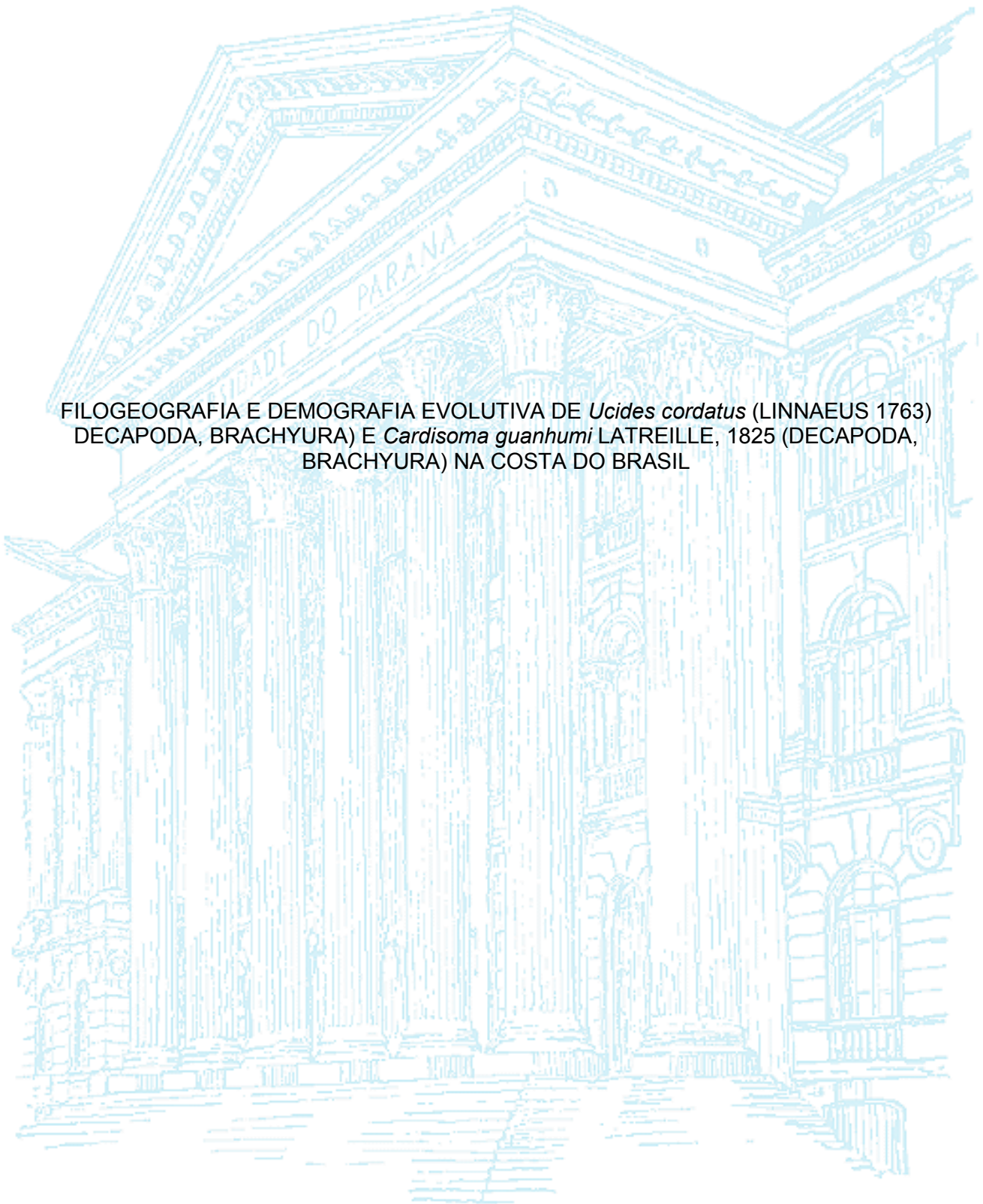


JOSÉ FRANCISCO DE OLIVEIRA NETO

FILOGEOGRAFIA E DEMOGRAFIA EVOLUTIVA DE *Ucides cordatus* (LINNAEUS 1763)
DECAPODA, BRACHYURA) E *Cardisoma guanhumi* LATREILLE, 1825 (DECAPODA,
BRACHYURA) NA COSTA DO BRASIL



CURITIBA
2009

JOSÉ FRANCISCO DE OLIVEIRA NETO

FILOGEOGRAFIA E DEMOGRAFIA EVOLUTIVA DE *Ucides cordatus* (LINNAEUS 1763)
DECAPODA, BRACHYURA) E *Cardisoma guanhumi* LATREILLE, 1825 (DECAPODA,
BRACHYURA) NA COSTA DO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Zoologia.

Orientador: Walter Antonio Pereira Boeger
Co-orientador: Marcio Roberto Pie

CURITIBA
2009

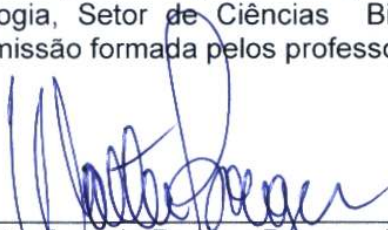
Termo de aprovação

FILOGEOGRAFIA E DEMOGRAFIA EVOLUTIVA DE *Ucides cordatus*
(LINNAEUS 1763) DECAPODA, BRACHYURA) E *Cardisoma guanhumi*
LATREILLE, 1825 (DECAPODA, BRACHYURA) NA COSTA DO
BRASIL.

por

José Francisco de Oliveira Neto

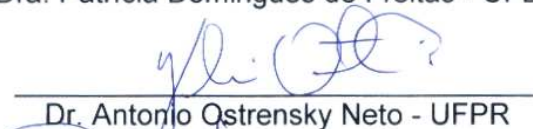
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências, área de concentração Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores



Dr. Walter Antonio Pereira Boeger - UFPR
Presidente e Orientador



Dra. Patrícia Domingues de Freitas - UFBA



Dr. Antonio Ostrensky Neto - UFPR



Dr. Paulo da Cunha Lana - UFPR



Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza - UFPR

Curitiba, 06 de fevereiro de 2009.

Agradecimentos

Ao CNPq.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

À equipe do GIA (Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais).

À Patrícia Domingues de Freitas, Antonio Ostrensky Neto, Guilherme Schnell e Schühli, Paulo da Cunha Lana e Ricardo Lehtonen R. de Souza que, juntos, compuseram a banca de avaliação desta tese.

Ao Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE), incluindo: o professor Walter Antonio Pereira Boeger, pela grande oportunidade de desenvolver vários projetos e pela orientação. Marcio Roberto Pie, pela co-orientação. Luciana Patella pela eterna ajuda em todas as situações e pela amizade. Rafael Baggio pela imensa dedicação. Raphael Orélis Ribeiro e Maria Wilhelmina Barbosa de Oliveira Pil pela ajuda em etapas laboratoriais importantes, na aquisição de amostras e no processamento de parte do material. Marlus Bueno, Flávio Marteleto, Marcel Tschá, Renan Macari Faleiros, Diogo Hungria, Rogério Tubino Vianna, Raquel Patella, Sandra Ludwig pela prazerosa companhia.

Ao Fabrício de Andrade Frehse, ao barqueiro Ermenigildo e ao catador Maíco, a Gabriel de Oliveira Langner e Laís Mariana de Oliveira Tedesco, pela fundamental ajuda nas coletas.

Aos amigos que deram suporte emocional ao longo do desenvolvimento desta tese (citados na ordem das amizades mais antigas para as mais novas): Rafael Bueno Noleto, Viviane Prodócimo e Jean Ricardo Vitule, Wanessa Algarte Ramsdorf, e Letícia de Bittencourt Zagonel.

À minha família.

Sumário

Agradecimentos	ivij
Lista de Ilustrações	vi
Lista de Tabelas	viii
Introdução geral	1
A estrutura genética de populações do caranguejo-uçá <i>Ucides cordatus</i> (Decapoda: Ocypodidae) em escala local e regional	4
Abstract	5
Introdução.....	5
Material de Métodos	7
Resultados.....	10
Discussão	11
Referências bibliográficas	13
Demografia evolutiva e estrutura genética da populações de <i>Ucides cordatus</i> (Decapoda: Ocypodidae)	26
Abstract	27
Introdução.....	27
Material e Métodos	29
Resultados.....	32
Discussão	33
Referências.....	36
Demografia evolutiva e estrutura genética da populações (<i>Cardisoma guanhumi</i>, Decapoda: Gecarcinidae) ao longo da costa do Brasil	48
Abstract	49
Introdução.....	50
Material de Métodos	51
Resultados.....	54
Discussão	55
Referências.....	57
Avaliação da diversidade genética e do fluxo gênico das populações de <i>U. cordatus</i> (Linneaus, 1763) na costa brasileira utilizando marcadores microssatélites	70
Abstract	71
Introdução.....	71
Material e métodos	73
Resultados.....	75
Discussão	77
Referências.....	80
Discussão geral	92
Anexos	95

Lista de Ilustrações

Capítulo 1

- Figura 1 - Pontos amostrais nos estados do Paraná e Sergipe (1- Antonina, 2- Paranaguá, 3- Guaratuba, 4- São Francisco, 5- Japaratuba, 6- Sergipe, 7- Vazabarris, 8- Piauí e 9- Real.).....15
- Figura 2 - Géis representativos de RAPD (a) e RFLP (b) utilizados neste estudo.....16
- Figura 3 - Correlação entre os valores de Φ_{st} pareados e suas respectivas distâncias geográficas. $R = 0,11$, $p = 0,50$ e $R = -0,08$, $p = 0,65$ para dados de RAPD e RFLP, respectivamente.....17
- Figura 4 - Árvore de passos mínimos subdividida em clados aninhados segundo as regras de Templeton (1993, 1995), obtida a partir dos 21 haplótipos de RFLP detectados para *U. cordatus*. Cada linha na rede de haplótipos representa um passo mutacional. O número dentro dos quadrados menores representa haplótipos. P (Paraná) e S (Sergipe) indicam a origem do material.....18

Capítulo 2

- Figura 1 - Mapa da costa do Brasil indicando as áreas amostradas.....39
- Figura 2 - Árvore de passos mínimos dos 90 haplótipos de d-loop de *U. cordatus*, subdividida em clados..... 40
- Figura 3 - *Mismatch distributions* de todas as amostras combinadas, bem como de cada localidade separadamente, indicando os padrões observados (círculos negros) e esperados (círculos brancos). O último é complementado por 95% de intervalo de confiança.41
- Figura4 - Relação entre os parâmetros τ e a latitude onde foram encontrados. A regressão é significativa ($r^2 = 0.8906$, $P = 0.0159$).....42

Capítulo 3

- Figura 1 - Localidades incluídas no presente estudo para coleta de espécimes de *Cardisoma guanhumi* ao longo da costa brasileira. São elas, de cima para baixo: Rio Grande do Norte, Pernambuco, Sergipe, Rio de Janeiro e Santa Catarina.....64
- Figura 2 - Árvore de passos mínimos obtidas de 95 espécimes de *Cardisoma guanhumi* coletados na costa Brasileira. Os símbolos presentes no mapa são os mesmos usados para representar a origem dos haplótipos na figura 2. As árvores estão subdividas em linhagens de diferentes níveis para a aplicação da Nested Clade Analysis.....65
- Figura 3 - Variação das estimativas de τ entre as localidades amostradas na costa brasileira.....66
- Figura 4 - Análise de *Mismatch Distribution* obtidas a partir do mtDNA de *Cardisoma guanhumi* para cada localidade, assim como para todo o conjunto de dados unidos.....67

Capítulo 4

- Figura 1 - Localização dos pontos de coleta com respectivas freqüências alélicas de cada região (foto acima) e aproximação dos pontos da região Nordeste (abaixo).....86

Lista de Tabelas

Capítulo 1

- Tabela 1 - *Primers* de RAPD (seis primeiros) e *primers* pra amplificação do fragmento de mtDNA, com respectivas seqüências de nucleotídeos.....19
- Tabela 2 - Haplótipos de PCR-RFLP (H) identificados no presente estudo, e suas freqüências relativas nos diferentes estuários do Paraná e Sergipe (S—Rio Sergipe, J—Rio, Japarutuba, R—Rio Real, P—Rio Piauí, SF—Rio, São Francisco, V—Rio, Vazabarris, G—Baía de Guaratuba, P—Baía de Paranaguá , A—Baía de Antonina).....20
- Tabela 3 - Distância genética de Nei entre populações de diferentes estuários baseado em PCR-RFLP (acima da diagonal) e RAPD (abaixo da diagonal), e a porcentagem de *loci* polimórficos (RAPD) e diversidade genética em cada estuário.....21
- Tabela 4 - Medidas de diferenciação das populações de *U. cordatus* baseadas na análise de variância molecular, tanto entre pontos de um mesmo estado quanto entre estados.....22
- Tabela 5 - Análise de Clados Aninhados (Nested Clade Analysis – NCA) a partir do d-loop das populações de *U. cordatus* na costa do Brasil, calculado com base nos clados da figura 4. D_c são distâncias de clado, D_n são distâncias de clado aninhado. Para nenhuma dessas distâncias foram encontrados valores significativos de p.....23

Capítulo 2

- Tabela 1 - Valores descritivos e parâmetros estimados a partir das seqüências de d-loop de *U. cordatus* da costa brasileira.....43

Tabela 2 - Valores de distâncias de clado (D_c), distâncias de clado aninhado (D_n) e contraste entre clados de ponta e clados interiores (I-T) provenientes da <i>Nested Clade Analysis</i> sobre a rede de haplótipos (Fig. 2) de d-loop de populações de <i>U. cordatus</i> da costa brasileira.....	44
---	----

Capítulo 3

Tabela 1 - Valores descritivos e parâmetros estimados a partir das seqüências de d-loop de <i>C. guanhumí</i> da costa brasileira.....	59
Tabela 2 - Análise de clados aninhados feito a partir da variação geográfica e genética do d-loop de <i>C. guanhumí</i> , esquematizados na figura 2.....	60
Tabela 3 - Estimativas de F_{st} entre as amostras estudadas de <i>Cardisoma guanhumí</i> . Nenhuma estimativa difere estatisticamente de 0 ($p > 0.05$ em todas as comparações). RN - Rio Grande do Norte, PE - Pernambuco, SE - Sergipe, RJ - Rio de Janeiro, SC - Santa Catarina.....	61
Tabela 4 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) sobre as populações de <i>C. guanhumí</i> amostradas na costa brasileira. As amostras foram separadas em grupos do Sul/Sudeste (Rio de Janeiro e Santa Catarina) e grupos do nordeste (Rio Grande do Norte, Pernambuco, e Sergipe).....	62

Capítulo 4

Tabela 1 - <i>Primers</i> testados para amplificação de microssatélites de caranguejos, com as respectivas seqüências de oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento. Os <i>primers forward</i> são mostrados acima dos <i>reverses</i> e receberam marcação nas extremidades 5'.....	80
Tabela 2 - Valores de diversidade para cada um dos 7 <i>loci</i> de microssatélite em cada uma das populações de <i>U. cordatus</i> amostradas ao longo da costa brasileira.....	81

Tabela 3 - Indicação dos <i>loci</i> que não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (D) nas localidades analisadas separadamente e em conjunto. O grau de significância considerado é 0,05.....	82
Tabela 4 – Valores de AMOVA estabelecidos para o conjunto de nove populações subdividida em dois grupos.....	83
Tabela 5 - Valores de R_{st} e F_{st} determinados para todas as comparações pareadas entre pontos amostrados.....	84
Tabela 6 - Valores de Theta e número de migrantes provenientes da análise de coalescência sobre 5 <i>loci</i> e Máxima Verossimilhança como estratégia de análise. As populações dispostas na coluna são fornecedoras enquanto as dispostas em linha são receptoras.....	85

Resumo geral

A diversidade e a estrutura genéticas de duas espécies de brachyura que ocorrem em estuários tropicais e subtropicais do Atlântico Ocidental foi estudada ao longo da costa brasileira. *Ucides cordatus* foi estudado com quatro tipos de marcadores: RAPD, PCR-RFLP, seqüências de d-loop (DNA mitocondrial) e microssatélites. *Cardisoma guanhumi* foi analisado somente com seqüências de d-loop. Para ambas as espécies, encontrou-se alta diversidade genética com níveis de estruturação geográfica extremamente baixos ou mesmo nulos. Os resultados das análises de microssatélite mostraram maior grau de estruturação, embora sempre baixos, quando comparados aos demais marcadores, o que pode ser explicado pela presença de *loci* não neutros. Os valores de tau obtidos a partir do d-loop revelaram que as populações de *U. cordatus* encontradas mais ao sul são mais recentes que aquelas localizadas nas regiões Norte e Nordeste, indicando que estas acompanharam a expansão geográfica dos manguezais. Os valores de Theta obtidos da análise de microssatélite sugerem que os tamanhos efetivos das populações localizadas mais ao norte (Amapá, Sergipe) são maiores que os localizados ao sul (Bahia, Paraná). Os resultados são compatíveis com uma estratégia reprodutiva de exportação de larvas e amplo fluxo gênico entre todas as populações estudadas para ambas as espécies.

Prefácio geral

Esta tese é uma compilação de quatro artigos científicos que tratam da diversidade genética de duas espécies de Brachyura na costa brasileira. Três destes artigos tiveram *Ucides cordatus* como espécie alvo. O primeiro capítulo traz uma análise da diversidade e estrutura genéticas de *U. cordatus* sob um ponto de vista local (dentro de uma escala menor que 500 Km) e regional (comparando pontos separados por mais de 2000km de distância). Para este primeiro trabalho, foram utilizadas técnicas de RAPD e PCR-RFLP.

O segundo capítulo também trata da diversidade genética de *U. cordatus*, visando confirmar os padrões observados no primeiro artigo utilizando uma técnica mais sofisticada (sequenciamento da região controladora do DNA mitocondrial, o d-loop) sobre amostras coletadas em pontos geograficamente mais equidistante e em uma escala mais abrangente. Este tipo de análise permitiu fazer inferências sobre o processo de colonização histórica dos estuários.

O fragmento analisado de d-loop representou um fragmento de tanto sucesso que foi aplicado também em uma segunda espécie de caranguejo, o guaiamum (*Cardisoma guanhumí*), que possui uma distribuição geográfica semelhante à de *U. cordatus*. Isso permitiu comparar as duas espécies sob o ponto de vista filogeográfico e demográfico-evolutivo. A filogeografia de *C. guanhumí* consiste no terceiro capítulo desta tese.

A discussão generalizada sobre quais tipos de marcadores seriam mais eficientes na detecção de estruturação, foi o motivo da realização de mais um estudo, apresentado no quarto capítulo. O estudo trata da estrutura genética de *U. cordatus*, com muito mais pontos de coletas e um número de indivíduos por ponto, em geral, maior quando comparados aos capítulos anteriores. Um dos novos pontos está localizado no Amapá, o que permitiu fazer uma avaliação do quanto a foz do Rio Amazonas representa uma barreira para a dispersão da espécie. Diferentemente dos demais, este capítulo contou

com marcadores microssatélites e estimativas do tamanho efetivo e padrões de fluxo gênico assimétrico que envolvem a Teoria Coalescente.

Introdução geral

U. cordatus é uma espécie intimamente associada às florestas de manguezal, onde escavam suas tocas em substrato não consolidado. A espécie tem, virtualmente, uma capacidade de dispersão muito limitada após a metamorfose. As florestas de manguezal não se encontram continuamente distribuídas, mas sim, separadas entre si por praias arenosas, restingas, serras e outros ambientes intransponíveis para os adultos de *U. cordatus*.

Cardisoma guanhumi tem, na fase adulta, uma capacidade de dispersão maior que *Ucides cordatus* e, provavelmente, a espécie consegue atravessar florestas e cidades litorâneas que separam estuários. Já foram encontrados *C. guanhumi* a 4 Km da costa. Contudo, a ocorrência desta espécie é bem maior próxima a estuários. Esta espécie escava suas tocas em substrato mais consolidado, frequentemente na periferia de manguezais (apicuns).

C. guanhumi passa por cinco fases de zoea (Costlow and Bookhout, 1968) enquanto *U. cordatus* passa por seis (Rodrigues & Hebling, 1989), os primeiros dos quais são preferencialmente vividos em mar aberto (Freire, 1998). A duração da fase pelágica de *U. cordatus* é supostamente variável na natureza. Em laboratório foi possível completar o período larval em aproximadamente 20 dias, com taxa de sobrevivência positivamente correlacionada ao aumento da salinidade, num gradiente de 15 a 30 (Simith & Dielle, 2008). O período larval é mais afetado pela dieta do que pela salinidade (Souza et al 2006). Uma característica importante no desenvolvimento de *U. cordatus* é a capacidade de adiar a metamorfose (por até oito dias) caso não encontre substrato apropriado para metamorfose. Entretanto, esse adiamento pode diminuir a sobrevivência e o *fitness* da espécie mesmo após a metamorfose (Diele & Simith, 2007).

A estruturação genética das populações

A princípio, não é possível ter certeza de que as amostras provenientes de diferentes estuários representam populações separadas, ou se fazem parte de uma metapopulação (uma população espacialmente estruturada, mas com algum fluxo gênico entre suas sub-populações locais) ou se se trata de uma população panmítica. Essa é uma das questões que este trabalho visou responder.

Os padrões de estruturação de espécies com dispersão limitada na fase adulta, mas que possuem larvas pelágicas, estão intimamente associados à retenção de larvas no estuário ou à sua exportação para mar aberto, da seguinte forma:

- As larvas sempre voltam para o mesmo estuário de origem, e os adultos representam populações isoladas em seus respectivos estuários.
- As larvas frequentemente voltam para o mesmo estuário de origem, mas alguma troca de larvas entre estuários é permitida. Neste caso o conjunto de indivíduos adultos de um estuário são metapopulações.
- As larvas são transportadas para diferentes estuários, com muita frequência, e não existe restrição de fluxo gênico entre o conjunto de indivíduos de diferentes estuários. Neste caso, trata-se de uma metapopulação panmítica.

Desta forma, baseado nos padrões de dinâmica larval de *U. cordatus* e *C. guanhumi* inferidos em outros trabalhos, esperava-se encontrar metapopulações pouco ou nada estruturadas, talvez apresentando sinais de isolamento por distância. Tal padrão foi confirmado, mas nenhum sinal de isolamento por distância foi encontrado na escala geográfica analisada neste trabalho.

Os princípios gerais da utilização dos marcadores moleculares.

A diversidade e estruturação genética das populações de *U. cordatus* e *C. guanhumi* foi inferida pela proporção de diferentes haplótipos (mt-DNA) ou alelos (microsatélite, RAPD) em cada conjunto de amostras.

Em uma situação de panmixia, ou não-estruturação, espera-se que a diversidade genética de *U. cordatus* e *C. guanhumi* na costa brasileira esteja bem distribuída ao longo de toda a costa. Ou seja, que as proporções de haplótipos (ou ainda de diferentes nucleotídeos que os compõe) ou alelos não seja estatisticamente diferente entre localidades diferentes. Outra implicação da não-estruturação é que, em qualquer localidade, a diversidade genética costuma ser alta, porque representa uma população com tamanhos efetivo e absoluto supostamente muito grandes.

Em uma situação de forte estruturação geográfica, espera-se que a proporção de haplótipos ou alelos entre diferentes localidades seja estatisticamente diferente. Neste caso, a diversidade genética em cada ponto de coleta é representativa de uma população com tamanhos efetivo e absoluto menor do que seria esperado se ela fosse parte de uma metapopulação panmítica.

É possível que o padrão observado para as espécies em questão esteja em algum ponto entre estes dois extremos (mais detalhes: Avise, 2004).

Referências:

- Avise, J. C. (2004) Molecular markers, natural history, and evolution. Second edition. Sinauer Associates, Inc, Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Freire, A. S. (1998). Dispersão larval do caranguejo do mangue *Ucides cordatus* (L.1763) em manguezais da Baía de Paranaguá, Paraná.
- Rodrigues, M.D.; Hebling, N.J. *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda). Complete larval development under laboratory conditions and its systematic position. Revista Brasileira de Zoologia, v.6, n.1, p.147-166, 1989.

Capítulo I

A estrutura genética de populações do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) em escala local e regional

Publicado na revista Hydrobiologia, (2007) 583:69-76 (Anexo I)

Abstract

The crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) is a species of considerable economic and ecological importance in mangrove areas of the Western Atlantic coast. However, habitat loss, overfishing and an infectious disease are causing substantial reductions in local stocks of this species, leading to a pressing need to design efficient management strategies. A crucial step in this design is an understanding of how the genetic variability of *U. cordatus* is distributed among estuaries throughout its range. In this study we assess the degree of spatial structure in the pattern of genetic variation of *U. cordatus* over local (estuaries located within 100 km from each other) and geographical scales (estuaries located farther than 2700 km from each other). Ninety individuals were collected from nine estuaries and analyzed using PCR-RFLP and RAPD techniques. The percentage of polymorphic bands within populations ranged from 15% to 46% for RFLP markers and from 40% to 70% for RAPD markers. Our results failed to demonstrate significant geographical structure in the pattern of genetic variation, indicating that populations of *U. cordatus* are capable of extensive gene flow among estuaries. The implications of these results for the management of *U. cordatus* populations are discussed.

