

Rodolfo Corrêa de Barros

Dispersão Global e Filogeografia de *Styela plicata* (Leseuer, 1823)
(Tunicata, Ascidiacea)

Curitiba
2007

Rodolfo Corrêa de Barros

Dispersão Global e Filogeografia de *Styela plicata* (Leseuer, 1823)
(Tunicata, Ascidiacea)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr^a Rosana Moreira da Rocha

Curitiba
2007

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Barros, Rodolfo Corrêa de
Dispersão global e filogeografia de *Styela plicata* (Leseuer, 1823)
(Tunicata, Ascidiacea)/ Rodolfo Corrêa de Barros . – Curitiba, 2007.
vii; 42f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Rosana Moreira da Rocha

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Filogeografia 2. Bioinvasão marinha 3. Morfometria I. Título II.
Rocha, Rosana Moreira da, 1962- III. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas.

CDD(20.ed.) 596.2

Dispersão Global e Filogeografia de *Styela plicata* (Leseuer, 1823)
(Tunicata, Ascidiacea)

por

Rodolfo Corrêa de Barros

Dissertação aprovada em 07 de março de 2007, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores


Dra. Rosana Moreira da Rocha – UFPR
Orientadora


Dr. Antônio Mateo Sole Cava - UFRJ


Dr. Walter Antonio Pereira Boeger – UFPR

Agradecimentos

Agradecer é uma forma de reconhecer que, sem ajuda, este trabalho não seria possível. Por isso, gostaria de dizer que sou imensamente grato a todos que colaboraram de alguma forma para que ele se concretizasse.

Agradeço à professora Rosana Moreira da Rocha pela preciosa orientação. Seu conhecimento, sua dedicação à pesquisa e ao ensino e suas palavras foram estímulo e força durante esses dois anos.

Ao Programa de Pós-graduação em Zoologia e ao Departamento de Zoologia por propiciarem a realização deste trabalho através de infra-estrutura e de recursos materiais.

Aos pesquisadores Flávia de Oliveira Marins (Universidade Federal do Rio de Janeiro), Shota Chiba (University of California), Kristen Larson (Smithsonian Environmental Research Center, Flórida) e Teruaki Nishikawa (Nagoya University, Japão) pela fundamental colaboração no envio de amostras.

A James Roper pelo inestimável auxílio com as análises estatísticas.

Ao professor Walter Boeger, que permitindo a utilização de seu laboratório (Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva - LEMPE), cedendo recursos e compartilhando seus conhecimentos foi um legítimo co-orientador e um grande exemplo.

Aos colegas de mestrado pelas discussões acadêmicas e pela troca de experiências.

À equipe do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Ascidiacea, Laura, Mariah, Nádia e Rafael pela acolhida e pela paciência.

A todos da equipe do LEMPE mas, especialmente à Luciana, Letícia, Marlus, José, Rogério e Márcio, por agüentaram as minhas interrupções e infinitas perguntas.

Aos professores Emanuel Maltempi de Souza (Departamento de Bioquímica) e Roseli Wassem (Departamento de Genética) pela atenção dispendida e pelo empréstimo de reagentes.

Ao professor Roberto Pontarolo (Departamento de Farmácia) pela cessão de reagentes analíticos.

Agradeço principalmente à minha família, pela presença ao meu lado na alegria e na tristeza e pela compreensão na ausência e no cansaço. Obrigado Waleska e Maria Vitória. Amo vocês.

Obrigado mãe, obrigado pai. Sem o exemplo de luta de vocês, nada disso seria possível!

**SONRÍE, ES GRATIS
Y ALIVIA EL DOLOR
DE CABEZA**



SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	01
MATERIAL E MÉTODOS	06
Coleta dos exemplares	06
Morfometria	07
Extração do DNA e seqüenciamento	09
Análise dos dados	12
Dados morfométricos	12
Dados moleculares	12
RESULTADOS	14
Análise morfométrica	14
Sistemática molecular	18
Variação das seqüências	18
Relações filogenéticas	19
Rede de haplótipos e “Nested Clade Analysis”	21
Genética de populações	23
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	24
Morfometria	24
Dispersão global	27
Especiação críptica	32
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE	43

Resumo

Styela plicata é uma ascídia solitária encontrada em ambientes protegidos, de águas rasas, nos mares tropicais e temperados-quentes. Sua origem é incerta e desde sua descrição já foi identificada em diversos mares e oceanos, apresentando ampla distribuição geográfica. Embora historicamente seja qualificada como uma espécie cosmopolita, nas últimas décadas vem sendo considerada introduzida ou invasora em diferentes regiões do mundo. No presente estudo, foi investigada a estrutura genética bem como a variação morfométrica intra-específica de populações de *S. plicata*. O tamanho do corpo foi a mais relevante diferença morfométrica verificada, sendo os maiores indivíduos encontrados em Florianópolis, Flórida e Califórnia. Essas variações representariam uma resposta a moduladores ambientais. As populações demonstraram ser morfologicamente indistinguíveis, não sendo possível separá-las de acordo com o local de coleta. Foram verificados oito haplótipos entre quarenta e três seqüências obtidas de um fragmento da subunidade 1 da citocromo *c* oxidase (CO1). O haplótipo 8 apresentou uma média de 3,3% de divergência genética em relação aos demais, o que poderia representar a possibilidade de especiação; contudo, são necessárias novas evidências para sustentar essa hipótese. Os resultados obtidos com os dados moleculares demonstraram que não há estruturação geográfica evidente, que os haplótipos estão distribuídos aleatoriamente entre as localidades geográficas e que não há, de acordo com o teste de Mantel, isolamento pela distância entre as populações estudadas. Esses resultados, acrescidos de registros históricos, indicam que o sistema de navegação comercial poderia ser a principal causa da dispersão global de *S. plicata*. A região do Hemisfério Norte foi considerada uma área potencial para ser o centro de dispersão da espécie, entretanto, novos dados a partir de diferentes localidades e marcadores precisam ser acrescentados para se determinar com mais precisão as relações filogeográficas entre as populações de *S. plicata*.

Palavras-chave: *Styela plicata*; filogeografia; bioinvasão marinha; citocromo *c* oxidase subunidade 1; morfometria.

Abstract

Styela plicata is a solitary ascidian found in some shallow water and protected environments of both tropical and warm temperate seas. Its origin is uncertain and since its description it was identified in several seas and oceans, with a large geographical distribution. Although historically qualified as a cosmopolitan species, in the last decades it has been considered an introduced or invasive species, in different regions of the world. In the present study, the genetic structure, as well as the morphometric variation of populations ascribed to *S. plicata* were investigated. The size of the body was the major morphometric difference, the larger individuals found in Florianópolis, Florida and California. Such variations are assumed to represent an answer to environment modulators. Thus, the populations could not be morphologically differentiated in accordance to the site where they were collected. Eight haplotypes were found among the forty-three sequences obtained for the mitochondrial DNA fragment of the cytochrome *c* oxidase subunit 1 (CO1). The haplotype 8 presented an average of 3.3% of genetic divergence in relation to the others, what might represent speciation. Nevertheless, other evidences to support this hypothesis are necessary. Molecular data evidences the absence of geographic structure since the haplotypes are distributed in a random way among the geographic sites studied; besides that, populations are not isolated by distance, according to Mantel test. These results, associated with historical records, indicate that the mercantile navigation system may be the main cause of *S. plicata* global spreading. The North Hemisphere region was considered a potential area as a spreading center of the species under consideration. New data, however, coming from different populations and molecular markers, must be added to determine more accurately the phylogeographic relationships among the *S. plicata* populations.

Keywords: *Styela plicata*; phylogeography; marine bioinvasion; cytochrome *c* oxidase subunit 1; morphometry.

INTRODUÇÃO

Ascídias são consideradas um ótimo material em estudos biogeográficos (Monniot 1983) uma vez que o estágio adulto é representado por animais de vida sésil e a dispersão natural ocorre através dos gametas ou do estágio larval (Lambert 2005). Em condições naturais, as larvas de ascídias coloniais normalmente não se dispersam a grandes distâncias, freqüentemente se dispersam a poucos metros. Em contraste, as larvas das espécies solitárias podem permanecer nadando livremente por períodos superiores a 12 horas, em conseqüência apresentando uma dispersão mais ampla (Ayre et al. 1997).

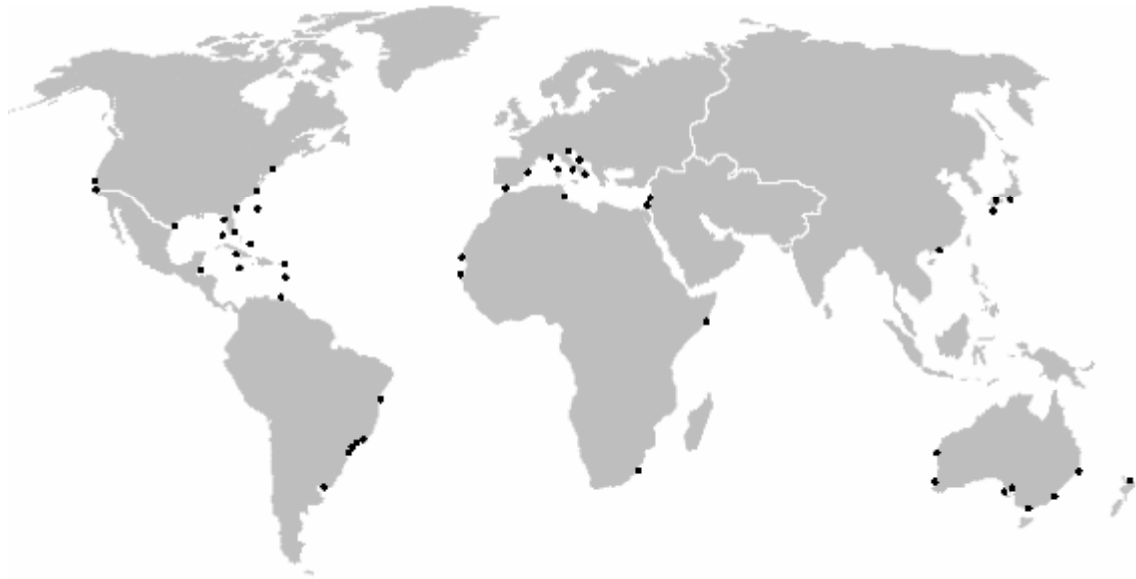


Figura 1. Distribuição mundial de *S. plicata*.

Styela plicata (Leseuer, 1823) é uma ascídia solitária encontrada em ambientes protegidos, de águas rasas, nos mares tropicais e temperados-quentes (Figura 1). Sua origem é desconhecida (Lambert 2001), mas talvez possa ter surgido no hemisfério norte (Lambert 2005). Quando a espécie foi descrita em 1823, o espécime-tipo utilizado por Leseuer foi encontrado aderido ao casco de um navio, na Filadélfia, não sendo encontrados outros indivíduos em substratos naturais na mesma região (Van Name 1945). Outros registros da presença de *S. plicata* aderida ao casco de navios

foram feitos na Baía de Hann, Senegal, em 1950 (Pérès 1951) e no USS Palos, após viagem através do Pacífico, vindo da China ou do Japão (Tokioka 1967).

Sua presença já foi registrada nas águas temperadas do Oceano Atlântico e do Mediterrâneo (Harant 1927; Harant e Vernières 1933). Embora possa ser encontrada na costa leste da América do Norte desde o início do século vinte (Van Name 1912; Huntsman 1912), até meados da década de 40 era muito rara na costa oeste (Van Name 1945). No início do século 20 sua ocorrência não era registrada nas Ilhas Bermudas (Van Name 1902), até que em 1945 foi registrado um único exemplar nessa ilha (Van Name 1945). Até 1980 não havia registros de ocorrência em ilhas e recifes em águas tropicais no leste e no oeste do Pacífico (Kott e Goodbody 1980). O registro mais antigo encontrado para o oceano Pacífico data de 1878, no qual sua presença foi registrada no Porto de Sidnei, Austrália (Heller 1878). Na Nova Zelândia foi registrada pela primeira vez em 1948 (Brewin 1948).

Desde sua descrição, já foi identificada em diversos mares e oceanos (Tabela 1) e está presente em quase todos os continentes. Embora tenha sido qualificada como uma espécie cosmopolita (Monniot 1969; Ramos Espla et al. 1992) foi considerada introduzida nas Bermudas (Monniot e Monniot 1983) e na Austrália (Kott 1985; Berents e Hutchings 2002, Wyatt et al. 2005), potencialmente invasora na Baía de Paranaguá (Rocha e Kremer 2005), invasora no sul da Califórnia (Lambert e Lambert 2003) e aparentemente não-nativa no Texas (Lambert et al. 2005).

Tabela 1. Registro histórico, por região, dos relatos da presença de *S. plicata*.

Região	País	Localidade(s)	Coleta	Substrato	Referência
	EUA	Filadélfia (Porto da Filadélfia)		ART	Leseuer 1823
	EUA	Nova Iorque			De Kay 1843
Atlântico Norte	EUA	Flórida (Cedar Key, Boca Ciega Bay)	1950		Abbott e Johnson 1972
	EUA	Flórida (Tortugas Islands, Apalachee Bay)	1968-74		Plough 1978
	EUA	Flórida (Virginia Key)			Goodbody 1984
	EUA	Flórida (Harbor Branch Marina)	1987		Bingham e Walters 1989
	EUA	Geórgia (Sapelo Island)	1968-74		Plough 1978

Tabela 1 (continuação). Registro histórico, por região, dos relatos da presença de *S. plicata*.

	EUA	Carolina do Norte (Fort Macon e Beaufort)	1915		Tucker 1942, Van Name 1945; Abbott e Johnson 1972, Plough 1978
	EUA	New England			Van Name 1912
Atlântico Norte	EUA	Texas (Sea Ranch Marina, Parrot Eyes Marina, Port Isabel)	2004		Lambert et al. 2005
	Canadá				Huntsman 1912
	Ilhas Bermudas	St. David Island, Church bay, Spanish Point e Harrington Sound			Van Name 1945, Monniot 1972
	Mauritânia	Port-Étienne, Cap Chacal, Baie de l'Étoile	1948		Pérès 1949
	Senegal	Dakar (Bel Air, Gorée, Tacoma)	1948		Monniot 1969; Pérès 1949
	Senegal	Baía de Hann	1950	ART	Pérès 1951
		Guadalupe			
	Ilha Margarita	Puente de la Restinga			Goodbody 1984
	Belize		1981	EPI	Goodbody 2004
Caribe e América Central	Cuba	Golfo de Ana Maria			Van Name 1945, Zanuy 1990
	Bahamas	Ilha de San Salvador			Pisut e Pawlik 2002
	Jamaica	Port Royal			Goodbody 2003
	Porto Rico	Porto de Guanica			Van Name 1945
	Ilha St. Thomas	Não especificado			Van Name 1945
	Ilha St. Vicent	Não especificado			Van Name 1945
	Ilha St. Croix	Não especificado			Van Name 1945
	Brasil	Rio de Janeiro		ART	Traustedt 1883, Rocha e Costa 2005
	Brasil	Niterói - RJ e Santos - SP			Millar 1958
	Brasil	Urca e Itacurussá - SP			Costa 1969
	Brasil	Duas Estações Marítimas entre Ilha Grande e o continente - RJ			Monniot 1969-1970
Atlântico Sul	Brasil	Cabo-Frio – RJ			Costa 1969; Lotufo 2002
	Brasil	Paranaguá, São Sebastião (Cabelo Gordo, Praia do Araçá, Pitangueiras) e Florianópolis (Baía Sul e Ilha das Vinhas)			Rodrigues 1962
	Brasil	Ribeirão da Ilha - Florianópolis			Presente trabalho
	Brasil	Ilha do Mel – PR			Moure et al. 1954
	Brasil	Baía de Guanabara - RJ e Baía de Todos os Santos - BA	1998		Lotufo 2002
	Uruguai	Montevideo			Traustedt 1883
		Espanha	Estreito de Gibraltar	1989	
	Espanha	Delta Del Ebro	1986	ART, EPI	Turon e Perera 1988
	Espanha	Baía de Algeciras			Naranjo et al. 1996
	Espanha	Cabo de Tortosa - Catalúnia		EPI	Perera et al. 1990
	Egito	Golfo de Suez, Alexandria, Port Said	1927		Ghobashy e Abdel Messeih 1991, Monniot 2002
	Itália	Mar Adriático	1994-96		Gabriele et al. 1997
	Itália	Mar Piccolo de Taranto	1972-82		Tursi et al. 1974, Tursi 1976, Tursi e Liaci 1983
Mediterrâneo	Itália	Venice Lagoon - Veneto	1971-74		Brunetti 1979
	Itália	Nápoles			Traustedt 1883
	Israel	Litoral Mediterrâneo	1955	EPI	Pérès 1958a
	Israel	Baie de Haifa		NAT, EPI	Pérès 1958b
	França	Nice (Alpes-Maritimes)	1964-65	ART	Leung Tack Kit 1975
	França	Porto de Banyuls e Port-Vendres		ART, EPI	Fiala-Medioni 1974
	França	Córsega (Ajaccio, Bonifácio)	1950	ART	Pérès 1952, Monniot et al. 1993
	Tunísia	Lagune Nord	1953		Pérès 1954

Tabela 1 (continuação). Registro histórico, por região, dos relatos da presença de *S. plicata*.

