

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA WILHELMINA BARBOSA DE OLIVEIRA PIL

FILOGEOGRAFIA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *RHIZOPHORA MANGLE* L.
(RHIZOPHORACEAE) AO LONGO DA COSTA BRASILEIRA

CURITIBA
2009

MARIA WILHELMINA BARBOSA DE OLIVEIRA PIL

FILOGEOGRAFIA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *RHIZOPHORA MANGLE* L.
(RHIZOPHORACEAE) AO LONGO DA COSTA BRASILEIRA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Área de concentração em Ecologia de Populações, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Prof^a Dr.^a Maria Regina T. Boeger.

Co-orientadora: Prof^a. Dr.^a. Valéria C. Muschner

CURITIBA
2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Zenaide Barbosa, em especial, pelo apoio incondicional à essa e a todas as fases da minha vida e pelo exemplo de vitória que tento seguir. Ao meu noivo, Junior, pelas constantes discussões sobre rizóforas, avicénias, manguezais, caranguejos, etc. e pelo exaustivo, porém divertidíssimo, trabalho de coleta. Sem você esse trabalho não seria o mesmo.

Agradeço aos meus orientadores, cada um com sua indispensável participação na minha formação: Prof^a. Dr^a. Maria Regina Boeger, minha orientadora desde cedo e responsável por grande parte da minha educação acadêmica. Regina, obrigada pelo apoio durante tantos anos, dentre tantos trancos e barrancos. Pela preocupação com a minha vida não só profissional, como pessoal. Para mim você é muito mais que uma orientadora, é uma grande amiga para o resto da vida. Ao Prof. Dr. Walter Boeger, o meu querido não-orientador, modelo para todas as minhas atitudes profissionais. Obrigado por me agüentar no seu laboratório e apoiar minha vida acadêmica. Serei eternamente grata a vocês dois. Ao Prof. Dr. Márcio Pie pelas constantes salvaçãoes quando o quesito é entender o que parecia incompreensível. À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Valéria Muschner, que de fininho veio chegando e hoje em dia é o meu ombro para assuntos acadêmicos e pessoais. Minha grande amiga, amo você.

À minha amiga Letícia Larcher, companheira de laboratório, de risadas, de macerações penosas, só porque não dá pra me deixar sofrer sozinha. Obrigada pelos muitos momentos de felicidade durante todos esses anos de contagens de estômatos e maceração de plantinhas. Aos meus colegas do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva pela ajuda nos processos laboratoriais, às vezes intrigantes. Especialmente, obrigada José Francisco de Oliveira Neto, aprendi muita coisa com você, obrigada pela paciência e interesse em ensinar.

Aos pesquisadores Prof. Dr. Ulf Mehlig, Profa. Dra. Moirah Menezes e em especial à Profa. Dra. Marivana Silva, pela ajuda com a coleta em Bragança e pela excelente hospitalidade. Ao Carlos Brito, Fernando Matos e ao meu pai, Emmanuel Pil, pelo esforço de coleta no nordeste.

Ao CNPq, CAPES, GIA e ao curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da UFPR pelo apoio financeiro.

RESUMO

A variabilidade genética dentre e entre populações do mangue vermelho, *Rhizophora mangle*, foi analisada através de quatro marcadores moleculares de microssatélites. Dez populações distribuídas entre os estados do Pará e Santa Catarina ao longo da costa brasileira foram amostradas. Uma baixa variabilidade genética na espécie foi detectada através de número (13) e riqueza alélica ($A = 2,28 - 1$) e índice de heterozigosidade ($H = 0 - 0,35$). A baixa variabilidade foi confirmada através da análise dois marcadores de RAPD, que amplificaram apenas 25 bandas, sendo que nenhuma foi específica para apenas uma população. As análises de microssatélite indicaram que as populações de *R. mangle* ao longo da costa são geneticamente diferenciadas ($R_{st} = 0,31$; $P < 0,001$), principalmente entre populações localizadas ao norte e ao sul da costa brasileira. As populações do Pará e Maranhão apresentaram uma variabilidade significativamente maior das demais. Essa diferença parece refletir a maior idade desses manguezais nessa região, que provavelmente prevaleceram durante a glaciação no Quaternário. Populações mais ao sul são mais recentes, resultantes do processo de dispersão e subsequente colonização de estuários durante o aquecimento gradativo na direção sul ao final do período glacial. A baixa variabilidade observada nas populações de *R. mangle* desses manguezais aparentemente reflete a sua idade recente associada com redução alélica, resultado de efeitos fundadores consecutivos. O estudo da filogeografia e estruturação genética de *R. mangle* ao longo da costa brasileira fornece conhecimento para subsidiar planos de manejo e conservação da espécie no País. A estruturação genética encontrada entre as populações sugerem que os esforços para conservação dessa espécie devam ser não apenas na preservação de grandes áreas, mas também em um maior número de populações separadas.

Palavras-chave: Estruturação genética. Mangue vermelho. Microssatélites. Variabilidade genética.

ABSTRACT

The genetic variability among and between populations of the red mangrove, *Rhizophora mangle*, were analyzed with four microsatellite markers. Ten populations along the Brazilian coast, between Pará and Santa Catarina States, were sampled. Low genetic variability was detected with allelic number (13) and richness ($A = 2,28 - 1$) and heterozygosity index ($H = 0 - 0,35$). The low variability was confirmed with the analysis of two RAPD markers, which amplified just 25 bands, with no specific bands to any population. Microsatellite analysis indicated *R. mangle* populations along the coast are genetically different ($R_{st}=0,31$; $P<0,001$), specially between populations from the north and south of the coast. Population from Pará and Maranhão States showed a significantly greater variability comparing to the others. This difference seems to be the reflection of the older age of these mangroves, which prevailed during the glaciations periods of the Quaternary age. South populations are probably more recent, and the result of dispersion and consequent colonization of estuaries during the gradual warming in the south direction by the end of the glacial period. The low variability observed in the *R. mangle* population of these mangroves reflects their recent age associated with allelic reduction, resulting from the consecutive founder events. The phylogeography and study of the genetic structure of *R. mangle* along the Brazilian coast provides knowledge to support management plans and conservation efforts of the species in the country. The genetic structure found between the populations suggests that the efforts for conservation of the species should be not only in preserving large areas, but also small separate ones.

Key words: microsatellites. Genetic structure. Genetic variability. Microsatellites. Red mangrove.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Mapa com as localizações das populações de *R. mangle* estudadas ao longo da costa brasileira.....13
- FIGURA 2 - Exemplo de visualização dos alelos em forma de picos dos quatro oligonucleotídeos iniciadores de microssatélites utilizados. A. RM19. B. RM38. C. RM41. D. RM46.....16
- FIGURA 3 - Dendrograma Neighbor-joining, elaborado a partir das distâncias genéticas de Nei (1972) entre populações de *R. mangle*.....25
- FIGURA 4 - Fotografia de gel de agarose mostrando padrão de bandas da população do Pará obtido com o oligonucleotídeo iniciador de RAPD, OPA10.....26
- FIGURA 5 - Figura 5. Esquemas das principais correntes ao redor da Corrente Sul Equatorial. Modificado de Fratantoni *et al.*, 2000.....31
- FIGURA 6 - Correntes climatológicas da costa brasileira em 30 de Abril e 31 de Agosto. Cores mais quentes indicam correntes mais fortes. Fonte: www.aoml.noaa.gov.....32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Localização, coordenadas geográficas e número de indivíduos amostrados (N) das populações de <i>R. mangle</i> estudadas.....	15
TABELA 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo, com suas respectivas seqüências e marcação utilizadas e o tipo de repetição da região de microssatélite por eles amplificada.....	15
TABELA 3 - Oligonucleotídeos iniciadores de RAPD e suas respectivas seqüências de bases.....	18
TABELA 4 - Distâncias geográficas entre pares de população de <i>R. mangle</i>	19
TABELA 5 - Frequência alélica observada por locos e população. O número do alelo é representado pelo seu tamanho em pares de base.....	21
TABELA 6 - Riqueza alélica por população (A), heterozigosidade esperada (H_e) e heterozigosidade observada (H_o) para cada uma das populações de <i>R. mangle</i> estudadas. A heterozigosidade de Nei (H) é mostrada por população e as médias das populações do AP e PA e das restantes, com o desvio padrão em parênteses.....	22
TABELA 7 - AMOVA para todas as populações de <i>R. mangle</i> amostradas.....	23
TABELA 8 - AMOVA considerando as populações em dois grupos, sendo um formado pelas populações do PA e MA e o outro, pelas demais populações.....	23
TABELA 9 - Estruturação genética baseada na AMOVA pareada das populações de <i>R. mangle</i> estudadas. O símbolo + indica diferenciação genética significativa ao nível de $P < 0,0011$ e o símbolo - indica ausência de estruturação.....	24
TABELA 10 - Distâncias genéticas de Nei (1972) entre pares de população de <i>R. mangle</i>	24
TABELA 11 - AMOVA para todas as populações de <i>R. mangle</i> amostradas.....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 Procedimento amostral e isolamento de DNA.....	12
2.2 Análise de microssatélite.....	13
2.3 “Random Amplification of Polymorphic DNA”.....	16
2.4 Análises estatísticas.....	18
2.4.1 Análises de microssatélites.....	18
2.4.2 Análises de RAPD.....	19
3 RESULTADOS	20
3.1 Análises de microssatélites.....	20
3.1.2 Diversidade genética.....	20
3.1.3 Estruturação genética.....	21
3.1.4 Distâncias genéticas.....	24
3.2 Análises de RAPD.....	25
4 DISCUSSÃO	27
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