Keywords: Phylogeography, RAPD, RFLP, AMOVA, Nested Clade analysis

Introdução

Os manguezais desempenham um papel essencial na dinâmica dos sistemas estuarinos onde são encontrados, servindo não apenas de berçário e áreas de alimentação para uma variedade de espécies de peixes e moluscos, mas também para o enriquecimento de águas costeiras, para a estabilização da linha da costa e para a retenção de silte e matéria orgânica de origem continental (Marshall, 1994, Beck et al., 2001, Holguin et al. 2001). Apesar do consenso entre os cientistas a respeito de sua

importância, os ecossistemas de manguezal estão sendo destruídos a uma taxa alarmante em várias partes do mundo, causando uma preocupação crescente com sua conservação e seu manejo sustentável (Ong, 1995; Farnsworth & Ellison, 1997; Sathirathai & Barbier, 2001; Walters, 2004). O caranguejo *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) é considerado uma espécie-chave dos manguezais a oeste do Atlântico, sendo responsável pelo consumo e degradação de mais da metade das folhas mortas produzidas nestes ambientes (Schories et al. 2003). Adicionalmente, esta espécie representa um importante recurso pesqueiro para comunidades locais ao longo da costa brasileira. Por exemplo, em uma comunidade de pescadores localizada no estuário de Caeté (estado do Pará, Norte do Brasil), *U. cordatus* é coletado e vendido por 42% das famílias e constituem a principal fonte de renda para 38% delas (Glaser, 2003). Não raro, a captura é feita utilizando técnicas extremamente predatórias pelas comunidades litorâneas mais pobres. Populações locais de *U. cordatus* têm declinado em número em diversas regiões, não apenas em função da sobrepesca, mas também em consequência de uma doença causada por um fungo negro patogênico (a Doença do Caranguejo Letárgico, Boeger et al., 2005). Relata-se que a doença causou redução de mais de 84% na área de coleta de catadores após eventos de mortalidade em massa no estuário do Rio Mamanguape, estado de Paraíba, Nordeste do Brasil (Nóbrega & Nishida, 2003). Estes fatores embasam a necessidade de desenvolvimento de estratégias de manejo de populações naturais de *U. cordatus* para preservar tanto a integridade dos manguezais como a dos recursos neles contidos.

Adultos de *U. cordatus* cavam suas tocas no substrato não consolidado dos manguezais. A capacidade de dispersão nesta fase é bastante limitada quando comparada com a capacidade de dispersão das larvas, que são planctônicas. Existem duas estratégias demográficas principais para macro-invertebrados bentônicos que têm uma fase planctônica larval (Bilton et al., 2002): (1) estágios com retenção larval e (2) exportação de estágios recém eclodidos do estuário para águas da plataforma continental, com subsequente retorno de um estágio larval mais avançado para o estuário

mais próximo. Ambas as estratégias têm conseqüências importantes para a distribuição de variação genética, tanto para a diferenciação genética de populações dentro e entre estuários, quanto para homogeneização da variação genética devida ao extenso fluxo gênico.

Com o objetivo de gerar as bases científicas para o manejo adequado das populações naturais, é essencial entender melhor as características biológicas da espécie em questão e, em particular, a distribuição geográfica da variabilidade genética entre as sub-populações. No presente estudo, foram usados marcadores RAPD e PCR-RFLP para descrever o padrão de variabilidade genética e de fluxo gênico entre populações de *U. cordatus*, em escala local e regional, estudando caranguejos provenientes de dois estados da costa do Brasil: Sergipe e Paraná.

Material de Métodos

Locais de coleta

Os espécimes de *U. cordatus* foram coletados em nove estuários do Brasil, três no estado do Paraná (Guaratuba, Paranaguá e Antonina) e seis no estado de Sergipe (Foz dos rios São Francisco, Sergipe, Japarutuba, Santa Maria—Vazabarris, Piauí, e Real) (Fig. 1). O litoral do Paraná e Sergipe tem 98 km e 178 km de extensão, respectivamente. Estes estados são distantes entre si mais de 2700 km. Já os pontos de coleta dentro do mesmo estado distam menos de 70 km de outro ponto mais próximo, na maioria dos casos.

Plano amostral

Dez indivíduos foram capturados em cada um dos 9 estuários. Um pereiópode de cada caranguejo foi removido, sem necessidade de sacrifício animal. As amostras de

tecido, obtidas dos pereiópodes, foram preservadas em solução de EDTA-DMSO (Seutin et al., 1991) e mantidas a -20° C até serem processadas. A extração foi realizada utilizando o kit DNeasy (QIAGEN). A concentração e a pureza do DNA foram determinadas usando espectrofotômetro GeneQuant Pro (Amersham Biosciences®). Dois métodos moleculares distintos foram usados para caracterizar a estrutura genética de *U. cordatus*. O primeiro foi o polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição obtidos da região controle do DNA mitocondrial (PCR-RFLP). O segundo foi a “Amplificação Randômica de DNA Polimórfico” (RAPD). A metodologia para cada técnica é descrita abaixo.

PCR-RFLP

A amplificação da região controle do mtDNA (d-loop) de *U. cordatus* foi conduzida usando iniciadores (*primers*) localizados na região final do 12S e na região ILE-tRNA (Tabela 1) e que foram desenhados especificamente para este estudo. Um fragmento de 1600 pares de base foi amplificado em uma solução de 25 µL contendo as concentrações finais dos seguintes reagentes: 6 mM de MgCl₂, 1 mM de cada dNTP, 0,1 U/µL de Taq Polimerase, tampão 1x (Invitrogen), 2 µM de cada *primer*, e 1,2 ng/µL de DNA. O termociclador foi programado com as seguintes temperaturas: 2 min a 95° C de desnaturação, seguidos de 35 ciclos de 20s a 95° C, 30s a 56° C e 90s a 72° C, e uma extensão final de 5 min a 72° C. O sucesso na amplificação foi conferido em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado em brometo de etídio e visualizado em câmara UV. Os produtos de PCR foi então submetido à ação de quatro enzimas de restrição: Mbol (BioLabs), Alul (Invitrogen), Dral (Invitrogen), e HinfI (Jena Bioscience). Cada 5 µL de reação de RFLP incluía 2 µL de produto de PCR, 0,5 µL de enzima de restrição (um tipo por reação), 2,5 µL de tampão de reação. A solução foi incubada por 4 horas a 37° C e o resultado foi visualizado em nova eletroforese, em gel de agarose 2%, corado em brometo de etídio e fotografado em câmara UV.

RAPD

Seis *primers* de RAPD foram selecionados para este estudo, a partir de vinte previamente testados (Série I, Operon Technologies). São eles: OPA–1, OPA–7, OPA–8, OPA–9, OPA–11 e OPA–17 (Tabela 1). Cada reação era composta de 15µl de solução contendo as concentrações finais dos seguintes reagentes: 0,25 mM de cada dNTP, tampão 1x (Invitrogen), 4 mM de MgCl₂, 0,1 U/µL de Taq Polimerase, 0,4 µM de *primer* e 0,4 ng/µL de extrato de DNA. A programação do termociclador incluiu um período de desnaturação inicial de 3 min a 95° C, seguido de 35 ciclos de 15 s a 94° C, 30 s a 35° C, e 60 s a 72° C, e por um período de 4 min a 72° C. Os produtos das amplificações foram visualizados em eletroforese em gel 2%, corado com brometo de etídio e fotografado em câmara UV. O processo, desde a PCR até a eletroforese, foi repetido pelo menos uma vez para cada *primer* e cada indivíduo, visando a obtenção de produtos satisfatórios quanto a reprodutibilidade dos fragmentos amplificados.

Análise Estatística

A existência de estruturação geográfica na variabilidade genética entre populações de *U. cordatus* foi testada usando o método de Análise de Variância Molecular (AMOVA, Excoffier et al., 1992) implementada no programa AMOVA (Dyer, in prep). Os bancos de dados de RAPD e RFLP para AMOVA foram analisados separadamente. Os tamanhos das bandas foram determinados por comparação com o ladder 100bp (colocados a cada seqüência de dez indivíduos no gel) e a partir dos quais foi produzida uma matriz de presença e ausência de bandas. Bandas fracas foram suprimidas das análises, no caso do RAPD.

Para os dados de RFLP foi usado, adicionalmente, *Nested Clade Analysis* (NCA, Templeton et al., 1995; Templeton, 1998) para detectar padrões de fluxo gênico ao longo

da história populacional. Este método incorpora o padrão evolutivo dos haplótipos e suas distribuições geográficas atuais. O princípio básico desta análise é comparar os centros geográficos relativos às localizações dos indivíduos (e seus haplótipos) de um determinado clado em relação ao centro geográfico de cada sub-clado ou haplótipo. Uma chave de inferência (Templeton et al., 1995) é usada para interpretar os valores dessas comparações e determinar o padrão de subdivisão resultante da história de seu fluxo gênico.

Para a NCA foi feita uma árvore de passos mínimos no Arlequin (Schneider et al., 2000) para construir a rede de haplótipos. O programa GeoDis 2.0 (Posada et al., 2000) foi usado para fazer os cálculos referentes ao NCA. A árvore foi dividida em clados aninhado seguindo as regras de Templeton & Sing (1993) e Templeton et al. (1995).

Resultados

Houve considerável variabilidade genética nas populações amostradas de *U. cordatus* sugeridas por ambas as técnicas (Fig. 2). Um total de 21 haplótipos de PCR-RFLP foi identificado no conjunto de amostras (Tabela 2). A enzima *Dra I* gerou 5 padrões distintos de digestão, seguido de *Hinfl* (4), *Alu I* (3) e *Mbol* (2). Treze dos 21 haplótipos apareceram somente uma única vez, enquanto o haplótipo mais comum estava presente em 41% das amostras. Os haplótipos que não foram compartilhados entre Paraná e Sergipe estavam presentes em 3,3% dos indivíduos de todo o conjunto de amostras.

Os tamanhos dos fragmentos de RAPD obtidos neste estudo variaram entre 100 e 1900bp. Um total de 40 *loci* pôde ser identificado com segurança, dos quais 29 foram polimórficos em todas as populações. Não foram observadas marcas exclusivas em nenhum estuário. A porcentagem de bandas polimórficas dentro de cada amostra variou de 15 a 46 nos marcadores do PCR-RFLP e 40 a 70 nos marcadores de RAPD. O índice de diversidade de Nei (Nei, 1973) foi maior com RAPD do que com RFLP, com médias de

diversidade genética de 0,16 e 0,03, respectivamente (Tabela 3). A análise de variância molecular sobre os dados de RAPD e RFLP não detectou qualquer evidência de estruturação geográfica na diversidade genética entre as populações de *Ucides cordatus* analisadas, com valores de Φ_{st} bem próximos a 0 (Tabela 4). A comparação entre os valores pareados de Φ_{st} entre diferentes estuários e suas respectivas distâncias geográficas não mostrou qualquer evidência de isolamento por distância (Fig. 3). Embora a árvore de passos mínimos dos haplótipos de PCR-RFLP indicasse duas linhagens principais, os testes de permutação do NCA não evidenciaram qualquer significância estatística nas associações entre haplótipos e localidades geográficas (Tabela 5, Fig. 4). Finalmente, as matrizes de distância genética entre populações, baseadas em ambos os marcadores, mostraram valores extremamente baixos (Tabela 2).

Discussão

Um alto grau de variabilidade genética foi encontrado em todas as populações de *U. cordatus* amostradas na costa brasileira. O alto grau de polimorfismo não foi evidente nas análises por causa de um artefato metodológico (seleção de bandas mais confiáveis para analisar estruturação) mas era evidente nos géis de RAPD e RFLP (Fig. 2). A alta diversidade genética é padrão para populações de Decapoda marinhos com ampla distribuição geográfica, e foi observada também com outros marcadores como aloenzimas e seqüências de COI em brachyura (McMillen-Jackson & Bert, 2004).

No presente trabalho, foi verificado um baixo grau de estruturação genética entre duas regiões geográficas consideravelmente distantes da costa brasileira. É importante ressaltar que algumas das populações estão quase 3000 km distantes entre si. Estes dados corroboram a hipótese de que *U. cordatus* exporta suas larvas para mar aberto. Indícios de que tal fenômeno aconteça foram observados nas regiões Norte (Diele, 2000) e Sudeste do país (Silva-Falcão et AL., 2007). No primeiro caso, na região de Furo Grande (Pará), foram encontradas larvas a 200 Km da costa, após eventos de liberação

massiva. É possível que a estratégia reprodutiva varie de acordo com as condições fisiográficas de cada estuário. Os dados obtidos com marcadores moleculares revelam que uma eventual retenção, nestes casos, não chega a constituir uma barreira para dispersão.

Todavia, o padrão observado é, de certa forma, surpreendente dada a evidência crescente de que a variedade de fatores físicos oceanográficos, incluindo gradientes de temperatura, correntes oceânicas, e padrões de circulação de massas de ar podem restringir a dispersão larval, proporcionando estruturação genética em populações de espécies com larvas pelágicas (e.g., Reeb & Avise, 1990; McCartney et al., 2000). Um exemplo disso é o primeiro estudo filogeográfico com *Brachyura* no Brasil, com a espécie *Callinectes danae*, que demonstrou significativa diferenciação na diversidade genética ao longo de uma distância equivalente a menos da metade da estudada no presente trabalho (Weber & Levy, 2000). A espécie de *Litopenaeus schmitti* apresentou uma pequena variação em suas populações ao sul de Cabo Frio (Maggioni et al., 2003), algo que não foi detectado para *U. cordatus*, embora Cabo Frio esteja entre os dois pontos.

Embora marcadores de RAPD tenham sofrido críticas por causa da reprodutibilidade supostamente baixa e das diferenças de interpretação dos polimorfismos, a similaridade entre réplicas, a rigorosa seleção de bandas e a congruência com os dados de PCR-RFLP garantem que os marcadores de RAPD usados neste estudo são confiáveis.

A falta de diferenciação na diversidade genética das populações de diferentes estuários tem implicações importantes para o manejo de populações naturais de *U. cordatus*. Primeiro, o considerável fluxo gênico indica que populações locais são demograficamente interdependentes, com substancial troca de formas imaturas entre estuários adjacentes. Esta propriedade pode facilitar o planejamento de estratégias de manejo. Estuários bem preservados podem funcionar como fonte de larvas para áreas alteradas e permitem sua re-colonização. Entretanto, ainda não se tem o conhecimento sobre o quanto cada estuário colabora para o número total de novos indivíduos em

metapopulações vizinhas, nem qual a influência dos tamanhos destes estuários tem nisso. Soluções aplicáveis de forma mais genérica foram propostas por Shanks & Grantham (2003). Segundo estes autores, as espécies com larvas pelágicas com mais de 17 dias de período larval experimentaram, predominantemente, médias de distância de dispersão superiores a 33km. Segundo estes autores, dispersar menos que 20 km pode ser uma estratégia instável, devido às altas variações nas correntes imediatamente após a linha da costa. Eles sugerem que, para animais com alta capacidade de dispersão, não é muito eficiente conservar uma única grande reserva e sim, preservar várias reservas pequenas (2km de diâmetro!) ao longo de toda a distribuição da espécie, a uma distância mínima de 20Km. Obviamente, há interesses econômicos na conservação de grandes áreas para extrativismo e as reservas devem preservar um número grande de espécies diferentes em relação a estratégia reprodutiva. Mesmo preservando grandes áreas, as pequenas reservas distribuídas equidistantemente deveriam continuar existindo.

Referências bibliográficas

- Beck, M. W., K. L. Heck, K. W. Able, D. L. Childers, D. B. Eggleston, B. M. Gillanders, B. Halpern, C. G. Hays, K. Hoshino, T. J. Minello, R. J. Orth, P. F. Sheridan & M. R. Weinstein, 2001. The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *BioScience* 51: 633–641.
- Bilton, D. T., J. Paula & J. D. D. Bishop, 2002. Dispersal, genetic differentiation and speciation in estuarine organisms. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55: 937–952.
- Boeger, W. A., M. R. Pie, A. Ostrensky & L. Patella, 2005. Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 161–167.

- Dyer, R. J., In prep. GenoServer: a server-based approach to the analysis of population genetic data. To be submitted to Molecular Ecology Notes. Available at <http://dyer.bio.vcu.edu/Software/amova.shtml>.
- Diele, K., 2000. Life history and population structure of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda Brachyura) in Northern Brazil. PhD. Thesis, University of Bremen.
- Excoffier, L., P. E. Smouse & J. M. Quattro, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Farnsworth, E. J. & A. M. Ellison, 1997. The global conservation status of mangroves. *Ambio* 26: 328–334.
- Glaser, M., 2003. Ecosystem, local economy and social sustainability: a case study of Caeté estuary, North Brazil. *Wetlands Ecology and Management* 11: 265–272.
- Holguin, G., P. Vazquez & Y. Bashan, 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology and Fertility of Soils* 33: 265–278.
- McMillen-Jackson L., Bert T.M. (2004) Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the blue crab *Callinectes sapidus* in the eastern United States. *Marine Biology*, 145, 769–777.
- Marshall, N., 1994. Mangrove conservation in relation to overall environmental considerations. *Hydrobiologia* 285: 303–309.
- McCartney, M., G. Keller & H. A. Lessios, 2000. Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchins of the genus *Echinometra*. *Molecular Ecology* 9: 1391–1400.
- Nei, M., 1973. The theory and estimation of genetic distance. In Morton, N. E. (ed.), *Genetic structure of Populations*. University of Hawaii, Honolulu, 45–54.

- Nóbrega R. R. & A. K. Nishida 2003. Aspectos socioeconômicos e percepção ambiental dos catadores de caranguejo uçá, *Ucides cordatus* (L.1763) (Decapoda, Brachyura) do estuário do rio Mamanguape, Nordeste do Brasil. *Interciência* 28: 36–43.
- Ong, J. E., 1995. The ecology of mangrove conservation and management. *Hydrobiologia* 295: 343–351.
- Posada, D., K. A. Crandall & A. R. Templeton, 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9: 487–488.
- Reeb, C. A. & J. C. Avise, 1990. A genetic discontinuity in a continuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics* 124: 397–406.
- Sathirathai, S. & E. B. Barbier, 2001. Valuing mangrove conservation in southern Thailand. *Contemporary Economic Policy* 19: 109–122.
- Seutin, G., B. N. White & P. T. Boag, 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology–Revue Canadienne de Zoologie* 69: 82–90.
- Schories, D., A. Barletta-Bergan, M. Barletta, U. Krumme, U. Mehlig & V.
- Rademaker, 2003. The keystone role of leaf-removing crabs in mangrove forests of North Brazil. *Wetlands Ecology and Management* 11: 243–255.
- Shanks, A.L., Grantham, B.A., and Carr, M.H. 2003. Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Ecol. Appl.* 13(1): S159–S169.
- Schneider, S., D. Roessli & L. Excoffier, 2000. Arlequin ver 2.000: A Software for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Templeton, A. R., 1998. Nested clade analysis of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology* 7: 381–397.

- Templeton, A. R. & C. F. Sing, 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134: 659–669.
- Templeton, A. R., E. Routman & C. A. Phillips, 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767–782.
- Walters, B. B., 2004. Local management of mangrove forests in the Philippines: Successful conservation or efficient resource exploitation? *Human Ecology* 32: 177–195.
- Waples, R. S., 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity* 89: 438–450.
- Weber, L. I. & J. A. Levy, 2000. Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in Southern Brazil. *Hydrobiologia* 420: 203–210.

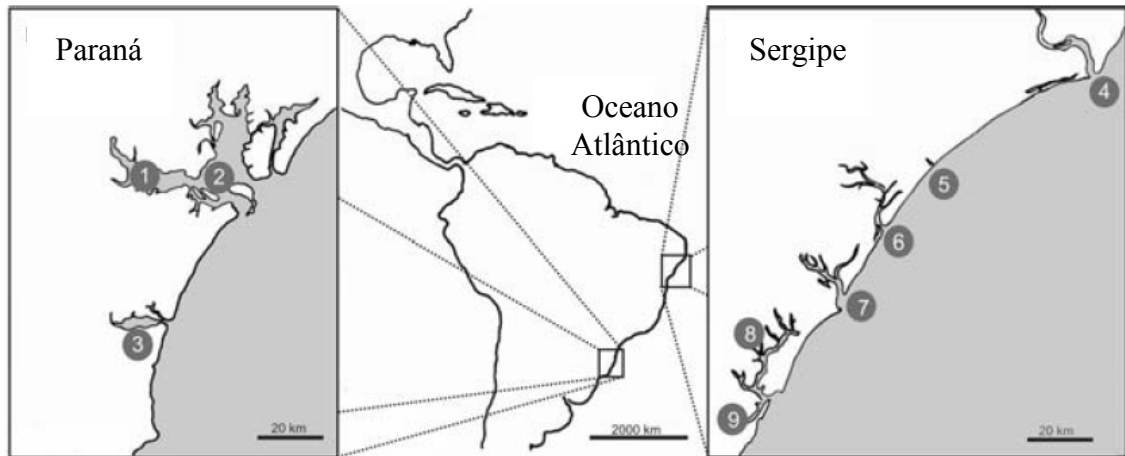


Fig 1 Pontos amostrais nos estados do Paraná e Sergipe (1- Antonina, 2- Paranaguá, 3- Guaratuba, 4- São Francisco, 5- Japarutuba, 6- Sergipe, 7- Vazabarris, 8- Piauí e 9- Real.)

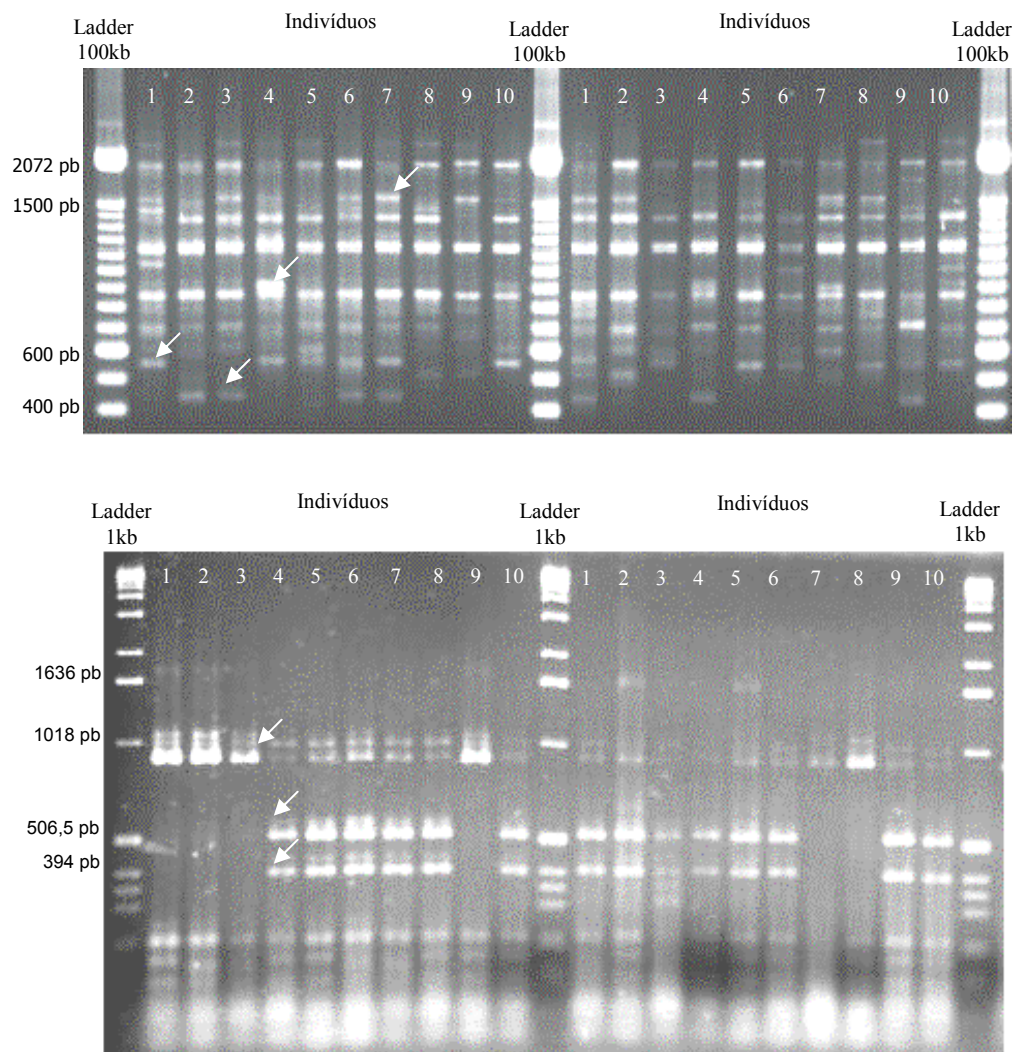


Fig 2 Géis representativos de RAPD (a) e RFLP (b) utilizados neste estudo

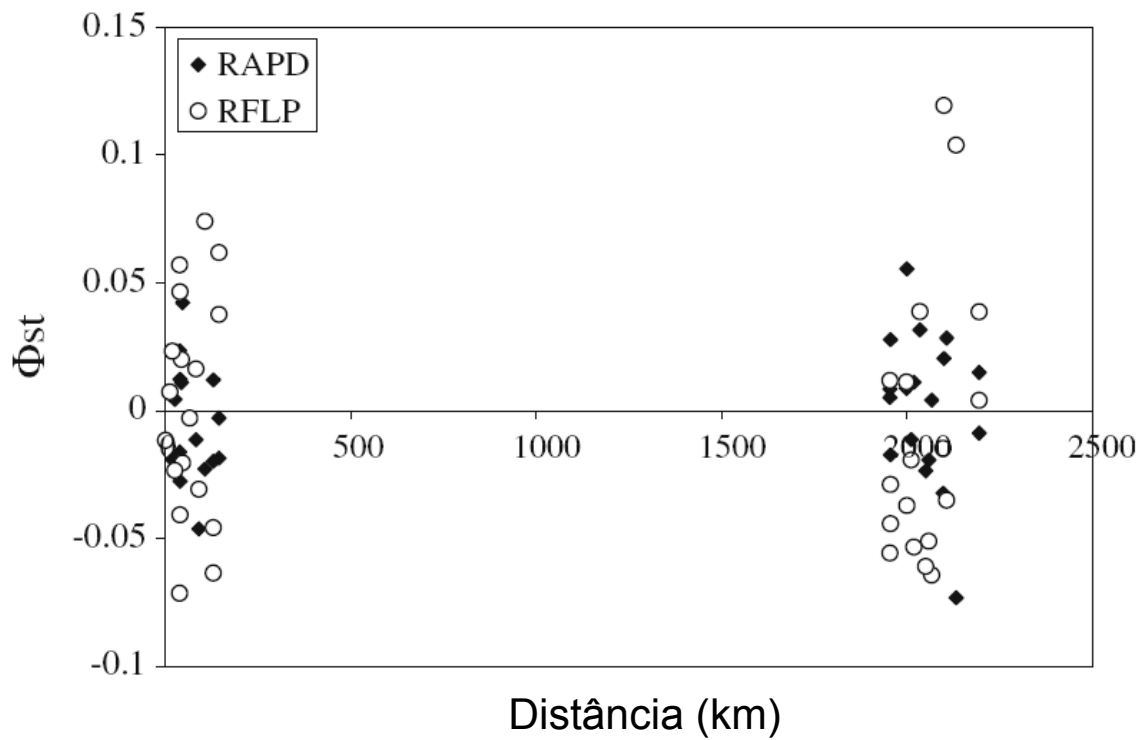


Fig 3 Correlação entre os valores de Φ_{st} pareados e suas respectivas distâncias geográficas. $R = 0.11$, $p = 0.50$ e $R = -0.08$, $p = 0.65$ para dados de RAPD e RFLP, respectivamente

