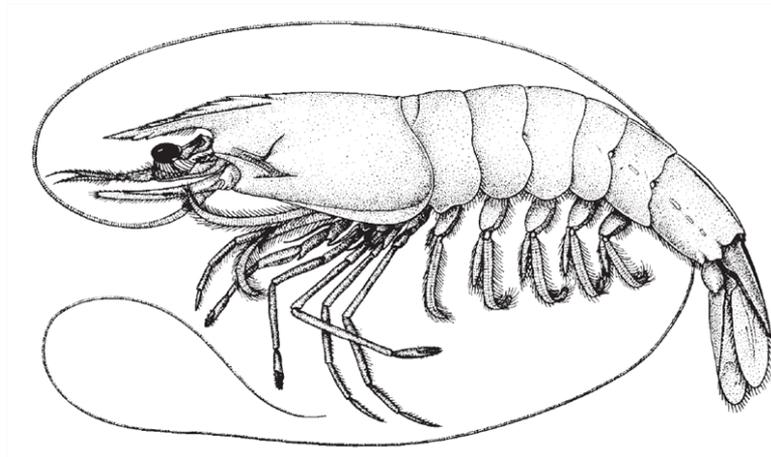


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**Carla Guinart Marques**

**“Relações Genéticas em Espécies de Camarões Peneídeos (Crustacea,  
Decapoda, Penaeidae) de Ocorrência no Litoral Brasileiro”**



**São Carlos  
2015**

**Carla Guinart Marques**

**“Relações Genéticas em Espécies de Camarões Peneídeos (Crustacea,  
Decapoda, Penaeidae) de Ocorrência no Litoral Brasileiro”**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, como requisito necessário para obtenção do título de Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, sob orientação da Profa Dr. Patrícia Domingues de Freitas.

**São Carlos**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M357r Marques, Carla Guinart  
Relações genéticas em espécies de camarões  
peneídeos (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) de  
ocorrência no litoral brasileiro / Carla Guinart  
Marques. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
120 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2015.

1. Filogeografia. 2. Genética de populações. 3.  
DNA Barconde. 4. Numts. 5. RAD-seq. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia  
Molecular

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Carla Guinart Marques, realizada em 21/08/2015:

---

Profa. Dra. Patricia Domingues de Freitas  
UFSCar

---

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama  
UFSCar

---

Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes  
UFSCar

---

Prof. Dr. Allysson Pontes Ribeiro  
URCA

---

Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto  
USP

À minha amada mãe Tereza de Castro Guinart,  
meu exemplo de vida.

## Agradecimentos

À Profa Dra Patrícia Domingues de Freitas por me dar a oportunidade de realizar este trabalho mas, principalmente pela convivência e amizade durante esses dez anos que estive no LABMC. Sua amizade trouxe muito consolo, felicidade e divertimento nesses anos e fez muita diferença no meu crescimento profissional e pessoal.

Ào Prof. Dr. Pedro M. Galetti Jr. pelo apoio na elaboração deste trabalho, onde trouxe grandes contribuições.

Ào Prof. Dr. Luiz Rocha e a California Academy of Science por me receber no Doutorado Sanduíche em San Francisco, CA.

À Universidade Federal de São Carlos e o Departamento de Genética e Evolução, corpo docente, direção e administração pela oportunidade de cursar o Doutorado.

Às instituições CAPES, CNPq, FAPESP e INCT pelo apoio financeiro.

À minha querida mãe Tereza de Castro Guinart, que sempre me apoiou com suas sábias palavras, nunca duvidou que eu seria capaz e ainda tornou possível que eu trilhasse esse caminho, obrigada pelo seu amor incondicional.

Ào meu amado filho Ariel Marques Sartório, que abdicou do carinho da mãe para que eu pudesse realizar este sonho. Espero um dia ser capaz de retribuir toda essa compreensão e compensar todo o tempo que não pude estar ao seu lado nesses intermináveis quatro anos.

Ào meu pai José Carlos Marques por todo apoio que tem dado me substituindo e se responsabilizando por meu filho enquanto estou ausente.

Ào Eduardo Cassinelli Filho, pela enorme paciência em aguentar meus anseios, limpar as lágrimas no desespero e servir me o colo para me acalmar.

Àos queridos amigos do laboratório que me aguentaram com muita paciência e cerveja durante todos esses anos, sempre apoiando e ajudando nas horas que mais precisei.

À todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

*“Só se pode alcançar um grande êxito quando  
nos mantemos fiéis a nós mesmos.”*

Friedrich Nietzsche

## RESUMO

A família Penaeidae ocorre em todos os oceanos, principalmente nas regiões tropicais e apresenta grande importância econômica mundial. No Brasil, os peneídeos têm mostrado declínio nas populações, as quais são consideradas sobreexplotadas. Dessa forma, melhor conhecimento dessas espécies se faz necessário para que medidas conservacionistas mais adequadas sejam tomadas. Estudos genéticos em peneídeos, incluindo filogeografia, distribuição geográfica e filogenia ainda são escassos. No presente estudo, a estrutura genética e as relações genéticas foram caracterizadas para distintas espécies de camarões marinhos pertencentes à família Penaeidae, com ênfase especial nas de ocorrência no litoral brasileiro (*Xiphopenaeus kroyeri*, *Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus subtilis* and *Farfantepenaeus brasiliensis*). Marcadores mitocondriais e nucleares, foram usados com o intuito de esclarecer aspectos relacionados à distribuição geográfica e relações genéticas entre as espécies estudadas e suas implicações conservacionistas. Oligonucleotídeos específicos foram desenvolvidos para amplificação de quatro regiões mtDNA (COI, 16S, Cytb e DLoop), os quais foram eficientes para 16 espécies nativas da costa brasileira e moçambicana. A presença de numts e suas implicações para a genética de peneídeos foi investigada utilizando primers específicos e universais para o gene COI, sendo observada a presença pseudogene em algumas espécies. Foi evidenciada pela primeira vez em Penaeidae a presença de pseudogene Cytb. A eficiência do DNA Barcode foi testada em diversas espécies coletadas no litoral brasileiro. Foi observada uma alta variação da distância intraespecífica, indicando a necessidade de uma revisão nesta família. A existência de um complexo de espécies foi verificada nas espécies *X. kroyeri* e *F. subtilis*. Sinais filogeográficos ou estruturação populacional não foram observadas ao longo da costa brasileira para *F. subtilis*. Uma leve estruturação populacional foi encontrada para *Farfantepenaeus paulensis* entre populações da Lagoa dos Patos-RS e Cananéia-SP, utilizando-se o gene COI. Este dado pode estar refletindo a existência de estoques de adultos geneticamente diferentes ou uma estruturação antiga. Duas expansões populacionais recentes foram observadas para esta espécie, sendo uma antes e outra após o período da última glaciação máxima. Dados de mtDNA e RAD-seq foram utilizados para estudar as populações de *X. kroyeri*. A análise mitocondrial sugeriu que ressurgência em Cabo Frio-RJ apresenta-se como uma barreira semipermeável para esta espécie, limitando o fluxo gênico entre populações situadas ao norte e ao sul de Cabo Frio. A análise de aproximadamente 3mil SNPs revelou três possíveis estoques genéticos, possivelmente relacionado a características hidrodinâmicas das regiões amostradas, as quais podem estar retendo larvas. O presente estudo trás importantes informações sobre as relações genéticas, estrutura de populações e filogeografia de espécies da família Penaeidae, principalmente as de ocorrência no litoral brasileiro. Essas informações podem ajudar futuras tomadas de decisão que visem a conservação dessas espécies, as quais apresentam relevância ecológica e/ou socioeconômica, representando um importante recurso pesqueiro.

Palavras-Chave: filogeografia, RAD-seq, estrutura populacional, mtDNA

## ABSTRACT

Penaeidae family occurs in all oceans, particularly in tropical regions and represents an important global fishing resource. In Brazil, penaeid species have been shown decline, of their populations, which are considered overexploited. Therefore, a greater knowledge about these species is required for the developing of appropriate conservation actions. However, genetic studies of penaeids, including phylogeography, geographic distribution and phylogeny, are still scarce. In the present work, genetic structure and genetic relationships were characterized for different marine shrimp species belonging to the Penaeidae family, with special emphasis on those of occurrence in the Brazilian coast (*Xiphopenaeus kroyeri*, *Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus subtilis* and *Farfantepenaeus brasiliensis*). Mitochondrial and nuclear markers were used in order to clarify aspects related to the geographic distribution and genetic relationships among the studied penaeid species and the implications for conservationist approaches. Specific oligonucleotides were designed to amplify four mtDNA regions (COI, 16S, Cytb and DLoop). The results showed efficient patterns for 16 native species of Brazilian and Mozambican coasts. Numts presence and its implication for penaeid genetics were investigated using specific and universal primers for COI gene. Pseudogenes were detected for some penaeid species. Cytb pseudogene for the Penaeidae family was reported by the first time. DNA barcoding approach was tested in several species from Brazilian coast. The barcoding analysis evidenced a high range of intraspecific distance, suggesting the necessity of taxonomic review into Penaeidae. The existence of species complex was investigated for both *X. kroyeri* and *F. subtilis*. Phylogeographical signs and population structure were no observed for *F. subtilis* along the Brazilian coast. *F. paulensis* populations, collected in Lagoa dos Patos (RS) and Cananéia (SP), showed genetic structuring by analyzing of COI gene. That data can be reflecting the existence of differentiated-genetically adult stocks or ancient structure. Two recent population expansions, one of them before and the other one after the last period of the maximum glacial, were observed for *F. paulensis*. mtDNA and RAD-seq data were using to study the species *X. kroyeri* populations. The mtDNA analysis suggested that the upwelling from Cabo Frio (RJ) consists in a semipermeable barrier to *X. kroyeri* species, limiting the genetic flow between populations from North and South of Cabo Frio for. The analysis of approximately three thousand SNPs revealed three different genetic stocks, possibly related to the hydrodynamic characteristics of the sampled geographic regions, which may be holding different larvae pools. The study herein brings important information about genetic relationships and population structure for Penaeidae species, mainly those species occurring in Brazil. Such data can be help to foment future actions aiming the conservation of penaeid species, which present ecological and socioeconomic relevance.

Keywords: Phylogeography, RAD-seq, structure population, mtDNA

## Lista de Figuras

**Figura 1:** Esquema representativo, baseado nos estudos de Pérez-Farfante (1967); Carpenter (2002) e Costa *et al.* (2003), ilustrando as áreas de ocorrências das espécies (1) *F. brasiliensis*, (2) *L. schmitti*, (3) *F. notialis*, (4) *F. paulensis* e (5) *F. subtilis*, com destaque para o Oeste do Atlântico ..... 3

**Figura 1.1:** Alinhamento das sequências do gene *Cytb* da espécie críptica *Xiphopenaeus kroyeri* II, sendo as quatro sequências pertencentes ao mesmo indivíduo. As duas primeiras sendo as sequências *forward* e *reverse* amplificadas com o par de *primers* *Cytb* F2R1 e as duas últimas sequências *forward* e *reverse* amplificado com o par de *primers* *Cytb* F1R1 que amplificou um *Numt*, em destaque a deleção de um *codon* ..... 18

**Figura 1.2:** Árvore Neighbor Joining K2P do gene COI de espécies de Penaeidae amplificados com diferentes pares de *primers*, mostrando diferentes topologias devido a presença de Numts. a) utilizando *primers* “universais” LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al.* 1994); b) utilizando os *primers* COIPenF2/COIPenR (aqui desenvolvidos) ..... 20

**Figura 2.1:** Locais onde foram amostrados os espécimes de camarões peneídeos ..... 29

**Figura 2.2:** Árvore *Neighbor Joining* utilizando *Kimura-2-parameters* com 104 sequências COI obtidas para seis espécies nominais de camarão ..... 31

**Figura 2.3:** Gráfico de frequências das distâncias par a par (K2P) evidenciando o DNA Barcoding Gap para 104 sequências COI de camarões Penaeidae da costa brasileira considerando os oito OTUs definido pelo ABGD (Puillandre *et al.*, 2012) e clados observados na árvore de NJ (K2P) ..... 34

**Figura 2.4:** Mínima distância Intrespecífica contra máxima distância intraespecífica para 22 espécies de Penaeidae com threshold de 3% que divide o gráfico em quatro quadrantes: (I) distância intraespecífica <3%, distância interespecífica >3%: concordante com a taxonomia; (II) distância intraespecífica >3%, distância interespecífica >3%: possível complexo de espécies, candidato a divisão taxonômica; (III) distância intraespecífica <3%, distância interespecífica <3%: recente divergência, hibridização ou sinonímia; (IV) distância intraespecífica >3%, distância interespecífica <3%: provável erro de identificação. (1) *Artemesia longinaris*, (2) *Trachypenaeopsis mobilispinis*, (3) *Funchalia villosa*, (4) *Marsupenaeus japonicus*, (5) *Penaeus monodon*, (6) *Fenneropenaeus merguensis*, (7) *Litopenaeus vannamei* ..... 36

**Figura 2.5:** DNA Barcode Gap (a) Frequência das distancias inter e intraespecificas das 571 sequencias compreendendo 22 espécies; (b) zoom evidenciando a sobreposição das distancias ..... 37

**Figura 2.6:** Árvore *Neighbor Joining* utilizando *Kimura-2-parameters* com 571 sequencias COI e 22 espécies nominais. Em destaque estão apresentadas as divisões resultantes do *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD *web interface* - Puillandre et al. 2012) quando  $P=0,011$  (29) e  $P=0,037$  (26) ..... 38

**Figura 3.1:** Ciclo de vida típico de Penaeidae (<http://www.fao.org/docrep/005/ac867s/ac867s07.htm>) ..... 47

**Figura 3.2:** Mapa da costa brasileira destacando os pontos onde os espécimes do gênero *Farfantepenaeus* foram amostrados ..... 50

**Figura 3.3:** *Median Joing networks* da espécie *Farfantepenaeus subtilis* destacando as duas variedades *F. subtilis* morfotipo I (MI) e I morfotipo II (MII) para três diferentes marcadores mitocondriais: a) 16S; b) COI; c) Cytb ..... 55

**Figura 3.4:** *Median Joing networks* da espécie *Farfantepenaeus paulensis* para o marcador mitocondrial COI ..... 56

**Figura 3.5:** *Median Joing networks* da espécie *Farfantepenaeus paulensis* para quatro marcadores mitocondriais: a) 16SrRNA; b) Cytb; c) Dloop ..... 57

**Figura 3.6:** gráficos de *mismatch distribution* utilizando modelo de expansão demográfica para a espécie *Farfantepenaeus paulensis* em quatro marcadores mitocondriais: a) 16SrRNA (SSD = 0,0005 p-value = 0,4; Raggedness index = 0,51418 p-value= 0,7) b) COI (SSD = 0,00102 p-value = 0,9; Raggedness index = 0,02 p-value = 1,0), c) Cytb (SSD = 0,00049 p-value = 0,95; Raggedness index = 0,1179 p-value = 0,8) e d) Dloop (SSD = 0,005, p-value = 0,60; Raggedness index = 0,0078, p-value = 0,8) ..... 59

**Figura 3.7:** Gráficos de *mismatch distribution* utilizando modelo de expansão demográfica para a espécie *Farfantepenaeus subtilis*: a) COI (SSD= 0,008, p-value= 0,80; Raggedness index = 0,037, p-value= 0,70); B) Cytb (SSD= 0,004, p-value= 0,60; Raggedness index = 0,078; p-value= 0,50) ..... 59

**Figura 3.8:** Bayesian Skyline plot divisões em cinza e branco representa os *Marine Isotopo Stage* (MIS): MIS3 – Interglacial período ~60ka 27ka BP (Van Meerbeeck *et al.*, 2009), MIS 2 - Last glacial maximun period ~27ka a 18ka e MIS 1 – Interglacial período ~18ka ao presente. Linha pontilhada representa o tempo estimado de expansão através da análise de *mismatch distribution*. a) COI; b) Dloop ..... 60

**Figura 3.9:** Mapa da distribuição da espécie *Farfantepenaeus paulensis*, apontando os locais amostrados e as regiões de concentrações de adultos ..... 66

**Figura 3.10:** Ilustração esquemática da da região de influencia da Corrente do Brasil: North Brazilian Current (NBC), South Equatorial Undercurrent (SEUC), South

Equatorial Countercurrent (SECC), South Equatorial Current (SEC), Subantarctic Front (SAF), Brazil Current Front (BCF), and Subtropical Front (STF) (retirado de Peterson & Stramma 1991) ..... 68

**Figura 3.11:** Corrente em superfície na costa sudeste e sul brasileira em fevereiro (retirado de Castro *et al.*, 2006) ..... 69

**Figura 4.1:** Mapa destacando os locais de amostrados no Brasil ..... 74

**Figura 4.2:** Rede de haplotipos *Median Joing* com o gene 16SrRNA para a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* em 10 regiões amostras e o número amostral entre parênteses ..... 83

**Figura 4.3:** Rede de haplotipos *Median Joing* com o gene COI para a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* em 9 regiões amostras e o número amostral entre parênteses ..... 83

**Figura 4.4:** Rede de haplotipos *Median Joing* com o gene COI para a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* em 11 regiões amostras e o número amostral entre parênteses ..... 84

**Figura 4.5:** gráficos de *mismatch distribution* utilizando modelo de expansão demográfica para a espécie *X. kroyeri* em três marcadores mitocondriais: a) 16SrRNA (SSD = 0,00008; p-value = 0,25; Raggedness index = 0,6348; p-value = 0,75) b) COI (SSD = 0,002148 p-value = 0,590; Raggedness index = 0,05018 p-value = 0,410) e c) Cytb (SSD = 0,38608 p-value = 0,0000; Raggedness index = 0,063822 p-value = 1,000) ..... 84

**Figura 4.6:** Resultado da análise FDIST com todos os SNPs inferidos por RAD-seq (2949 SNPs). Aqueles que tiveram valores significativos e encontraram se a cima de IC= 0,95 foram considerados sob seleção direcionada, enquanto que aqueles com valores significativos e abaixo de IC=0,05 foram classificados sob seleção balanceadora ..... 86

**Figura 4.7:** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para os quatro conjuntos de SNPs sendo a) todos os SNPs, b) SNPs neutros, c) SNPs sob seleção balanceadora e d) SNPs sob seleção direcionada. Legenda : (Δ Angra) (O Macaé) (□ Cananéia) (- Itajaí) ..... 88

**Figura 4.8:** Gráficos de saída do programa STRUCTURE para k=3 com os quatro conjuntos de SNPs: A) Todos os SNPs, B) SNPs neutros, C) SNPs sob seleção balanceadora e D) SNPs sob seleção direcionada ..... 89

**Figura 4.9:** Rede de haplotipos do gene Cytb e mapa dos locais amostrados destacando a região de Cabo Frio ..... 91

**Figura 4.10:** Ecoregiões estipuladas por Spalding *et al.*, (2007), destacando as regiões amostradas (cores referentes a figura 4.8) ..... 94

## Lista de Tabelas

- Tabela 1.1:** espécies amostradas e locais de origem ..... 15
- Tabela 1.2:** Espécies utilizadas na amplificação do gene COI com o primer universal LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al.* 1994) e os números de acesso: n/a – não apresentou amplificação; (\*) - presença de Numts; s/b – sequência de baixa qualidade ..... 16
- Tabela 1.3:** Listagem dos pares de primer, loci de amplificação, nome dos *primers*, temperatura e o táxon que cada par de primer amplifica ..... 18
- Tabela 2.1:** Matriz de distancia entre os clados encontrados com a árvore *Neighbor Joining* valores calculados utilizando *Kimura-2-Parameters* ..... 32
- Tabela 2.2:** Número de indivíduos coletados e identificados por espécie e local amostrado. XkI (*Xiphonopaeus kroyeri* I); XkII (*Xiphonopaeus kroyeri* II); Fbra (*Farfantepenaeus brasiliensis*); Fpau (*Farfantepenaeus paulensis*); FsubMI (*Farfantepenaeus subtilis* morfotipo I); FsubMII (*Farfantepenaeus subtilis* morfotipo II); Lsch (*Litopenaeus schmitti*); Rcon (*Rimapenaeus constrictus*) ..... 33
- Tabela 2.3:** Resultados obtidos no ABGD web com X=1.5, distancia K80 e 20 passos entre P mínimo de 0.001 e P máximo de 0.1 para as duas análises, com 104 e 571 sequencias. Valores de P com resultados idênticos foram omitidos com exceção de P=0.078 devido a ser o ultimo valor apresentado ..... 33
- Tabela 3.1:** Listagem dos *primers* utilizados para amplificação dos quatro marcadores mitocondriais utilizados ..... 51
- Tabela 3.2:** Quantidade espécimes coletados por local amostrado e quantidade de cada uma das espécies *Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus subtilis* morfotipo II (MI - *F. subtilis* Morfotipo I) e *Farfantepenaeus brasiliensis* identificadas molecularmente por local amostrado e o total amostrado ..... 53
- Tabela 3.3:** Dados de polimorfismo para os marcadores mitocondriais para todas as espécies onde (N) numero de sequencias, (pb) n° de pares de bases, (S) sítios polimórficos, (G+C) quantidade de G e C, (h) número de haplótipos, (Hd) diversidade haplotípica e (Pi) diversidade nucleotídica ..... 54
- Tabela 3.4:** Matriz dos valores de  $\Phi_{ST}$ , método de distância par a par (diagonal abaixo) e seus valores de p-value +- desvio padrão (diagonal acima) para o gene COI em *F. paulensis* (nível de significância 0,05) ..... 56
- Tabela 3.5:** Testes de neutralidade *Tajima's D statistic* (D - Tajima, 1989) e *Fu's Fs statistical tests* (Fs - Fu, 1997) e de expansão populacional ( $R_2$  - Ramos-Onsins and

Rozas 2002) dos quatro genes mitocondriais e seus *p*-value para as espécies *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus subtilis* ..... 56

**Tabela 4.1:** Índices de diversidade dos três marcadores mtDNA para a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* onde (N) número de sequências, (pb) n° de pares de bases, (S) sítios polimórficos, (G+C) quantidade de G e C, (h) número de haplótipos, (Hd) diversidade haplotípica e (Pi) diversidade nucleotídica ..... 79

**Tabela 4.2:** Testes de neutralidade Tajima's D statistic (D - Tajima, 1989), Fu's Fs statistical tests (Fs - Fu, 1997) e R<sub>2</sub> (Ramos-Onsins and Rozas 2002) dos três genes mitocondriais e seus *p*-value para a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* ..... 79

**Tabela 4.3:** Matriz dos valores de  $\Phi_{ST}$ , método de distância par a par (diagonal abaixo) e seus valores de *p*-value +- desvio padrão (diagonal acima) para o gene COI em *X. kroyeri* (nível de significância 0,05) ..... 81

**Tabela 4.4:** Matriz dos valores de  $\Phi_{ST}$ , método de distância par a par (diagonal abaixo) e seus valores de *p*-value +- desvio padrão (diagonal acima) para o gene Cytb em *X. kroyeri* (nível de significância 0,05) ..... 81

**Tabela 4.5:** Matriz dos valores de *p*-value do teste exato de diferenciação par a par usando o método de distância (abaixo da diagonal) e sua significância entre os pares de populações (acima da diagonal) para o gene Cytb em *X. kroyeri* (nível de significância 0,005) ..... 82

**Tabela 4.6:** Análise de Variância Molecular (AMOVA) para o gene Cytb *X. kroyeri* sendo onze locais amostrados distribuídas em cinco grupos (*p*=0,05 com 1023 permutações) ..... 82

**Tabela 4.7:** Valores Fst par a par entre as regiões amostradas com todos os 2949 SNPs (diagonal a baixo) e valores de *p*-value +- desvio padrão (diagonal a baixo) ..... 86

**Tabela 4.8:** Valores Fst par a par entre as regiões amostradas com os 2484 SNPs classificados neutros (diagonal a baixo) e valores de *p*-value +- desvio padrão (diagonal a baixo)..... 87

**Tabela 4.9:** Valores Fst par a par entre as regiões amostradas com os 315 SNPs classificados sob seleção balanceadora (diagonal a baixo) e valores de *p*-value +- desvio padrão (diagonal a baixo) ..... 87

**Tabela 4.10:** Valores Fst par a par entre as regiões amostradas com os 104 SNPs classificados sob seleção direcionada (diagonal a baixo) e valores de *p*-value +- desvio padrão (diagonal a baixo) ..... 87

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	8
Objetivos específicos .....	8
<b>CAPÍTULO 1</b>	
“Quando numts podem atrapalhar análises genéticas em Penaeidae?” .....	10
1.1 INTRODUÇÃO .....	11
1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	13
1.3 RESULTADOS .....	17
1.4 DISCUSSÃO .....	21
<b>CAPÍTULO 2</b>	
“DNA Barcode: Identificando e ampliando a distribuição de camarões Penaeidae (Crustacea:Decapoda)” .....	24
2.1 INTRODUÇÃO .....	25
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	28
2.3 RESULTADOS .....	20
2.4 DISCUSSÃO .....	29
<b>CAPÍTULO 3</b>	
“História demográfica e estruturação genética em camarões rosa <i>Farfantepenaeus</i> (Crustacea: Penaeidae)” .....	45
3.1 INTRODUÇÃO .....	46
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	49
3.3 RESULTADOS .....	52
3.4 DISCUSSÃO .....	61
3.4.1 <i>Farfantepenaeus subtilis</i> e <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> .....	62
3.4.2 <i>Farfantepenaeus paulensis</i> .....	64
<b>CAPÍTULO 4</b>	
“Estrutura genética no camarão sete barbas <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> (Crustacea: Penaeidae) inferida com mtDNA e SNPs.” .....	70
4.1 INTRODUÇÃO .....	71
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	73

4.2.1 Amostragem .....	73
4.2.2 Marcadores mitocondriais .....	73
4.2.3 <i>Restriction Site-Associated DNA sequencing</i> (RAD-seq) .....	75
4.3 RESULTADOS .....	79
4.3.1 Marcadores mitocondriais .....	79
4.3.2 Marcadores SNPs (RAD-seq) .....	85
4.4 Discussão .....	90
4.4.1 Marcadores mtDNA .....	90
4.4.1 Marcadores SNPs (RAD-seq) .....	95
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>98</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

A família Penaeidae, a qual inclui as espécies de camarões marinhos mais importantes do mundo, apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os oceanos, principalmente nas regiões tropical e subtropical. Ela representa um terço das espécies comercialmente mais exploradas, sendo considerada a parcela de crustáceos de maior importância econômica mundial (Dall *et al.*, 1990; SOFIA, 2008). A família Penaeidae é constituída por 33 gêneros que englobam 215 espécies e subespécies descritas até o momento (Sakai e Shinomiya, 2011; Fransen e De Grave, 2009).

No Brasil, 19 espécies de peneídeos, pertencentes a dez gêneros (*Penaeus*, *Farfantepenaeus*, *Litopenaeus*, *Rimapenaeus*, *Xiphopenaeus*, *Parapenaeus*, *Metapenaeus*, *Metapenaeopsis*, *Artemesia* e *Fuchalia*), é encontrado ao longo da costa litorânea (Pérez-Farfante, 1969; Costa *et al.*, 2000). Dentre estas espécies, estão *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus notialis*, *Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus subtilis* e *Xiphopenaues kroyeri*, entre outras comercialmente menos exploradas como *Rimapenaeus constrictus* (Costa *et al.*, 2000; Pérez-Farfante e Kensley, 1997; Carpenter, 2002).

O camarão branco do Atlântico *Litopenaeus schmitti* é a única espécie do gênero *Litopenaeus* que ocorre no Brasil. Ela se distribui desde a Baía de Matanzas em Cuba até o litoral brasileiro, sendo desde o estado do Amapá até o estado do Rio Grande do Sul. Esta espécie costuma habitar preferencialmente águas rasas com até 50 m de profundidade (Figura 1.2) (Pérez-Farfante, 1967; Carpenter, 2002 e Costa *et al.*, 2003).

*Xiphopenaeus kroyeri*, também conhecido popularmente como sete barbas no Brasil e “sea bob” em outros países, tem uma ampla distribuição, ocorrendo desde a Carolina do Norte nos EUA até Santa Catarina e vivendo preferencialmente em águas rasas com profundidade até 70 metros, sendo mais abundante até 27 metros (Pérez-Farfante, 1967; Carpenter, 2002 e Costa *et al.*, 2003).

A espécie *Farfantepenaeus brasiliensis*, conhecida como camarão rosa, se distribui do Atlântico Ocidental dos EUA (Cape Hatteras, Carolina do Norte) até a faixa litorânea brasileira, indo desde o estado do Amapá até o estado do Rio Grande do Sul.

Este camarão é encontrado tanto em águas rasas quanto profundas, com até 360 m de profundidade (Figura 1.1) (Pérez-Farfante, 1967; Carpenter, 2002 e Costa *et al.*, 2003).

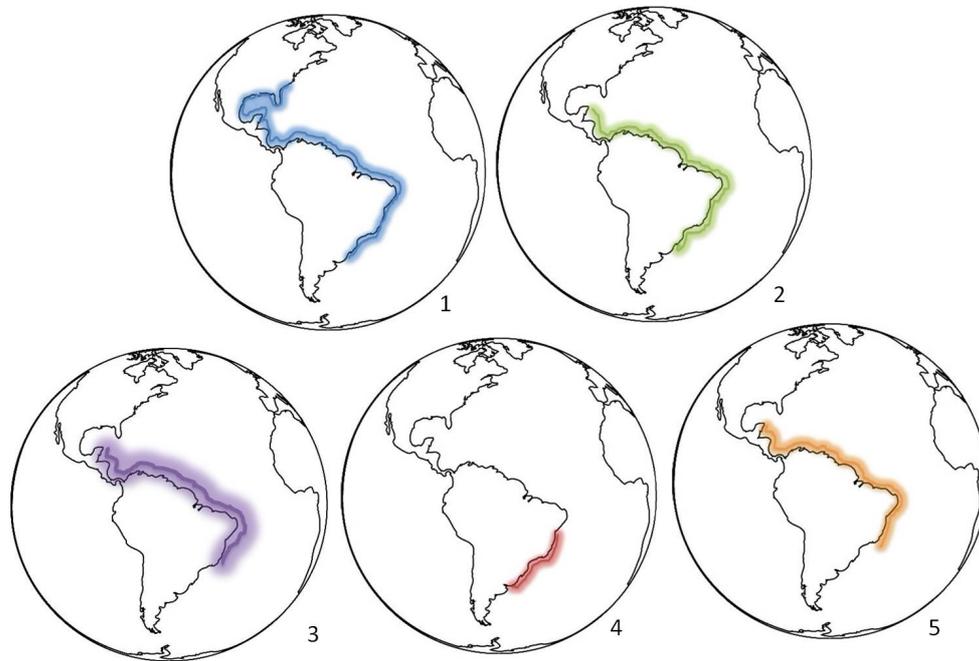
*Farfantepenaeus notialis*, igualmente conhecida como camarão rosa, pode ser encontrada no Mar do Caribe, passando pelas Ilhas Virgens ao longo da costa da América do Sul e se estendendo até o estado do Rio de Janeiro, no Brasil. Este camarão também pode ser encontrado na costa Oeste da África, indo desde Mauritania até Angola (Figura 1.3). *F. notialis* é encontrada desde o litoral até 90m de profundidade ocasionalmente até 190m de profundidade, na lama tanto macia e quanto dura (Pérez-Farfante, 1967; Carpenter, 2002 e Costa *et al.*, 2003).

Outra espécie também conhecida popularmente como camarão rosa é a *Farfantepenaeus paulensis*. Esta espécie possui uma distribuição mais restrita no Atlântico Ocidental, indo do litoral da Bahia ao Rio Grande do Sul no Brasil até a costa do Uruguai e da Argentina no Mar Del Plata. Esta espécie pode ser encontrada em águas com até com 150 m de profundidade (Figura 1.4) (Pérez-Farfante, 1967; Carpenter, 2002 e Costa *et al.*, 2003).

Já a espécie *Farfantepenaeus subtilis* pode ser encontrada na região que se estende do Mar do Caribe, desde Cuba e Penas Antilhas, até o litoral de Cabo Frio, no estado do Rio de Janeiro no Brasil. Este camarão habita águas rasas com até de 75 m de profundidade (Figura 1.5) (Pérez-Farfante, 1967; Carpenter, 2002 e Costa *et al.*, 2003).

Parte da população humana brasileira (25%) está localizada na região litorânea do país, dessa forma a pesca representa uma importante fonte econômica, social e cultural para essa grande parcela da população (Ferreira e Freire 2009). Os crustáceos representam cerca de 10,7% (53.087 toneladas) do total (494.696 toneladas) de pescado produzido em toda a costa, sendo que 6,6% (32.585 toneladas) são representados pelos camarões, principalmente os pertencentes a família Penaeidae, com maior produção na região Nordeste-Central do país (SOFIA, 2008; Nahum *et al.*, 2006). Devido ao seu grande valor comercial, muitas espécies de camarões peneídeos vêm sendo economicamente sobreexploradas, especialmente nas regiões tropicais (De Francisco *et al.*, 2008, D'incao *et al.*, 2002).

**Figura 1:** Esquema representativo, baseado nos estudos de Pérez-Farfante (1967); Carpenter (2002) e Costa *et al.* (2003), ilustrando as áreas de ocorrências das espécies (1) *F. brasiliensis*, (2) *L. schmitti*, (3) *F. notialis*, (4) *F. paulensis* e (5) *F. subtilis*, com destaque para o Oeste do Atlântico.



Segundo a Instrução Normativa do Ministério do Meio Ambiente nº 05 de 21 de maio de 2004 (Brasil 05/2004), entende-se como espécies sobreexploradas: “aquelas cuja condição de captura de uma ou todas as classes de idade em uma população são tão elevadas que reduz a biomassa, o potencial de desova e as capturas no futuro, a níveis inferiores aos de segurança”, sendo as ameaçadas de sobreexploração definidas como: “aquelas cujo nível de exploração encontra-se próximo ao de sobreexploração”. O Ministério do Meio Ambiente considerou desde 2004 (Brasil 05/2004) que as espécies *F. subtilis*, *F. brasiliensis*, *F. paulensis*, *L. schmitti* e *X. Kroyeri* encontram-se sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração. Em decorrência da sobreexploração, algumas espécies de peneídeos nativos à costa brasileira já estão apresentando acentuado declínio em seus estoques naturais (Gillett, 2008; Borrell *et al.*, 2004; Isaac *et al.* 2008, D’Incão *et al.*, 2002; Filho *et al.*, 2003).

O período de defeso para as espécies de camarão rosa (*F. paulensis*, *F. brasiliensis* e *F. subtilis*), e camarão branco (*L. schmitti*) entre outras, ocorre nos períodos de 1º de março a 31 de maio para a região compreendida entre os estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul e de 15 de novembro a 15 de janeiro e 1º de abril a 31 de maio para a região compreendida entre os estados do Espírito Santo e da Bahia (Brasil 189/2008).

