0,00308 |
| Dentro das populações [1] | 0,54094 | 74,62340 | 0,25377* | 69,53840 | 97,18160 | 0,02818 |
| Fonte da variação | Variância | % do total | F_{ST} | Variância | % do total | R_{ST} |
| Entre Grupos [2] | 0,29052 | 33,55975 | 0,33560* | 4,50658 | 6,15062 | 0,06151* |
| Entre populações dentro dos grupos [2] | 0,03422 | 3,95279 | 0,05949* | -0,77477 | -1,05742 | -0,01127 |
| Dentro das populações [2] | 0,54094 | 62,48747 | 0,37513* | 69,53840 | 94,90679 | 0,05093 |
| Fonte da variação | Variância | % do total | F_{ST} | Variância | % do total | R_{ST} |
| Entre Grupos [3] | -0,24904 | -36,23126 | -0,36231 | 0,02366 | 0,03334 | 0,00033 |
| Entre populações dentro dos grupos [3] | 0,39547 | 57,53360 | 0,42232* | 1,38376 | 1,95044 | 0,01951 |
| Dentro das populações [3] | 0,54094 | 78,69767 | 0,21302* | 69,53840 | 98,01622 | 0,01984 |

(*) $P < 0,05$

5. DISCUSSÃO

5.1. SISTEMÁTICA MOLECULAR

Xiphopenaeus sp. I provavelmente possui distribuição geográfica contínua ao longo de toda a área estudada, enquanto *Xiphopenaeus* sp. II foi observado até o momento apenas nos estados de São Paulo e Rio Grande do Norte. Esses padrões podem ser causados por diferentes tolerâncias às condições ambientais, possivelmente menores em *Xiphopenaeus* sp. II. No entanto, é possível que *Xiphopenaeus* sp. II apresente uma ampla distribuição, mas devido aos métodos de coleta empregados, esta pode não ser amostrada com tanta eficiência como *Xiphopenaeus* sp. I. Nas análises de sequências do gene COI, observou-se que a variação dentro das espécies foi baixa (0,7% - *Xiphopenaeus* sp. I; 0,2% - *Xiphopenaeus* sp. II), porém com elevada divergência entre as espécies (12% entre *Xiphopenaeus* sp. I - *Xiphopenaeus* sp. II; 11% entre *Xiphopenaeus* sp. I e *Xiphopenaeus* sp. III; 10% entre *Xiphopenaeus* sp. II e *Xiphopenaeus* sp. III). A sustentação estatística dos ramos das três espécies foi alta (100%), inclusive entre as espécies irmãs (*Xiphopenaeus* sp. III e *Xiphopenaeus* sp. II; 93%).

Lessios (2008) utilizou sequências disponíveis no *Genbank* e comparou a distância entre diversas espécies separadas pelo Istmo do Panamá, por meio de regiões nucleares e mitocondriais. Os valores de distância (K2P) encontrados para crustáceos através de COI, variaram de 4,1% a 22,6%. Entre estas, as distâncias inferiores a nove corresponderam a valores posteriores ao final do fechamento do Istmo.

Segundo Gusmão e colaboradores (2006), a origem de *Xiphopenaeus* sp. I e do ancestral comum de *Xiphopenaeus* sp. III e *Xiphopenaeus* sp. II ocorreu a partir do mesmo evento de cladogênese, há 4,5 Ma, enquanto *Xiphopenaeus* sp. III e *Xiphopenaeus* sp. II surgiram do ancestral mais recente, há 4Ma. Os resultados aqui obtidos evidenciam a grande distância genética existente entre *Xiphopenaeus* sp. I e *Xiphopenaeus* sp. II (12%). É possível que a divergência a partir da elevação do Istmo seja anterior à interrupção do fluxo marinho entre as regiões e alguns trabalhos sustentam a idéia de que o isolamento no mar, em muitos casos, pode ocorrer sem a

existência de barreiras físicas (Palumbi, 1994; Palumbi *et al.*, 1997; Barber *et al.*, 2000), mas sim ocasionado por barreiras ao fluxo gênico decorrentes de vários aspectos do comportamento e fisiologia larval (Knowlton e Weigt, 1998).

Foi observada uma grande distância genética entre as três espécies (superior a 10%), equivalente às distâncias existentes entre comparações de espécimes dos gêneros *Litopenaeus* e *Farfantepenaeus*. É possível que outras espécies mais próximas de *Xiphopenaeus* sp. II tenham existido no Atlântico e outras de *Xiphopenaeus* sp. III, no Pacífico, mas foram extintas, por conta das alterações sofridas pelo ambiente durante o soergimento do Istmo do Panamá.

Além disso, as condições abióticas encontradas no Mar do Caribe seriam próximas das existentes no Pacífico antes da interrupção do fluxo das águas (Coates e Obando, 1996; Collins, 1996), servindo como “refúgios” para várias espécies. Por meio de dados fósseis, já foi confirmado que essas modificações ambientais resultaram em uma grande extinção de moluscos (Jackson *et al.*, 1993; Marko, 2002). Porém, devido à ausência de estruturas calcificadas, dificilmente os camarões são preservados como fósseis (Ma *et al.*, 2009) e não existem informações sobre grandes extinções do grupo. É possível que outras espécies tenham sido extintas, entretanto a existência atual dessas não pode ser descartada, por conta das poucas localidades estudadas, principalmente no Pacífico.