	China	Hong Kong (Tolo Harbour, Mirs Bay)			Tokioka e Nishikawa 1975, Kott e Goodbody 1980, Thiyagarajan e Qian 2003
	Japão	Baía de Tokyo			Traustedt e Weltner 1894
	Japão	Porto de Yokohama (Sagami Bay)		NAT	Tokioka 1953a
	Japão	Obama Bay			Tokioka 1953b
	Japão	Baía de Osaka	1950-52		Tokioka 1951, 1954
	Japão	Mar de Ariake - Ilha de Kyûsyû	1957-58	EPI	Tokioka 1960
Pacífico Norte	Japão	Nagasaki			Tokioka 1963
	Japão	Baía de Mutsu			Oka 1935
	Japão	Baía de Tsukumo e Baía de Nanao			Nishikawa 1991
		Península de Kii	1963		Nishikawa 1980
	Japão	Ilha Sakushima	2006		Presente trabalho
	EUA	Califórnia (San Diego)	1915	EPI	Ritter e Forsyth 1917
	EUA	Califórnia (San Diego, Long Beach, Newport Bay)	1950		Abbott e Johnson 1972
	EUA	Califórnia (Porto de Santa Bárbara, King Harbor, Baía de Alamitos, San Pedro, Baía Mission)	1960	ART, NAT	Reish 1963, Fay e Johnson 1971
	Austrália	Queensland (Moreton Bay, Harvey Bay, Ross Creek, Calliope River)	1970-71		Kott 1972a, Kott 1985
	Austrália	New South Wales (Garden Island e Botany Bay; Port Kembla)	1948-49		Kott 1952, Kott 1973, Kott 1985
Pacífico Sul	Austrália	Porto de Sidnei	1877		Heller 1878, Raftos e Hutchinson 1997
	Austrália	Victoria (Port Phillip)	1958		Millar 1966, Kott 1985
	Nova Zelândia	Golfo de Hauraki	1948		Brewin 1948, Brewin 1958, Millar 1982
	Austrália	Coffin Bay			Kott 1972b
	Austrália	Região Oeste (Monte Belo Is., Cockburn Sound, Swan River, Canning River e Bunbury)			Kott 1985
Índico	Austrália	Shark Bay			Kott 1972a , Wyatt et al. 2005
	Austrália	Região Sul (Spencer Gulf, St. Vincent Gulf)			Kott 1985
	África do Sul	Natal (Durban e KwaZulu)	1951	ART	Millar 1955
	Somália	Não especificado	1964	ART	Millar 1988

Tipos de substratos: ART - artificial, NAT - natural e EPI - epibiose.

S. plicata se desenvolve bem em águas salobras ou poluídas, ocorrendo habitualmente em ambientes estuarinos (Kott 1952, 1972a; Kott e Goodbody 1980) ou em águas rasas no entorno dos continentes, onde grandes fluxos de água doce reduzem a salinidade (Sims 1984). Essa espécie pertence ao grupo de ascídias que somente são encontradas em áreas perturbadas como refinarias, estações de força, portos pesqueiros (Carballo e Naranjo 2002). Pode ser considerada como uma espécie indicadora de áreas que tenham sofrido intenso estresse (transformação do substrato, estagnação da água e excessiva sedimentação) por longos períodos de tempo (Naranjo et al. 1996).

É encontrada aderida a diferentes tipos de substratos, freqüentemente em substratos artificiais ou epibiose. Cresce sobre conchas de bivalves, com os quais compete por recursos (Perera et al. 1990), podendo também preda as larvas véligers (Bingham e Walters 1989). Isso a torna uma presença indesejável em cultivos. *S. plicata* não pode necessariamente ser considerada como uma espécie colonizadora porque suas larvas se fixam apenas em substratos onde previamente estejam fixados outros organismos. De alguma forma, a fixação das larvas está condicionada à rugosidade do substrato (Sciscioli et al. 1978).

A espécie apresenta características biológicas que podem contribuir na sua capacidade dispersiva. Em condições experimentais (26 °C e 34‰ de salinidade) a larva, em média, leva quatro horas e meia para se fixar ao substrato após a eclosão do ovo, mas pode permanecer nadando por mais de dois dias sem afetar a metamorfose e o crescimento pós-larval (Thiyagarajan e Qian 2003). Mesmo embriões danificados podem se desenvolver em larvas e potencialmente gerar adultos funcionais (Nakauchi e Takeshita 1983). Em apenas quatro dias após a fixação, a ascídia funcional está completamente formada (no verão) e, com cerca de 40 mm de comprimento, já se torna sexualmente madura; após ter atingido a maturidade sexual vive por mais três ou quatro meses (Yamaguchi 1975). A espécie parece não ser ativa sexualmente nos meses frios, contudo, pode ter de duas a três gerações reprodutivas por ano (Yamaguchi 1975). O rápido crescimento e as taxas reprodutivas permitem que a espécie colonize rápida e intensamente novos substratos, levando ao desenvolvimento de grandes populações (Morris et al. 1980).

Embora doses sub-letais dos componentes mais comuns (TBT, cobre e creosato) utilizados nas tintas antiincrustantes possam afetar substancialmente as reações imunes de *S. plicata*, não são inibitórias e dependem da via de intoxicação - *in vitro* ou *in vivo* (Raftos e Hutchinson 1997), indicando a possibilidade de certo grau de resistência a esses compostos. Devido à presença de alguns compostos secundários

nas paredes do corpo, *S. plicata* se apresenta pouco palatável a predadores, especialmente a peixes (Pisut e Pawlik 2002).

S. plicata já foi objeto de estudos taxonômicos descritivos (Van Name 1945, Kott 1985, Tokioka 1951, 1953b) e também tem sido muito empregada em pesquisas farmacológicas (Cavalcante et al. 2000), imunoquímicas (Green et al. 2006; Raftos et al. 2002), imunogenéticas (Raftos e Briscoe 1990), entre outras áreas. Entretanto, os trabalhos sobre sua distribuição têm se limitado ao registro de sua ocorrência.

No presente trabalho foram utilizadas duas diferentes abordagens para comparar populações de *S. plicata*. A análise morfométrica foi empregada com o objetivo de se conhecer a variação intra-específica e de se identificar uma possível relação entre morfometria e localização geográfica. A quantificação da variabilidade de um fragmento de mtDNA foi utilizada para investigar a origem geográfica da espécie, as relações evolutivas entre as populações e propor possíveis mecanismos de dispersão.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos Exemplares

Oito populações de *S. plicata* foram amostradas, em quatro regiões geográficas (Figura 2). Duas populações no oceano Pacífico: Santa Bárbara, Califórnia (34°25' N; 119°41' W), 16/12/2005 e Ilha Sakushima, Japão (34°43' N, 137°02' E) 07/08/2006, e as demais no Atlântico Norte e Sul: Apollo Beach, Flórida (27°46' N, 82°24' W), 23/07/2002; Cabo Canaveral, Flórida (28°27' N; 80°32' W), 22 e 24/08/2005; Enseada de Jurujuba, Rio de Janeiro (22°56' S; 43°07' W), 17/02/2006; Ilha do Mel, Paraná (25°30' S; 48°23' W), 14/11/2005 e 08/01/2006; Penha, Santa Catarina (26°47' S; 48°39' W), 12/12/2005 e Ribeirão da Ilha, Santa Catarina (27°43' S; 48°34' W), 29/05/2006.

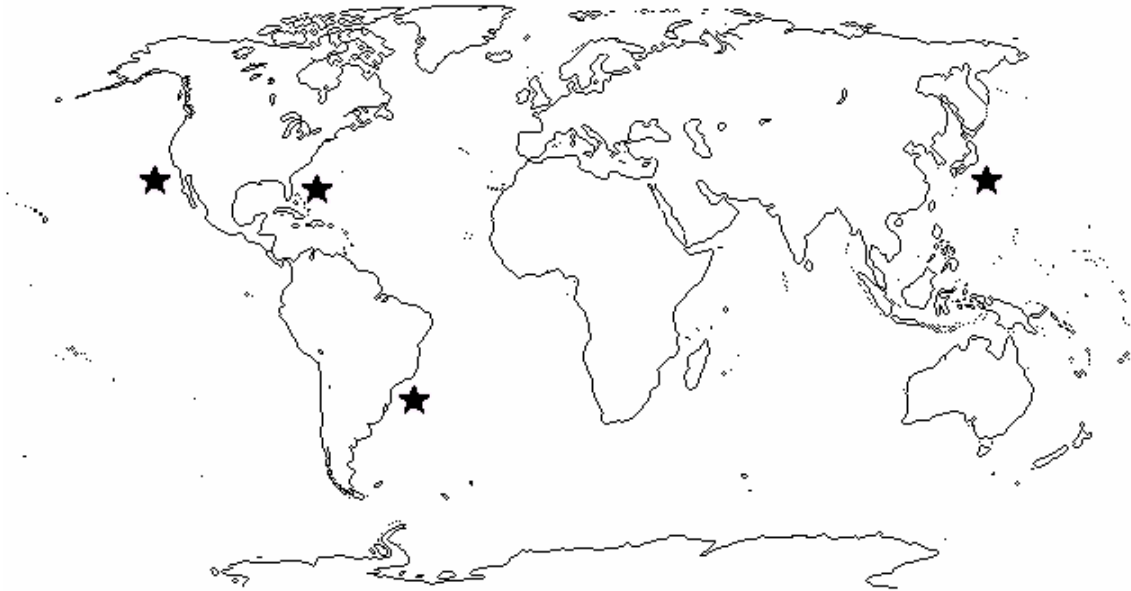


Figura 2. Regiões geográficas amostradas. Pacífico Oeste: Santa Bárbara - Califórnia; Atlântico Norte: Apollo Beach e Cabo Canaveral - Flórida; Atlântico Sul: Baía de Jurujuba - Rio de Janeiro; Ilha do Mel - Paraná; Penha e Florianópolis - Santa Catarina; Pacífico Leste: Ilha Sakushima - Japão.

Os espécimes de *S. plicata* (Tabela 2) foram coletados em áreas rasas ou, quando necessário, com uso de técnicas de mergulho livre. Os exemplares destinados à morfometria foram anestesiados pela adição de cristais de mentol à água do mar e fixados em solução de formaldeído 4%. Aqueles exemplares destinados para a análise molecular foram dissecados em campo ou no laboratório para a retirada de fragmentos de tecidos (parede do corpo e gônadas), que foram armazenados em etanol 95% e refrigerados a aproximadamente -18°C (Hillis et al. 1996).

Tabela 2. Esforço amostral por local de coleta.

		RB	PE	IM	RJ	FL	CA	JP	Total
Morfometria	Amostrado	10	10	10	14	10	10	0	64
	Analisado	10	10	10	9	10	10	0	59
Molecular	Amostrado	10	10	10	10	10	10	10	70
	Analisado	5	6	6	6	7	6	7	43

RB - Florianópolis; PE - Penha; IM - Ilha do Mel; RJ - Rio de Janeiro; FL - Flórida; CA - Califórnia e JP - Japão.

Morfometria

Nesta abordagem foram analisadas seis populações, a saber: Santa Bárbara (Califórnia), Apollo Beach (Flórida), Enseada de Jurujuba (Rio de Janeiro), Ilha do Mel (Paraná), Penha e Ribeirão da Ilha (Santa Catarina). Por falta de exemplares a

população do Japão não foi incluída na análise morfométrica. Os espécimes foram dissecados sob microscópio estereoscópico (Olympus SZ40) descritos e medidos. Para melhor evidenciar as estruturas os exemplares foram corados com hematoxilina de Harris. As medidas foram obtidas com o auxílio de paquímetro (Mitutoyo) optando-se por uma precisão de 0,5 mm.

Os parâmetros morfométricos empregados foram divididos em variáveis métricas (medidas lineares padronizadas # Figura 3) e merísticas (variáveis contáveis).

Parâmetros métricos:

CC - comprimento do corpo (distância entre a região basal do corpo, sem a túnica, e a borda livre do sifão oral);

LC - largura do corpo (obtida na região mediana do corpo, retirado da túnica, no sentido dorso-ventral);

CSO - comprimento do sifão oral (distância entre a borda livre do sifão oral e sua base);

LSO - largura do sifão oral (distância transversal obtida na base do sifão);

CSA - comprimento do sifão atrial (distância entre a borda livre do sifão atrial e sua base);

LSA - largura do sifão atrial (distância transversal obtida na base do sifão);

DS - distância entre sifões (medida obtida entre as bases dos sifões);

RPT - comprimento longitudinal da região peritubercular (distância entre o início da lâmina dorsal e a base do tentáculo situado logo acima);

DTD - diâmetro do tubérculo dorsal (obtido na região mediana, no sentido transversal);

Parâmetros merísticos:

LO - número de lobos do sifão oral;

LA - número de lobos do sifão atrial;

TO - número de tentáculos orais;

PFe - número de pregas faríngeas do lado esquerdo;

PFd - número de pregas faríngeas do lado direito;
 VLe - número de vasos longitudinais do lado esquerdo;
 VLd - úmero de vasos longitudinais do lado direito;
 Ge - número de gônadas do lado esquerdo;
 Gd - número de gônadas do lado direito;
 PLE - número de pregas longitudinais no estômago;
 FM - quantidade de fendas por malha.