Em 2009 uma publicação da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, *International Union for Conservation of Nature – Winter*, 2009) especial atenção foi dada à pesca de camarões no litoral do Brasil. Segundo a IUNC, apesar de haver intervenção do governo na pesca dos camarões rosa, na região nordeste do Brasil, as espécies *F. brasiliensis* e *F. subtilis* encontram-se sobreexplotadas e nas regiões sul e sudeste, estoques de *F. brasiliensis* e *F. paulensis* já estão em estado crítico. Porém, os dados de exploração dos camarões podem ser ineficientes devido às dificuldades técnicas e operacionais de estabelecer um estudo estatístico mais eficiente sobre a distribuição e a captura destas espécies ao longo de suas áreas de ocorrência.

A redução desses estoques naturais pode conduzir à extinção de populações locais com potencial evolutivo único. Sendo assim, estudos genéticos que possibilitem a discriminação de estoques podem auxiliar na tomada de decisões para monitoramento da atividade pesqueira, contribuindo para conservação das espécies e, conseqüentemente, sustentabilidade da atividade exploratória (Borrell *et al.*, 2007; Meng 2009, Valles-Jimenez *et al.*, 2005; De Francisco *et al.*, 2008; D'incao *et al.*, 2002).

Inferências filogeográficas em espécies marinhas são citadas na literatura, porém, estudos são escassos quando se considera o grupo de camarões peneídeos do Oeste do Atlântico. Para estas espécies, mesmo quando se tem conhecimento sobre os seus locais de ocorrência, ainda não se sabe ao certo se suas populações possuem uma distribuição contínua e homogênea ao longo de toda sua área de ocorrência geográfica, se constituindo em populações únicas, ou se formam populações sub-estruturadas, geneticamente diferenciadas (De Francisco, 2008; Luvesuto, 2006; Pinheiro, 2008; Preto, 2009; Gusmão; Lazoski *et al.*, 2005).

Algumas ideias relativas aos conceitos de panmixia e metapopulação têm sido discutidas para o ambiente marinho. Segundo alguns autores, a ausência de barreiras geográficas nos oceanos e o grande poder de dispersão larval facilitariam a homogeneidade genética das populações oceânicas, as quais se apresentariam preferencialmente como populações panmíticas (Palumbi, 1994). Esta idéia, no entanto, tem sido contraposta por dados que comprovam a existência de estruturação populacional em espécies marinhas. A presença de correntes oceânicas e de diferenças no período de duração da larva pelágica, entre outros argumentos, tem sido usada, por exemplo, para explicar a diferenciação genética de populações em espécies marinhas (Rocha *et al.*, 2005).

Munoz *et al.* (2008), analisando sequências parciais do gene COI em *Artemia salina*, um pequeno crustáceo que ocorre em águas com grande concentração salina, encontraram grande nível de estruturação filogeográfica para esta espécie, apontando evidências de correlação direta entre a área de ocorrência e o dado de distância genética obtido para as populações analisadas. Neste trabalho, os autores relataram que quanto maior a distância geográfica separando as populações, maior são os valores de divergências genéticas observados entre elas.

Análises de DNA mitocondrial (mtDNA) em peixes de recifes de coral que apresentam estágios de larvais pelágicos, assim como os Penaeidae, mostraram, no entanto, que ao contrário do encontrado para *A. salina* por Munoz *et al.* (2008), existem diferenças genéticas significativas entre populações separadas por curtas distâncias, mas que habitam locais, no Mar do Caribe e parte do Oeste do Oceano Atlântico, com características ambientais diferentes (Rocha *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2008). Por sua vez, populações separadas por grandes distâncias, mas que habitam locais com características ambientais mais similares, podem apresentarm menor divergência genética (Rocha *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2008).

Em camarões peneídeos, estudos genéticos nos gêneros *Litopenaeus* e *Farfantepenaeus* já foram realizados, sendo encontrados para algumas espécies padrões diferenciados de estruturação ao longo da costa ocidental do Atlântico. McMillen-Jackson e Bert (2003) estudando a estrutura genética e os padrões de

dispersão das espécies *Farfantepenaeus aztecus* e *Litopenaeus setiferus*, da região de Chesapeake Bay, desde o Oeste dos Estados Unidos até o Texas no Mar do Caribe, com base em análises da região controle do mtDNA, encontraram padrões de diferenciação bem distintos para as duas espécies, sendo que para *L. setiferus* foi possível identificar a existência de duas linhagens divergentes, enquanto que para *F. aztecus* foi encontrada apenas uma população, indicando ausência de estruturação populacional desta espécie ao longo de toda a região estudada.

Em *Farfantepenaeus duorarum*, McMillen-Jackson e Bert (2004) também não conseguiram encontrar diferenciação entre populações da Carolina do Norte e do Sul do Texas (EUA). Os dados obtidos para a região controle mitocondrial indicaram apenas uma possível expansão populacional, sendo que fatores como alta dispersão e fluxo gênico contínuo poderiam ser os possíveis responsáveis pela homogeneidade dessas populações ao longo de sua área de distribuição.

Em *L. schmitti*, aspectos relacionados à estrutura genética de oito populações do litoral brasileiro foram investigados por Maggioni *et al.* (2003). Utilizando cerca de seis marcadores microssatélites, os autores encontraram uma significativa descontinuidade genética na região de Cabo Frio (RJ), considerada uma área de possível barreira biogeográfica. Gusmão *et al.* (2005), estudando sistemas aloenzimáticos nas espécies *F. paulensis*, *F. brasiliensis*, *Farfantepenaeus* sp. e *L. schmitti* encontraram diferenças entre pares de populações de *F. paulensis* e *Farfantepenaeus* sp. no litoral do Brasil, apontando a existência de diferentes estoques de *F. paulensis*, provavelmente, decorrente da dinâmica da espécie e seu ciclo de vida.

Além da sobreexploração dos estoques naturais, outra importante ameaça às populações nativas de camarões são os impactos advindos da eventual introdução de espécies exóticas no habitat natural, decorrente de escapes de fazendas que as cultivam. No Brasil, já se tem relatos da invasão de espécies exóticas como o camarão gigante *Penaeus monodon* e o camarão branco do Pacífico *L. vannamei* (Maggioni *et al.*, 2003). Em 2006, Barbieri e Melo realizaram um estudo sobre a ocorrência da espécie *L. vannamei* no estuário de Cananéia em Ilha Comprida (SP), sendo encontrados indivíduos dessa espécie em todas as localidades amostradas,

demonstrando claramente que esta já se encontra disseminada por todo o estuário. Os autores ainda ressaltam que a presença de *L. vannamei* no litoral brasileiro, além de aumentar a competição por habitat e alimento, pode introduzir patógenos exógenos e facilitar o surgimento de híbridos, comprometendo a viabilidade de espécies nativas e a manutenção do equilíbrio do ecossistema como um todo.

No caso específico de híbridos em peneídeos, apesar de ainda não se ter registros conclusivos sobre sua ocorrência na natureza, alguns estudos em laboratório, usando técnicas de inseminação artificial, já produziram com sucesso híbridos entre diferentes espécies de *Litopenaeus* (Bray *et al.*, 1990). Neste sentido, especial atenção deve ser dada às áreas de ocorrência da espécie nativa *L. schmitti*, a qual apresenta grande similaridade ecológica e morfológica com a espécie exótica *L. vannamei* (Paquotte *et al.*, 1998).

Estudos genéticos em camarões peneídeos vêm sendo conduzidos também com o intuito de esclarecer aspectos relacionados à taxonomia, às relações de proximidade genética entre estas espécies e a estrutura de suas populações. Como consequência desse conhecimento, esforços têm sido empenhados para questões conservacionistas, visando à identificação de unidades genéticas com potencial evolutivo único e o estabelecimento de dados que sirvam para o desenvolvimento de estratégias de manejo e preservação dos estoques naturais.

Frente a este cenário, e à intensa pressão que estas espécies vêm sofrendo em seus habitats, estudos que investiguem a estrutura genética e a distribuição de distintas espécies de populações de camarões peneídeos e suas relações, podem contribuir para o melhor entendimento do grupo e sua manutenção na natureza (Coelho e Santos, 1995; Maggioni *et al.*, 2003; Benzie, 2000; Luvesuto *et al.*, 2007). Desta forma, considerando o contexto aqui apresentando, o presente estudo baseou-se nas seguintes hipóteses de trabalho:

- Os camarões peneídeos não estão geneticamente estruturados em populações distintas ao longo da costa do Brasil, devido a quebras genéticas no fluxo

gênico, uma vez que não existem barreiras físicas que impeçam o fluxo genético, o que poderia levar à estruturação de suas populações.

- Devido à ampla distribuição das espécies de Penaeidae, espera-se encontrar diferenciação genética entre populações separadas por longas distâncias.
- Há evidências genéticas que corroboram a atual classificação taxonômica atribuída a algumas espécies de peneídeos.

Para responder as questões levantadas foram propostos os seguintes objetivos de trabalho:

### **OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a estrutura genética de distintas espécies de camarões marinhos pertencentes à família Penaeidae, com ênfase especial nas de ocorrência no litoral brasileiro, através da utilização de marcadores mitocondriais e nucleares, com o intuito de esclarecer aspectos relacionados à distribuição geográfica das espécies e populações estudadas, às relações genéticas entre elas e suas implicações conservacionistas.

### **Objetivos Específicos**

- Desenvolver oligonucleotídeos específicos, para quatro regiões mitocondriais de Penaeidae: gene Cytochrome Oxidase subunidade I (COI), gene

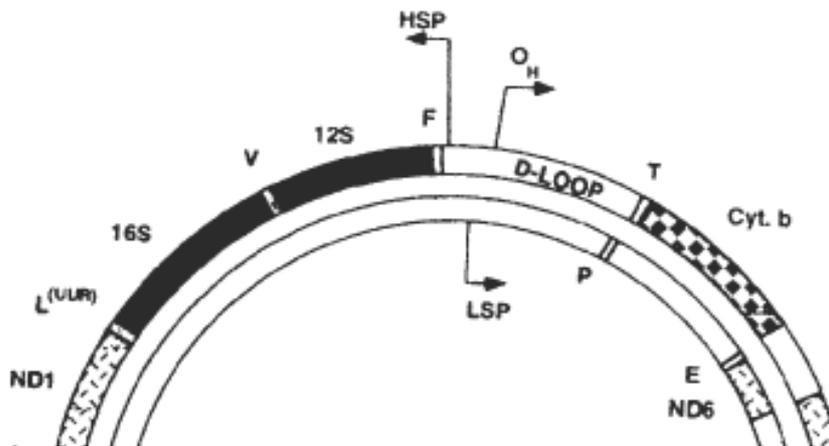
ribossomal 16S rRNA (16S), Cytochrome subunidade b (Cytb) e Região Controle da mitocôndria (Dloop).

- Testar a ferramenta DNA barcode para espécies da família Penaeidae encontradas no litoral brasileiro.
- Estimar os níveis de diversidade genética, e avaliar o padrão de distribuição, bem como os níveis de estruturação e divergência genética dentro e entre populações de espécies do gênero *Farfantepenaeus* (*F. brasiliensis*, *F. paulensis*, *F. subtilis*) e *X. kroyeri* nativos da costa brasileira ao longo de suas respectivas áreas de ocorrência, por meio da análise de marcadores mitocondriais.
- Avaliar os padrões filogeográficos das espécies do gênero *Farfantepenaeus* (*F. brasiliensis*, *F. paulensis*, *F. subtilis*) e *X. kroyeri*, investigando a existência de sinais genéticos geograficamente estruturados dentro e entre estas espécies, para inferir sobre aspectos relevantes relacionados aos processos históricos possivelmente responsáveis pela distribuição geográfica dessas espécies e de suas populações ao longo da costa brasileira.

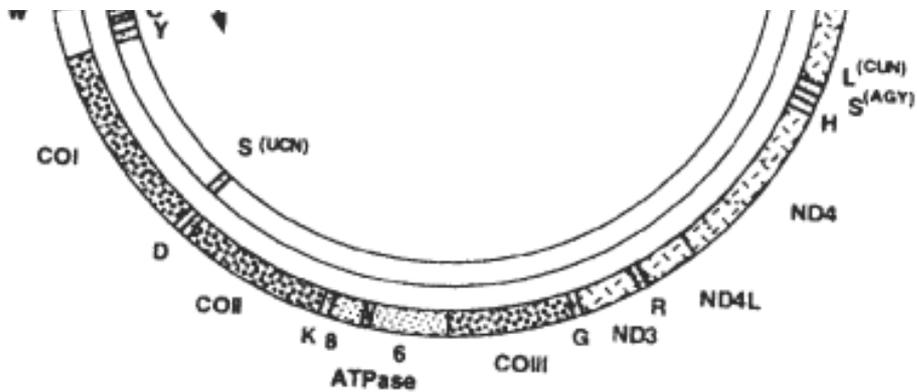
Para alcançar os objetivos propostos, diferentes metodologias foram utilizadas, com intuito de identificar as espécies estudadas através de métodos clássicos (análise taxonomica) e moleculares (DNA barcode), estabelecer a estrutura genética das mesmas e as relações genéticas intra e interespecíficas, avaliadas pela análise das regiões mitocondriais Dloop, Cytb, COI, 16S e nucleares, obtidas através do uso da tecnologia RAD-seq (*Restriction site Associated DNA markers sequencing*).

A seguir, a descrição da metodologia utilizada e dos resultados obtidos é apresentada na forma de capítulos, nos quais os dados obtidos são discutidos. Uma breve introdução abrangendo especificamente o tema desenvolvido nos respectivos capítulos também é apresentada para facilitar a compreensão dos mesmos e a elaboração do relativo manuscrito vinculado.

# Capítulo 1



Quando *numts* podem atrapalhar análises genéticas em Penaeidae?



## 1.1 INTRODUÇÃO

Polimorfismo de sequência de DNA tem sido amplamente utilizado para análises filogenéticas, filogeográficas e caracterização da estrutura genética de populações. O cloroplasto, no caso das plantas, e a mitocôndria, para os animais, ainda são os genomas mais utilizados para tais estudos. No caso do DNA mitocondrial (mtDNA), essa ampla utilização se deve a algumas características favoráveis que essa organela possui como herança materna, ausência de recombinação, alto polimorfismo, taxa evolutiva mais rápida quando comparada com o DNA nuclear, entre outras. Portanto, o mtDNA é uma boa escolha para ser usado em genética de populações e tem mostrado ser eficiente tanto para inferências na conservação quanto para monitoramento e melhoramento genético de espécies cativas (Vaseeharan *et al.*, 2013).

As vantagens do mtDNA já são bem conhecidas porém algumas desvantagens como a não neutralidade, heteroplasmia “*paternal leakage*” e taxas evolutivas variáveis são alvo de constantes estudos e revisões (Zhang e Godfrey, 1996,; Galtier *et al.*, 2009). Um dos maiores problemas, atualmente, muito discutido pela comunidade científica é a coamplificação de genes parálogos, chamados pseudogenes ou cópias nucleares do mtDNA (numts). A amplificação de genes mitocondriais a partir do DNA total pode levar a amplificação preferencial ou coamplificação de numts. Caso o numt não seja detectado, as análises realizadas podem conduzir a inferências errôneas, independente da abordagem (Bensasson *et al.*, 2001).

Song *et al.* (2008) atribui a amplificação desses pseudogenes à utilização de *primers* conservados, chamados de *primers* “universais” e diz que a presença de numts pode se constituir em um grande impedimento para as análises de DNA barcoding, por superestimar o número real de espécies avaliadas. O DNA barcode, primeiramente idealizado por Hebert *et al.* (2003a), é uma técnica que vem sendo difundida no meio científico que baseia-se na amplificação de genes mitocondriais para identificação de espécies, sendo comum o uso de *primers* universais para amplificar o gene Citocromo c

Oxidase subunidade I (COI), região mais amplamente utilizada para DNA barcode em animais, desde invertebrados a vertebrados.

Os ditos *primers* “universais” como, por exemplo, os desenvolvidos por Folmer *et al.* (1994) para o gene COI, Simon *et al.* (1994) e Palumbi *et al.* (2002) para vários genes mitocondriais (16SrRNA, COI, Dloop, entre outros), são construídos em regiões amplamente conservadas do genoma. Estes *primers* podem amplificar genes ou fragmentos de regiões mitocondriais de uma gama muito grande de táxons e são amplamente utilizados por pesquisadores devido à não necessidade de conhecimento prévio do genoma da espécie alvo. Porém, como consequência da possível amplificação de numts por tais *primers*, inferências errôneas podem inviezar os resultados obtidos para vários grupos taxonômicos, incluindo organismos de ambiente marinho, como em crustáceos, nos quais *primers* universais são amplamente utilizados, e a existência de numts, para diferentes genes mitocondriais, apresenta grande incidência (Schizas, 2012).

Mutações em genes não funcionais, como no caso dos numts, são acumuladas e toleradas Já em genes funcionais, incluindo mtDNA ortólogos, podem provocar má formação da proteína ou até mesmo sua disfunção ocorrendo, portanto, em uma menor taxa. Dessa forma, quando comparamos o gene mtDNA e um numt, eles podem ser altamente divergentes devido as diferentes taxas de mutação, resultando, por exemplo, na superestimação de espécies, construção de árvores filogenéticas com topologias equivocadas e caracterização de divergência genética populacional inexistente (Buhay, 2009).

Mesmo não sendo novidade a presença de numts em crustáceos, são raros os registros publicados em espécies de peneídeos. Atualmente existem 26 sequências identificadas como COI-Like, disponíveis no GenBank (acessado em setembro de 2014) para nove espécies de peneídeos (*Penaeus monodon* (1), *Farfantepenaeus subtilis* (4), *Fenneropenaeus indicus* (14), *Litopenaeus vannamei* (2), *Metapenaeus brevicornis* (1), *Metapenaeus dobsoni* (1), *Metapenaeus joyneri* (1), *Metapenaeus moyebi* (1), *Parapenaeopsis tenella* (1)), sendo que a maioria delas ainda não está publicada.

Apesar dos peneídeos serem o grupo de crustáceos mais explorados mundialmente, pouco se sabe sobre aspectos relacionados ao status taxonômico, filogenia, limites de distribuição, história filogeográfica e estrutura genética de suas espécies e populações (Waqairatu *et al.*, 2012; Bissaro *et al.*, 2012). Para que esses estudos sejam realizados de forma confiável é necessário, no entanto, o reconhecimento e registro de numts nas espécies estudadas para que inferências equivocadas, como a superestimação de espécies através da técnica de DNA Barcode, não sejam feitas.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver oligonucleotídeos específicos e avaliar a presença de numts para quatro regiões mitocondriais amplamente utilizadas em estudos de filogenia, filogeografia e de estruturação genética e populacional na família Penaeidae: gene COI, 16S rRNA (16S), Citocromo b (Cytb) e Região Controle da mitocôndria (Dloop). Além disso, análises comparativas entre os dados obtidos pela utilização de *primers* universais e *primers* específicos para amplificar o gene COI em 12 espécies da família Penaeidae foram também discutidas.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Sequências completas das regiões COI, Cytb, 16SrRNA e Dloop, disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), foram acessadas e alinhadas utilizando-se a ferramenta CLUSTAL W v.2 (Larkin *et al.*, 2007), implementada no software Geneious (Kearse *et al.*, 2012). Sequências conservadas nas regiões flangeadoras dos fragmentos de interesse, entre os gêneros e espécies, foram utilizadas para delineamento dos respectivos pares de *primers*.

Foram amostrados indivíduos de sete gêneros de camarões peneídeos nativos à costa brasileira no Oceano Atlântico, à costa Moçambicana no Oceano Índico e do

Oceano Pacífico (Tabela 1.1). Uma porção de músculo foi retirada e preservada em álcool 100% em tubos lacrados e mantidos a -4°C. Um pequeno pedaço de tecido foi submetido à extração de DNA, seguindo o protocolo fenol/clorofórmio/álcool isoamílico proposto por Sambrook *et al.* (1989). O DNA foi checado quanto à qualidade, em gel de agarose 0,8%, quantificado em biofotômetro, aliquotado a 50ng/uL e armazenado a -20°C.

A caracterização morfológica das espécies foi feita pelas pesquisadoras Jaqueline Gusmão e Carolina Tavares da UERJ (Rio de Janeiro, RJ), segundo classificação proposta por Pérez-Farfante e Kensley (1997). A espécie críptica à *X. kroyeri* foi nomeada *Xiphopenaeus kroyeri* II (Gusmão *et al.*, 2006) e as duas linhagens de *F. subtilis* distinguíveis morfológicamente foram nomeadas *Farfantepeneaeus subtilis* morfotipo I e *Farfantepeneaeus subtilis* morfotipo II (Gusmão *et al.*, 2000).

Os novos *primers* foram testados nas amostras de DNA das 15 espécies de peneídeos coletados (Tabela 1.1). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em termocicladores Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems), usando 5ng DNA, 0,5u Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen), 1x buffer, 0,25mM de cada dNTP, 2,0mM a 4,0mM MgCl<sub>2</sub> e 0,2μM a 0,3μM de cada primer (estas concentrações variaram dependendo do primer e espécie utilizados).

Os ciclos de amplificação variaram dependendo da combinação de *primers* utilizada. Para a amplificação parcial dos genes COI e Cytb, assim como o Dloop, foi feita uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 50 segundos a 94°C, 1 minuto e 20 segundos a T°C (Tabela 3, em resultados e discussão), 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 20 minutos a 72°C. O gene 16S rRNA foi amplificado com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C, 45 segundos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

**Tabela 1.1:** espécies amostradas e locais de origem.

<b>Espécies</b>	<b>Área de Ocorrência</b>
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Farfantepenaeus subtilis MI</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Farfantepenaeus subtilis MII</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Xiphopenaeus kroyeri I</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Xiphopenaeus kroyeri II</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Litopenaeus schmitti</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Rimapenaeus constrictus</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Oceano Pacífico
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Oceano Índico
<i>Penaeus monodon</i>	Oceano Índico
<i>Feneropenaeus indicus</i>	Oceano Índico
<i>Metapenaeus monoceros</i>	Oceano Índico
<i>Metapenaeus stebinggi</i>	Oceano Índico
<i>Melicertus latisulcatus</i>	Oceano Índico

Para verificar a eficiência do primer universal LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) para amplificação da região COI em peneídeos, foram feitas PCRs em 12 espécies da família Penaeidae (Tabela 1.2), em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied biosystems), como descrito pelos autores. A amplificação foi feita em um mínimo de três e máximo de 20 indivíduos de cada espécie. A enzima Taq Platinum (Invitrogen), de alta fidelidade, foi utilizada visando-se otimizar a reação de amplificação.

Os produtos amplificados, tanto pelo uso dos novos *primers* quanto do primer universal, foram purificados utilizando protocolo de PEG 800 a 20% (Lis e Schleif 1975) e sequenciados em sequenciador 3730XL em sentido *Forward*. A qualidade dos cromatogramas foi analisada de acordo com o valor da porcentagem de “High Quality (HQ%)”, fornecido pelo software Geneious v6.1.7 (Kearse *et al.*, 2012), e alinhados utilizando o algoritmo Clustal W v.2 (Larkin *et al.*, 2007) implementado também no Geneious. Cromatogramas que apresentaram baixa porcentagem de qualidade (HQ<50%) foram descartados das análises antes mesmo da edição e alinhamento das mesmas. O frame de leitura dos genes foi estabelecido usando-se a ferramenta Open Reading Frame Finder (ORF finder), disponível em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>. A tradução das sequências e o alinhamento foram feitos no *software* Geneious. A presença de inserção, deleção, gaps e *stop* códons foram analisados a partir do alinhamento das sequências de nucleotídeos e sequências de aminoácidos.

**Tabela 1.2:** Espécies utilizadas na amplificação do gene COI com o primer universal LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al.* 1994) .

<b>Espécies</b>	<b>origem</b>
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Farfantepenaeus subtilis MI</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Farfantepenaeus subtilis MII</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Xiphopenaeus kroyeri I</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Xiphopenaeus kroyeri II</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Litopenaeus schmitti</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Oceano Pacífico
<i>Rimapenaeus constrictus</i>	Oceano Atlântico Sul
<i>Penaeus monodon</i>	Oceano Indico
<i>Feneropenaeus indicus</i>	Oceano Indico

Cinco amostras das espécies de *X. kroyeri* e *F. subtilis* morfotipo II, que apresentaram in/dels e *stop* códons quando amplificadas com o par de primer universal, foram utilizadas em reações de amplificação usando-se o par de *primers* COIPenF2/COIPenR1, delineado no presente trabalho. As distâncias intraespecíficas, segundo modelo Kimura-2-Parameter, e as árvores de *Neighbor-joining* foram estabelecidas no *software* Mega v6 (Tamura *et al.*, 2013), para os diferentes conjuntos de sequências de COI obtidos com o par de primer universal e específico. Os resultados foram comparados entre si.

### 1.3 RESULTADOS

Para a região Dloop foram desenvolvidos dois pares de *primers*, sendo o par DloopFarF1/DloopFarR1 útil para o gênero *Farfantepenaeus*, e o outro par DloopPenF2/DloopPenR2 útil para as 15 espécies. Os fragmentos com tamanhos próximos à 900pb foram obtidos em ambos os casos. Para a região COI foram desenhados três *primers* que foram combinados em dois diferentes pares. O par COIFarF1/COIPenR1 amplificou fragmentos de alta qualidade com cerca de 900pb nas espécies do gênero *Farfantepenaeus*. O par COIPenF2/COIPenR1 apresentou amplificação satisfatória para as 15 espécies de Penaeidae, amplificando fragmentos de aproximadamente 1000pb (Tabela 1.3). A região 16SrRNA foi amplificada com o par 16SPenF1/16SPenR1, o qual gerou um fragmento de cerca de 350pb em todas as 16 espécies testadas. A análise dos cromatogramas não evidenciou bandas inespecíficas ou picos duplos para nenhum destes *primers* testados. Os alinhamentos obtidos apresentaram alta qualidade sem a presença de in/dels, gaps ou *stop* códons.

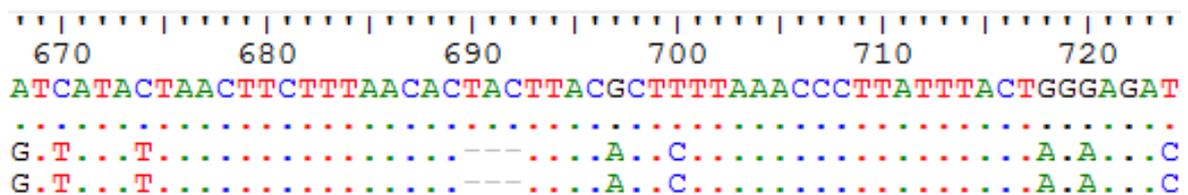
Para a amplificação do fragmento do gene *Cytb* foi desenvolvido o par de primer *CytbPenF1/CytbPenR1* (Tabela 1.3) que amplificou aproximadamente 750pb em todas espécies, com exceção da espécie *Melicertus latisulcatus*. Na espécie críptica *X. kroyeri* II foi observada uma deleção de três nucleotídeos (Figura 1.1), que após tradução resultou na deleção de um aminoácido, além da presença de um *stop codon* anterior ao término normal da cadeia da proteína. Um segundo primer *forward* foi construído para amplificação do gene *Cytb* (*CytbPenF2*) *up stream* ao primer anteriormente desenhado. Sua utilização juntamente com o primer reverse, anteriormente desenhado (*CytbPenF2/CytbPenR1*), amplificou um fragmento de aproximadamente 1200pb em todas as 16 espécies. As sequências obtidas para a espécie *X. kroyeri* II não apresentaram deleção nem *stop codon* (Figura 1.1). As sequências obtidas para as demais espécies foram idênticas às amplificadas utilizando-se o primeiro par de *primers* testado (*CytbPenF1/CytbPenR1*).

Todas as sequências produzidas serão disponibilizadas no GenBank com as devidas identificações de numt quando necessário.

**Tabela 1.3:** Listagem dos pares de primer, genes de amplificados, nome dos *primers*, temperatura e o táxon que cada par de primer amplifica.

Loci	Primer	Sequence 5'-3'	T°C	Taxa
COI	COIFarF1	CCA ATT ATG ATT GGA GGA TTT GGT AA	51°C	<i>Farfantepenaeus</i>
	COIPenR1	ATA CCA AAT ACR GCT CCY ATT GA		
COI	COIPenF2	AGA TTT ACA GTC TAT CGC CTA	51°C	Penaeidae
	COIPenR1	ATA CCA AAT ACR GCT CCY ATT GA		
DLoop	DloopFarF1	AAG AAC MAG CTA GGA TAA AAC TT	58°C	<i>Farfantepenaeus</i>
	DloopFarR1	ATC CTT TTT CAG GCA CTT CAT T		
DLoop	DloopPenF2	CCT AAA ADT GAA AGA AYA AGC YAG G	51°C	Penaeidae
	DloopPenR2	TAC CCT ATC AAG ATA ATC C		
Cytb	CytbPenF1	GTA YTA CCY TGA GGA CAA ATA TC	51°C	Penaeidae
	CytbR1	AAA CAC GTG CTT TCC TAT CAG CCA A		
16S	16SPenF1	TGA CCG TGC GAA GGT AGC ATA	62°C	Penaeidae
	16SPenR1	AAT TCA ACA TCG AGG TCG CAA		
Cytb	CytbPenF2	TTG GTC CTY TMC GHY TAT CMT C	51°C	Penaeidae
	CytbR1	AAA CAC GTG CTT TCC TAT CAG CCA A		

**Figura 1.1:** Alinhamento das sequências do gene Cytb da espécie críptica *Xiphopenaeus kroyeri* II, sendo as quatro sequências pertencem ao mesmo indivíduo. As duas primeiras sendo as sequências *forward* e *reverse* amplificadas com o *primer* Cytb F2R1 e as duas últimas sequências *forward* e *reverse* amplificado com o *primer* Cytb F1R1 que amplificou um *numt*, em destaque a deleção de um *codon*.



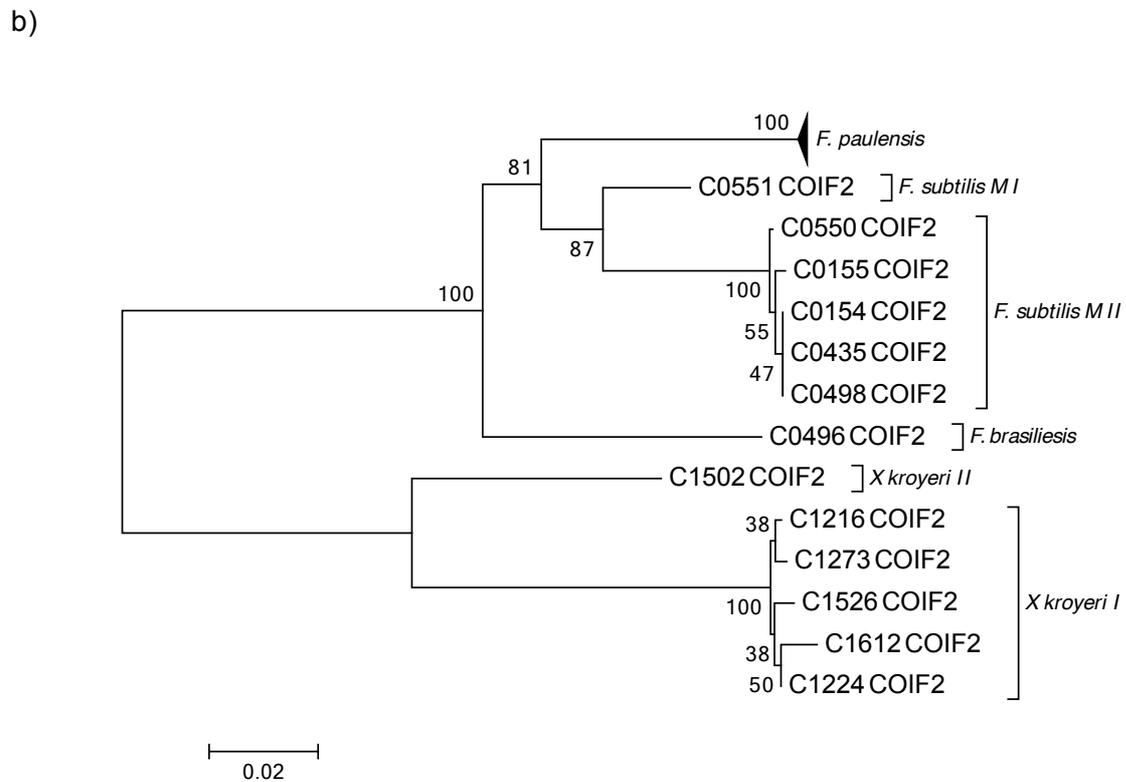
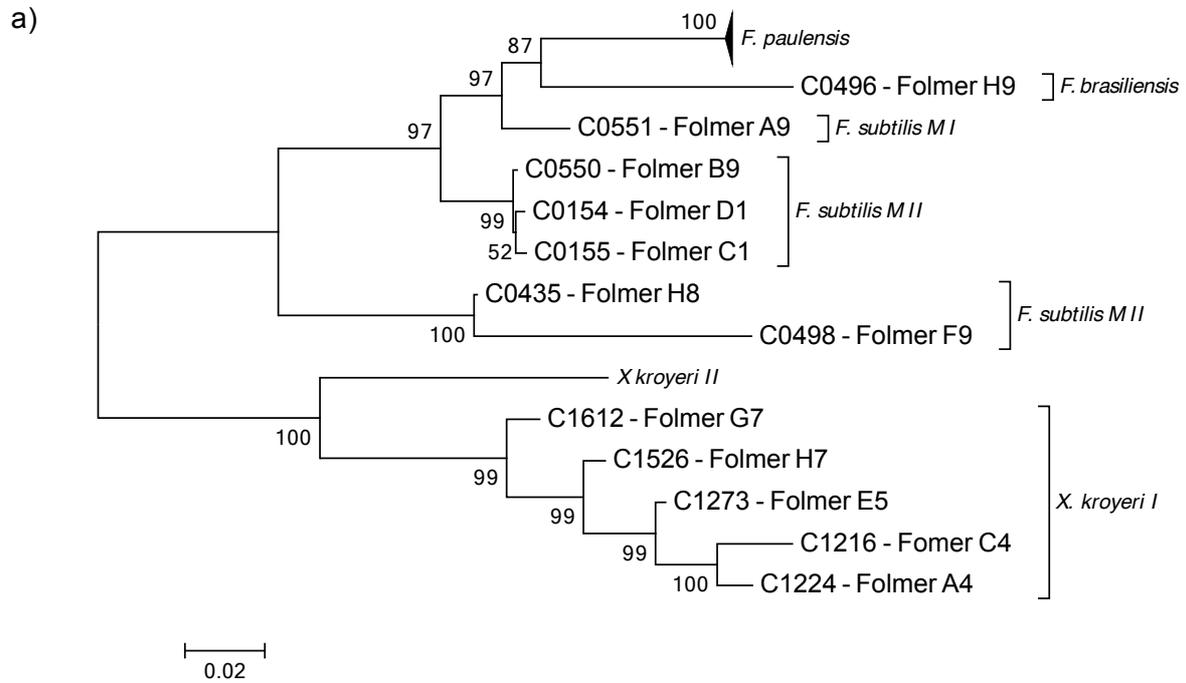
Os *primers* universais não foram eficientes para amplificação do gene COI nas espécies aqui avaliadas, devido a fatores como: 1) ausência de amplificação; 2) difícil padronização; 3) co-amplificação de bandas inespecíficas; 4) presença de múltiplos picos e/ou sequências com baixa qualidade e 5) possível presença de numts.