Todos esses eventos marítimos resultaram em processos de especiação dentro do gênero *Xiphopenaeus*, contudo as características morfológicas não divergiram da mesma maneira que o conteúdo genético, impossibilitando a descrição e validação das mesmas. Apesar da aparente ausência de caracteres diagnósticos, seria indispensável o uso de dados morfológicos para a resolução da sistemática do grupo, o que em alguns casos podem apresentar polimorfismos intraespecíficos. Um exemplo disso é *X. riveti*, que, de acordo com Bouvier (1907), era diferenciado de *X. kroyeri* a partir de diferenças no número de dentes rostrais, com quatro dentes e *X. kroyeri* com cinco. No entanto, já foram observadas variações em exemplares de *Xiphopenaeus* sp. I (três e quatro dentes; Gusmão *et al.*, 2006) e recentemente nas duas espécies do Atlântico (dois a seis em *Xiphopenaeus* sp. I e de quatro a seis em *Xiphopenaeus* sp. II; Piergiorgio, dados não publicados).

Vale ressaltar que, mesmo com a grande distância genética existente entre as três espécies, as mesmas são muito similares morfológicamente. Embora o trabalho de revisão morfológica de Pérez Farfante e Kensley (1997) não justifique o porquê

da união das duas espécies em *X. kroyeri*, é possível que os autores tenham se deparado com exemplares das duas espécies do Atlântico. E, considerando as informações genéticas, a maior proximidade entre as espécies *Xiphopenaeus* sp. II do Atlântico e *Xiphopenaeus* sp. III, do Pacífico, pode estar refletida em semelhanças morfológicas entre as duas espécies, o que pode ter levado os autores a considerarem que as variações morfológicas contidas em exemplares do Atlântico tratassem de plasticidade fenotípica da espécie.

5.2. GENÉTICA DE POPULAÇÕES E DEMOGRAFIA HISTÓRICA

O gene mitocondrial COI revelou baixa variabilidade genética nas populações de *Xiphopenaeus* sp. I e *Xiphopenaeus* sp. II, porém mostrou-se útil na detecção de estruturação populacional e na elucidação de eventos demográficos em *Xiphopenaeus* sp. I. A hipótese proposta de divisão populacional dos estoques, pela barreira biogeográfica de Cabo Frio, foi sustentada através das análises de variância e PCA. Entretanto, por conta da baixa variação existente no gene COI, a análise de Φ_{ST} não foi capaz de detectar estruturação nessa região.

Os resultados obtidos na SAMOVA foram significativos a partir de cinco grupos, porém, exceto para oito grupos, todos os agrupamentos produzidos corresponderam às populações não agrupadas, formadas a partir da fragmentação de um agrupamento maior (contendo as 10 populações). Após a construção de nove grupos, as populações ao norte foram todas isoladas e apenas Cananéia e Santos foram mantidas juntas. Depois da exclusão da população de Poças, os valores da AMOVA não foram significativos para a divisão das populações em dois grupos, considerando a região de ressurgência como barreira para o fluxo gênico ($\Phi_{CT} = 0,00135$). Com o agrupamento de Ilhéus com Caravelas e de Atafona com Nova Almeida o valor de Φ_{CT} (0,20694) foi altamente significativo ($p < 0,0001$). Contudo, a significância foi reduzida após o isolamento de B. Camboriú e Ubatuba das localidades de Cananéia e Santos ($\Phi_{CT} = 0,19640$; $p < 0,001$). Apesar da redução dos valores de Φ_{CT} , os resultados de estruturação foram mantidos mesmo após a exclusão de Poças, sustentando a confiabilidade dos resultados. Entretanto, a AMOVA não detectou o mesmo padrão de estruturação.

Com os resultados de identidade genética de Nei e F_{ST} , baseados em análises de microssatélites de quatro localidades (Caravelas, Atafona, Ubatuba e

Camboriú), verificou-se que as localidades de Caravelas e Atafona são mais próximas entre si, apresentando identidade genética de $I=0,998$. Esse resultado está de acordo com os obtidos pela PCA, a partir de sequências de COI, em que foram observados três agrupamentos: um que compreendeu o grupo formado por populações abaixo da região de Cabo Frio, um formado por localidades da Bahia (Ilhéus e Caravelas) e o terceiro por populações ao norte da região Sudeste (Nova Almeida e Atafona). O padrão observado condiz com a distância existente entre as localidades e a proximidade genética de Ubatuba com Caravelas e Atafona pode estar relacionada com a não amostragem das populações mais próximas geneticamente. A baixa variabilidade encontrada em COI pode ser decorrente do grande esforço de pesca exercido sobre o recurso pesqueiro nas últimas décadas ou de um gargalo populacional ocorrido na última glaciação, antes da expansão demográfica observada.

Os resultados encontrados por Gusmão e colaboradores (2006), utilizando isoenzimas indicaram que *Xiphopenaeus* sp. I é geneticamente estruturada ao longo da costa. Valores significativos de F_{ST} foram observados entre Nova Almeida e Cabo Frio, entre Nova Almeida e Poças (BA), entre Poças e Ubatuba e entre Cabo Frio e Ubatuba. Recentemente, através de morfometria geométrica, já foram observadas variações na curvatura do rosto em populações de *Xiphopenaeus* sp. I. Os autores concluíram que as populações de Nova Almeida, Atafona, Ubatuba e Balneário Camboriú são estruturadas e, provavelmente, correspondem a diferentes estoques pesqueiros (Gusmão *et al.*, 2013).