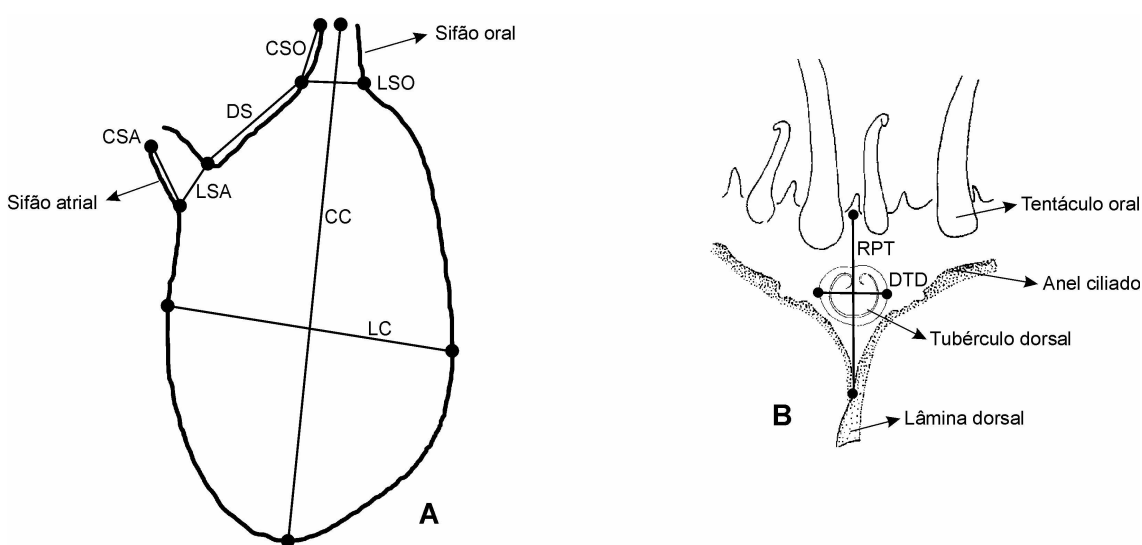


Figura 3. Diagrama das variáveis métricas. A, vista lateral direita de *S. plicata* (sem a túnica); B, região dorsal interna do sifão oral.

Extração do DNA e seqüenciamento

As seqüências de COI foram obtidas a partir de amostras provenientes de sete populações de *S. plicata*: Santa Bárbara (Califórnia), Ilha Sakushima (Japão), Cabo Canaveral (Flórida), Enseada de Jurujuba (Rio de Janeiro), Ilha do Mel (Paraná), Penha e Ribeirão da Ilha (Santa Catarina).

O DNA foi extraído de acordo com o protocolo EZ-DNA (Biosystems) modificado, a partir de amostras de tecidos que pesavam entre 10 a 50 mg. Após fragmentação mecânica, as amostras foram incubadas por 3 a 4 horas em banho-maria a 50° C em solução contendo 98 µl de tampão de digestão (Tris 50mM pH 8.0)

e 2 µl de proteinase K (Biosolv Lid), na concentração de 25 mg/ml. Em seguida foram adicionados 200 µl de EZ-DNA, agitado vigorosamente e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o procedimento de centrifugação foi repetido nos casos em que o sobrenadante permaneceu turvo. Ao sobrenadante foram adicionados 300 µl de etanol absoluto a 4° C, homogeneizado por inversão e deixado em repouso por 3 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi removido com o auxílio de lenço de papel. O “pellet” de DNA foi então ressuspensão com 200 µl de etanol 95% a 4° C e novamente centrifugado, a 1.000 rpm por 1 minuto. Esse procedimento de lavagem foi repetido uma vez. O etanol foi removido cuidadosamente e o “pellet” de DNA foi posto para secar à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Quando seco, o DNA foi ressuspensão com água ultrapura (50, 100 ou 200 µl de acordo com a quantidade de DNA obtida). As concentrações de DNA foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro Genequant *pro* (Amersham Biosciences).

Foram utilizados os primers universais HCOI498 (5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA ATC A 3' - Invitrogen) e LCO2198 (5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3' - Invitrogen) de acordo com Folmer et al. (1994) para amplificar um fragmento de aproximadamente 700 pb da COI. Uma vez que o mtDNA é transmitido maternamente e não sofre recombinação, todos os seus constituintes moleculares estão presentes nos descendentes de uma mesma geração parental. O uso de filogenias de genes do mtDNA associadas com informações geográficas provê meios para a avaliação da estrutura genética de populações. Tal associação de técnicas foi denominada “filogeografia intraespecífica” por Avise (Avise et al. 1987). O seqüenciamento da citocromo *c* oxidase subunidade 1 tem sido amplamente utilizado em estudos de filogeografia animal (Machordom et al. 2003, Edmands 2001), em estudos de bioinvasão (Roman 2006; Turon et al. 2003; Mackie et al. 2006) e, também, de filogenia e filogeografia de ascídias (Stach e Turbeville 2002, Turon e

López-Legentil 2004, López-Legentil e Turon 2006). Dessa forma, neste trabalho também se optou pelo estudo da variabilidade genética da COI.

As reações de PCR consistiram de 10-50 ng de DNA molde, 2,5 µl de tampão 10X, 3 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTP (Biotools BeM Labs), 50 µmol de cada primer e 1 U de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen) em 25 µl de volume de reação. As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler personal - Eppendorf) de acordo com os seguintes parâmetros: 95° C por 2 minutos, 35 ciclos de 92° C por 40 segundos, 57° C por 40 segundos, 70° C por 40 segundos, seguidos por uma extensão final de 5 minutos a 70° C.

Os resultados da PCR foram verificados por corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados e fotografados com transiluminador ultravioleta.

Os produtos da PCR foram purificados adicionando-se 17 µl de acetato de amônio 7,5 M e 60 µl de etanol 96% e deixados em repouso por 5 minutos. Em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante retirado com auxílio de micropipetador. Após a adição de 100 µl de etanol 70% foram novamente centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm, retirado o sobrenadante com auxílio de micropipetador, colocados para secar por 15 minutos (Speed vac a 35° C) e ressuspensos com água ultrapura.

As reações de seqüenciamento foram realizadas num volume total de 10 µl contendo 0,5 µl de BigDye (Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit - Applied Biosystems), 1,0 µl de primer (1,6 µmol), 0,5 µl de tampão, 0,5 µl a 6,0 µl de DNA e água ultra pura e procedidas em termociclador (Mastercycler personal - Eppendorf) de acordo com os seguintes parâmetros: 96° C por 1 minuto, 35 ciclos de 96° C por 10 segundos, 50° C por 5 segundos e 60° C por 4 minutos.

Os produtos da PCR foram precipitados pela adição de 40 µl de isopropanol 75%. Após 20 minutos de repouso, em temperatura ambiente, foram centrifugados a 13.000 rpm por 25 minutos. Removido o isopropanol, foram adicionados 200 µl de

etanol 70% e centrifugados novamente (13.000 rpm por 5 minutos). Após a remoção de todo o etanol, os produtos passaram por um processo de secagem (speed vac, 1h a 60°C), foram ressuspensos em 10 µl formamida Hi Di e, subsequentemente, seqüenciados no Analisador Automático de DNA Applied Biosystems 3130 do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE).

Análises dos Dados

Dados Morfométricos

Inicialmente, os dados morfométricos foram analisados quantitativamente e submetidos à Análise de Correlação para se estabelecer o grau de dependência entre as variáveis pareadas. Posteriormente, foi aplicada a Análise de Componentes Principais (ACP) para identificar o conjunto de caracteres que melhor descrevessem a variação entre as populações. Os componentes principais foram extraídos a partir de uma matriz de covariância. Para testar estatisticamente as diferenças entre as 6 populações, foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste multifatorial de Tukey-Kramer (α 0,05).

Todas as análises estatísticas dos dados morfométricos foram feitas com o auxílio do software JMP v.5.0 (SAS Institute 1995).

Dados Moleculares

As seqüências de DNA foram lidas no sentido 5'-3', checadas, na sua maioria, pelo sentido reverso e geradas as seqüências consenso. Todas as seqüências foram inspecionadas visualmente com o auxílio do programa BioEdit v.5.0 (Hall 1999) e alinhadas usando o programa CLUSTAL X (Thompson et al. 1997 # Apêndice 1). O teste estatístico Tajima D foi estimado com programa DnaSP v.4.1 (Rozas et al. 2003) e aplicado para testar a existência de pressão seletiva agindo sobre as substituições (López-Legentil e Turon 2006).

As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de Inferência Bayesiana - BI (BI) e Neighbor-joining - NJ (Saitou e Nei 1987). A árvore de NJ, os valores de “bootstrap” e a matriz de distância (diferença absoluta em número de nucleotídeos) entre os haplótipos de *S. plicata* foram obtidos usando o programa PAUP* 4.0 (Swofford 2000). A análise de NJ foi realizada segundo o método de distância (distância p). As árvores de distância podem ser úteis por permitirem a detecção visual de possíveis casos de atração de ramos longos. Com o auxílio do programa MrBayes 3.0 (Ronquist e Huelsenbeck 2003) foi obtida a relação filogenética dos haplótipos pela Inferência Bayesiana e estimada a probabilidade posterior. Considerando que métodos filogenéticos tradicionais (representados por árvores bifurcadas) nem sempre representam a evolução gênica intra-específica (Posada e Crandall 2001) optou-se pela não utilização de grupo externo nem critérios de enraizamento.

Os valores de “bootstrap” foram calculados com 1000 repetições usando o método de busca heurística e a probabilidade posterior foi inferida baseada em 10.000 árvores.

A rede de haplótipos foi estimada com o programa TCS (Clemente et al. 2000) que aplica a parcimônia estatística descrita por Templeton et al. (1992). Esse método estima uma árvore não enraizada fornecendo uma relação plausível (95%) entre os haplótipos. O procedimento descrito por Crandall (1996) foi aplicado à rede de haplótipos. A “Nested Clade Analysis” (NCA) foi aplicada com o objetivo de se diferenciar eventos históricos da estrutura genética das populações (Templeton 1998; Templeton 2001). A NCA foi realizada usando o programa GeoDis 2.2 (Posada et al. 2000). Tal programa busca por associações significativas entre distâncias genéticas e geográficas. Associações significantes foram então interpretadas em termos de processos biológicos seguindo a chave de inferência disponível em Templeton (2004).

As distâncias geográficas entre os locais de coleta foram estimadas, em km, estabelecendo as menores rotas costeiras possíveis, ponderando-se barreiras

ambientais (físico-químicas) e geográficas. A menor rota entre os oceanos Atlântico e Pacífico foi estabelecida através do Canal do Panamá.

Com o programa DnaSP v.4.1 (Rozas et al. 2003) foram medidas as diversidades nucleotídicas (π) e haplotípicas (H_d) dentro de cada população (Nei 1987). Outras análises foram realizadas com o programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005). Para testar a hipótese de distribuição não-aleatória dos haplótipos (sob a hipótese de panmixia) entre as diferentes localidades geográficas foi executado o teste exato para diferenciação de populações (Raymond e Rousset 1995) e sua significância foi estimada a partir de 10.000 permutações aleatórias. Foram calculados os valores pareados de F_{ST} e suas significâncias (teste de permutação, 1000 replicações) entre as localidades geográficas. O teste de Mantel (10.000 permutações) testou o isolamento pela distância entre as populações (Rousset 1997).

RESULTADOS

Análise morfométrica

No estudo morfométrico foram analisadas seis populações de *S. plicata*, totalizando 59 espécimes amostrados (Tabela 2). Foram determinadas a média e o desvio-padrão para cada variável morfométrica (Tabela 3). No curso das análises as variáveis referentes ao tamanho da túnica (comprimento e largura) foram rejeitadas, pois foram consideradas não-comparáveis dado a variedade de formas. Fica claro que não é possível distinguir os indivíduos entre as populações a partir das variáveis morfométricas. Entretanto, valores médios diferiram pelo menos entre algumas das populações. Os exemplares do Rio de Janeiro, de forma geral, foram caracterizados pelas menores médias dentre as variáveis métricas. Por outro lado, verificou-se que os indivíduos de maior tamanho estão nas populações da Flórida e de Florianópolis.

Entre os espécimes analisados não foram encontradas variações para o número de lobos orais (LO) e lobos atriais (LA) e para o número de pregas faríngeas do lado esquerdo (Pfe) e do lado direito (PFd). O número de gônadas do lado

esquerdo (Ge) apresentou variação em apenas três exemplares (5%), sendo considerado um caráter invariável. Foi observado um conspícuo deslocamento da lâmina dorsal em direção ao lado esquerdo da abertura esofágica; como resultado, os vasos longitudinais são discretamente mais numerosos do lado direito da faringe.

Tabela 3. Média e desvio-padrão (entre parênteses) de cada variável nas 6 populações de *S. plicata* analisadas.

Variáveis	RB	PE	IM	RJ	FL	CA
CC	43,2 (6,4)	33,8 (4,4)	32 (8,6)	25,3 (5,0)	45,5 (3,7)	35,1 (7,5)
LC	29,2 (5,9)	20,3 (3,4)	17 (5,6)	14,1 (3,8)	27,4 (3,8)	22,7 (5,6)
CSO	4,9 (1,9)	5,5 (1,2)	6,0 (3,0)	3,7 (1,2)	4,2 (1,1)	2,9 (0,6)
LSO	5,8 (1,7)	6,7 (1,6)	5,1 (2,9)	3,8 (1,6)	5,1 (1,3)	5,0 (1,5)
CSA	5,9 (1,5)	6,2 (1,4)	5,7 (3,1)	3,2 (1,0)	4,0 (1,1)	3,6 (1,2)
LSA	4,8 (1,5)	6,3 (1,9)	4,1 (2,0)	3,8 (1,1)	4,3 (0,8)	5,3 (1,8)
DS	5,6 (1,7)	4,6 (1,4)	2,8 (1,5)	3,1 (0,8)	5,1 (1,0)	5,6 (1,6)
RPT	2,3 (1,1)	2,0 (0,4)	1,7 (0,6)	1,4 (0,5)	2,9 (1,0)	2,7 (0,9)
DTD	1,8 (0,4)	1,4 (0,3)	1,5 (0,6)	1,0 (0)	1,8 (0,4)	1,5 (0,5)
LO	4,0 (0)	4,0 (0)	4 (0)	4,0 (0)	4,0 (0)	4,0 (0)
LA	4,0 (0)	4,0 (0)	4 (0)	4,0 (0)	4,0 (0)	4,0 (0)
TO	54,5 (12,5)	60,4 (5,6)	50,7 (11,9)	56,7 (8,4)	58,0 (13,2)	47,9 (14,4)
PFe	4,0 (0)	4,0 (0)	4 (0)	4,0 (0)	4,0 (0)	4,0 (0)
PFd	4,0 (0)	4,0 (0)	4 (0)	4,0 (0)	4,0 (0)	4,0 (0)
VLe	104,9 (9,9)	105,6 (9,2)	94 (7,1)	72,7 (3,8)	96,6 (6,1)	108,8 (8,7)
VLd	107,7 (10,8)	111,1 (11,3)	97,8 (9,4)	76,4 (4,6)	101,2 (5,5)	112,9 (9,9)
Ge	1,9 (0,3)	2,0 (0)	2,2 (0,6)	2,0 (0)	2,0 (0)	1,9 (0,3)
Gd	6,2 (1,1)	6,2 (1,7)	5,9 (1,2)	4,9 (1,1)	5,7 (1,1)	5,8 (1,0)
PLE	29,0 (4,4)	25,1 (3,0)	26,7 (4,0)	21,1 (2,4)	27,8 (3,1)	23,3 (2,5)
FM	7,5 (0,7)	7,3 (0,8)	6,8 (0,9)	6,3 (0,5)	8,5 (0,5)	7,0 (0,8)
n	10	10	10	9	10	10

RB - Florianópolis; PE - Penha; IM - Ilha do Mel; RJ - Rio de Janeiro; CA - Califórnia e FL - Flórida. CC: comprimento do corpo; LC: largura do corpo; CSO: comprimento do sifão oral; LSO: largura do sifão oral; CSA: comprimento do sifão atrial; LSA: largura do sifão atrial; DS: distância entre sifões; RPT: distância entre os tentáculos orais e o início da lâmina dorsal; DTD: diâmetro do tubérculo dorsal; LO: número de lobos do sifão oral; LA: número de lobos do sifão atrial; TO: número de tentáculos orais; PFe: número de pregas faríngeas do lado esquerdo; PFd: número de pregas faríngeas do lado direito; VLe: número de vasos longitudinais do lado esquerdo; VLd: número de vasos longitudinais do lado direito; Ge: número de gônadas do lado esquerdo; Gd: número de gônadas do lado direito; PLE: número de pregas longitudinais no estômago; FM: quantidade de fendas por malha.