Os manguezais correspondem a um ecossistema cujo tipo de vegetação arbóreo-arbustiva se desenvolve principalmente nos solos pouco consolidados dos rios tropicais e subtropicais ao longo da zona de influência das marés. Eles ocorrem tanto para o interior do estuário, onde as variações de marés impulsionam as águas salgadas do mar para dentro do continente, como para as laterais dos rios, em zonas sujeitas a inundações. Manguezais são caracterizados por uma baixa diversidade de espécies arbóreas, resistentes às condições halófilas das águas estuarinas ou marinhas (Maia *et al.*, 2006). No Brasil, os manguezais ocupam uma fração significativa do litoral, cerca de 92% da linha de costa, o que corresponde a aproximadamente 6.800 km, estendendo-se do extremo norte, no Oiapoque, Estado do Amapá, até seu limite sul, em Santa Catarina (Schaeffer-Novelli *et al.*, 1990). Esse ecossistema é extremamente suscetível a variações de nível do mar e a mudanças climáticas (Gornitz, 1991).

Os manguezais desempenham um papel fundamental na estabilidade da geomorfologia costeira, na conservação da biodiversidade e na manutenção de amplos recursos pesqueiros, geralmente utilizados por populações locais (Maia *et al.*, 2006). Por serem ambientes de imenso valor ecológico e ambiental, a legislação brasileira considera as áreas de manguezal como áreas de preservação permanente (Resolução Conama 303/02). Apesar dos esforços para sua conservação, os manguezais encontram-se permanentemente ameaçados por diversas atividades humanas desenvolvidas tanto no litoral quanto no interior. Os principais vetores potenciais geradores de impactos sobre os manguezais são as barragens em rios, a agropecuária, incluindo a aqüicultura, e a urbanização, decorrente da especulação imobiliária, as quais resultam em pressões sobre o balanço de sedimentos e águas em estuários, fluxo de nutrientes e poluentes, além do desmatamento direto das florestas (Maia *et al.*, 2006).

Em todo o mundo, existem apenas 28 gêneros e cerca de 70 espécies de plantas de mangue, sendo 17 exclusivamente presentes em manguezais (Duke *et al.*, 1998). Apesar da alta taxa de endemismo, a riqueza de espécies é baixa e provavelmente influenciada pelas condições encontradas nesses ambientes submetidos a oscilações de marés e a alta salinidade, onde, aparentemente, existem

menos oportunidades para o estabelecimento de espécies menos aptas a estas condições e posterior diversificação de linhagens características de manguezais (Duke *et al.*, 1998).

No Brasil, o ecossistema manguezal pode ser representado por uma restrita associação de espécies de *Rhizophora* L., *Avicennia* L., *Laguncularia* C.F. Gaertn e *Conocarpus* L. (Por, 1994). *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), o mangue vermelho, é uma das principais espécies representantes deste ecossistema. Apresenta raízes aéreas que permitem uma maior sustentação em solos pouco consolidados. Localiza-se nas porções de baixas e médias salinidades dentro da zonação estuarina (Maia *et al.*, 2006). A polinização da espécie ocorre pelo vento e a reprodução da espécie parece se dar principalmente por autopolinização, apesar de também ocorrer polinização cruzada. (Menezes *et al.*, 1997). *Rhizophora mangle* tem uma distribuição ampla, ocorrendo do oeste da África à costa Pacífica tropical da América (Tomlinson, 1986). No Brasil, a espécie ocorre ao longo de toda a distribuição de manguezal do país, desde o norte, no Amapá, ao sul, em Santa Catarina. Entretanto, do sentido norte para o sul da costa brasileira, os manguezais vão se tornando mais escassos e apresentam árvores de menor porte. Provavelmente, porque no sul, a amplitude de maré e a temperatura são menores e a planície costeira é restrita pela Serra do Mar (Schaeffer-Novelli *et al.*, 1990).

Todas as espécies arbóreas dos manguezais possuem dispersão pela água. Uma característica distinta da maioria das espécies é que elas produzem uma estrutura de propagação alongada, conhecida como propágulo. Esse termo é utilizado porque, na maioria das espécies, a estrutura liberada pela planta-mãe já é uma plântula, não um fruto ou semente. Após a polinização, o embrião permanece na planta-mãe e dependente dela por um período que pode se estender por meses. Esse fenômeno é conhecido como viviparidade (Hogarth, 1999). *Rhizophora mangle* é uma espécie vivípara e seus propágulos são curvos e flutuam na água antes de se estabelecerem. Essas estruturas conseguem dispersar por longas distâncias, pois permanecem viáveis por um ano ou mais (Rabinowitz, 1978). Como a dispersão dos propágulos tem um papel importante na colonização de novos ambientes, a capacidade de dispersão tem uma influência particularmente forte na estruturação e distribuição desta (Cain *et al.*, 2000).

Padrões atuais de fluxo gênico podem ostentar pouca semelhança às conexões históricas entre populações, mas ambos são relevantes para a distribuição de espécies e genes (Freeland, 2005). Compreender como eventos históricos ajudaram a formar a atual distribuição de genes, populações e espécies é o principal objetivo da filogeografia. Uma interpretação mais atual da filogeografia permite a utilização de marcadores como microssatélites e AFLP, que geram informações sobre a similaridade genética entre populações baseados em frequência alélica, que por sua vez, gera informações sobre o fluxo gênico e subdivisão genética de populações, sendo então úteis para os estudos de filogeografia (Freeland, 2005). Esses estudos têm importância também na identificação de unidades genéticas para conservação por ter o potencial de revelar a diversidade intra-específica (Taberlet *et al.*, 1991).

Espécies de plantas de manguezal estão constantemente submetidas a um estresse fisiológico. Apesar da condição extrema em que vivem, elas colonizaram com sucesso essas áreas através de adaptações morfológicas, fisiológicas e reprodutivas (Tomlinson, 1986). Diferentes espécies apresentam graus de polimorfismos variáveis. Não há uma congruência entre as espécies estudadas em relação ao seu grau de polimorfismo. Apesar de presentes no mesmo ambiente, possuem diferentes graus de polimorfismo, sendo em algumas baixo, como em *Acanthus ilicifolius* (L.), na Índia (Lakshmi *et al.*, 1997), *Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco (Ge e Sun, 1999) e *Kandelia candel* (L.) Druce., na China (Sun *et al.*, 1998), e em outras alto, como detectado para *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh., na Índia (Parani *et al.*, 1997), *Avicennia germinans* (L.) Stearn, na Colômbia (Cerón-Souza *et al.*, 2005), e *Ceriops decandra* (Griff.) Ding Hou, na Malásia e Austrália (Tan *et al.*, 2005).

Estudos sobre a variabilidade genética de *R. mangle* ainda são escassos. Núñez-Farfán *et al.* (2002) analisaram populações nas costas do Atlântico e do Pacífico, no México, e demonstraram que as populações dessa espécie são geneticamente distintas nas duas regiões estudadas. Outro estudo, realizado por Arbeláez-Cortes *et al.* (2007), mostrou que as populações de *R. mangle* da costa do oceano Pacífico da Colômbia são geneticamente estruturadas e com alta variabilidade genética.

Segundo Frankham (2005) a variabilidade genética é um fator chave na adaptação e, portanto, na sobrevivência de populações de espécies. Conseqüentemente, variabilidade reduzida pode diminuir a possibilidade das espécies se adaptarem a longo prazo e, mais imediatamente, pode levar ao decréscimo na aptidão das populações. Portanto, segundo esse autor, avaliações da diversidade genética são comuns em genética populacional e são particularmente importantes para a genética da conservação.

Informações sobre os padrões de dispersão de alelos e estruturação genética das populações de *R. mangle* ao longo da costa brasileira são importantes não apenas para compreensão da dinâmica e fluxo gênico recentes entre elas, mas também para subsidiar modelos gerais de diversificação evolutiva e desenvolvimento de estratégias efetivas para conservação. Em vista disso, este estudo apresenta dados de marcadores microssatélites que permitiram estimar parâmetros genéticos populacionais de *R. mangle*, em populações distribuídas ao longo da costa brasileira. Os objetivos foram quantificar a variabilidade genética das populações e inferir o padrão de diferenciação entre elas baseado na estruturação genética e fluxo gênico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedimento amostral e isolamento de DNA

Folhas de 145 indivíduos de *R. mangle* foram coletadas em dez populações distribuídas ao longo da costa brasileira (Figura 1, Tabela 1). Onde o tamanho da população permitia, foram selecionados para a amostra, indivíduos que estavam distanciados a pelo menos 10 m. As folhas coletadas foram desidratadas em sílica gel e depois pulverizadas com auxílio de nitrogênio líquido e congeladas a -20°C até seu processamento. O DNA foi extraído seguindo o procedimento padrão do kit DNeasy Plant Mini[®], da Qiagen, e preservados a -20°C em tampão AE, que acompanha o kit.