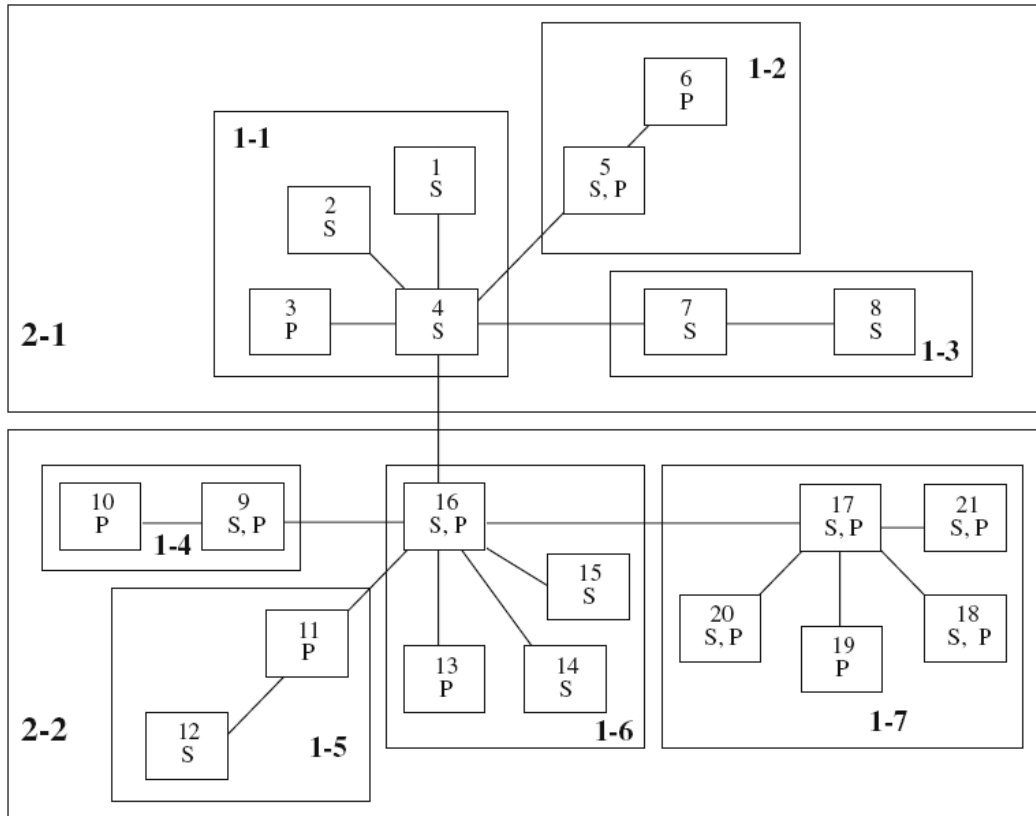


Fig 4 Árvore de passos mínimos subdividida em clados aninhados segundo as regras de Templeton (1993, 1995), obtida a partir dos 21 haplótipos de RFLP detectados para *U. cordatus*. Cada linha na rede de haplótipos representa um passo mutacional. O número dentro dos quadrados menores representa haplótipos. P (Paraná) e S (Sergipe) indicam a origem do material.

Tabela 1 *Primers* de RAPD (seis primeiros) e *primers* pra amplificação do fragmento de mtDNA, com respectivas seqüências de nucleotídeos

Nome do primer	Seqüência
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA-08	5'-GTGACGTAGG-3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'
OPA-17	5'-GACCGCTTGT-3'
12SUCAF3	5'-CCAGTANRCCTACTA TGTTACGACTTAT-3'
ILEUCAR3	5'-GCTAYCCTTTTAAAT CAGGCAC-3'

Tabela 2 Haplótipos de PCR-RFLP (H) identificados no presente estudo, e suas freqüências relativas nos diferentes estuários do Paraná e Sergipe (S—Rio Sergipe, J—Rio, Japarutuba, R—Rio Real, P—Rio Piauí, SF—Rio, São Francisco, V—Rio, Vazabarris, G—Baía de Guaratuba, P—Baía de Paranaguá, A—Baía de Antonina)

	Sergipe						Paraná		
	SF	JA	SE	VB	PI	RE	P	G	A
H1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H4	7	4	4	3	5	5	4	3	3
H5	0	0	0	0	1	1	0	0	0
H6	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H7	1	3	0	2	2	0	3	0	4
H8	0	0	0	0	0	2	0	0	1
H9	0	0	1	1	0	0	0	2	1
H10	0	0	0	0	0	0	0	1	0
H11	0	0	0	0	0	0	1	0	0
H12	0	0	0	0	0	1	0	0	0
H13	0	0	0	0	0	0	1	0	0
H14	0	0	1	0	0	0	0	0	0
H15	0	0	0	0	0	1	0	0	0
H16	0	2	3	1	2	1	2	3	2
H17	0	0	0	2	0	0	0	1	0
H18	0	0	1	0	0	0	0	0	0
H19	0	0	0	0	0	0	1	0	0
H20	0	0	0	0	0	0	0	1	0
H21	0	1	0	0	0	1	0	1	0
Total	10	10	10	10	10	10	12	12	12

Tabela 3 Distância genética de Nei entre populações de diferentes estuários baseado em PCR-RFLP (acima da diagonal) e RAPD (abaixo da diagonal), e a porcentagem de *loci* polimórficos (RAPD) e diversidade genética em cada estuário.

	VA	PI	RE	SF	JA	SE	P	G	A
VA	–	0,003	0,006	0,015	–	0,003	0,003	0,004	0,001
PI	0,019	–	0,009	0,003	–	0,007	0,001	0,006	0,001
RE	0,027	0,01	–	0,023	0,015	0,002	0,015	0,005	0,005
SF	0,01	0,006	0,001	–	0,005	0,02	0,003	0,016	0,014
JA	0,004	0,007	0,011	0,004	–	0,008	–	0,003	0,002
SE	0,018	0,003	0,015	0,007	0,009	–	0,009	0,001	0,002
P	0,015	0,002	0,012	0,001	0,004	0,004	–	0,005	0,004
G	0,02	0,006	0,014	0,003	0,019	0,005	0,004	–	0,003
A	0,023	0,009	0,016	0,011	0,001	0,01	0,005	0,018	–
<i>% de loci</i>									
polimórficos	50	60	60	52,5	52,5	52,5	50	52,5	47,5
He (RFLP)	0,12	0,06	0,09	0,03	0,07	0,1	0,07	0,1	0,09
He(RAPD)	0,16	0,17	0,17	0,17	0,16	0,16	0,17	0,16	0,14

VA. Vaza-barris; P. Piauí; RE. Real; SF. São Francisco; JA. Japarutuba; SE. Sergipe; P. Paranaguá; G. Guaratuba; A.

Antonina

Tabela 4 Medidas de diferenciação das populações de *U. cordatus* baseadas na análise de variância molecular, tanto entre pontos de um mesmo estado quanto entre estados.

	Comparação	Φ_{st}	ρ
RAPD	Entre amostras do Sergipe	-0,009	0,73
	Entre amostras do Paraná	0,025	0,09
	Sergipe X Paraná	-0,0004	0,55
RFLP	Entre amostras do Sergipe	-0,005	0,61
	Entre amostras do Paraná	0,03	0,12
	Sergipe X Paraná	-0,001	0,58

Tabela 5 Análise de Clados Aninhados (Nested Clade Analysis – NCA) sobre o d-loop das populações de *U. cordatus* na costa do Brasil, calculado a partir dos clados da figura 4. D_c são distâncias de clado, D_n são distâncias de clado aninhado. Para nenhuma dessas distâncias foi encontrado valores significativos de p.

	Haplótipos		Clados de nível 1		Clados de nível 2			
	D_c	D_n	D_c	D_n	D_c	D_n		
1	0	605	1-1	1262	1164	2-1	1344	1222
2	0	605						
3	0	1650						
4	1253	1219	1-2	0	720	2-2	1491	1204
I-T	1253	269						
5	1530	1500						
6	0	1173	1-3	1530	1189	2-2	1491	1204
I-T	1530	326						
7			I-T	-26	49	2-2	1491	1204
8								
9	1650	1466	1-4	1530	1192	2-2	1491	1204
10	0	880						
I-T	1650	586	1-5	2200	1131	2-2	1491	1204
11	0	2200						
12	0	2200						
I-T	0	0	1-6	1494	1281	2-2	1491	1204
13	0	1344						
14	0	977						
15	0	977	1-7	1571	1184	2-2	1491	1204
16	1514	1419						
I-T	1514	319						
17	1760	1243	I-T	-135	100	2-2	1491	1204
18	1760	1243						
19	0	1375						
20	0	1375	I-T	-135	100	2-2	1491	1204
21	0	1100						
I-T	880	-19,9						

Capítulo II

Demografia evolutiva e estrutura genética da populações de *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae)

Abstract

Variation in a fragment of the mitochondrial control region was investigated to assess the population history of the mangrove land crab, *Ucides cordatus* L., based on 100 individuals from five locations throughout the Brazilian coast. There was considerable variability in the studied fragment, with every individual showing a distinct haplotype. When regions of ambiguous alignment were removed, 90 haplotypes were still recognized, of which only 1 was shared among locations. There was no statistically significant evidence for geographical structure in the pattern of genetic variability based on a nested clade analysis, even though the geographical distances among the farthest collection sites exceeded 3000 km. Moreover, the mismatch distribution of pairwise differences showed a smooth unimodal distribution that is consistent with a recent population expansion of *U. cordatus*, either when each location was analyzed in isolation or when all samples were combined. Interestingly, the estimates for the duration of such expansion vary latitudinally, suggesting that the expansion of the population of *U. cordatus* proceeded in a southward direction. These results indicate a possible relationship between the growth in the population of the mangrove land crab and the dynamics of mangrove ecosystems during the Quaternary.

Introdução

Um crescente número de ferramentas analíticas e conceituais para estudo de variabilidade genética tem revelado uma acentuada variedade de padrões de fluxo gênico e demografia histórica em organismos marinhos. O grau de estruturação nem sempre é inversamente proporcional à aparente capacidade dispersiva dos animais marinhos, tendo sido relatado estruturação em animais com grande capacidade de dispersão (Graves, 1998; Shaw et al, 1999; 2000; Roman & Palumbi 2004; Bay et al. 2006), e pouca ou nenhuma relação com o tempo de vida como larvas pelágicas, no caso de algumas espécies de peixes de recife (Bay et al. 2006). Até mesmo entre espécies

filogeneticamente próximas, é possível encontrar graus de estruturação geográfica e diversidade genética bem distintos, como observado recentemente em duas espécies próximas de camarões peneídeos (McMillen-Jackson & Bert, 2003), bem como com espécies de siris do gênero *Callinectes* (ver: Weber & Levy 2000; McMillen-Jackson & Bert 2004; Pfeiler et al. 2005).

Entretanto, o modo como os fatores fisiográficos e históricos têm moldado os padrões de diversidade genéticos de espécies marinhas desde o início do Quaternário ainda são desconhecidos. Tais informações seriam muito úteis, não somente para compreender os processos de especiação, mas também para estabelecer estratégias de conservação que mantenham o potencial evolutivo das espécies marinhas a longo prazo (Palumbi, 2004).

Um crustáceo marinho de particular importância dos manguezais brasileiros é o caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* L. Ele é considerado uma espécie-chave para os manguezais do Oeste do Atlântico por seu papel de reciclador de nutrientes, coletando folhas mortas caídas no solo, e proporcionando o aeramento do solo, através da escavação de tocas (Nordhaus et al. 2006). Adicionalmente, ele está entre os recursos pesqueiros mais importantes da região Nordeste do Brasil, sendo uma importante fonte de renda para famílias pobres locais (Diele et al., 2005). A combinação de super-exploração (Ministério do Meio Ambiente 2004; Amaral & Jablonski 2005) e uma doença infecciosa emergente (Doença do Caranguejo Letárgico, Boeger et al, 2005), têm causado reduções nos estoques naturais de *U. cordatus* (ver Alves & Nishida 2003), implicando na necessidade urgente de desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação da integridade genética das populações locais deste caranguejo.

Em um primeiro estudo sobre a diversidade genética de *U. cordatus*, no qual foram utilizados marcadores de RAPD e PCR-RFLP sobre a região controle do DNA mitocondrial não foi encontrada nenhuma evidência de estruturação genética (Oliveira-Neto et al., 2007). Entretanto, os dados de seqüências nucleotídicas e uma maior

abrangência geográfica e poderão confirmar os padrões genéticos das populações desta espécie, fornecendo novas informações sobre a evolução destas populações.

Mudanças no tamanho da população podem deixar traços reconhecíveis nos padrões de variabilidade genética. Em particular, a distribuição do número de diferenças entre pares de seqüências em uma amostra (conhecido como *Mismatch distribution*) pode conter informações sobre a história da população (Rogers & Harpending 1992). Dado que a genealogia de uma população de tamanho constante contém ramos internos longos, as mutações presentes nestes ramos serão compartilhadas por várias linhagens, resultando em uma *mismatch distribution* irregular ou descontínua. Por outro lado, a genealogia de uma população que tem crescido significativamente em tamanho apresenta longos ramos terminais e as mutações ocorridas nestes ramos serão específicas de uma linhagem. Sob estas condições, uma *mismatch distribution* unimodal é esperada, cuja média, sob um modelo de sítios infinitos, cresce em função do tempo decorrido após o crescimento da população. Os métodos de *mismatch distribution* são usados no presente estudo para inferir a história das populações do caranguejo-uçá, *U. cordatus*, através da investigação dos padrões de variação em um fragmento da região controle do mt-DNA entre pontos ao longo da costa brasileira.

Material e Métodos

Foram utilizados 20 exemplares de *U. cordatus* de cada uma das 5 localidades amostradas ao longo da costa brasileira: Pará, Pernambuco, Sergipe, Bahia e Paraná (Fig. 1), totalizando 100 indivíduos. O tecido muscular de um dos pereiópodes foi removido, preservado em EDTA-DMSO (Seutin et al. 1991) e mantido a -20° C. O DNA genômico foi extraído utilizando kit Dneasy (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante.

Os *primers* 12SUCAF3 (5'-CCA GTA NRCCTA CTA TGT TAC GAC TTA T-3') e ILEUCAR3 (5'-GCT AYC CTT TTA AAT CAG GCA C-3') foram usados para amplificação

de um fragmento de 1,6kb, incluindo a região controle mtDNA de *U. cordatus* (Oliveira-Neto et al. 2007). Cada 25 μ l de PCR incluiu as seguintes concentrações: 6 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP, 0,1 U/ μ l de Taq Polimerase, tampão 1 X (Invitrogen), 2 μ M de cada primer, e 1,2 ng/ μ l de DNA. As condições de termociclagem incluíram uma denaturação inicial a 95° C por 2 min, seguida de 35 ciclos a 95° C por 20s, 56° C por 30s, e 72° C por 90s, e uma extensão final a 72° C por 2 min. Uma alíquota de 2 μ l foi usada para eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizada sob luz UV. Os produtos bem sucedidos na amplificação foram purificados usando o kit MinElute (Qiagen).

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando *primers* internos (DL.USSA.R1: 5'-GGT TAG AGA GAA GGT TAG AGG AC-3', e DL.USSA.F1: 5'GTA TAA CCG CGA ATG CTG GCA C-3'), que geraram fragmentos que poderiam ser seqüenciados em uma única reação, incluindo 112bp da região 5' do 12S mtDNA e mais de 400bp da região controladora (o tamanho pode variar em função da presença de inserções). A reação de seqüenciamento em soluções de 10 μ l incluiu as seguintes concentrações finais: 5ng/ μ l de DNA, 0,16 μ l de *primer*, 0,15X de tampão de reação, e 0,5 μ l de BigDye (Applied Biosystems). O produto final foi purificado com Sephadex G50 e processado em seqüenciador automático ABI3130. As fitas sense e reverso foram conciliadas usando o pacote STADEN (Staden, 1996). As seqüências foram alinhadas usando Clustal W (Thompson et al. 1994), implementado no BioEdit® (Hall 1999). Regiões com alinhamento ambíguo foram omitidas das análises.

A existência de estruturação geográfica no padrão de variabilidade genética entre populações de *U. cordatus* foi testada usando a Análise de Clados Aninhados (NCA), como implementado pelo programa GeoDis (Posada et al. 2000), de acordo com as regras de Templeton et al. (1995). Este programa calcula as distâncias de clado Dc (média das distâncias entre a localidade dos membros de um clado e o centro geográfico do clado) e a distância de clado aninhado Dn (média espacial da distância entre os membros de cada clado e o centro geográfico e o centro geográfico de todo o clado).

aninhado de nível superior). Adicionalmente, as medidas da média de distância entre cladogramas de ponta e interior dentro de um clado aninhado (Int-Tip)_c, e a distância de clado de ponta e interior do clado aninhado de nível superior (Int-Tip)_n são estimados. O teste para saber se as distâncias são significativamente maiores ou menores do que o esperado pelo acaso foi feito a partir de 10000 permutações. A interpretação dos resultados seguiu os métodos desenvolvidos por Templeton et al. (1995).

As inferências sobre a história demográfica foram acessadas usando a análise de *mismatch distribution* - MD (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending 1992). Três parâmetros foram estimados usando modelos de Rogers & Harpending's (1992) $h_0 = 2N_0u$, $h_1 = 2N_1u$, e $s = 2ut$, onde assume-se que uma população inicial de tamanho efetivo N_0 cresce rapidamente para um tamanho N_1 num intervalo de tempo de t gerações antes do presente, e u é a probabilidade por geração de que uma mutação atinja um nucleotídeo na região de estudo. Estes parâmetros foram estimados usando a aproximação de mínimos quadrados não linear generalizada desenvolvida por Schneider & Excoffier (1999). Também, o grau de aproximação entre o *mismatch distribution* observado e aquele esperado sob população em crescimento foi testado usando a estatística de *raggedness* de Harpending (1994). O equilíbrio de seleção de mutação foi testado usando os parâmetros D de Tajima (1989) e F de Fu (1997). No teste de Tajima (1989) o parâmetro h é independentemente estimado duas vezes. Uma estimativa é calculada a partir do número de sítios polimórficos e a outra a partir da média de diferenças das amostras. As diferenças entre as duas estimativas são então atribuídas à seleção ou à história demográfica da população estudada.

Similarmente, a estatística F_s de Fu (1997) compara o número observado de alelos em uma amostra com o número observado de alelos esperados em uma população que se mantém em tamanho constantes. As significâncias de D e F_s foram testadas por randomização. D e F_s foram calculados para cada re-amostragem simulada para obtenção de uma distribuição nula, sob a hipótese de estacionariedade demográfica. Uma expansão de população recente produziria valores negativos em ambas as

estatísticas. Todas as análises foram rodadas pelo programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier et al. 2005) com exceção da NCA, que foi feita com o auxílio dos programas GeoDis (Posada, 2000) e TCS (Clement et al., 2000)

Resultados

Variação genética

Um fragmento de 600 pares do DNA mitocondrial foi bidirecionalmente seqüenciado para os 100 indivíduos de *U. cordatus*. Houve considerável variabilidade genética no fragmento estudado, com cada indivíduo mostrando um distinto haplótipo da região controladora. Quando as regiões ambíguas foram removidas do alinhamento, 505 sítios definiram 90 haplótipos, dos quais apenas um foi compartilhado entre localidades e 10 foram encontrados em mais de um indivíduo. Não houve nenhuma tendência latitudinal clara no número de haplótipos, no número médio de diferenças de nucleotídeos e na diversidade de nucleotídeos entre as áreas estudadas (Tabela 1). As seqüências destes haplótipos foram depositadas no GenBank sob os números de acesso EU057729–EU057828.

Estrutura populacional

Não houve estruturação estatisticamente significativa nos padrões de diversidade genéticas da populações entre as localidades estudadas de acordo com o NCA (Tabela 2). Este resultado é evidente na rede de haplótipos (Fig.2), na qual não há relação aparente entre as localidades de um haplótipo e o seu relacionamento genético com outros haplótipos. Este resultado indica que conhecendo-se apenas o haplótipo de um indivíduo não é possível predizer a localidade na qual ele foi coletado.

Expansão da população no passado

As estimativas do D de Tajima e F de Fu foram negativas em todas as localidades, embora as probababilidades associadas não apresentaram significância estatística na maioria dos casos (Tabela 1). Em adição, a distribuição das diferenças entre pares de base mostraram padrão unimodal característico de populações em expansão populacional, tanto quando cada localidade foi analisada separadamente quanto quando todas as amostras foram agrupadas para uma única análise (Fig. 3). O índice de *raggedness* de Harpending foi uniformemente baixo em todos os casos, confirmando a distribuição unimodal. A amostra do Pará teve uma relativamente baixa probabilidade associada ($P= 0,017$), que se tornou não significativa após o controle de múltiplas comparações.

As estimativas de h_0 e h_1 indicam que as populações tiveram um aumento a partir de um tamanho muito pequeno (próximo de 0, em alguns casos) para muito grande (infinitas em todos os casos), com 95% de intervalo de confiança (CI). Interessantemente, houve um decréscimo nos valores de tau nas populações do Norte (tau=20,7 no Pará) para o sul (tau=12,18 no Paraná), indicando que a expansão de *U. cordatus* ocorreu do norte para o sul do Brasil ($r^2 = 0,89$; $P=0,016$; Fig. 4).

Discussão

Os resultados de NCA da variação genética de *U. cordatus* não mostraram nenhuma evidência de estruturação geográfica, mesmo considerando as distâncias entre os pontos mais distantes, equivalentes a 4500 km. Este resultado corrobora o estudo prévio com a mesma espécie, em uma escala geográfica menor, utilizando marcadores de RAPD e PCR-RFLP (Oliveira-Neto et al. 2007). Embora tal falta de diferenciação genética seja também encontrada em outras espécies [e.g. *Pachygrapsus crassipes* (ver

Cassone & Boulding, 2006) e *Callinectes sapidus* (ver McMillen-Jackson & Bert 2003)], este caráter com certeza não é compartilhado por todos os crustáceos estuarinos. Um espectro de níveis de diferenciação em populações marinhas tem sido descrito, o qual pode variar de fraco a muito forte (Weber & Levy 2000; Roman & Palumbi 2004; Diniz et al. 2005; Remerie et al. 2006; Ricklefs et al. 2006). Tais diferenças são causadas por variação interespecíficas na biologia das larvas, com a qual a retenção/expoção larval pode estar associada a níveis de fluxo gênico variáveis entre estuários. Por outro lado, as larvas de *U. cordatus* são conhecidas por sua alta capacidade de dispersão (Diele 2001), uma estratégia que é consistente com uma esperada baixa estruturação geográfica.

Um considerável nível de diversidade genética foi observado nas populações de *U. cordatus*, o que é comum em crustáceos marinhos (e.g. McMillen-Jackson & Bert 2003, Diniz et al. 2005, Cassone & Boulding 2006). Um alto nível de diversidade haplotípica é usualmente interpretado como o resultado de uma combinação de altas taxas de mutação e grande tamanho efetivo das populações (McMillen-Jackson & Bert, 2003; Diniz et al. 2005; Cassone & Boulding 2006; Ricklefs et al. 2006). A mudança de tamanho na população deixa rastros que podem ser detectados por seqüências de DNA (Slatkin & Hudson 1991; Rogers & Harpending 1992). Os padrões de *mismatch distribution* observados são claramente unimodais, um resultado que é consistente com uma expansão demográfica recente (Slatkin & Hudson 1991; Rogers & Harpending 1992) ou com a expansão da área de ocorrência com altos níveis de migração entre demes vizinhas (Ray et al. 2003; Excoffier 2004). A mismatch observada ainda pode explicar um alto nível de diversidade haplotípica, assumindo-se que a expansão populacional causa um número de haplótipos gerados maior que o número de haplótipos perdidos por deriva (Avice et al. 1984). É importante notar que, mesmo sabendo que a alta variabilidade genética no fragmento estudado, provavelmente, viola o pressuposto de sítios infinitos da análise de *mismatch distribution*, estudos com simulações têm mostrado que as estimativas paramétricas são robustas a despeito de tais violações, mesmo quando a taxa de mutação de sítios específicos seguem a distribuição gama (Rogers et al. 1996).

Um aspecto marcante na *mismatch distribution* observada é a variação sistemática nos valores de tau, indicando uma possível expansão latitudinal da área de ocorrência. Assumindo que a taxa de mutação é constante entre localidades, as populações localizadas mais ao norte ($s = 20,7$) é mais antiga que a população localizada mais ao sul ($s = 12,18$). Tendo-se em vista a forte ligação entre a ecologia de *U. cordatus* e o manguezal, esta expansão pode indicar um aumento correspondente na disponibilidade de áreas com manguezal ao longo da costa brasileira. Estudos com dados palinológicos do Quaternário têm mostrado que a distribuição de florestas de manguezais resulta de um processo muito dinâmico, especialmente em resposta às flutuações no nível do mar (Woodroffe & Grindrod 1991; Ellison 1996). Em particular, a expansão dos manguezais tem sido relacionada a períodos de transgressão, e não pode ser simplesmente associada ao clima úmido e seco (Grinrod et al. 1999). Esta hipótese de expansão de ambientes de manguezal na costa brasileira pode ser indicativo de formação de estuários mais bem desenvolvidos, como sugerido por Grinrod et al (1999) para os trópicos australianos.