Através da análise de correlação (Tabela 4) as variáveis morfométricas, em sua maioria, demonstraram-se independentes considerando-se um índice de correlação arbitrário de 75%. O maior índice de correlação foi verificado entre o número de vasos longitudinais do lado direito e do lado esquerdo, igual a 94,3%. Comprimento e largura do corpo apresentaram 85,8% de correlação. Largura e comprimento dos sifões (oral e atrial) não apresentaram valores elevados em relação à largura e comprimento do corpo como era esperado. O valor encontrado de 79,6%

reflete a dependência entre as variáveis: comprimento do sifão oral (CSO) e comprimento do sifão atrial (CSA).

Tabela 4. Resultados da Análise de Correlação entre os dados morfométricos. Valores superiores a 0,75 indicam variáveis significativamente correlacionados.

	CC	LC	CSO	LSO	CSA	LSA	DS	DTA	DTD	TO	VLe	VLd	Gd	PLE	FM
CC	1														
LC	0,858	1													
CSO	0,350	0,148	1												
LSO	0,495	0,414	0,598	1											
CSA	0,406	0,289	0,796	0,645	1										
LSA	0,323	0,351	0,265	0,651	0,476	1									
DS	0,602	0,652	0,027	0,278	0,151	0,276	1								
RPT	0,638	0,554	0,077	0,308	0,169	0,383	0,419	1							
DTD	0,713	0,572	0,325	0,479	0,391	0,360	0,368	0,460	1						
TO	0,158	0,065	0,292	0,324	0,323	0,078	0,045	0,078	0,243	1					
VLe	0,542	0,544	0,144	0,429	0,349	0,374	0,456	0,471	0,551	0,034	1				
VLd	0,567	0,567	0,200	0,493	0,423	0,434	0,486	0,498	0,569	0,028	0,943	1			
Gd	0,197	0,200	0,116	0,288	0,331	0,285	0,098	0,232	0,269	0,014	0,313	0,324	1		
PLE	0,485	0,427	0,235	0,147	0,354	0,104	0,163	0,247	0,551	0,109	0,353	0,394	0,209	1	
FM	0,621	0,649	0,085	0,216	0,093	0,022	0,431	0,329	0,439	0,188	0,322	0,265	0,270	0,429	1

CC: comprimento do corpo; LC: largura do corpo; CSO: comprimento do sifão oral; LSO: largura do sifão oral; CSA: comprimento do sifão atrial; LSA: largura do sifão atrial; DS: distância entre sifões; RPT: distância entre os tentáculos orais e o início da lâmina dorsal; DTD: diâmetro do tubérculo dorsal; LO: número de lobos do sifão oral; LA: número de lobos do sifão atrial; TO: número de tentáculos orais; PFe: número de pregas faríngeas do lado esquerdo; PFd: número de pregas faríngeas do lado direito; VLe: número de vasos longitudinais do lado esquerdo; VLd: número de vasos longitudinais do lado direito; Ge: número de gônadas do lado esquerdo; Gd: número de gônadas do lado direito; PLE: número de pregas longitudinais no estômago; FM: quantidade de fendas por malha.

Para a realização da ANOVA (Tabela 5) foram testadas as variáveis individualmente e, posteriormente, os três componentes principais. Foram excluídos dessa análise os dados que não apresentaram variação (LO, LA, PFe, PFd, Ge) e uma das variáveis de cada um dos pares considerados significativamente correlacionados. Confrontados com relação ao local de coleta de cada população a maioria das variáveis morfométricas foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$) para as 6 populações, com exceção do número de tentáculos orais e do número de gônadas do lado direito. Dentre os três primeiros componentes principais apenas o segundo não apresentou significância.

Pelo teste de Tukey-Kramer observou-se que, embora as médias sejam significativamente diferentes, não existe padrão estabelecido e cada variável se comporta de forma diferente em cada local de coleta. Novamente se observou que a população do Rio de Janeiro tende a se diferenciar das demais.

Tabela 5. Dados e componentes da ANOVA; autovalores (pesos) das variáveis morfométricas na análise de componentes principais.

Variáveis	GL	SQ	F	p	Tukey-Kramer	CP1	CP2	CP3
VLe	5	8161,45	26,87	<0,0001	FL≥PE=RB≥CA≥IM≥RJ	0,93	-0,02	-0,35
LC	5	1640,46	14,09	<0,0001	RB≥CA≥FL≥PE=IM≥RJ	0,31	0,07	0,88
RPT	5	15,72	4,97	0,0008	CA≥FL≥RB=PE≥IM≥RJ	0,03	0,01	0,04
CSA	5	80,56	5,42	0,0004	PE≥RB=IM≥CA≥FL≥RJ	0,05	0,06	0,02
PLE	5	412,82	7,32	<0,0001	RB=CA≥IM≥PE≥FL≥RJ	0,12	0,05	0,25
FM	5	46,91	15,63	<0,0001	RB=CA>PE=FL=IM=RJ	0,03	0,02	0,10
DTD	5	3,61	4,57	0,0015	RB=CA≥FL=IM=PE≥RJ	0,02	0,01	0,02
DS	5	73,07	7,42	<0,0001	RB=FL=CA≥PE≥RJ=IM	0,06	0,01	0,12
LSA	5	42,48	3,37	0,0103	PE≥FL=RB=CA≥IM=RJ	0,05	0,01	0,03
LSO	5	42,83	2,52	0,0406	PE≥RB=CA=IM=FL≥RJ	0,06	0,06	0,03
TO	5	1091,32	1,67	0,1580	-	-0,02	0,99	-0,09
Gd	5	10,87	1,46	0,2171	-	0,03	0,00	0,00
CP1	5	9207,83	27,48	<0,0001	CA=RB=PE≠FL=IM≠RJ			
CP2	5	1152,55	1,75	0,1398	-			
CP3	5	959,45	10,06	<0,0001	FL=RB=RJ≠IM=CA=PE			
Porcentagem						52,0	33,2	8,0

RB - Florianópolis; PE - Penha; IM - Ilha do Mel; RJ - Rio de Janeiro; CA - Califórnia e FL - Flórida. LC: largura do corpo; CSA: comprimento do sifão atrial; LSO: largura do sifão oral; LSA: largura do sifão atrial; DS: distância entre sifões; RPT: distância entre os tentáculos orais e o início da lâmina dorsal; DTD: diâmetro do tubérculo dorsal; TO: número de tentáculos orais; VLe: número de vasos longitudinais do lado esquerdo; Gd: número de gônadas do lado direito; PLE: número de pregas longitudinais no estômago; FM: quantidade de fendas por malha.

Os resultados da ACP (análise de componentes principais) mostraram que os três primeiros componentes principais juntos correspondem a 93,16% da variabilidade total. As variáveis que, de acordo com os autovalores (Tabela 5), melhor descreveram os componentes foram: o número de vasos longitudinais do lado esquerdo (VLe) e a largura do corpo (LC) para o CP1, o número de tentáculos orais (TO) para o CP2 e largura do corpo (LC), seguida pelo número de vasos longitudinais do lado esquerdo (VLe), para o CP3. A partir dos dois primeiros componentes (CP1=52,0% e CP2=33,2%) foi elaborado um gráfico bidimensional onde, como era de se esperar, com base nos dados apresentados até aqui, a representação espacial não evidenciou claramente a diferenciação das populações, com exceção dos indivíduos coletados no Rio de Janeiro (Figura 4).

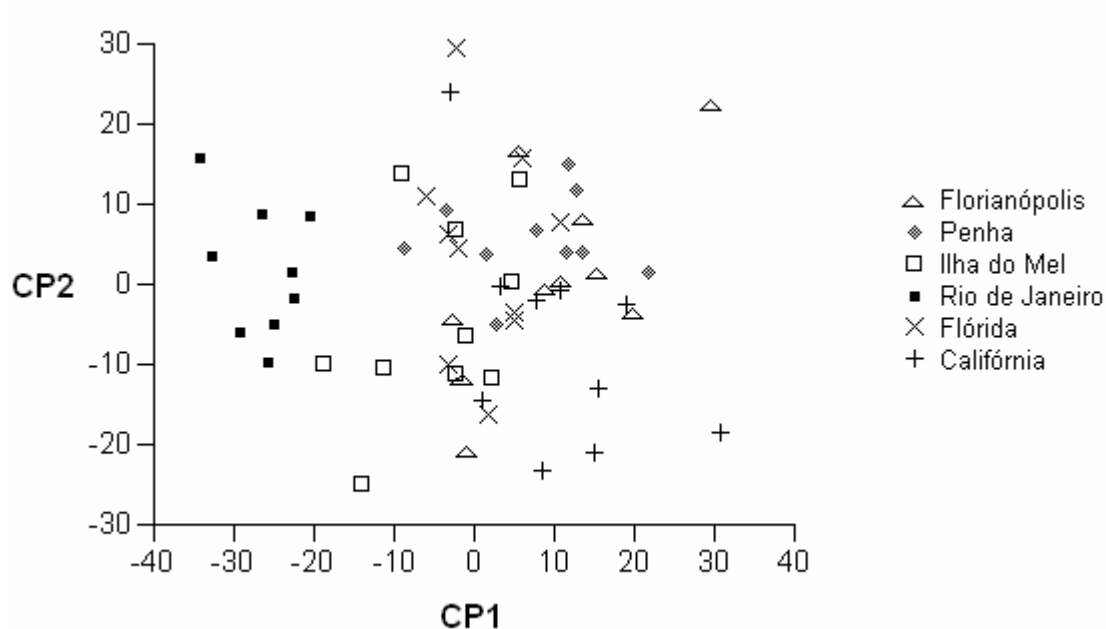


Figura 4. Mapa fatorial (CP1 X CP2) entre as populações de *S. plicata*. CP1 - primeiro componente principal (52,0%); CP2 - segundo componente principal (33,1%) demonstrando 85,1% da variação total.

Sistemática molecular

Variação das seqüências

Um total de 43 seqüências do fragmento do gene mitocondrial da COI foi obtido para *S. plicata*. O comprimento final, após alinhamento e cortes das extremidades, foi de 562 pares de bases (pb), livres de “gaps”. Dentro das populações estudadas de *S. plicata* foram identificados oito diferentes haplótipos (Tabela 6), considerando haplótipo o conjunto de seqüências que compartilham a mesma composição e ordenamento de nucleotídeos (Templeton 2001). Vinte e dois sítios polimórficos (3,9%) foram encontrados, sete dos quais representando mudanças não sinônimas (Figura 5). Transições contabilizaram aproximadamente 77% das substituições, sendo que 77,3% ocorreram na terceira posição e 22,7% na segunda. A proporção média de Adenina-Timina foi de 63,2 %. O teste estatístico Tajima D, para os dados totais, não foi significativo (Tajima's D= 0,23779; $p > 0,10$) indicando que os haplótipos são seletivamente equivalentes e sugerindo que a variação no loco analisado não pode ser explicada diretamente por deriva genética e podem ser resultantes do efeito da seleção ou rápida expansão populacional.

Tabela 6. Frequências haplotípicas, diversidade nucleotídica (π), diversidade haplotípica (Hd) e número de sítios polimórficos, dentro das populações e nos dados totais, de *S. plicata*.

População de <i>S. plicata</i>	Haplótipos								N	π	Hd	Nº de sítios polimórficos
	1	2	3	4	5	6	7	8				
Florianópolis (RB)	3	-	1	-	-	-	-	1	5	0,01281	0,700	18
Penha (PE)	4	-	-	-	-	1	-	1	6	0,01163	0,600	19
Ilha do Mel (IM)	3	-	2	-	-	-	-	1	6	0,01139	0,733	18
Rio de Janeiro (RJ)	4	-	1	-	1	-	-	-	6	0,00332	0,600	5
Flórida (FL)	-	-	-	3	1	3	-	-	7	0,00153	0,714	2
Califórnia (CA)	2	-	-	-	-	-	2	2	6	0,01993	0,800	21
Japão (JP)	2	1	3	-	-	-	1	-	7	0,00390	0,810	6
Total	18	1	7	3	2	4	3	5	43	0,00970	0,782	

		*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
		14	48	62	123	156	219	228	252	258	264	267	285	296	305	336	402	423	432	434	441	483	561
Consenso		T	C	A	T	C	G	T	G	A	T	G	A	T	T	G	G	A	A	T	G	A	A
Hap 1	(18)
Hap 2	(1)	.	.	G
Hap 3	(7)	.	.	G	G
Hap 4	(3)	G	.	G	G	.	.
Hap 5	(2)	G	.	G	A	G	.	.
Hap 6	(4)	G	.	G	C	G	.	.
Hap 7	(3)	G	.	G	A	C	G	.	.
Hap 8	(5)	.	T	.	C	A	A	C	.	G	A	A	G	.	C	A	A	G	G	.	A	C	.

Figura 5. Variação das seqüências entre os 8 haplótipos de 562 pb do gene de COI de *S. plicata*. Somente as posições diferentes do consenso são mostradas. Os números no topo (lidos verticalmente) indicam os sítios variáveis e os asteriscos mostram aqueles cujas mudanças foram não-sinônimas. O número de indivíduos pertencentes a cada haplótipo é mostrado entre parênteses após o nome do haplótipo.

Relações filogenéticas

A relação filogenética dos haplótipos de *S. plicata* indicada pela Inferência Bayesiana (BI) apontou o haplótipo 8 como sendo o mais distante, geneticamente, dos demais haplótipos (Figuras 6 e 7). Observando a árvore não enraizada (Figura 6) pode-se verificar a formação de dois haplogrupos. O primeiro, envolvendo os haplótipos 4, 5, 6 e 7 e o segundo formado pelos haplótipos 1, 2, 3 e 8. Esses dois haplogrupos foram suportados por um valor de 100 % de probabilidade posterior, entretanto, o valor de “bootstrap” (75%) não foi significativo (Figura 7). O haplogrupo um é marcado pela ausência das localidades de Florianópolis (RB) e Ilha do Mel (IM) e pela presença exclusiva da localidade da Flórida (FL).



Figura 6. Relação filogenética entre os haplótipos de *S. plicata* obtida pela análise de Inferência Bayesiana (BI). Árvore não-enraizada. RB - Florianópolis, PE - Penha, IM - Ilha do Mel, RJ - Rio de Janeiro, FL - Flórida, CA - Califórnia e JP - Japão.

O método de Neighbor-joining (NJ) gerou uma árvore ($L=23$, $CI=0,957$, $RI=0,889$, $RC=0,850$, $HI=0,043$) com topologia idêntica à obtida pela Inferência Bayesiana, reforçando o distanciamento genético do haplótipo 8 em relação aos outros haplótipos e a sua relação de proximidade com o haplótipo 1.