Das 12 espécies que foram testadas com o par de primer universal, nove apresentaram amplificação positiva em pelo menos um indivíduo (Tabela 1.2). Foram obtidas ao todo 73 sequências, sendo que 20 delas apresentaram baixa qualidade, inclusive a única amplificação obtida para a espécie de *Rimapenaeus constrictus*, a qual apresentou uma sequência com HQ = 0.0% devido à existência de múltiplos picos. Todas as sequências de baixa qualidade (%HQ<50%) foram excluídas das análises. As demais 53 sequências foram editadas, resultando em fragmentos com cerca de 629pb para as espécies: [*Fenneropenaeus indicus* (1), *Penaeus monodon* (2), *Farfantepenaeus paulensis* (19), *Farfantepenaeus brasiliensis* (2) *Farfantepenaeus subtilis* morfotipo I (1), *Farfantepenaeus subtilis* morfotipo II (10), *Xiphopenaeus kroyeri* I (17), *Xiphopenaeus kroyeri* II (1)].

O alinhamento das sequências com alta qualidade evidenciou que 21 sequências COI (~39%) apresentaram inserções e/ou deleções nas espécies *X. kroyeri* I e *F. subtilis* morfotipo II. A tradução dos fragmentos resultou em 209 aminoácidos, porém, todas as 21 sequências apresentaram *stop codons*. Os mesmos indivíduos de *X. Kroyeri* I e *F. subtilis* morfotipo II, no entanto, quando amplificados com o par de primer específico COIPenF2/COIPenR, não evidenciaram in/dels ou *stop codons*.

O valor de distância intraespecífica média entre as cinco sequências de *X. kroyeri* I amplificadas com os *primers* universais LCO1490/HCO2198 foi de 4,66% (com mínimo de 3,0% e máximo de 8,2%). Este valor abaixou para 0,67% (com mínimo de 0,3% e máximo de 1,1%) quando utilizou-se as sequências amplificadas com o par COIPenF2/COIPenR. Para a espécie *F. subtilis* morfotipo II, a distância intraespecífica média com o par de *primers* universal foi de 7,63% (mínima de 0,3% e máxima de 14,9%), enquanto que o valor obtido para os mesmos indivíduos amplificados com o par COIPenF2/COIPenR foi de 0,19% (mínimo de 0,0% e máximo de 0,5%). As árvores de *Neighbor Joining* (Figura 1.2) demonstraram diferentes topologias para os alinhamentos realizados com as sequências obtidas com os diferentes pares de *primers* utilizados neste trabalho.

**Figura 1.2:** Árvore *Neighbor Joining K2P* do gene COI de espécies de Penaeidae amplificadas com diferentes pares de *primers*, mostrando diferentes topologias devido a presença de Numts. a) utilizando *primers* “universais” LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994); b) utilizando os *primers* COIPenF2/COIPenR (aqui desenvolvidos).



## 1.4 DISCUSSÃO

Os *primers* desenvolvidos neste trabalho para amplificar as regiões mitocondriais 16SrRNA, Dloop, Cytb e COI se mostraram úteis para a amplificar o genoma de diferentes espécies de peneídeos e evitar amplificações parálogas. A amplificação de um possível pseudogene do gene Cytb na espécie *X. kroyeri* II, utilizando o par de primer CytbPenP1/CytbPenR1, demonstra, no entanto, que a utilização de *primers* mais específicos não necessariamente impede a amplificação de numts e que atenção especial deve ser dada na análise de sequências mitocondriais, seja pelo uso de *primers* universais ou *primers* de espécies mais relacionadas.

Em crustáceos, Nguyen *et al.* (2002) já haviam descrito a presença de pseudogene na espécie de camarão *Cherax destructor*, para o gene Cytb, amplificado a partir de sequências de *primers* obtidos para espécies muito distantes da espécie alvo. Em peneídeos, no entanto, a presença de pseudogene ainda não havia sido relatada para Cytb. A descoberta de numts pode ser importante para estudos que procuram compreender mecanismos envolvendo a história evolutiva das espécies. Entretanto, muito pouco ainda é conhecido para a maioria dos taxons. Em humanos, estudos revelaram a presença de 12 loci contendo numts, sendo que alguns destes possuem polimorfismos população-específicos além de serem reconhecidos como causadores de cinco doenças genéticas (Bensasson *et al.*, 2001; Hazkani-Covo *et al.*, 2010).

No presente trabalho, os dados obtidos demonstraram que mesmo para *primers* desenhados especificamente para um grupo de interesse, a amplificação paráloga pode ocorrer. Além disso, numts podem ser espécie-específicos ou até mesmo restritos a uma população. Dessa forma, utilizar um primer mais específico para a espécie a ser estudada consiste apenas em um primeiro passo para evitar a amplificação de numts, mas não exclui a necessidade de análises mais detalhadas, como a verificação de picos duplos, in/del e *stop codons*.

A presença de *stop codons* antes do término da cadeia da proteína, sugerindo a presença de um possível numt para o gene COI foi observada nas sequências amplificadas espécies de Penaeidae *F. subtilis* e *X. kroyeri* usando *primers* universais.

Entretanto, a utilização do par de *primers* específicos aqui desenvolvidos, produziu sequências de altíssima qualidade, demonstrando que em alguns casos oligos universais devem ser evitados. No presente estudo, diferenças significativas entre os valores encontrados para as distâncias intraespecíficas e as topologias das árvores de *Neighbor Joining* (Figura 1.2) obtidas para conjuntos de amostras amplificadas com *primers* universais e específicos foram encontradas.

A árvore NJ obtida para as sequências amplificadas com o primer universal (Figura 1.2a) mostrou uma topologia diferente na relação entre as espécies do gênero *Farfantepenaeus*, na qual a espécie *F. brasiliensis* foi retirada da base desse grupo. Além disso, a espécie *F. subtilis* morfotipo II foi dividida em dois clados distantes. Esses falsos resultados poderiam nos levar a assumir a existência de uma terceira linhagem da espécie *F. subtilis*.

Um estudo realizado em quatro espécies de *crayfish* do gênero *Orconectes*, analisando o gene COI obtido a partir da utilização de um par de *primers* universais, evidenciou uma alta porcentagem de numts, de 17% a 77% dependendo da espécie. Se a abordagem de DNA barcoding fosse empregada nesse estudo, sem o conhecimento da coamplificação desses numts, o número de espécies existentes seria superestimado, resultando em 25 espécies ao invés das apenas quatro espécies reconhecidas (Song *et al.*, 2008). Outros trabalhos também têm encontrado evidências de numts em outras famílias de crustáceos que utilizaram esse mesmo par de *primers* universais, como, por exemplo, para as espécies *Orconectes barri* da família *Cambaridae* (Buhay e Crandall, 2008) e *Austinograea alayseae* da família *Bythograeidae* (Kim *et al.*, 2013). Williams e Knowlton (2001) encontraram pseudogenes em 10 espécies de camarões do gênero *Alpheus* (*Alpheidae*), sugerindo 21 transferências independentes de regiões do mtDNA para o genoma nuclear. Indivíduos da espécie *Cancer irroratus* da família *Cancriidae* apresentaram dois ou mais fragmentos do gene COI, sendo sua presença atribuída à amplificação de numts (Gíslason *et al.*, 2013).

Alguns autores vêm apontando inferências errôneas devido a presença de numts (Buhay, 2009), evitando *primers* universais desenvolvendo *primers* específicos (Prosser *et al.*, 2013) e identificando pseudogenes em grupos de interesse (Gíslason

*et al.*, 2013; Khamnamtong *et al.*, 2009) o que mostra uma grande preocupação do meio científico em relação aos pseudogenes em crustáceos. Apesar disso, para a família Penaeidae, grande parte dos estudos de mtDNA ainda utiliza *primers* que foram desenvolvidos para outros organismos que não a espécie de interesse (Maggioni *et al.*, 2001; Lavery *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2011). A falta de conhecimento do genoma da família e/ou da espécie alvo, o custo e tempo despendido para o delineamento e validação de *primers* específicos talvez sejam os motivos da ampla utilização de *primers* universais por pesquisadores para este grupo de camarões. Entretanto, como já salientado, a existência de numts e o seu não conhecimento, pode inviezar os dados obtidos, propiciando interpretações equivocadas. Há que se destacar ainda que embora alguns pseudogenes sejam não funcionais, evidenciando a presença de *stop codons* ou trocas no *frame* de leitura, outros se apresentam idênticos quanto ao comprimento do fragmento e ausência de *stop codons*, diferindo dos genes por apenas um ou poucos pares de base. Essas características dificultam a identificação de pseudogenes, os quais em alguns casos podem ser preferencialmente amplificados (Williams e Knowlton 2001; Bertheau *et al.*, 2011).

No presente trabalho, um conjunto de *primers* específicos foi desenvolvido para amplificar as regiões DLoop, COI, 16S e Cytb. A análise das sequências obtidas demonstra a eficiência do uso desses *primers* para o estudo do genoma mitocondrial em diferentes espécies de camarões peneídeos, contribuindo para o avanço dos estudos genéticos que consideram o uso de regiões mitocondriais para abordagens de filogeografia, filogenia, DNA barcoding e evolução dos genoma neste grupo animal.

# Capítulo 2

**DNA Barcode: Identificando e ampliando a  
distribuição de camarões Penaeidae  
(Crustacea:Decapoda).**



## 2.1 INTRODUÇÃO

A identificação das espécies é um passo importante para inúmeros estudos biológicos e é fundamental na elaboração e execução de programas que visam estimar e proteger a biodiversidade. O trabalho de identificar e descrever espécies é um trabalho, quase que exclusivamente, dos taxonomistas, que devido a grande biodiversidade mundial têm tido dificuldades para identificar a ampla variedade de espécies e atender à crescente demanda de inúmeros pesquisadores das diferentes áreas de estudos (Frézal e Leblois, 2008; Azeredo, 2005).

A plasticidade fenotípica e a variabilidade genética encontradas nos caracteres usados na identificação de espécies, táxons crípticos, além da ausência de caracteres diagnósticos, consistem nas maiores dificuldades observadas por taxonomistas que utilizam a análise de características morfológicas (Azeredo, 2005). Da mesma forma, a utilização de chaves de identificação por pesquisador não taxonomista, em geral costuma demandar auxílio de um especialista para tornar precisa a identificação de uma determinada espécie (Waugh, 2007).

Um sistema alternativo, proposto por alguns pesquisadores a partir da década de 90, para a classificação sistemática tradicional foi utilizar sistemas de identificação molecular baseados na amplificação de trechos do genoma (Frézal e Leblois, 2008). Em 2003, foi iniciado o projeto *Barcode of Life* com o objetivo de criar um sistema de identificação molecular universal, rápido, barato e acessível, capaz não só de identificar espécies, mas também de auxiliar na descoberta de novas espécies, principalmente aquelas crípticas e/ou de morfologia complexa. Dessa forma, iniciou-se uma corrida para o desenvolvimento de DNA barcode para espécies de todo o planeta, esses DNA barcodes ou Código de Barras do DNA são sequências exclusivas de DNA para cada espécie, que se vem para caracterizar molecularmente uma espécie e diferenciá-la das demais (Frézal e Leblois, 2008).

Para que uma sequência seja caracterizada como um DNA *barcode* é necessário que esta seja facilmente isolada, e que apresente poucas inserções e deleções e taxa de mutação adequada para observar divergência entre espécies, mas não grandes variações intra-específicas (Waugh, 2007). O DNA mitocondrial (mtDNA) por possuir maior taxa de mutação que o nuclear, é mais apropriado para gerar barcodes que o DNA nuclear. Além disso, ele consiste em uma relevante fonte de material genético, devido ao grande número de mitocôndrias presente em cada célula, o que se torna importante quando a quantidade de tecido disponível é limitada.

A tecnologia do DNA barcode, se corretamente implementada, pode servir para identificação taxonômica precisa, contribuindo para diversas áreas do conhecimento. Devido seu relativo baixo custo, praticidade e eficiência, o barcoding pode ser particularmente útil em projetos científicos que envolvam a identificação de um grande número de amostras, incluindo estudos que tenham como objetivo a detecção de organismos patogênicos, ou de importância farmacêutica, ecológica, agrônômica ou industrial.

O gene mitocondrial mais comumente utilizado para identificação de DNA barcode em diversos grupos de espécies é o COI, que codifica a subunidade catalítica da proteína transmembrana Citocromo C Oxidase. O *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) selecionou um segmento de 648pb do gene COI, na posição 58 a 705, para ser utilizado em estudos de DNA barcoding. Esta região se mostrou apropriada para uma grande diversidade de táxons, incluindo nematóides e mosquitos (Floyd *et al.*, 2002; Besansky *et al.*, 2003), peixes (Ward *et al.*, 2005), pássaros (Kerr *et al.*, 2007), borboletas (Hajibabaei *et al.*, 2006), efemerópteros (Ball *et al.*, 2005), aranhas (Greenstone *et al.*, 2005), crustáceos (Costa *et al.*, 2007).

O conhecimento da biodiversidade marinha tem sido alvo de muitos estudos que buscam a compreensão de aspectos diversos relacionados à vida neste importante ecossistema. Dentro desta abordagem, estudos de DNA barcoding têm sido realizados em diferentes organismos oceânicos com o objetivo de facilitar a identificação de espécies e o estudo de suas populações, tanto no que diz respeito ao levantamento da diversidade molecular de espécies taxonomicamente reconhecidas quanto da

biodiversidade oculta. No grupo dos camarões peneídeos, a caracterização morfológica de algumas espécies tem sido insistentemente reavaliada devido à discordância de alguns autores para caracteres utilizados como parâmetros. Neste sentido, a caracterização e comparação de sequências de DNA específicas pode auxiliar na classificação desses organismos, contribuindo de forma efetiva para os estudos de biodiversidade e filogenia deste importante grupo animal.

Embora a utilização do COI como barcode já tenha se mostrado satisfatória para alguns grupos de crustáceos (Costa *et al.*, 2007; Radulovici *et al.*, 2009), não existem estudos utilizando a metodologia analítica proposta para o DNA barcode publicados para camarões marinhos da família Penaeidae. A família Penaeidae, em especial, apresenta grande importância econômica como fonte de recursos para pescaria e aquicultura em regiões tropicais e subtropicais, respondendo por mais de 90% das espécies cultivadas em todo o mundo (Baldwin *et al.*, 1998; Chu *et al.*, 2003; Maggioni *et al.*, 2001).

Os camarões da família Penaeidae, divididos atualmente em 33 gêneros e 216 espécies (Pérez Farfante e Kensley, 1997; Sakai e Shinomiya, 2011; Fransen e De Grave, 2009), podem ser encontrados em todos os oceanos (Dall, 1990). Na costa brasileira, a maioria dos indivíduos encontrados pertence aos gêneros *Farfantepenaeus*, *Xiphopenaeus* e *Litopenaeus*, que são economicamente mais representativos, embora, espécies de outros gêneros também possam ser encontradas (Costa *et al.*, 2003; Tavares, 2002.; Silva *et al.*, 1998).

Assim, considerando a importância dos camarões peneídeos, tanto econômico-social quanto ambiental, e a relevância que a abordagem do DNA barcode apresenta para este grupo, o objetivo desse trabalho consiste em testar a ferramenta DNA barcode para espécies da família Penaeidae encontradas no litoral brasileiro, identificar novos barcodes e quando possível inferir sobre a distribuição dessas espécies.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

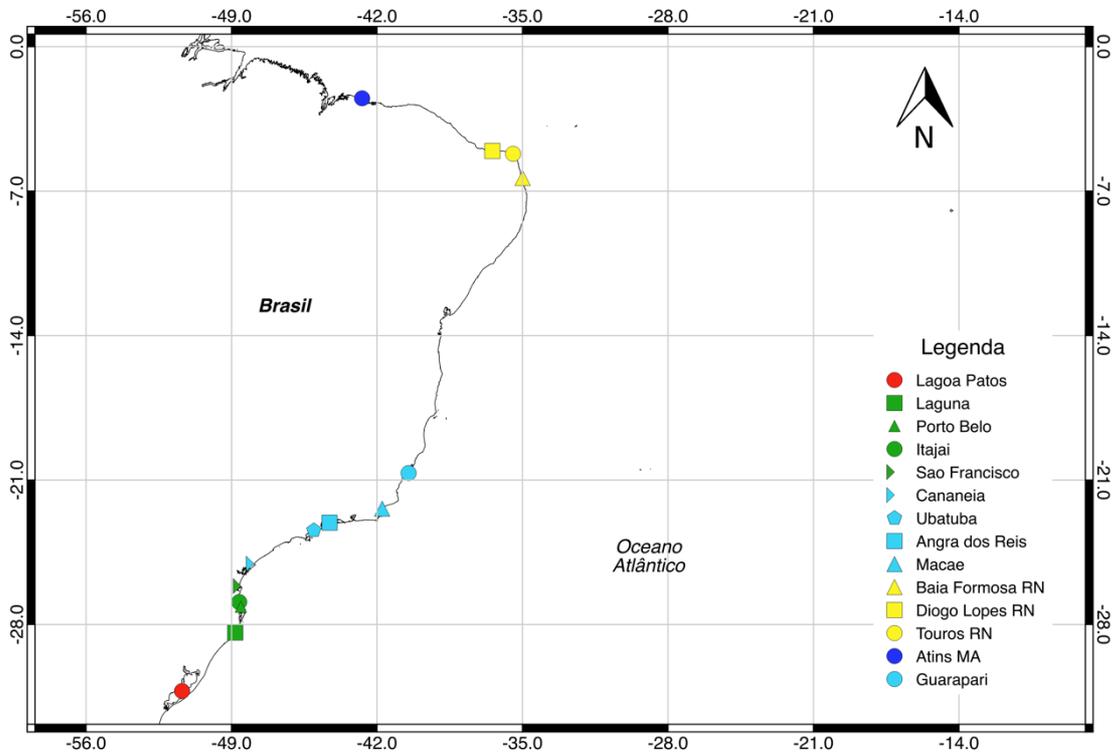
Coletas foram realizadas em 14 locais no oeste do Oceano Atlântico Sul, ao longo da costa brasileira (Figura 2.1), sendo amostrados 104 espécimes de camarões peneídeos. Os indivíduos foram identificados morfológicamente de acordo com Pérez-Farfante e Kensley (1997). Uma porção do músculo caudal foi retirada e preservada em tubo individual contendo etanol 100% a -20°C até a extração do DNA. Os espécimes foram devidamente etiquetados e armazenados em etanol 80%. As amostras foram submetidas à extração de DNA total, realizada de acordo com o protocolo fenol/Clorofórmio proposto por Sambrook *et al.* (1989).

Para a amplificação parcial do gene mitocondrial COI, foram usados primers para a primeira porção do gene COIPenF2 (3'-AGATTTACAGTCTATCGCCTA-5) e COIPenR (3'- ATACCAAATACRGCTCCYATTGA-5'). As amplificações foram feitas com desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 50 segundos a 94°C, 1 minuto e 20 segundos a 51°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 20 minutos a 72°C. As reação de amplificação continham 3µL de amostra de DNA a 50ng, 1x PCR reaction buffer, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP, 0,3µM de cada primer, 0,5 unidade de Taq Polymerase (Platinum Invitrogen) e ddH<sub>2</sub>O para um volume total de 30 µL.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando solução de Polietileno Glicol 8000 20% (Lis; Schleif, 1975) e os fragmentos foram sequenciados na direção *forward* em sequenciador de capilar Applied Biosystems 3730XL (Macrogen Inc. Korea). As sequências de todas as espécies foram submetidas à BLASTn no National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para certificação da amplificação do gene COI. As sequências foram alinhadas usando-se o algoritmo Clustal W v.2 (Larkin *et al.*, 2007), disponível no software Geneious v6.1.7 (Kearse *et al.*, 2012). Este software também foi utilizado para avaliar a e aa qualidade Phred dos cromatogramas, editar e traduzir as sequências para verificar a ausência de

stop codons antes do término normal da proteína e descartar a possibilidade de amplificação paráloga. Árvores de *Neighbor Joining* (NJ) foram construídas a partir dos valores de distâncias, utilizando-se o modelo de Kimura-2-parâmetros (K-2P), disponível no *software* MEGA v.6 (Tamura *et al.*, 2013). Análises para estimar o *Barcode Gap* e o número de OTUs (*Operational Taxonomic Units*) para as espécies avaliadas foram realizadas usando-se a *interface web* do ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery* - Puillandre *et al.*, 2012) e valor de default para largura do gap ( $X=1,5$ ).

**Figura 2.1:** Locais onde foram amostrados os espécimes de camarões peneídeos.



As sequências foram analisadas no site BOLD System (<http://www.boldsystems.org>), utilizando a ferramenta BOLD *Identification System* (IDS) com a opção *Species Level Barcode Records* (Ratnasingham;Hebert, 2007). O IDS emprega uma busca linear para encontrar os vizinhos mais próximos de um

alinhamento global entre todas sequências referências. O IDS considera uma identificação à nível de espécie quando uma sequência possui menos que 1% de divergência da sequência de referência e a nível de gênero até 3% de divergência (Ratnasingham e Hebert, 2007). Gráficos de quadrantes foram compostos com as máximas distâncias intraespecíficas versus as mínimas distâncias interespecíficas (Hebert *et al.*, 2004) utilizando valor de *threshold* de 3%. Além das sequências obtidas para as amostras aqui coletadas, 467 sequências de 16 espécies de peneídeos não amostradas foram acessadas nas bases de dados do GenBank e BOLD System e submetidas às análises de agrupamento para identificação de espécie.

## 2.3 RESULTADOS

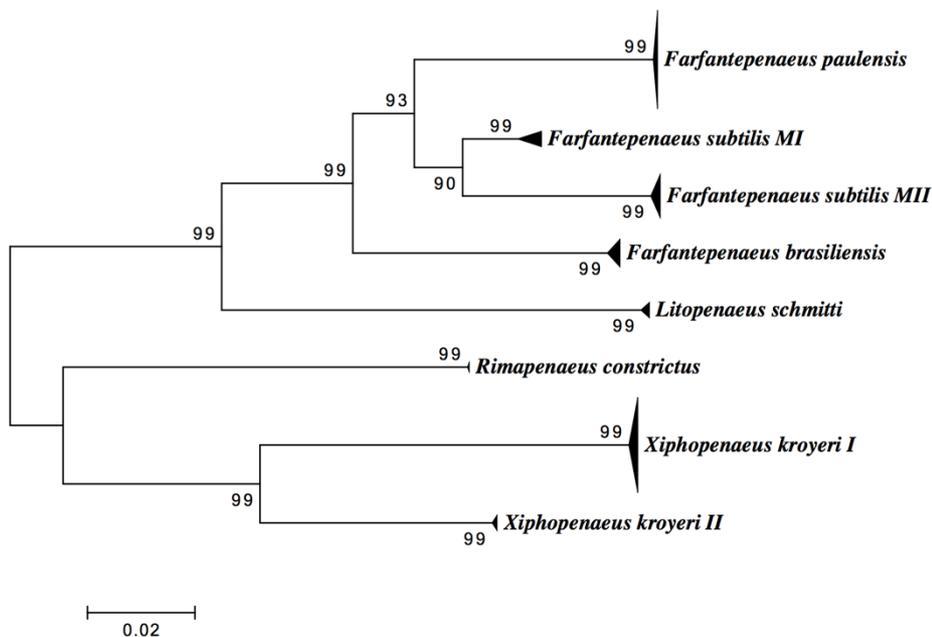
Neste trabalho, foram analisadas 571 sequências do gene COI, 467 sequências acessadas do Genbank e BOLD System e 104 sequências amplificadas para as espécies *F. subtilis*, *F. paulensis*, *F. brasiliensis*, *X. kroyeri*, *L. schmitti* e *R. constrictus*. Após edição das 104 sequências, foram obtidos fragmentos de alta qualidade contendo 829 pb do gene COI. A análise das sequências confirmou a amplificação do gene de interesse e a ausência de inserções, deleções e *stop* códons, descartando-se a possibilidade de amplificação de numts ou coamplificação paráloga. Todas as sequências obtidas estão sendo depositadas na base de dados do Bold System. Os espécimes, amostras de tecidos e de DNA estão disponíveis no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, SP). Os vouchers serão depositados na coleção carcinológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

A árvore de *Neighbor Joining* estabelecida para as sequências amplificadas (Figura 2.2), evidenciou oito clados bem definidos com altos valores de bootstrap para todos eles. As espécies *L. schmitti*, *F. paulensis*, *F. brasiliensis* e *R. constrictus* apresentaram cada uma apenas um clado bem definido, com médias intraespecíficas

de 0.16%, 0.07%, 0,30% e 0,08% respectivamente.

A espécie *F. subtilis* apresentou dois clados, *F. subtilis* morfotipo I e morfotipo II, bem suportados (90), com distância média entre eles de 5,2% (Tabela 2.1) e valores intraclado de 0,53% e 0,16%, respectivamente. A espécie *X. kroyeri* também apresentou dois clados bem distintos com alto suporte (99). A média de distância entre *X. kroyeri* I e *X. kroyeri* II foi de 11,4% (Tabela 2.1) e as médias das distâncias intraclados foram 0,25% e 0.09%, respectivamente. A Tabela 2.2 mostra o número de indivíduos amostrados e identificados por espécie/clado e o local de origem das amostras analisadas. A ausência de algumas espécies em alguns locais de ocorrência não significa a não presença das mesmas, mas sim a não amostragem destas.

**Figura 2.2:** Árvore *Neighbor Joining* utilizando Kimura-2-parameters com 104 sequências COI obtidas para seis espécies nominais de camarão.



As distâncias intraespecíficas médias ou intra-clados apresentaram valores menores que 1%, os quais variaram de 0,1% para o clado de *F. paulensis* a 0,5% para o clado de *F. subtilis* morfotipo I. As distâncias inter-clados apresentaram valores maiores que 3%, variando de 5,2%, entre os dois morfotipos de *F. subtilis*, a 24,6%, entre os clados de *F. paulensis* e *X. kroyeri* I. Foram definidas oito OTUs pelo ABGD

(Tabela 2.3), correspondentes aos oito clados encontrados na árvore de NJ. A análise do DNA *barcode Gap* (Figura 2.3) evidenciou valores variando aproximadamente entre 1,5% e 5,0%, sendo possível visualizar as frequências das distâncias inter e intra-clados sem sobreposição das mesmas.

Todas as espécies do gênero *Farfantepenaeus* encontraram-se dentro dos limites de distribuição descritos para as respectivas espécies, com exceção de *F. subtilis*. A distribuição da espécie *F. subtilis* foi descrita por Pérez-Farfante (1967) como sendo do Mar do Caribe, desde Cuba e Pequenas Antilhas, até o litoral de Cabo Frio, no estado do Rio de Janeiro no Brasil. No presente estudo, oito indivíduos alocados no clado *F. subtilis* morfotipo II foram provenientes fora desses limites, a saber: um indivíduo amostrado em Ubatuba (SP), cinco em Cananéia (SP), um em Itajaí (SC) e um em São Francisco do Sul (SC) (Tabela 2.2). Dos oito locais amostrados para *X. kroyeri*, em dois deles, Ubatuba e Cananéia, ambos localizados no estado de São Paulo, foram encontrados representantes dos dois clados identificados para a espécie *X. kroyeri* (Tabela 2.2).

**Tabela 2.1:** Matriz de distancia entre os clados encontrados com a árvore *Neighbor Joining* valores calculados utilizando Kimura-2-Parameters.

	<i>F. brasiliensis</i>	<i>L. schmitti</i>	<i>F. subtilis</i> MI	<i>F. subtilis</i> MII	<i>F. paulensis</i>	<i>X. kroyeri</i> I	<i>X. kroyeri</i> II
<i>F. brasiliensis</i>							
<i>L. schmitti</i>	0.148						
<i>F. subtilis</i> MI	0.093	0.135					
<i>F. subtilis</i> MII	0.111	0.154	0.052				
<i>F. paulensis</i>	0.108	0.162	0.070	0.093			
<i>X. kroyeri</i> I	0.233	0.219	0.213	0.221	0.246		
<i>X. kroyeri</i> II	0.211	0.212	0.202	0.208	0.208	0.114	
<i>R. constrictus</i>	0.209	0.212	0.185	0.203	0.204	0.177	0.161

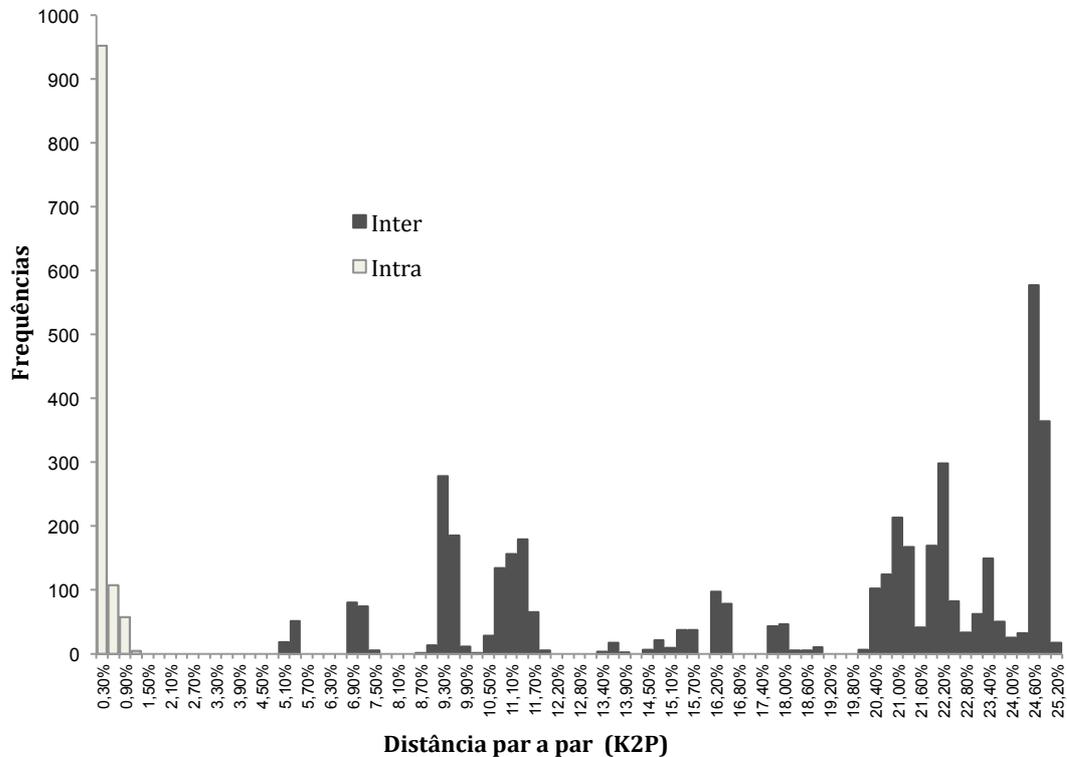
**Tabela 2.2:** Número de indivíduos coletados e identificados por espécie e local amostrado. Xkl (*Xiphonepaeus kroyeri* I); Xkll (*Xiphonepaeus kroyeri* II); Fbra (*Farfantepenaeus brasiliensis*); Fpau (*Farfantepenaeus paulensis*); FsubMI (*Farfantepenaeus subtilis* morfotipo I); FsubMII (*Farfantepenaeus subtilis* morfotipo II); Lsch (*Litopenaeus schmitti*); Rcon (*Rimapenaeus constrictus*).

Local	Xkl	Xkll	Fbra	Fpau	FsubMI	FsubMII	Lsch	Rcon	Total
Atins – MA	-	-	-	-	4	-	-	-	4
Diogo Lopes – RN	-	-	-	-	1	2	-	-	3
Touros – RN	-	-	1	-	-	-	1	-	2
Baía Formosa – RN	-	-	-	-	-	4	2	-	6
Guaraparí – ES	4	-	-	-	-	-	-	3	7
Macaé – RJ	8	-	-	-	-	-	-	-	8
Angra dos Reis – RJ	2	-	-	-	-	-	-	-	2
Ubatuba – SP	2	1	4	-	-	1	2	-	10
Cananéia – SP	7	4	4	6	-	5	-	-	26
São Francisco do Sul - SC	2	-	-	2	-	1	-	-	5
Itajaí – SC	4	-	-	12	-	1	-	-	17
Porto Belo – SC	2	-	-	-	-	-	-	-	2
Laguna – SC	-	-	-	8	-	-	-	-	8
Lagoa dos Patos - RS	-	-	-	4	-	-	-	-	4
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>32</b>	<b>5</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>104</b>

**Tabela 2.3:** Resultados obtidos no ABGD web com X=1.5, distancia K80 e 20 passos entre P mínimo de 0.001 e P máximo de 0.1 para as duas análises, com 104 e 571 sequências. Valores de P com resultados idênticos foram omitidos com exceção de P=0.078 devido a ser o ultimo valor apresentado.

Análise	Partition	Divergência Intraespecífica a priori (P)											
		0.001	0.0012	0.0016	0.0020	0.0026	0.0054	0.007	0.0088	0.011	0.037	0.048	0.078
104	Inicial	19	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Recursive	40	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8
571	Inicial	269	269	269	269	31	31	29	29	29	26	26	26
	Recursive	269	269	269	269	43	36	33	32	29	28	26	26

**Figura 2.3:** Gráfico de frequências das distancias par a par (K2P) evidenciando o DNA *Barcoding Gap* para 104 sequencias COI de camarões Penaeidae da costa brasileira considerando os oito OTUs definido pelo ABGD (Puillandre *et al.*, 2012) e clados observados na árvore de NJ (K2P).



A análise utilizando o *BOLD Identification System* (IDS) identificou nove indivíduos como sendo da espécie *F. brasiliensis* (variando os valores de similaridades de 99,81% a 100%), e 32 indivíduos como *F. paulensis* (99,84% a 100%). A espécie *L. schmitti* não apresentou correspondência no IDS tanto em nível de espécie quanto de gênero. As sequências dos três indivíduos classificados morfologicamente como *R. constrictus* tiveram correspondência com uma única sequência do BOLD amostrada no Brasil, apresentando valores de similaridade variando de 99,67% a 99,84%. Além desta sequência, foram encontradas mais quatro sequências para a espécie *R. constrictus*, coletadas em Maryland (2), Virginia (1) e Lousiana (1), nos EUA. Apesar dessas sequências não estarem disponíveis para acesso, os dados de similaridade fornecidos pelo BOLD entre estas sequências e as do presente estudo variaram de 87,86% a 90,43%, sugerindo não se tratarem da mesma espécie.