Os resultados do presente estudo sugerem que tal expansão pode ter deixado sinais no padrão de variação genética de caranguejo do mangue, possivelmente acompanhando uma expansão das áreas de manguezal. Infelizmente, para melhor compreensão, nenhuma informação comparável sobre outros animais ou plantas está disponível para determinar se este é um padrão geral para espécies de manguezal. Entretanto, ao menos um caranguejo símpátrico mostra alta concordância nesses padrões genéticos (*Cardisoma guanhumi*, Oliveira-Neto et al., dados não publicados).

Referências

- Alves R.R.N., Nishida A.K. (2003) Aspectos socioeconômicos e percepção ambiental dos catadores de caranguejo-ucá *Ucides cordatus cordatus* (L. 1763) (Decapoda, Brachyura) do estuário do Rio Mamanguape, nordeste do Brasil. *Interciencia*, 28(1), 36–43.
- Amaral A.C.Z., Jablonski S. (2005) Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. *Megadiversidade*, 1, 43–51.
- Avise J.C., Neigel J.E., Arnold J. (1984) Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, 20, 99–105.
- Bay L.K., Crozier R.H., Caley M.J. (2006) The relationship between population genetic structure and pelagic larval duration in coral reef fishes on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, 149, 1247–1256.
- Boeger W.A., Pie M.R., Ostrensky A., Patella L. (2005) Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(2), 161–167.
- Cassone B.J., Boulding E.G. (2006) Genetic structure and phylogeography of lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western pacific coast. *Marine Biology*, 149, 213–226.
- Diele K. (2000) Life history and population structure of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1758) (Crustacea, Decapoda Brachyura) in Northern Brazil. PhD. Thesis, University of Bremen.
- Diele K., Koch V., Saint-Paul U. (2005) Population structure, catch composition and CPUE of the artisanally harvested mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) in the Caete´ estuary, north Brazil: indications for overfishing? *Aquatic Living Resource*, 18, 169–178.
- Diniz F.M., Maclean N., Ogawa M., Cintra I.H.A., Bentzen P. (2005) The hypervariable domain of the mitochondrial control region in Atlantic spiny lobsters and its potential as a marker for investigating phylogeographic structuring. *Marine Biotechnology*, 7, 462–473.

- Ellison J.C. (1996) Pollen evidence of Late Holocene mangrove development in Bermuda. *Global Ecology & Biogeography Letters*, 5, 315–326.
- Excoffier L. (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13, 853–864.
- 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.
- Fu Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915–925.
- Graves J.E. (1998) Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. *The American Genetic Association*, 89, 427–437.
- Grinrod J., Moss P., van der Kaars S. (1999) Late Quaternary cycles of mangrove development and decline on the North Australian continental shelf. *Journal of Quaternary Science*, 14, 465–470.
- Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Harpending R.C. (1994) Signature of ancient population growth in low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66, 591–600.
- McMillen-Jackson A.L., Bert T.M. (2003) Disparate patterns of population genetic structure and population history in two sympatric penaeid shrimp species (*Farfantepenaeus aztecus* and *Litopenaeus setiferus*) in the eastern United States. *Molecular Ecology*, 12, 2895–2905.
- McMillen-Jackson L., Bert T.M. (2004) Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the blue crab *Callinectes sapidus* in the eastern United States. *Marine Biology*, 145, 769–777.

- Ministério do Meio Ambiente (2004) Lista Nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração. Instrução Normativa Nº 5 de 21 de Maio de 2004.
- Nordhaus I., Wolff M., Diele K. (2006) Litter processing and population food intake of the mangrove crab *Ucides cordatus* in a high intertidal forest in northern Brazil. *Estuarine Coastal Shelf Science*, 67, 239–250.
- Oliveira-Neto J.F., Boeger W.A., Pie M.R., Ostrensky A., Hungria D.B. (2007) Genetic structure of populations of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) at local and regional scales. *Hydrobiologia*, 583, 69–76.
- Palumbi S.R. (2004) Marine reserves and ocean neighborhoods: the spatial scale of marine populations and their management. *Annual Review of Environmental Resources*, 29, 31–68.
- Pfeiler E., Hurtado L.A., Knowles L.L., Torre-Cosío J., Bourillón-Moreno L., Márquez-Farías J.F., Montemayor-López G. (2005) Population genetics of the swimming crab *Callinectes bellicosus* (Brachyura: Portunidae) from the eastern Pacific Ocean. *Marine Biology*, 146, 559–569.
- Posada D., Crandall K.A., Templeton A.R. (2000) GEODIS: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9, 487–488.
- Ray N., Currat M., Excoffier L. (2003) Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology Evolution*, 20, 76–86.
- Remerie T., Bourgois T., Peelaers D., Vierstraete A., Vanfleteren J., Vanreusel A. (2006) Phylogeographic patterns of the mysid *Mesopodopsis slabberi* (Crustacea, Mysida) in Western Europe: evidence for high molecular diversity and cryptic speciation. *Marine Biology*, 149, 464–481.
- Ricklefs R.E., Schwarzbach A.E., Renner S.S. (2006) Rate of lineage origin explains the diversity anomaly in the world's mangrove vegetation. *American Naturalist*, 168, 805–810.

- Rogers A.J., Harpending H. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology Evolution*, 9, 552–569.
- Rogers A.R., Fraley A.E., Bamshad M.J., Watkins W.S., Jorde L.B. (1996) Mitochondrial mismatch analysis is insensitive to the mutational process. *Molecular Biology Evolution*, 3, 895–902.
- Roman J., Palumbi S.R. (2004) A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. *Molecular Ecology*, 13, 2891–2898.
- Santos S., Hrbek T., Farias I.P., Schneider H., Sampaio I. (2006) Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Molecular Ecology*, 15, 4361–4373.
- Schneider S., Excoffier L. (1999) Estimation of demographic parameters from distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152, 1072–1089.
- Seutin G., White B.N., Boag P.T. (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 82–90.
- Shaw P.W., Pierce G.J., Boyle P.R. (1999) Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 8, 407–417.
- Slatkin M., Hudson R.R. (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129, 555–562.
- Staden R. (1996) The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, 5, 233–241.
- Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Templeton A.R., Routman E., Phillips C.A. (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140, 767–782.

- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- Weber L.I., Levy J.A. (2000) Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. *Hydrobiologia*, 420, 203–210.
- Woodroffe C.D., Grindrod J. (1991) Mangrove biogeography: the role of quaternary environmental and sea-level change. *Journal of Biogeography*, 18, 479–492.

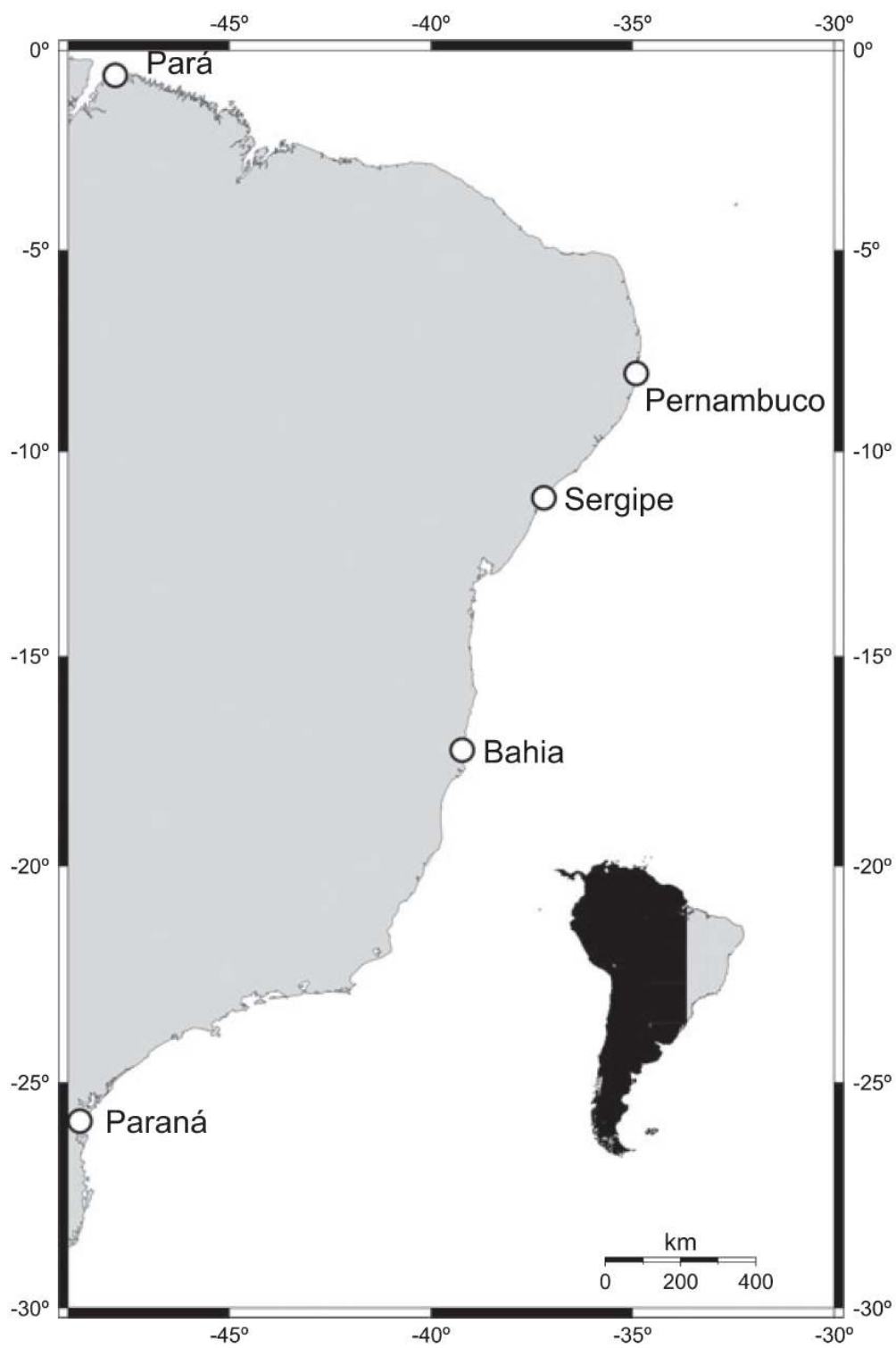


Fig.1. Mapa da costa do Brasil indicando as áreas amostradas.

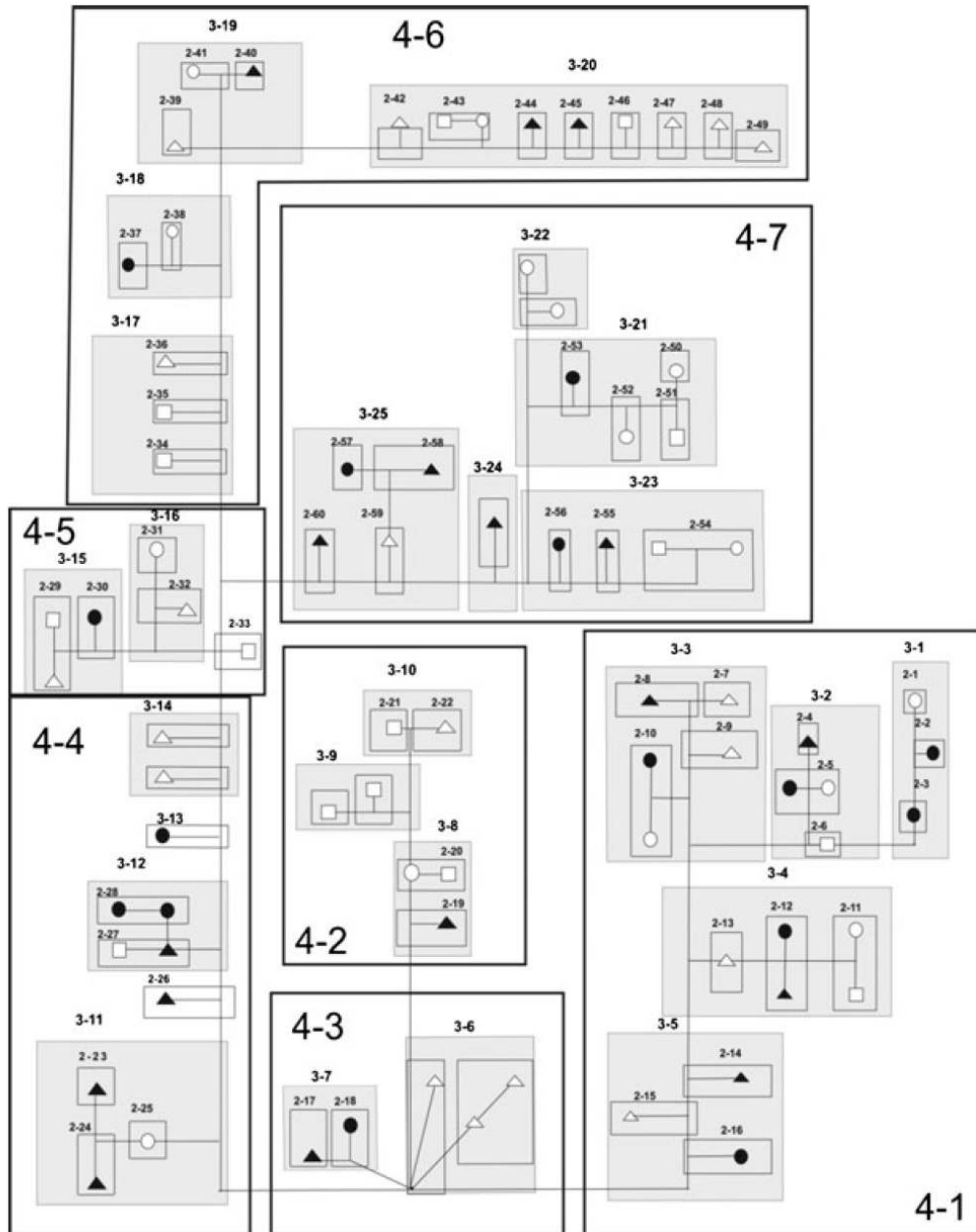


Fig.2. Árvore de passos mínimos dos 90 haplótipos de d-loop de *U. cordatus*, subdividida em clados. O nível 1 foi omitido. O número dentro de cada quadrado representa o número do nível do clado seguido do número de ordem do clado naquele nível. O haplótipo é representado pelo símbolo que também representa sua localidade: quadrados brancos são do Pará, triângulos brancos são de Pernambuco, triângulos pretos são do Sergipe, círculos pretos são da Bahia e círculos brancos são do Paraná.

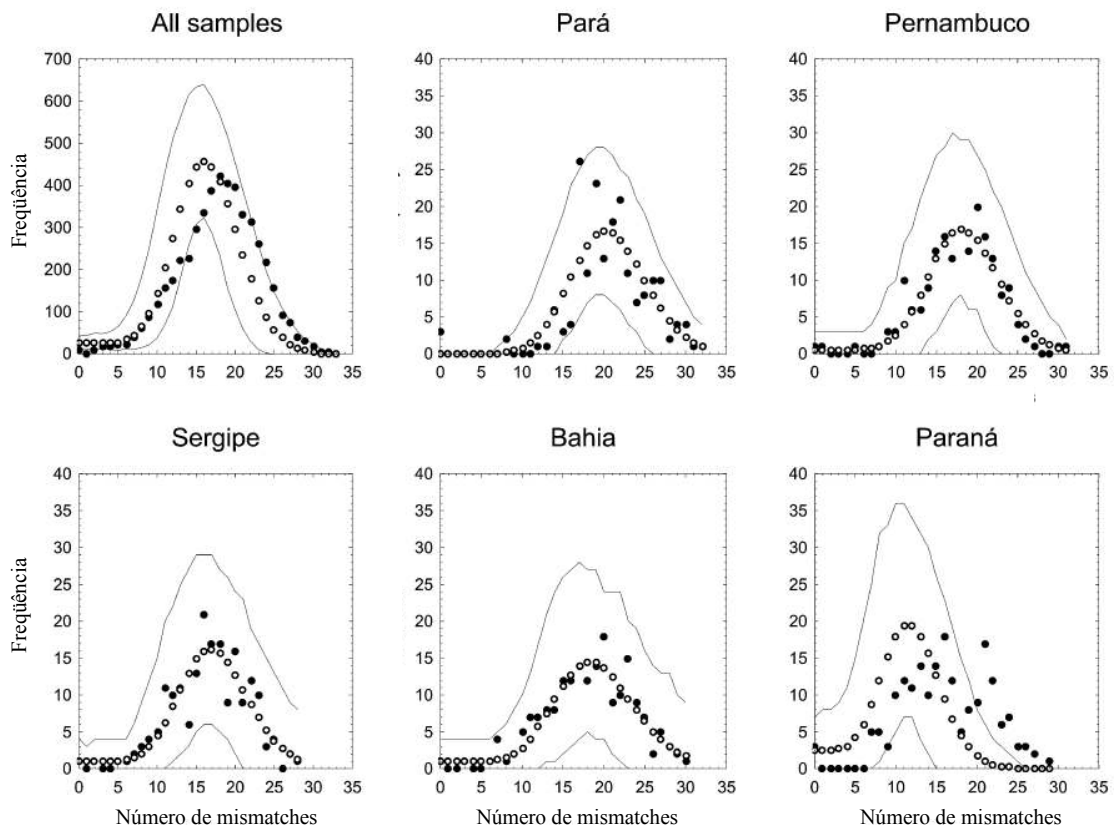


Fig.3. *Mismatch distributions* de todas as amostras combinadas, bem como de cada localidade separadamente, indicando os padrões observados (círculos fechados) e esperados (círculos abertos) de *mismatch*. O último é complementado por 95% de intervalo de confiança.

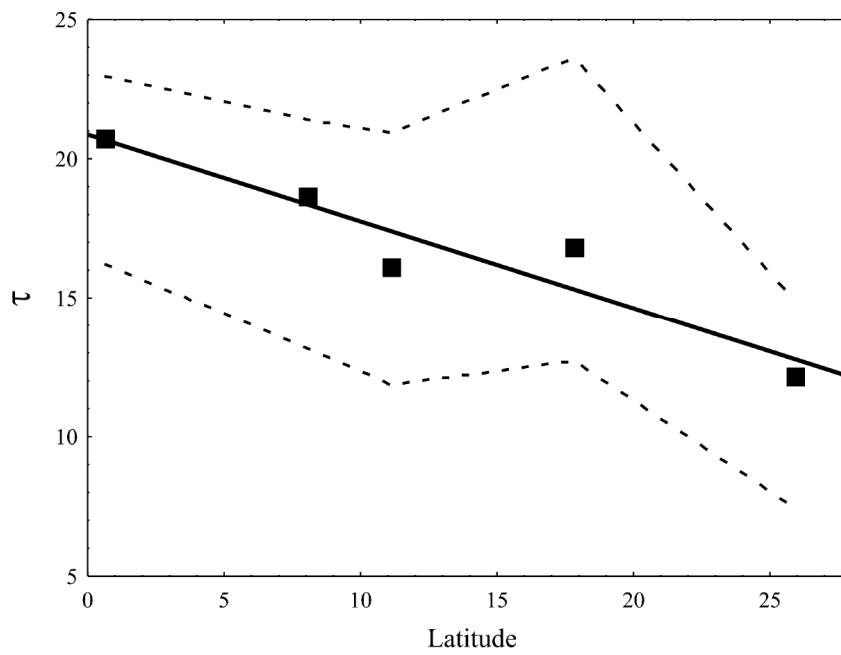


Fig.4. Relação entre os parâmetros τ e a latitude onde foram encontrados. A regressão é significativa ($r^2 = 0.8906$, $P = 0.0159$).

Tabela 1. Valores descritivos e parâmetros estimados a partir das seqüências de d-loop de *U. cordatus* da costa brasileira.

	Total	Pará	Pernambuco	Sergipe	Bahia	Paraná
Número de indivíduos	100	20	20	20	20	20
Número de haplótipos	90	17	19	19	18	17
Número de haplótipos únicos	88	17	19	18	18	16
Médias de diferenças de nucleotídeos	16,2	18,32	16,71	14,84	16,17	15,7
Diversidade de nucleotídeos (SD)	0,035 ± 0,017	0,041 ± 0,021	0,035 ± 0,018	0,033 ± 0,017	0,036 ± 0,018	0,032 ± 0,016
D de Tajima	-1,472	-1,036	-0,811	-1,215	-1,227	-0,6
P _D	0,045	0,149	0,209	0,088	0,091	0,315
F _s de Fu	-24,01	-2,03	-5,63	-6,01	-5,52	-2,97
P _F	<0,001	0,188	0,018	0,019	0,018	0,106
Θ ₀ (95% IC)	0 (0–3,15)	0,035 (0–3,69)	0,028 (0–3,99)	1,5 (0–5,15)	2,7 (0–8,62)	0 (0–3,67)
Θ ₁ (95% IC)	191 (120–∞)	∞ (178,8–∞)	300 (126,19–∞)	187 (92,06–∞)	184 (82,5–∞)	74 (37,75–∞)
Tau (95% IC)	16,6 (12,3–18,4)	20,7 (16,2–23)	18,6 (13,2–21,4)	16,1 (12–21)	16,8 (12,5–23,6)	12,18 (7,4–14,9)
Índice raggedness	0,001	0,034	0,007	0,012	0,007	0,011
P _r	0,991	0,017	0,854	0,528	0,871	0,731

Tabela 2. Valores de distâncias de clado (D_c), distâncias de clado aninhado (D_n) e contraste entre clados de ponta e clados interiores (I-T) provenientes da *Nested Clade Analysis* sobre a rede de haplótipos (Fig. 2) de d-loop de populações de *U. cordatus* da costa brasileira.

clados	D_c	D_n	clados	D_c	D_n	clados	D_c	D_n																											
2-1	0	1930	3-1	2660.7	1714.9	4-1	1692.2	164.2																											
2-2	1600	2639																																	
2-3	0	3100																																	
1-T	960	893.5																																	
2-4	0	2000																																	
2-5	0	1000																																	
2-6	0	1000																																	
1-T	0	-1000																																	
2-7	0	1291																																	
2-8	0	1748.1																																	
2-9	0	1575																																	
2-10	1600	2311.7							3-2	1600	1534																								
2-11	4600	2875																																	
2-12	450	1318.7																																	
2-13	0	1262.5																																	
2-14	0	566.6																																	
2-15	0	1100																																	
2-16	0	680																																	
2-17	0	450																																	
2-18	0	450																																	
1-T	0	0																																	
2-19	0	2300	3-3	1984.2	1714.9																														
2-20	4600	3450																																	
2-21	0	1350				3-4	2031.6	1671.0																											
									1-T	-450	-197.9																								
												2-22	0	1350																					
															1-T	0	0																		
																		2-23	0	1225															
																					2-24	0	1225												
																								2-25	0	2450									
																											1-T	0	612.5						
																														2-26	2150	1733.3			
																																	2-27	0	1220
			1-T	2150	513.3																														
2-30	0	2150																																	
						1-T	-1080	668.75																											
									2-31	0	3700																								
												2-32	0	3700																					
															2-33	0	3700																		
																		1-T	-2369.1	-923.7															
																					3-5	763.6	1269.4												
																								3-6	450	881.2									
																											3-7	0	683.3						
																														1-T	-450	-197.9			
			3-8	3066	2472																														
																																	1-T	490	572.4
3-9	0	1472																																	
						3-10	1350	1500																											
									3-11	1960	1431.2																								
												3-12	1500	1211.6																					
															3-13	0	847.6																		
																		3-14	0	1261.9															
																					3-15	1663.6	1786												
																								3-16	3700	2683									
																											4-2	2186.1	1953.3						
																														4-3	776.5	1308.2			
			4-4	1262.2	1443.2																														
																																	4-5	2189.5	1858.7

Tabela 2. Continuação.

clados	D _c	D _n	clados	D _c	D _n	clados	D _c	D _n	
2-34	0	540	}	3-17	900	}	4-6	1922.1	1743.7
2-35	0	450							
2-36	0	1350	}	3-18	2000	}	4-6	1922.1	1743.7
2-37	0	2000							
2-38	0	2000	}	3-19	2316.7	}	4-6	1922.1	1743.7
1-T	0	0							
2-39	0	3075	}	3-20	1616.2	}	4-6	1922.1	1743.7
2-40	0	1625							
2-41	0	2250	}	3-20	1616.2	}	4-6	1922.1	1743.7
2-42	0	1170.6							
2-43	4600	2655.5	}	3-20	1616.2	}	4-6	1922.1	1743.7
2-44	0	1105.5							
2-45	0	1827.8	}	3-20	1616.2	}	4-6	1922.1	1743.7
2-46	0	977.7							
2-47	0	977.7	}	3-20	1616.2	}	4-6	1922.1	1743.7
2-48	0	977.7							
2-49	0	977.8	}	3-20	1616.2	}	4-6	1922.1	1743.7
1-T	1022.2	524.3							
2-50	0	1650	}	1-T	0.4	}	4-6	1922.1	1743.7
2-51	0	4100							
2-52	0	1885.7	}	3-21	2635.2	}	4-7	2046.9	1899.3
2-53	0	2150							
1-T	0	747.6	}	3-22	0	}	4-7	2046.9	1899.3
2-54	4600	3066							
2-55	0	1683.3	}	3-23	2375	}	4-7	2046.9	1899.3
2-56	0	1683.3							
1-T	-4600	-1383.3	}	3-24	0	}	4-7	2046.9	1899.3
2-57	0	716.6							
2-58	0	716.6	}	3-25	681.8	}	4-7	2046.9	1899.3
2-59	0	950							
2-60	0	416.6	}	3-25	681.8	}	4-7	2046.9	1899.3
							1-T	38.1	-68.7

Capítulo III

Demografia evolutiva e estrutura genética da populações (*Cardisoma guanhumi*, Decapoda: Gecarcinidae) ao longo da costa do Brasil

Publicado na revista *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*
(2008): 88(7), 1417-1423 (Anexo 3)

Abstract

Several crab species are important fishery resources in Brazil and their overexploitation to severe population declines in some regions. The management of populations of these species should take into account the degree of gene flow among populations in different estuaries. The goal of the present study is to assess the degree of geographical structure in the genetic diversity of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi*, along the Brazilian coast. A fragment of the control region of the mtDNA (750 bp) was sequenced for 95 specimens collected across 5 Brazilian states. Analyses using F-statistics failed to indicate any evidence of geographical structure, a result that was corroborated by a Nested Clade Analysis of the same dataset. Mismatch distribution analyses indicated that populations of the blue land crab have experienced an expansion during their recent evolutionary past. The obtained results are similar to those recently described for another sympatric crab, *Ucides cordatus*, particularly with respect to the extensive degree of gene flow. However, populations of *C. guanhumi* do not show the North-South expansion found in *U. cordatus*.