2.2 Análise de microssatélites

Microssatélites são repetições de um a seis nucleotídeos encontrados em alta frequência no genoma da maioria dos táxons. As seqüências de microssatélites são extremamente mutáveis, alterando em número de repetições, o que resulta na mudança do tamanho dos fragmentos. Essa mudança gera diferentes alelos para o mesmo *locus* de microssatélite. A maioria deles tem alta taxa de mutação, o que resulta em altos níveis de diversidade alélica, úteis para estudos genéticos (Selkoe e Toonen, 2006). Portanto, a amplificação dessas regiões do genoma tem sido uma das técnicas moleculares mais usadas por ter o potencial de gerar dados sobre migração e estimar a relação entre os indivíduos estudados (Selkoe e Toonen, 2006).



Figura 1. Mapa com as localizações das populações de *R. mangle* estudadas ao longo da costa brasileira.

A variabilidade genética das populações de *R. mangle* foi analisada através da amplificação de regiões de microssatélite nucleares através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizados quatro conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos para *R. mangle* por Rosero-Galindo *et al.* (2002). Um oligonucleotídeo iniciador de cada par foi marcado com fluorescência (Tabela 2, Figura 2). O processo de amplificação de PCR foi realizado em um termociclador Personal Cycler, Eppendorf, com um volume total de 25µL, contendo 0,2ng de DNA, Tampão 1x sem Magnésio, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de DNTP (Biotools), 1,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,625U de Taq Polymerase *Platinum* (Invitrogen). Todas as reações foram feitas pelo robô de pipetagem CAS-1200[®] (Corbett Life Science). As condições de amplificação foram 94°C por três minutos, 35 ciclos de 95°C por 30s, 52°C por 1 minuto, 70°C por 1 minuto e uma extensão final de 1 hora a 70°C.

Após a PCR, os alelos de cada marcador foram definidos através de eletroforese em um seqüenciador automático de DNA, ABI 3130, e subsequentemente visualizados no programa GeneMapper[®] v.3.7 (Applied Biosystems). Através desse programa, os indivíduos foram mapeados de acordo com os tamanhos em pares de base dos alelos de microssatélite amplificados.

Tabela 1. Localização, coordenadas geográficas e número de indivíduos amostrados (N) das populações de *R. mangle* estudadas.

Localização	Coordenadas	N
Pará (PA) Bragança	0°50'19"S 46°36'44"O	15
Maranhão (MA) Barreirinhas	2°36'43"S 42°41'38"O	15
Rio Grande do Norte (RN) Natal	5°45'40"S 35°12'45"O	12
Pernambuco (PE) Jaboatão dos Guararapes	8°13'36"S 34°56'11"O	15
Sergipe (SE) Aracajú	11° 5'52"S 37° 9'12"O	13
Bahia (BA) Ilhéus	14°48'39"S 39° 2'54"O	15
Rio de Janeiro (RJ) Barra de Guaratiba	23° 2'56"S 43°33'30"O	15
São Paulo (SP) Bertioga	23°49'S 46°09'O	15
Paraná (PR) Ilha do Mel	25°32'2"S 48°17'40"O	15
Santa Catarina (SC) Palhoça	27°49'33"S 48°37'17"O	15

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo, com suas respectivas seqüências e marcação utilizadas e o tipo de repetição da região de microssatélite por eles amplificada.

Oligonucleotídeos iniciadores	Marcação e seqüência	Tipo de repetição
RM19	Hex -TGCCCTCTACGTTGTGAATG CTGTCTGAGCTTGCATCATTG	(AG) ₂₆
RM38	Tet -TCATGCACACGGATACAGACAC TGTTCCCTATTCTCAAATGATGCC	(CA) ₈
RM41	Tet -TGGAAGGATTGTGGTAATTGGG CATGTGGGTGTGCTCTGGG	(GA) ₂₅
RM46	Fam -ACAGTCCTCCAATCGTGAAT TTAATTCTGACGGGACCAG	(AT) ₄ (GCGT) ₈ (GT) ₈ (GGAA) ₂

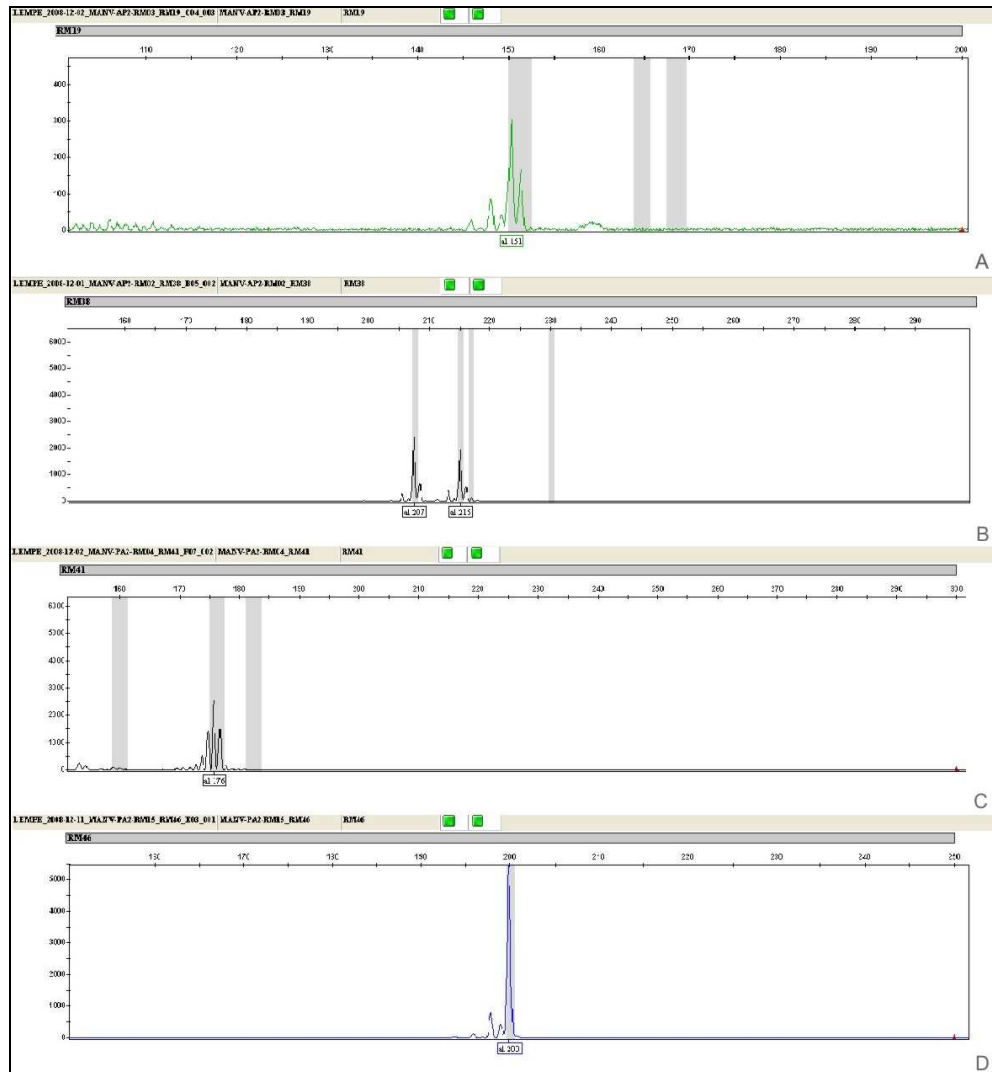


Figura 2. Exemplo de visualização dos alelos em forma de picos dos quatro oligonucleotídeos iniciadores de microssatélites utilizados. A. RM19. B. RM38. C. RM41. D. RM46.

2.3 “Random Amplification of Polymorphic DNA” (RAPD)

O método de RAPD (“Random Amplification of Polymorphic DNA”) possui alta capacidade de detecção de variabilidade (Cavalli, 2003) e por isso foi aplicado em parte das amostras com o propósito de comparar o nível de variabilidade genética dos indivíduos de *R. mangle* determinado pelas regiões de microssatélites amplificadas.

RAPD é baseado na técnica de PCR e utiliza um oligonucleotídeo iniciador de cerca de dez nucleotídeos de seqüência arbitrária para amplificar diferentes regiões do genoma do indivíduo. Os segmentos de DNA amplificados podem ser

visualizados em gel de agarose por eletroforese e coloração com brometo de etídio em luz ultravioleta (Cavalli, 2003; Freeland, 2005). Indivíduos com padrões de bandas diferentes no gel apresentam diferenças nas regiões onde o oligonucleotídeo iniciador pôde hibridar. Desta maneira, os polimorfismos podem ser detectados na população. Apesar da vantagem de gerar grande quantidade de polimorfismos de segmentos de DNA, RAPD é um marcador dominante, diferentemente dos microssatélites nucleares, que são co-dominantes (Cavalli, 2003; Freeland, 2005). Os marcadores co-dominantes são mais adequados para o estudo de variabilidade e estruturação genética, pois permitem a determinação do genótipo, distinguindo homocigotos e heterocigotos para diferentes genótipos, enquanto nos dominantes, como o RAPD, apenas o genótipo homocigoto recessivo é identificado, pela ausência de banda no gel (Cavalli, 2003; Freeland, 2005).