Figura 7. Filograma dos haplótipos de *S. plicata* obtido pela análise de Inferência Bayesiana (BI). Números entre ramos representam: probabilidade posterior (a esquerda da barra) e valores de "bootstrap" (a direita da barra). São mostrados apenas os suportes maiores que 50%. RB - Florianópolis, PE - Penha, IM - Ilha do Mel, RJ - Rio de Janeiro, FL - Flórida, CA - Califórnia e JP - Japão.

As distâncias genéticas entre os haplótipos foram baixas, entretanto, o haplótipo 8 apresentou, comparativamente, os mais elevados valores (Tabela 7) apresentando uma média de $0,033\pm 0,003$ (média \pm DP).

Tabela 7. Distância genética absoluta entre haplótipos.

	Hap1	Hap 2	Hap 3	Hap 4	Hap 5	Hap 6	Hap 7	Hap 8
Hap 1	-							
Hap 2	0.00181	-						
Hap 3	0.00362	0.00181	-					
Hap 4	0.00542	0.00362	0.00542	-				
Hap 5	0.00723	0.00542	0.00723	0.00181	-			
Hap 6	0.00723	0.00542	0.00723	0.00181	0.00362	-		
Hap 7	0.00904	0.00723	0.00904	0.00362	0.00181	0.00542	-	
Hap 8	0.02893	0.03074	0.03255	0.03436	0.03617	0.03255	0.03797	-

Rede de haplótipos e NCA (“Nested Clade Analysis”)

Foram encontradas duas redes conectas ambigualmente por 16 substituições (Figura 8). A rede dois foi representada apenas pelo haplótipo oito. O haplótipo dois foi considerado um provável haplótipo ancestral, com uma probabilidade de 44,1%. Os haplótipos 1 e 3 ficaram separados do grupo externo por apenas um passo mutacional, o haplótipo 4 por dois passos, os haplótipos 5 e 6 por três passos e o haplótipo 7 por quatro. O haplótipo 8 foi conectado de forma ambígua, uma vez que o número máximo de substituições para uma conexão parcimoniosa, com 95% de confiança, foi estimado em 10 passos. Nenhum haplótipo intermediário foi amostrado entre as duas redes, entretanto, uma futura conexão não pode ser descartada.

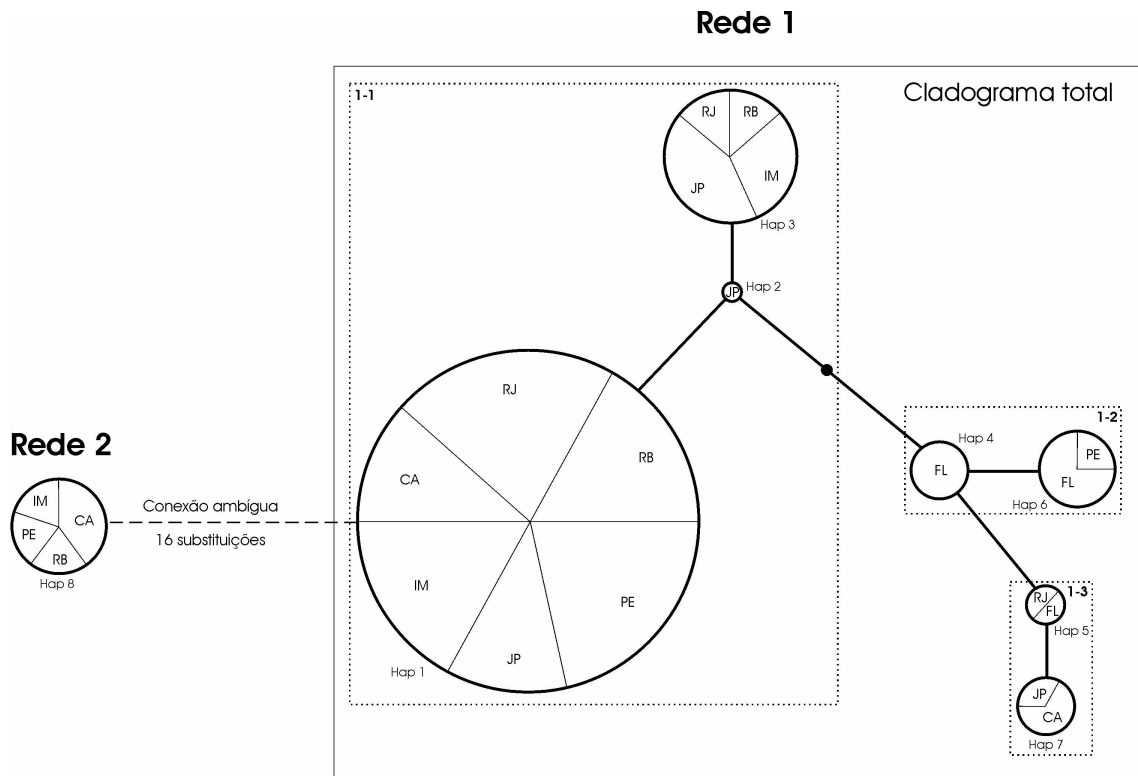


Figura 8. Rede de haplótipos e design da NCA. Linhas entre haplótipos representam um passo mutacional e ponto negro representa um haplótipo intermediário perdido ou não amostrado. Frequências dos haplótipos (número de indivíduos dentro de cada haplótipo) são representadas pela área dos círculos. As caixas pontilhadas agrupam os haplótipos em clados de um passo e a linha tracejada representa conexão ambígua.

Os resultados da NCA mostraram que a maioria das associações não foi significativa, indicando a falta de estruturação geográfica nos dados obtidos. Entretanto, alguns valores significativos foram verificados e indicaram associações para as quais foi possível apontar relações filogeográficas (Tabela 8). Seguindo a chave de inferência (Templeton 2004), foi apontada uma faixa contígua de expansão para o clado 1-1 (que inclui haplótipos encontrados em quase todos os locais amostrados, exceto na Flórida) e ao nível do cladograma total.

Tabela 8. Resultados da “nested clade analysis” (NCA) para *S. plicata*.

Clado	Membros do Clado	Dc	Dn	Inferência
1-1	I (interior)	0	17080,0	1-2-11-12
	II (ponta)	7844,4 ^(G)	9089,3 ^(G)	Faixa de expansão contígua
	III (ponta)	14542,1	11536,8	
	IV (ponta)	0	0	
	I-T	-9719,8	7305,4	
1-2	V (interior)	0	2390,0	Não significativo
	VI (ponta)	7966,7	5121,4	
	I-T	-7966,7	-2731,4	
1-3	VII (interior)	11050,0	13243,7	Não significativo
	VIII (ponta)	6520,0	10586,4	
	I-T	4530,0	2657,4	
	Cladograma	1-2 (interior)	5311,1 ^(G)	
Total	1-1 (ponta)	10478,7	10930,5	Faixa de expansão contígua
	1-3 (ponta)	11705,3	11444,8	
	I-T	-5365,4	-323,3	

A coluna “inferência” descreve os passos seguidos na chave de inferência (Templeton 2004) e aponta o processo biológico inferido. (G) e (P) indicam distâncias significativamente grandes ou pequenas. Dc - distância entre os clados, Dn - distância do clado “aninhado”, I-T indica a diferença média entre clados interior e de ponta.

Genética de populações

A diversidade nucleotídica (π) considerando todas as amostras foi de $0,0097 \pm 0,002$ (média \pm DP) e a diversidade haplotípica foi de $0,782 \pm 0,05$ (média \pm DP). Os maiores índices de diversidade nucleotídica foram verificados nas populações onde o haplótipo 8, altamente diferenciado, foi amostrado (Tabela 6). Sendo assim, Califórnia (com dois indivíduos deste haplótipo) foi a população com maior π , $0,01993 \pm 0,005$ (média \pm DP).

Quase todas as populações são relacionadas através de haplótipos coincidentes. O haplótipo 1 foi o mais freqüente e apenas não foi encontrado na Flórida. Haplótipos exclusivos foram verificados no Japão (haplótipo 2) e na Flórida (haplótipo 4). Não foram verificados haplótipos coincidentes entre essa população da Flórida e as populações da Califórnia, Japão e Florianópolis. Ilha do Mel e Florianópolis apresentaram exatamente os mesmos haplótipos.

Os resultados do teste exato para diferenciação das populações (Raymond e Rousset 1995), baseado na freqüência haplotípica entre as diferentes localidades, revelaram significativa heterogeneidade na distribuição dos haplótipos ($p < 0,05$). Não foram verificadas evidências de isolamento pela distância entre as regiões geográficas

(teste Mantel $p=0,80$). Todavia, é preciso ressaltar que, dado o número de seqüências obtidas, provavelmente não houve a plena amostragem dos haplótipos em cada área de coleta.

Os valores de F_{ST} verificados (Tabela 9) indicam pouca estruturação genética e considerável fluxo gênico entre as populações estudadas (Grosberg e Cunningham 2001). O menor valor de F_{ST} (-0.213) foi verificado entre Ilha do Mel e Florianópolis, distantes, aproximadamente, 400 km, enquanto, o maior valor (0,583) foi observado entre Rio de Janeiro e Flórida, distantes cerca de 11.000 km. Entretanto, regiões distantes geograficamente, como Japão e Rio de Janeiro (22.000 km), apresentaram um valor de F_{ST} inferior à zero, indicando a possibilidade de que fluxo gênico e distância geográfica não sejam diretamente relacionados. Valores de F_{ST} foram significativos ($p<0,05$) para todas as comparações envolvendo a população da Flórida indicando divergência genética entre esta população e as restantes.

Tabela 9. Valores de F_{ST} entre as populações estudadas (abaixo da diagonal) e os valores das probabilidades (acima da diagonal).

	Florianópolis	Penha	Ilha do Mel	Rio de Janeiro	Flórida	Califórnia	Japão
Florianópolis	-	0,001	0,001	0,367	1,000 *	0,288	0,880
Penha	-0,196	-	0,306	0,267	0,993 *	0,465	0,939
Ilha do Mel	-0,213	-0,152	-	0,001	0,998 *	0,485	0,674
Rio de Janeiro	-0,008	-0,022	-0,033	-	0,999 *	0,678	0,422
Flórida	0,449	0,367	0,429	0,583	-	0,986 *	0,994 *
Califórnia	-0,111	-0,093	-0,056	0,122	0,292	-	0,916
Japão	0,071	0,089	0,011	-0,041	0,530	0,169	-

* $p > 0,05$

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Morfometria

Os dados morfométricos apresentados neste trabalho são relevantes para o entendimento da variação morfológica intra-específica de *S. plicata*. Entretanto, algumas considerações devem ser levadas em conta para a correta interpretação desses resultados: a) todas as medidas foram realizadas em animais fixados e preservados em formaldeído. Portanto, pode ter havido influência induzida por deformações provocadas pelo processo de preservação; b) a morfometria é uma

técnica muito sensível, e por essa razão, é necessária muita cautela com relação ao tamanho da amostra.

Todos os espécimes analisados apresentaram gônadas, atestando a maturidade sexual. Todavia, a maioria dos indivíduos analisados dentro da população do Rio de Janeiro apresentou níveis iniciais de desenvolvimento gonadal, indicando que esses, possivelmente, seriam animais jovens, o que poderia explicar o pequeno tamanho observado nos animais coletados nesse ambiente. Consideramos que os resultados encontrados nessa população divergem das demais por interferências amostrais e não refletem um padrão morfométrico diferenciado por influência latitudinal. Além disso, os exemplares de *S. plicata* verificados em Angra dos Reis são maiores do que os da Baía de Guanabara (Flávia Marins, comunicação pessoal 2006). A reamostragem da população do Rio de Janeiro seria recomendada.

Tentáculos bifurcados foram verificados em três espécimes (Penha, Ilha do Mel e Califórnia) analisados de *S. plicata*. Essa alteração na forma dos tentáculos pode ser interpretada como sendo uma variação morfológica normal para espécie, ainda não descrita, ou como sendo decorrente de má-formação embrionária ocasionada por agentes poluentes. Efeitos embriotóxicos já foram descritos para *Ciona intestinalis* Linnaeus, 1767 (Bellas et al. 2004) e para a própria *S. plicata* (Cima et al. 1996). Essa variação poderia ser o foco de um estudo morfológico descritivo posterior.

A análise morfométrica demonstrou que, embora o tunicado *S. plicata* seja um organismo desprovido de estruturas rígidas, apresenta dimensões suficientemente estabelecidas e que dados morfométricos podem ser empregados no estudo biométrico da espécie. Não foram observadas diferenças morfológicas visíveis entre os espécimes, entretanto, algumas médias morfométricas foram estatisticamente diferentes entre as populações. Com relação ao tamanho do corpo (comprimento e largura) os maiores exemplares de *S. plicata* foram verificados nas localidades da Flórida, Florianópolis e Califórnia. Dois cenários melhor explicariam as diferenças verificadas. Primeiro, o crescimento estaria sendo influenciado pela temperatura da

água. Resultados experimentais demonstraram que a faixa ideal de crescimento, para *Styela clava* Herdman 1881 (espécie com taxa metabólica similar a da *S. plicata*, Fisher 1976, Ai-Li et al. 2006) oscila entre 16 e 20° C e que o alcance de crescimento para essa espécie decresce com o aumento de temperatura (Ai-Li et al. 2006). No entanto, *S. plicata* tolera grande variação de temperatura (Thiyagarajan e Qian 2003) e sua eficiência de absorção de carbono e nitrogênio (biomassa, portanto) é independente da temperatura (Fisher 1977). Assim, é provável que *S. plicata* não responda à variação térmica da mesma forma que *S. clava*. Além disso, a média da temperatura superficial das águas na Flórida é reconhecidamente maior do que na Califórnia e, portanto, se a relação maior temperatura, menor tamanho fosse correta, essa região não deveria apresentar os maiores indivíduos. O segundo cenário estaria voltado à disponibilidade de alimento relacionada a condições locais e/ou ao fenômeno de ressurgência. A ressurgência (onde massas de águas profundas, frias e ricas em nutrientes, afloram na superfície) é notável na costa da Califórnia (Huyer 1983). A região oeste da Flórida apresenta condições geográficas e climáticas favoráveis à ocorrência de ressurgência (Li e Weisberg 1999) e, recentemente, um estudo baseado em imagens de satélites e em informações locais indicou possíveis pontos de ressurgência na costa oeste da Flórida (Weisberg et al 2004). No Brasil, o fenômeno é conhecido há pelo menos três décadas na região de Cabo Frio (Moreira da Silva e Rodrigues 1973), mas também podem ocorrer pequenas e intermitentes ressurgências ao longo de grande parte da costa brasileira (Schmiegelow 2004). Zonas de ressurgência são encontradas junto ao Cabo de Santa Marta, região sul de Santa Catarina, e na Baía de Paranaguá (Brandini 1990). A forte intrusão da ACAS (Água Central do Atlântico Sul), especialmente no inverno, através do fundo da Plataforma Continental emergindo próximo às áreas costeiras (Brandini 1990), pode ter provável relação com os fenômenos de enriquecimento das águas verificados nessas áreas. Águas ricas em nutrientes poderiam estar favorecendo o crescimento de *S. plicata*

uma vez que estariam propiciando maior desenvolvimento de biomassa disponível para bentos filtradores.

Os resultados da ANOVA, somados ao teste de Tukey-Kramer, demonstraram que embora a maioria das variáveis empregadas apresente significado estatístico, elas comportam-se de forma independente e parecem estar relacionadas ao tamanho do corpo, sendo esta última a mais relevante diferença morfométrica verificada entre as populações. Assim, as variações observadas para *S. plicata* em diferentes localidades poderiam representar respostas independentes a moduladores ambientais (temperatura da água, disponibilidade de alimentos, competição intra-específica, entre outros).