Key words: population genetics, d-loop, mangrove, estuary, guaiamum.

Introdução

O guaiamum (*Cardisoma guanhumi*, Brachyura: Gecarcinidae) é uma caranguejo muito adaptado à vida terrestre, que vive em áreas estuarinas nas regiões tropicais e subtropicais da costa atlântica do Novo mundo, desde o estado da Flórida, nos EUA, até o estado de Santa Catarina, sul do Brasil. É um importante recurso econômico devido ao seu grande tamanho corporal, que comumente ultrapassa 11 cm de comprimento de carapaça. No Brasil, seu maior consumo ocorre nos estados da região Nordeste, onde tem considerável importância econômica (Amaral & Jablonski, 2005; Ministério do Meio Ambiente, 2005). *C. guanhumi* não é uma espécie considerada ameaçada de extinção, ainda que em algumas regiões, tenha se tornado rara e as médias de tamanho corporal tenham diminuído (Amaral & Jablonsky, 2005). Conseqüentemente, *C. guanhumi* foi incluída na lista oficial de espécies sobre-explotadas (Ministério do Meio Ambiente, 2004).

O ciclo de vida de *C. guanhumi* é similar ao de outros crustáceos semi-terrestres que vivem nos manguezais ou próximos a estes. Durante a estação reprodutiva, tais caranguejos lançam milhares de larvas na água durante a maré cheia da lua nova. Estas são carregadas para águas da plataforma, onde permanecem por várias semanas até retornarem para o estuário (Gifford, 1962). O fluxo gênico entre populações desta espécie ocorre, principalmente, através da dispersão das larvas para outros estuários, uma vez que os adultos têm capacidade de dispersão mais limitada. A distância entre estuários, o fluxo gênico, a direção das correntes marinhas e o formato dos estuários variam consideravelmente ao longo da costa brasileira, e a influência destes fatores no potencial dispersivo das larvas é quase completamente desconhecida.

Os conhecimentos de grau de fluxo gênico, diversidade genética e tamanho efetivo da população são a base do estabelecimento de estratégias de conservação (Frankham et al. 2002). Animais com larvas pelágicas marinhas normalmente possuem pouca diferenciação genética devido ao alto grau de fluxo gênico. Entretanto, estudos com alguns crustáceos braquiúros têm mostrado graus de estruturação que variam de

baixo (McMillen-Jackson & Bert, 2004; Cassone & Boulding, 2005; Pfeiler et al., 2005; Oliveira-Neto et al., 2007, 2008) a intermediário ou alto (Weber & Levy, 2000; Fratini & Vannini, 2002; Weinberg et al., 2003; Roman & Palumbi, 2004).

Um estudo recente com o ocipodídeo *Ucides cordatus*, uma espécie grandemente simpátrica com *C. guanhumi*, falhou em mostrar alguma evidência de estruturação genética ao sul do Rio Amazonas (Oliveira-Neto et al., 2007).

O objetivo do presente estudo é a caracterização e comparação da estrutura genética de *C. guanhumi* ao longo da costa brasileira usando seqüências da região controladora do mt-DNA, um fragmento muito apropriado para estudos de genética populacional, devido ao seu alto grau de polimorfismo intrapopulacional (McMillen-Jackson & Bert T.M, 2004; Oliveira-Neto et al., 2007).

Material de Métodos

Área de estudo

As amostras foram obtidas de cinco estados ao longo da costa brasileira: Rio Grande do Norte (n=10), Pernambuco (n=19), Sergipe (n=21), Rio de Janeiro (n=20), e Santa Catarina (n=23) (Fig. 1). As distâncias entre os estuários estudados variaram entre 400 Km a 5000 km e são separados um dos outros por praias arenosas e outros estuários. Os aproximadamente 5000 km de costa que este estudo abrange representam aproximadamente um terço da distribuição de *C. guanhumi*. Existe uma bifurcação na corrente Sul Equatorial na região Nordeste do Brasil, perto dos 16° S, implicando o surgimento de duas correntes, a corrente das Guianas ao norte e a corrente do Brasil ao sul. No entanto, a correntes costeiras podem ter maior importância na dispersão das larvas, e tem maior variação espacial e temporal em suas direções (Silva et al., 2005; Miranda, 1370; Mesquita & Hatari, 1969).

Etapas laboratoriais

Um fragmento de tecido muscular de um pereiópode foi removido, preservado numa solução de EDTA-DMSO (Seutin et al., 1991), e mantido a -20°C. O DNA genômico

total foi extraído usando o kit ChargeSwitch® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os primers 12SUCAF3 (5'– CCA GTA NRC CTA CTA TGT TAC GAC TTA T – 3') e ILEUCAR3 (5'– GCT AYC CTT TTA AAT CAG GCA C – 3') foram usados para amplificar um fragmento de aproximadamente 1,6kb incluindo a região controle do mtDNA (Oliveira-Neto *et al.* 2007). Cada 25- μ l de solução de PCR teve as seguintes concentrações finais: 6 mM de $MgCl_2$, 0,25 mM de cada dNTP, 0,1 U/ μ L de *Taq* polimerase, tampão 1X, 2 μ M de cada primer, e 1,2 ng/ μ L de DNA genômico. A programação de temociclagem consistiu nos seguintes passos: 95°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 95°C de 20 s, 56°C de 30 s, e 72°C por 90 s, seguido por uma extensão final de 72 °C por 2 min. Uma alíquota de cada produto de PCR foi usada em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em câmara UV. Os produtos das reações bem sucedidas foram purificados com kit MinElute (Qiagen) e seqüenciados através de iniciadores internos ILEUCAR2: 5'–CCT TTT AAA TCA GGC ACT ATA – 3', e DLUSSAF1: 5'– GTA TAA CCG CGA ATG CTG GCA C – 3') (Oliveira-Neto *et al.* 2007). Cada 10 μ L de reação de seqüenciamento incluiu as seguintes concentrações de reagentes: 0,16 μ M de primer, 0,15X de tampão, 0,5 μ L de BigDye (Applied Biosystems), e 20 ng de produto de PCR purificado. A solução resultante foi purificada usando Sephadex G50 e analisada seqüenciador automático ABI3130. As seqüências foram alinhadas manualmente.

Análise dos dados

A ocorrência de estruturação geográfica na variabilidade genética das populações foi testada usando estatística F e Análise de Variância Molecular (AMOVA), ambos implementados pelo programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). A distribuição nula dos valores pareados de F_{st} sob a hipótese de não diferenciação entre populações foi obtida através de permutação de haplótipos entre populações. Similarmente, a AMOVA foi calculada baseada em uma matriz de distância entre haplótipos, e comparando grupos de amostras. Amostras do Rio de Janeiro e Santa Catarina foram agrupadas como

“amostras do sul”, enquanto as demais amostras foram agrupadas como “amostras do norte”, para aumentar o poder estatístico da AMOVA. Estes agrupamentos foram feitos com base na distância entre os estuários e características climáticas e geomorfológicas. Estas análises foram complementadas pelo Nested Clade Analysis, como implementado pelo programa GeoDis (Posada et al. , 2000) de acordo com os métodos de Templeton et al (1995). Este programa calcula as distâncias de clado D_c (média das distâncias entre as localidades dos membros do clado e o centro geográfico do clado) e as distâncias de clado aninhado D_n (a média de distância espacial dos membros de cada clado e o centro geográfico do clado de nível superior). Adicionalmente, as médias de distância entre os clados de ponta e os clados de interior num determinado clado aninhado também foram calculados. O teste para saber se os valores foram significativamente maiores ou menores do que seria esperado pelo acaso foi feito através de 10000 permutações. A interpretação dos resultados foi feita a partir de uma chave criada por Templeton et al.(1995).

As inferências sobre a história demográfica foram acessadas usando a análise de *Mismatch Distribution* (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending 1992). Três parâmetros foram estimados usando modelos de Rogers & Harpending's (1992) $\theta_0 = 2N_0u$, $\theta_1 = 2N_1u$, e $\tau = 2ut$, onde se assume que uma população inicial de tamanho efetivo N_0 cresça rapidamente para um tamanho N_1 num intervalo de tempo de t gerações antes do presente, e u é a probabilidade por geração de que uma mutação atinja um nucleotídeo na região de estudo. Estes parâmetros foram estimados usando a aproximação de mínimos quadrados generalizada não linear desenvolvida por Schneider & Excoffier (1999). Também, o grau de aproximação entre o *mismatch distribution* observado e aquele esperado para população em crescimento foi testado usando estatística de *raggedness* de Harpending (1994). O equilíbrio de seleção de mutação foi testado usando os parâmetros D de Tajima e F de Fu. No teste de Tajima (1989) o parâmetro h é independentemente estimado duas vezes, uma do número de sítios polimórficos e uma da média de diferenças das amostras. As diferenças entre as duas

estimativas são então atribuídas a seleção ou a história demográfica da população estudada.

Similarmente, a estatística F_s de F_u (1997) compara o número observado de alelos em uma amostra com o número observado de alelos esperados em uma população que se mantém em tamanho constante. As significâncias de D e F_s são testadas por randomização. D e F_s são calculados para cada re-amostragem simulada para obtenção de uma distribuição nula, sob a hipótese de estacionariedade demográfica. Uma expansão de população recente produziria valores negativos em ambas as estatísticas. Todas as análises foram executadas pelo programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier et al. 2005) com exceção da NCA, que foi realizada com o auxílio dos programas GeoDis (Posada, 2000) e TCS (Clement et al., 2000)

Resultados

Um total de 95 seqüências (\approx 750 bp) foi obtido, incluindo a região controladora do mtDNA de *C. guanhum*. Houve considerável variação genética em todas as localidades. Apenas quatro indivíduos compartilharam haplótipos: dois no Rio de Janeiro e dois em Santa Catarina (Tabela 1). Nenhum haplótipo foi compartilhado entre localidades. A diversidade de nucleotídeos foi em torno de 0,03 em todas as localidades, com uma média de diferenças de nucleotídeos variando de 21,3 em Sergipe a 24,9 no Rio Grande do Norte. Não houve diferenças estatísticas significativas no padrão de variabilidade genética entre as localidades estudadas de acordo com o NCA (Fig.2, Tabela 2). Resultado similar foi obtido usando estatística F , onde nenhum valor de F_{st} foi significativamente diferente de zero (Tabela 3), e com AMOVA (Tabela 4).

A análise de *mismatch distribution* foi consistente com um padrão unimodal, tanto com as amostras agrupadas quanto com as amostras analisadas separadamente como mostram os índices de *raggedness* (Fig. 3, Tabela 1). Tal padrão é característico de populações que sofreram expansão em número de indivíduos. Esta conclusão é

suportada pelos valores negativos das estimativas D de Tajima e F_s de Fu, embora, apenas a última tenha atingido valores significativos (exceto pela população do Rio Grande do Norte, provavelmente um artefato devido ao tamanho amostral baixo).

Um padrão interessante torna-se evidente quando os valores de τ são comparados latitudinalmente. Sendo τ diretamente proporcional a probabilidade de mutação no fragmento de DNA estudado, multiplicado pelo tempo de expansão em termos de número de geração, as populações mais jovens estão localizadas no Nordeste (Sergipe), e não nos pontos extremos (Fig. 4).

Discussão

Populações de guaiamum são caracterizadas pelo alto grau de variabilidade genética, a qual está homogeneamente distribuída através de toda a região estudada ao longo da costa brasileira. A grande diversidade genética provavelmente é resultado da combinação de altas taxas de mutação no fragmento estudado e grande tamanho efetivo da população (Avice et al. 1984), como observado também em outras espécies de crustáceos (e.g. McMillen-Jackson & Bert, 2004; Diniz et al, 2005; Cassone & Boulding, 2006). Adicionalmente, o padrão unimodal de *mismatch distribution* e a estimativa de Fu's F_s inferem expansão das populações de *C. guanhumi* num período evolutivo recente. O padrão observado nesta espécie é particularmente comparável ao de *U. cordatus* (Brachyura: Ocypodidae) (ver Oliveira-Neto et al., 2007). Estas espécies têm ocorrências geográficas similares, que vão desde o sul dos EUA até o sul do Brasil e várias características biológicas similares, como hábito semiterrestre próximo a águas estuarinas, das quais dependem para desova e desenvolvimento das larvas (Oliveira, 1946; Melo, 1996; Hill 2001). *U. cordatus* foi estudada através do mesmo marcador molecular (Oliveira-Neto et al., 2007). Não há obstáculos para fluxo gênico de ambas as espécies nas respectivas regiões de estudo (que também são bastante similares). A capacidade de dispersão das larvas parece ser aumentada pelas correntes costeiras, a

tal ponto que as populações de diferentes estuários têm composição genética homogeneizada. É importante notar que o que ocorre, provavelmente, não é a migração de larvas por distâncias muito longas em uma única geração, mas sim, a migração sucessiva das larvas entre estuários adjacentes, o que já seria suficiente para que houvesse a homogeneização das populações.

O extensivo fluxo gênico entre populações de *C. guanhumi* ao longo de sua distribuição amostrada tem importantes conseqüências para sua conservação. Primeiro, as populações ao longo da costa não parecem organizadas em unidades evolutivas (Evolutionary Significant Units - Moritz, 1994), facilitando grandemente os esforços de manejo. Populações muito ameaçadas poderiam ser repostas através de adultos ou larvas de outras populações, sem comprometimento de uma individualidade genética dessas populações. Entretanto, fluxo gênico intenso em tempo evolutivo não significa populações fortemente ligadas em termos demográficos. A aplicação de métodos bayesianos recentes pode ser particularmente útil para elucidar este tópico (Wilson & Rannala, 2003).

A despeito das similaridades acima mencionadas, *C. guanhumi* e *U. cordatus* mostram diferenças intrigantes nas inferidas dinâmicas de população. Ambas as espécies mostram claramente o mesmo padrão de *mismatch distribution*, compatível com o de uma população recentemente expandida. A variação latitudinal nas estimativas de τ foi muito diferente da de *U. cordatus*, que mostram claro decréscimo de τ na direção das latitudes mais altas (Oliveira-Neto et al., 2007), enquanto o presente estudo indica valores baixos de τ na região do Sergipe. Este resultado deve ser interpretado com cautela, devido à alta freqüência de sobreposição entre os intervalos de confiança. Isso pode significar que a espécie esteve ausente na região do Sergipe, e recolonizou a região recentemente, em contraste com a colonização em sentido sul de *U. cordatus*. Existem diferenças ecológicas importantes entre *U. cordatus* e *C. guanhumi* que podem ter colaborado para tais diferenças. Sabe-se que *C. guanhumi* não é uma espécie fortemente ligada ao manguezal e sim às regiões mais secas e altas do estuário (e.g. Oliveira, 1946).

Conseqüentemente, as respostas de cada espécie às mudanças climáticas e, mais particularmente, às mudanças no manguezal são também diferentes.

Referências

- Amaral, A.C.Z. & Jablonski, S., 2005. Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. *Megadiversidade*, 1(1), 43-51.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel J.E., Reeb C.A. & Saunders, N.C., 1987 Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology And Systematics*, 18, 489–522.
- Avise, J.C., Neigel, J.E. & Arnold, J., 1984 Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, 20, 99–105.
- Bay, L.K., Crozier, R.H. & Caley, M.J., 2006. The relationship between population genetic structure and pelagic larval duration in coral reef fishes on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, 149, 1247–1256.
- Cassone, B.J. & Boulding, E.G., 2006. Genetic structure and phylogeography of the lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western Pacific coasts. *Marine Biology*, 149, 213–226.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1660.
- Excoffier, L., 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13(4), 853-864.
- 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.

- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A., 2002. 'Introduction to conservation genetics.(Cambridge University Press, Cambridge).
- Fratini, S. & Vannini, M., 2002. Genetic differentiation in the mud crab *Scylla serrata* (Decapoda: Portunidae) within the Indian Ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 272(1), 103-116.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915–925.
- Gifford C.A. (1962) Some observations on the general biology of the land crab, *Cardisoma guanhumi* (Latneilla), in South Florida. Biological Bulletin. Marine Biological Laboratory, Woods Hole 123, 207–223.
- Hill, K. 2001. "*Cardisoma guanhumi*" (On-line). Accessed December 28, 2008 at http://www.sms.si.edu/IRLSpec/Cardis_guanhu.htm.
- McMillen-Jackson, L. & Bert, T.M., 2004. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the blue crab *Callinectes sapidus* in the eastern United States. *Marine Biology*, 145(4), 769-777.
- Melo, G.A.S., 1996. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. São Paulo, Plêiade/ FAPESP. 604p.
- Mesquita, A. R. & Harari, J., (1977). Variações sazonais em águas costeiras: Brasil Lat 24 . Parte II. *Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo*, 26, 339 – 365.
- Ministério do Meio Ambiente (2004). Lista Nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação. Instrução Normativa N° 5 de 21 de Maio de 2004. http://www.ibama.gov.br/sisbio/legislacao.php?id_arq=28.
- Ministério do Meio Ambiente (2005). Boletim estatístico da pesca marítima e estuarina do nordeste do Brasil-2004. Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste – 2004 – Tamandaré, PE: CEPENE, 2004. http://www.ibama.gov.br/cepene/download.php?id_download=316

- Miranda, L.B., 1970. Flutuações da Corrente do Brasil e variações da distribuição horizontal da temperatura na região costeira entre Cabo de São Tomé e Ilha de São Sebastião em Janeiro e Fevereiro e Abril de 1970. *Caderno de Ciências da Terra*, 3, 13 - 14.
- Moritz, C., 1994. Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 9, 373–375.
- Oliveira, L.P.H., 1946. Estudos ecológicos dos crustáceos comestíveis Uçá e Guaiamú, *Cardisoma guanhumi* Latreille e *Ucides cordatus* (L). Gecarcinidae, Brachyura. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 44(2), 395-322.
- Oliveira-Neto, J.F., Boeger, W.A., Pie, M.R., Ostrensky, A. & Hungria, D.B., 2007. Genetic structure of populations of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) at local and regional scales. *Hydrobiologia*, 583, 69-76. DOI 10.1007/s10750.
- Oliveira-Neto, J.F., Pie, M.R., Boeger, W.A., Ostrensky, A. & Baggio, R.A., 2007. Population genetics and evolutionary demography of *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). *Marine Ecology*, 28, 1-10.
- Pfeiler, E. Hurtado, L.A. Knowles, L.L., Torre-Cosío, J., Bourillón-Moreno, L. Márquez-Farías, J.F. & Montemayor-López, G., 2005. Population genetics of the swimming crab *Callinectes bellicosus* (Brachyura: Portunidae) from the eastern Pacific Ocean. *Marine Biology*, 146(3), 1432-1793.
- Posada, D., Crandall K.A. & Templeton, A.R., 2000. GEODIS: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9, 487–488.
- Rogers, A.J. & Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology Evolution*, 9, 552-569.
- Roman, J., & Palumbi, S.R., 2004. A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. *Molecular Ecology*, 13(10), 2891-2898. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02255.x.

- Shaw, P.W., Pierce G.J. & Boyle P.R., 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 8(3), 407–417.
- Silva, A.C., Araújo, M. & Bourlès, B., 2005. Variação sazonal da estrutura de massas de água na plataforma continental do amazonas e área oceânica adjacente. *Revista Brasileira de Geofísica* 23(2), 145-157.
- Slatkin, M. & Hudson, R.R., 1999. Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Populations. *Genetics* 129, 555-562.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Templeton A.R., Routman, E. & Phillips C.A., 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140, 767–782.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- Weber, L.I. & Levy, J.A., 2000. Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. *Hydrobiologia*, 420(1), 203-210.
- Weisstein, E. W. "Bonferroni Correction." From MathWorld--A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/BonferroniCorrection.html>
- Wilson, G.A. & Rannala, B., 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, 163, 1177-1191.

Tabela 1. Valores descritivos e parâmetros estimados a partir das seqüências de d-loop de *C. guanhumi* da costa brasileira.

	All samples	RN	PE	SE	RJ	SC
Número de indivíduos	93	10	19	21	20	23
Número de haplótipos	91	10	19	21	19	22
Média no número de diferenças	24,5	24,9	23,7	21,2	24,4	23,9
Diversidade de nucleotídeos (SD)	0.03±0.016	0.035±0.02	0.03±0.015	0.03±0.017	0.034±0.02	0.03±0.02
De de Tajima	-1,41	-0,5	-0,9	-1,0	-0,9	-0,8
P _D	0,05	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2
F _s de Fu's	-23,97	-1,3	-5,6	-7,3	-6,1	-7,8
P _F	0,001	0,138	0,016	0,003	0,008	0,004
θ ₀ (95% CI)	4,1 (0-4,5)	3,2 (0-12)	0 (0-4,9)	0 (0-3,8)	2,2 (0-6,3)	2,3 (0-6,7)
θ ₁ (95% CI)	514 (307-∞)	160 (69-∞)	247 (131-∞)	634 (204-∞)	718 (225-∞)	488 (207-∞)
τ (95% CI)	21 (16-24)	25 (17-33)	25 (18-28)	19 (14-22)	24 (19-29)	24 (19-29)
índice r Raggedness	0,001	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
P _r	0,86	0,90	0,38	0,42	0,84	0,64

Tabela 2. Análise de clados aninhados feito a partir da variação geográfica e genética do d-loop de *C. guanhumí*, esquematizados na figura 2.

Clado	Dc	Dn	Clado	Dc	Dn	Clado	Dc	Dn	Clado	Dc	Dn
2-3	0	2080									
2-4	0	1270									
2-5	0	1549									
2-6	0	1685									
2-7	0	2065									
2-8	1940	1477	3-3	2672	1427						
2-9	0	1235									
2-10	0	1940									
2-11	0	1293	3-4	1552	1226						
			I-T	120	201						
2-12	0	1104									
2-13	0	818									
2-14	0	1616	3-5	1169	1250				5-1	1393	1290
2-15	2200	736									
I-T	-2200	-747									
2-16	0	1080									
2-17	0	1367									
2-18	2540	1376									
2-19	0	1445									
2-20	0	1168	3-6	1353	1327						
2-21	0	1367									
2-22	1280	1150									
I-T	-716	151	I-T	-185	-77						
2-23	0	1448									
2-24	0	1447									
2-25	2400	1600									
I-T	2400	-153									
2-26	0	2215									
2-27	0	1535									
2-28	1693	1597	3-8	1798	1471						
I-T	-1693	278									
2-29	0	1600									
2-30	0	1600	3-9	1600	1206						
2-31	0	1600									
2-32	0	1600	3-10	1600	1206						
I-T	0	0									
2-33	0	991									
2-34	1693	1507									
2-35	0	1620									
2-36	0	991	3-11	1572	1386						
2-37	0	1067									
I-T	847	287	I-T	137	-63						
2-38	0	1500									
2-39	0	1730									
2-40	0	2770	3-12	2000	1383						
I-T	0	750									
			2-73	0	813						
2-41	0	1600									
2-42	0	800									
2-43	0	800	3-13	1280	1065						
I-T	0	-800									
2-44	0	2200									
2-45	0	2200	3-14	2200	1372						
I-T	0	0									
2-46	0	1940									
2-47	0	1940	3-15	1940	1189						
			3-16	0	937						

Continua

Continuação

Clado	Dc	Dn	Clado	Dc	Dn	Clado	Dc	Dn	Clado	Dc	Dn
2-48	0	600	3-17	600	1715	4-5	1500	1421	5-3	1472	1325
2-49	0	600									
I-T	0	0									
2-50	0	3000	3-18	3000	1625						
2-51	0	3000									
2-52	0	1304									
2-53	340	936	3-19	1297	1305						
2-54	0	1576									
2-55	0	936									
2-56	0	1576									
2-57	0	533	3-20	640	1272						
2-58	0	800									
			I-T	858	179						
2-59	0	1508	3-21	1493	1337						
2-60	0	1388									
2-61	0	1268									
2-62	0	1268									
2-63	0	1540									
I-T	240	-138									
2-64	800	1600									
2-65	2200	1575	3-22	1822	1451						
2-66	0	1850									
I-T	666	67									
2-67	0	1570	3-23	1693	1337						
2-68	0	1270									
2-69	0	2240									
I-T	0	635									
			I-T	51	-51				I-T	-8.6	2.6

Tabela 3. Estimativas de F_{st} entre as amostras estudadas de *Cardisoma guanhumii*. Nenhuma estimativa difere estatisticamente de 0 ($p > 0.05$ em todas as comparações). RN - Rio Grande do Norte, PE - Pernambuco, SE - Sergipe, RJ - Rio de Janeiro, SC - Santa Catarina.

	RN	PE	SE	RJ	SC
RN	0				
PE	-0.007	0			
SE	0.025	-0.006	0		
RJ	-0.004	-0.013	-0.011	0	
SC	0.016	0.002	-0.005	0.007	0

Tabela 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) sobre as populações de *C. guanhumi* amostradas na costa brasileira. As amostras foram separadas em grupos do Sul/Sudeste (Rio de Janeiro e Santa Catarina) e grupos do nordeste (Rio Grande do Norte, Pernambuco, e Sergipe).