A PCR foi realizada em 30µl de solução final, contendo 0,2ng de DNA, tampão 1x sem Magnésio, 3,33mM de MgCl₂, 0,83mM de DNTP (Biotools), 0,33µM de primer, 2,5U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), e 5µg de BSA ("Bovine Serum Albumin"). Todas as reações foram realizadas pelo robô de pipetagem CAS-1200[®] (Corbett Life Science). O termociclador (Personal Cycler, Eppendorf) foi programado com o seguinte ciclo de temperaturas: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30s, 36°C por 30s, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 5 minutos. Foram utilizados dois oligonucleotídeos iniciadores da série 1 da OPERON que apresentaram maior índice de polimorfismo (Tabela 3). As bandas foram visualizadas em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. O gel analisado de cada oligonucleotídeo iniciador continha o produto da PCR-RAPD de todos os indivíduos, intercalados entre populações, de modo que um indivíduo não ficasse ao lado de outro da mesma população. Esta estratégia teve como objetivo evitar a indução de erro por proximidade na análise das bandas do gel. As fotografias dos géis foram obtidas com equipamento de fotodocumentação Vilber Loumart[®]. As bandas foram detectadas por indivíduo e codificadas como presente (1) ou ausente (0) em uma matriz de dados com o auxílio de um programa de análise, Gel Pro Analyzer[®]. A similaridade entre as bandas foi analisada através da comparação com o padrão de bandas de um marcador de peso molecular de 1kb. Para todos os oligonucleotídeos iniciadores, um controle negativo foi utilizado em cada reação de PCR a fim de verificar possível contaminação nas reações.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores de RAPD e suas respectivas seqüências de bases.

Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência
OPA04	ATT CGG GCT G
OPA10	GTG ATC GCA G

2.4 Análises estatísticas

2.4.1 Análises de microssatélites

A independência entre os quatro *loci* utilizados foi realizada pelo programa Arlequin v.3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), utilizando o algoritmo de expectativa-maximização (EM), através de 10000 permutações (ver Slatkin e Excoffier, 1996; Excoffier e Slatkin, 1998). A diversidade genética dentro e entre as populações de *R. mangle* amostradas foi quantificada através de estimativas de proporção de *loci* polimórficos, número de alelos por *locus*, riqueza de alelos por população (A), heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) e heterozigosidade média (H), utilizando o programa Popgene v.1.32 (Yeh *et al.*, 1997). O equilíbrio de Hardy-Weinberg por *locus* e por população foi testado a partir de cadeia de Markov de 100.000 passos com o programa Arlequin. Para esses testes foi usada a correção de Bonferroni (1936) para o nível de significância, que passou a ser de 0,0011.

A estruturação genética entre populações de *R. mangle* amostradas ao longo da costa brasileira foi verificada por Análise de Variância Molecular (AMOVA), utilizando o programa Arlequin com dois níveis de hierarquia e nível de significância de 0,05. O teste de estruturação entre pares de população também foi analisada pelo mesmo programa através das freqüências genótípicas (Goudet *et al.*, 1996) e 10000 passos da cadeia de Markov, mas com nível de significância de 0,0011 (correção de Bonferroni). A diferenciação genética foi calculada com o programa Fstat, v.2.9.3.2 (Goudet, 2001) através de estimativas de N_m (número de migrantes por geração) e R_{st} , medida análoga ao F_{st} de Wright. R_{st} é uma medida mais apropriada para análises com microssatélite, pois leva em consideração altas taxas de mutação e o modelo de mutação "stepwise" para explicar as mudanças no tamanho dos alelos que ocorrem dentro dessas regiões repetitivas do genoma (Slatkin, 1995).

As distâncias genéticas entre as populações foram calculadas utilizando as estimativas de Nei (1972) no programa Popgene. Essas distâncias foram utilizadas para construção de um dendrograma através do método de *Neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987) pelo programa Poptree (Takezaki, 2001). A significância da melhor topologia foi estimada com 1000 réplicas de *bootstrap*. O teste de Mantel (1967) foi realizado com o programa Arlequin para testar a correlação entre as distâncias genéticas e geográficas que separam as populações amostradas de *R. mangle*. As distâncias geográficas utilizadas foram as medidas entre os pontos pelo Oceano Atlântico (Tabela 4). Este teste também foi realizado com todo o conjunto de populações e com as populações do PA e MA separadamente.

Tabela 4. Distâncias geográficas entre pares de população de *R. mangle*.

	PA	MA	RN	PE	SE	BA	RJ	SP	PR	SC
AP	0									
PA	480	0								
RN	1411	931	0							
PE	1688	1208	277	0						
SE	2105	1625	694	417	0					
BA	2577	2097	1166	889	472	0				
RJ	3674	3194	2263	1986	1569	1097	0			
SP	3962	3482	2551	2274	1857	1385	288	0		
PR	4249	3769	2838	2561	2144	1672	575	287	0	
SC	4503	4023	3092	2815	2398	1926	829	541	254	0

2.4.2 Análises de RAPD

A matriz com os dados de RAPD de 99 indivíduos de *R. mangle* foi analisada para verificação do número de bandas total e específicas por população. Através do programa Popgene v.1.32 (Yeh *et al.*, 1997) foram calculados: índice de diversidade gênica de Nei (1973), fluxo gênico (G_{st} e N_m), e número e porcentagem de *loci* polimórficos. Com o programa Arlequin v.3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) foi testada a estruturação genética das populações, através da AMOVA, com nível de significância 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 Análises de microssatélites

3.1.2 Diversidade genética

Os *loci* mostraram-se independentes entre si e tanto estes quanto as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,0011$, correção de Bonferroni). Os quatro *loci* são polimórficos (100%) e produziram um total de 13 alelos, sendo que o *locus* RM19 produziu cinco alelos, o RM38 produziu quatro alelos, e o RM41 e RM46, dois cada.

O número máximo de alelos por população foi de dez, na população do PA, seguida pela população do MA, com nove alelos. Nas outras populações, o número de alelos não foi superior a seis (Tabela 5). A população de SC foi a que apresentou a menor variabilidade alélica, com apenas quatro alelos, um para cada conjunto de marcador.

As populações do PA, MA, SE e PE apresentaram alelos únicos, que não foram encontrados nas outras populações amostradas (Tabela 5). Além disso, as populações do PA e MA compartilham três alelos que são exclusivos a elas. A riqueza de alelos por população varia de 2,28 no PA a 1,0 em SC (Tabela 6).

A Tabela 6 mostra as médias de heterozigosidade esperada e observada para as populações de *R. mangle* estudadas. A grande maioria das populações apresentou menos heterozigotos do que o esperado, com a exceção apenas da população de SP, o que sugere a ocorrência de endogamia. Existe uma redução na heterozigosidade das populações do norte da costa (PA e MA) para as populações de estuários mais ao sul. A heterozigosidade média das populações do PA e MA é de $H=0,32$, enquanto a média para os estuários mais ao sul é cerca de 72% menor, i.e., $H=0,09$.

Tabela 5. Freqüência alélica observada por *locus* e por população. O número do alelo é representado pelo seu tamanho em pares de base.

<i>Loci</i>	Alelos	Populações									
		PA	MA	RN	PE	SE	BA	RJ	SP	PR	SC
RM19	151	0,933	0,667	1,000	1,000	0,923	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	153	—	0,042	—	—	—	—	—	—	—	—
	158	—	—	—	—	0,077	—	—	—	—	—
	165	0,033	0,042	—	—	—	—	—	—	—	—
	169	0,033	0,250	—	—	—	—	—	—	—	—
RM38	207	0,033	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	215	0,567	0,625	0,458	0,867	0,500	0,867	0,567	0,633	0,567	1,000
	217	0,333	0,376	0,542	0,133	0,500	0,133	0,433	0,367	0,433	—
	231	0,067	—	—	—	—	—	—	—	—	—
RM41	176	0,321	0,318	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	183	0,679	0,682	—	—	—	—	—	—	—	—
RM46	190	—	—	—	0,033	—	—	—	—	—	—
	200	1,000	1,000	1,000	0,967	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

3.1.3 Estruturação genética

As análises de estruturação foram feitas com todo o conjunto de populações, assim como sem as populações do PA e MA, após ter sido verificado que a presença dessas populações nas análises alterava perceptivelmente os resultados. As análises realizadas com e sem as populações do PA e MA possibilitou a melhor interpretação dos dados.

A AMOVA incluindo todas as populações mostrou que a diferenciação genética é maior entre os indivíduos de uma mesma população (70,32%) do que entre as populações (29,68%) (Tabela 7). Retirando as populações do PA e MA da análise, a porcentagem de variação entre populações fica ainda menor (14,55%). No entanto, a variação entre as populações é significativa ($P < 0,05$), indicando que as populações de *R. mangle* na costa brasileira são geneticamente estruturadas. Considerando as populações do PA e MA como um grupo separado das demais populações, a análise de AMOVA mostrou que eles são geneticamente estruturados ($P < 0,05$) e que a porcentagem de variação é maior entre esses dois grupos do que

entre populações do mesmo grupo (Tabela 8), evidenciando a diferenciação das populações ao norte da costa (PA e MA) em relação às demais.