Em relação a marcadores moleculares microsatélites, Francisco (2009) não observou qualquer tipo de estruturação genética espacial para *Xiphopenaeus* sp. I em sete localidades ao sul de Nova Almeida ($F_{ST} = 0,000$). A autora associou as flutuações sazonais ocorridas na região de ressurgência com a ausência de diferenciação populacional, pois durante o inverno o evento perde intensidade e possibilita a migração.

De forma similar, Gusmão e colaboradores (2005), empregando marcadores isoenzimáticos, não observaram estruturação para *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Litopenaeus schmitti* ao longo da costa brasileira. Contudo, *F. paulensis* apresentou estruturação, sendo as localidades Rio de Janeiro e Santos geneticamente distintas de Lagoa dos Patos. Além disso, *Farfantepenaeus* sp. foi altamente estruturada ao longo da costa.

Vários outros trabalhos utilizaram genes mitocondriais e microsatélites para estudos populacionais em camarões, demonstrando que o DNA é útil para a datação de eventos de expansão e as regiões repetitivas para a detecção de estruturação:

Chu e colaboradores (2012) estudaram sequências de RCM (Região Controle Mitocondrial) de populações de *Metapenaeopsis* sp. na costa chinesa e Taiwan. Os autores encontraram estruturação genética e dois clados significativos. Em relação às análises demográficas, apenas os clados separados geraram distribuições unimodais na *mismatch distribution*. A datação foi calculada 13,8-22,4 para o clado I e 26,8-39,1 mil anos para o II.

Através da RCM, Mcmillen-Jackson e Bert (2004) não observaram estruturação populacional para *Farfantepenaeus duorarum* coletados no Golfo do México. Entretanto, o marcador foi capaz de detectar sinais de expansão populacional, datada em 36 mil anos. Em um outro trabalho das autoras (Mcmillen-Jackson e Bert, 2003) foram observados padrões de expansões para *Farfantepenaeus aztecus* e *Litopenaeus setiferus*, datadas para a última era glacial.

Já em *Feneropenaeus chinensis*, Li e colaboradores (2009), utilizando o gene mitocondrial COI, não detectaram estruturação genética. Apesar disso, as análises demográficas indicaram expansão populacional, coincidindo com a última glaciação. Porém, Russ e colaboradores (2010) observaram estruturação ao utilizar o gene COI para estudos populacionais de *Metabetaeus lohena*, nas ilhas havainas. Foram encontrados 43 haplótipos, 41 sítios variáveis e evidências de expansão populacional.

Com o gênero *Penaeus* (*Penaeus monodon*), You e colaboradores (2008), que utilizaram nove loci de microsatélites e detectaram estruturação populacional no Indo-Pacífico. Em outro trabalho, feito por Premruethai Supungul e colaboradores (2000), foi apresentado resultados de estruturação em populações dessa espécie na Tailândia, por meio de cinco loci de microsatélites.

Em relação ao presente estudo, os resultados de estruturação encontrados com o gene COI condizem com os encontrados por Maggioni e colaboradores (2003) para *Litopenaeus schmitti*, por meio de marcadores microsatélites. Os autores observaram um padrão de estruturação norte-sul, que coincide com a barreira biogeográfica de Cabo Frio (23°S). Além disso, atribuíram a ressurgência nessa região como uma possível limitação para a dispersão de *L. schmitti*.

Em analogia ao número de alelos observados por Francisco (2009) foram observados dois novos alelos para o locus Xkro10, nas localidades de Cananéia, Camboriú, Atafona e Caravelas. O locus Xkro11 apresentou cinco dos sete alelos já amostrados, sendo 170 e 188 pb os mais frequentes. Apesar de serem citados três alelos para o locus, a autora descreve apenas dois (166 e 168 pb). No presente estudo, foram observados apenas dois alelos (160 e 162 pb) que diferem em relação aos valores de heterozigosidade observadas (H_o) encontrados por Francisco (2009).

A rede de haplótipos produzida para *Xiphopenaeus* sp. I com base em sequências COI possui topologia em estrela, porém, apenas Ubatuba e B. Camboriú apresentaram indícios de expansão. No entanto, como não foram observadas estruturas populacionais para nenhuma das localidades abaixo da região de Cabo Frio, todas as populações da região foram agrupadas. A expansão foi sugerida através dos seguintes resultados: (1) a topologia da rede em forma de estrela; (2) os desvios significativos para os testes neutralidade; (3) os valores de θ antes e após a expansão; (4) a distribuição unimodal encontrada na *mismatch distribution*.

Considerando os dados gerados neste estudo e as informações disponíveis na literatura sobre a estruturação de *Xiphopenaeus* sp. I (Voloch, 2005; Gusmão *et al.*, 2006; Francisco, 2009; Tavares *et al.*, 2013), obteve-se a distribuição consensual da espécie. Foram observados oito pontos de estruturação ao longo da costa: três ao sul (Camboriú; Santos e Cananéia; Ubatuba), dois pontos no sudeste, acima da região de ressurgência (Atafona; Nova Almeida), dois na Bahia (Caravelas e Ilhéus; Poças) e um que corresponde à população da Venezuela. Esses dados suportam o isolamento das populações próximas à região de Cabo Frio e sugere os outros isolamentos, possivelmente, por conta de aportes de água doce entre essas regiões. Segundo Branco e colaboradores (1999), a abundância da espécie está relacionada com as variações de temperatura e salinidade, o que pode variar em regiões próximas a rios. Entretanto, essas flutuações podem refletir padrões do aporte continental, o verdadeiro fator responsável pelas mudanças na abundância do camarão sete-barbas (Dias Neto, 2011).