Source of variation □ Fonte de Variação	G.L.	S.S.	Variação dos componentes	Porcentagem da variação
Entre grupos	1	10	-0,08	-0,55
Entre populações dentro dos grupos	3	42	0,002	0,01
Dentro das populações	82	1.149	1,401	100

Figura 1

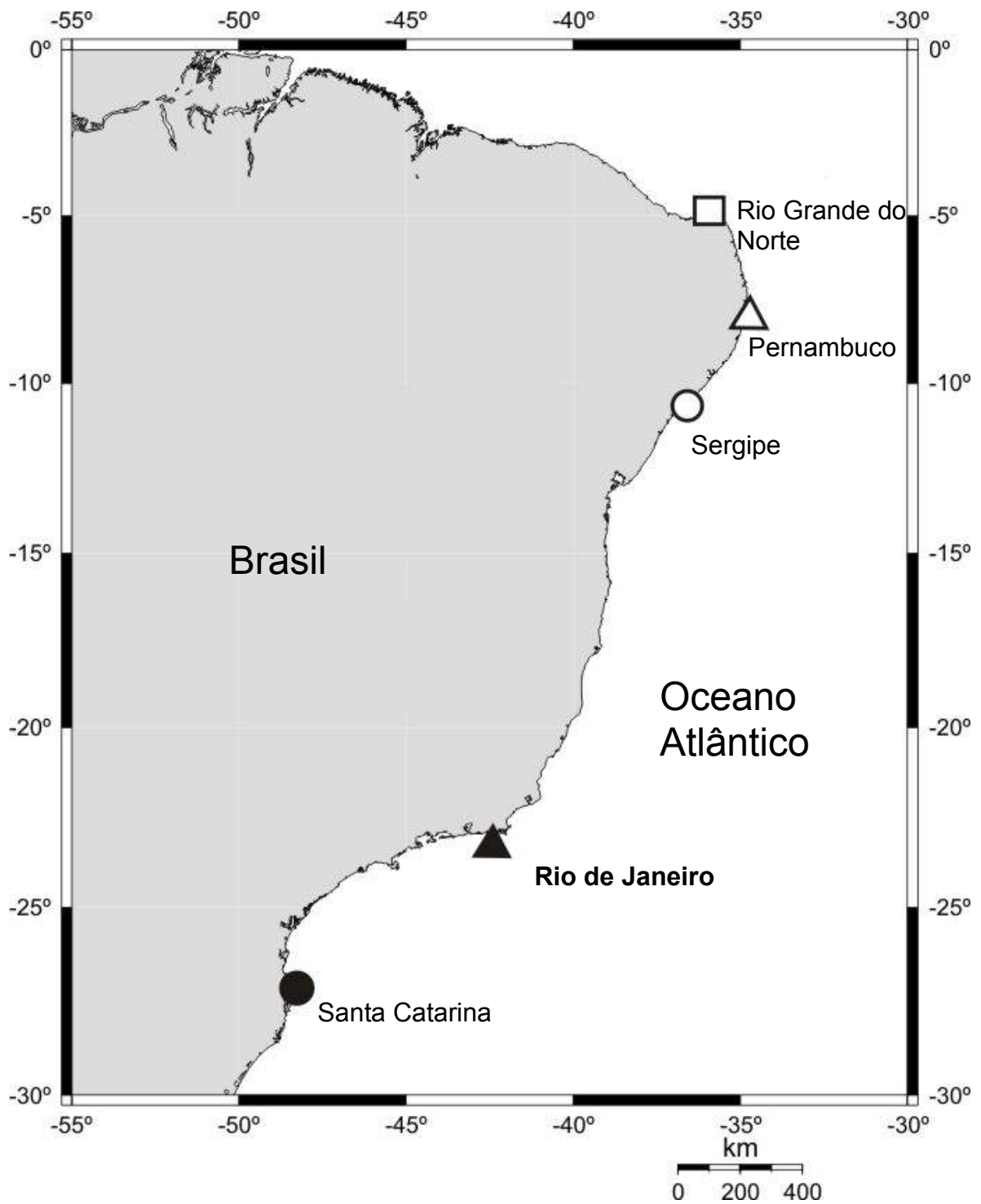


Fig. 1. Localidades incluídas no presente estudo para coleta de espécimes de *Cardisoma guanhumí* ao longo da costa brasileira. São elas, de cima para baixo: Rio Grande do Norte, Pernambuco, Sergipe, Rio de Janeiro e Santa Catarina

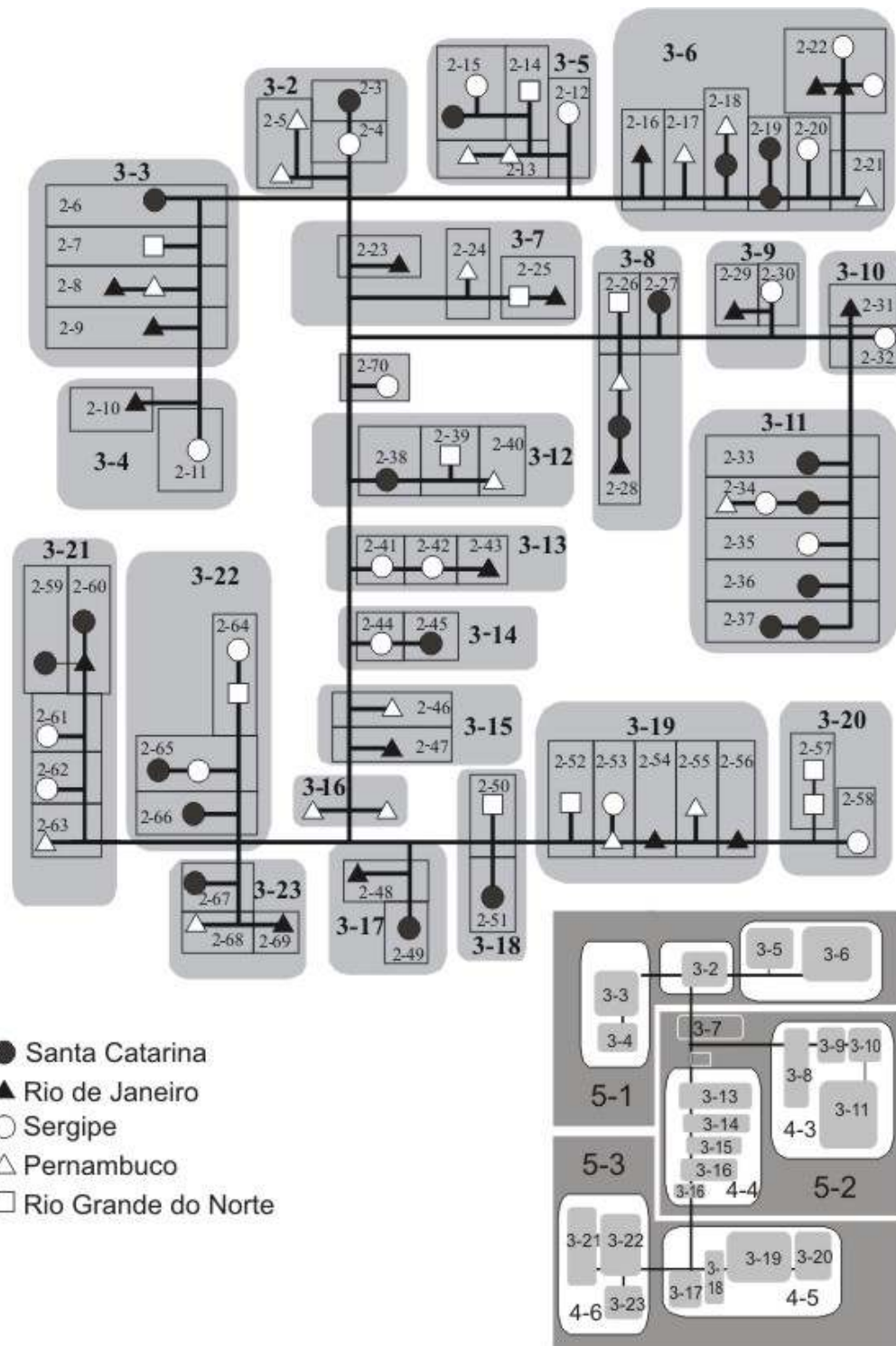


Fig. 2. Árvore de passos mínimos obtidas de 95 espécimes de *Cardisoma guanhumii* coletados na costa Brasileira. Os símbolos presentes no mapa são os mesmos usados para representar a origem dos haplótipos na figura 2. As árvores estão subdividas em linhagens de diferentes níveis para a aplicação da *Nested Clade Analysis*

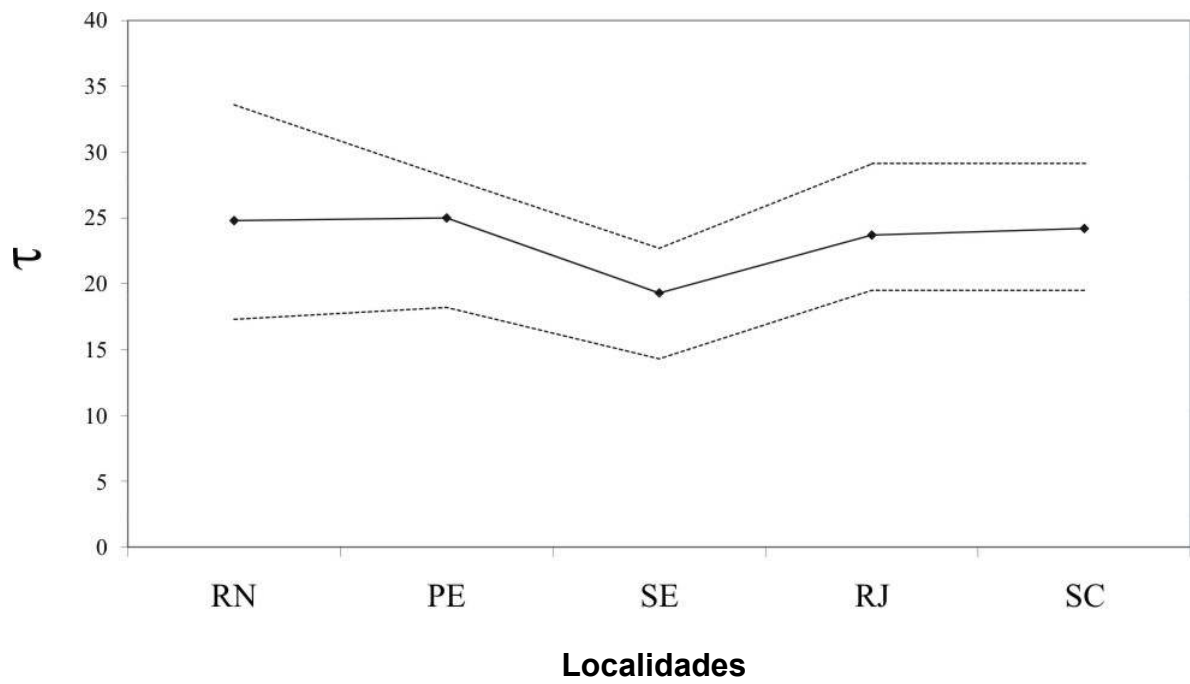


Fig. 3. Variação das estimativas de τ entre as localidades amostradas na costa brasileira

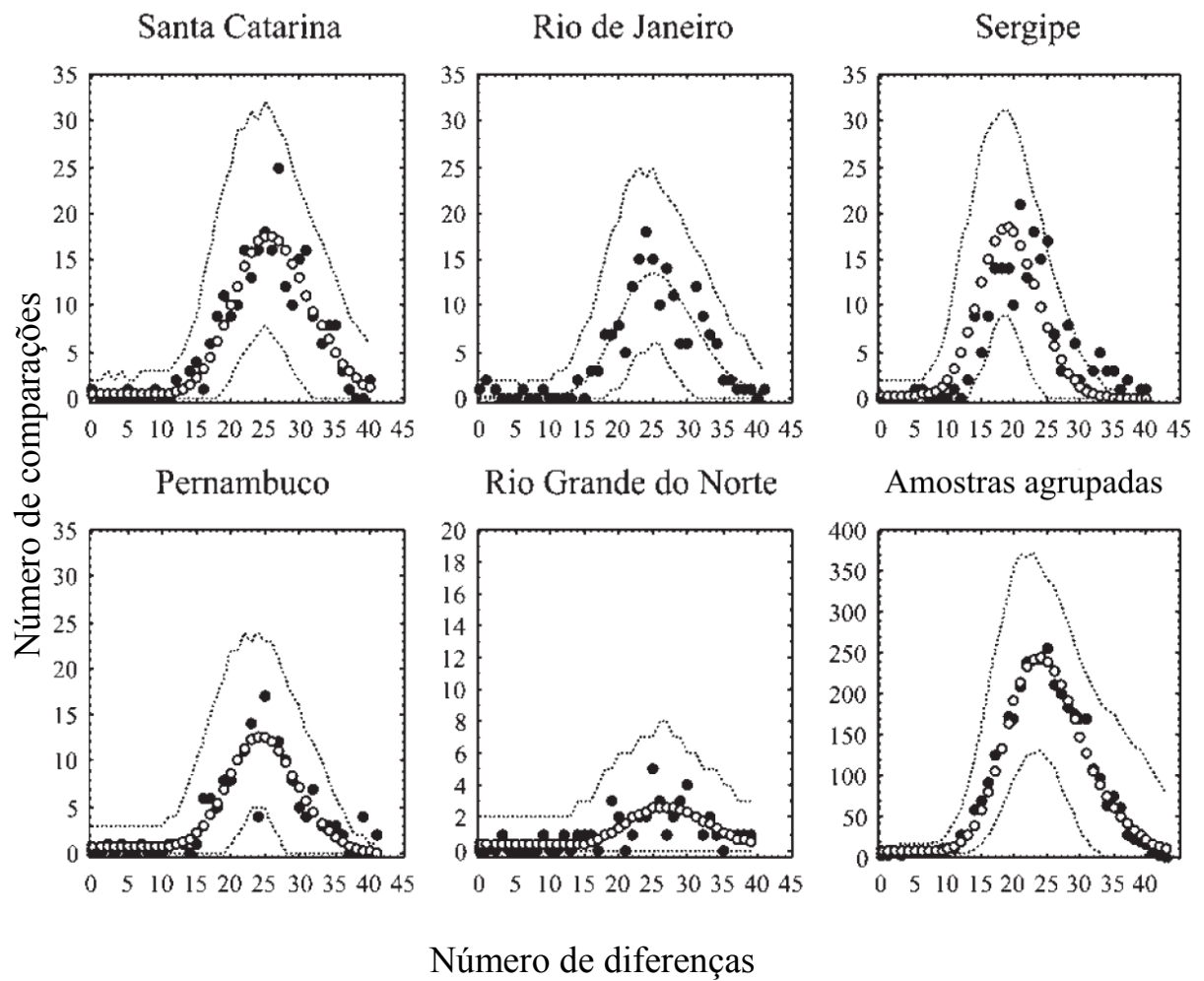


Fig. 4. Análise de *Mismatch Distribution* obtidas a partir do mtDNA de *Cardisoma guanhum* para cada localidade, assim como para todo o conjunto de dados unidos

Capítulo IV

Avaliação da diversidade genética e do fluxo gênico das populações de *U. cordatus* (Linneaus, 1763) na costa brasileira utilizando marcadores microssatélites

Abstract

The variation in seven microsatellite *loci* were studied to estimate the genetic structure and demographic parameters of mangrove land crab, *Ucides cordatus*, based on 280 individuals from nine locations throughout the Brazilian coast. One of these samples is located in Amapá, to test the role of Amazon River mouth as a natural barrier to this species. There was considerable variability in the studied fragment, with high values of expected heterozygosity (0,61) and no statistically significant evidence for geographical structure in the pattern of genetic variability based on *Rst* values when two *loci* highly deviated of Hardy-Weinberg equilibrium were removed, even though the geographical distances among the farthest collection sites exceeded 5000 km. However, *Fst* values were small ($>0,05$) but significantly different from zero in some comparisons. Amapá have not shown significant values of *Fst* or *Rst*, indicating that Amazon river mouth is not a dispersal barrier to this species. Interestingly, the estimates for effective population size and heterozygosity tend to be slightly higher in northern populations than in southern ones. No clearly pattern of migration were detected, indicating that this information was lost by the intense gene flow.

Introdução

Ucides cordatus é um caranguejo semi-terrestre típico dos manguezais do Atlântico Ocidental, possuindo grande importância econômica no Brasil. A espécie tem sido alvo de estudos sobre genética de populações, com a finalidade de embasar as estratégias de manejo, e torna-las mais eficientes. Nestes estudos (Oliveira-Neto *et al.*, 2006, 2007a), utilizando RAPD, PCR-RFLP e sequenciamento, não detectou-se estruturação na diversidade genética ao longo da extensa costa brasileira. Esse padrão é comum para outras espécies marinhas de Brachyura, incluindo *Pachygrapsus crassipes* (ver Cassone & Boulding 2006) e *Callinectes sapidus* (ver

McMillen-Jackson & Bert 2003), ambas estudadas na América do Norte, e *Cardisoma guanhumi* na costa do Brasil (Oliveira-Neto, 2008). No entanto, alguns estudos com espécies com capacidade de dispersão aparentemente até maiores do que as de *U. cordatus*, demonstram estruturação moderada na diversidade genética. Entre estas espécies estão *Callinectes danae*, no sul do Brasil (Weber & Levy) e *Carcinus maenas*, em toda Europa (Romam & Palumbi, 2004). A primeira espécie possui adultos aquáticos e a última é considerada uma espécie invasora em vários continentes, o que já é um indicativo da sua grande capacidade de dispersão. As razões para estas espécies apresentarem padrões tão distintos dos observados para *U. cordatus* e *C. guanhumi* pode ser uma interação diferenciada entre suas larvas e as correntes marinhas locais.

O uso de marcadores microssatélite para análise da diversidade genética de organismos marinhos é crescente. Através deles foi possível detectar estruturação fraca entre as populações de *Litopenaeus schmitti* do Sul/Sudeste em relação às do Norte/Nordeste do Brasil (Maggioni et al., 2003) e subdivisões em diversos níveis nas populações de *Loligo forbesi* no Atlântico Norte (Shaw et al, 2003). A análise comparativa de vários *loci* independentes, tanto entre os de microssatélites entre si quanto os destes com *loci* de outra natureza, como aloenzimas, evidenciam os efeitos da seleção sobre alguns *loci*. A seleção sobre *loci* específicos aumenta os valores de F_{st} e R_{st} , o que poderia ser erroneamente interpretado como quebra de fluxo gênico (Larsson et al., 2007; Innocentis et al., 2001)

Microssatélites são repetições sucessivas de 2 a 6 nucleotídeos e estão homoganeamente distribuídos pelo genoma nuclear (Murray, 1996). Através deles, é possível realizar análises filogeográficas baseadas no DNA nuclear e pesquisar sua evolução em diferentes cromossomos. Sua análise permite a identificação e aproveitamento dos dois possíveis alelos presentes em cada indivíduo (em genoma diplóide). Os alelos desse tipo de marcador variam muito em tamanho, de acordo com o número de repetições de nucleotídeos. Alguns tipos de marcadores microssatélite

possuem maior grau de variação genética do que aloenzimas ou marcadores mitocondriais (Shaw et al, 1999) e é uma técnica mais sensível para detecção de estruturação quando comparados com mtDNA (Shaw et al, 1999; Hauser et al 2002). Esta ferramenta é eficiente também na detecção de redução do tamanho efetivo das populações, embora os marcadores precisem cumprir certas exigências, como possuir somente alelos com repetições perfeitas (Garza & Willianson, 2001). A razão para isso é que alelos ímpares alteram a relação entre amplitude e a quantidade de alelos de uma maneira bastante aleatória, dificultando as comparações entre populações.

Os objetivos deste estudo são: testar a estruturação da diversidade genética de *U. cordatus* na costa brasileira utilizando marcadores do tipo microsatélite; testar a existência de padrões na dispersão desta espécie e sua relação com a direção de correntes marinhas prevalentes; testar se há diferenças no tamanho efetivo das populações e se estas diferenças estão associadas a padrões latitudinais.

Material e métodos

Foram feitas amostragens em 10 pontos da costa Brasileira (Figura 1). A maior parte dos pontos estão concentrados na região Nordeste do Brasil. São eles: Jequiá (38 indivíduos) e Coruripe (31), ambos no estado de Alagoas, São Francisco (58) e Japarutuba (38), ambos no estado de Sergipe, Acupe (20), Camamu (40) e Canavieiras (16), no estado da Bahia. Também há dois pontos na Região Norte, Amapá (18 indivíduos) e Pará (17) e um ponto na Região Sul, representado pela Baía de Paranaguá, no Paraná (18 indivíduos).

Um pereiópode de cada caranguejo foi removido e a musculatura foi conservada em tampão de EDTA-DMSO (Seutin et al. 1991). O DNA foi extraído através do kit Charge Switch da Invitrogen. Foram utilizados sete *loci* de microsatélites, cinco dos quais contendo repetições dinucleotídicas e dois contendo

repetições trinucleotídicas. Os *primers* receberam marcação fluorescente para leitura dos tamanhos dos fragmentos em seqüenciador ABI 3130 (Tabela 1).

As concentrações finais dos reagentes foram às seguintes: 1X de tampão de reação, 2mM de MgCl₂, 0,2 mM de DNTP, 0,6uM de cada um dos *primers*, 0,025U/ul de *taq* e 1,5 ng/uL de DNA. A amplificação dos fragmentos alvo foi obtida em termociclador, através do seguinte programa: desnaturação inicial a 94° C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 40s, anelamento a 55° C por 40s e extensão a 72° C por 30s. O processo foi finalizado com uma extensão final a 72° C por 40 min. Alguns *primers* possuem temperaturas de anelamento diferenciadas (Tabela 1)

Para cada ponto amostral, foram calculados o equilíbrio de Hardy-Weinberg aplicando 1.000.000 de passos na cadeia de Markov e 100.000 passos de desmemorização.

A existencia de excesso de homozigotos ou alelos nulos foi testado pelo programa Micro-Checker V.2.2.3 (Shibley, 2003). O conjunto de dados resultante foi analisado primeiramente levando-se em consideração todos os *loci* e, depois, removendo-se os *loci* mais distantes do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A grande divergência de opiniões com relação a qual método utilizar em análises de microsatélite foi o motivo pelo qual se optou pela utilização de vários índices comparativos. A partir da frequência de alelos para cada uma das amostras, foram obtidos valores de R_{st} (Slatkin, 1995) e F_{st} (Wright, 1969), com significâncias calculadas através de 20.000 permutações. Conforme Slatkin (1995), os valores de R_{st} são mais confiáveis que os valores de F_{st} para análises de microsatélite. Também foi feito o teste exato de não diferenciação através de 100.000 passos na cadeia de Markov e 10.000 passos de desmemorização. Complementarmente, foi realizada uma análise de AMOVA (Excoffier, 2004), separando as populações em amostras do Norte (Amapá), Nordeste (Jequiá, Coruripe, São Francisco, Japaratuba, Acupe, Camamu e Canavieiras) e Sul (Paraná). Todas estas análises foram processadas pelo programa

Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005). Os múltiplos testes estatísticos passaram pelo método de correção de Bonferroni.

Detecção de migração diferenciada entre estuários de diferentes regiões.

Para as estimativas dos padrões migratórios e do tamanho efetivo da população foi utilizado o programa Migrate 3-0 (Beerli, 2008). O programa faz uma estimativa do quanto a imigração é mais importante que as mutações para trazer novas variantes a população (M) e também estima o valor de θ , que é proporcional ao tamanho efetivo da população. O programa faz estes cálculos integrando todas as possibilidades de relacionamento entre amostras usando uma expansão da teoria coalescente a qual inclui migração. A integração de todas as genealogias é a soma de todas as possibilidades criadas para todos os comprimentos de ramos possíveis (Beerli, 2008).

Os processos migratórios foram estudados comparando regiões Norte, Nordeste e Sul do Brasil. Foi realizada uma análise com três *loci* (b124, a120 e a11) e cinco pontos (Amapá, Pará, Sergipe, Bahia e Paraná) e outra utilizando cinco *loci* (b124, a120, a11, c109 e a5) e quatro pontos (Amapá, Sergipe, Bahia e Paraná). As taxas de mutação relativas foram calculadas a partir do próprio conjunto de dados das amostras. A Máxima Verossimilhança foi usada como estratégia de análise. O número de passos gravados foi 5.000 e o valor de incremento foi igual a 20. Os números de árvores descartadas por cadeia (burn-in), de parâmetros amostrados e de cadeias concomitantes foram iguais a 10.000, 1.000.000 e 1, respectivamente.

Resultados

Foram genotipados 280 animais, totalizando cerca de 149 alelos (média de 21,3 alelos por locus) (Tabela 2). As taxas de mutação dos *loci* b124, a120, a11, c109

e a5 foram, respectivamente, 1,55, 0,73 , 1, 0,73 e 1. Os *loci* com maior diversidade alélica foram o B124 com 35 alelos e a5 com 28 alelos. O *locus* com menor diversidade foi o c109 (14 alelos). As médias de heterozigosidade esperada variaram entre 0,63 a 0,71. As maiores médias foram encontradas do Amapá até o Sergipe (0,68 a 0,71) e as menores nos pontos do estado da Bahia e Paraná (0,63 a 0,66). Entretanto, os valores de heterozigosidade não estão em perfeito decréscimo na direção Norte-Sul.

Dos 7 *loci* analisados, quatro não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3). Quando o teste foi aplicado nas amostras separadamente, verificou-se que dois dos *loci*, c109 e a5, estavam em desequilíbrio apenas em uma localidade cada, enquanto os outros dois, c105 e a115, estavam em desequilíbrio em quatro localidades cada (Tabela 3). Os *loci* c105 e a115 também estavam significativamente ligados ao *loci* a5. Essa ligação só foi detectada quando as 280 amostras foram agrupadas, não sendo detectadas nas amostras separadamente.