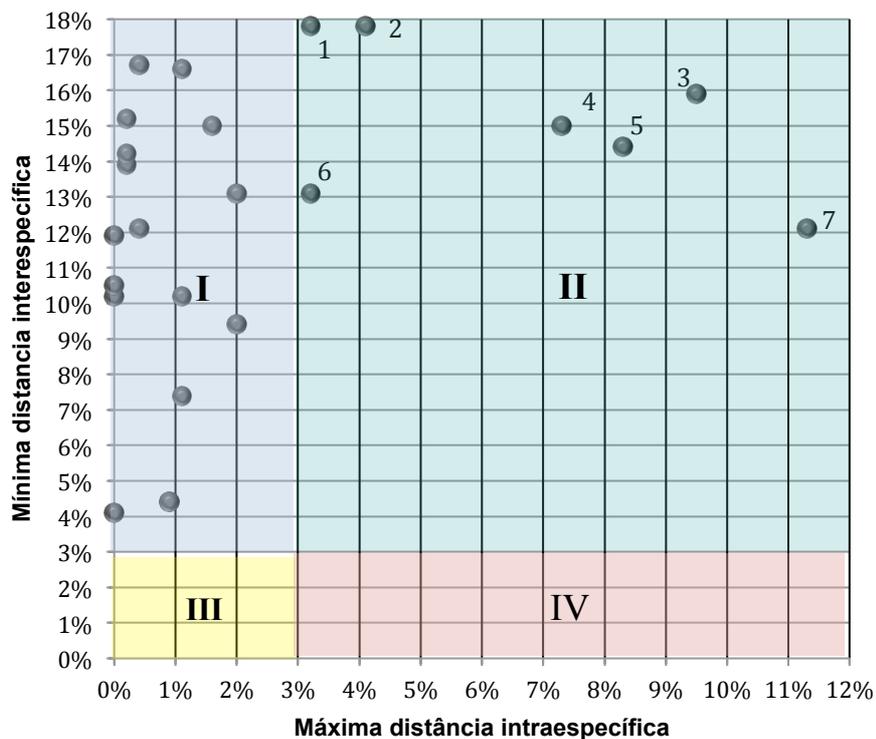
Catorze espécimes foram identificados como *F. subtilis*, com similaridades entre 99,04% a 99,42%, sendo estes pertencentes ao clado *F. subtilis* morfotipo II. Apenas uma sequência desta espécie, coletada no sudeste do Brasil, estava depositada e disponível no BOLD em maio de 2015. Este trabalho acrescentou mais 14 sequências dessa espécie, de espécimes coletados em seis distintos locais, sendo quatro destes apontados como nova área de ocorrência para esta espécie (Tabela 2.2). As sequências do clado *F. subtilis* morfotipo I não apresentaram correspondência no IDS.

Quando uma identificação em nível de espécie não é obtida, a sequência é alocada a um gênero, nos casos em que a divergência entre a sequência de referência é menor que 3%. Apenas três sequências de *X. kroyeri* II apresentaram correspondência à nível de gênero com *X. kroyeri*, apresentando similaridades de 97,09%. Para esta espécie, apenas uma sequência obtida para um espécime coletado no Texas, EUA encontrava-se depositada no banco de dados do BOLD System, com acesso restrito, limitando as análises. As demais sequências de *X. kroyeri* II (2) e *X. kroyeri* I (31) não apresentaram correspondências no IDS.

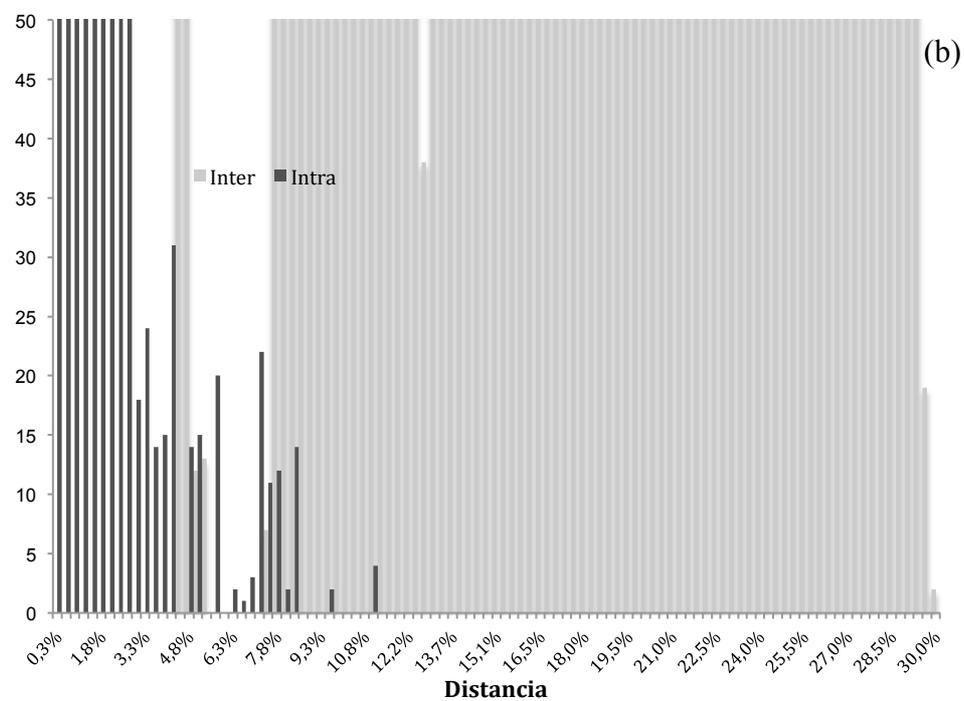
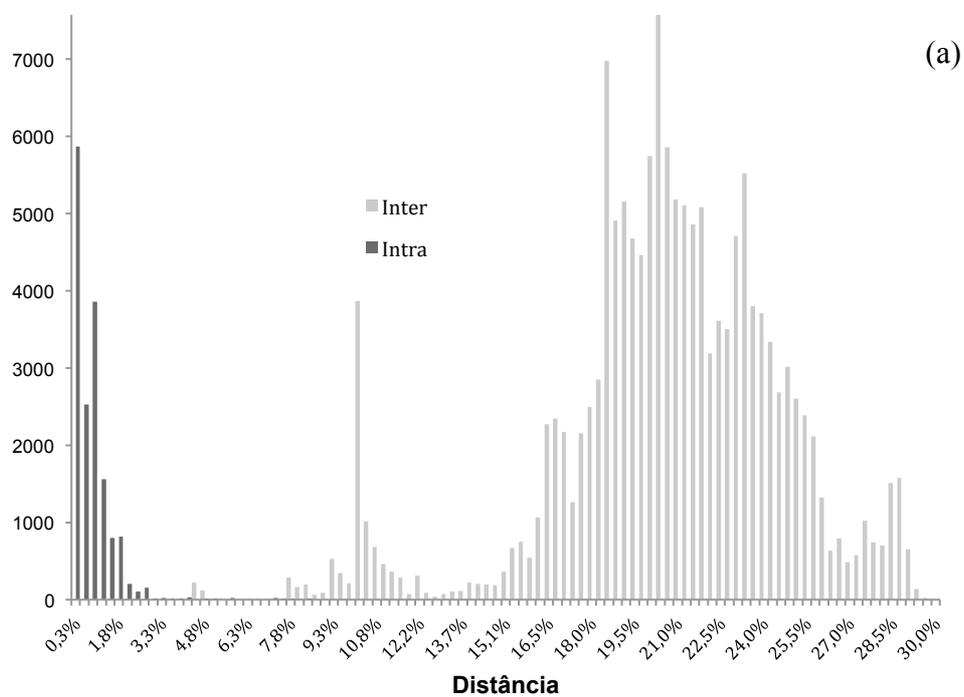
O alinhamento final utilizando o total de 571 sequências (com no mínimo duas sequências por espécie) gerou um fragmento com 455pb para 24 espécies analisadas, incluindo as nomeadas aqui como *F. subtilis* morfotipo I e morfotipo II e *X. kroyeri* I e II. Os gráficos de quadrantes obtidos para o conjunto das sequências com o threshold 3% (Figura 2.4) evidenciaram alguns valores dentro do quadrante II, indicando a existência de um complexo de espécies.

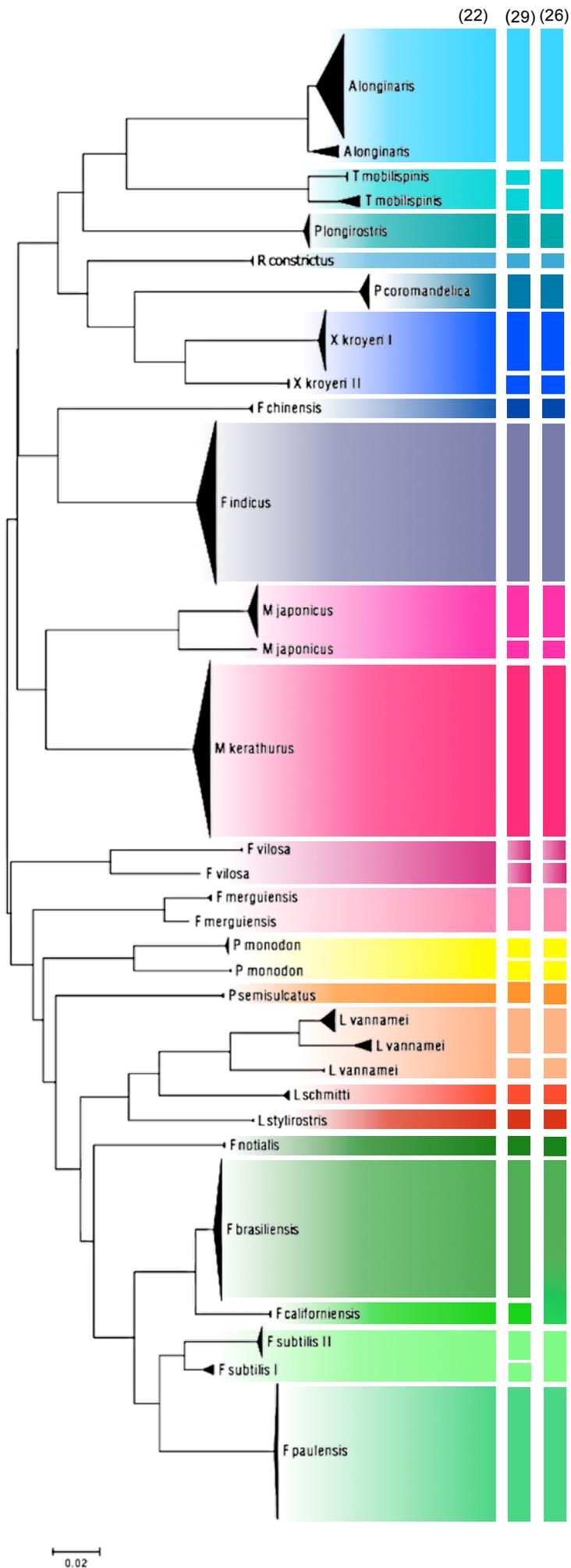
O *DNA barcode Gap* não pôde ser evidenciado claramente devido à sobreposição das distâncias intraespecífica e interespecíficas (Figura 2.5). A análise do alinhamento no ABGD apresentou diferentes números de OTUs, variando de 269 (P=0,001) a 26 (P=0.0379) (Tabela 2.3). Nenhum valor de P apontou a existência de 24 OTUs. A árvore de NJ (K2P) apresentando 32 clados e apontando as 29 (com P=0.013) e 26 OTUs(P=0.037) pode ser observada na Figura 2.6.

**Figura 2.4:** Mínima distancia Interspecifica contra máxima distancia intraespecifica para 22 espécies de Penaeidae com threshold de 3% que divide o gráfico em quatro quadrantes: (I) distancia intraespecifica <3%, distancia interespecifica >3%: concordante com a taxonomia; (II) distancia intraespecifica >3%, distancia interespecifica >3%: possível complexo de espécies, candidato a divisão taxonomica; (III) distancia intraespecifica <3%, distancia interespecifica <3%: recente divergência, hibridização ou sinonímia; (IV) distancia intraespecifica >3%, distancia interespecifica <3%: provável erro de identificação. (1) *Artemesia longinaris*, (2) *Trachypenaeopsis mobilispinis*, (3) *Funchalia villosa*, (4) *Marsupenaeus japonicus*, (5) *Penaeus monodon*, (6) *Fenneropenaeus merguensis*, (7) *Litopenaeus vannamei*.



**Figura 2.5:** DNA Barcode Gap (a) Frequência das distancias inter e intraespecificas das 571 sequencias compreendendo 22 espécies; (b) zoom evidenciando a sobreposição das distancias.





**Figura 2.6:** Árvore Neighbor Joining utilizando Kimura-2-parameters com 571 seqüências COI e 22 espécies nominais. Em destaque estão apresentadas as divisões resultantes do Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD web interface - Puillandre *et al.*, 2012) quando  $P=0,011$  (29) e  $P=0,037$  (26).

## 2.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, algumas das sequências obtidas para o gene COI nas espécies de peneídeos aqui avaliadas não apresentaram correspondência no BOLD em nível de espécie ou mesmo nível de gênero. O IDS realiza as análises comparando com sequências que foram depositadas por pesquisadores ou migradas do GenBank para o BOLD System. Quando uma espécie não está documentada ou apresenta um conjunto pobre de informações, esta identificação pode ficar comprometida, o que nos leva a acreditar que seja o caso da família Penaeidae.

Os peneídeos compreendem 216 espécies descritas (Pérez-Farfante e Kensley, 1997), as quais ocupam todos os oceanos do planeta. Porém, mesmo depois de quase uma década de existência do Bold System (Ratnasingham e Hebert, 2007), somente 687 sequências de apenas 27 espécies distribuídas em 12 países (acesso em 21 de maio de 2015) estão disponíveis. Deste total, 426 sequências não possuem local amostrado especificado, fato que dificulta sua precisa identificação e realização de análises mais robustas.

Além da falta de dados na base do Bold System, as porcentagens de divergências limites para identificação de uma espécie (<1%) ou gênero (<3%) no IDS parecem não ser as ideais para a família Penaeidae. Quando analisamos o conjunto de 571 sequências, observamos que a variação intraespecífica inerente à família Penaeidae é maior que o threshold estipulado pelo IDS. Da mesma forma, a divergência de espécies cogenéricas também ultrapassa os 3%, impossibilitando a identificação da espécie/gênero.

Hebert *et al.* (2003a) compararam sequências de 19.900 espécies entre diferentes grupos taxonômicos e apenas quatro pares de espécies tiveram um valor menor que 3% de divergência. Outro estudo realizado com 130 espécies de aves evidenciou sequências do gene COI idênticas ou muito similares dentro de cada espécie, sendo que os valores de divergência se mostraram inferiores a 3% (Hebert *et*

*al.*, 2004).

Apesar de níveis de divergência intraespecífica inferiores a 3% serem compartilhados por alguns grupos taxonômicos, estes, no entanto, podem se comportar de forma diferente dependendo de diferenças nas histórias evolutivas e biogeográficas das espécies. Assim, níveis de variação intraespecíficas e divergências interespecíficas devem ser investigados e estabelecidos para os diversos grupos, especialmente aqueles que apresentam diferenças características como tempo de geração e dispersão, as quais podem alterar as taxas de evolução molecular e também permitir estruturação populacional dentro dessas espécies (Hebert *et al.*, 2003a).

No caso dos cnidários, por exemplo, 94.1% dos pares de espécies comparadas evidenciaram valores de divergência menores que 2% , enquanto que em outros grupos avaliados por Hebert *et al.* (2003b) (por exemplo: Arthropoda, Molusca e Echinodermata), mais de 98% dos pares de espécies mostraram divergências maiores que 2%. Em dois grupos de anfíbios (sapos mantelídeos e salamandras) foram observadas variações intraespecíficas no COI de até 18%, ou seja, valores semelhantes às variações interespecíficas observadas para outros grupos (Waugh, 2007).

Para crustáceos, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de propor alguns limites de separação entre os táxons. Costa *et al.* (2007), ao avaliarem a capacidade de identificação de crustáceos através da abordagem pelo DNA barcoding, encontraram valores de divergência para espécies cogenéricas 19 a 48 vezes maiores que para indivíduos pertencentes a uma mesma espécie, sendo que a divergência dentro das espécies variou de 0 a 2.57%, com média de  $0.46\% \pm 0.05$ .

Radulovici *et al.* (2009) também utilizaram o DNA barcoding para identificar espécies de crustáceos marinhos no Golfo do Saint Lawrence. Os autores analisaram 460 indivíduos pertencentes a 80 espécies, sendo que apenas quatro casos apresentaram divergência intraespecífica maior que 3%, sugerindo, a possível presença de espécies crípticas. Bucklin *et al.* (2007) analisaram sequências do gene COI de 40 espécies pertencentes a 10 gêneros de *Euphausiids* (uma espécie de krill) e observaram valores de distâncias intraespecíficas menores que 2%. Bilgin *et al.* (2014)

acessaram a diversidade genética do gene COI em 12 espécies de camarões e obtiveram 1,3% de média intraespecífica (0,73% a 2,75%) e 21,03% de média interespecífica com mínima de 12,6% e máxima de 26,8%

Na família Penaeidae pouco é conhecido sobre os limites das distâncias intra e interespecíficas para o gene COI. Além disso, a não evidência do DNA Barcode Gap (Figura 5) dificulta estabelecer um threshold, uma vez que quanto maior é a sobreposição entre a variação intraespecífica e a divergência interespecífica, menor é a eficiência de identificação de espécies pelo DNA Barcode (Meyer e Paulay, 2005).

Vários trabalhos têm tentado esclarecer aspectos sobre as espécies da família Penaeidae com o intuito de melhor caracterizar as espécies, gêneros e tribos e as relações filogenéticas deste grupo (Baldwin, 1998; Maggioni, 1996; Gusmão *et al.*, 2000; Lavery *et al.*, 2004; Pérez-Farfante e Kensley 1997; Rajakumaran *et al.*, 2013). Porém, conflitos e dúvidas sobre a caracterização dessas espécies sempre permeiam estes trabalhos (Ma *et al.*, 2011; Flegel, 2007 e 2008; McLaughlin *et al.*, 2008) dificultando o entendimento desse importante grupo de crustáceos decápodos.

Gusmão *et al.* (2006) estudando aloenzimas e fragmentos do gene COI apontaram para existência de uma espécie críptica à *X. kroyeri*, no litoral de Ubatuba (SP) e Natal (RN). No presente trabalho, dois clados com alto valor de suporte foram identificados para essa espécie, sendo que a distância média entre eles é tão alta quanto a distância encontrada entre outras espécies cogenéricas e bem definidas da família Penaeidae, como, por exemplo, as espécies *F. paulensis* e *F. brasiliensis* (Tabela 1). Apesar desses altos valores de divergência, diferenças morfológicas aparentes entre estas linhagens, no entanto, ainda não foram evidenciadas.

A espécie *F. subtilis* também apresentou dois distintos clados para os morfotipos I e II, com média interespecífica entre eles de 5,2%, sendo este o menor valor interclado encontrado neste estudo. Os morfotipos I e II de *F. subtilis* foram primeiramente mencionados por Pérez-Farfante (1967), que destacou a presença de diferenças morfológicas entre populações do nordeste do Brasil, Venezuela e Colômbia. Estas diferenças foram inicialmente atribuídas a possíveis variações nas condições ambientais. Entretanto, décadas mais tarde, análises moleculares indicaram que tais

morfotipos se tratavam de fato de duas espécies distintas (Gusmão *et al.*, 2000; Maggioni *et al.*, 2001). Apesar disso, até a presente data, ambos os morfotipos ainda não foram validados como duas espécies taxonomicamente reconhecidas, o que faz com que os trabalhos atuais continuem se referenciando a tais linhagens como morfotipos.

Um estudo da composição de camarões das famílias Penaeidae e Caridea na Baía de Ubatuba (São Paulo, Brasil) registrou seis espécies de Penaeidae, entre elas a *F. paulensis* e *F. brasiliensis*, não sendo relatada a ocorrência de *F. subtilis* (Costa *et al.*, 2003). O presente trabalho, no entanto, sugere a ampliação da área de distribuição natural dessa espécie até a região de São Francisco, situada no estado de Santa Catarina. O fato de não ter sido registrada a ocorrência de *F. subtilis* até esta localidade pode ser devido à grande semelhança entre esta e os demais camarões do gênero *Farfantepenaeus*, principalmente na fase juvenil. Outro fato que pode ter colaborado para a falta de registro desta espécie, é que a abundância de *F. subtilis* costuma ser inferior a de outros camarões rosa, como *F. paulensis* e *F. brasiliensis*, os quais possuem grandes estoques no sul e sudeste do país, sendo alvo de grande interesse pesqueiro (D'Incao, 1991).

Além das linhagens de *F. subtilis* e *X. kroyeri*, outras sete espécies apresentaram valores de distâncias intraespecíficas maiores que 3% (Figura 2.5). Esses altos valores podem estar indicando a presença de um complexo de espécies e/ou espécies crípticas ou uma forte estruturação populacional, como observado em *Artemia salina* através da análise do mesmo gene mitocondrial (Munoz *et al.*, 2008).

Vários critérios usados na taxonomia integrativa podem ajudar a delinear espécies e distinguir uma estruturação populacional de um complexo de espécie (Padial *et al.*, 2010; Miralles e Vences, 2013). A condição de simpatria e monofilia, por exemplo, podem se constituir em parâmetros importantes para decidir sobre a divisão de uma espécie em OTUs diferentes (Kekkonen e Hebert, 2014). OTUs irmãs monofiléticas encontradas em regiões biogeográficas separadas são agrupadas para formar uma única unidade, enquanto OTUs irmãs monofiléticas encontradas em simpatria, em uma ou várias regiões, são consideradas duas OTUs realmente distintas,

e, portanto, fortemente candidatas à revisão taxonômica.

Considerando o critério de simpatria, tanto a espécie *X. kroyeri* quanto a *F. subtilis* apresentariam duas OTUs distintas cada uma, uma vez que as linhagens geneticamente divergentes de cada espécie são encontradas nas mesmas regiões biogeográficas de ocorrência das espécies taxonomicamente reconhecidas (Tabela 2.2). Essas divisões podem ser observadas nos resultados do ABGD quando assumimos  $P = 0.011$  e nas árvores de NJ (Figuras 2.2 e 2.6). Quando consideramos os resultados do ABGD, com  $P=0.037$ , observamos, no entanto, que a espécie *F. subtilis* é colocada como uma única OTU, assim como as espécies *F. brasiliensis* e *Farfantepenaeus californiensis* (Figura 2.6), que são muito bem caracterizadas taxonomicamente, também são agrupadas em uma única OTU. Dessa forma, sugere-se que valor de  $P=0,037$  pode não ser o threshold ideal para analisar este gênero ou representantes da família Penaeidae.

Em relação às análises utilizando as sequências do Bold System e GenBank, embora as mesmas estejam disponíveis para acesso, a falta de informações sobre a origem dos espécimes, impossibilita uma análise mais precisa sobre dados de local de ocorrência e simpatria. Entretanto, algumas análises obtidas aqui apontam para a necessidade de uma grande revisão dentro da família Penaeidae. Por exemplo, para a espécie *Marsupenaeus japonicus*, a literatura relata a existência de duas variedades morfológicamente similares, mas com distintos padrões de cor de bandas na carapaça (Tsoi *et al.*, 2007; Shih *et al.*, 2011). Estas duas variedades apresentam diferentes distribuições, mas também ocorrem em simpatria (Tsoi *et al.*, 2005). Considerando estas informações e os resultados obtidos aqui é possível sugerir que esta espécie se apresente como um complexo de espécies (Figura 2.4), composto por duas distintas OTUs (Figura 2.6). Da mesma forma, embora a espécie *Penaeus monodon* não apresente diferenças morfológicas aparentes relatadas na literatura, a grande variabilidade genética e estruturação populacional verificada ao longo de sua área de distribuição (Benzie *et al.*, 2002; Duda e Palumbi, 1999; Waqairatu *et al.*, 2012), além da divisão desta espécie em duas OTUs (Figura 6), pode indicar a existência de um complexo de espécies ou de espécies crípticas, fato que deve ser melhor analisado.

Em relação à espécie *L. vannamei*, apesar de ter sido observado os maiores valores de variabilidade intraespecífica, a maioria das sequências obtidas para essa espécie foi oriunda de indivíduos de cativeiros. Portanto, a divisão em distintas OTUs encontrada aqui deve ser provavelmente resultado do efeito de fundação dessas linhagens e não necessariamente de diferenças nas populações naturais devido a seus locais de ocorrência. Estudos que analisem espécimes coletados na natureza devem ser realizados para confirmar a existência de distintas OTUs para esta espécie.

Os dados obtidos no presente estudo demonstram que a abordagem de DNA barcode pode ser uma ferramenta útil para direcionar estudos na taxonomia e distribuição de espécies na família Penaeidae. Porém, a identificação através do BOLD System ainda é insuficiente, pois além da falta de informações complementares às sequências disponibilizadas, o único valor de threshold (1%) adotado limita a análise da diversidade, uma vez que este não representa a variabilidade intraespecífica observada para distintas espécies da família Penaeidae, as quais apontam para existência de espécies crípticas e/ou complexos de espécies.

# Capítulo 3



**“História demográfica e estruturação  
genética em camarões rosa**

***Farfantepenaeus* (Crustacea: Penaeidae)”**

### 3.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Farfantepenaeus* Burukovsky, 1972 (Penaeidae), proposto inicialmente como um subgênero de *Penaeus*, tem como espécie tipo *Farfantepenaeus brasiliensis*, descrita em 1997 por Burukovsky (1997). Pérez-Farfante e Kensley, em 1997, elevaram o então subgênero *Farfantepenaeus*, além de outros subgêneros de *Penaeus* (*Litopenaeus*, *Fenneropenaeus*, *Marsupenaeus*, *Melicetus*), à categoria de gênero, justificando que os caracteres morfológicos dos subgêneros de *Penaeus* l.s. eram muito relevantes e distintos, principalmente, quanto à morfologia reprodutiva e biologia (Pérez-Farfante, 1988).

Enquanto alguns pesquisadores adotaram prontamente esta nova nomenclatura proposta por Pérez-Farfante e Kensley (1997), outros não concordam com a elevação dos subgêneros (Flegel, 2007; McLaughlin *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2011), o que ocasionou controvérsias nas comunidades científica e econômica. Neste trabalho, a nomenclatura sugerida por Pérez-Farfante e Kensley (1997) foi acatada, devido a maioria dos estudos filogenéticos realizados até o momento demonstrar monofilia para o gênero *Farfantepenaeus* (Lavery *et al.*, 2004). Entretanto, aspectos relativos à validade dos gêneros propostos por Pérez-Farfante e Kensley (1997) não são discutidos.

O gênero *Farfantepenaeus* é endêmico das Américas, sendo que as espécies que ocorrem no Oceano Pacífico, não ocorrem no Oceano Atlântico e vice-versa. Atualmente existem oito espécies válidas, sendo duas nativas do Oceano Pacífico: *Farfantepenaeus brevirostris* (Kingsley 1878) e *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad 1939), e seis nativas do Atlântico: *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille 1817), *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad 1939), *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967), *Farfantepenaeus aztecus* (Ives 1891), *Farfantepenaeus notialis* (Pérez-Farfante 1967) e *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante 1967) (Pérez-Farfante 1988).

Conhecidos popularmente como camarão rosa (*pink shrimp*), este grupo engloba

seis espécies de ocorrência no litoral brasileiro, com sobreposição de áreas de distribuição. No Brasil, *Farfantepenaeus* é um dos gêneros de maior importância econômica, sendo que a abundância das três espécies de maior importância comercial (*F. paulensis*, *F. brasilienses* e *F. subtilis*) pode variar dependendo da região (Winter, 2009).

De acordo com Dall *et al.* (1990), este gênero possui ciclo de vida do tipo 2 que é caracterizado por ter a reprodução e desova ocorrendo em mar aberto. A larva é planctônica com vários estágios naupliar, protozoel, mysis e pós-larvais. No estágio de pós-larva, os indivíduos migram para estuário onde crescem até a fase juvenil/pré-adulto, quando voltam para o mar aberto, completando o ciclo (Figura 3.1). As espécies do gênero *Farfantepenaeus* possuem ciclo de vida com duração relativamente curta, entre 16 a 30 meses, sendo sua longevidade de aproximadamente 2 anos.

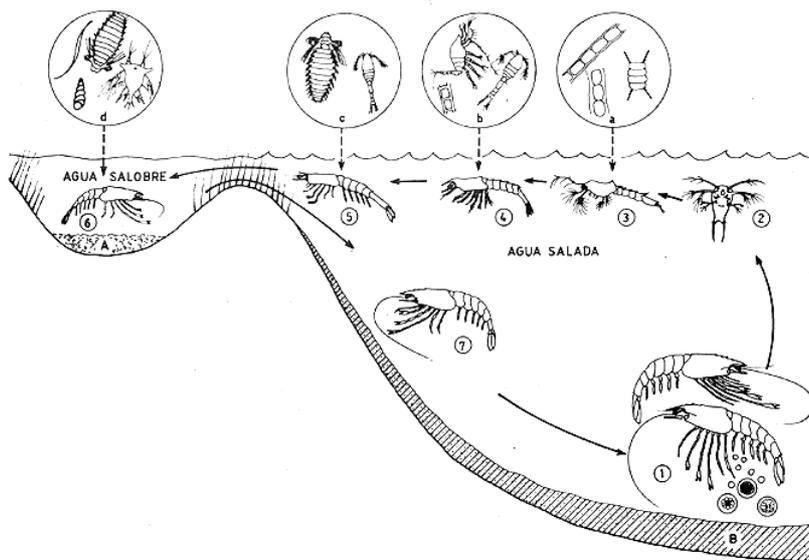


Figura 3.1: Ciclo de vida típico de Penaeidae (retirado de <http://www.fao.org/docrep/005/ac867s/ac867s07.htm>)

A espécie *F. paulensis* possui uma distribuição mais restrita que a maioria das espécies desse gênero, ocorrendo do sul do estado da Bahia até a costa da Argentina no Mar Del Plata, podendo ser encontrada em águas com até 150 m de profundidade (Pérez-Farfante, 1996; Carpenter, 2002). Por ser uma das espécies do gênero

*Farfantepenaeus* mais abundante nas regiões sul e sudeste (igualando sua abundância com *F. brasiliensis* em algumas regiões), ela tem grande importância para a economia dessas regiões, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (D'Incao, 1991; Ferreira e Freire, 2009).

A espécie *F. subtilis*, diferente de *F. paulensis*, habita águas mais quentes, presentes mais ao norte do Brasil, distribuindo-se desde o Mar do Caribe (Cuba e Pequenas Antilhas) até Cabo Frio, no litoral do Rio de Janeiro, e representa um dos principais recursos pesqueiros na região norte do país (Corrêa e Martinelli, 2009). *F. brasiliensis*, por sua vez, possui a maior área de distribuição dentro do gênero, indo desde a Carolina do Norte nos EUA até o Rio Grande do Sul no sul do Brasil. Esta espécie habita águas rasas de até aproximadamente 350m de profundidade, sendo mais abundante no litoral de Cabo Frio (RJ), Cananeia (SP) e Santos (SP) (Zenger Jr. e Agnes, 1977).

A partir de 1973 houve uma acentuada queda no rendimento da captura de camarão rosa no Brasil, a qual vem se agravando devido ao grande aumento da frota pesqueira, consequência de incentivos governamentais nas décadas de 70 e 80 (Perez *et al.*, 2001). Dessa maneira, a Normativa nº32 de 26 de maio de 2004 (Brasil 05/2004) tem considerado as espécies do gênero *Farfantepenaeus*, entre outras, como recursos sobreexplotados em todo o litoral brasileiro. Em 2008, outra Normativa (Brasil 189/2008) proibiu o exercício da pesca de arrasto com tração motorizada para a captura de camarão rosa em determinadas épocas do ano e regiões, estipulando um período de defeso para essas espécies, visando a conservação e preservação das mesmas. Essas leis são baseadas nas áreas de ocorrência das espécies e suas épocas de reprodução, evitando que adultos maduros e/ou em desova sejam pescados.

Estudos em relação à biologia e pesca destas espécies tem sido realizados focando algumas regiões de maior interesse pesqueiro (Malpartida e Vinatea, 2007; Leite e Petrere, 2006; Corrêa e Martinelli, 2009). Entretanto, estudos genéticos ainda são escassos ou inexistentes (Gusmão *et al.*, 2005) e estoques com potenciais evolutivos únicos e/ou espécies crípticas podem estar desprotegidas pela falta de conhecimento.

Neste contexto, o levantamento de informações acerca da área de distribuição das espécies do gênero *Farfantepenaeus*, bem como da estrutura genética de suas populações pode ser eficiente para que medidas governamentais e conservacionistas sejam propostas de forma mais efetiva para este grupo. Neste capítulo, aspectos relacionados ao padrão e distribuição da diversidade genética, bem como da divergência genética dentro e entre populações das espécies *F. brasiliensis*, *F. paulensis* e *F. subtilis* são discutidos por meio da análise de marcadores mitocondriais.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

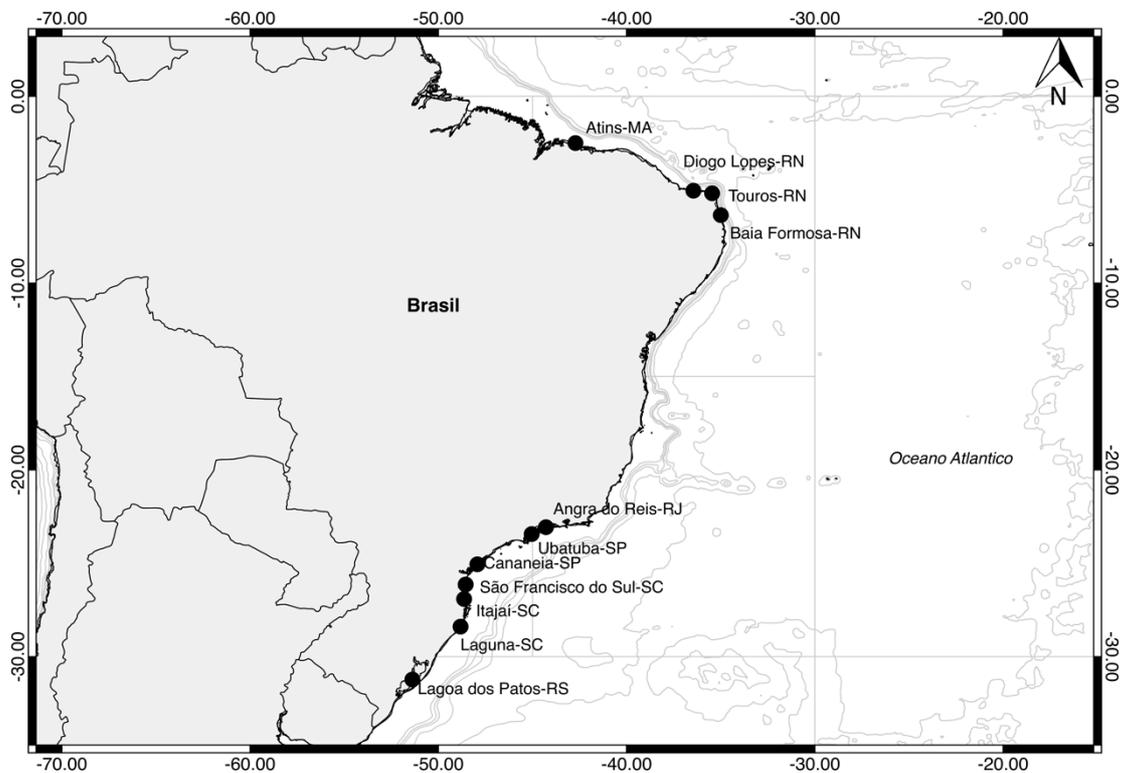
Entre 2006 a 2012, foram amostrados 131 espécimes de camarão do gênero *Farfantepenaeus*, coletados ao longo do litoral brasileiro, sendo uma região no estado do Maranhão, três regiões no estado do Rio Grande do Norte, duas regiões no estado de São Paulo, quatro em Santa Catarina e uma no estado do Rio grande do Sul (Figura 3.1). Os espécimes foram coletados com a ajuda de pescadores locais e de colaboradores. De cada indivíduo foi retirada uma porção de músculo, sendo este conservado em álcool e refrigerado até o momento da extração de DNA.