Em relação à população da Venezuela, além de ser mais distante geograficamente das demais, está restrita a uma outra corrente marinha (CCNB), ao norte do delta do Amazonas, e está contida em uma das ecorregião de Spalding e colaboradores (66 - sul do Caribe). Apesar dessas ecorregiões permitirem algumas correlações com os dados obtidos, por exemplo as regiões 180 e 76, não foi possível

relacionar a estruturação da genética das populações Atafona, Nova Almeida e Caravelas e Ilhéus com nenhuma das ecorregiões.

Todos os resultados demográficos apontam que *Xiphopenaeus* sp. I sofreu contração populacional seguida de expansão, nas localidades abaixo de Cabo Frio. Os valores da datação coincidem com o início e término da última glaciação, no qual é possível que a espécie tenha passado por redução populacional e geográfica. Essa diminuição pode estar relacionada com a perda de ambientes favoráveis e ocupação de regiões com condições ambientais propícias (refúgios). Alguns trabalhos com organismos marinhos sustentam a hipótese da existência de refúgios durante as glaciações (Kettle *et al.*, 2011; Panova *et al.*, 2011). Populações que possuem elevada variabilidade genética estão menos sujeitas às perturbações decorrentes de mudanças ambientais, porém o Brasil ainda não faz uso de informações genéticas para auxiliar na elaboração dos períodos de defeso. Até o momento, para fins de conservação, a existência de um complexo críptico para o gênero *Xiphopenaeus* ainda é completamente ignorada.

O reconhecimento dessas espécies crípticas permite a associação entre padrões bimodais de distribuição com a existência de mais de uma espécie em certas localidades. Por exemplo, alguns estudos ecológicos encontraram dois picos reprodutivos para o camarão sete-barbas em Ubatuba (Nakagaki e Negreiros-Franozo, 1998; Castro *et al.*, 2005). Tais picos podem estar relacionados à reprodução das duas espécies (Piergiorgio, 2010), e, caso reflitam isso, o período de defeso estaria protegendo somente uma delas, pois a proteção se restringe apenas à captura da espécie durante o outono (1 Março – 31 Maio), permitindo a captura dos espécimes durante a primavera. De forma similar, Santos e Magalhães (2001) encontraram dois picos reprodutivos em *F. subtilis* ao sul da Bahia, espécie que possui dois morfotipos conhecidos que foram identificados como duas espécies crípticas com base em estudos moleculares (Gusmão *et al.*, 2000).

Além disso, em todos os trabalhos que realizaram identificação molecular das espécies crípticas do gênero *Xiphopenaeus*, a maioria dos espécimes identificados corresponderam a *Xiphopenaeus* sp. I (Gusmão *et al.* 2006; Francisco, 2009; Piergiorgio, 2010). A menor frequência de *Xiphopenaeus* sp. II nas amostragens pode refletir o tamanho populacional da espécie, mas não pode ser descartada a possibilidade desses espécimes apresentarem um hábito de vida diferente de *Xiphopenaeus* sp. I, o que dificulta sua amostragem (i.e. modificação do padrão de

fORAGEAMENTO POR CONTA DA TURBIDEZ DA ÁGUA; NATIVIDADE, 2006). Contudo, caso a espécie seja realmente “rara”, é possível que a exploração indiscriminada do recurso diminua a variabilidade genética e, conseqüentemente, leve a depleção do estoque pesqueiro, e a extinção da espécie.

6. CONCLUSÕES

- Apesar de resultar em ampliações, os três íntrons dos genes selecionados não foram polimórficos para *Xiphopenaeus* spp..
- As medidas de diversidades genética encontradas em *Xiphopenaeus* sp. I foram baixas, coincidindo com as encontradas em espécies que sofreram expansão populacional recente.
- As análises demográficas mostraram que *Xiphopenaeus* sp. I sofreu duas expansões populacionais (demográfica e geográfica), datadas em 99,57 e 10,95 mil, respectivamente. Provavelmente essas datações refletem mudanças ambientais decorrentes da última glaciação.
- Apenas as análises de variância e componente principal resultaram em padrões de estruturação populacional para as populações de *Xiphopenaeus* sp I. O padrão de estruturação encontrado coincide com a localização da barreira biogeográfica de Cabo Frio. Já os marcadores microssatélites, além de polimórficos, permitiram a identificação de três populações, uma acima de Cabo Frio (Caravelas + Atafona) e duas abaixo (Cananéia; Ubatuba). Considerando todos os dados disponíveis sobre *Xiphopenaeus* sp I, foram observadas oito populações ao longo da costa.
- A distribuição geográfica encontrada para as duas espécies corrobora resultados anteriores. *Xiphopenaeus* sp. I é encontrado em todas as localidades já estudadas, sendo seus extremos conhecidos de distribuição geográfica: Balneário Camboriú/SC e Venezuela. Já para *Xiphopenaeus* sp. II, a espécie foi apenas observada em São Paulo (Cananéia e Ubatuba) e em Natal/RN, mas a possibilidade de ocorrência em outras localidades não deve ser descartada.

7. REFERÊNCIAS

Baldwin JD, Bass AL, Bowen BW, Clark Jr WH. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp genus *Penaeus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10:399–407. 1998.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48. 1999.

Barber PH, Palumbi SR, Erdmann MV, Moosa MK. A marine wallace's line? *Nature*, 406: 692-693. 2000.