Não foi encontrado nenhum sinal de estruturação geográfica na diversidade genética em todos os pontos amostrados quando utilizados os valores de R_{st} e AMOVA (Tabelas 4 e 5). A AMOVA revelou que a maior porcentagem da variação foi devida à variação contida primeiramente dentro das populações (95%) e dentro dos próprios indivíduos (9,6%). Utilizando-se todos os *loci*, ou excluindo da análise os *loci* a115 e c105 (muito desviados do equilíbrio de Hardy-Weinberg), os valores de R_{st} foram extremamente baixos e nenhum significativamente diferente de 0, após a correção de Bonferroni.

Um maior número de comparações pareadas foram significativamente diferentes quando foram usados índices de F_{st} (Tabela 5). Das 36 comparações entre amostras, 12 permaneceram significativas após a correção de Bonferroni. O grau de diferenciação diminuiu muito quando a análise é repetida removendo-se os *loci* a115 e c105. Desta forma, somente 1 comparação permaneceu significativamente diferente de 0 (Jequiá X São Francisco, com $F_{st} = 0,022$).

A análise de verossimilhança utilizando-se três *loci* mostrou um valor alto de Theta (que deve ser interpretado aqui como um valor proporcional ao tamanho efetivo da população) para a amostra do Amapá (0,60) e valores de 0,22 a 0,25 para as amostras do Sergipe, Pará, Bahia e Antonina. Já a análise de máxima verossimilhança utilizando-se cinco *loci* mostrou valores decrescentes de Theta no sentido Norte-Sul apresentando os valores de 0,28 no Amapá, 0,24 no Sergipe, 0,17 na Bahia e 0,14 no Paraná. O número de migrantes seguiu padrões muito diferentes dependendo da análise utilizada. Com cinco *loci*, os valores para número de migrantes foram maiores no sentido dos pontos extremos (Regiões Norte e Sul) para os mais centrais (Sergipe e Bahia). O valor de *M* obtido para migração de Antonina para Bahia é maior que o inverso (18,2 contra 5,5), e o Amapá torna-se fornecedor de larvas para estuários mais ao sul como o Sergipe (7,1 contra 2,6). Com três *loci*, não parece haver um padrão na troca de migrantes e a situação se inverte. Amapá torna-se receptor de larvas (65,4 contra 3,7) e Antonina também (16,4 contra 0) (Tabela 6).

Discussão

A análise de microssatélites confirma a alta diversidade genética presente nas populações de *U. cordatus*, a qual é uma consequência da combinação entre tamanho da população e natureza dos marcadores, com numerosas repetições dinucleotídicas. A presença de alelos nulos também é o provável motivo para que alguns *loci* não estivessem em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Anexo IV). Alelos nulos são relativamente comuns em microssatélites e alguns dos motivos são mutações no sítio de um dos *primers*, alelos de um mesmo indivíduo com tamanhos muito diferentes ou qualidade diferenciada da amostra (Callen *et al.* 1993; Dakin & Avise, 2004).

Estruturação genética

A diversidade genética de *U. cordatus* encontra-se bem distribuída desde o Amapá até o Paraná. A análise confirma os resultados observados com RFLP, RAPD e seqüências de d-loop (Oliveira-Neto et al., 2006, 2007a), lembrando que, além da utilização de uma técnica diferenciada, as distâncias geográficas e o tamanho amostral são consideravelmente maiores no presente trabalho. Não houve relação entre distância geográfica e os valores de R_{st} como observado com outros trabalhos com *Brachyura* (Cassone & Boulding, 2006, McMillen-Jackson & Bert 2003). Em algumas localidades, no entanto, houve fortes indícios de que alguns *loci* estivessem sob seleção ou que o grau de estruturação foi superestimado pela presença de alelos nulos. Estes *loci* possuem freqüências alélicas muito diferentes das esperadas, estão em acentuado desequilíbrio de Hardy-Weinberg, e em geral empurram os valores de R_{st} e F_{st} para cima. Com a grande diversidade de ambientes oferecidos pelos estuários, é esperado que alguns alelos encontrem-se sob algum tipo de seleção devido a proximidade espacial com outros *loci*.

Um dos questionamentos deste trabalho seria se as populações do Amapá conteriam diferenças significativas em relação às demais amostras, demonstrando que a foz do Rio Amazonas seria de fato uma barreira geográfica para a dispersão desta espécie, como ocorre com algumas espécies de animais, que incluem seis espécies de corais, peixes de recife de águas rasas, alguns gastrópodes e até uma espécie de pelicano (Haemig, 2008). No entanto, a amostra do Amapá não demonstrou diferenciação alguma, nem mesmo quando comparadas à amostra do Paraná, que está a quase 5.000 km de distância. Recentemente, sugeriu-se que o papel de barreira geográfica atribuído à foz do Rio Amazonas tem sido superestimado, pelo menos para algumas espécies de peixes de recifes de coral, embora ainda assim seja bastante atuante (Rocha, 2003).

Muitos trabalhos com organismos marinhos, especialmente peixes, demonstram que os níveis de estruturação, embora sempre pequenos, são maiores utilizando-se marcadores microssatélite do que mtDNA, por exemplo (Bentzen *et al.* 1996; Ruzzante *et al.* 1997; O'Connell *et al.* 1998). No presente trabalho, observou-se que, mesmo excluindo-se os *loci* em maior grau de desequilíbrio, uma grande parte das comparações entre amostras mostraram grau ainda menor de estruturação enquanto outras mostraram baixo porém significativo grau de estruturação. Outra explicação para que populações geograficamente próximas pareçam no limite de apresentarem-se geneticamente estruturadas enquanto populações distantes pareçam idênticas, seria que o intenso fluxo gênico ocorreu num passado recente, mas não no presente. Populações muito grandes, como é o caso das de *U. cordatus*, são menos afetadas pela deriva genética do que populações pequenas, como por exemplo, de baleias beluga (Brent & White, 1995). Entretanto, vários trabalhos atestam que as larvas pelágicas de *U. cordatus* passam parte de suas vidas em mar aberto (Simith & Diele, 2008; Silva-Falcão *et al.*, 2007), onde poderiam dispersar para outros estuários. O grande fluxo gênico seria assim promovido, garantindo que qualquer nova linhagem que surja em uma população rapidamente se espalhe para as demais em outros pontos da costa. Mas este fenômeno não foi estudado em todos os estuários e talvez fatores fisiográficos atuem em cada um deles no sentido de aumentar ou inibir a troca de larvas entre o estuário e o mar aberto.

A dispersão de *U. cordatus* não mostrou uma direção predominante no sentido Norte ou Sul. As correntes marinhas oceânicas principais/prevalentes provavelmente possuem uma importância menor na dispersão de *U. cordatus*, ao contrário das correntes costeiras, que possuem maior variação temporal e espacial em suas direções (Silva *et al.*, 2005; Miranda, 1970; Mesquita & Hatari, 1969).

Isso deve ter colaborado para dificultar a visualização de um padrão. É importante ressaltar que os movimentos migratórios tratados aqui não se referem necessariamente a ordem de colonização dos diferentes habitats da diferentes

localidades. Uma localidade pode ter sido colonizada mais recentemente e ainda assim, ser fornecedora de larvas no presente. Embora exista indícios de que as populações localizadas mais ao sul são mais recentes (ver Capítulo 2), elas ainda assim podem fornecer mais larvas do que receber. Mas neste sentido, os dados ainda são inconclusivos.

Referências

- Bay LK, Crozier RH, Caley MJ, 2006. The relationship between population genetic structure and pelagic larval duration in coral reef fishes on the Great Barrier Reef. *Marine Biology* 149: 1247–1256.
- Beerli P, 2008. Migrate documentation. Version 3.0. <http://popgen.scs.fsu.edu/migratedoc.pdf>
- Brent WM, White BN, 1995. Sequence Variation at the Major Histocompatibility Complex Locus DQB in Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*). *Molecular Biology and Evolution* 12:582-593.
- Boeger WA, Pie MR, Ostrensky A, Patella AL, 2005. Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 161–167.
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y *et al.*, 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, 52, 922-927.
- Cassone BJ, Boulding EG, 2006. Genetic structure and phylogeography of lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western pacific coast. *Marine Biology*, 149, 213–226.
- Dakin EE, Avise JC, 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504–509. doi:10.1038/sj.hdy.6800545
- Garza JC, Williamson EG, 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10 (2), 305-318

- Haemig PD, 2008. A Barreira Amazônica. *Ecologia.Info* 29
<http://www.ecologia.info/barreira.htm>
- 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.
- Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, Ramirez JHB, Carvalho GR, 2003. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Evolution* 99 (18), 11742-11747.
- Larsson LC, Laikre L, Palm S, André C, Carvalho GR, Ryman N, 2007. Concordance of allozyme and microsatellite differentiation in a marine fish, but evidence of selection at a microsatellite locus. *Molecular Ecology* 16(6):1135-47.
- Maggioni R, Rogers AD, Maclean N, 2003. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology* 12(12): 3213-3217.
- McMillen-Jackson AL, Bert TM (2003). Disparate patterns of population genetic structure and population history in two sympatric penaeid shrimp species (*Farfantepenaeus aztecus* and *Litopenaeus setiferus*) in the eastern United States. *Molecular Ecology*, 12, 2895–2905.
- Mesquita, AR, Harari J, 1977. Variações sazonais em águas costeiras: Brasil Lat 24 . Parte II. *Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo*, 26, 339 – 365.
- Miranda LB, 1970. Flutuações da Corrente do Brasil e variações da distribuição horizontal da temperatura na região costeira entre Cabo de São Tomé e Ilha de São Sebastião em Janeiro e Fevereiro e Abril de 1970. *Caderno de Ciências da Terra*, 3, 13 - 14.
- Murray BW (1996) The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. <http://helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html>

- Oliveira-Neto JF, Boeger, WA, Pie MR, Ostrensky A, Hungria DB, 2007. Genetic structure of populations of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) at local and regional scales. *Hydrobiologia*, 583, 69-76. DOI 10.1007/s10750.
- Oliveira-Neto JF, Pie MR, Boeger WA, Ostrensky A, Baggio RA, 2007. Population genetics and evolutionary demography of *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). *Marine Ecology*, 28, 1-10.
- Oliveira-Neto JF, Pie MR, Chammas MA, Ostrensky A, Boeger WA, 2008. Phylogeography of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) along the Brazilian coast. *Journal of the Marine Biological Association of United Kingdom*, 88 (7), 1417-1423.
- O'Reilly PT, Canino MF, Bailey M, Bentzen P, 2004. Inverse relationship between F_{st} and microsatellite polymorphism in the marine fish, walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*): implications for resolving weak population structure. *Molecular Ecology*.
- Rocha LA, 2003. Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. *Journal of Biogeography* 30: 1161-1171.
- 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.
- Seutin G., White BN, Boag PT, 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 82–90.
- Shaw PW, Pierce GJ, Boyle PR, 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microstellite DNA markers. *Molecular Ecology* 8, 407-417.
- Silva AC, Araújo M, Bourlès B, 2005. Variação sazonal da estrutura de massas de água na plataforma continental do Amazonas e área oceânica adjacente. *Revista Brasileira de Geofísica* 23(2), 145-157.

Smith JC, Diele K, 2008 O efeito da salinidade no desenvolvimento larval do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Ocypodidae) no Norte do Brasil. *Acta Amazônica*, v38(2): 345 – 350.

Shiple P, 2003. Micro-Checker. University of Hull Research Support Grant.

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

Weber LI, Levy JA, 2000. Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. *Hydrobiologia*, 420(1), 203-210.

Tabela 1 – *Primers* testados para amplificação de microssatélites de caranguejos, com as respectivas seqüências de oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento. Os *primers forward* são mostrados acima dos *reverse*s e receberam marcação nas extremidades 5'.

Nome (Marcação)	Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores (5' para 3')	Temperatura de anelamento (° C)
A120 (HEX)	F-AAC-TCC-CGC-TAC-CTC-TCA-CTC- R-TGG-TCT-TTG-CAC-ACA-TGA-TTC	55
B124 (FAM)	F-TTT-CCT-CGA-ATG-TAT-AAA-CAG-G R-TCC-ACA-AAG-CGA-CTC-TCT-AG	55
A11 (FAM)	F-TGG-TGA-ATG-AGT-CAA-ACT-GAG R-TGC-TTC-CTT-GCA-TAC-ATA-CTG	52
A115 (NED)	F-AGA-ACA-CGG-CAC-GAA-TCT-AC R-AGA-ACA-CGG-CAC-GAA-TCT-AC	52
C105 (FAM)	F-TCC-CCA-AAT-AGC-CAA-CAG R-CCA-AGA-GGG-TAA-CAG-AAT-GG	59
C109 (HEX)	F-GCC-ATC-ATC-ACC-ATC-ACC R-TCC-CCT-TCT-TCC-TAT-TGT-CC	62
A5 (FAM)	F-TTG-CTC-GTT-CGT-ATC-CAG-TAG R-ACG-CCT-TAG-AAA-AGA-AGA-AAC-C	59

Tabela 2 –Valores de diversidade para cada um dos 7 *loci* de microsatélite em cada uma das populações de *U. cordatus* amostradas ao longo da costa brasileira.

Heterozigosidade esperada												
Locus#	AP	JE	CO	SF	JA	AC	CM	CN	PR	Média	D.P.	H _e total
B124	0,80	0,87	0,85	0,80	0,82	0,78	0,70	0,87	0,82	0,82	0,05	0,82
A120	0,72	0,48	0,49	0,59	0,61	0,46	0,53	0,63	0,53	0,57	0,07	0,56
A11	0,52	0,48	0,62	0,71	0,73	0,51	0,63	0,67	0,65	0,63	0,08	0,63
A115	0,81	0,80	0,71	0,75	0,70	0,79	0,75	0,59	0,66	0,73	0,06	0,74
C105	0,66	0,76	0,73	0,67	0,76	0,42	0,57	0,46	0,65	0,65	0,11	0,71
C109	0,54	0,51	0,48	0,55	0,50	0,54	0,47	0,49	0,42	0,50	0,04	0,50
A5	0,85	0,89	0,90	0,88	0,86	0,90	0,84	0,90	0,89	0,88	0,02	0,88
Média	0,70	0,68	0,68	0,71	0,71	0,63	0,64	0,66	0,66	0,68	0,03	0,69
s.d.	0,12	0,17	0,15	0,11	0,11	0,18	0,12	0,16	0,15	0,14	0,02	0,13
Amplitude de alelos												
B124	19	39	47	41	30	39	76	44	26	39,9	13,8	79
A120	8	13	9	22	24	10	10	12	13	14,1	6,2	30
A11	14	13	22	16	14	14	12	20	14	15,2	2,9	22
A115	12	17	17	14	16	12	24	10	12	15,6	4,1	27
C105	14	20	13	13	16	10	11	15	13	13,9	2,5	21
C109	28	3	3	41	3	44	3	3	3	15,4	15,3	61
A5	16	27	31	26	18	29	23	19	23	23,4	5,8	33
Média	15,8	18,8	20,2	24,7	17,2	22,5	22,7	17,5	14,8	19,6	3,0	39,0
s.d.	5,8	10,6	13,7	11,1	7,7	13,4	22,8	12,0	7,0	11,1	4,4	20,5

Tabela 3 - Indicação dos *loci* que não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (D) nas localidades analisadas separadamente e em conjunto. O grau de significância considerado é 0,05.

	AP	JE	CO	SF	JA	CM	CN	AC	PR	Tudo
B124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A120	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-
A11	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-
A115	-	D	D	-	-	D	-	D	-	D
C105	-	-	D	D	-	D	-	D	-	D
C109	-	-	-	D	-	-	-	-	-	D
A5	D	-	-	-	-	-	-	-	-	D

Tabela 4 – Valores de AMOVA provenientes das comparações entre as nove populações divididas em três grupos

	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem da variação
Entre grupos	2	-640	-7,22Va	-4,9
Entre populações	8	1737	0,86Vb	0,59
Entre indivíduos	300	49843	13,61Vc	9,32
Nos indivíduos	311	43199	138,Vd	95
Total	621	94199	146,16	

Tabela 5 - Valores de Rst e Fst provenientes de todas as comparações pareadas entre pontos amostrados.

		AP	JE	CO	SF	JA	AC	CM	CN	PR
Rst 7loci	AP	-								
	JE	-0,04	-							
	CO	-0,07	-0,01	-						
	SF	-0,03	0,02	0,01	-					
	JA	-0,03	0,03	0,01	0,00	-				
	AC	0,02	0,03	0,04	-0,01	0,04	-			
	CM	-0,06	0,00	-0,01	0,01	0,01	0,04	-		
	CN	-0,10	-0,01	-0,01	-0,03	-0,01	-0,04	-0,01	-	
	PR	0,00	-0,06	-0,08	-0,05	-0,04	-0,06	-0,06	-0,10	-
Fst 7loci	AP									
	JE	0,01								
	CO	0,00	0,00							
	SF	0,02	0,02*	0,01						
	JÁ	0,00	0,01	0,00	0,01					
	AC	0,06*	0,03*	0,03*	0,03*	0,04*				
	CAM	0,05*	0,03*	0,03*	0,02*	0,03*	0,01			
	CAN	0,05*	0,03	0,02	0,01	0,02	0,00	0,01		
	PR	0,02	0,00	-0,02	-0,01	-0,01	0,01	0,01	0,01	
Rst 5loci	AP									
	JE	-0,04								
	CO	-0,07	-0,01							
	SF	-0,03	0,02	0,01						
	JÁ	-0,03	0,03	0,01	0,00					
	AC	0,02	0,03	0,04	-0,01	0,04				
	CAM	-0,06	0,00	-0,01	0,01	0,01	0,04			
	CAN	-0,10	-0,01	-0,01	-0,03	-0,01	-0,04	-0,01		
	PR	0,00	-0,06	-0,08	-0,05	-0,04	-0,06	-0,06	-0,10	
Fst 5loci	AP									
	JE	0,01								
	CO	0,01	0,00							
	SF	0,02	0,02*	0,00						
	JÁ	0,01	0,01	0,00	0,00					
	AC	0,04	0,01	0,00	0,01	0,01				
	CAM	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01			
	CAN	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	0,01		
	PR	0,02	-0,01	-0,02	-0,01	-0,02	-0,01	-0,01	-0,01	

*Valores de Rst significativamente diferentes de 0 após a correção de Bonferroni.

Negrito mostra valores significativos ao nível de 5% antes da correção de Bonferroni.

Tabela 6 - Valores de Theta e número de migrantes provenientes da análise de coalescência sobre 5 e 3 *loci* e Máxima Verossimilhança como estratégia de análise. As populações dispostas na coluna são fornecedoras enquanto as dispostas em linha são receptoras.

Populações	Theta	Amapá	Pará	Sergipe	Bahia	Antonina
Amapá	0,28	-	-	17,1	14,7	0,8
Pará	-	-	-	-	-	-
Sergipe	0,24	2,6	-	-	1,2	0
Bahia	0,16	0	-	13,2	-	5,5
Antonina	0,14	5,9	-	7,9	18,2	-
Amapá	0,70	-	3,7	-	-	-
Pará	0,22	65,4	-	2,0	-	-
Sergipe	0,23	-	10,4	-	5,2	-
Bahia	0,25	-	-	6,5	-	16,4
Antonina	0,22	-	-	-	0	-

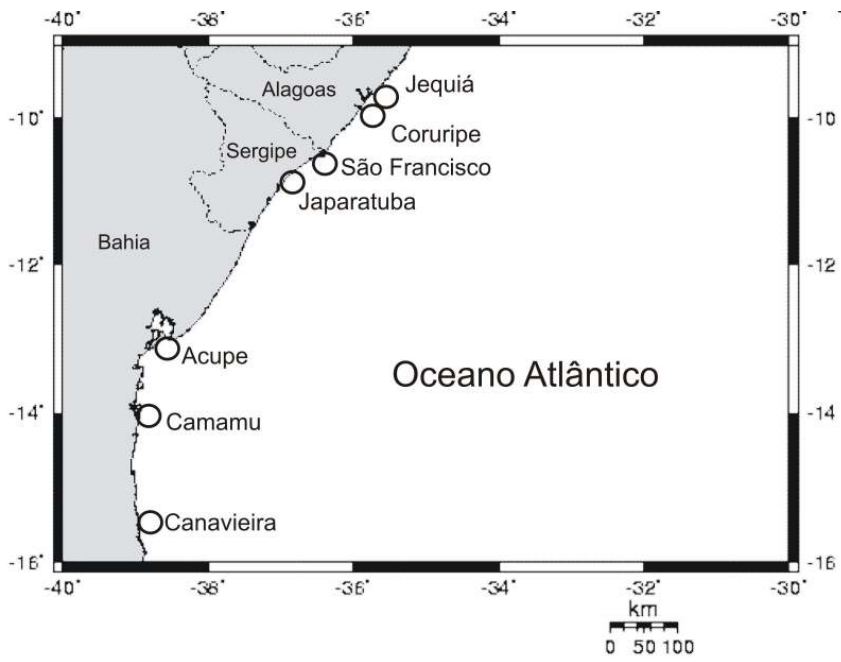
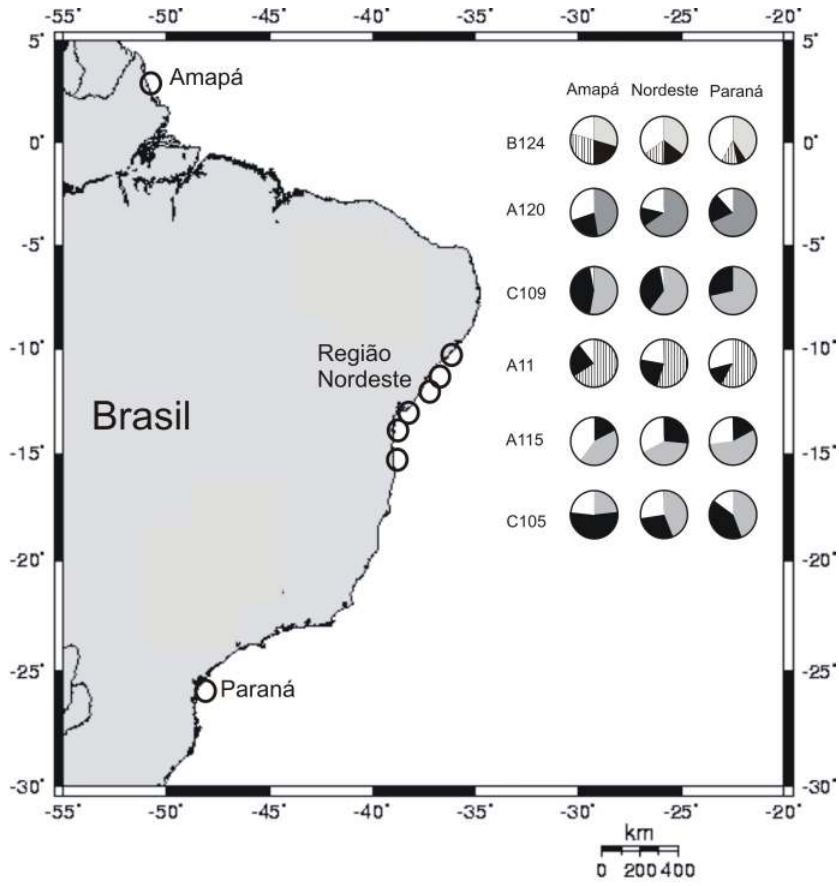


Figura 1 – Localização dos pontos de coleta com respectivas frequências dos alelos principais em cada região (foto acima) e aproximação dos pontos da região Nordeste (abaixo)

Discussão geral

Ucides cordatus e *C. guanhumí* são duas espécies com alta diversidade genética, a qual se encontra bem distribuída entre todos os pontos amostrados. Isso significa que o fluxo gênico é intenso e, muito provavelmente, é promovido pelas larvas pelágicas, que são exportadas para mar aberto.

A conclusão de que a diversidade genética é alta para *U. cordatus* e *C. guanhumí* é de certa forma intuitiva, porque não é possível fazer comparações precisas com outros trabalhos. A diversidade varia de acordo com o modo como os alinhamentos foram cortados, e com o tipo de marcador. Mesmo utilizando o mesmo marcador, d-loop, as regiões de corte variam, alterando as proporções entre regiões mais e menos conservadas do fragmento (ver Pie et al, 2008). Já para microssatélites, a diversidade irá variar de acordo com o número de repetições e também o tamanho das unidades repetidas (di, tri ou tetranucleotídicas).

As principais mudanças ocorridas na população que podem ser percebidas no mtDNA devem estar relacionadas às mudanças ocorridas no Pleistoceno. O alto fluxo gênico e as altas taxas de mutação do marcador tendem a apagar sinais muito antigos no DNA. A extensão das inferências à partir deste marcador seriam grandemente aumentadas à partir da determinação de sua taxa de mutação. A taxa de mutação do fragmento d-loop para espécies de *Ucides* poderia ser determinada através do estudo da divergência entre *U. cordatus* e *U. occidentalis*, uma subespécie que ocorre no oceano Pacífico, que está separada de *U. cordatus* desde a formação do Istmo do Panamá, há no máximo 3 milhões de anos atrás (Lloyd & Keigwin, 1978).

Embora exista bastante informação sobre a ocorrência de florestas de manguezal em diferentes períodos, as informações sobre a variação latitudinal das florestas de manguezais no Brasil são escassas. Estudos com dados palinológicos do Quaternário têm mostrado que a distribuição de florestas de manguezais resulta de um processo muito dinâmico, especialmente em resposta às flutuações no nível do mar (Woodroffe &

Grindrod 1991; Ellison 1996). Em particular, a expansão dos manguezais tem sido relacionada a períodos de transgressão, e não pode ser simplesmente associada ao clima úmido e seco (Grinrod et al. 1999). Esta hipótese de expansão de ambientes de manguezal na costa brasileira pode ser indicativo de formação de estuários mais bem desenvolvidos, como sugerido por Grinrod et al (1999) para os trópicos australianos. A evolução dos manguezais na região sul do Brasil parece ter maior relação com a expansão da população de *U. cordatus*, mas *C. guanhumí* também apresentou padrão de expansão. Existem aspectos sobre a biologia de *C. guanhumí* que não estão claras e uma delas é sua dependência das florestas de manguezal. O fato de ambas as espécies possuírem limites latitudinais semelhantes e terem sofrido expansão recente em número indivíduos é um indicativo de que ambas podem estar sendo influenciadas pelo mesmo fator, seja pela presença de manguezal, seja pela temperatura.