O valor de R_{st} considerando todas as populações foi de 0,31 e $Nm=0,65$, o que indica um grau de diferenciação muito alto. No entanto, retirando as populações do PA e MA da análise, o valor de R_{st} passa a ser 0,08, considerado como indicativo de pouca diferenciação. As diferenças nos valores das análises com e sem as populações do PA e MA indicam que a estruturação genética encontrada na espécie ao longo da costa está principalmente relacionada à diferença entre estas populações e as demais, já que os valores sem elas evidenciam uma variação entre populações ainda menor e uma pequena estruturação.

Tabela 6. Riqueza alélica por população (A), heterozigosidade esperada (H_e) e heterozigosidade observada (H_o) para cada uma das populações de *R. mangle* estudadas. A heterozigosidade média de Nei (H) é mostrada por população e as médias das populações do PA e MA e das demais, com o desvio padrão entre parênteses.

População	A	H_e	H_o	H
PA	2,28	0,29	0,17	0,28
MA	2,21	0,37	0,30	0,35
média H				0,32 (0,05)
RN	1,25	0,13	0,06	0,12
PE	1,45	0,08	0,02	0,07
SE	1,50	0,17	0,13	0,16
BA	1,25	0,06	0,03	0,06
RJ	1,25	0,13	0,05	0,12
SP	1,25	0,12	0,18	0,12
PR	1,25	0,13	0,05	0,12
SC	1,00	0	0	0
média H				0,09 (0,05)

As populações amostradas no PA e no MA são geneticamente similares entre si, no entanto são geneticamente estruturadas em relação às demais (Tabela 9). As relações entre pares de populações mais ao sul são, em sua maioria, de similaridade genética. Entretanto, a população mais distante, de SC, é diferente da maioria das outras.

Tabela 7. AMOVA para todas as populações de *R. mangle* amostradas.

Fonte	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	% variação
Entre populações	9	30,97	29,68
Entre indivíduos da mesma população	280	72,80	70,32
Total	289	103,78	

Tabela 8. AMOVA considerando as populações em dois grupos, sendo um formado pelas populações do PA e MA e o outro, pelas demais populações.

Fonte	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	% variação
Entre grupos	1	22,02	43,08
Entre populações do mesmo grupo	8	8,96	5,85
Entre indivíduos da mesma população	280	72,80	51,08
Total	289	103,78	

Tabela 9. Estruturação genética baseada na diferenciação pareada das populações de *R. mangle* estudadas. O símbolo + indica diferenciação genética significativa ao nível de $P < 0,0011$ e o símbolo - indica ausência de estruturação.

	PA	MA	RN	PE	SE	BA	RJ	SP	PR
MA	-								
RN	+	+							
PE	+	+	-						
SE	+	+	-	-					
BA	+	+	+	-	-				
RJ	+	+	-	-	-	-			
SP	+	+	-	-	-	-	-		
PR	+	+	-	-	-	-	-	-	
SC	+	+	+	-	+	-	+	+	+

3.1.4 Distâncias genéticas

Os valores de distâncias genéticas de Nei (1972) entre as populações amostradas de *R. mangle* ao longo da costa brasileira suportam a diferenciação das populações do PA e MA das demais amostradas (Tabela 10). As populações do RJ e PR são geneticamente idênticas, com distância genética de zero.

Tabela 10. Distâncias genéticas de Nei (1972) entre pares de população de *R. mangle*.

	PA	MA	RN	PE	SE	BA	RJ	SP	PR	SC
AP	—									
PA	0.0232	—								
RN	0.1635	0.1954	—							
PE	0.1686	0.2093	0.0473	—						
SE	0.1656	0.1922	0.0020	0.0397	—					
BA	0.1652	0.2048	0.0463	0.0003	0.0385	—				
RJ	0.1549	0.1889	0.0034	0.0252	0.0028	0.0244	—			
SP	0.1530	0.1882	0.0087	0.0152	0.0066	0.0145	0.0013	—		
PR	0.1549	0.1889	0.0034	0.0252	0.0028	0.0244	0.0000	0.0013	—	
SC	0.1839	0.2259	0.0792	0.0042	0.0683	0.0041	0.0492	0.0344	0.0492	—

O dendrograma elaborado a partir dessas distâncias corrobora com o resultado, onde as populações do PA e do MA estão evidentemente separadas das demais que formam um aglomerado com populações próximas entre si (Figura 3).

O teste de Mantel evidenciou a relação entre distâncias genéticas e geográficas ($R^2=0,22$, $P<0,05$) apenas quando incluídas na análise as populações do PA e MA, que são as mais diferenciadas geneticamente das demais. Quando essas populações foram retiradas da análise, o teste não evidenciou tal relação ($P>0,05$). Portanto, entre as populações ao sul do RN não há relação entre distâncias geográfica e genética.

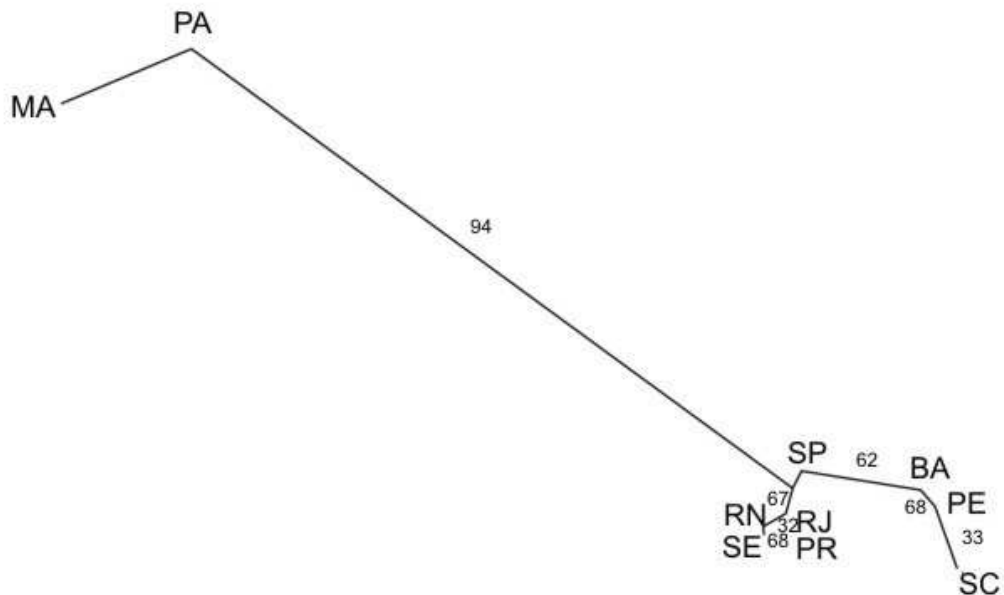


Figura 3. Dendrograma *Neighbor-joining*, elaborado a partir das distâncias genéticas de Nei (1972) entre populações de *R. mangle* com valores de *bootstrap*.

3.2 Análises de RAPD

A técnica de RAPD confirmou a baixa variabilidade encontrada nas populações amostradas de *R. mangle*. Foram encontradas apenas 25 bandas (*loci*) no total, sendo que nenhuma delas era específica para apenas uma população. No entanto, como foram utilizados os iniciadores da série 1 da OPERON que apresentaram maior variabilidade, o número de *loci* polimórficos foi de 21 (84%). O

padrão de bandas mostrado na Figura 4 exemplifica o encontrado nas populações. O índice de diversidade gênica de Nei (1973) foi $H = 0,24$, com $Gst = 0,34$ e $Nm = 0,96$. Valores independentes, como os obtidos através da técnica de RAPD e os de microsatélite mostraram a mesma baixa variabilidade nas populações de *R. mangle* ao longo da costa brasileira.

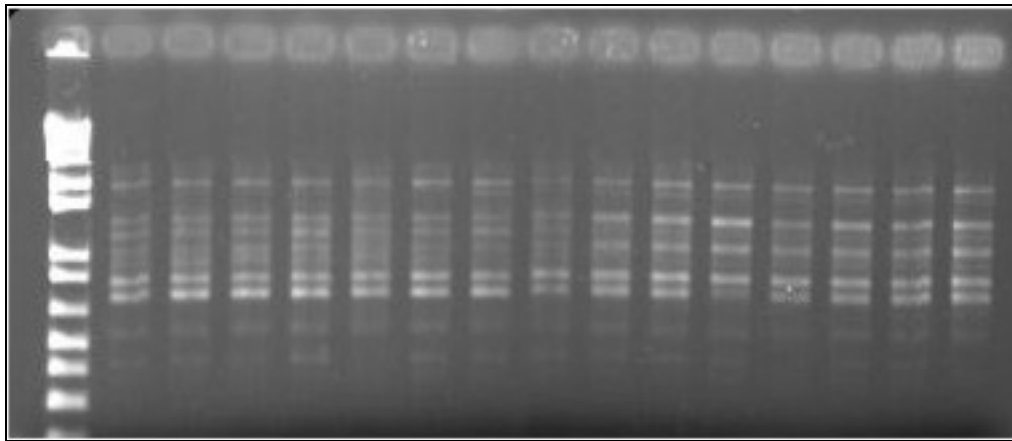


Figura 4. Fotografia de gel de agarose mostrando padrão de bandas da população do PA obtido com o oligonucleotídeo iniciador de RAPD, OPA10.