As extrações de DNA foram realizadas segundo protocolo de Sambrook *et al.* (1989). Os DNAs foram analisados em BioPhotometer (Eppendorf) e armazenados a -20°C. Foram amplificadas quatro regiões mitocondriais: Citocromo oxidase subunit I gene (COI), 16S ribosomal RNA gene (16S), Citocromo b gene (Cytb) e Região controle da mtDNA (Dloop). Os *primers* utilizados nas ampliações já descritos anteriormente para a família Penaeidae estão listados na Tabela 3.1 e foram utilizados como descrito no capítulo 1.

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando Polietileno Glicol 8000 (Lis e Schleif, 1975 ) e sequenciados em sentido *Forward* em sequenciador 3730XL . No *software* Geneious v6.1.8 (Kearse *et al.*, 2012), cada cromatograma foi avaliado quanto à qualidade, levando-se em consideração os valores de *basecall*, e

desprezando-se aqueles que apresentaram valores de HQ (*high quality*) inferiores a 50%, antes da edição dos mesmos. Neste mesmo software os cromatogramas foram alinhados utilizando algoritmo Clustal W v.2 (Larkin *et al.*, 2007), e também trimados. Foi analisada a presença de picos duplos, assim como *in/del*, *gaps* e *stop codons* no caso de genes codificadores de proteínas para descartar a possibilidade de serem pseudogenes ou produto de amplificação não específica.

**Figura 3.2:** Mapa da costa brasileira destacando os pontos onde os espécimes do gênero *Farfantepenaeus* foram amostrados.



As análises de diversidade genética para estabelecimento do número de haplótipos, diversidade haplotípica ( $H_d$ ), sítios polimórficos ( $S$ ) e diversidade nucleotídica ( $P_i$ ) foram realizadas no DNAsp v5 (Librado e Rozas, 2009) para cada um dos marcadores amplificados. Os dados de estruturação populacional foram obtidos através do cálculo de  $\Phi_{ST}$  (distância par a par), teste exato de diferenciação e AMOVA

(*Analysis of Molecular Variance*), considerando significância de  $p < 0,05$ , testada através de permutações dos haplótipos (1023 permutações) realizadas no programa Arlequin ver. 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Para verificar graficamente a existência de estruturação, foram construídas redes de haplótipos para os quatro locos avaliados no programa PopArt (<http://popart.otago.ac.nz>), usando-se o algoritmo Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999). O Teste de Mantel foi aplicado para investigar a presença de isolamento por distância, verificando-se a correlação entre as matrizes par a par de distância genética e distância geográfica para as regiões amostradas no Fstat (Goudet, 2002).

**Tabela 3.1:** Listagem dos *primers* utilizados para amplificação dos quatro marcadores mitocondriais utilizados.

Loci	Primer	Sequence 5´-3´	T°C
COI	COIPenF2	AGA TTT ACA GTC TAT CGC CTA	51°C
	COIPenR1	ATA CCA AAT ACR GCT CCY ATT GA	
DLoop	DloopPenF2	CCT AAA ADT GAA AGA AYA AGC YAG G	51°C
	DloopPenR2	TAC CCT ATC AAG ATA ATC C	
Cytb	CytbPenF1	GTA YTA CCY TGA GGA CAA ATA TC	51°C
	CytbR1	AAA CAC GTG CTT TCC TAT CAG CCA A	
16S	16SPenF1	TGA CCG TGC GAA GGT AGC ATA	62°C
	16SPenR1	AAT TCA ACA TCG AGG TCG CAA	

Testes de neutralidade Tajima's *D* statistic (Tajima, 1989) e Fu's *F<sub>s</sub>* statistical tests (Fu, 1997) para cada loco foram calculados no programa DNAsp v5 (Librado e Rozas, 2009). Para avaliação de mudança temporal no tamanho populacional foi realizada a análise *R<sub>2</sub>* (Ramos-Onsins e Rozas, 2002) e seus intervalos de confiança foram calculados no DNAsp. A análise de *mismatch distribution* e a significância do modelo de expansão demográfica e espacial (Excoffier e Lischer, 2010), através da Soma do Desvio dos Quadrados (SSD) (Schneider e Excoffier, 1999), foram realizadas nos programas DNAsp e Arlequin v3.5 (Excoffier e Lischer, 2010).

O tempo desde o início da expansão, para a espécie *F. paulensis* considerando os genes COI e Dloop, foi calculado através da fórmula  $t = T/2\mu k$  (Rogers e Harpending,

1992), onde  $\mu$  é a taxa de substituição e  $k$  o comprimento da sequência. Baldwin *et al.* (1998) estimaram a taxa de divergência do gene COI para Penaeidae como sendo 3% por milhões de anos, sendo, portanto, assumido um  $\mu(\text{COI})=1.5 \times 10^{-8}$  por geração. Para o gene Dloop foi assumido a taxa proposta por McMillen-Jackson e Bert (2003), onde a taxa média de divergência foi estimada como sendo 38% por milhões de anos e  $\mu(\text{Dloop})=19 \times 10^{-8}$ . O valor  $T$  foi obtido na análise de *mismatch* para os dois genes e  $k(\text{COI})=1100\text{pb}$  e  $k(\text{Dloop})=958\text{pb}$ . Dessa forma, chegamos ao valor de  $t$ , que consiste no tempo dado em gerações desde a expansão.

A análise Bayesian Skyline (Drummond *et al.*, 2005), que estima a dinâmica de população no tempo através da amostragem de sequências moleculares, foi realizada no BEAST v2.3.0 (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees – Bouckaert *et al.*, 2014), usando-se os dados do gene COI e Dloop em *F. paulensis*.

### 3.3 RESULTADOS

As amplificações de todos os locos foram bem sucedidas. Os cromatogramas não apresentaram picos duplos, in/del ou gaps. As sequências dos genes COI e Cytb foram traduzidas e verificadas quanto a presença de *stop* códons, o que não foi constatado para nenhum dos dois genes. Os 131 espécimes foram identificados molecularmente, sendo encontradas três espécies nominais: *F. paulensis*, *F. brasiliensis* e duas variedades de *F. subtilis* (Tabela 3.2). A não evidenciação de algumas espécies em toda sua extensão de ocorrência não significa a não ocorrência das mesmas, podendo refletir apenas sua não amostragem.

O gene 16S foi o que se apresentou mais conservado dentre os quatro analisados, apresentando uma diversidade haplotípica variando de 0,15 a 0,81 para *F. paulensis* e *F. subtilis* morfotipo MII, respectivamente. Apesar de *F. subtilis* morfotipo II ter apresentado uma diversidade nucleotídica de 0,81, este apresentou apenas 6 sítios polimórficos, com uma diversidade nucleotídica de apenas 0,003, sendo o gene mais

conservado para a espécie. A região controle Dloop foi analisada apenas em *F. paulensis*, pois apresentou-se muito polimórfica com uma alta diversidade nucleotídica (0,015) e diversidade haplotípica (1,0), com todos os haplótipos únicos não compartilhados (Tabela 3.3). Dessa forma, os dados de Dloop não se mostraram informativos para analisar estruturação populacional neste grupo de camarões.

Em *F. subtilis* não foi possível observar um padrão geográfico nas redes de haplótipos, sendo observado haplótipos compartilhados entre toda a extensão da costa avaliada (Figura 3.3). Porém, foi possível observar dois grupos distantes, um deles presente apenas nas regiões norte e nordeste do país, sendo este denominado *F. subtilis* morfotipo I, e outro com uma distribuição mais ampla, presente na maioria das regiões amostradas, desde Diogo Lopes em Rio Grande do Norte até a Itajaí em Santa Catarina, sendo este denominado *F. subtilis* morfotipo II. Devido a grande distância observada entre essas duas linhagens de *F. subtilis*, as análises seguintes prosseguiram separando os grupos em espécies distintas, como já proposto por Gusmão *et al.* (2000).

**Tabela 3.2:** Quantidade espécimes coletado por local amostrado e quantidade de cada uma das espécies *Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus subtilis* morfotipo II ( MI - *F. subtilis* Morfotipo I) e *Farfantepenaeus brasiliensis* identificadas molecularmente por local amostrado e o total amostrado.

<b>Local</b>	<i>F. paulensis</i>	<i>F. subtilis</i> MII(MI)	<i>F. brasiliensis</i>	<b>Total</b>
Atins - MA	-	0 (5)	-	5
Diogo Lopes - RN	-	5 (1)	-	6
Touros - RN	-	5 (1)	1	7
Baia Formosa - RN	-	8	-	8
Angra dos Reis - RJ	-	-	1	1
Ubatuba - SP	-	3	5	8
Cananeia - SP	19	8	7	34
Sao Francisco do Sul - SC	2	1	-	3
Itajaí - SC	30	1	-	31
Laguna - SC	14	-	-	14
Lagoa dos Patos - RS	10	-	-	10
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>38</b>	<b>14</b>	<b>131</b>

Considerando o baixo número de espécimes amostrados da espécie *F. brasiliensis* e *F. subtilis* morfotipo I, análises de estrutura populacional para estas

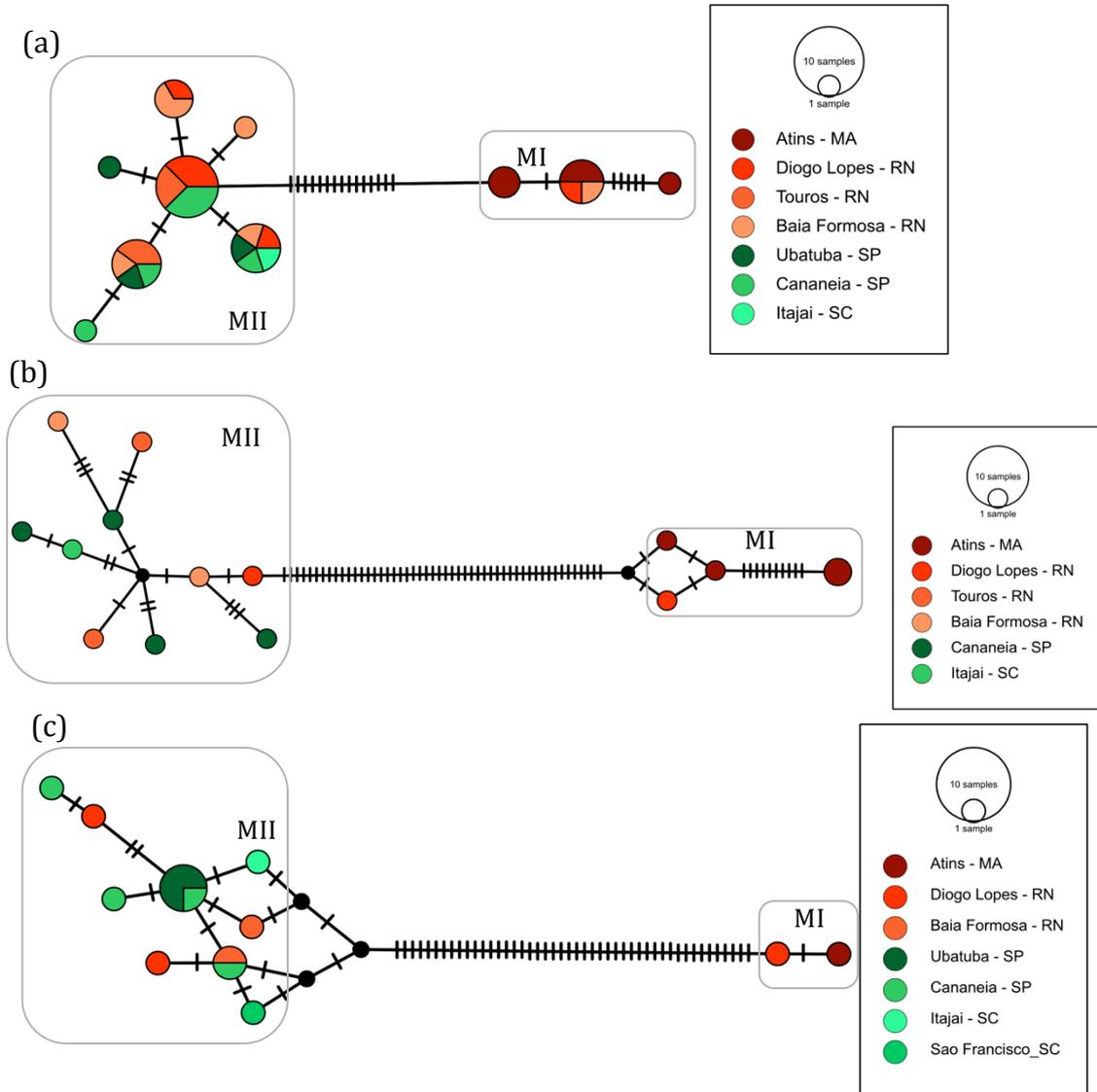
espécies não foram realizadas. Para a espécie *F. paulensis* foram construídas redes de haplótipos para os quatro locos analisados (Figura 3.4 e Figura 3.5). Nenhuma das quatro redes mostrou evidência de populações estruturadas geneticamente, evidenciando haplótipos compartilhados em todas as áreas amostradas e haplótipos únicos em formato de estrela, característico de espécies que passaram por um período de expansão. O  $\Phi_{ST}$  par a par considerando os locais amostrados não foi significativo para nenhum dos locos e espécies analisadas, com exceção das populações de *F. paulensis* de Lagoa dos Patos e Cananéia, em que o valor de  $\Phi_{ST}$  para o loco COI, apesar de baixo (0,029;  $p < 0,05$ ), foi significativo (Tabelas 3.4 e 3.5).

**Tabela 3.3:** Dados de polimorfismo para os marcadores mitocondriais para todas as espécies onde (N) número de sequências, (pb) n° de pares de bases, (S) sítios polimórficos, (G+C) quantidade de G e C, (h) número de haplótipos, (Hd) diversidade haplotípica e (Pi) diversidade nucleotídica.

Espécie	N	pb	S	G+C	h	Hd	Pi
<b>16S</b>							
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	14	345	2	0,319	3	0,275	0,00083
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	64	360	4	0,338	5	0,151	0,00043
<i>Farfantepenaeus subtilis MI</i>	7	366	6	0,326	3	0,667	0,00520
<i>Farfantepenaeus subtilis MII</i>	24	366	6	0,327	7	0,815	0,00332
<b>COI</b>							
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	8	1106	20	0,371	8	1,000	0,00494
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	44	1100	26	0,366	18	0,655	0,00130
<i>Farfantepenaeus subtilis MI</i>	5	1090	12	0,351	4	0,900	0,00624
<i>Farfantepenaeus subtilis MII</i>	10	1055	22	0,371	10	1,000	0,00565
<b>Cytb</b>							
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	3	624	2	0,372	3	1,000	0,00214
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	33	636	7	0,362	8	0,430	0,00093
<i>Farfantepenaeus subtilis MI</i>	2	699	1	0,337	2	1,000	0,00143
<i>Farfantepenaeus subtilis MII</i>	13	690	9	0,355	9	0,910	0,00282
<b>Dloop</b>							
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	24	958	99	0,204	24	1,00	0,01586

A maioria dos testes de neutralidade para *F. paulensis* foi negativo e significativo para os quatro marcadores mitocondriais (Table 3.6), sugerindo seleção purificadora ou recente expansão populacional. Para *F. subtilis*, os testes de neutralidade para o COI e Cytb também apresentaram valores negativos e significativos (Tabela 3.6).

**Figura 3.3:** Median Joining networks da espécie *Farfantepenaeus subtilis* destacando as duas variedades *F. subtilis* morfotipo I (MI) e I morfotipo II (MII) para três diferentes marcadores mitocondriais: a) 16S; b) COI; c) Cytb.

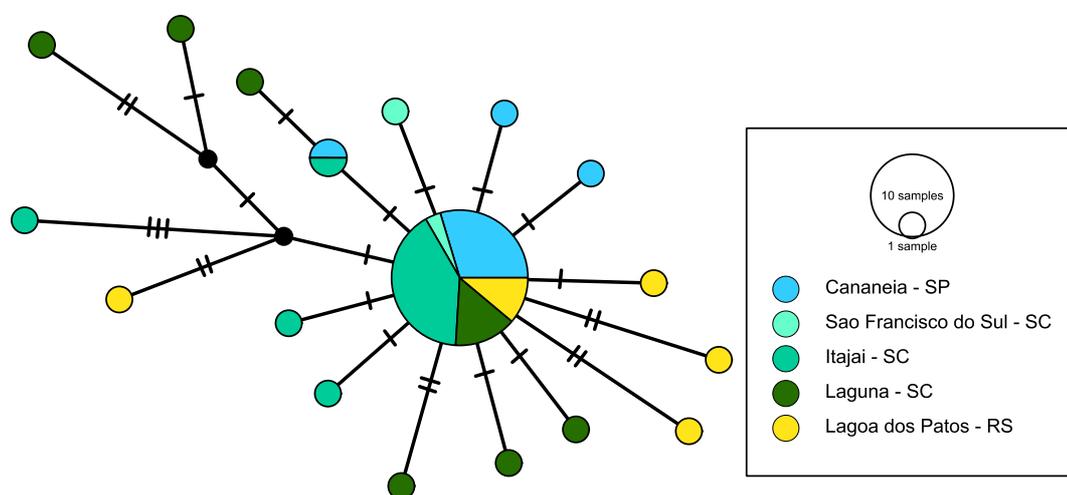


**Tabela 3.4:** Matriz dos valores de  $\Phi_{ST}$ , método de distância par a par (diagonal abaixo) e seus valores de  $p$ -value +- desvio padrão (diagonal acima) para o gene COI em *F. paulensis* entre as regiões amostradas (nível de significância 0,05).

Populações (N)	Cananéia	São Francisco do Sul	Itajaí	Laguna	Lagoa dos Patos
Cananéia (10)	-	0.49+-0.03	0.79+-0.05	0.51+-0.06	0.03+-0.02*
São Francisco do Sul (2)	0.12	-	0.68+-0.03	0.89+-0.02	0.85+-0.02
Itajaí (15)	-0.02	0.02	-	0.15+-0.03	0.15+-0.04
Laguna (10)	0.02	-0.14	0.02	-	0.51+-0.04
Lagoa dos Patos (7)	0.03*	-0.14	0.03	-0.01	-

(\*) valores significativos

**Figura 3.4:** Median Joining networks da espécie *Farfantepenaeus paulensis* para marcador mitocondrial COI.

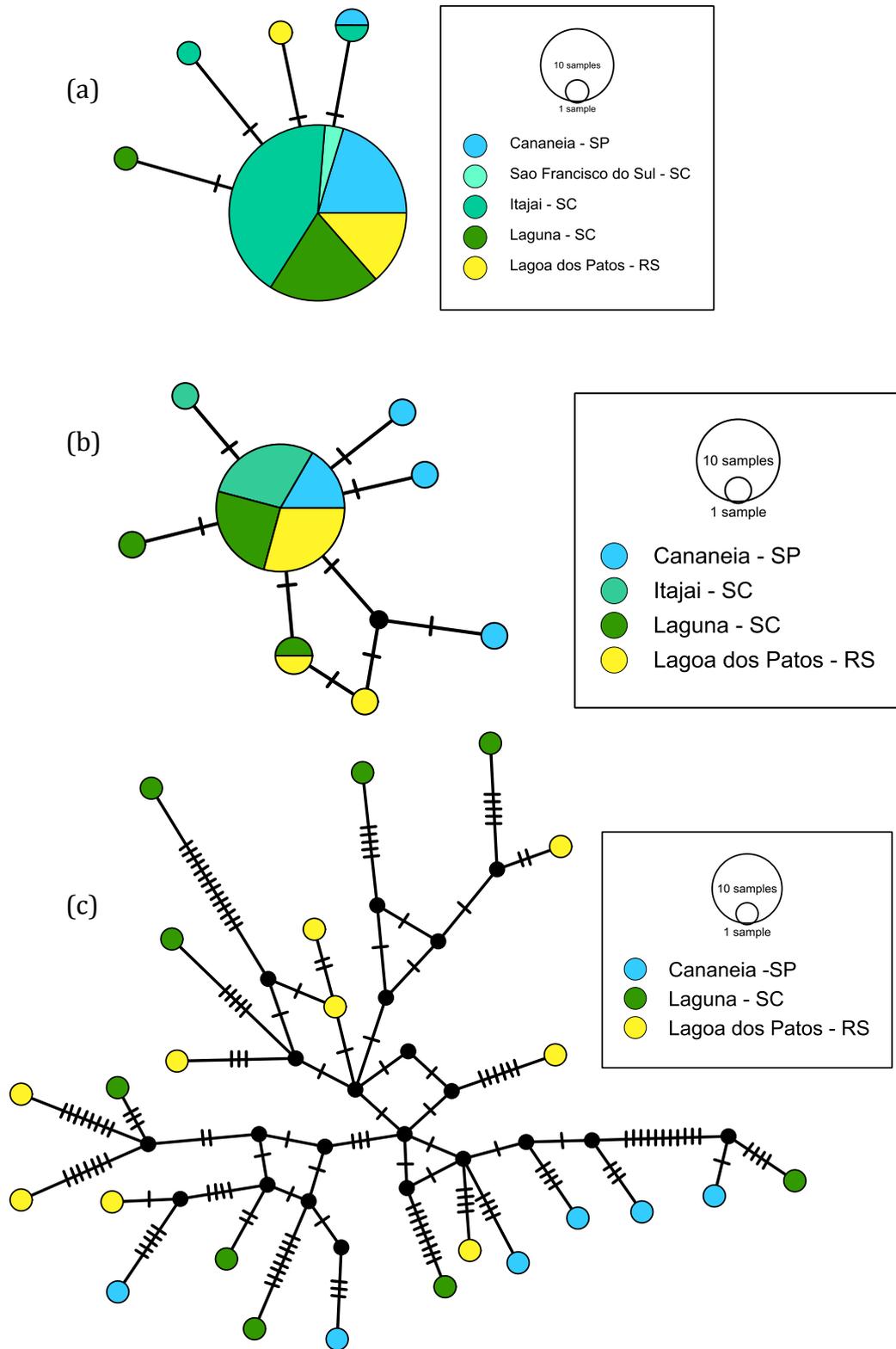


**Tabela 3.5:** Testes de neutralidade Tajima's D statistic (D - Tajima, 1989) e Fu's Fs statistical tests (Fs - Fu, 1997) e de expansão populacional ( $R_2$  - Ramos-Onsins e Rozas, 2002) dos quatro genes mitocondriais e seus  $p$ -value para as espécies *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus subtilis* II.

Loci	<i>Farfantepenaeus paulensis</i>						<i>Farfantepenaeus subtilis</i> II					
	D	p-value	Fs	p-value	$R_2$	p-value	D	p-value	Fs	p-value	$R_2$	p-value
16S	-1,76	$p > 0,05$	-5,42	0,00*	0,053	0,116	-0,74	$p > 0,10$	-2,46	0,045	0,097	0,134
COI	-2,54	$p < 0,001^*$	-16,43	0,00*	0,031	0,000*	-1,07	$p > 0,10$	-5,175	0,002*	0,080	0,001*
Cytb	-1,90	$p < 0,05^*$	-6,28	0,00*	0,055	0,000*	-1,29	$p > 0,10$	-5,391	0,000*	0,079	0,000*
Dloop	-1,81	$p < 0,05^*$	-12,69	0,00*	0,052	0,001*	-	-	-	-	-	-

(\*) Valores significativos

**Figura 3.5:** Median Joining networks da espécie *Farfantepenaeus paulensis* para três marcadores mitocondriais: a) 16SrRNA; b) Cytb; c) Dloop.

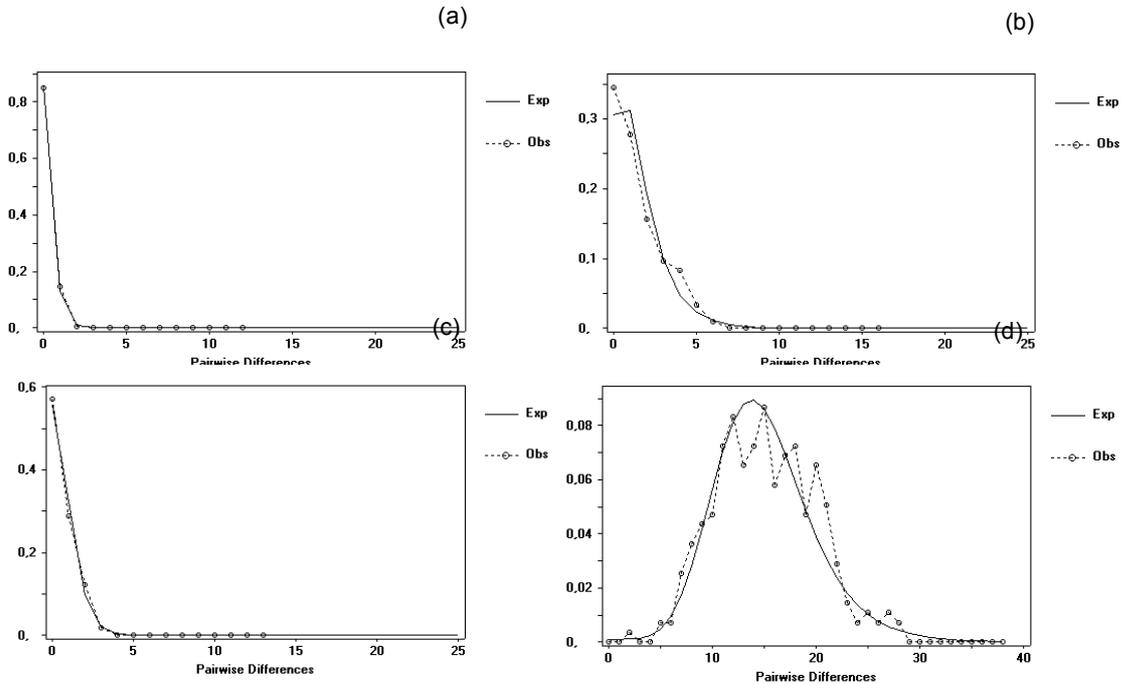


Os testes de AMOVA para todos os locos com diferentes agrupamentos dos locais amostrados também não foram significativos, demonstrando que a maioria da variação é encontrada dentro das populações. O teste de Mantel para verificar a presença de Isolamento por distância não apresentou valores significativos para nenhum dos marcadores analisados em *F. paulensis*.

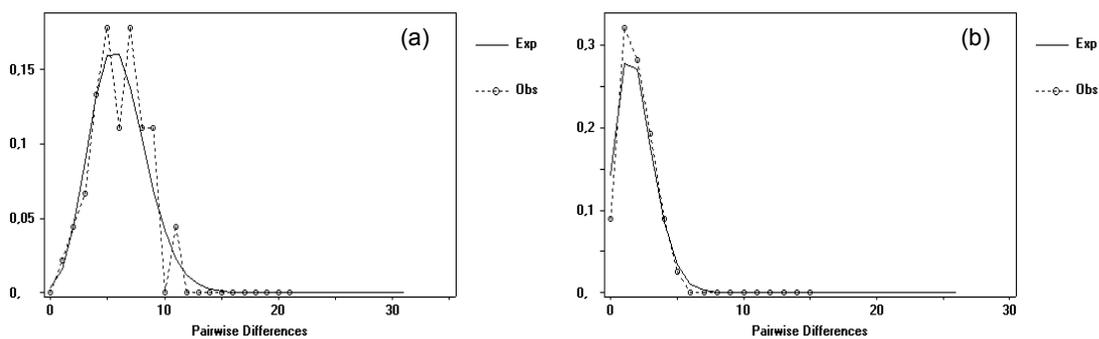
As análises de *mismatch distribution*, avaliando expansão demográfica e espacial realizadas em *F. paulensis* para os quatro locos (Figure 3.6) e em *F. subtilis* morfotipo II para COI e Cytb para (Figura 3.7), apresentaram curvas unimodais. A Soma dos Desvios dos Quadrados (SSD), para validar a expansão populacional, apresentou valores de p-value entre 0,4 a 0,9 para ambas as espécies analisadas, demonstrando que a curva observada não é diferente da esperada quando se considera uma população em expansão demográfica e espacial (Figura 3.6 e Figura 3.7).

O valor de  $T$  para o gene COI foi de 0,550 e 12,302 para o Dloop em *F. paulensis*. A análise de demografia histórica para esta espécie, calculando o tempo desde o início da expansão demográfica, apresentou valores de  $t(\text{COI}) \cong 16.600$  anos e  $t(\text{Dloop}) \cong 33.800$  anos. O *Bayesian Skyline plot* não foi sensível para captar a ocorrência de uma grande expansão pelo gene COI (Figura 3.8a). Porém, com o gene Dloop (Figura 3.8b) foi possível demonstrar uma expansão anterior a última glaciação máxima (27.000 a 18.000 anos atrás), resultado que se assemelha ao cálculo do tempo desde início da última expansão

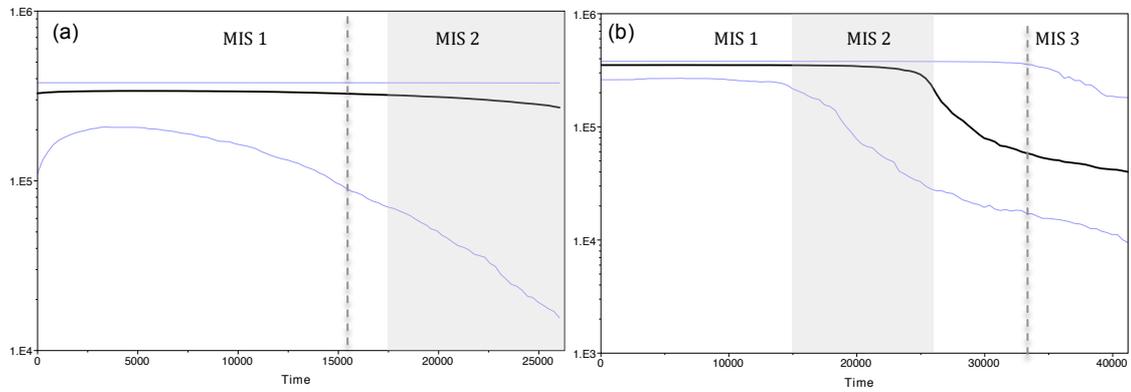
**Figura 3.6:** gráficos de *mismatch distribution* utilizando modelo de expansão demográfica para a espécie *Farfantepenaeus paulensis* em quatro marcadores mitocondriais: a) 16SrRNA (SSD = 0,0005 p-value = 0,4; Raggedness index = 0,51418 p-value= 0,7) b) COI (SSD = 0,00102 p-value = 0,9; Raggedness index = 0,02 p-value = 1,0), c) Cytb (SSD = 0,00049 p-value = 0,95; Raggedness index = 0,1179 p-value = 0,8) e d) Dloop (SSD = 0,005, p-value = 0,60; Raggedness index = 0,0078, p-value = 0,8).



**Figura 3.7:** Gráficos de *mismatch distribution* utilizando modelo de expansão demográfica para a espécie *Farfantepenaeus subtilis*: a) COI (SSD= 0,008, p-value= 0,80; Raggedness index = 0,037, p-value= 0,70); B) Cytb (SSD= 0,004, p-value= 0,60; Raggedness index = 0,078; p-value= 0,50).



**Figura 3.8:** Bayesian Skyline plot divisões em cinza e branco representa os *Marine Isotopo Stage* (MIS): MIS3 – Interglacial período ~60ka 27ka BP (Van Meerbeeck *et al.*, 2009), MIS 2 - Last glacial maximum period ~27ka a 18ka e MIS 1 – Interglacial período ~18ka ao presente. Linha pontilhada representa o tempo estimado de expansão através da análise de *mismatch distribution*. a) COI; b) Dloop;



### 3.4 Discussão

As análises da região Dloop realizadas no gênero *Farfantepenaeus* da costa brasileira mostraram alto polimorfismo nas populações analisadas, com ausência de haplótipos compartilhados. Essa alta diversidade observada para a região controle parece ser uma característica comum entre os peneídeos. Resultados semelhantes foram observados para outras espécies do mesmo gênero, como, por exemplo, em *Farfantepenaeus duoaram* (McMillen-Jackson e Bert, 2004) e *Farfantepenaeus notialis* (Robainas-Barcia e García-Machado, 2012) e também em *Penaeus monodon* (Waqairatu *et al.*, 2012). Dessa maneira, as análises de Dloop se restringiram a apenas uma espécie, na qual o gene havia sido inicialmente testado.

A região 16S, por sua vez, apresentou-se extremamente conservada, evidenciando apenas um máximo de sete haplótipos na espécie *F. subtilis*. Esse alto conservadorismo do 16S tem se mostrado eficiente em análises de filogenia, evidenciando altos valores de suporte para árvores filogenéticas estabelecidas para espécies deste grupo (Lavery *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2011).

O estudo do gene COI também tem sido útil em estudos de filogenia de crustáceos, incluindo a família Penaeidae (Baldwin *et al.*, 1998; Maggioni *et al.*, 2001), auxiliando inclusive na identificação de espécies através do DNA barcoding (Carvalho-Batista *et al.*, 2014; Teodoro *et al.*, 2015). Chu *et al.* (2003) encontraram valores de polimorfismo para os genes 16S, COI e Dloop, na espécie *Fenneropenaeus merguensis*, similares aos encontrados no presente trabalho. Li *et al.* (2009) encontraram baixos valores de polimorfismo em *Fenneropenaeus chinensis* para gene COI ( $hd=0,48$  e  $pi=0,08$ ). Para *Artemesia longinaris*, Dumont *et al.*, (2009), encontraram valores de diversidade nucleotídica de  $hd=0,77$  e  $pi=0,006$  e  $hd=0,92$  e  $pi=0,017$  para os genes COI e Dloop, respectivamente. Em *Farfantepenaeus duoaram* também foram encontrados valores altos de  $hd=1,0$  e  $pi=0,018$  para o gene Dloop (McMillen-Jackson e Bert 2004).

O gene Cytb é amplamente usado em análises de diversidade genética no grupo animal, se apresentando, em geral, mais conservado que o gene COI (Arif e Khan, 2009). O Cytb já vem sendo usado em estudos de estruturação populacional e filogeografia em Crustáceos. Em caranguejos *Callinectes bellicosuse*, por exemplo, o Cytb tem demonstrado ser mais conservado que o gene COI (Pfeiler *et al.*, 2005). Já nos lagostins do gênero *Cherax*, o inverso parece ocorrer, sendo o gene Cytb mais variável que o COI (Munasinghe *et al.*, 2003).