A dispersão antropogênica foi cogitada por Schweitzer et al. (2008) como um modo de explicar a vasta distribuição de *C. guanhumí*, uma hipótese originada através de informações sobre o registro fóssil. Provavelmente o transporte desses animais (e a fuga dos mesmos, pois eles eram usados como alimento) deveria ser, necessariamente, muito frequente para provocar homogeneização dessas populações em toda costa brasileira. Uma explicação com base na estratégia reprodutiva, no que se baseia esta tese, é mais satisfatória.

Predominantemente, espécies com larvas pelágicas com mais de 17 dias de período larval experimentam médias de distância de dispersão superiores a 33km (Shanks & Grantham, 2003). Segundo estes autores, dispersar menos que 20 km pode ser uma estratégia instável, devido às altas variações nas correntes imediatamente após a linha da costa. Eles sugerem que, para animais com alta capacidade de dispersão, não é muito eficiente conservar uma única grande reserva e sim, preservar várias reservas pequenas (2km de diâmetro!) ao longo de toda a distribuição da espécie, a uma distância mínima de 20Km. Obviamente, há interesses econômicos na conservação de grandes áreas para

extrativismo e as reservas devem preservar um número grande de espécies diferentes em relação a estratégia reprodutiva.

Referências

- Grinrod J., Moss P., van der Kaars S. (1999) Late Quaternary cycles of mangrove development and decline on the North Australian continental shelf. *Journal of Quaternary Science*, 14, 465–470.
- Lloyd D. Keigwin, Jr. *Geology* (1978); Pliocene closing of the Isthmus of Panama, based on biostratigraphic evidence from nearby Pacific Ocean and Caribbean Sea cores v. 6; no. 10; p. 630-634;
- Pie, M. R., Oliveira-Neto, J. F., Boeger, W. A., Ostrensky, A., Baggio, R. A. (2008). The Organization of the Mitochondrial Control Region in 2 Brachyuran Crustaceans: *Ucides cordatus* (Ocypodidae) and *Cardisoma guanhumi* (Gecarcinidae) *Journal of Heredity*.
- Schweitzer, C. E., J. Velez-Juarbe, M. Martinez, A. C. Hull, R. M. Feldmann, and H. Santos. 2008. New Cretaceous and Cenozoic Decapoda (Crustacea: Thalassinidea, Brachyura) from Puerto Rico, United States Territory. *Bulletin of the Mizunami Fossil Museum*, 34: 1-15.
- Shanks, A.L., Grantham, B.A., and Carr, M.H. 2003. Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Ecol. Appl.* 13(1): S159–S169.
- Woodroffe C.D., Grinrod J. (1991) Mangrove biogeography: the role of quaternary environmental and sea-level change. *Journal of Biogeography*, 18, 479–49

ANEXO I

Hydrobiologia (2007) 583:69–76
DOI 10.1007/s10750-006-0472-x

PRIMARY RESEARCH PAPER

Genetic structure of populations of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) at local and regional scales

José F. Oliveira-Neto · Walter A. Boeger ·
Marcio R. Pie · Antonio Ostrensky ·
Diogo B. Hungria

Received: 10 March 2006 / Revised: 15 August 2006 / Accepted: 15 November 2006 / Published online: 19 March 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract The crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) is a species of considerable economic and ecological importance in mangrove areas of the Western Atlantic coast. However, habitat loss, overfishing, and a new infectious disease are causing substantial reductions in local stocks of this species, leading to a pressing need to design efficient management strategies. A crucial step in this design is an understanding of how the genetic variability of *U. cordatus* is distributed among estuaries throughout its range. In this study we assess the degree of spatial structure in the pattern of genetic variation of *U. cordatus* over local (estuaries located within 100 km from each other) and geographical scales (estuaries

located farther than 2700 km from each other). Ninety individuals were collected from nine estuaries and analyzed using PCR-RFLP and RAPD techniques. The percentage of polymorphic bands within populations ranged from 15% to 46% for RFLP markers and from 40% to 70% for RAPD markers. Our results failed to demonstrate significant geographical structure in the pattern of genetic variation, indicating that populations of *U. cordatus* are capable of extensive gene flow among estuaries. The implications of these results for the management of *U. cordatus* populations are discussed.

Keywords Phylogeography · RAPD · RFLP · AMOVA · Nested Clade analysis

Handling editor: C. Sturmbauer

J. F. Oliveira-Neto · W. A. Boeger ·
M. R. Pie (✉) · D. B. Hungria
Departamento de Zoologia, Universidade Federal do
Paraná, Caixa Postal 19073, Curitiba, PR 81531-990,
Brazil
e-mail: pie@ufpr.br

A. Ostrensky
Departamento de Zootecnia, Universidade Federal
do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

J. F. Oliveira-Neto · W. A. Boeger ·
M. R. Pie · A. Ostrensky · D. B. Hungria
Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos
Ambientais, Universidade Federal do Paraná,
Curitiba, PR, Brazil

Introduction

Mangroves play essential roles in the dynamics of the estuarine systems where they are found, serving not only as nursery and feeding areas for a variety of fish and shellfish species, but also in the enrichment of coastal waters, in the stabilization of the shoreline, and in trapping silt and wastes from upland runoff (Marshall, 1994, Beck et al., 2001, Holguin et al., 2001). Despite the consensus among scientists regarding their importance, mangrove environments are being destroyed at an alarming rate in many parts of the

 Springer

ANEXO II

Marine Ecology. ISSN 0173-9565

ORIGINAL ARTICLE

Population genetics and evolutionary demography of *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae)

José F. Oliveira-Neto^{1,2}, Marcio R. Pie^{1,2}, Walter A. Boeger^{1,2}, Antonio Ostrensky^{2,3} & Rafael A. Baggio^{1,2}

¹ Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

² Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

³ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

Keywords

Brachyura; land crab; mangrove; mismatch distribution; nested clade analysis; population expansion; population genetics.

Correspondence

Marcio R. Pie, Departamento de Zoologia, Caixa Postal 19073, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR 81531-990, Brazil.
E-mail: pie@ufpr.br

Accepted: 20 June 2007

doi:10.1111/j.1439-0485.2007.00188.x

Abstract

Variation in a fragment of the mitochondrial control region was investigated to assess the population history of the mangrove land crab, *Ucides cordatus* L., based on 100 individuals from five locations throughout the Brazilian coast. There was considerable variability in the studied fragment, with every individual showing a distinct haplotype. When regions of ambiguous alignment were removed, 90 haplotypes were still recognized, of which only 1 was shared among locations. There was no statistically significant evidence for geographical structure in the pattern of genetic variability based on a nested clade analysis, even though the geographical distances among the farthest collection sites exceeded 3000 km. Moreover, the mismatch distribution of pairwise differences showed a smooth unimodal distribution that is consistent with a recent population expansion of *U. cordatus*, either when each location was analysed in isolation or when all samples were combined. Interestingly, the estimates for the duration of such expansion vary latitudinally, suggesting that the expansion of the population of *U. cordatus* proceeded in a southward direction. These results indicate a possible relationship between the growth in the population of the mangrove land crab and the dynamics of mangrove ecosystems during the Quaternary.

Problem

The increasingly larger number of analytical and conceptual tools for the study of genetic variability has revealed a remarkable variety of patterns of gene flow and historical demography of marine organisms (Graves 1998; Shaw et al. 1999; Weber & Levy 2000; Knutsen et al. 2003; Roman & Palumbi 2004; Bay et al. 2006; Santos et al. 2006). Even among closely related species, one can find drastically different degrees of geographical structure and genetic diversity, as recently observed in two closely related penaeid shrimp species (McMillen-Jackson & Bert 2003), as well as several species of *Callinectes* crabs (Weber & Levy 2000; McMillen-Jackson & Bert 2004;

Pfeiler et al. 2005). However, there is still no comprehensive picture of how physiographical and historical events have shaped the patterns of genetic diversity of marine species since the beginning of the Quaternary. Such information would be instrumental, not only to understand the diversification process of marine taxa, but also to establish conservation strategies that maintain the long-term evolutionary potential of these species (Palumbi 2004).

A marine crustacean of particular importance in Brazilian mangrove areas is the mangrove land crab *Ucides cordatus* L. It is considered a keystone species in mangroves of the western Atlantic for its role in processing decaying plant material and nutrient cycling in those

ANEXO III

Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2008, 88(7), 1417–1423. © 2008 Marine Biological Association of the United Kingdom
doi:10.1017/S0025315408001999 Printed in the United Kingdom

Phylogeography of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) along the Brazilian coast

JOSÉ F. DE OLIVEIRA-NETO^{1,3}, MARCIO R. PIE^{1,3}, MARCELO A. CHAMMAS³, ANTONIO OSTRENSKY^{2,3}
AND WALTER A. BOEGER^{1,3}

¹Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil, ²Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil, ³Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

*Several crab species are important fishery resources in Brazil and their overexploitation has led to severe population declines in some regions. The management of populations of these species should take into account the degree of gene flow among populations in different estuaries. The goal of the present study is to assess the degree of geographical structure in the genetic diversity of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi*, along the Brazilian coast. A fragment of the control region of the mtDNA (750 bp) was sequenced for 95 specimens collected across 5 Brazilian states. Analyses using F-statistics failed to indicate any evidence of geographical structure, a result that was corroborated by a nested clade analysis of the same dataset. Mismatch distribution analyses indicated that populations of the blue land crab have experienced an expansion during their recent evolutionary past. The obtained results are similar to those recently described for another sympatric crab, *Ucides cordatus*, particularly with respect to the extensive degree of gene flow. However, populations of *C. guanhumi* seem to be older than those of *U. cordatus* and do not show the north–south expansion found in that species.*

Keywords: population genetics, d-loop, mangrove, estuary, guaiamum

Submitted 7 November 2007; accepted 22 April 2008; first published online 22 July 2008

INTRODUCTION

The blue land crab, *Cardisoma guanhumi* (Brachyura: Gecarcinidae) is a species highly adapted to terrestrial life that is found in estuarine areas throughout tropical and sub-tropical regions in the Atlantic Coast of the New World, from the state of Florida (USA) to the state of Santa Catarina (southern Brazil). It is an important food resource due to its large body size, which often exceeds 11 cm in carapace length. In Brazil, its highest consumption takes place in the north-eastern states, where it has considerable economic importance (Amaral & Jablonski, 2005; Ministério do Meio Ambiente, 2005). *Cardisoma guanhumi* is not considered to be under threat of extinction, yet in some areas it became rare and its average body size decreased (Amaral & Jablonski, 2005), resulting in a reduction in its commercialization and reducing the importance of this fishery resource. As a consequence, *C. guanhumi* has been included in the list of overexploited species of the Brazilian Ministry of Environment (Ministério do Meio Ambiente, 2004).

The life-cycle of *C. guanhumi* is presumably similar to other semi-terrestrial crustaceans that live in or near mangrove areas. During the reproductive season, such crabs release thousands of larvae into the water during high tide of full moon. These larvae are carried to open waters, where

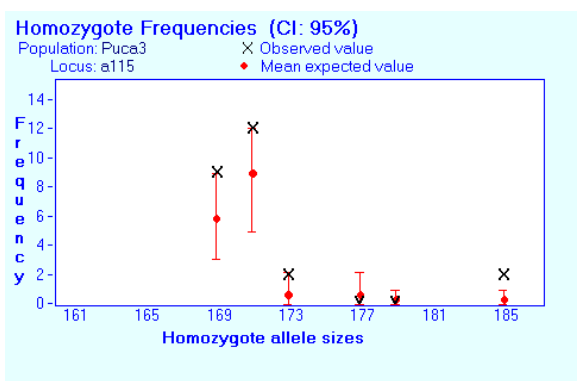
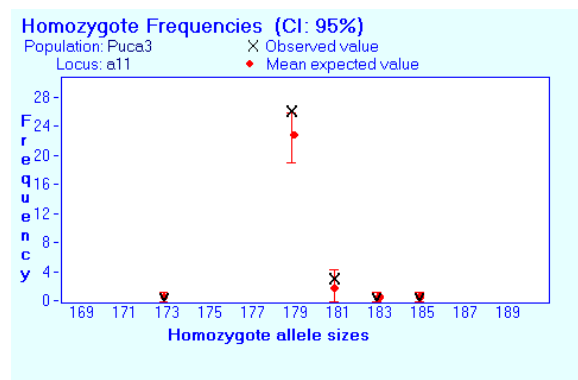
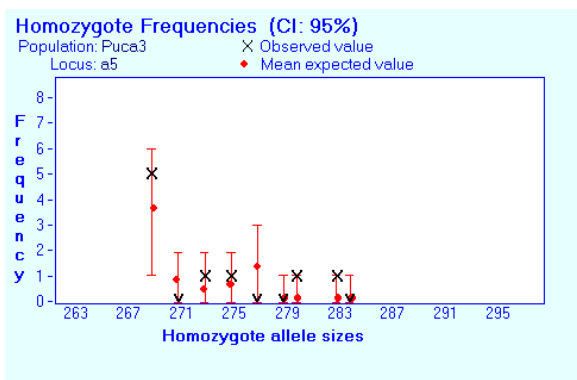
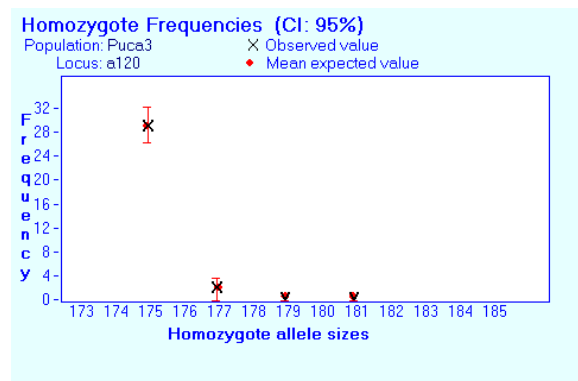
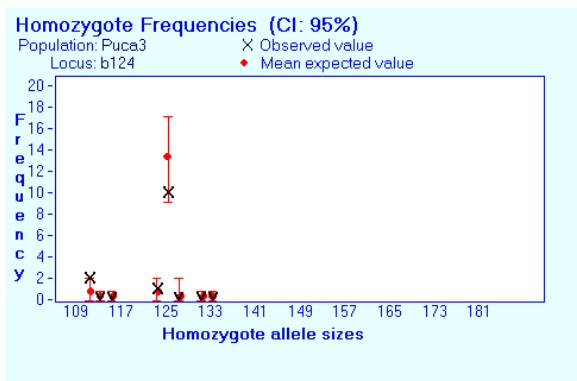
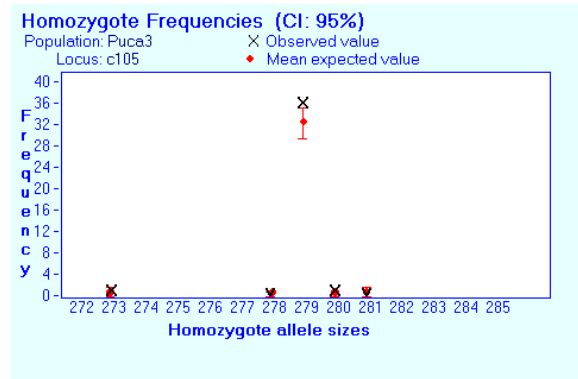
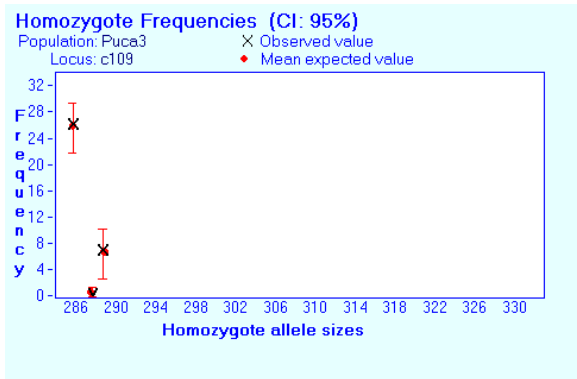
they remain for several weeks until returning to an estuary (Gifford, 1962). Genetic flow between populations of the species is accomplished by the dispersal of larvae, since the adults present reduced horizontal displacements. The distance between mangroves, the flow of water currents, and the shape of the estuaries vary considerably along the Brazilian coast, yet the influence of these factors on the dispersal potential of planktonic larvae is poorly known.

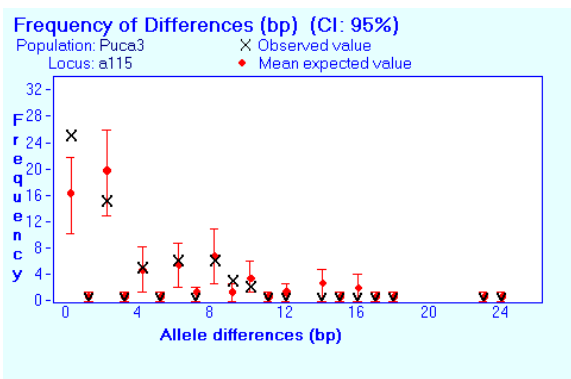
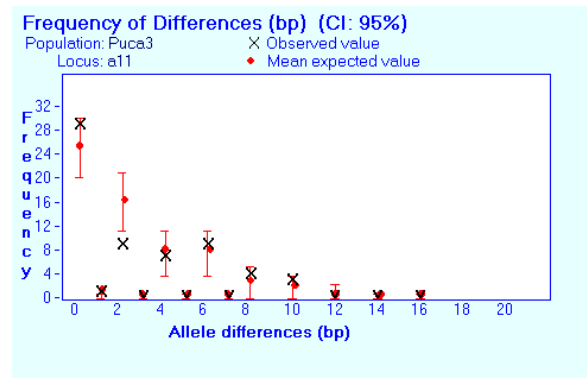
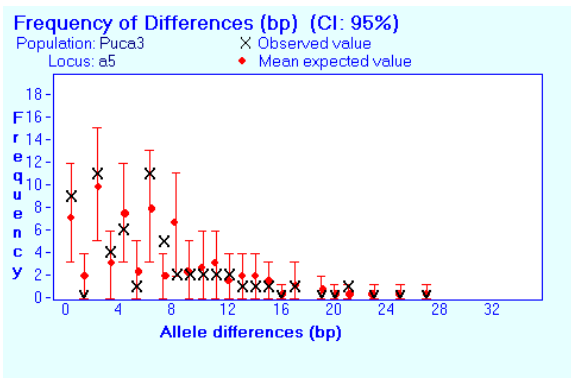
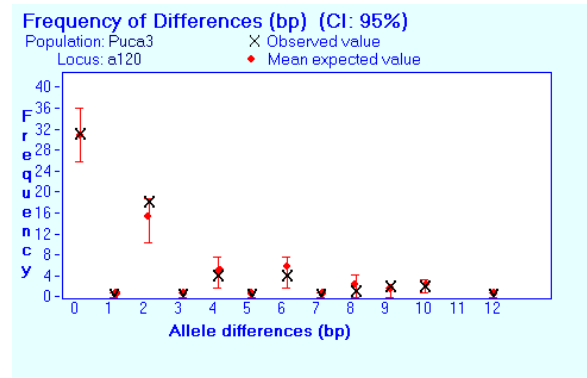
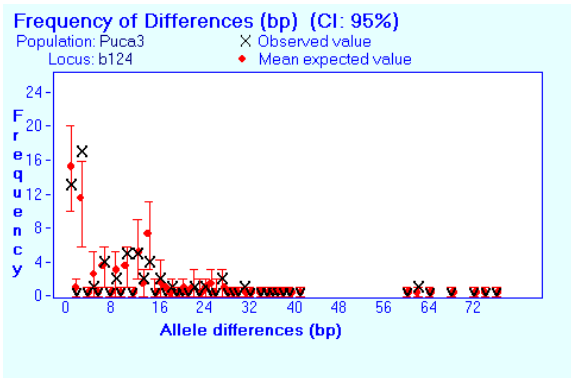
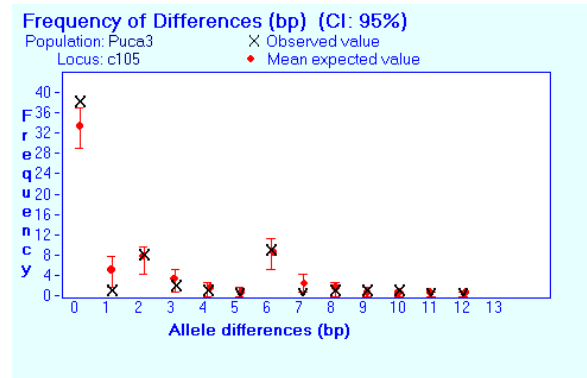
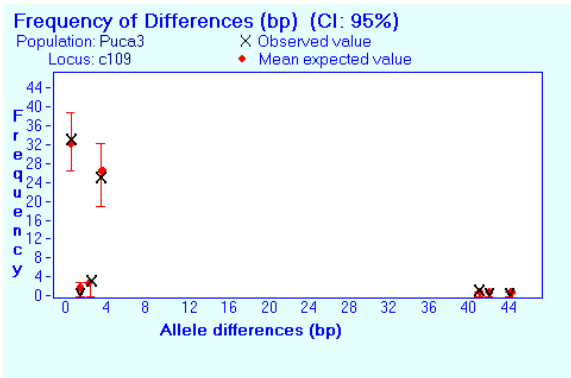
An understanding of the degree of gene flow, genetic diversity, and effective population size is the basis for the establishment of efficient conservation strategies (Frankham *et al.*, 2002). It has been usually thought that animals with this type of life cycle, with pelagic and marine larvae, would show little genetic differentiation due to the high level of gene flow. However, studies on brachyurans have shown genetic differentiation levels ranging from negligible (McMillen-Jackson & Bert, 2004; Cassone & Boulding, 2005; Pfeiler *et al.*, 2005; Oliveira-Neto *et al.*, 2007, 2008) to intermediate or high (Weber & Levy, 2000; Fratini & Vannini, 2002; Weinberg *et al.*, 2003; Roman & Palumbi, 2004).

A recent study on the ocypodid *Ucides cordatus*, a species largely sympatric with the blue land crab, failed to show any evidence of genetic structure in populations south of the River Amazon (Oliveira-Neto *et al.*, 2007). The goal of the present study is to characterize and compare the genetic structure of *C. guanhumi* along the Brazilian coast using sequences of the control region of the mitochondrial DNA, a fragment characterized by high mutation rate that is particularly suitable for population genetic studies.

Corresponding author:
M.R. Pie
Email: pie@ufpr.br

ANEXO IV





Locus: c109

More than 50% of the alleles at this locus are of one allele size class.

Binomial analysis could not be performed.

Total expected homozygotes: 32,298

Total observed homozygotes: 33

No evidence for scoring error due to stuttering.

No evidence for large allele dropout.

No evidence for null alleles.

Locus: c105

More than 50% of the alleles at this locus are of one allele size class.

Binomial analysis could not be performed.

Total expected homozygotes: 32,911

Total observed homozygotes: 38

Analysis indicates homozygote excess at this locus.

No evidence for scoring error due to stuttering.

No evidence for large allele dropout.

Null alleles may be present at this locus, as is suggested by the general excess of homozygotes for most allele size classes.

Locus: b124

Probability of observed homozygote class frequency:

	Binomial based	Rank based
112	0,1362	0,077
114	0,999	1
116	0,999	1
120	0,9998	1
124	0,4167	0,2525
128	0,9942	1
132	0,9998	1
134	0,9998	1
138	1	1
139	1	1
151	1	1

Combined probability for all classes: > **0.05 (not significant)**

Total expected homozygotes: 15,258

Total observed homozygotes: 13

No evidence for scoring error due to stuttering.

No evidence for large allele dropout.

No evidence for null alleles.

Locus: a120

More than 50% of the alleles at this locus are of one allele size class.

Binomial analysis could not be performed.

Total expected homozygotes: 30,959

Total observed homozygotes: 31

No evidence for scoring error due to stuttering.

No evidence for large allele dropout.

No evidence for null alleles.

Locus: a5

Probability of observed homozygote class frequency:

	Binomial based	Rank based
267	1	1
269	0,2171	0,1725
271	0,9873	1
273	0,2979	0,1725
274	1	1
275	0,477	0,315
277	0,9773	1
279	0,9983	1
280	0,1417	0,0825
281	1	1
282	0,9998	1
283	0,0998	0,0655
284	0,9998	1
286	0,9998	1

Combined probability for all classes: **> 0.05 (not significant)**

Total expected homozygotes: 7,475

Total observed homozygotes: 9

No evidence for scoring error due to stuttering.

No evidence for large allele dropout.

No evidence for null alleles.

Locus: a11

More than 50% of the alleles at this locus are of one allele size class.

Binomial analysis could not be performed.

Total expected homozygotes: 25,145

Total observed homozygotes: 29

No evidence for scoring error due to stuttering.

No evidence for large allele dropout.

No evidence for null alleles.

Locus: a115

Probability of observed homozygote class frequency:

	Binomial based	Rank based
169	0,0358	0,028
171	0,05	0,04
173	0,0489	0,03
177	0,9955	1
179	0,9966	1
185	0,001	0,001

Combined probability for all classes: **< 0.01 (significant)**

Total expected homozygotes: 15,927

Total observed homozygotes: 25

Analysis indicates homozygote excess at this locus.

No evidence for scoring error due to stuttering.

No evidence for large allele dropout.

Null alleles may be present at this locus, as is suggested by the general excess of homozygotes for most allele size classes.