Segundo a análise de AMOVA dos dados obtidos através da técnica de RAPD, as populações são geneticamente estruturadas ($P < 0,001$), sendo a porcentagem de variação dentro das populações maior (66,11%) do que entre elas (33,89%) (Tabela 11), assim como encontrado para os dados de microsatélites.

Tabela 11. AMOVA para todas as populações de *R. mangle* amostradas.

Fonte	Soma dos quadrados	% variação
Entre populações	89,23	33,89
Entre indivíduos da mesma população	165,51	66,11
Total	254,74	

4 DISCUSSÃO

O baixo número de alelos e de heterozigosidade encontrados nesse estudo evidenciam a baixa variabilidade genética de *R. mangle* ao longo de toda a costa brasileira. Arbeláez-Cortes *et al.* (2007), utilizando três dos quatro *loci* do presente estudo (RM19, RM41 e RM46), encontraram uma variabilidade muito maior nas populações da mesma espécie na costa do Atlântico Pacífico da Colômbia. Esses autores recuperaram um total de 17 alelos, sendo que este estudo detectou apenas nove para o mesmo conjunto de iniciadores. Da mesma forma, a riqueza de alelos encontrada na Colômbia foi maior, variando de 4,3 a 5,7, enquanto que a das populações brasileiras de *R. mangle* variou de 1,0 a 2,28 apenas. A mesma diferença na variabilidade genética de populações de *R. mangle* entre a costa Atlântica e Pacífica foi encontrada por Núñez-Farfán *et al.* (2002). Esses autores estimaram uma diversidade genética quase duas vezes maior nas populações da costa Pacífica do México em relação às do Atlântico, através da análise de dez marcadores isoenzimáticos em 14 populações de *R. mangle*.

A baixa variabilidade genética e diferença entre a diversidade genética de populações das costas do Atlântico e do Pacífico, aparentemente, não se restringem à *R. mangle*. A mesma baixa variabilidade foi encontrada por Nettel e Dodd (2007) para outra espécie de árvore de mangue, *Avicennia germinans*, em algumas regiões da costa do Atlântico, através de dados de seqüências de regiões de ITS, microssatélites e AFLP. Esses autores também verificaram que as populações localizadas na costa do oceano Pacífico são geneticamente mais diversas e diferentes entre si do que as localizadas na costa do oceano Atlântico.

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que, na costa brasileira, o mangue vermelho não é composto por uma única metapopulação panmítica e sim por populações geneticamente estruturadas. Essa diferenciação é muito evidente principalmente entre as populações amostradas ao norte da costa (PA e MA) e as demais populações ao sul do RN, através das diferenças nos indicadores de variabilidade, como número de alelos e heterozigosidade.

Tal diferença entre as populações ao norte da costa e as demais pode estar relacionada com o efeito das mudanças climáticas ocorridas nos últimos milhares de anos. Durante o Quaternário, o clima se tornou mais frio, com freqüentes oscilações

de temperatura que aumentaram de amplitude, levando a uma série de eras do gelo, sendo o último máximo de gelo entre 22.000 e 18.000 anos atrás (Hewitt, 2000; 2004; Yokoyama *et al.*, 2001). Desde então, muitas espécies têm re-expandido sua distribuição por causa do aumento da temperatura global e presença de condições mais favoráveis. Algumas delas deixando traços dessa recolonização através de dados palinológicos e evidências genéticas.

Durante essas glaciações, a faixa de gelo polar se espalhou consideravelmente e as zonas de vegetação ficaram limitadas às regiões equatoriais (Hewitt, 2000; 2004). Sendo os manguezais ecossistemas com limites latitudinais determinados por temperatura e umidade, sua distribuição ficou restrita durante o esfriamento do Quaternário (Duke *et al.*, 1998; Saenger, 1998). Como os manguezais dependem de áreas de baixa energia, protegidas pela costa, para seu desenvolvimento, as mudanças no nível do mar ainda adicionam um importante fator aos efeitos dos ciclos glaciais na distribuição desses ambientes (Woodroffe e Grindrod, 1991).

Conseqüentemente, as populações da região norte da costa brasileira, devem ser significativamente mais antigas e, portanto, ter tido mais tempo para se diversificar. Esse padrão pode ser verificado nas populações do PA e MA desse estudo. Tais populações são significativamente mais variáveis geneticamente em comparação com as localizadas ao sul e estão localizadas na região equatorial. A maior diversidade na região equatorial da costa brasileira é ainda evidenciada pela presença de um maior número de espécies de *Rhizophora*. Esse gênero é lá representado por três espécies, *R. mangle*, *R. harisonii* e *R. racemosa* (Menezes *et al.*, 2008), diferentemente do resto da costa, onde só há ocorrência de uma espécie, *R. mangle*.

Em contrapartida, as populações ao sul do RN devem ter sido recolonizadas mais recentemente, o que levou ao decréscimo da diversidade intra-específica, devido a eventos fundadores sucessivos durante a colonização, à medida que ocorre o afastamento do refúgio glacial (Petit *et al.*, 2003). A ausência de heterozigotos nos 15 indivíduos amostrados na população de SC suporta esta idéia.

Indivíduos das populações de *R. mangle* preservadas no Equador durante o último período glacial puderam dispersar em direção ao sul após o degelo e

aquecimento dos estuários desta região. Essa dispersão deve ter se repetido várias vezes ao longo da recolonização da costa e esses eventos fundadores seqüenciais parecem ter resultado na perda de alelos e na conseqüente homozigidade observada nessas populações. Essa rápida colonização produz áreas de variabilidade genética reduzida (Hewitt, 2000). No caso de *R. mangle*, esses eventos são evidenciados pela reduzida variabilidade encontrada nas populações localizadas abaixo do RN.

Estudos de palinologia mostram a idade mínima dos manguezais da costa norte. Em Taperebal (PA), os manguezais surgiram há pelo menos 6.500 anos (Vedel *et al.*, 2006); em Lagoa do Curuçá (PA), entre 7.250 e 5.600 anos atrás (Behling, 2001); em Lago do Aquiri (MA), a idade do manguezal é entre 7.450 e 6.700 anos (Behling e da Costa, 1997); e em Lago Crispim (PA) a idade fica entre 7.550 e 6.620 (Behling e da Costa, 2001). Retrações e expansões dos manguezais em relação a mudanças no nível do mar podem ocorrer (Woodroffe e Grindrod, 1991; Ellison, 1996), indicando que esses manguezais acima citados podem estar há ainda mais tempo na região, apesar de não particularmente na mesma posição, já que estão localizados em um local onde esse ecossistema foi mantido durante as glaciações. Já os manguezais mais ao sul da costa brasileira foram formados mais recentemente, como indica o estudo de Amaral *et al.* (2006). Com base em informações palinológicas, o manguezal de Itanhaém, no Estado de São Paulo, tem apenas 1300 anos, sendo o local totalmente colonizado há cerca de 330 anos.

Apoiados em dados de estimativa de tempo baseadas em análises Bayesianas e simulações coalescentes, Nettel e Dodd (2007) também relatam que a baixa diversidade e pouca diferenciação genética encontrada entre populações de *A. germinans* em algumas regiões na costa do oceano Atlântico, podem ser explicadas através da recente recolonização das áreas após o período de retração dos manguezais devido às oscilações climáticas do Quaternário.

Resultados deste e outros estudos (Lowenfeld e Klekowski, 1992; Klekowski *et al.*, 1994; Núñez-Farfán *et al.*, 2002; Arbeláez-Cortes *et al.*, 2007) indicam que a endogamia é uma característica comum em populações de *R. mangle*. A capacidade de autofertilização da espécie (Lowenfeld e Klekowski, 1992) faz com que ela seja capaz de ocupar rapidamente o ambiente. Conseqüentemente, mesmo com a

chegada de poucos propágulos, a espécie seria capaz de estabelecer uma população viável, resultando, entretanto, em uma baixa variabilidade genética. Os propágulos são capazes de estabelecer colônias bastante distantes da distribuição principal da espécie. Mas, migrantes posteriores contribuem pouco já que estarão entrando em uma população estabelecida na capacidade limite e com dinâmica de reposição, apenas. A reprodução desses migrantes é logisticamente baixa enquanto aquela dos colonizadores originais é exponencialmente alta (Hewitt, 1996). Isso parece ser capaz de explicar a manutenção da menor variabilidade genética das populações de *R. mangle* ao sul, mais recentemente formadas.

Outro fator importante para a diferenciação encontrada entre as populações ao norte (PA e MA) e as demais pode ser que essas populações ainda são separadas pela bifurcação da Corrente Sul Equatorial (Figura 5). Essa corrente se origina na costa da África e corre no sentido oeste até atingir a costa brasileira, próximo a costa do Rio Grande do Norte e da Paraíba, onde se separa em duas outras que correm em sentidos contrários, as correntes do Brasil (de direção sul) e das Guianas (de direção noroeste) (Stramma e England, 1999), podendo dificultar a passagem dos propágulos de uma região para outra. O mesmo padrão de separação foi encontrado por Takayama *et al.* 2008 para *Hibiscus pernambucensis*, espécie com sementes dispersas pelo oceano, que apresentou uma diferenciação genética evidente entre populações localizadas ao norte e ao sul do RN. Segundo esses autores, essa diferenciação pode ser devido à barreira formada pela bifurcação da Corrente Sul Equatorial na região. Ainda há relatos de outros organismos marinhos que têm essa mesma estruturação genética entre populações ao norte e ao sul do RN (Santos *et al.*, 2003; Muss *et al.*, 2001).