A distribuição das seis populações no diagrama bidimensional proveniente da Análise de Componentes Principais (Figura 4), ponderando-se a população do Rio de Janeiro, nos deu suporte para inferir que as populações são morfologicamente indistinguíveis e, por hora, excluímos a possibilidade de segregação espacial entre as populações.

Dispersão global

Desvendar os mecanismos que levaram uma espécie bentônica, sésil e com larva não-planctotrófica de curta duração (em média 4,5 horas para *S. plicata*) a atingir uma ampla distribuição geográfica não é tarefa fácil. Embora a dispersão de espécies marinhas ocorra de forma natural, geralmente em pequena escala, através das correntes marinhas ou aderidas em materiais flutuantes (Carlton, 1987), o transporte antropogênico tem sido a principal causa de sucessivas invasões bem sucedidas de ascídias exóticas (Lambert 2005). Um fator importante no sucesso de espécies invasoras é o estado de preservação do ambiente invadido. Aqueles ambientes degradados ou fragilizados são mais facilmente colonizados por espécies invasoras (Bax et al. 2001). A tolerância a elevados níveis de poluição e variações ambientais

(salinidade e temperatura) somadas ao rápido crescimento, à rápida maturação sexual e à pouca predação fazem de *S. plicata* um potencial agente invasor.

A presença de ascídias em portos e a movimentação de navios contribuem enormemente para o seu transporte entre continentes (Monniot et al. 1985), sendo o deslocamento de adultos aderidos ao casco de navios considerado o mais provável vetor (Carlton e Geller 1993, Lambert 2001). Os registros históricos demonstram a ocorrência de *S. plicata* em diversas regiões portuárias e a presença de indivíduos da espécie navegando aderidos ao casco de navios não deixam dúvidas de que exista relação entre sua distribuição e a navegação global. O transporte marítimo internacional corresponde, atualmente, a aproximadamente 80% do comércio mundial (Carlton 2001). De 1995 a 2006, mais de 22 mil embarcações passaram pelos Portos de Paranaguá e de Antonina e, nesse período, o número de atracções aumentou cerca de 70% (Fonte: <http://www.portosdoparana.com.br>). Mais ao sul, o Porto de Itajaí registrou um aumento superior a 100% nas atracções entre 1999 e 2006, totalizando quase 6.400 navios atracados. O Porto de Itajaí mantém rotas marítimas semanais com o norte da Europa, Mediterrâneo, Golfo do México (EUA e México), Costa Leste do Atlântico (EUA e Canadá) e Costa Oeste (EUA), Caribe (Jamaica, Porto Rico, Bahamas, República Dominicana) e Japão (Fonte: <http://www.portoitajai.com.br>). Esses dados refletem a tendência de crescimento da comercialização marítima do Sul do Brasil com o resto do mundo e a possibilidade de intensificação das introduções nessa região.

As introduções de *S. plicata* podem não ser tão recentes quanto se imagina. Até meados da década de 40, sua presença não havia sido formalmente registrada na costa oeste dos Estados Unidos (Van Name 1945). Todavia, essa espécie foi erroneamente identificada na Califórnia, em 1915, como *Styela barnharti* (Ritter e Forsyth 1917). Mas, posteriormente, foi reconhecida como sendo pertencente à espécie *S. plicata* (Abott e Johnson 1972). Nas Bermudas foi registrada pela primeira vez em 1945 (Van Name 1945), sendo verificado apenas um espécime. Van Name

(1945) atribui a sua presença à navegação marítima. Em 1972 novos registros foram feitos (Monniot 1972), demonstrando que o transporte permaneceu ativo nos anos subseqüentes e que populações puderam se estabelecer na região. No continente australiano ela ocorre pelo menos desde 1877 (Porto de Sidnei), porém, introduções locais foram registradas em regiões mais a oeste (Kott 1972a), onde não há navegação comercial, sugerindo que a navegação recreacional possa ser um importante vetor na região (Wyatt et al. 2005). Na Nova Zelândia foi registrada pela primeira vez em 1948 (Brewin 1948) e por lá se estabeleceu conforme registros posteriores (Brewin 1958, Millar 1982).

O compartilhamento de haplótipos indica a possibilidade de transporte entre as regiões, seja através de objetos flutuantes à deriva ou através do casco de navios. A Flórida compartilhou haplótipos apenas com o Rio de Janeiro e com a Penha, sugerindo a existência de uma rota exclusivamente atlântica. Rio de Janeiro, Ilha do Mel e Florianópolis compartilharam dois haplótipos com o Japão, indicando uma possível conexão. Para os nossos dados, o Japão parece ser o elo entre os oceanos Pacífico e Atlântico.

Os resultados obtidos com os dados moleculares demonstraram que não há estruturação geográfica evidente e que os haplótipos estão distribuídos aleatoriamente entre as localidades geográficas. Além disso, foi demonstrado estatisticamente que não há isolamento pela distância entre as populações estudadas. Padrões geográficos de variação genética em invertebrados marinhos têm demonstrado que o isolamento pela distância ocorre em ambientes marinhos, mas somente em grandes escalas geográficas (Palumbi 1994). Entretanto, o mesmo haplótipo de *S. plicata* foi verificado em regiões geográficas distantes indicando, aparentemente, que não existem barreiras geográficas influenciando na distribuição da espécie, o que, de certa forma, desfavorece a hipótese de dispersão natural das larvas. Esses resultados parecem confirmar a hipótese histórica de que o padrão de dispersão global de *S. plicata* teria como principal causa a navegação global, considerando que a dispersão mediada pela

ação humana seria um processo aleatório. Contudo, o formato verificado na rede de haplótipos não é compatível com uma expansão populacional recente (topologia em forma de estrela), indicando a possibilidade da distribuição de *S. plicata* ser o resultado de um evento mais antigo ou, ainda, que a amostragem foi insuficiente. Os resultados da NCA apontam para a possibilidade de expansão contígua entre as regiões. Entretanto, o menor *valor de p* verificado ($p = 0,020$) pode ser considerado elevado tomando-se um índice mais rigoroso de confiança ($\alpha = 0,01$) ou após a aplicação de métodos de correção (Correção de Bonferroni, onde $\alpha = 0,007$). Assumindo-se, portanto, um nível descritivo mais rigoroso, a NCA não demonstra estrutura geográfica estatisticamente significativa relacionada à variabilidade genética.

A estrutura genética de uma população invasora depende de vários fatores, incluindo o tamanho efetivo da população introduzida e a diversidade genética da população de origem. Em geral, populações invasoras têm baixa variabilidade gênica, principalmente se a introdução ocorre em um único evento e envolve poucos fundadores (Holland 2000), como verificado na ascídia invasora *Botryllus schlosseri* Pallas, 1766 introduzida em portos ao sul da Europa (Lopes-Legentil et al. 2006).

Nossos resultados apontam para uma elevada diversidade haplotípica ($Hd_{\text{média}} = 0,782 \pm 0,05$) o que, de acordo com o exposto acima não seria esperado em populações invasoras. Contudo, estudos recentes têm demonstrado que é possível encontrar alta variabilidade genética em espécies invasoras tanto sésseis (Turon et al. 2003) quanto vágeis (Barbaresi et al. 2003). Por exemplo, na espécie de caranguejo *Carcinus maenas* Linnaeus, 1758 a diversidade haplotípica verificada em regiões na qual foi introduzida (Roman 2006) foi equivalente àquelas onde é considerada nativa (Roman e Palumbi 2004). Assim, se a introdução envolve um grande número de indivíduos geneticamente diferentes, pode-se observar pouca ou nenhuma redução na diversidade alélica (haplotípica). Logo, a população introduzida que deriva de várias populações previamente isoladas é potencialmente capaz de apresentar uma variedade de descendentes geneticamente diferentes (Holland 2000), minimizando ou

mascarando o efeito fundador (Roman 2006). Além do mais, os registros históricos mais antigos verificados para as diferentes regiões geográficas (1823, 1843, Atlântico Norte; 1883, Atlântico Sul e Mediterrâneo; 1894, Pacífico Norte e 1877, Pacífico Sul) indicam que a ampla distribuição geográfica não é um fato recente e a janela temporal considerada permitiria múltiplas introduções. Concluímos, então, que o amplo padrão de dispersão verificado em *S. plicata* pode ser o resultado de múltiplas introduções a partir de populações nativas e do transporte entre as populações introduzidas.

No presente trabalho, foi encontrado um complexo padrão de distribuição de haplótipos de *S. plicata* que não pôde ser claramente elucidado pelo seqüenciamento de um fragmento da citocromo *c* oxidase subunidade 1. Apresentamos, portanto, indícios moleculares e históricos que sugerem que a ampla distribuição geográfica de *S. plicata* tem na ação antropogênica o seu principal determinante. Contudo, não descartamos a possibilidade de fatores naturais estarem também influenciando na dispersão da espécie, especialmente entre regiões próximas.

Os resultados da rede de haplótipos apontam o haplótipo 2 como sendo o mais provável ancestral, sendo esse um haplótipo exclusivo do Japão. Porém, sua raridade (apenas um espécime amostrado) contraria um dos princípios do modelo neutralista, onde o haplótipo (alelo) mais freqüente é provavelmente o mais antigo (Watterson e Guess 1977), sugerindo, novamente, a necessidade de ampliação da amostragem. Assumindo que a população de origem seja aquela com maior variabilidade genética (Holland 2000), pode-se concluir que a provável região de origem seja aquela com a maior diversidade haplotípica. O Japão apresentou a maior diversidade haplotípica dentre as regiões estudadas ($H_d = 0,810$), mas não foi significativamente maior do que as verificadas na Califórnia ($H_d = 0,800$) ou na Ilha do Mel ($0,733$). A espécie foi considerada nativa das águas do Atlântico Norte (Plough 1978), contudo, esse autor baseou-se apenas na comparação faunística entre o Caribe e a Flórida, não levando em consideração outras regiões. Nossos dados foram insuficientes para elucidar o

centro de origem da espécie e parecem apenas corroborar com a literatura que sugere origem no hemisfério norte para *S. plicata* (Plough 1978, Lambert 2005).

Dois cenários podem explicar as limitações que encontramos na análise dos nossos dados: primeiro, o mtDNA pode não ser apropriado para estudo de populações invasoras como proposto por Holland (2000) ou, segundo, o esforço amostral não foi suficiente para desvendar toda a informação genética contida nas populações estudadas. Descartamos o primeiro cenário considerando que diversos trabalhos têm demonstrado a eficácia do mtDNA em estudos de bioinvasão (Geller et al. 1997, Turon et al. 2003, Mackie et al. 2006). Entretanto, análises fundamentadas em apenas um marcador molecular devem ser ponderadas com cautela, pois, marcadores diferentes podem apresentar diferentes resultados. Sendo assim, concluímos que a obtenção de um número maior de seqüências, a inserção de populações não amostradas e a adição de outros marcadores moleculares, especialmente genes nucleares, poderiam revelar, com mais segurança, as relações filogeográficas entre populações de *S. plicata*.

Especiação Críptica

Estudos taxonômicos empregando marcadores moleculares freqüentemente conduzem à divisão da espécie reconhecida em duas ou mais espécies crípticas (Bastrop et al. 1998, Dawson e Jacobs 2001, Zhang et al. 2004). Espécies crípticas são aquelas morfologicamente indistinguíveis, mas que se diferenciam por outras características biológicas e não se inter cruzam (Futuyma 2002). Embora a fronteira genética entre espécies de ascídias não seja bem conhecida (Knowlton 2000), estudos moleculares relevantes já foram conduzidos com diversos gêneros: *Botryllus* (Aron e Solé-Cava 1991), *Pyura* (Dalby 1997), *Herdmania* (Degnan e Lavin, 1995), *Clavelina* (Tarjuelo et al. 2001), *Pseudodistoma* (Tarjuelo et al. 2004) e *Cystodytes* (López-Legentil e Turon 2006). Em cada um desses casos foi possível diferenciar as espécies crípticas, as quais apresentaram significativa divergência genética. Para Knowlton

(2000), muitas outras espécies crípticas podem ainda ser descobertas entre as ascídias.

Comparando nossos dados, verificamos moderada diferença nucleotídica entre o haplótipo 8 e os demais haplótipos (Tabela 7). Duas possibilidades parecem melhor explicar esses resultados. Na primeira, o haplótipo 8 pertenceria a uma espécie distinta; na segunda, a significativa diferença nucleotídica observada deve-se à ocorrência de cópias nucleares de genes mitocondriais, ou pseudogenes. Pseudogenes nucleares já foram previamente demonstrados para a subunidade 1 da citocromo *c* oxidase (Wallace et al. 1997). No entanto, essa hipótese foi, por hora, rejeitada, considerando a ausência de códons de parada nas seqüências analisadas (Bensasson et al. 2001). A média de 3,3% de divergência observada entre o haplótipo oito e os demais é comparável à taxa de variação de 2,1% da COI verificada na ascídia *Pseudodistoma crucigaster* Gaill, 1972 (Tarjuelo et al. 2004). Esses autores puderam, a partir de análises filogenéticas e populacionais, separar duas linhagens diferentes entre os morfotipos estudados e concluíram que poderiam se tratar de espécies diferentes. Duas prováveis espécies crípticas também foram identificadas em *Clavelina lepadiformes* Müller, 1776 (Ascidiacea). A divergência genética entre elas foi de 5% para um segmento de 500 pb da COI (Tarjuelo et al. 2001). Contudo, para co-espécies de outros invertebrados marinhos, os valores de divergência genética para o mesmo marcador se mostram mais elevados. Espécies irmãs do camarão *Alpheus* diferiram entre 4% e 19% (Knowlton e Weigt 1998) e variações nucleotídicas de 13% a 24% separaram espécies crípticas em *Aurelia* (Dawson e Jacobs 2001).

Considerando a taxa de mutação típica estimada para o mtDNA de 2% por milhão de ano - Ma (Brown et al. 1979) podemos inferir uma data aproximada de 1,65 Ma para a separação entre as duas linhagens, tempo suficiente para uma possível especiação (Mayr 1970). Porém, este é um dado meramente especulativo porque não existe relógio molecular estimado para este grupo.

A quebra na rede de haplótipos, que separa o haplótipo 8 dos demais haplótipos com um nível de confiança de 95% e as relações filogenéticas obtidas pela Inferência Bayesiana e por Neighbor-joining indicam claramente que o haplótipo 8 está geneticamente distante dos demais, corroborando com uma possível especiação. As três análises relacionam o haplótipo 8 ao haplótipo 1, o que pode significar, de fato, alguma relação entre esses haplótipos ou ser apenas resultado da atração de ramos longos.

Considerando que as duas possíveis linhagens foram encontradas em diferentes e distantes regiões geográficas (Atlântico Sul e Pacífico Oeste) e que, ao que tudo indica, a distância não ocasiona isolamento geográfico, pode-se supor que o evento de especiação poderia ter ocorrido em alopatria e que a ocorrência das duas espécies em regiões diferentes seria secundária, considerando as características invasivas e dispersivas da(s) espécie(s).

A ausência de outros fatores de diferenciação, como caracteres morfológicos e isolamento geográfico, somada ao uso de apenas um marcador molecular fazem com que devamos ser cautelosos ao interpretar a divergência genética encontrada. Estudos futuros, combinando outros marcadores moleculares e uma descrição morfológica detalhada, seriam necessários no sentido de determinar o significado evolutivo das diferenças nucleotídicas verificadas e confirmar ou excluir a existência de espécies crípticas em *S. plicata*.