Pascoal *et al.* (2008) desenvolveram um método PCR-AFLP utilizando 181pb do gene Cytb para identificação de seis espécies de Penaeidae em alimentos comercializados processados e não processados. Tian-Jun *et al.* (2009) utilizando o gene Cytb avaliaram a diferenciação e estruturação de quatro estoques de *Marsupenaeus japonicus*, encontrando diferentes valores de diversidades nucleotídicas entre estes. Apesar desses estudos, análises com o gene Cytb em Penaeidae são escassas, principalmente em estudos de filogenia e filogeografia. Consequentemente, pouco se sabe sobre os padrões de polimorfismos no gênero *Farfantepenaeus*, sendo este o primeiro trabalho em camarões peneídeos a ser de realizado com o gene Cytb.

### **3.4.1 *Farfantepenaeus subtilis* e *Farfantepenaeus brasiliensis***

Todos os testes realizados para investigar a estruturação populacional em *F. subtilis* morfotipo II apontam para existência de uma única população distribuída ao longo do litoral do nordeste ao sul do Brasil. Houve compartilhamento de haplótipos dos genes 16S e Cytb entre todas as regiões amostradas. Em peixes, um estudo similar realizado por Rocha *et al.* (2002) e três espécies de recifes não apontou diferenciação das populações no litoral do Brasil. Rodríguez-Rey *et al.* (2013), analisando a estrutura populacional na lagosta *Scyllarides brasiliensis*, espécie que similarmente à *F. subtilis* possui larva pelágica, evidenciou a existência de uma única população ao longo da costa do Ceará ao Espírito Santo, não encontrando qualquer sinal de diferenciação

entre as populações do nordeste e sudeste do Brasil. Gusmão *et al.* (2005) também apontaram para existência de uma única população de *L. schmitti* e *F. brasiliensis* em toda a costa do nordeste ao sul do país, porém, em *F. subtilis* morfotipo II, os autores encontraram diferenciação entre populações de três regiões amostradas no nordeste do Brasil. No presente trabalho, localidades diferentes das analisadas anteriormente por Gusmão *et al.* (2005) foram amostradas ao longo da costa brasileira. As análises realizadas aqui, no entanto, evidenciaram ausência de estruturação para as populações de *F. subtilis* morfotipo II avaliadas. Estes dados não corroboram com os encontrados por Gusmão *et al.* (2005) utilizando aloenzimas. O fato do presente estudo não ter apontado nenhuma diferenciação entre o nordeste e as demais áreas amostradas, pode ser devido ao marcador utilizado, uma vez que as aloenzimas podem estar refletindo uma dispersão intermitente ou episódios passados (Benzie, 2000).

Apesar da baixa amostragem das espécies *F. subtilis* e *F. brasiliensis*, o presente trabalho dá indícios de que as populações dessas espécies não se encontram geograficamente estruturadas ao longo da costa brasileira, ao menos quando marcadores mitocondriais são considerados. Marcadores mais polimórficos como microssatélites e SNP podem contribuir para estudar uma possível estruturação mais recente.

A espécie *F. subtilis* apresentou indícios de recente expansão populacional demográfica e espacial na análise de *mismatch distribution* e nos testes de neutralidade dos genes COI e Cytb. Devido ao baixo número de indivíduos amostrados nesta espécie não foi possível, no entanto, testar essa hipótese e confirmar os resultados apresentados. Em algumas regiões no sul do país (Itajaí e São Francisco do Sul), o número de indivíduos encontrados foi reduzido, o que já era esperado uma vez que a abundância dessa espécie nessas regiões parece ser baixa, o que pode justificar o fato de *F. subtilis* não ter sido anteriormente reportada nessas regiões.

Desde a descoberta da possível existência de duas distintas espécies para *F. subtilis*, poucos estudos foram realizados. Dessa forma, pouco se sabe sobre a biologia e dinâmica populacional dos morfotipos I e II de *F. subtilis* e o que está reportado não os considera como espécies distintas. Apesar da escassez de dados e falta de

embasamento teórico sobre a biologia dessas espécies, o presente trabalho evidenciou claramente altos valores de distância genética entre os dois morfotipos de *F. subtilis* para os três marcadores analisados, sendo observada ocorrência simpátrica dos mesmos no nordeste do país. Estes dados indicam mais uma vez que tais linhagens denominadas atualmente de morfotipos de fato tratam-se de espécies distintas, como sugerido por Gusmão *et al.* (2000) e Maggioni *et al.* (2001) e que trabalhos que priorizem a caracterização destas espécies precisam ser realizados.

Apesar da espécie *F. subtilis* estar listada na Normativa 189/2008 como uma das espécies em que é proibida a pesca na região compreendida entre Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (entre 1º de março a 31 de maio), sua distribuição geográfica ainda é reconhecida até Cabo Frio no Rio de Janeiro, como inicialmente proposto por Pérez-Farfante (1967). No entanto, o presente trabalho demonstra a necessidade de rever a área de distribuição dessa espécie no litoral brasileiro, qual deve ser expandida até Itajaí em Santa Catarina

### **3.4.2 *Farfantepenaeus paulensis***

A análise de Mantel realizada para as populações de *F. paulensis* entre os pares de localidades amostradas não demonstrou uma correlação significativa entre distância genética e distância geográfica, indicando ausência de isolamento por distância. Porém, não podemos descartar a possibilidade de isolamento por distância nesta espécie, pois não foi feita uma amostragem em toda a área de distribuição (cerca de 3.300km), uma vez que as populações estudadas aqui atingiram um raio de aproximadamente apenas 800km. Esta distância pode não ser suficiente para promover isolamento por distância em *F. paulensis* devido à grande capacidade de dispersão da espécie.

O valor de  $\Phi_{ST}$  foi significativo para o gene COI para as populações de Cananéia e Lagoa dos Patos, indicando uma baixa estruturação (0,029;  $p < 0,05$ ). Gusmão *et al.*

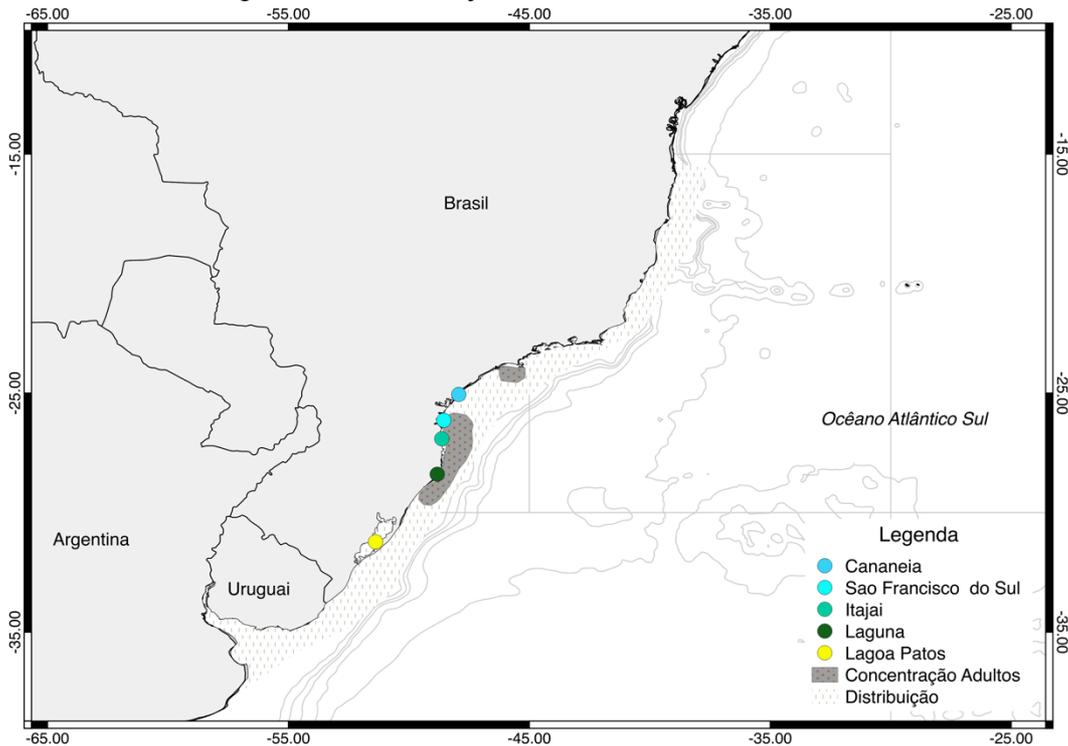
(2005), analisando aloenzimas para esta mesma espécie, encontraram altos valores de  $F_{st}$  significativos entre a população de Lagoa dos Patos (RS) e duas outras populações coletadas no litoral de Santos (SP) e do Rio de Janeiro (RJ). Os autores sugeriram que a estrutura detectada não devia a eventos biogeográfico históricos, mas sim a aspectos da biologia da espécie e existência de dois estoques reprodutores concentrados em distintas regiões geográficas.

Segundo uma revisão feita por D'Incao (1991), a principal região de pesca de *F. paulensis* localiza-se entre Santos e Torres (RS), onde a maior concentração de adultos se dá, principalmente, na plataforma continental do estado de Santa Catarina, mas também na plataforma do estado de São Paulo, situada entre as cidades de Santos e São Sebastião (Figura 3.9). Nas plataformas continentais do estado do Rio Grande do Sul e no Uruguai não há relatos de concentrações de indivíduos adultos. Em Lagoa dos Patos são encontrados indivíduos apenas em estágios de pós larvas, juvenis e pré-adultos, não sendo verificada a presença de adultos. Acredita-se que esses indivíduos da Lagoa dos Patos sejam oriundos de adultos reprodutores da plataforma continental do estado de Santa Catarina, uma vez que a presença de adultos na plataforma continental do Rio Grande do Sul é baixa, não sendo, portanto, capaz de contribuir de forma significativa com as pós arvas encontradas em Lagoa dos Patos (D'Incao, 1991). Essa dinâmica de dispersão e migração de *F. paulensis* nessa região pode explicar o fato das amostras de Lagoa dos Patos serem geneticamente iguais as da costa de Santa Catarina. Considerando que a região de Cananéia recebe indivíduos adultos do estado de São Paulo, devido a sua localidade e fluxo da corrente oceânica da Corrente do Brasil, seria esperado encontrar diferenças entre Lagoa dos Patos e Cananeia. Porém, as amostras de Cananéia não mostraram-se geneticamente diferenciadas de nenhuma amostra da região de Santa Catarina, evidenciando diferença significativa apenas com a Lagoa dos Patos.

De acordo com Palumbi (1994), uma baixa estruturação em ambientes marinhos, e longas distâncias, é comumente encontrado para animais com grande capacidade de dispersão e alta fecundidade. Assim, marcas de estruturação antigas, isolamento por distância, ou retenção de larvas devido a dinâmica de correntes são algumas

especulações teóricas que podem explicar tais resultados. Apesar disso, não podemos descartar a possibilidade de um desvio amostral, e deste valor significativo de  $\Phi_{ST}$  para o gene COI não refletir a realidade.

**Figura 3.9:** Mapa da distribuição da espécie *Farfantepenaeus paulensis*, apontando as locais amostrados e as regiões de concentrações de adultos.



Por outro lado, clinas genéticas, por exemplo, são caracterizadas como regiões geográficas onde duas populações geneticamente distintas inter cruzam (Avice, 2000). Em ambientes marinhos, clinas genéticas têm sido reportadas para alguns organismos como peixes *Sardina pilchardus* na costa da França (Laurent *et al.*, 2006), moluscos gastrópodes *Littorina saxatilis* na Espanha (Rolán-Alvarez *et al.*, 1997), bivalves *Perna canaliculu* na Nova Zelândia (Gardner e Wei, 2015) e crustáceos *Balanus glandula* no Pacífico (Sotka *et al.*, 2004) e *Callinectes sapidus* no Atlântico Norte (Mcmillen-Jackson

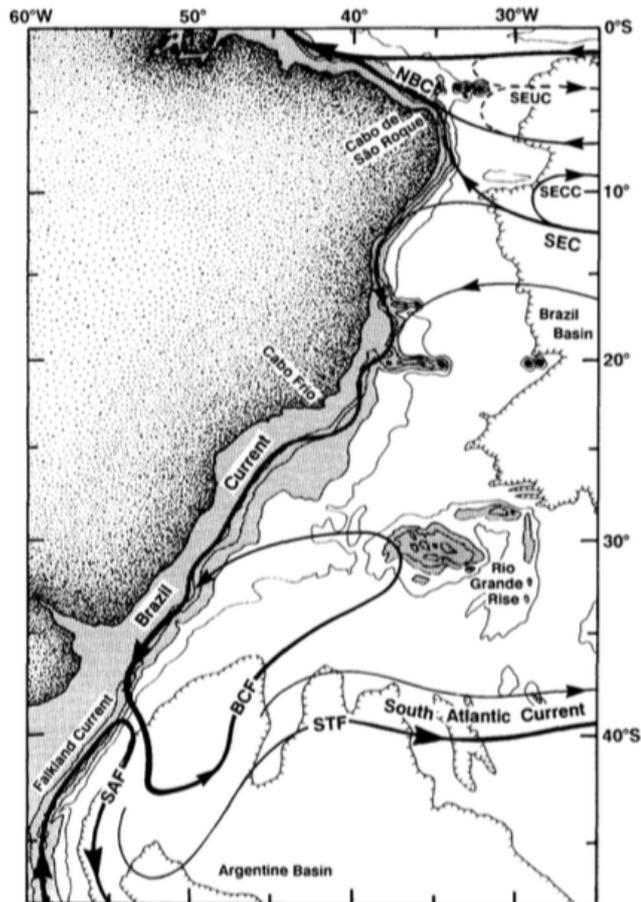
*et al.*, 1994). No presente trabalho, as três amostragens de Santa Catarina apresentaram semelhanças à amostragem de Cananeia e de Lagoa dos Patos, que por sua vez são diferentes entre si. Esta região pode se constituir em uma zona onde estas duas populações se misturam, já que a distribuição desta espécie é contínua e não existem barreiras físicas aparentes na região. Esta proposição sugere que o povoamento de Lagoa dos Patos seja feito por uma região não amostrada neste trabalho, ou de uma outra área de concentração de adultos, também não amostrada.

A Corrente Brasil (CB) é uma corrente de contorno que se origina ao Sul 10°S com a bifurcação da Corrente Sul Equatorial e influencia toda a região estudada. A CB flui do nordeste ao sul do país, onde forma a Frente Corrente Brasil (BCF) (Peterson e Stramma, 1991) (Figura 3.10). Na região sudeste ocorre a formação de pares vorticais (ciclones e anticiclones) que aparentemente não se desprendem da CB (Da Silveira *et al.*, 2000) (Figura 3.11). Esses vorticais podem estar provocando uma retenção maior de larvas provindas de região mais próximas, como, por exemplo, da área de concentração de adultos da plataforma de Santos. Este fato poderia favorecer uma estruturação neste local. Dessa forma, considerando a proximidade desta região com Cananéia e a direção do fluxo norte-sul da CB, os dados sugerem que a população de Cananéia recebia pós larvas oriundas de Santos, refletindo a estruturação observada nesta região.

Os testes de neutralidade e *mismatch distribution* indicaram expansão demográfica e espacial para essa espécie. Da mesma forma, a análise Bayesian Skyline plot apontou para uma grande expansão demográfica há aproximadamente 33 mil anos, quando o marcador Dloop foi avaliado. O cálculo de  $t = T/2\mu k$  (Rogers e Harpending, 1992) também indicou o mesmo resultado. Apesar de não ser clara a expansão quando analisamos o gráfico do gene COI, os testes realizados com este marcador também indicaram uma expansão, datada há aproximadamente 16 mil anos. Isso indica que essa expansão mais recente não tenha sido de grandes proporções. Assim, duas expansões foram detectadas uma ocorrendo antes da última era glacial máxima que ocorreu há aproximadamente entre 25-15mil anos e a segunda expansão no fim da última glaciação. Eventos de Glaciação ocorridos durante o Quaternário foram

os principais fatores que moldaram a distribuição dos dias atuais de fauna e flora no planeta. Expansões e contrações das placas de gelo fizeram com que muitas espécies procurassem refúgios em baixas latitudes (Provan e Bennett 2008).

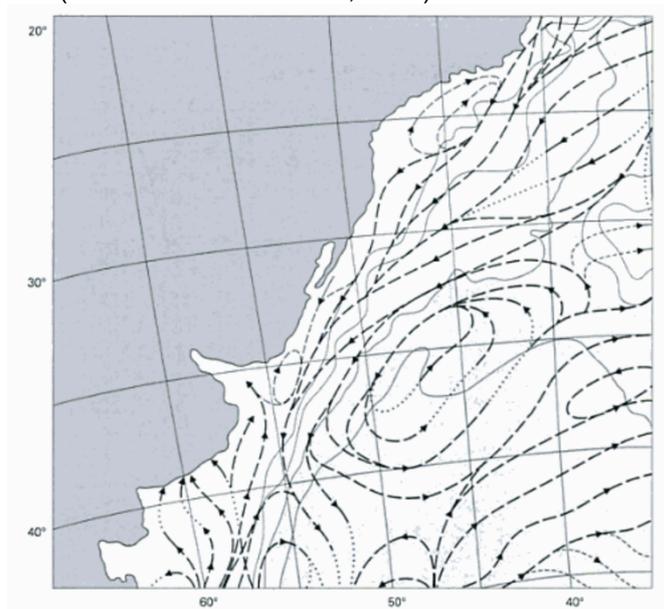
**Figura 3.10:** Ilustração esquemática da da região de influencia da Corrente do Brasil: North Brazilian Current (NBC), South Equatorial Undercurrent (SEUC), South Equatorial Countercurrent (SECC), South Equatorial Current (SEC), Subantarctic Front (SAF), Brazil Current Front (BCF), and Subtropical Front (STF) (retirado de Peterson e Stramma, 1991).



A fraca estruturação encontrada, portanto, também pode estar refletindo uma estruturação antiga formada na época da última glaciação, quando os níveis dos oceanos diminuíram. Com o recuo do mar, diferentes estoques podem ter sido mantidos em regiões geográficas distintas e sem conexão, propiciando estes se

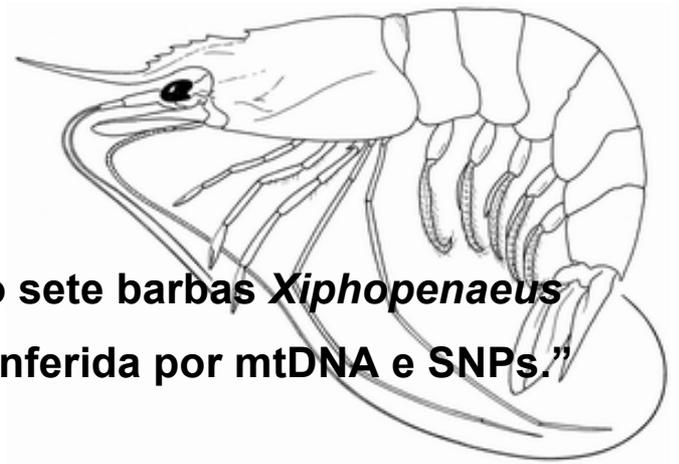
diferenciarem. Com a elevação posterior do mar, essas populações, no entanto, entraram novamente em contato e se expandiram espacialmente e demograficamente. Apesar de ter ocorrido fluxo gênico entre estas, essa diferenciação passada permanece no mtDNA. Dessa forma, uma atenção maior deve ser dada as regiões de Lagoa dos Patos e Cananéia devido à possível diferenciação entre populações da espécie *F. paulensis*, as quais podem representar linhagens evolutivas diferenciadas.

**Figura 3.11:** Corrente em superfície na costa sudeste e sul brasileira em fevereiro (retirado de Castro *et al.*, 2006).



# Capítulo 4

**“Estrutura genética no camarão sete barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea: Penaeidae) inferida por mtDNA e SNPs.”**



## 4.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Xiphopenaeus* (Smith 1869) compreendia inicialmente duas espécies: *Xiphopenaeus kroyeri*, de ocorrência no Atlântico Oeste, e *Xiphopenaeus riveti* do Leste Pacífico. Entretanto, devido a baixa divergência morfológica observada entre estas, uma revisão posterior, sinonimizou ambas as espécies em uma única: a *X. kroyeri*. Entretanto, em 2006, um amplo estudo realizado apontou para existência de grandes diferenças genéticas entre as populações de *Xiphopenaeus* dos diferentes oceanos, sugerindo a existência de uma terceira espécie no Atlântico, críptica à *X. kroyeri* (Gusmão *et al.*, 2006).

A espécie *X. kroyeri* (Heller 1862), conhecida como camarão sete barbas no Brasil e *seabob* mundialmente, ocorre desde a Carolina do Norte (EUA) até Santa Catarina no Brasil. Esta é mais abundante em profundidades com mais de 27 m e pode atingir comprimentos superiores a 100mm (Alves e Rodrigues, 1977). A maior abundância dessa espécie se dá em temperaturas maiores que 20°C e em áreas onde o sedimento é composto por silte, argila e areia fina ou muito fina (Almeida *et al.*, 2012).

Acreditava-se no passado que o gênero *Xiphopenaeus* possuía o ciclo reprodutivo típico dos peneídeos, no qual as pós-larvas procuram regiões estuarinas para se desenvolver e crescer até a fase pré-adulta, migrando posteriormente para a plataforma continental (Dall *et al.*, 1990). Estudos mais recentes com este gênero, no entanto, mostraram que o ciclo de desenvolvimento de *X. kroyeri* ocorre apenas na plataforma continental, onde representantes de todos os estágios podem ser encontrados, indicando que esta espécie não depende do estuário para completar seu ciclo de vida (Castro *et al.*, 2005). Espécies de Penaeidae possuem comumente reprodução durante todo o ano, apresentando dois picos principais. De acordo com a revisão de Santos *et al.* (2006), existe uma variação sazonal e espacial na reprodução de *X. kroyeri* ao longo da costa oeste do Atlântico.

Nas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil, esta espécie é o principal alvo na pesca de camarão, sendo altamente sobreexplorada em todas as regiões de sua ocorrência (Almeida *et al.*, 2012). Muitos estudos tem sido realizados para levantamento de dados relativos à pesca e biologia desta espécie em todo litoral brasileiro. Em Santa Catarina, Bail e Branco (2007), destacam a importância sócio-econômica e cultural deste importante recurso pesqueiro. Um estudo sobre a biologia reprodutiva e recrutamento desta espécie foi realizado por Almeida *et al.* (2012) na região de Ubatuba (SP). Alves e Rodrigues (1977) estudaram a reprodução na costa do Ceará e Branco *et al.*, (1994) estabeleceram a curva de crescimento para populações de *X. kroyeri* da região de Matinhos (PR), concluindo que a espécie apresenta crescimento rápido com ganho de peso alométrico.

Estudos genéticos nesta espécie, porém, são raros. Voloch e Solé-Cava (2005), realizaram o primeiro estudo genético da espécie no Brasil. Análises de aloenzimas apontaram estruturação entre populações amostradas em três distintas regiões. Gusmão *et al.* em 2006, utilizando aloenzimas e o gene mtDNA COI, sugeriram a existência de três espécies para o gênero *Xiphopenaeus* e de estruturação populacional entre populações do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Bahia. Martinelli-Lemos *et al.*, (2014), através de marcadores VNTR, encontraram estruturação genética entre amostras do Pará e amostras oriundas de três regiões do nordeste do Brasil. Já De Francisco (2009), utilizando quatro loci microssatélites, encontrou valores baixos de  $F_{ST}$  baixos, porém significativos, entre populações de Ubatuba, Guarapari e Macaé, destacando a presença de duas populações não geograficamente estruturadas ao longo da área amostrada.

Apesar desses estudos, análises genéticas em *X. kroyeri* são ainda necessárias para auxiliar a compreender melhor a sua diversificação e a distribuição dessa(s) espécie(s) ao longo de sua(s) área(s) de ocorrência. Tais dados podem ser úteis para auxiliar o estabelecimento de planos de manejo mais adequados para exploração desse importante recurso pesqueiro. Neste capítulo, distintas populações de *X. kroyeri*, foram avaliadas com o intuito de investigar a existência de sinais filogeográficos que permitam inferir sobre aspectos relevantes relacionados aos processos históricos possivelmente

responsáveis pela distribuição geográfica dessa espécie e de suas populações ao longo da costa brasileira. Para tanto, foram utilizados marcadores de mtDNA e dados de polimorfismos únicos de nucleotídeos (SNPs) produzidos pela tecnologia de próxima geração.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Amostragem**

Foram amostrados 92 espécimes de camarão da espécie *Xiphopenaeus kroyeri* ao longo do litoral brasileiro, e em uma região em Caracas na Venezuela (Figura 4.1) totalizando 11 locais amostrados. Os espécimes foram amostrados com a ajuda de pescadores locais e ou fornecidos por colaboradores. Cada espécime foi retirado uma porção de músculo sendo conservado em álcool e refrigerado até a extração de DNA.

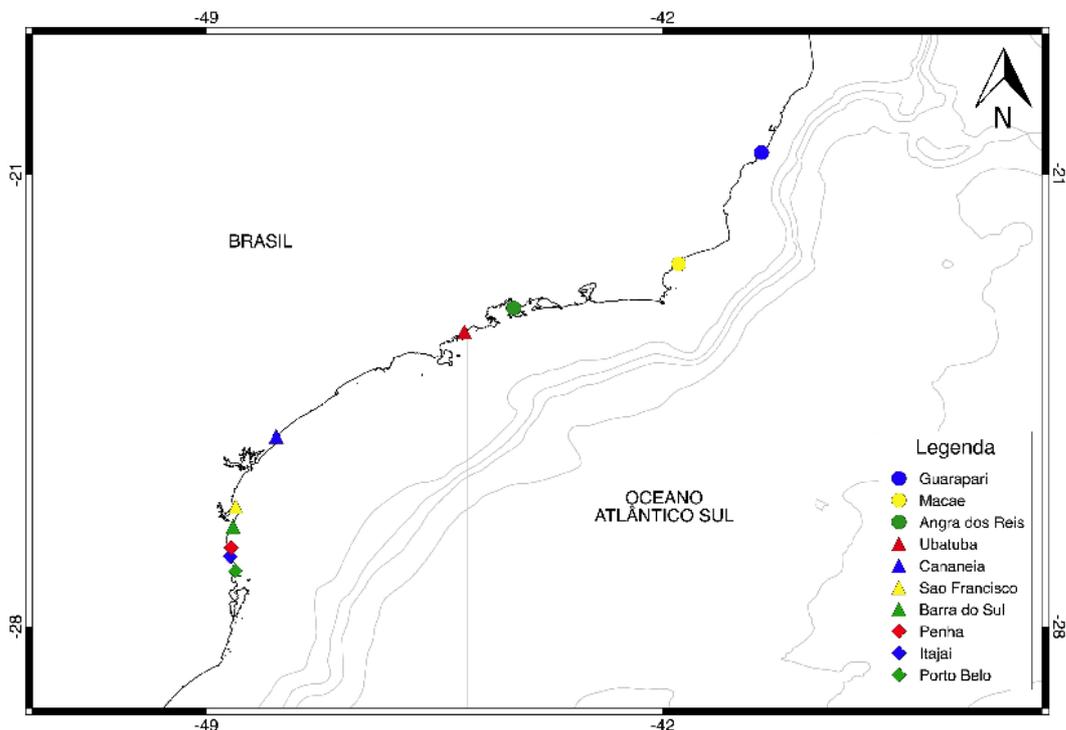
### **4.2.2 Marcadores mitocondriais**

As extrações de DNA foram realizadas segundo protocolo de Sambrook; Fritsch; Maniatis, (1989). Os DNAs foram analisados segundo a qualidade, quantificados em BioPhotometer (Eppendorf) e armazenados a -20°C. Foram amplificadas três regiões mitocondriais: Citocromo oxidase subunidade I gene (COI), subunidade ribossomal do RNA (16S) e Citocromo b (Cytb). Os *primers* utilizados nas ampliações foram aqueles já descritos anteriormente pra a família Penaeidae no capítulo 1.

As análises de diversidade genética para estabelecimento do número de haplótipos, diversidade haplotípica (Hd), sítios polimórficos (S) e diversidade

nucleotídica ( $\pi$ ) foram realizadas no DNAsp v5 (Librado e Rozas, 2009) para cada um dos marcadores amplificados. Os dados de estruturação populacional foram obtidos através do cálculo de  $\Phi_{ST}$  (distância par a par), teste exato de diferenciação e AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*), utilizando significância de  $p < 0,05$  testada através de permutações dos haplótipos (1023 permutações) no programa Arlequin v3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Para verificar graficamente a existência de estruturação foram construídas redes de haplótipos, para os três locos, no programa PopArt (<http://popart.otago.ac.nz>), usando o algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999). O teste de Mantel, para investigar a presença de isolamento por distância, verificando a correlação entre as matrizes par a par de distância genética e distância geográfica para as regiões amostradas, foi executado no Fstat (Goudet, 2002).

**Figura 4.1:** Mapa destacando os locais de amostrados no Brasil



Testes de neutralidade Tajima's  $D$  statistic (Tajima, 1989) e Fu's  $F_s$  statistical tests (Fu, 1997) para cada loco foram calculados no programa DNAsp v5 (Librado e Rozas, 2009). Para análises de mudança temporal no tamanho populacional foi realizada a análise  $R_2$  (Ramos-Onsins e Rozas 2002) e seus intervalos de confiança foram calculados no DNAsp. A análise de *mismatch distribution* e a significância do modelo de expansão demográfica e espacial (Excoffier, 2004) através da Soma do Desvio dos Quadrados (SSD) (Schneider e Excoffier, 1999) foram realizados no DNAsp e Arlequin v3.5 (Excoffier e Lischer, 2010).

#### 4.2.3 Restriction site-associated DNA Sequencing (RAD-Seq)

Um sub conjunto de 47 indivíduos de cinco diferentes locais amostrados [Guaraparí-ES (10), Macaé-RJ (11), Angra dos Reis-RJ (10), Cananéia-SP (8), Itajaí-SC (8)] foi utilizado para a montagem das bibliotecas de *RAD-seq (Restriction site-associated DNA Sequencing)*, construídas de acordo com o protocolo desenvolvido por Peterson *et al.*, (2012). As 47 amostras tiveram o seu DNA extraído com kit DNeasy spin column (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, afim de obter um DNA de boa qualidade. A digestão do DNA foi realizada com duas enzimas de restrição, SphI e MluCI (New England Biolabs), sendo este par de enzimas selecionado de acordo com os dados disponíveis em Peterson *et al.* (2012). A reação foi feita em placa e incubada a 37°C por três horas, com volume total de 50µL contendo 400ng de DNA e as enzimas SphI e MluCI em concentrações sugeridas pelo fabricante.

O DNA digerido foi então lavado com Dynabeads M-270 Streptavidin (Life Technologies) em uma plataforma magnética para placas 96 *well*. O volume de beads utilizado foi de 1.8x o volume da reação. O DNA obtido foi quantificado em Qubit® Fluorometer (Invitrogen). Nesta etapa, foi verificado se após todos os passos descritos acima as amostra continham a concentração de DNA mínima de 3,30ng/µL, necessária

para continuar as etapas seguintes. Aquelas amostras que apresentaram valores insuficientes foram submetidas a digestão e lavagem com *beads* novamente.

Cada amostra foi ligada a um adaptador *barcode* (P1) e a um adaptador *universal* (P2), necessários para a identificação dos reads e individualização das amostras. Um total de 24 *barcodes* distintos foram utilizados. Como o número de amostras superou o número de *barcodes*, a cada 24 indivíduos os adaptadores *barcodes* se repetiram. A reação de ligação foi realizada em placa contendo 40µL de volume final, sendo 10xT4Buffer (4µL), 0.18pmol/µL P1 adapter (2.0µL), 3.64pmol/µL P2 adapter (2µL), T4 Ligase (2µL) e 3,30ng/µL DNA digerido (30µL). As placas foram mantidas em termociclador MyCycler™ (Bio-Rad) programado com ciclo de 30min a 37°C, 65°C por 10min, diminuindo-se 2°C a cada 90s 23 vezes, permanecendo ao final em temperatura de 20°C.

Cada 12 indivíduos, marcado com diferentes *barcodes*, foi reunido em um pool, formando-se quatro diferentes pools. Posteriormente, foi realizada mais uma limpeza com Dynabeads (como já descrito) para retirada dos reagentes e adaptadores excedentes. A seleção dos fragmentos foi realizada de acordo com os tamanhos (de 375-450 bp) em Pippin Prep (Sage Science) para cada pool. Após a seleção, cada pool foi ligado a um Illumina index único, utilizando o kit real-time library amplification (Kapa Biosystems). Dessa forma, cada amostra obteve uma combinação de Barcode+index única, possibilitando a individualização das mesmas. Foi realizada mais uma limpeza com Dynabeads e, por fim, os DNAs foram aliquotados a concentração de 2pmol/µL. Os pools foram quantificados utilizando-se o kit High Sensitivity DNA em equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). O sequenciamento de próxima geração (NGS ou next-gen) foi feito em plataforma Illumina HiSeq 2000 (100 bp single end reads).

O pipeline Stacks (Catchen *et al.*, 2011 e 2013) foi utilizado para análise dos *raw reads* e identificação dos loci e alelos. O pipeline Stacks possui vários componentes, dentre os quais foram utilizados os programas *process\_radtags*, *denovo\_map* e *populations*. O programa *process\_radtags* analisa os *raw reads* sequenciados em *Illumina* (FASTQ formato). *Raw reads* são checados quanto a integridade e presença dos sítios de restrição e *barcodes*. Cada read é analisado quanto aos valores médios

de qualidade de basecall Reads com valores menores que 90% de probabilidade de estar correto (raw phred score de 10) foram descartados. Cada combinação de barcode+index utilizada na montagem da biblioteca é identificada, e individualizada. Os *reads* são então trimados para retirada dos adaptadores e index.

O programa *denovo\_map* executa três componentes *Stacks*: *ustacks*, *cstacks* e *sstacks*. O *ustacks* é executado para cada amostra individualmente, construindo os loci e nomeando os SNPs, através de dois passos principais. Primeiro os reads idênticos são empilhados formando os stacks (alelos). Uma cobertura mínima de três reads (-m 3) foi exigido para produzir os stacks iniciais. Aqueles stacks com cobertura inferior a estabelecida são classificados como reads secundários, colocados a parte e posteriormente analisados. Uma vez gerado o conjunto de stacks idênticos, o segundo passo é combinar os stacks em loci. Um importante parâmetro nessa etapa é a distância permitida entre os stacks. Este parâmetro estipula o número de nucleotídeos que pode ser diferente entre os stacks para agrupá-los em loci. Neste experimento foi usado três (-M 3). Com os loci já formados, são incorporados os reads secundários, deixados a parte, anteriormente, onde novamente foi atribuído uma distância (-N 5), permitida entre os loci e reads secundários.

Os loci de cada amostra foram colocados em um catálogo através do *cstacks*. O catálogo continha todos os loci de todas as amostras. Dessa forma, os loci foram comparados dentro do catálogo através de sequências consenso de cada locus. Novamente uma distância mínima permitida entre loci no catálogo foi estipulada (-n 19) e os loci que obedecerem o critério foram agrupados. Finalmente *sstacks* foi executado para coincidir cada amostra contra o dicionário formado por *cstacks*.