Somada à influência das correntes marinhas no transporte dos propágulos, está a importância da direção dos ventos nessas regiões. Os propágulos são estruturas flutuantes e, portanto, muito suscetíveis à movimentação das águas superficiais dos oceanos. As diferentes direções que objetos flutuantes podem tomar a partir de determinado ponto no oceano foram simuladas através de dados de rotas de objetos flutuantes detectadas por satélites pelo “Atlantic Oceanographic and Meteorological Laboratory/NOAA” (<http://www.aoml.noaa.gov>), nos Estados Unidos. Essas rotas são chamadas de correntes climatológicas, pois levam em consideração as correntes marinhas e direções dos ventos.

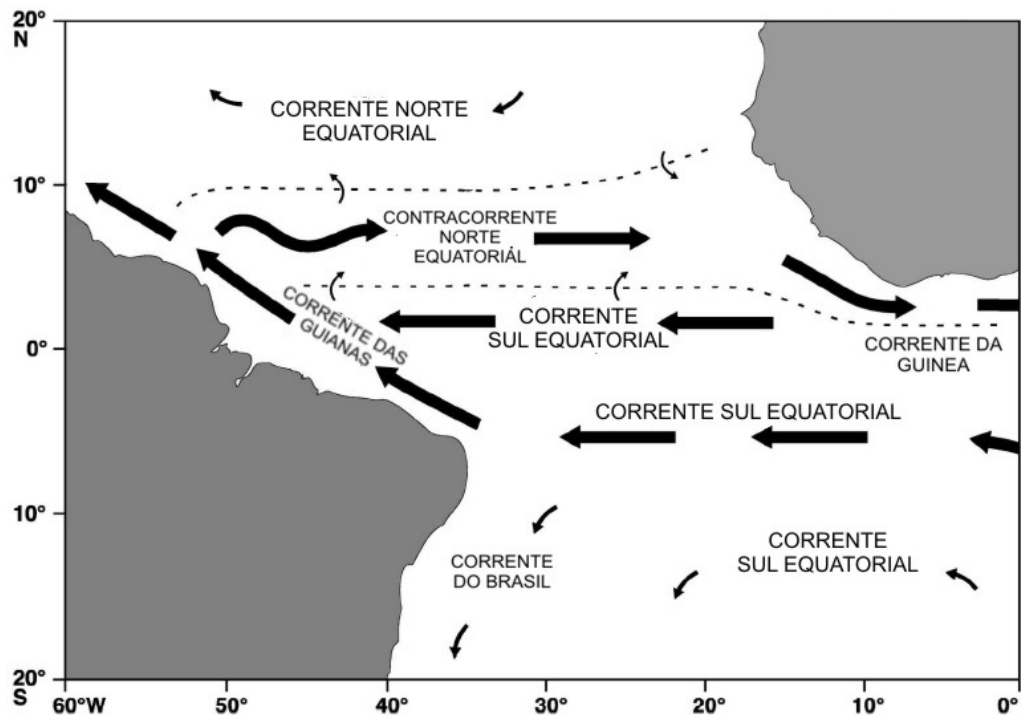


Figura 5. Esquemas das principais correntes ao redor da Corrente Sul Equatorial. Modificado de Fratantoni *et al.*, 2000.

Provavelmente os propágulos de *R. mangle* seguem essas mesmas rotas, que variam ao longo do ano. A Figura 6 mostra qual seriam as rotas tomadas pelos propágulos em diferentes períodos do ano, no final de abril e agosto. As correntes localizadas ao norte da costa brasileira são bastante fortes e direcionadas para o norte, enquanto as correntes ao sul do RN não são unidirecionais e são mais fracas. Os propágulos provenientes da região norte da costa são, portanto, em sua grande maioria, levados para o norte do continente. Provavelmente, poucos deles conseguem ser levados por correntes que chegam até a região ao sul do RN. A chegada de apenas poucos propágulos da região norte da costa brasileira deve impedir a homogeneização das duas regiões, mantendo-as geneticamente diferentes.

A estruturação genética detectada entre populações de *R. mangle* localizadas ao sul e norte da bifurcação da corrente marinha (i.e. entre população do PA e a do MA; entre a BA e o RN; entre a população de SC e outras – Tabela 9) pode indicar a retenção de propágulos nas baías, a qual, usualmente, é influenciada pelas correntes superficiais locais e regionais. Esse mesmo padrão complexo de

estruturção foi encontrado por Núñez-Farfán *et al.* (2002) entre populações de *R. mangle* da costa Atlântica do México.

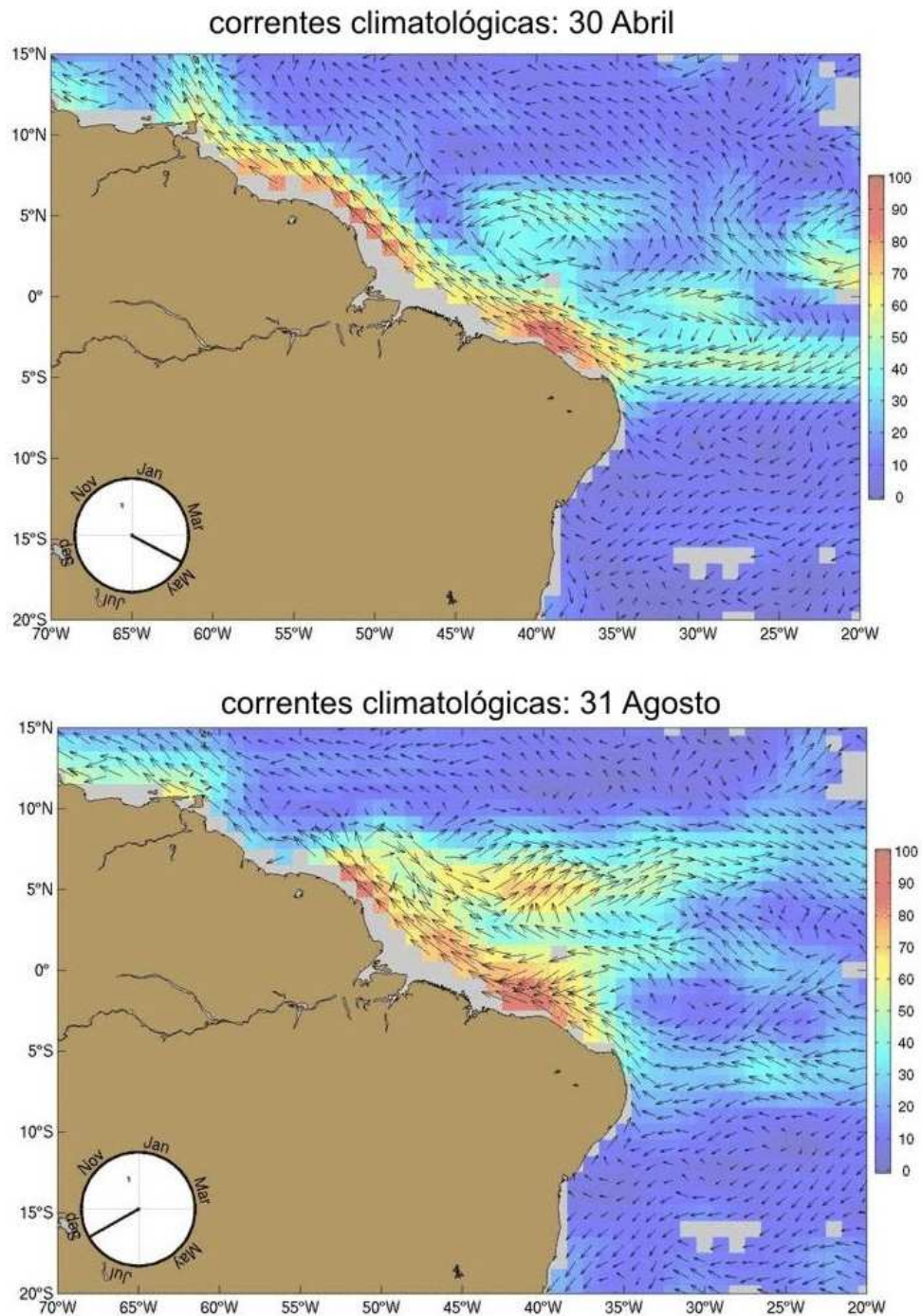


Figura 6. Correntes climatológicas da costa brasileira em 30 de Abril e 31 de Agosto. Cores mais quentes indicam correntes mais fortes. Fonte: www.aoml.noaa.gov

O baixo nível de polimorfismo encontrado nas populações amostradas de *R. mangle* ao longo da costa brasileira evidencia a constituição genética estável da espécie. Conseqüentemente, as populações já são frágeis pela própria constituição genética. Com a freqüente pressão antrópica que esses ambientes vêm sofrendo, esforços para a preservação devem ser reforçados. Esse fator juntamente com a estruturação genética encontrada entre as populações sugerem que tais esforços para conservação dessa espécie devam ser não apenas na preservação de grandes áreas, mas também em um maior número de populações separadas. Evidentemente, a diferença encontrada entre as populações da região norte da costa em relação ao sul exige a preservação de amostras de ambas as regiões.