REFERÊNCIAS

- Abbott DP, Johnson JV (1972) The ascidians *Styela barnharti*, *S. plicata*, and *S. montereyensis* in californian waters. Bulletin of the Southern California Academy of Sciences 71(2):95-105
- Ai-li J, Jian L, Chang-hai W (2006) Physiological energetics of the ascidian *Styela clava* in relation to body size and temperature. Comparative Biochemistry and Physiology DOI 10.1016/j.cbpa.2006.08.036
- Aron S, Solé-Cava AM (1991) Genetic evaluation of the taxonomic status of two varieties of the cosmopolitan ascidian *Botryllus niger* (Ascidiaceae: Botryllidae). Biochemical Systematics and Ecology. 19:271-276
- Awise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel, JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between

- Population Genetics and Systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18:489-522
- Ayre DJ, Davis AR, Billingham M, Llorens, Styan C (1997) Genetic evidence for contrasting patterns of dispersal in solitary and colonial ascidians. Marine Biology 130:51-61
- Barbaresi S, Fani R, Gherardi F, Mengoni A, Souty-Grosset C (2003) Genetic variability in European populations of an invasive American crayfish: preliminary results. Biological Invasions 5:269-274
- Bastrop R, Jürss K, Sturmhuber C (1998) Cryptic Species in a Marine Polychaete and Their Independent Introduction from North America to Europe. Molecular Biology and Evolution. 15(2):97-103
- Bax N, Carlton JT, Mathews-Amos A, Haedrich RL, Howarth FG, Purcell JE, Riese A, Gray A (2001) The control of biological invasions in the world's ocean. Conservation Biology 15(5):1234-1246
- Bellas J, Beiras R, Vázquez E (2004) Sublethal Effects of Trace Metals (Cd, Cr, Cu, Hg) on Embryogenesis and Larval Settlement of the Ascidian *Ciona intestinalis*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 46:61-66
- Bensasson D, Zhang DX, Hartl DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. Trends in Ecology & Evolution 16(6):314-321
- Berents P, Hutchings P (2002) Port Survey for Introduced Marine Species - Sydney Harbour - Final Report. Australian Museum Business Services, Sydney
- Bingham BL, Walters LJ (1989) Solitary ascidians as predators of invertebrate larvae: evidence from gut analyses and plankton samples. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 131:147-159
- Brandini FP (1990) Hydrography and characteristics of the phytoplankton in shelf and oceanic waters off southeast Brazil during winter (July/August 1982) and summer (February/March 1984). Hydrobiologia 196:111-148
- Brewin BI (1948) Ascidians of the Hauraki Gulf. Part I. Transactions of the Royal Society of New Zealand 77:115-138
- Brewin BI (1958) Ascidians of the Hauraki Gulf. Part III. Transactions of the Royal Society of New Zealand 85:455-458
- Brown WM, George M, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 76:1967-1971
- Brunetti R (1979) Ascidians of the Venice Lagoon I. Annotated inventory of species. Ann. Inst. Océanogr. 55(1):95-109
- Carlton JT (1987) Patterns of transoceanic marine biological invasions in the Pacific Ocean. Bulletin of Marine Science 41(2):452-465
- Carlton JT, Geller JB (1993) Ecological Roulette: The Global Transport of Nonindigenous Marine Organisms. Science 261:78-82
- Carlton JT (2001) Introduced Species in U.S. Coastal Waters: Environmental Impacts and Management Priorities. Pew Oceans Commission, Virginia
- Carballo JL, Naranjo S (2002) Environmental assessment of a large industrial marine complex based on a community of benthic filter-feeders. Marine Pollution Bulletin 44:605-610
- Cavalcante MCM, Allodi S, Valente AP, Straus AH, Takahashi HK, Mourão PAS, Pavão MSG (2000) Occurrence of Heparin in the Invertebrate *S. plicata* (Tunicata) Is Restricted to Cell Layers Facing the Outside Environment. Biological Chemistry 275(46):36189-36196
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology 9:1657-1659
- Cima F, Ballarin L, Bressa G, Martinucci GB, Burighel P (1996) Embryotoxic effects of organotin compounds on *S. plicata* (Tunicata; Ascidiacea). Fresenius Environmental Bulletin 5(11-12):718-722

- Costa HR (1969) Notas sobre os Ascidiacea brasileiros. VI. Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro 12(5-6):321-325
- Crandall KA (1996) Multiple Interspecies Transmissions of Human and Simian T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus Type I Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 13:115-131
- Dalby Jr JE (1997) Reproductive and electrophoretic evidence for genetic maintenance of dimorphism in the ascidian *Pyura stolonifera* near Melbourne, Australia. *Ophelia* 47:227-243
- Dawson MN, Jacobs DK (2001) Molecular Evidence for Cryptic Species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *The Biological Bulletin* 200:92-96
- Degnan BM, Lavin MF (1995) Highly repetitive DNA sequences provide evidence for a lack of gene flow between two morphological forms of *Herdmania momus* (Ascidiacea: Stolidobranchia). *Marine Biology* 124:293-299
- De Kay JE (1843) *Natural History of New York*. Albany: New York Assembly.
- Edmunds S (2001) Phylogeography of the intertidal copepod *Tigriopus californicus* reveals substantially reduced population differentiation at northern latitudes. *Molecular Ecology* 10:1743-1750
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50
- Fay RC, Johnson JV (1971) Observations on the distribution and ecology of the littoral ascidians of the Mainland coast of southern California. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* 70(3):114-124
- Fiala-Medioni A (1974) Ascidies du benthos rocheux de Banyuls-Sur-Mer. *Inventaire faunistique et notes écologiques*. *Vie Milieu* 24(1):193-207
- Fisher TR (1976) Oxygen uptake of the solitary tunicate *S. plicata*. *The Biological Bulletin* 151:297-305
- Fisher TR (1977) Metabolic Maintenance Costs of the Suspension Feeder *S. plicata*. *Marine Biology* 41:361-369
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-299
- Futuyma DJ (2002) *Biologia Evolutiva*. Funpec, Ribeirão Preto
- Gabriele M, Putrone V, Brunetti R (1997) Morphometrics and energetic value of Adriatic ascidians. *Cahiers de Biologie Marine* 38:169-2174
- Geller JB, Walton ED, Grosholz ED, Ruiz GM (1997) Cryptic invasions of the crab *Carcinus* detected by molecular phylogeography. *Molecular Ecology* 6:901-906
- Ghobashy AFA, Abdel Messeih MK (1991) Ascidians in Egyptian Waters. *J. Egyptian German Society Zool.* 4:313-326
- Goodbody I (1984) Ascidians from Caribbean Shallow Water Localities. *Studies on the fauna of Curaçao and other Caribbean Islands* 203:62-76
- Goodbody I (2003) The Ascidian Fauna of Port Royal, Jamaica. I. Harbor and Mangrove Dwelling Species. *Bulletin of Marine Science* 73(2):457-476
- Goodbody I (2004) Diversity and Distribution of Ascidians (Tunicata) at Twin Cays, Belize. *Atoll Research Bulletin* 524:1-19
- Green P, Luty A, Nair S, Radford J, Raftos D (2006) A second form of collagenous lectin from the tunicate, *S. plicata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 144(3):343-350
- Grosberg R, Cunningham CW (2001) Genetic structure in the sea: from populations to communities. In: Bertness MD et al. (eds) *Marine community ecology*. Sinauer, Sunderland, pp 61-84
- Harant H (1927) La faune ascidiologique de Banyuls et de Cette: essai de révision des ascidies de la Méditerranée occidentale. *Annales de L'Institut Oceanographique de Monaco* 4:209-251
- Harant H, Vernières P (1933) Faune de France - Tuniciers - Fasc. 1: Ascidies 27:1-101

- Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 40:413-427
- Heller C (1878) Beitrage zur nahern Kenntnis der Tunicaten. *Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften in Wien* 77(1): 2-28
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds) (1996) *Molecular Systematics*. Sinauer, Massachusetts
- Holland, BS (2000) Genetics of marine bioinvasions. *Hydrobiologia* 420:63–71
- Huntsman AG (1912) Ascidiens from the coasts of Canada. *Transactions of the Royal Canadian Institute* 9:111-148
- Huyer A (1983) Coastal upwelling in the California current system. *Progress in Oceanography* 12(3):259-284
- Knowlton N, Weigt LA (1998). New dates and new rates for divergence cross the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265:2257-2263
- Knowlton N (2000) Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420:73-90
- Kott P (1952) The Ascidiens of Australia. I - Stolidobranchiata Lahille and Phlebobranchiata Lahille. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 3(3):205-233
- Kott P (1972a) Some Sublittoral Ascidiens in Moreton Bay, and their Seasonal Occurrence. *Memoirs of the Queensland Museum* 16(2):233-260
- Kott P (1972b) The Ascidiens of South Australia II. Eastern Sector of the Great Australian Bight and Investigator Strait. *Transect of the Royal Society of South Australia* 96(4):165-196
- Kott P (1973) Notes on Some Ascidiens from Port Jackson, Botany Bay and Port Hacking, New South Wales. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 97(4):241-257
- Kott P (1985) The Australian Ascidiacea - Phlebobranchia and Stolidobranchia. *Memoirs of the Queensland Museum* 23:1-440
- Kott P, Goodbody I (1980) The ascidiens of Hong Kong. In: Morton BS, Tseng CK (eds) *Proceedings of the first international marine biological workshop: the flora and fauna of Hong Kong and Southern China*. Hong Kong University Press, Hong Kong, pp 503-554
- Lambert G (2001) A Global Overview of Ascidian Introduction and Their Possible Impact on the Endemic Fauna. In: Sawada H, Yokosawa H, Lambert CC (eds) *The Biology of Ascidiens*. Springer-Verlag, Tokyo
- Lambert, G (2005) Ecology and natural history of the protochordates. *Canadian Journal of Zoology* 83(1): 34-50
- Lambert CC, Lambert G (2003) Persistence and differential distribution of nonindigenous ascidiens in harbors of the Southern California Bight. *Marine Ecology Progress Series* 259:145-161
- Lambert G, Faulkes Z, Lambert CC, Scofield VL (2005) Ascidiens of South Padre Island, Texas, with key to species. *Texas Journal of Sciences* 57(3):251-262
- Lesueur, CA (1823) *Ascidia plicata*. Descriptions of several new species of *Ascidia*. *Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 3(1):2-8
- Leung Tack Kit D (1975) Étude qualitative et quantitative des salissures biologiques de plaques expérimentales immergées en pleine eau. 5 - Les ascidies. *Tethys* 7(2-3):223-234
- Li Z, Weisberg RH (1999) West Florida shelf response to upwelling favorable wind forcing: Kinematics. *Journal of Geophysical Research* 104(C6):13507-13528
- López-Legentil S, Turon X (2006) Population genetics, phylogeography and speciation of *Cystodytes* (Ascidiacea) in the western Mediterranean Sea. *Biological Journal of the Linnean Society* 88:203-214

- López-Legentil S, Turon X, Planes S (2006) Genetic structure of the star sea squirt, *Botryllus schlosseri* introduced in southern European harbours. *Molecular Ecology* 15:3957-3967
- Lotufo TMC (2002) Ascidiacea (Chordata: Tunicata) do litoral tropical brasileiro. Tese de Doutorado. São Paulo. Instituto de Biociências da USP, Departamento de Zoologia. p. 183
- Machordom A, Araújo R, Erpenbeck D, Ramos MA (2003) Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Journal of the Linnean Society* 78:235-252
- Mackie JA, Keough MJ, Christidis L (2006) Invasion patterns inferred from cytochrome oxidase I sequences in three bryozoans, *Bugula neritica*, *Watersipora subtorquata* and *Watersipora arcuata*. *Marine Biology* 149:285-295
- Mayr E (1970) Populations, Species and Evolution - An Abridgment of Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Massachusetts
- Millar RH (1955) On a Collection of Ascidiaceans from South Africa. *Proceedings of the Zoological Society of London* 125(1): 169-221
- Millar RH (1958) Some Ascidiaceans From Brazil. *Annals and Magazine of Natural History* 13(1): 497-514
- Millar RH (1966) Ascidiacea - Port Phillip Survey 1957-1963. *Memoirs of the National Museum of Victoria* 27:357-384
- Millar RH (1982) The Marine Fauna of New Zealand: Ascidiacea. *New Zealand Oceanographic Institute Memoir* 85:1-117
- Millar RH (1988) Ascidiaceans collected during the International Indian Ocean Expedition. *Journal of Natural History* 22:823-848
- Monniot C (1969) Sur Une Collection D'Ascidiées de Dakar (Phlébobranches et Stolidobranches). *Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle* 41(3):622-654
- Monniot C (1969-1970) Ascidiées Phlébobranches et Stolidobranches. *Résultats Scientifiques des Campagnes de la "Calypso"* 9:03-59
- Monniot C (1972) Ascidiées Stolidobranches des Bermudes. *Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle* 57:617-643
- Monniot C (1983) Ascidiées littorales de Guadeloupe. IV - Styelidae. *Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle* 5(2):423-456
- Monniot C (2002) Stolidobranch ascidiaceans from the tropical western Indian Ocean. *Zoological Journal of the Linnean Society* 135:65-120
- Monniot C, Monniot F (1983) Navigation ou courants? La colonisation des Açores et des Bermudes par les ascidiées (tuniciers benthiques). *Comptes-Rendus de la Société biogéographique* 59(1):53-58
- Monniot C, Monniot F, Laboute P (1985) Ascidiées du port de Papeete (Polynésie française): relations avec le milieu naturel et apports intercontinentaux par la navigation. *Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle* 7(3):481-495
- Monniot F, Martoja R, Monniot C (1993) Accumulation d'étain dans les tissus d'ascidiées de ports méditerranéens (Corse, France). *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris - Sciences de la vie* 361:588-592
- Moreira da Silva PC, Rodrigues RF (1973) A Ressurgência de Cabo Frio (I). *Publicação do Instituto de Pesquisas da Marinha, Rio de Janeiro*
- Morris RH, Abbot DP, Haderlie EC (1980) Intertidal Invertebrates of California. Stanford University Press, Stanford
- Moure JS, Björnberg TKS, Loureiro TS (1954) Protochordata ocorrentes na entrada da Baía de Paranaguá. *Dusenía* 5(5-6):233-242
- Nakauchi M, Takeshita T (1983) Ascidian one-half embryos can develop into functional adult ascidiaceans. *Journal of Experimental Zoology* 227(1):155-8
- Naranjo AS, Carballo JL, García-Gomes JC (1996) Effects of environmental stress on ascidian population in Algeciras Bay (southern Spain). Possible marine bioindicators? *Marine Ecology Progress Series* 144:119-131
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York