Por último o programa *populations* foi executado para formar um conjunto de loci utilizando três parâmetros principais: (1) -r : A porcentagem mínima requerida de indivíduos em uma população para processar um locus para aquela população. Foi utilizado valor 0.7, ou seja, 70% da população tem que ser genotipada para que um determinado locus entre no conjunto de loci a ser analisado, permitindo, portanto, apenas 30% de missing data por locus; (2) -m: Especifica a profundidade mínima de cobertura que um determinado locus deve ter por indivíduo (utilizamos cobertura de 7);

e (3) -p: Número mínimo de populações que o locus deve estar presente. Utilizamos o valor de -p igual a 4 (Guarapari+Macaé, Angra dos Reis, Cananéia e Itajaí) devido a maioria das amostras de Guarapari apresentarem baixo número de reads, sendo portanto descartados. Juntamente com esses três parâmetros também foi implementada a opção “write\_single\_snp” que assume apenas um SNP por locus evitando desequilíbrio de ligação.

O programa *populations* forneceu o output de um conjunto de loci nos formatos, Fasta, Genepop (Rousset, 2008) e STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), os quais foram convertidos para outros formatos pelo softwares PGDSpider 2.0 (Lischer e Excoffier, 2012). O índice de diversidade molecular e Fst par a par entre as quatro áreas de coleta estudadas foram calculados com o software Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier e Lischer, 2010) com todos os 2949 Loci selecionados pelo pipeline Population\_map. Foi verificado os loci sob seleção através da análise FDIST (Beaumont e Nichols, 1996) realizada no programa Arlequin v3.5.1.2 com 2000 simulações, sendo 100 demes por simulação para detectar quais loci se comportam de forma neutra, sob seleção balanceada ou seleção direcionada. Para outliers foram considerados os loci dentro do índice de confiança de 5%. Os loci que se comportaram sob seleção direcionada e balanceadora foram anotados utilizando a ferramenta Blastn implementada no programa Geneious R6 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012).

A análise bayesiana foi realizada com o software STRUCTURE v 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) considerando variação de k=1 a k=10, com 50000 burning e MCMC 500000, tendo 7 corridas para cada k. A correção de Evanno foi realizada no STRUCTURE HARVESTER (Earl e vonHoldt, 2012) um programa *web-based*, que possibilita identificar o k ideal para os dados analisados. A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi realizada no GenALEX 6.5 (Peakall e Smouse, 2006 e 2012) utilizando matriz de distância genética.

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Marcadores mitocondriais

Os índices de diversidade dos três locos mitocondriais mostraram que o gene mais conservado foi o 16SrRNA e o mais diverso foi o COI, evidenciando diversidade haplotípica de 0,88 (Tabela 4.1). Todos os testes de neutralidade (Tabela 4.2) foram negativos e significativos para o gene Cytb. Para os outros dois marcadores (16S e COI) apenas o teste  $R_2$  apresentou-se significativo, mostrando indícios de expansão populacional.

**Tabela 4.1:** Índices de diversidade dos três marcadores mtDNA para a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* onde (N) número de sequências, (pb) n° de pares de bases, (S) sítios polimórficos, (G+C) quantidade de G e C, (h) número de haplótipos, (Hd) diversidade haplotípica e (Pi) diversidade nucleotídica.

Marcador	N	pb	S	G+C	h	Hd	Pi
16S	36	354	1	0.305	2	0.105	0.00030
COI	35	829	18	0.406	16	0.884	0.00263
Cytb	61	684	15	0.382	14	0.545	0.00167

**Tabela 4.2:** Testes de neutralidade Tajima's D statistic (D - Tajima, 1989), Fu's Fs statistical tests (Fs - Fu, 1997) e  $R_2$  (Ramos-Onsins and Rozas, 2002) dos três genes mitocondriais e seus p-value para a espécie *Xiphopenaeus kroyeri*.

Marcador	D	p-value	Fs	p-value	R2	p-value
16S	-0.819	p > 0,10	-0.621	0.126	0.054	0.000*
COI	-1.675	p > 0,05	-9.869	0,003	0.054	0.007*
Cytb	-1.999	p < 0,05*	-9.714	0,000*	0.038	0.011*

(\*) valores significativos

A análise de  $\Phi_{ST}$  para investigar a estruturação populacional (Tabela 4.3) apresentou valores significativos entre dois pares de locais amostrados [Cananea e

Venezuela (0,237 p=0,03) e Cananeia e Guarapari (0,281 p=0,00)], com o gene COI. Já o teste exato de diferenciação não foi significativo para os pares analisados com este mesmo gene. A análise do  $\Phi_{ST}$  para o gene Cytb mostrou oito valores significativos para os pares de locais amostrados, os quais variaram de 0,21 a 0,67 (Tabela 4.4). O teste exato de diferenciação por sua vez apresentou 14 pares divergindo significativamente (Tabela 4.5). A AMOVA foi significativa apenas para o gene Cytb. Apesar de 70% da variação estar dentro das populações, quase 24% pode ser encontrada entre os grupos que, por sua vez, foram formados levando em consideração os resultados apresentados no  $F_{ST}$ : (Venezuela), (Guarapari), (Macaé), (Angra dos Reis, Ubatuba, Cananeia) e (São Francisco do Sul, Barra do Sul, Penha, Itajaí, Porto Belo) (Tabela 4.6).

O teste de Mantel entre as variáveis distância geográfica e  $F_{ST}$  mostrou uma correlação de  $r = 0,007138$  e  $r^2 = 0,01\%$  para o Cytb, indicando que esta estruturação não se dá pela distância entre as populações. Fatores como barreiras geográficas e/ou ecológicas podem ser responsáveis por esta estruturação.

O gene 16S não mostrou resultados significantes para nenhuma análise de estruturação genética. A rede de haplótipos para este gene também não apontou estruturação geográfica (Figura 4.2). A rede de haplótipos com o gene COI (Figura 4.3) mostrou compartilhamento de dois haplótipos mais comuns entre a maioria das regiões amostradas, exceto Guarapari. A rede de haplótipos com o gene Cytb (Figura 4.4) mostrou um haplótipo comum às regiões do estado do Rio de Janeiro e ao sul em Porto Belo, não compartilhando este haplótipo com as regiões de Guarapari e Venezuela, as quais apresentam uma maior diversidade de haplótipos que as outras regiões amostradas.

A análise de *mismatch distribution* mostrou valores de SSD não significativos para os genes 16S e COI, mostrando que as curvas não desviam quando o modelo de expansão demográfica (Figura 4.5a e 4.5b) e espacial (SSD=0,000075 p-value=0.18000 para o gene 16S e SSD=0,00214 p-value=0.5900 para gene COI) é considerado. Para o gene Cytb, o valor de SSD mostrou-se significativo (p-value=0,000) para a análise de expansão demográfica. Porém, estes valores não foram significativos quando consideramos o modelo de expansão espacial, (SSD= 0,000472 p= 0,88000).

**Tabela 4.3:** Matriz dos valores de  $\Phi_{ST}$ , método de distância par a par (diagonal abaixo) e seus valores de  $p$ -value +- desvio padrão (diagonal acima) para o gene COI em *X. kroyeri* (nível de significância 0,05).

	Venezuela	Guarapari	Macaé	Angra dos Reis	Ubatuba	Cananeia	São Francisco	Itajaí	Porto Belo
Venezuela	-	0.25+-0.05	0.46+-0.046	0.46+-0.04	0.33+-0.04	0.03+-0.01	0.11+-0.02	0.37+-0.06	0.11+-0.01
Guarapari	0.175	-	0.14+-0.03	0.30+-0.05	0.45+-0.04	0.00+-0.00	0.07+-0.01	0.15+-0.05	0.07+-0.02
Macaé	-0.026	0.058	-	0.86+-0.02	0.88+-0.02	0.25+-0.03	0.54+-0.07	0.36+-0.01	0.10+-0.01
Angra dos Reis	0.059	0.164	-0.207	-	0.99+-0.00	0.99+-0.00	0.99+-0.00	0.99+-0.00	0.34+-0.04
Ubatuba	0.059	0.164	-0.207	-1.000	-	0.99+-0.00	0.99+-0.00	0.99+-0.00	0.32+-0.06
Cananeia	0.237*	0.281*	0.065	-0.31	-0.313	-	0.32+-0.03	0.54+-0.03	0.06+-0.01
São Francisco	0.356	0.442	-0.047	0.000	0.000	0.226	-	0.40+-0.04	0.36+-0.02
Itajaí	0.133	0.200	0.020	-0.302	-0.302	-0.029	0.111	-	0.11+-0.02
Porto Belo	0.356	1.000	0.165	0.667	0.667	0.481	0.442	0.314	-

(\*) valores significativos

**Tabela 4.4:** Matriz dos valores de  $\Phi_{ST}$ , método de distância par a par (diagonal abaixo) e seus valores de  $p$ -value +- desvio padrão (diagonal acima) para o gene Cytb em *X. kroyeri* (nível de significância 0,05).

	Venezuela	Ubatuba	Cananeia	São Francisco do Sul	Itajaí	Angra dos Reis	Macaé	Guarapari	Porto Belo	Penha	Barra do Sul
Venezuela	-	0.00+-0.0	0.00+-0.0	0.00+-0.0	0.00+-0.0	0.00+-0.0	0.12+-0.0	0.00+-0.0	0.00+-0.0	0.99+-0.0	0.02+-0.0
Ubatuba	0.51*	-	0.99+-0.0	0.68+-0.0	0.99+-0.0	0.99+-0.0	0.04+-0.0	0.00+-0.0	0.62+-0.0	0.99+-0.0	0.99+-0.0
Cananeia	0.45*	-0.059	-	0.99+-0.0	0.99+-0.0	0.99+-0.0	0.11+-0.0	0.05+-0.0*	0.99+-0.0	0.99+-0.0	0.99+-0.0
São Francisco do Sul	0.42*	0.02	0.00	-	0.99+-0.0	0.99+-0.0	0.06+-0.0	0.10+-0.0	0.99+-0.0	0.99+-0.0	0.99+-0.0
Itajaí	0.42*	-0.08	0.00	-0.03	-	0.99+-0.0	0.10+-0.0	0.07+-0.0	0.99+-0.0	0.99+-0.0	0.99+-0.0
Angra dos Reis	0.45*	-0.06	0.00	0.00	0.00	-	0.07+-0.0	0.08+-0.0	0.99+-0.0	0.99+-0.0	0.99+-0.0
Macaé	0.16	0.67*	0.67	0.55	0.63	0.67	-	0.28+-0.0	0.12+-0.0	0.99+-0.0	0.39+-0.0
Guarapari	0.21	0.21*	0.13	0.11	0.09	0.13	0.10	-	0.10+-0.0	0.99+-0.0	0.45+-0.0
Porto Belo	0.42*	0.02	0.00	0.00	-0.03	0.00	0.55	0.12	-	0.99+-0.0	0.99+-0.0
Penha	0.01	-1.00	0.00	-1.00	0.00	0.00	0.00	-0.68	-1.00	-	0.99+-0.0
Barra do Sul	0.34*	-0.18	0.00	-0.15	0.00	0.00	0.50	-0.02	-0.15	0.00	-

(\*) valores significativos

**Tabela 4.5:** Matriz dos valores de p-value do teste exato de diferenciação par a par usando o método de distância (abaixo da diagonal) e sua significância entre os pares de populações (acima da diagonal) para o gene *Cytb* em *X. kroyeri* (nível de significância 0,005).

Populações	Venezuela	Ubatuba	Cananéia	São Francisco do Sul	Itajaí	Angra dos Reis	Macaé	Guarapari	Porto Belo	Penha	Barra do Sul
Venezuela											
Ubatuba	0.00010+-0.0001										
Cananéia	0.00080+-0.0008	1.00000+-0.0000									
São Francisco do Sul	0.00695+-0.0021	0.62275+-0.0079	1.00000+-0.0000								
Itajaí	0.00125+-0.0004	1.00000+-0.0000	-1.00000+-1.0000	1.00000+-0.0000							
Angra dos Reis	0.00290+-0.0016	1.00000+-0.0000	-1.00000+-1.0000	1.00000+-0.0000	-1.00000+-1.0000						
Macaé	0.09255+-0.0084	0.03710+-0.0039	0.08005+-0.0023	0.08840+-0.0076	0.11162+-0.0039	0.08230+-0.0026					
Guarapari	0.08090+-0.0137	0.00025+-0.0003	0.00605+-0.0015	0.01400+-0.0033	0.01430+-0.0033	0.00565+-0.0022	0.71125+-0.0085				
Porto Belo	0.00525+-0.0016	0.61550+-0.0093	1.00000+-0.0000	1.00000+-0.0000	1.00000+-0.0000	1.00000+-0.0000	0.08490+-0.0051	0.00820+-0.0020			
Penha	0.54670+-0.0246	1.00000+-0.0000	-1.00000+-1.0000	1.00000+-0.0000	-1.00000+-1.0000	-1.00000+-1.0000	1.00000+-0.0000	0.77140+-0.0097	1.00000+-0.0000		
Barra do Sul	0.02535+-0.0033	1.00000+-0.0000	-1.00000+-1.0000	1.00000+-0.0000	-1.00000+-1.0000	-1.00000+-1.0000	0.39830+-0.0045	0.10950+-0.0071	1.00000+-0.0000	-1.00000+-1.0000	

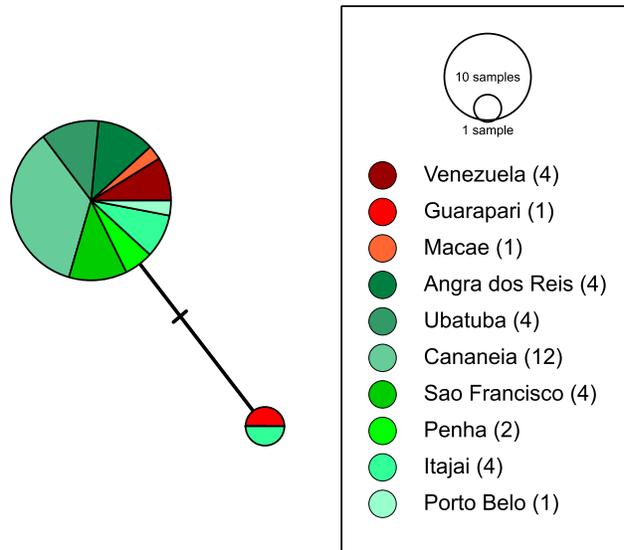
(+) Resultados significativos da probabilidade do teste de diferenciação par a par; (-) Resultados não significativos da probabilidade do teste de diferenciação par a par.

**Tabela 4.6:** Análise de Variância Molecular (AMOVA) para o gene *Cytb* *X. kroyeri* sendo onze locais amostrados distribuídas em cinco grupos ( $p=0,05$  com 1023 permutações).

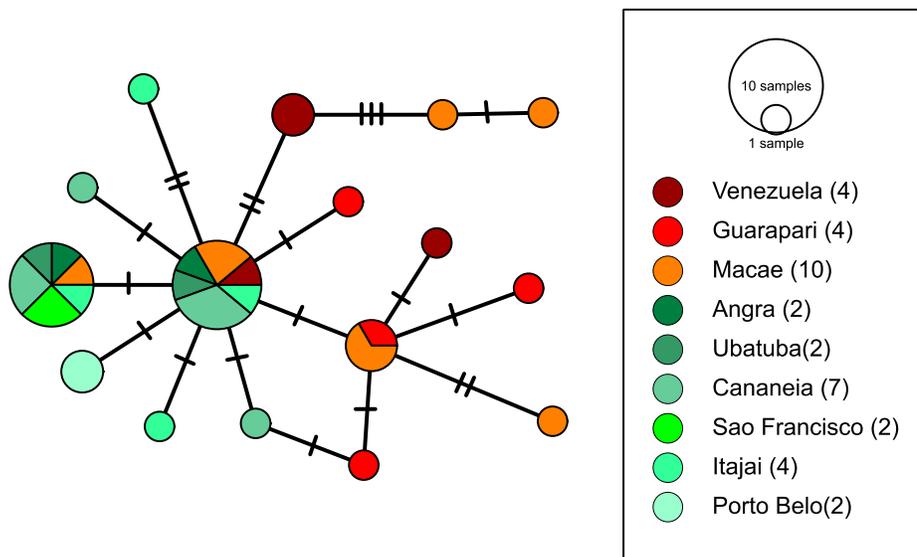
Fonte de Variação	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes da variância	% variação	Índice de Fixação	P-value
Entre grupos	3	8,037	0,14598 Va	23,64	FCT=0,236	0,02542+-0,00528*
Entre populações dentro dos grupos	7	2,382	0,035337 Vb	5,73	FST=0,075	0,02542+-0,00528*
Dentro das populações	50	21,811	0,43621 Vc	70,63	FIT=0,293	0,00000+-0,00000*

Grupos: {Venezuela} {Guarapari} {Macaé} {Angra dos Reis, Ubatuba, Cananéia} {São Francisco do Sul, Barra do Sul, Penha, Itajaí, Porto Belo}.

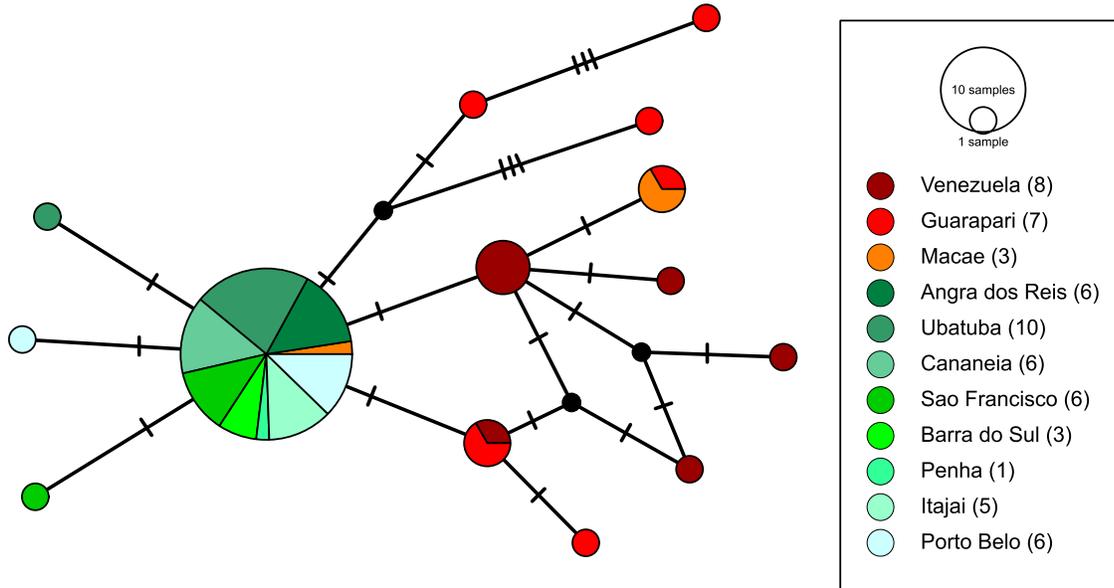
**Figura 4.2:** Rede de haplótipos *Median Joining* com o gene 16SrRNA para a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* em 10 regiões amostras e o número amostral entre parênteses.



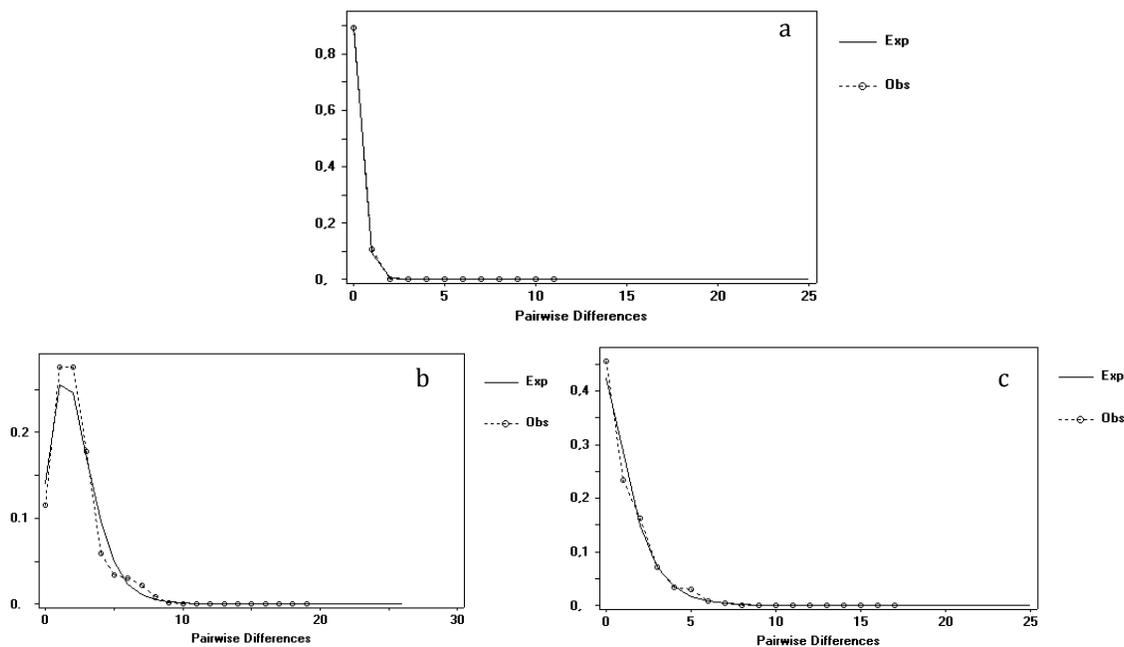
**Figura 4.3:** Rede de haplótipos *Median Joining* com o gene COI para a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* em 9 regiões amostras e o número amostral entre parênteses.



**Figura 4.4:** Rede de haplótipos *Median Joing* com o gene *Cytb* para a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* em 11 regiões amostras e o número amostral entre parênteses.



**Figura 4.5:** gráficos de *mismatch* distribution utilizando modelo de expansão demográfica para a espécie *X. kroyeri* em três marcadores mitocondriais: a) 16SrRNA (SSD = 0,00008; p-value = 0,25; Raggedness index = 0,6348; p-value = 0,75) b) COI (SSD = 0.002148 p-value = 0.590; Raggedness index = 0,05018 p-value = 0,410) e c) *Cytb* (SSD = 0,38608 p-value = 0,0000; Raggedness index = 0,063822 p-value = 1,000).



### 4.3.2 Marcadores SNPs (RAD-seq)

Foram gerados mais de 104 milhões de raw reads. Após executado o programa *process\_radtags* foram retidos mais de 91 milhões de reads, com as quantidades variando entre os indivíduos de 13 mil a 7.8 milhões. Após executar o algoritmo *denovo\_map.pl*, foram obtidos 1.894.856 stacks, com média de 41 mil por indivíduo, variando de 1 a 90 mil entre os indivíduos. Aquelas amostras que tiveram menos de 2 mil stacks foram descartadas das análises.

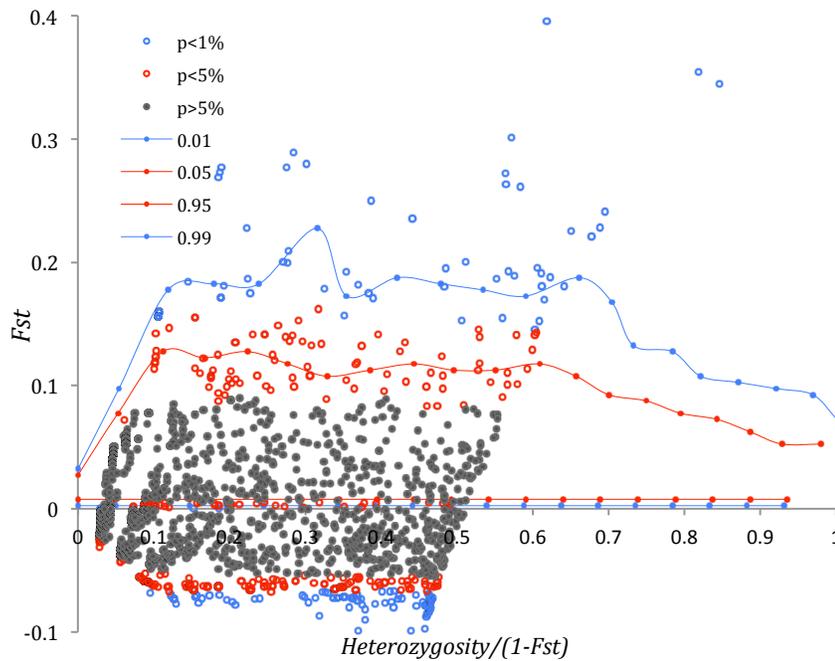
Ao todo, 33 amostras produziram resultados satisfatórios, sendo estas pertencentes a Guarapari (1), Macaé (6), Angra (10), Cananéia (8) e Itajaí (8). Das 10 amostras de Guarapari, apenas uma obteve *stacks* suficientes para continuar as análises. Este fato pode ter ocorrido devido ao mau estado de conservação do tecido e consequentemente má qualidade do DNA obtido. Dessa forma, nas análises seguintes a única amostra de Guarapari foi agrupada à população de Macaé, devido a proximidade geográfica entre as duas.

O programa *populations*, considerando os critérios estipulados de cobertura do *stacks* ( $\geq 7$ ) e cobertura do loci ( $\geq 0.7$  e número de populações 4), estabeleceu um conjunto de 2949 locos polimórficos. Utilizando a análise FDIST, foram classificados 104 SNPs sob seleção direcionada, 315 SNPs sob seleção balanceadora e os 2484 SNPs restantes como neutros (Figura 4.6). Todos os locos sob seleção divergente e balanceadora foram anotados. Porém, não foi possível atribuir nenhuma função gênica às sequências anotadas, pois os valores de E-value encontrados foram muito baixos.

A análise de  $F_{st}$  entre as regiões amostradas, utilizando todos os SNPs, demonstrou significância para um par de locais (Macaé e Angra dos Reis) (Tabela 4.7). Quando fizemos essa mesma análise separando os SNPs em neutros (Tabela 4.8), sob seleção balanceadora (Tabela 4.9) e sob seleção direcionada (Tabela 4.10), nenhum par de locais amostrado apresentou resultados significativos para diferenciação. Quando realizamos a AMOVA agrupando Cananéia e Itajaí, como pertencendo a uma

única população, também não foi encontrado nenhum valor significativo, tendo sido observado valores de  $F_{ST}=-0,02974$  (p-value =  $0,81427\pm 0,01271$ ),  $F_{SC}=0,01301$  (p-value=  $0,50733\pm 0,01426$ ) e  $F_{CT}=-0,04331$  (p-value=  $1,00\pm 0,00$ ).

**Figura 4.6:** Resultado da análise FDIST com todos os SNPs inferidos por RAD-seq (2949 SNPs). Aqueles que tiveram valores significativos e encontraram-se acima de  $IC=0,95$  foram considerados sob seleção direcionada, enquanto que aqueles com valores significativos e abaixo de  $IC=0,05$  foram classificados sob seleção balanceadora.



**Tabela 4.7:** Valores  $F_{st}$  par a par entre as regiões amostradas com todos os 2949 SNPs (diagonal a baixo) e valores de p-value +- desvio padrão (diagonal a baixo).

	Macaé	Angra dos Reis	Cananéia	Itajaí
Macaé	-	0.01758±0.0042	0.57227±0.0138	0.67773±0.0116
Angra dos Reis	0.0239*	-	0.89941±0.0082	0.96582±0.0060
Cananéia	-0.02883	-0.03781	-	0.51074±0.0213
Itajaí	-0.03267	-0.0476	-0.00441	-

(\*) valores significativos  $p < 0,05$

**Tabela 4.8:** Valores Fst par a par entre as regiões amostradas com os 2484 SNPs classificados neutros (diagonal a baixo) e valores de p-value +- desvio padrão (diagonal a baixo).

	Macaé	Angra dos Reis	Cananéia	Itajaí
Macaé	-	0.28829+-0.0297	0.82883+-0.0354	0.75676+-0.0610
Angra dos Reis	0.01524	-	0.34234+-0.0327	0.76577+-0.0413
Cananéia	-0.09718	0.02296	-	0.50450+-0.0309
Itajaí	-0.0477	-0.05988	0.00952	-

(\*) valores significativos  $p < 0,05$

**Tabela 4.9:** Valores Fst par a par entre as regiões amostradas com os 315 SNPs classificados sob seleção balanceadora (diagonal a baixo) e valores de p-value +- desvio padrão (diagonal a baixo).

	Macaé	Angra dos Reis	Cananéia	Itajaí
Macaé	-	0.99099+-0.0030	0.99099+-0.0030	0.99099+-0.0030
Angra dos Reis	0.000	-	0.99099+-0.0030	0.99099+-0.0030
Cananéia	0.000	0.000	-	0.99099+-0.0030
Itajaí	0.000	0.000	0.000	-

(\*) valores significativos  $p < 0,05$

**Tabela 4.10:** Valores Fst par a par entre as regiões amostradas com os 104 SNPs classificados sob seleção direcionada (diagonal a baixo) e valores de p-value +- desvio padrão (diagonal a baixo).

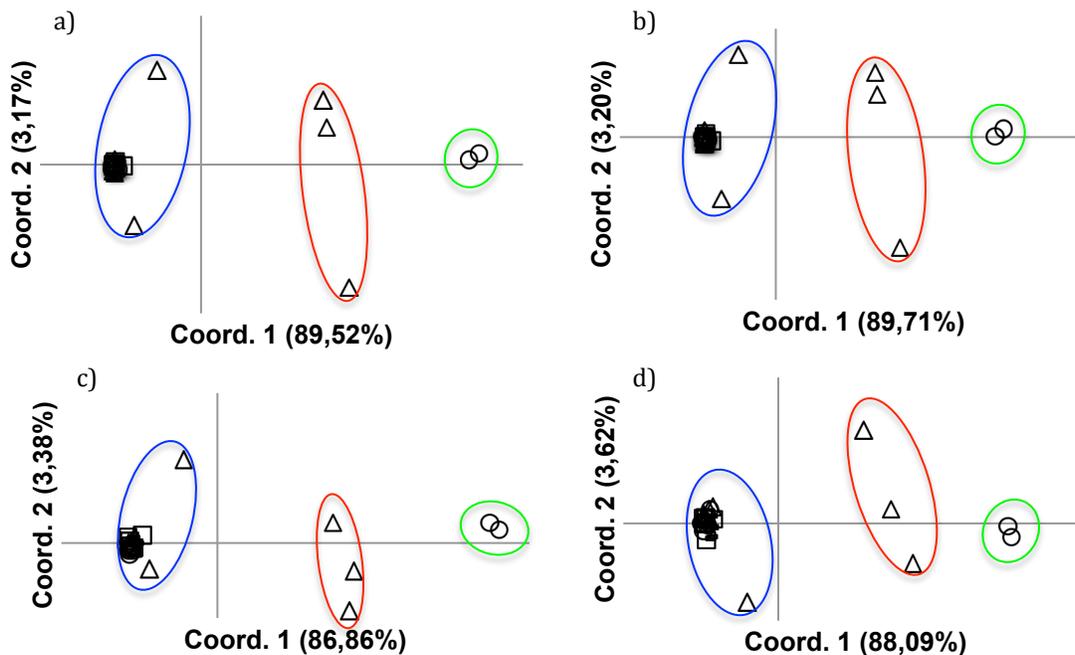
	Macaé	Angra dos Reis	Cananéia	Itajaí
Macaé	-	0.13514+-0.0279	0.21622+-0.0278	0.45045+-0.0636
Angra dos Reis	0.2350	-	0.99099+-0.0030	0.45045+-0.0450
Cananéia	0.1919	0.0000	-	0.99099+-0.0030
Itajaí	-0.0108	0.0295	0.0000	-

(\*) valores significativos  $p < 0,05$

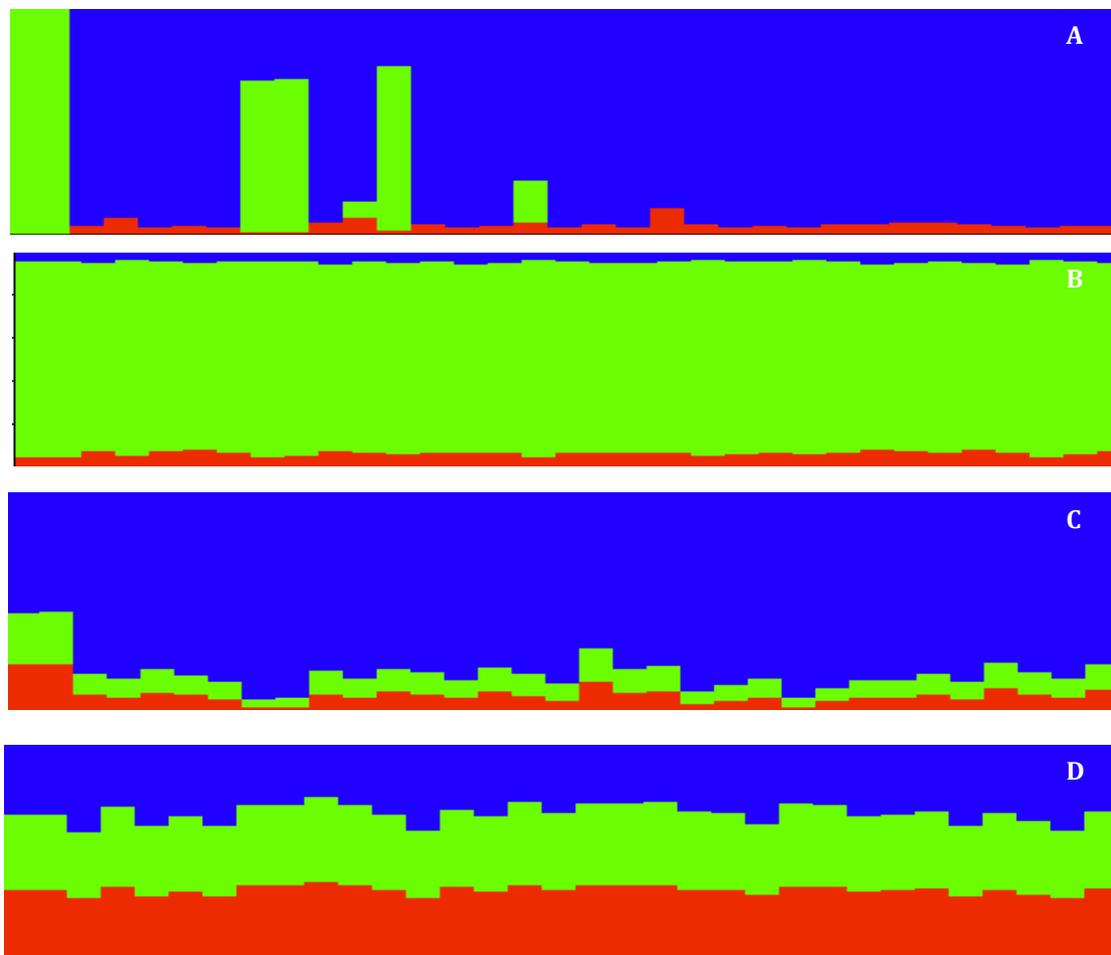
A análise de PCoA com todos os SNPs (Figura 4.7a) mostrou o agrupamento da maioria dos indivíduos em um único local. Alguns indivíduos de Macaé e Angra dos Reis, no entanto, se destacam desse grupo. O mesmo padrão foi observado quando a análise foi realizada apenas com os locos neutros (Figura 4.7b), locos sob seleção balanceadora (Figura 4.7c) e locos sob seleção direcionada (Figura 4.7d).