REFERÊNCIAS

- Amaral, P.G.C., Ledru, M., Branco, F.R., Giannini, P.C.F., 2006. Late Holocene development of a mangrove ecosystem in southeastern Brazil (Itanhaém, state of São Paulo). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 241: 608–620.
- Arbeláez-Cortes, E., Castillo-Cárdenas, M.F., Toro-Perea, N., Cárdenas-Henao, H., 2007. Genetic structure of the red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) on the Colombian Pacific detected by microsatellite molecular markers. *Hydrobiologia* 583: 321-330.
- Behling, H., 2001. Late quaternary environmental changes in the Lagoa da Curuça region (eastern Amazonia, Brazil) and evidence of *Podocarpus* in the Amazon lowland. *Vegetation History and Archaeobotany* 10: 175–183.
- Behling, H., da Costa, M.L., 1997. Studies on Holocene tropical vegetation, mangrove and coast environments in the state of Maranhão, NE Brazil. *Quaternary Of South America And Antarctic Peninsula* 10: 93–118.
- Behling, H., da Costa, M.L., 2001. Holocene vegetational and environmental changes from the Lago Crispin record in Northeastern Pará State, eastern Amazonia. *Review Of Palaeobotany And Palynology* 114: 145–155.
- Bonferroni, C.E., 1936. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. *Pubblicazioni del Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze* 8: 3-62.
- Cain, M.L., Milligan, B.G., Strand, A.E., 2000. Long-distance seed dispersal in plant population. *American Journal of Botany* 87: 1217-1227.
- Cavalli, S.S. 2003. Polimorfismos moleculares. p. 311-332. In: Freitas, L.B., Bered, F., 2003. *Genética e Evolução Vegetal*. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Céron-Souza, I., Toro-Perea, N., Cárdenas-Henao, H., 2005. Population genetic structure of neotropical mangrove species on the Colombian Pacific coast: *Avicennia germinans* (Avicenniaceae). *Biotropica* 37: 258-268.
- Duke, N.C., Ball, M.C., Ellison, J.C., 1998. Factors influencing biodiversity and distributional gradients in mangroves. *Global Ecology and Biogeography Letters* 7: 27-47.
- Ellison, J.A., 1996. Pollen evidence of Late Holocene mangrove development in Bermuda. *Global Ecology and Biogeography Letters* 5: 315– 326.
- 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.

- Excoffier, L., Slatkin, M., 1998. Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. *American Journal of Human Genetics* 64: 171-180.
- Frankham, R., 2005. Genetics and extinction. *Biological conservation* 126: 131-140.
- Fratantoni, D.M., 2001. North Atlantic surface circulation during the 1990s observed with satellite-tracked drifters. *Journal of Geophysical Research* 106: 22067–22093.
- Freeland, J., 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd. Inglaterra.
- Ge, X., Sun, M., 1999. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. *Molecular Ecology* 8: 2061-2069.
- Gornitz, V., 1991. Global coastal hazards from future sea level rise. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 89: 379–398.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Goudet, J., Raymond, M., de Meeüs, T., Rousset, F., 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144: 1933-1940.
- Hewitt, G., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 908-913.
- Hewitt, G., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 359: 183-195.
- Hogarth, P.J., 1999. *The biology of mangroves*. Oxford Press, Oxford.
- Klekowski, E.J., Lowenfeld, R., Helper, P.K., 1994. Mangrove genetics. II. Outcrossing and lower spontaneous mutation rates in Puerto Rican *Rhizophora*. *International Journal of Plant Sciences* 155: 373-381.
- Lakshmi, M., Rajalakshmi, S., Parani, M., Anuratha, C. S., Parida, A., 1997. Molecular phylogeny of mangroves I. Use of molecular markers in assessing the intraspecific genetic variability in the mangrove species *Acanthus ilicifolius* Linn. (Acanthaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 94: 1121-1127.
- Lowenfeld, R., Klekowski, E.J., 1992. Mangrove genetics. I. Mating system and mutation rates of *Rhizophora mangle* in Florida and San Salvador Island, Bahamas. *International Journal of Plant Sciences* 153: 394-399.

- Maia, L.P., Lacerda, L.D., Monteiro, L.H.U., Souza, G.M.E., 2006. Atlas dos Manguezais do Nordeste: Avaliação das Áreas de Manguezal dos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco. Superintendência Estadual do Meio Ambiente, Fortaleza.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Menezes, M.P.M., Oliveira, D., Melo, C.F., 1997. Pollination of red mangrove, *Rhizophora mangle*, in northern Brazil. *Acta Horticulturae* 437: 431-434.
- Menezes, M.P.M., Berger, U., Mehlig, U., 2008. Mangrove vegetation in Amazonia: a review of studies from the coast of Pará and Maranhão States, north Brazil. *Acta Amazonica* 38: 403-420.
- Muss, A., Ross, R.D., Stepien, C.A., Wirtz, P., Bowen, B.W. 2001. Phylogeography of *Ophioblennius*: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution. *Evolution* 55: 561-572.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science* 70: 3321-3323.
- Nettel, A., Dodd, R., 2006. Drifting propagules and receding swamps: genetic footprints of mangrove recolonization and dispersal along tropical coasts. *Evolution* 61: 958-971.
- Núñez-Farfán, J., Domínguez, C.A., Eguiarte, L.E., Cornejo, A., Quijano, M., Vargas, J., Dirzo, R., 2002. Genetic divergence among Mexican populations of red mangrove (*Rhizophora mangle*): geographic and historic effects. *Evolutionary Ecology Research* 4: 1049-1064.
- Parani, M., Lakshmi, M., Elango, S., Ram, N., Anurhata, C.S., Parida, A., 1997. Molecular phylogeny of mangroves II. Intra and inter-specific variation in *Avicennia* revealed by RAPD and RFLP markers. *Genome* 40: 487-495.
- Petit, R. J., Aguinagalde, I., de Beaulieu, J., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J. P., Rendell, S., Vendramin, G. G., 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563-1565.
- Por, F.D., 1994. Guia ilustrado do manguezal brasileiro. Instituto de Biociências da USP, São Paulo.
- Rabinowitz, D., 1978. Dispersal properties of mangrove propagules. *Biotropica* 10: 47-57.

- Rosero-Galindo, C., Gaitan-Solis, E., Cárdenas-Henao, H., Tohme, J., Toro-Perea, N., 2002. Polymorphic microsatellites in a mangrove species, *Rhizophora mangle* (L.) (Rhizophoraceae). *Molecular Ecology Notes* 2: 281–283.
- Saenger, P., 1998. Mangrove vegetation: an evolutionary perspective. *Marine Freshwater Research* 49: 277–286.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Santos, S., Schneider, H., Sampaio, I. 2003. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 26: 151–161.
- Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón-Molero, G., Adaime, R.R., 1990. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast. *Estuaries*, 13: 204-218.
- Selkoe, K.A., Toonen, R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Slatkin, M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457–462.
- Slatkin, M., Excoffier, L., 1996. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity* 76: 377-383.
- Stramma, L., England, M. 1999. On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. *Journal of Geophysical Research* 104: 20863–20883.
- Sun, M., Wong, K.C., Lee, J.S.Y., 1998. Reproductive biology and population genetic structure of *Kandelia candel* (Rhizophoraceae), a viviparous mangrove species. *American Journal of Botany* 85: 1631-1637.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Takayama, K., Tateishi, Y., Murata, J., Kajita, T., 2008. Gene flow and population subdivision in a pantropical plant with sea-drifted seeds *Hibiscus tiliaceus* and its allied species: evidence from microsatellite analyses. *Molecular Ecology* 17: 2730-2742.
- Tan, F., Huang, Y., Ge, X., Su, G., Ni, X., Shi, S., 2005. Population genetic structure and conservation implications of *Ceriops decandra* in Malay Peninsula and North Australia. *Aquatic Botany* 81: 175-188.
- Takezaki, N. 2001. Poptree. Max-Planck Institut fuer Biologie, Alemanha. Disponível em www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/software.htm

- Tomlinson, P.B., 1986. The botany of mangroves. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vedel, V., Behling, H., Cohen, M., Lara, R., 2006. Holocene mangrove dynamics and sea-level changes in northern Brazil, inferences from Taperebal core in northeastern Pará State. *Vegetation History and Archaeobotany* 15: 115-123.
- Woodroffe, C.D., Grindrod, J., 1991. Mangrove biogeography: the role of Quaternary environmental and sea-level change. *Journal of Biogeography* 18: 479– 492.
- Yeh, R.C., Yang, T.B.J., Boyles, Z.H., Ye, J.X. Mao, 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis, Molecular Biology and Biotechnology Centre, Alberta. Disponível em <http://www.ualberta.ca/~fyeh>.
- Yokoyama, Y., De Deckker, P., Lambeck, K., Johnston, P., Fifield, L. K., 2001. Sea level at the Last Glacial Maximum: evidence from northwestern Australia to constrain ice volumes for oxygen isotope stage 2. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 165: 281–297.