- Nishikawa T (1980) Ascidiens from the Coast of Kii Peninsula, Middle Japan, with Description of Two Species. *Memoirs of the National Science Museum* 13:97-111
- Nishikawa T (1991) The Ascidiens of the Japan Sea. II. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory* 35(1-3):25-170
- Oka A (1935) Report of the Biological Survey of Mutsu Bay 28. *Ascidiae Simplicis*. Scientific Report. Tohoku University. 10(4):428-466
- Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25:547-572
- Perera M, Ballesteros M, Turon X (1990) Estudio de los organismos epibiontes en un cultivo de bivalvos marinos del delta del Ebro. *Cahiers de Biologie Marine* 31:385-399
- Pérès JM (1949) Contribution a l'étude des Ascidiens de la côte occidentale d'Afrique. *Bulletin de l'Institut français d'Afrique noire* 11(1-2):159-207
- Pérès JM (1951) Nouvelle contribution à l'étude des Ascidiens de la Côte occidentale d'Afrique. *Bulletin de l'Institut français d'Afrique noire* 13(4):1051-1071
- Pérès JM (1952) Recueil des Travaux de la Station Marine D'Endoume. *Faculté des Sciences de Marseille* 6:35-44
- Pérès JM (1954) Contribution a l'étude des ascidiens de Tunisie. *Bulletin de Station Océanographique de Salammbô* 49:3-19
- Pérès JM (1958a) Ascidiens récoltés sur les côtes méditerranéennes d'Israël. *Bulletin of the Research Council of Israel* 3-4(7B):143-150
- Pérès JM (1958b) Ascidiens de la Baie de Haifa collectées par E. Gottlieb. *Bulletin of the Research Council of Israel* 3-4(7B):151-164
- Pisut DP, Pawlik JR (2002) Anti-predatory chemical defenses of ascidiens: secondary metabolites or inorganic acids? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 270(2): 203-214
- Plough HH (1978) *Sea Squirts of the Atlantic Continental Shelf from Maine to Texas*. The Johns Hopkins University Press, Maryland
- Posada D, Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16:37-45
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR (2000) GEODIS: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9(4):487-488
- Raftos DA, Briscoe DA (1990) Genetic Basis of Histocompatibility in the Solitary Urochordate *S. plicata*. *Journal of Heredity* 81: 96-100
- Raftos D, Hutchinson A (1997) Effects of Common Estuarine Pollutants on the Immune Reaction of Tunicates. *The Biological Bulletin* 192:62-72
- Raftos DA, Nair SV, Robbins J, Newton RA, Peters R (2002) A complement component C3-like protein from the tunicate, *S. plicata*. *Developmental & Comparative Immunology* 26(4):307-312
- Ramos Espla AA, Buencuerpo V, Vazquez E, Lafarque F (1992) Some biogeographical remarks about the Ascidian littoral fauna of the Straits of Gibraltar (Iberian sector). *Bulletin de l'Institut océanographique Monaco* 9:126-132
- Raymond M, Rousset F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283
- Reish DL (1963) Mass mortality of marine organisms attributed to the "red tide" in southern California. *California Fish and Game* 49:265-270
- Ritter WE, Forsyth RA (1917) *Ascidiens of the littoral zone of southern California*. University of California Publications in Zoology 16:439-512
- Rocha RM, Costa LV (2005) Ascidiens (Urochordata: Ascidiacea) from Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia - Série Zoologia* 95(1):57-64
- Rocha RM, Kremer LP (2005) Introduced Ascidiens in Paranaguá Bay, Paraná, southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22(4):1170-1184

- Rodrigues AS (1962) Algumas ascídias do litoral sul do Brasil. Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo - Zoologia 24:193-216
- Roman J (2006) Diluting the founder effect: cryptic invasions expand a marine invader's range. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences DOI 10.1098/rspb.2006.3597
- Roman J, Palumbi SR (2004) A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. Molecular Ecology 13:2891-2898
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19:1572-1574
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distances. Genetics 145:1219-1228
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19:2496-2497
- SAS Institute (1995) JMP, Statistics and Graphics Guide, Version 3.1. SAS Inc Cary NC
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Molecular Biology and Evolution 4(4):406-425
- Schmiegelow JMM (2004) O Planeta Azul - Uma introdução às Ciências Marinhas. Interciência, Rio de Janeiro
- Sciscioli M, Lepore E, Tursi A (1978) Relazione fra insediamento e riproduzione di *S. plicata* (Les.) (Tunicata). Memorie di Biologia Marina e di Oceanografia 8(3):65-75
- Sims LL (1984) Osmoregulatory capabilities of three macrosympatric stolidobranch ascidians, *Styela clava* Herdman, *S. plicata* (Lesueur), and *S. montereyensis* (Dall). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 82(2-3):117-129
- Stach T, Turbeville JM (2002) Phylogeny of Tunicata inferred from molecular and morphological characters. Molecular Phylogenetic and Evolution 25:408-428
- Swofford DL (2000) PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer, Sunderland
- Tarjuelo I, Posada D, Crandall KA, Pascual M, Turon X (2001) Cryptic species of *Clavelina* (Ascidiacea) in two different habitats: harbours and rocky littoral zones in the northwestern Mediterranean. Marine Biology 139:455-462
- Tarjuelo I, Posada D, Crandall A, Pascual M, Turon X (2004) Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*. Molecular Ecology 13:3125-3136
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A Cladistic Analysis of Phenotypic Associations With Haplotypes Inferred From Restriction Endonuclease Mapping and DNA Sequence Data. Genetics 132:619-633
- Templeton AR (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. Molecular Ecology 7:381-397
- Templeton AR (2001) Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. Molecular Ecology 10:779-791
- Templeton AR (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. Molecular Ecology 13:789-809
- Thiyagarajan V, Qian PY (2003) Effect of temperature, salinity and delayed attachment on development of the solitary ascidian *S. plicata* (Leseuer). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 290:133-146
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 24:4876-4882
- Tokioka T (1951) Contributions to Japanese Ascidian Fauna. IV - Notes on Some Ascidians Collected in Osaka Bay. Publication of the Seto Marine Biological Laboratory 1(4):11-25
- Tokioka T (1953a) Ascidiacs of Sagami Bay. Iwanami Shoten, Tokyo

- Tokioka T (1953b) Contributions to Japanese Ascidian Fauna. VI – Simple Ascidiens of the Museum of Hukui. Publication of the Seto Marine Biological Laboratory 3(1):27-32
- Tokioka T (1954) Contributions to Japanese Ascidian Fauna. X - Notes on Some Ascidiens Collected in Osaka Bay. Publication of the Seto Marine Biological Laboratory 4(1):75-105
- Tokioka T (1960) Contributions to Japanese Ascidian Fauna. XVII Ascidiens found in the benthonic samples dredged in the Ariake Sea 1957-58. Publication of the Seto Marine Biological Laboratory 8(1):205-221
- Tokioka T (1963) Contributions to Japanese Ascidian Fauna. XX. The outline of Japanese ascidian fauna as compared with that of the Pacific coasts of North America. Publication of the Seto Marine Biological Laboratory 11(1):131-155
- Tokioka T (1967) Pacific Tunicata of the United States National Museum. United States National Museum Bulletin 251:1-247
- Tokioka T, Nishikawa T (1975) Contributions to Japanese Ascidian Fauna. XXVII - Some Ascidiens from Okinawa, with notes on a small collection from Hong Kong. Publication of the Seto Marine Biological Laboratory 22(5):323-341
- Traustedt MPA (1883) Vestindiske Ascidiæ simplices. Anden afdeling. Molgulidae og Cynthidae. Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistoriske Forening 1882:108-36
- Traustedt MPA, Weltner W (1894) Bericht über die von Herrn Dr. Sander gesammelten Tunicaten. Archiv Naturges 60:10-14
- Tucker GH (1942) The histology of the gonads and development of the egg envelopes of an ascidian (*S. plicata* Leseuer). Journal of Morphology 70:81-113
- Turon X, Perera M (1988) Las ascidias del delta del Ebro. Aspectos faunísticos y cuantitativos. Publicaciones del Departamento Zoología 14:81-90
- Turon X, López-Legentil S (2004) Ascidian molecular phylogeny inferred from mtDNA data with emphasis in the Aplousobranchiata. Molecular Phylogenetics and Evolution 33:309-320
- Turon X, Tarjuelo I, Duran S, Pascual M (2003) Characterising invasion processes with genetic data: an Atlantic clade of *Clavelina lepadiformis* (Ascidiacea) introduced into Mediterranean harbours. Hydrobiologia 503: 29-35
- Tursi A, Gherardi M, Lepore E (1974) The breeding season of some ascidians of "Mar Piccolo" (Taranto, Italy): preliminary data. Memorie di Biologia Marina e di Oceanografia 4(4-5-6):421-434
- Tursi A (1976) Ascidiens de la Mer Jonienne des parages du nouveau port Italsider (Taranto) première note: campagne 1975. Oebalia 2(1):153-163
- Tursi A, Liaci LC (1983) Settlement Periods of Ascidiens in the Mar Piccolo of Taranto in Ten Years 1972-1982. Oebalia 9:65-80
- Van Name WG (1902) The ascidians of the Bermuda Islands. Transactions of the Connecticut Academy of Sciences 11:325-412
- Van Name WG (1912) Simple ascidians of the coasts of New England and neighbouring British Provinces. Proceedings of the Boston Society of Natural History 34:439-619
- Van Name WG (1945) The North and South American Ascidiens. Bulletin of the American Museum of Natural History. v. 84. Order of the Trustees, New York
- Wallace DC, Stugard C, Murdock D, Schurr T, Brown MD (1997) Ancient mtDNA sequences in the human nuclear genome: a potential source of errors in identifying pathogenic mutations. Proceedings of the National Academy of Sciences 94:14900-14905
- Watterson GA, Guess HA (1977) Is the most frequent allele the oldest? Theoretical Population Biology 11(2): 141-160
- Weisberg RH, He R, Kirkpatrick G, Muller-Karger F, Walsh JJ (2004) A West Florida shelf case study - Coastal Ocean Circulation on Remotely Sensed. Oceanography 17(2):69-75

- Wyatt ASJ, Hewitt CL, Walker DI, Ward TJ (2005) Marine introductions in the Shark Bay World Heritage Property, Western Australia: a preliminary assessment. *Diversity and Distributions* 11:1-33
- Yamaguchi M (1975) Growth and reproductive cycles of the marine fouling ascidians *Ciona intestinalis*, *S. plicata*, *Botrylloides violaceus* and *Leptoclinum mitsukurii* at Abaratsubo-Moroiso Inlet (Central Japan). *Marine Biology* 29:253-259
- Zhang D, Lin K, Hanski I (2004) Coexistence of cryptic species. *Ecology Letters* 7:165-169
- Zanuy H (1990) Lista de ascidias cubanas. *Poeyana*. Instituto de Ecología y Sistemática. Academia de Ciencias de Cuba 388:1-7

APÊNDICE 1

Seqüências alinhadas (562 pb)
Citocromo c oxidase subunidade I
Styela plicata (Leseuer, 1823)

RB14	AATATAACCC	AACCCTTAGT	TTTTATGTTG	AACATCGTAG	TCATAAAATT	AAGAGAACCT
RB16	AATATAACCC	AACCCTTAGT	TTTTATGTTG	AACATCGTAG	TCATAAAATT	AAGAGAACCT
RB13	AACATAACCC	AACCCTTAGT	TTTTATGTTG	AACATAGTAG	TCATAAAATT	AAGAGAACCT

....
185	195	205	215	225	235	

BG01	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
BG08	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
BG02	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
BG03	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
BG06	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
BG07	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
CA04	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
CA09	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
CA07	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATAG	CACAATCCAG	TGCTCCCCCA
CA10	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATAG	CACAATCCAG	TGCTCCCCCA
CA05	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
CA06	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
FL01	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
FL23	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
FL33	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
FL06	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
FL07	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
FL24	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
FL26	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
IM02	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATAG	CACAATCCAG	TGCTCCCCCA
IM01	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
IM03	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
IM41	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
IM44	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
IM45	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
JP03	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
JP04	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
JP05	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
JP06	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
JP10	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
JP02	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
JP07	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
PE03	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
PE30	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
PE34	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
PE35	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
PE32	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATAG	CACAATCCAG	TGCTCCCCCA
PE38	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
RB11	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
RB10	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
RB14	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
RB16	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATGG	CACAATCTAG	TGCTCCCCCA
RB13	AAAATACTAG	AAATTCTAGC	TAGATGTAAG	GAAAAAATAG	CACAATCCAG	TGCTCCCCCA

....
245	255	265	275	285	295	

BG01	GAGTGGGCTA	GATTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCTACTC
BG08	GAGTGGGCTA	GGTTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCTACTC
BG02	GAGTGGGCTA	GGTTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCTACTC
BG03	GAGTGGGCTA	GGTTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCTACTC
BG06	GAGTGGGCTA	GGTTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCTACTC
BG07	GAGTGGGCTA	GGTTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCTACTC
CA04	GAGTGGGCTA	GGTTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCTACTC
CA09	GAGTGGGCTA	GGTTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCTACTC
CA07	GAGTGGGCTA	GGTTTCCGGC	TAGAGGAGGA	TATACCGTCC	ATCTGGTACC	CACCCTACTC
CA10	GAGTGGGCTA	GGTTTCCGGC	TAGAGGAGGA	TATACCGTCC	ATCTGGTACC	CACCCTACTC
CA05	GAGTGGGCTA	GATTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCCCTC
CA06	GAGTGGGCTA	GATTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCCCTC
FL01	GAGTGGGCTA	GGTTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCTACTC
FL23	GAGTGGGCTA	GGTTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCTACTC
FL33	GAGTGGGCTA	GGTTTCCAGC	TAGTGGGGGA	TATACCGTCC	ATCTAGTACC	CACCCTACTC

PE03	GTAACCACAA	CATTATAAAG	CTGACCGTCA	CCAATAACCT	GACCCACTTG	AGACAATTCT
PE30	GTAACCACAA	CATTATAAAG	CTGACCGTCA	CCAATAACCT	GACCCACTTG	AGACAATTCT
PE34	GTAACCACAA	CATTATAAAG	CTGACCGTCA	CCAATAACCT	GACCCACTTG	AGACAATTCT
PE35	GTAACCACAA	CATTATAAAG	CTGACCGTCA	CCAATAACCT	GACCCACTTG	AGACAATTCT
PE32	GTCACCACAA	CATTATAAAG	CTGACCGTCA	CCAATAACCT	GACCCACTTG	AGACAATTCT
PE38	GTAACCACAA	CATTATAAAG	CTGACCGTCA	CCAATAACCT	GACCCACTTG	AGACAATTCT
RB11	GTAACCACAA	CATTATAAAG	CTGACCGTCA	CCAATAACCT	GACCCACTTG	AGACAATTCT
RB10	GTAACCACAA	CATTATAAAG	CTGACCGTCA	CCAATAACCT	GACCCACTTG	AGACAATTCT
RB14	GTAACCACAA	CATTATAAAG	CTGACCGTCA	CCAATAACCT	GACCCACTTG	AGACAATTCT
RB16	GTAACCACAA	CATTATAAAG	CTGACCGTCA	CCAATAACCT	GACCCACTTG	AGACAATTCT
RB13	GTCACCACAA	CATTATAAAG	CTGACCGTCA	CCAATAACCT	GACCCACTTG	AGACAATTCT

....|....||....| ..
545 555

BG01	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
BG08	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	GC
BG02	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
BG03	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
BG06	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
BG07	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
CA04	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
CA09	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
CA07	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
CA10	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
CA05	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
CA06	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
FL01	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
FL23	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
FL33	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
FL06	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
FL07	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
FL24	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
FL26	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
IM02	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
IM01	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	GC
IM03	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
IM41	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
IM44	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	GC
IM45	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
JP03	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
JP04	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
JP05	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
JP06	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	GC
JP10	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	GC
JP02	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	GC
JP07	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
PE03	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
PE30	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
PE34	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
PE35	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
PE32	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
PE38	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
RB11	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
RB10	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
RB14	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC
RB16	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	GC
RB13	GTCCGAATTA	ACACACTCAT	AC

Correção gramatical e de estilo
Maria do Desterro Brisolla Maciel Barros
Especialista em Língua Portuguesa