Begg GA, WALDMAN JR. An holistic approach to fish stock identification. *Fisheries Research*, 43: 35–44. 1999.

Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PK, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22, 148–155. 2007.

Bierne N, Lehnert SA, Bédier E, Bonhomme F, Moore SS. Screening for intron-length polymorphism in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR. *Molecular Ecology*, 9: 233-235. 2000.

Bonferroni CE. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilit `a. Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze 8, 3-62. 1936.

Boschi EE. Estudio biológico pesquero del camarón *Artemesia longinaris* Bate de Mar del Plata. *Boletín del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero* 18, 1–47. 1969.

Bouvier EL. Crustacés Décapodes nouveaux recueillis a Paita (Perú) par M. le Dr. Rivet. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle*. Paris 13:113-116. 1907.

Branco, JO. Biologia do *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda: Penaeidae), Análise da Fauna Acompanhante e das Aves Marinhas Relacionadas a sua Pesca, na Região De Penha, Sc - Brasil. Tese de Doutorado. UFSCar. São Carlos/SP, 1999.

Branco JO, Lunardon-Branco Mj, Souto Fx, Guerra CR. Estrutura populacional do Camarão Sete-Barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862), na Foz do Rio Itajaí-Açu, Itajaí, SC, Brasil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 1999, vol.42, n.1. [acesso em: 12/03/13]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89131999000100016&lng=en&nrm=iso.

Branco JO. Biologia e Pesca do Camarão Sete-Barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) (Crustacea, Penaeidae) na Armação do Itapocoroy, Penha SC. Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, v. 22, nº 4, p. 1050-1062. 2005.

Caccone A, Gentile G, Burns CE, Sezzi E, Bergman W, Ruelle M, Saltonstall K, Powell JR. Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galápagos tortoises. Mol Phylogenet Evol. 2004 May;31(2):794-798.

Castro, RH. Padrões distribucionais do camarão *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) na enseada de Ubatuba, SP. 143 p. Tese de Mestrado. UNESP. Botucatu-SP. 1997.

Castro RH, Costa RC, Fransozo A, Mantelatto FLM. Population structure of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) Crustacea: Penaeoidea in the littoral of São Paulo, Brasil. Scientia Marina, Barcelona, 69(1): 105 -112. 2005.

CEPSUL. Pesca de arrasto. [acesso em: 12/03/13]. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/artes_de_pesca/artesanal/arrasto/arrasto_duplo.pdf

Clement M, Posada D Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology 9 (10): 1657-1660. 2000.

Coates AG, Obando JA. The geologic evolution of the Central American isthmus. Pp. 21–56 in J. B. C. JACKSON, A.F. BUDD, and A. G. COATES, eds. Evolution and environment in tropical America. University of Chicago Press, Chicago. 1996.

Collins TM. Molecular comparisons of transisthmian species pairs: rates and patterns of evolution. Pp. 303–334 in J. B. C. Jackson, A.F. Budd, and A. G. Coates, eds. Evolution and environment in tropical America. University of Chicago Press, Chicago. 1996.

Costa RC, Fransozo A, Melo GAS, Freire FAM. Chave ilustrada para a identificação dos camarões Dendrobranchiata do litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil. Biota Neotropica, São Paulo, 3(1): 1-12. 2003.

Costa RC, Fransozo A, Freire FAM, Castilho AL. Abundance and ecological distribution of the “sete-barbas” shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda: Penaeoidea) in three bays of the Ubatuba region, Southeastern, Brazil. Gulf and Caribbean Research, v. 19. 33-41. 2007.

Chu, TJ, Wang D, Huang HL, Lin FJ, Tzeng TD. Population Structure and Historical Demography of the Whiskered Velvet Shrimp (*Metapenaeopsis barbata*) off China and Taiwan Inferred from the Mitochondrial Control Region. Zoological Studies 51(1): 99-107. 2012.

Cristescu, MEA, Hebert PDN. Phylogeny and adaptive radiation in the Onychopoda (Crustacea: Cladocera): evidence from multiple gene sequences. J. Evol. Biol. 15: 838-849. 2002.

Dall W, Hill BJ, Rothlisberg PC, Staples DJ. The biology of the penaeidae. *Advances in Marine Biology*, 27. London: Academic Press. 489p. 1990.

Dawson MN, Jacobs DK. Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *The Biological bulletin*. 200(1), 92-6. 2001.

Dias Neto J, Dornelles LDC. Diagnóstico da pesca marítima do Brasil. IBAMA, Brasília, Serie Estudos Pesca. 1996.

Dias Neto J, Charvet P, Amorim AF, Rodrigues AMT, Castro ALF, Arfelli CA, Vooren CM, Motta F, Santana FM, Rincon G, Pereira HL, Kotas JE, Lima JHM, Soto JMR, Furtado Neto, MAA, Gonzalez MMB, Oddone MC, Araújo MLG, Almeida MP, Peres MB, Gadig OBF, Schwingel PR, Rosa RS, Lessa R, Klippel S, Montealegre-Quijano S, Faria VV. Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável de elasmobrânquios sobre-explotados ou ameaçados de sobre-explotação no Brasil (Série Plano de Gestão Recursos Pesqueiros). Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. 156. 2011.

Dieringer D, Schlötterer C. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3 (1), 167-169. 2003.

D'Incao F, Valentini H, Rodrigues, LF. Avaliação da pesca de camarões nas regiões Sudeste e Sul do Brasil de 1965-99. *Atlântica* 24: 103-116. 2002.

Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11(12):2571-81. 2002.

DeWoody JA, Avise JC. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56, 461-473. 2000.

Excoffier L, Smouse PE. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony *Genetics* 136 (1), 343-359. 1994.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491. 1992.

Excoffier L, Smouse P. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene genealogies within a species. *Molecular variance parsimony*. *Genetics* 136, 343-59. 1994.

Excoffier L. Analysis of population subdivision, p. 271-307. In: Balding, D.J., Bishop, M., and Cannings, C., eds. *Handbook of statistical genetics*. Chichester (UK): John Wiley & Sons. 2001.

Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567. 2010.

FAO. Fishstat Plus 2.30: Universal software for fishery statistical time series. Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. 2010.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791. 1985.

Ferreira ME, Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília; EMBRAPA-CERNAGEN. 1996.

Forster P, Harding R, Torroni A, Bandelt HJ. Origin and Evolution of Native American mtDNA Variation: A reappraisal. *American Journal of Human Genetics* 59:935-945. 1996.

France SC, Tachino N, Duda TF Jr, Shleser RA, Palumbi SR. Intraspecific genetic diversity in the marine shrimp *Penaeus vannamei*: multiple polymorphic elongation factor 1-alpha loci revealed by intron sequencing. *Marine Biotechnology*, 1, 262–268. 1999.

Francisco AK. Caracterização genética populacional do camarão marinho *Xiphopenaeus kroyeri* no litoral sudeste-sul do Brasil. Tese de Doutorado. UFSCar. São Carlos/SP. 2009.

Francisco AK, Pinheiro AP, Silva, TB, Galetti PM. Isolation and characterization of microsatellites in three overexploited penaeid shrimp species along the Brazilian coastline. *Conservation Genetics*, 10: 563–566. 2009.

Freitas PD, Jesus CM, Galetti PM. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and cross-species amplification in other penaeid species. *Molecular Ecology Notes*, 7: 324–326. 2007.

Fu XY, Li WH . Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*133: 693–709. 1993.

Fu XY. Statistical properties of segregating sites. *Theoretical Population Biology*, 48:172-197. 1995.

Fu YX. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925. 1997.

Góes ACS; Silva da; Domingues CS; Marreiro Sobrinho, J, Carvalho EF. Identification of a criminal by DNA typing in a rape case in Rio de Janeiro, Brazil. *São Paulo Medical Journal*, São Paulo, v. 120, n.3, p. 77-80. 2002.

Goldstein DB, Ruiz Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6723-6727. 1995.

Goldstein DB, Schlötterer C. *Microsatellites Evolution and Applications*. Oxford University Press. Oxford. 1999.

Gusmão J, Lazoski C and Solé-Cava AM. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. *Mar Biol* 137:435-446. 2000.

Gusmão J, Solé-Cava AM. Um sistema de diagnóstico molecular para a identificação de espécies comerciais de camarões marinhos brasileiros. In: Blas I (ed) CIVA 2002: Comunicaciones y Foros de Discusión. Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. (<http://www.civa2002.org>). Zaragoza, pp 754-764. 2002.

Gusmão J, Lazoski C, Solé-Cava AM. Population genetic structure of Brazilian shrimp species (*Farfantepenaeus* sp., *F. brasiliensis*, *F. paulensis* and *Litopenaeus schmitti*: Decapoda: Penaeidae). *Genetics and Molecular Biology*, 28: 165-171. 2005.

Gusmão J, Lazoski C, Monteiro F, Solé-Cava AM. Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. *Marine Biology* (2006) 149: 491–502. 2006.

Gusmão J, Piergiorgio RM, Tavares C. The Contribution of Genetics in the Study of the Sea-Bob Shrimp Populations from the Brazilian Coast. *Boletim do Instituto de Pesca (Impresso)*. 2013.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. Ser. 41:95-98. 1999.

Heller C. Beiträge zur näharen Kenntnis der Macruoren. *Sitzungsberichte der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Classe der kaiserliche Akademie der Wissenschaften Wien* 45:389-426, plates 1-2. 1862.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JMJ, Daniel H, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the semitropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS* 101(41): 14812-14817. 2004.

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B*. 270: 596-599. 2003.

Heckler GL. Distribuição Ecológica e Dinâmica Populacional do Camarão Sete-Barbas *Xiphopenaeus Kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea: Decapoda) no Complexo Baía/Estuário de Santos e São Vicente, SP-UNESP-Mestrado-Botucatu. 2010.

Hilborn R, Walters CJ. Quantitative Fisheries Stock Assessment: Choice, Dynamics and Uncertainty. Chapman and Hall, New York. 570 p. 1992.

Hudson RR. Gene genealogies and the coalescent proces, Oxford Surveys in Evolutionary Biology, edited by Futuyama, and J. D. Antonovics. Oxford University Press, New York. 1-44. 1990.

Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC) of UNESCO. The Ocean Biogeographic Information System. Web. [acesso em: 12/03/13]. Disponível em: <http://www.iobis.org>.

Jackson JBC, Jung P, Coates AG, Collins LS. Diversity and extinction of tropical American mollusks and emergence of the Isthmus of Panama. *Science* 260:1624–1626. 1993.

Kettle AJ, Morales-Muniz A, Rosello-Izquierdo E, Heinrich D, Vøllestad LA. Refugia of marine fish in the northeast Atlantic during the last glacial maximum: concordant assessment from archaeozoology and palaeotemperature reconstructions. *Climate of the Past*, 7, 181–201. 2011.

Kimura M. Evolutionary Rate at the Molecular Level. *Nature* 217, 624 – 626. 1968.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.1980.

Knowlton N. "Sibling Species in the Sea". *Annual Review of Ecology and Systematics* 24 (1): 189–216.1993.

Knowlton N, Weigt LA. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceeding of Royal Society of London*. 265, 2257-2263. 1998.

Koenemann S, Jenner RA, Hoenemann M, Stemme T, Von Reumont BM. Arthropod phylogeny revisited, with a focus on crustacean relationships. *Arthropod Struct Dev*. 39:88-110. 2010.

Laurenzano C, Farias NE, Schubart CD. Mitochondrial genetic structure of two populations of *Uca uruguayensis* fails to reveal an impact of the Rio de la Plata on gene flow. *Nauplius* 20(1):15-25. 2012.

Lee C, Attig JW, Mickelson DM, Johnson MD, Syverson KM. "Glaciation of Wisconsin". Dept. Geology, University of Wisconsin. 2006.

Lessios HA. Testing electrophoretic data for agreement with Hardy-Weinberg expectations. *Mar. Biol.* 112: 517-523. 1992.

Lessios HA. The Great American Schism: Divergence of marine organisms after the rise of the Central American Isthmus Annual Reviews of Ecology Evolution and Systematics 39 63–91. 2008.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol. Ecol. 11:2453-2465. 2002.

Li YL, Kong XY, Yu ZN, Kong J, MS, Chen LM. Genetic diversity and historical demography of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in Yellow Sea and Bohai Sea based on mitochondrial DNA analysis. Afr. J. Biotechnol. (7): 1193-1202. 2009.

Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am J. Human Genet. 44:397-401. 1989.

Lopez JV, Yuhki N, Masuda R, Modi W, O'Brien SJ. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. Journal of Molecular Evolution 39: 174-190. 1994.

Ma KY, Chan TY, Chu KH. Phylogeny of penaeoid shrimps (Decapoda: Penaeoidea) inferred from nuclear protein-coding genes. Molecular Phylogenetics and Evolution 53 45–55. 2009.

Maddison WP, Maddison DR. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>. 2011.

Maggioni R, Rogers AD, Maclean N, D'incao F. Molecular phylogeny of western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* shrimp based on mitochondrial 16S partial sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18: 66-73. 2001.

Maggioni R, Rogers AD, Maclean N. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda, Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. Mol Ecol 12:3213-3217. 2003.

Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res 27: 209–220. 1967.

Marko PB. Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the Isthmus of Panama. Molecular Biology & Evolution 19: 2005-2021. 2002.

Mayr E. What is a species, and what is not? Philosophy of Science 63 (June): 262–277. 1996.

McMillen-Jackson AL, Bert TM. Disparate patterns of population genetic structure and population history in two sympatric penaeid shrimp species (*Farfantepenaeus aztecus* and *Litopenaeus setiferus*) in the eastern United States. Molecular Ecology, 12, 2895–2905. 2003.

McMillen-Jackson AL, Bert TM. Genetic Diversity in the mtDNA Control Region and Population Structure in the Pink Shrimp *Farfantepenaeus duorarum*. *Journal of Crustacean Biology*, 24(1): 101-109. 2004.

Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração. Instrução Normativa Nº 5 de 21 de Maio de 2004.

Moreira da Silva PC. Upwelling and its biological effects in southern Brazil. In: Costlow Jr. JD, ed. *Fertility of the sea*. New York: Gordon & Breach. pp 469–474. 1971.

Mota-Alves MI, Rodrigues MM. Aspectos da reprodução do camarão-sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) (Decapoda, Macrura), na costa do Estado do Ceará. *Arq. Ciênc. Mar.*, 17(1):29-35. 1977.

Nagakaki JM, Negreiros-Fransozo ML. Population biology of *Xiphopenaeus kroyeri* (Decapoda: Penaeidae) from Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *Journal of Shellfish Research, Maine*, 17 (4): 931-935. 1998.

Natividade CD. Estrutura populacional e distribuição do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda: Penaeidae) no litoral do Paraná, Brasil. 2006.

Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press: New York. 1987.

Neiva G, Wise JP. *Biologia e pesca do camarão sete-barbas da Baía de Santos, Brasil*. Ver. Nac. Pesca, São Paulo, v. 1, p. 13-19. 1963.

Ovenden JR. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 41: 835-853. 1990.

Paiva MP. Tentativa de avaliação dos recursos pesqueiros do Nordeste brasileiro. *Arq. Ciênc. Mar.* 1971.

Paiva MP. *Administração Pesqueira no Brasil*. Interciência. 2004.

Palumbi SR, Benzie J. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1, pp. 27–34. 1991.

Palumbi SR. Genetic Divergence, Reproductive Isolation, and Marine Speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 547-572. 1994.

Palumbi SR Baker CS. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution* 11(3): 426-435. 1994.

Palumbi SR. Using genetics as an indirect estimator of larval dispersal. In Larval Ecology, L. McEdward, Ed. CRC Press. 1995.

Palumbi SR, Grabowsky G, Duda T, Tachino N, Geyer L. Speciation and the evolution of population structure in tropical Pacific sea urchins. *Evolution* 51: 1506-1517. 1997.

Panova M, Blakeslee AMH, Miller AW, Mäkinen T, Ruiz GM, Johannesson K, André C. Glacial History of the North Atlantic Marine Snail, *Littorina saxatilis*, Inferred from Distribution of Mitochondrial DNA Lineages. *PLoS ONE* 6(3): e17511. doi:10.1371/journal.pone.001751. 2011.

Peakall R, Smouse PE. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539. 2012.

Peregrino-Uriarte AB, Varela-Romero A, Muhlia-Almazána A, Anduro-Corona I, Vega-Heredia S, Gutiérrez-Millán LE, Rosa-Vélez JDL, Yepiz-Plascencia G. The complete mitochondrial genomes of the yellowleg shrimp *Farfantepenaeus californiensis* and the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Crustacea: Decapoda). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. Mar;4(1):45-53. 2009.

Pérez-Farfante I. Illustrated key to penaeoid shrimp of commerce in the Americas. NOAA Technical Report. Department of Commerce. National Oceanic and Atmospheric Administration. National Marine Fisheries Service, p. 32. 1988.

Pérez-Farfante I, Kensley B. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Mem Mus Nat Hist Natur Paris* 175:1-79. 1997.

Polzin T, Daneschmand SV. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31:12-20. 2003.

Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256. 2008.

Piergiorgio, R.M. Estudo da amplitude de distribuição das espécies crípticas do camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) no Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil através de identificação molecular via PCR/RFLP do gene mitocondrial COI. Monografia. UERJ. Rio de Janeiro/RJ. 2010.

Rodrigues ES, Pita JB, Graça-Lopes R, Coelho JA, Puzzi A. Aspectos biológicos e pesqueiros do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) capturados pela pesca artesanal no litoral do Estado de São Paulo. *Bol. Inst. Pesca*, 19:67-81. 1993.

Rogers AR, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552-569. 1992.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497. 2003.

Russ A, Santos SR, Muir C. Genetic population structure of an anchialine shrimp, *Metabetaeus lohena* (Crustacea: Alpheidae), in the Hawaiian Islands. *Revista de Biología Tropical*, 58, 159–170. 2010.

Santos MCF, Magalhães JAD. Recrutamento do camarão rosa, *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967) (Crustácea: Decapoda: Penaeidae), no litoral sul do estado da Bahia – Brasil. *Bol. Téc. Cient. CEPENE, Tamandaré*, v. 9, n.1, p. 73-85. 2001.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425. 1987.

Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, v.18, p.233-234. 2000.

Silva ACCD, Castilhos JC, Santos EAP, Brondízio LS, Bugoni L. Efforts to reduce sea turtle bycatch in the shrimp fishery in Northeastern Brazil through a co-management process. *Ocean and Coastal Management*, 53: 570-576. 2010.

Silva HD. Aspectos Biométricos na detecção de QTLs (“Quantitative Trait Loci”) em espécies cultivadas. Tese de Doutorado. USP. São Paulo/SP. 2001.

Slatkin M, Maddison WP. A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogeny of alleles. *Genetics* 123: 603-613. 1989.

Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462. 1995.

Smith S. Notice of the Crustacea collected by Prof. C.F.Hartt on the coast of Brazil in 1867. *Trans Conn Acad Sci* 2:1–42. 1869.

Spalding MD, Fox HE, Allen GR, Davidson N, Ferdaña ZA, Finlayson M, Halpern BS, Jorge MA, Lombana A, Lourie SA, Martin KD, McManus E, Molnar J, Recchia CA, Robertson J. Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience* 57 (7): 573-583. 2007.

Souza KM. Avaliação da política pública do defeso e análise socioeconômica dos pescadores de camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) do Perequê, Guarujá, São Paulo, Brasil. 2008.

Supungul P, Sootanan P, Klinbunga S, Kamonrat W, Jar-ayabhand P, Tassanakajon A. Microsatellite poly-morphism and the population structure of the black tigershrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Marine Biotechnology* ,2, 339–347. 2000.

Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595. 1989.

Tajima F. Measurement of DNA polymorphism. In: *Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology*, edited by Takahata, N. and Clark, A.G., Tokyo, Sunderland, MA: Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc., p. 37-59. 1993.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739. 2011.

Tajima F. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597–601. 1989.

Teske PR, Beheregaray LB. Intron-spanning *primers* for the amplification of the nuclear ANT gene in decapod crustaceans. *Molecular Ecology Resources* 9:774-776. 2009.

Touriya A, Rami M, Cattaneo-Berrebi G, Ibanez C, Augros S, Boissin E, Dakkak A, Berrebi P. *Primers* for EPIC amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies. *Biotechniques*. October; 35(4): 676-8, 680, 682. 2003.

Valentini H, D'incao F, Rodrigues LF, Neto JER, Domit LG. Análise da pesca do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. *Atlântica*, Rio Grande, 13(1): 171-177. 1991.

Voloch CM, Solé-Cava AM. Genetic structure of the sea-bob shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri* Heller, 1862; Decapoda, Penaeidae) along the Brazilian southeastern coast. *Genetics and Molecular Biology*, São Paulo, 28(2): 254-257. 2005.

Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *The American Journal of Human Genetics*. Mar;44(3):388–396. 1989.

Williams AB. Marine Decapod Crustacean of the Carolinas. *Fishery Bulletin* 65 (1): 1-298. 1965.

Wright S. The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics* 15: C323-C354. 1950.

You EM, Chiu TS, Liu KF, Tassanakajon A, Klinbunga S. *et al.* Microsatellite and mitochondrial haplotype diversity reveals population differentiation in the tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Indo-Pacific region. *Animal Genetics*, 39: 267-277. 2008.