As análises bayesianas realizadas com o software STRUCTURE e Harvest Structure, para os quatro diferentes conjuntos de SNPs, apresentaram números iguais de clusters, apresentando  $k=3$ . Entretanto, os gráficos de saída do STRUCTURE não foram muito claros em relação ao número de clusters (Figura 4.8) para os diferentes conjuntos de locos. Apenas o gráfico considerando todos os SNPs demonstrou mais claramente a existência de duas populações (Figura 4.8).

**Figura 4.7:** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para os quatro conjuntos de SNPs sendo a) todos os SNPs, b) SNPs neutros, c) SNPs sob seleção balanceadora e d) SNPs sob seleção direcionada. Legenda : ( $\Delta$  Angra) (O Macaé) ( $\square$  Cananéia) (- Itajaí).



**Figura 4.8:** Gráficos de saída do programa STRUCTURE para  $k=3$  com os quatro conjuntos de SNPs: A) Todos os SNPs, B) SNPs neutros, C) SNPs sob seleção balanceadora e D) SNPs sob seleção direcionada.



## 4. 4 DISCUSSÃO

### 4.4.1 Marcadores mtDNA

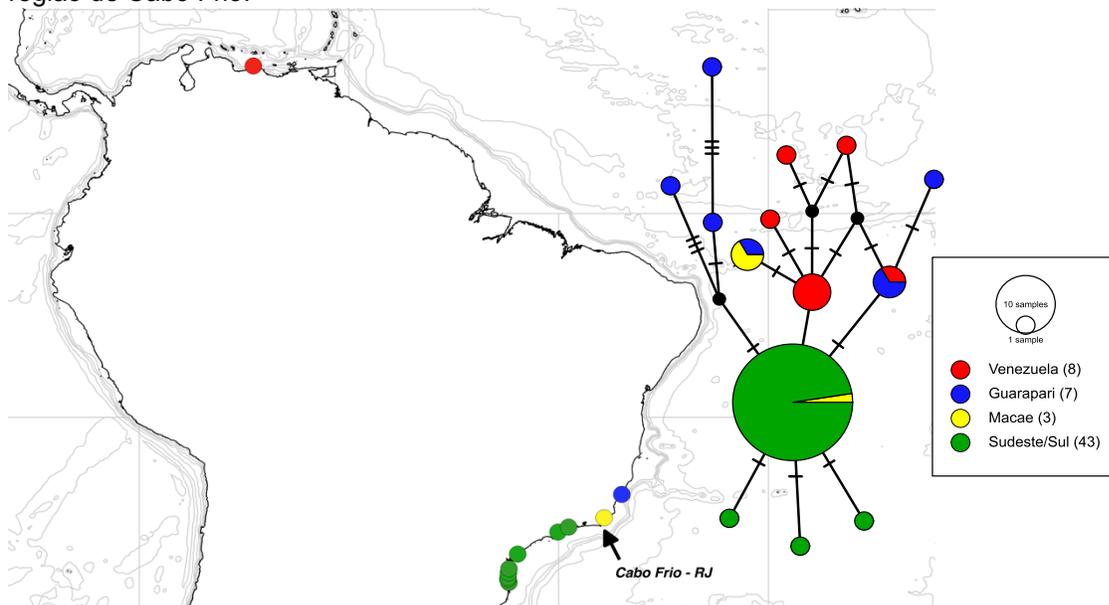
Os índices de diversidade determinados para as populações de *X. kroyeri* aqui analisadas mostraram que o gene 16S é mais conservado, sendo seguido pelo Cytb e COI. O maior conservadorismo do 16S em relação ao COI já havia sido descrito para espécies de Penaeidae (Lavery *et al.*, 2004), sendo, portanto, esperado encontrar uma baixa diversidade para esta espécie. Para o gene Cytb, no entanto, não havia relatos na literatura para esta espécie. Porém, os dados de diversidade encontrados para o Cytb mostram estar de acordo com os comumente encontrados para outras espécies animais (Arif; Khan 2009), nas quais a diversidade aumenta na ordem 16S<Cytb<COI.

As análises com o gene 16S não apontaram nenhuma estruturação populacional ou padrão filogeográfico. Este dado pode ser devido ao seu baixo polimorfismo, o qual evidenciou apenas dois haplótipos em 36 indivíduos analisados. Com base nestes resultados, esse gene não parece ser indicado para estudos de filogeografia e estruturação genética para esta espécie. Por outro lado, os genes COI e Cytb mostraram altos valores de  $\Phi_{ST}$  e o teste exato de diferenciação mostrou valores significativos para alguns pares de locais amostrados, principalmente, para Venezuela e Guarapari. Isso nos dá indícios que estes dois locais amostrados apresentam populações geneticamente diferenciadas das dos demais locais amostrados, porém, não diferem entre si.

Quando analisamos a rede de haplótipos do gene COI, esse padrão não ficou muito evidente devido o compartilhamento de haplótipos entre as regiões amostradas. Entretanto, ao observarmos a rede de haplótipos do gene Cytb, um padrão filogeográfico bem evidenciado, com um haplótipo amplamente compartilhado entre todas as regiões com exceção da Venezuela e Guarapari foi verificado. Nesta análise foi possível perceber claramente dois grupos distintos: um da região ao sul de Cabo

Frio, no qual um único haplótipo é observado em 43 indivíduos; e outro da região acima de Cabo Frio, onde foi observada uma grande diversidade de haplótipos. Macaé por sua vez foi a única região amostrada que apresentou haplótipos de ambos os grupos identificados (Figura 4.9). A divisão das populações em dois grupos distintos foi confirmada quando realizamos a AMOVA, a qual evidenciou altos valores significativos de fixação ( $F_{CT}=0,24$ ), com a variação entre os grupos de aproximadamente 24%.

**Figura 4.9:** Rede de haplótipos do gene *Cytb* e mapa dos locais amostrados destacando a região de Cabo Frio.



A região de Cabo Frio, localizada no estado do RJ, possui uma oceanografia particular onde ocorre o fenômeno de ressurgência costeira. Durante o período entre o fim da primavera e o verão, há influência dos ventos que mudam de direção, ocorrendo nessa região o surgimento de águas mais profundas oriundas da massa de Água Central do Atlântico Sul (ACAS). Fora desse período, o período de não-ressurgência (outono-inverno), prevalece as águas tropicais da Corrente do Brasil (BC), que se caracteriza por apresentar águas mais quentes (maiores que 24°C) e alta salinidade (>36) quando comparada com as águas da ACAS (<18°C, salinidade <36) (Valentin,

2001). A espécie *X. kroyeri* não possui fase dependente de estuário, completando todo o seu ciclo de vida na plataforma continental. Assim as larvas ficam mais sujeitas aos eventos que ocorrem nesta região. Dessa forma, a ressurgência de Cabo Frio pode se constituir em uma barreira para esta espécie.

De acordo com a revisão feita por Dall *et al.* (1990), a salinidade e, principalmente, a temperatura são fatores que influenciam na maturação, reprodução e desenvolvimento nas fases de vida iniciais dos Penaeidae. A temperatura retarda, por exemplo, o desenvolvimento das fases nauplius a mysis, assim como a eclosão dos ovos. Em *Metapenaeus* os ovos eclodem a 0,35 e 0,79 dias em temperaturas de 30 e 22,5°C, respectivamente. Em espécies do gênero *Penaeus*, os ovos eclodem a 0,5 e 1,56 dias a 30 e 19,6°C, respectivamente.

Gusmão *et al.*, (2005) não encontraram quebra no fluxo genético para as espécies *L. schmitti* e *F. brasiliensis*, com aloenzimas. Da mesma forma, os dados apresentados aqui no capítulo 3 também não indicaram diferenciação genética para *F. subtilis* antes e depois de Cabo Frio. Maggioni *et al.*, (2003), utilizando seis marcadores de microssatélites, encontraram estruturação fraca, mas significativa (1.1%) entre populações ao norte e sul de Cabo Frio para a espécie *L. schmitti*.

Em peixes do gênero *Sebastes*, análises de mtDNA e microssatélites evidenciaram uma forte quebra de fluxo genético em populações ao norte de Monterey Bay, na costa oeste dos Estados Unidos. Este resultado foi atribuído, em partes ao fenômeno de ressurgência na região de Cape Mendocino (Sivasundar e Palumbi, 2010). Assim, o fenômeno de ressurgência parece influenciar diferentemente cada espécie, dependendo da característica individual de cada uma; diferentes histórias de vida e habitat preferencial (Sivasundar e Palumbi, 2010). Algumas espécies de Penaeidae podem possuir uma maior tolerância a águas frias, para outras com diferentes ciclos de vida, como aquelas dependentes de estuário, a ressurgência pode não se constituir em uma barreira para dispersão de larvas ou migração de adultos. Sendo a espécie *X. kroyeri* uma espécie de distribuição geográfica tropical (Coelho *et al.*, 1980), com maior abundância em baixas latitudes, esta pode ter preferência por

águas quentes com alta salinidade, evitando atravessar águas frias, como as da ACAS,, onde talvez a sua chance de sobrevivência seja menor.

Voloch e Solé-Cava (2005) analisaram 130 indivíduos de *X. kroyeri* através de aloenzimas e também encontraram diferenças significativa entre populações de Ubatuba (SP) e populações de Cabo Frio (RJ) e Nova Almeida (ES), as quais, por sua vez, foram semelhante entre si. Estes dados corroboram os dados obtidos no presente estudo. Gusmão *et al.* (2006), utilizando aloenzimas, encontraram valores de  $F_{ST}$  similares, porém, não evidenciaram separação entre indivíduos das regiões de Ubatuba e de Nova Almeida.

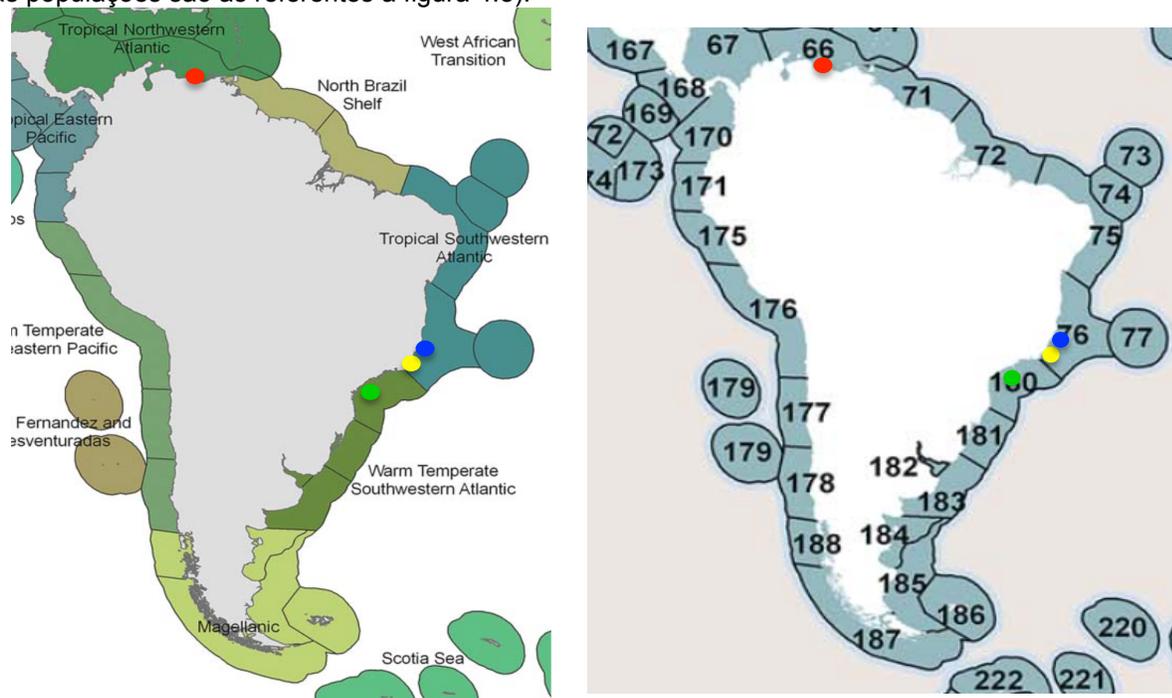
Fluxo gênico interrompido atribuído ao evento de ressurgência já foi descrito para estrelas do mar na Nova Zelândia (Waters e Roy, 2004). Já para a espécie *Balanus glândula*, um crustáceo da família Balanidae, foi observada estruturação populacional apenas quando a ressurgência, no estado de Oregon (EUA) era fraca, permitindo a retenção local de larvas (Barshis *et al.*, 2011).

Como o evento de ressurgência em Cabo Frio é sazonal, alguns indivíduos também podem ultrapassar essa barreira no período de não-ressurgência. Além disso, uma barreira provocada por águas de baixa temperatura e salinidade pode não se constituir em uma barreira intransponível, que impede totalmente a migração e dispersão. Entretanto, apesar de poder haver transposição desta barreira, a ressurgência pode limitar a dispersão e migração favorecendo a diferenciação de populações em áreas adjacentes. A região de Macaé, por exemplo, devido a proximidade com Cabo frio (aproximadamente 75 km), parece ser uma região de hibridização, onde indivíduos oriundos da região ao norte e ao sul de Cabo frio podem ser encontrados.

Outro fator observado tanto para gene COI quanto o gene Cytb foi a alta diversidade encontrada na Venezuela e, principalmente, em Guarapari, quando todas as outras regiões amostradas foram consideradas. Isso mostra que Guarapari pode ser uma região diferenciada das demais, se constituindo numa área de maior diversidade, genética, resultante talvez de propriedades ecológicas e oceânicas diferenciadas.

Spalding *et al.* (2007) avaliaram diferentes regiões marinhas e destacaram reinos, províncias e eco-regiões, baseando-se em aspectos ecológicos, oceanográficos e biotas dessas regiões. No presente trabalho, quando as populações são avaliadas considerando essas mesmas regiões descritas por Spalding *et al.* (2007), nota-se que Venezuela se encontra em uma eco-região distinta de Guarapari e Macaé. Da mesma forma, as demais regiões estudadas se encontram em uma única eco-região diferenciada das anteriores (Figura 4.9).

**Figura 4.10:** Eco-regiões estipuladas por Spalding *et al.* (2007), destacando as regiões amostradas (cores das populações são as referentes a figura 4.8).



#### 4.4.2 Marcadores SNPs

A análise de RAD-Seq se constitui em um método eficiente para descoberta e genotipagem de SNPs (Davey *et al.*, 2013), permitindo a comparação de grandes padrões de variação genética do genoma em um grande número de indivíduos pertencentes a diversas populações (Gautier *et al.*, 2013). Várias abordagens em diferentes organismos têm sido reportadas na literatura nos últimos anos, utilizando a abordagem RAD-seq. Gamble *et al.* (2015) avaliou transições do sistema determinante do sexo em oito espécies de répteis da ordem *Gecko* utilizando essa técnica. Fraser *et al.* (2015) estudaram demografia e estrutura populacional no peixe *Poecilia reticulata*, encontrando forte estruturação associada à geografia da região. Reitzel *et al.* (2013) encontraram padrões filogeográficos na costa leste dos EUA para uma espécie de cnidário, sendo este o primeiro trabalho realizado com um invertebrado marinho utilizando a técnica de RAD-seq.

Segundo Gagnaire *et al.* (2015) uma das aplicações mais promissoras para o estudo em genômica de populações é o uso de locos *outlier*, principalmente, para o delineamento de unidades de conservação em ambientes marinhos. Um dos benefícios dessa análise de genoma *scans* é que a abordagem de loci *outlier* é efetiva para classificar genes sob seleção, sem o conhecimento do fenótipo, identificando genes candidatos para futuras investigações (Narum e Hess, 2011). Locos sob seleção diferenciada podem ser úteis para apontar padrões de diferenciação adaptativa entre populações e explorar hipóteses de especiação (Beaumont e Balding 2004).

Keller *et al.* (2012), utilizando a análise de locos *outlier*, identificaram diferentes histórias evolutivas utilizando locos neutros e sob seleção divergente. Neste trabalho, foram inferidos eventos de hibridizações e fluxo gênico em peixes. Guo *et al.* (2015) estudando a espécie de peixe *Gasterosteus aculeatus* no mar Báltico, identificaram locos *outlier* e genes candidatos associados a adaptação local.

No presente trabalho, foram encontrados 104 locos sob seleção divergente e 315 locos sob seleção balanceadora. A anotação genômica realizada não permitiu, no entanto, identificar genes para nenhum dos locos sob seleção divergente ou seleção balanceadora. Para Penaeidae, dados de transcriptoma e genomas são escassos. Assim, para um grupo com tamanho de genoma estimado em 2.5 gigabases distribuídos em 44 pares de cromossomos (Ghaffari *et al.*, 2014), e ausência de um genoma de referência, já era esperado que o sucesso da anotação genômica não fosse atingido. Reitzel *et al.* (2013) estudando anêmonas através de RAD-seq concluíram que mesmo para espécies sem genomas de referência, análises de RAD-seq podem produzir dados extremamente importantes em estudos populacionais e filogeografia.

No presente trabalho foram analisados 2949 SNPs em 33 indivíduos provenientes de quatro regiões amostrais, sendo uma região acima e três a baixo de Cabo Frio. As análises realizadas mostraram diferenciação de três possíveis populações, o que foi claramente observado com as análises de PCoA. Os diferentes conjuntos de SNPs (neutros e sob seleção balanceadora ou divergente) produziram resultados semelhantes em todas as análises realizadas, sugerindo que a diferenciação dessas populações, no entanto, não se deve a diferenças adaptativas.

As regiões amostradas e estudadas com marcadores SNPs, com exceção de Macaé, são encontradas dentro de uma única ecoregião (Figura 4.9 - Spalding *et al.*, 2007). Assim não existem variações ecológicas significativas entre elas o que justificaria o fato de não termos encontrado diferentes repostas quando consideramos apenas os locos sob seleção divergente. Uma maior abrangência da distribuição dessa espécie, no entanto, contemplando regiões com diferenças ecológicas marcantes, poderá apontar para a existência de padrões diferenciados relacionados à possíveis adaptações locais.

As PCoAs evidenciaram três agrupamentos de indivíduos. O mesmo resultado foi observado na análise bayesiana com a correção de Evanno. O primeiro e maior agrupamento foi formado por indivíduos oriundos dos quatro locais amostrados. Já o segundo agrupamento foi formado por três indivíduos coletados em Angra dos Reis. O terceiro agrupamento foi formado por apenas dois indivíduos amostrados em Macaé.

Como vimos nas análises com mtDNA, Macaé é a região mais próxima a Cabo Frio. Além disso, nesta região há indivíduos oriundos da população ao norte e ao sul de Cabo Frio. Os dados de SNPs são concordantes com os de mtDNA para a região de Macaé, onde indivíduos de duas populações diferentes são encontrados. Esta área pode, portanto, se constituir numa região de hibridização de populações.

Angra dos Reis, localizada 240 km ao sul de Cabo Frio, possui uma geografia diferenciada constituída por uma baía chamada Baía da Ilha Grande. Seu litoral é recortado com numerosas ilhas o que diminui a hidrodinâmica do local (Andreatta *et al.*, 2002). Essas características, juntamente com o ciclo de vida da espécie, podem fazer com que haja uma maior retenção de larvas locais, ficando estas próximas aos parentais. Apesar deste evento favorecer a estruturação populacional, indivíduos vindos de fora desta Baía continuam presentes nesta região, uma vez que larvas podem ser eventualmente trazidas por correntes costeiras.

Com esses dados podemos sugerir que a espécie de *X. kroyeri* está estruturada ao longo do litoral brasileiro e que os diferentes tipos de marcadores evidenciam diferentes padrões de estruturações. O mtDNA, por ter herança materna, reflete uma estruturação filogeográfica. Já os SNPs evidenciam uma estruturação de eventos mais recentes e em fina escala, mostrando que a utilização de diferentes marcadores deve ser adotada para acessar toda a história de uma espécie.

É relevante ressaltar que este trabalho é pioneiro no uso da metodologia RAD-seq para estudo populacional em crustáceos, assim como também não existe reportado ainda nenhum trabalho que estude SNPs em análises populacionais nas espécies de Penaeidae da costa brasileira.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. et al. Reproductive biology and recruitment of *Xiphopenaeus kroyeri* in a marine protected area in the Western Atlantic: implications for resource management. **Aquatic Biology**, v. 17, n. 1, p. 57-69, 2012.
- ALVES, M. I. M.; RODRIGUES, M. M. Aspectos reprodutivos do camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) (Decapoda, Macrura), na costa do estado do Ceará. **Arq. Ciên. Mar**, v. 17, n. 1, p. 29-35, 1977.
- ANDREATA, J. V. et al. Composição da assembléia de peixes da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 4, p. 1139-1146, 2002.
- ARIF, I. A.; KHAN, H. A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. **Animal biodiversity and conservation**, v. 32, n. 1, p. 9-17, 2009.
- AVISE, John C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard university press, 2000.
- AZEREDO, A. M. L. O Código de Barras da Vida baseado no DNA "Barcoding of Life": Considerações e Perspectivas. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos: Ciência , Tecnologia e Inovação**, Universidade de Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, p. 14, 2005.
- BALDWIN, J. D. et al. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 399-407, 1998.

- BALL, S. L. *et al.* Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 24, n. 3, p. 508-524, 2005.
- BANDELT, H.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.
- BAIL, G. C.; Branco, J. O. Pesca artesanal do camarão sete-barbas: uma caracterização sócio-econômica na Penha, SC. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 11, n. 2, p. 25-32, 2007.
- BARBIERI, E.; MELO G. A. S. Biodiversity: *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exotic species presence in Cananéia-Iguape-Ilha Comprida lagoon estuary complex Biodiversidad: presencia de la especie exótica *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en el complejo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 654-659, out./dez. 2006.
- BARSHIS, D. J. *et al.* Coastal upwelling is linked to temporal genetic variability in the acorn barnacle *Balanus glandula*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 439, p. 139-150, 2011.
- BEAUMONT, M A.; NICHOLS, R. A. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 263, n. 1377, p. 1619-1626, 1996.
- BEAUMONT, M. A.; BALDING, D. J. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. **Molecular ecology**, v. 13, n. 4, p. 969-980, 2004. BENSASSON, D. *et al.* Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. **Trends in ecology & evolution**, v. 16, n. 6, p. 314-321, 2001.
- BENZIE, J. Population genetic structure in penaeid prawns. **Aquaculture Research**, v.

31, n. 1, p. 95-119, 2000.

BENZIE, J. A. H. *et al.* Mitochondrial DNA variation in Indo-Pacific populations of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 12, p. 2553-2569, 2002.

BERTHEAU, C. *et al.* Hit or miss in phylogeographic analyses: the case of the cryptic NUMTs. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 6, p. 1056-1059, 2011.

BESANSKY, N. J.; SEVERSON, D. W.; FERDIG, M. T. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 12, p. 545-546, 2003.

BILGIN, R. *et al.* DNA barcoding of twelve shrimp species (Crustacea: Decapoda) from Turkish seas reveals cryptic diversity. **Mediterranean Marine Science**, v. 16, n. 1, p. 36-45, 2014.

BISSARO, F. G.; GOMES-Jr, J. L.; DI BENEDITTO, A. P. M. Morphometric variation in the shape of the cephalothorax of shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* on the east coast of Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2012.

BOUCKAERT, R. *et al.* BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS Comput Biol**, v. 10, n. 4, p. e1003537, 2014.

BRANCO, J. O.; LUNARDON-BRANCO, M. J.; DE FENIS, A. Crescimento de *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862)(Crustacea: Natantia: Penaeidae) da região de Matinhos, Paraná, Brasil. **Arq. Biol. Tecnol**, v. 37, n. 1, p. 1-8, 1994.

BRAY, W. A. *et al.* Hybridization of *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) and *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936 (Decapoda). **Journal of Crustacean Biology**, v. 10, n. 2, p. 278-283, 1990.

BRASiL. Instrução Normativa IBAMA n. 189, de 23 de setembro de 2008.

- BRASIL. Instrução Normativa MMA n. 5, de 21 de maio de 2004. **Diário oficial da União**. Seção 1, n. 102, p. 136-142, 2004.
- BORRELL, Y. et al. DNA microsatellite variability and genetic differentiation among natural populations of the Cuban white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Marine Biology**, v. 144, n. 2, p. 327-333, 2004.
- BUCKLIN, A. et al. DNA barcodes for species identification of euphausiids (Euphausiacea, Crustacea). **Journal of Plankton Research**, v. 29, n. 6, p. 483-493, 2007.
- BUHAY, J. E.; CRANDALL, K. A. Taxonomic revision of cave crayfishes in the genus *Orconectes*, subgenus *Orconectes* (Decapoda: Cambaridae) along the Cumberland Plateau, including a description of a new species, *Orconectes barri*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 28, n. 1, p. 57-67, 2008.
- BUHAY, J. E. "COI-like" sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, n. 1, p. 96-110, 2009.
- BURUKOVSKY, R. N. Selection of a type species for *Farfantepenaeus* Burukovsky (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). **Proceedings-Biological Society Of Washington**, v. 110, p. 154-154, 1997.
- CARPENTER, K. E. **The living marine resources of the Western Central Atlantic**: Introduction, molluscs, crustaceans, hagfishes, sharks, batoid fishes, and chimaeras. Roma: FAO, V. 1 N. 5, pp. 1-600, 2002.
- CARVALHO-BATISTA, A. et al. Inferring population connectivity across the range of distribution of the stiletto shrimp *Artemesia longinaris* Spence Bate, 1888 (Decapoda, Penaeidae) from DNA barcoding: implications for fishery management. **Zookeys**, n. 457, p. 271, 2014.

- CASTRO, R. H. *et al.* Population structure of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862)(Crustacea: Penaeoidea) in the littoral of São Paulo, Brazil. **Scientia Marina**, p. 105-112, 2005.
- CATCHEN, Julian *et al.* Stacks: an analysis tool set for population genomics. **Molecular ecology**, v. 22, n. 11, p. 3124-3140, 2013.
- CATCHEN, Julian M. *et al.* Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 1, n. 3, p. 171-182, 2011.
- CHU, K. H. *et al.* Application of mitochondrial control region in population genetic studies of the shrimp *Penaeus*. **Molecular ecology notes**, v. 3, n. 1, p. 120-122, 2003.
- COELHO, P. A.; RAMOS-PORTO, M.; KOENING, M. L. Biogeografia e bionomia dos crustáceos do litoral equatorial brasileiro. **Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 15, p. 7-138, 1980.
- COELHO, P. A.; SANTOS, M. C. F. Resultados das amostragens biológicas na pesca de camarões marinhos ao largo de Ilheus, BA. **Boletim Técnico Científico**. CEPENE, Tamandaré, v. 3, n. 1, p. 111-121, 1995.
- CORRÊA, A. B.; MARTINELLI, J. M. Composição da população do camarão-rosa *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1936) no estuário do Rio Curuçá, Pará, Brasil. **Revista Científica da UFPA**, v. 7, n. 1, p. 1-18, 2009.
- COSTA, R. C. *et al.* Occurrence of shrimp species (Crustacea: Decapoda: Natantia: Penaeidea and Caridea) in Ubatuba Bay, Ybatuba, SP, Brazil. **Proceedings of the biological society of Washington**. V. 113 n. 3, p. 776-781, 2000.
- COSTA, R. C. D. *et al.* An illustrated key for Dendrobranchiata shrimps from the northern coast of São Paulo state, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2003.

- COSTA, F. O. et al. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 64, n. 2, p. 272-295, 2007.
- DA SILVEIRA, I. C. A. et al. A corrente do Brasil ao largo da costa leste brasileira. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 48, n. 2, p. 171-183, 2000.
- DALL, W. et al., The Biology of Penaeidae. In “**Advances in Marine Biology**” (J. H. S. Blaxter and A. J. Southward, Eds.), Vol. 27. Academic Press, London (1990).
- DAVEY, J. W. et al. Special features of RAD Sequencing data: implications for genotyping. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 11, p. 3151-3164, 2013.
- DE FRANCISCO, A. K. (2009). Caracterização genética populacional do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (HELLER, 1862) noitoral sudeste-sul do Brasil. Tese de doutorado defendida no programa de pós graduação em genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP.
- DE FRANCISCO, A. K. et al. Isolation and characterization of microsatellites in three overexploited penaeid shrimp species along the Brazilian coastline. **Conservation Genetics**, v. 10, n. 3, p. 563-566, 2008.
- DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular biology and evolution**, v. 22, n. 5, p. 1185-1192, 2005.
- D'INCAO, F. Pesca e biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos, RS. **Atlântica**, v. 13, n. 1, p. 159-169, 1991.
- D'INCAO, F. ; VALENTINI, H. ; RODRIGUES, L. F. Avaliação da pesca de camarões nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. 1965-1999. **Atlântica, Rio Grande**, v. 24, n. 2, p. 49-62, 2002.

- DUDA JR, T. F.; PALUMBI, S. R. Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western Pacific populations. **Marine Biology**, v. 134, n. 4, p. 705-710, 1999.
- DUMONT, L. F. C.; HWANG, G.; MACLEAN, N. The mtDNA control region of the barba-ruça shrimp *Artemesia longinaris* (Decapoda:Penaeidae) and its potential use as a marker for population analysis. **Atlântica**, Rio Grande, v. 31, n. 2, p. 199-207, 2009.
- EARL, D. A.; vonHoldt B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation genetics resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.
- EXCOFFIER, Laurent. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 4, p. 853-864, 2004.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.
- FERREIRA, N. C.; FREIRE, A. Spatio-temporal variation of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) associated to the seasonal overture of the sandbar in a subtropical lagoon. Ilheringa, **Série Zoo**. Porto Alegre, v. 99, n. 4, p. 390-396, 2009.
- FU, Y. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915-925, 1997.
- FILHO M. A.; HOLANDA F. C. A. F.; SANTOS F. J. S. Influencia da profundidade na distribuição do camarão rosa, *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez Farfante, 1967), na região norte do Brasil. **Boletim Técnico Científico**, Belém: CEPNOR, v. 3, n. 1, p. 9-19, 2003.

- FLEGEL, T. W. The right to refuse revision in the genus *Penaeus*. **Aquaculture**, v. 264, n. 1, p. 2-8, 2007.
- FLEGEL, T. W. Confirmation of the right to refuse revision in the genus *Penaeus*. **Aquaculture**, v. 280, n. 1, p. 1-4, 2008.
- FLOYD, R. *et al.* Molecular barcodes for soil nematode identification. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 4, p. 839-850, 2002.
- FOLMER, O. *et al.* DNA *primers* for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology And Biotechnology**. V. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.
- FRANSEN, C. H. J. M.; DE GRAVE, S. A. M. M. Y. Evolution and radiation of shrimp-like decapods: an overview in: **Decapod Crustacean Phylogenetics, II Advances in Our Knowledge of Shrimp-Like Decapods**, CRC Press Taylor & Francis Group, New York, p. 246-259, 2009.
- FRASER, B. A. *et al.* Population genomics of natural and experimental populations of guppies (*Poecilia reticulata*). **Molecular ecology**, v. 24, n. 2, p. 389-408, 2015.
- FRÉZAL, L; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**. V. 8, n. 5, p. 727-736, 2008.
- GALTIER, N. *et al.* Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology** v. 18, n. 22, p. 4541-4550, 2009.
- GAMBLE, Tony *et al.* Restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) reveals an extraordinary number of transitions among gecko sex-determining systems. **Molecular biology and evolution**, p. msv023, 2015.
- GARDNER, J. P. A.; WEI, K. J. The genetic architecture of hybridisation between two lineages of greenshell mussels. **Heredity**, v. 114, n. 3, p. 344-355, 2015.

- GAGNAIRE, P. et al. Using neutral, selected, and hitchhiker loci to assess connectivity of marine populations in the genomic era. **Evolutionary applications**, v. 8, n. 8, p. 769-786, 2015.
- GAUTIER, M. et al. Estimation of population allele frequencies from next-generation sequencing data: pool-versus individual-based genotyping. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 14, p. 3766-3779, 2013.
- GHAFFARI, N. et al. Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. **Scientific reports**, v. 4, 2014.
- Gillett R. Global study of shrimp fisheries. Roma: FAO, **Fisheries Technical Paper**. n. 475, 2008,
- Gíslason, Ó. S., Svavarsson, J, Halldórsson, H. P., Pálsson, S. (2013). Nuclear mitochondrial dna (numt) in the atlantic rock crab *Cancer irroratus* Say, 1817 (Decapoda, Cancridae). *Crustaceana* 86 (5): 537-552.
- GREENSTONE, M. H. et al. Barcoding generalist predators by polymerase chain reaction: carabids and spiders. **Molecular ecology**, v. 14, n. 10, p. 3247-3266, 2005.
- GÍSLASON, Ó. S. et al. Nuclear mitochondrial DNA (numt) in the Atlantic rock crab *Cancer irroratus* Say, 1817 (Decapoda, Cancridae). *Crustaceana*, v. 86, n. 5, p. 537-552, 2013.
- GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: **University of Lausanne**, Department of Ecology & Evolution, 2002.
- GUO, B. et al. Population genomic evidence for adaptive differentiation in Baltic Sea three-spined sticklebacks. **BMC biology**, v. 13, n. 1, p. 19, 2015.

- GUSMÃO J.; LAZOSKI C.; SOLÉ-CAVA, A. M. A new species of *Penaeus* Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. **Marine Biology**, v. 137, p. 435-446, 2000.
- GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. Population genetic structure of Brazilian shrimp species (*Farfantepenaeus* sp., *F. brasiliensis*, *F. paulensis* and *Litopenaeus schmitti*: Decapoda: Penaeidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 165-171, 2005.
- GUSMÃO, J. *et al.* Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. **Marine Biology**, v. 149, p. 491-502, 2006.
- HAJIBABAEI, M. *et al.* DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 4, p. 968-971, 2006.
- HAZKANI-COVO, E.; ZELLER, R. M.; MARTIN, W. Molecular Poltergeists: Mitochondrial DNA Copies (numts) in Sequenced Nuclear Genomes. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 2, p. e1000834, 2010.
- HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003a.
- HEBERT, P. DN; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl 1, p. S96-S99, 2003b.
- HEBERT, P. D. N. *et al.* Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS biology**, v. 2, p. 1657-1663, 2004

- KEARSE, M. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.
- KEKKONEN, M.; HEBERT, P. D. N. DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows. **Molecular ecology resources**, v. 14, n. 4, p. 706-715, 2014.
- KELLER, I. *et al.* Population genomic signatures of divergent adaptation, gene flow and hybrid speciation in the rapid radiation of Lake Victoria cichlid fishes. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 11, p. 2848-2863, 2013.
- KERR, K. C. R *et al.* Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. **Molecular ecology notes**, v. 7, n. 4, p. 535-543, 2007.
- KHAMNAMTONG, B.; KLINBUNGA, S.; MENASVETA, P. Genetic diversity and geographic differentiation of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand analyzed by mitochondrial COI sequences. **Biochemical genetics**, v. 47, n. 1-2, p. 42-55, 2009.
- KIM, Se-Joo; LEE, Kyeong Yong; JU, Se-Jong. Nuclear mitochondrial pseudogenes in *Austino-graea alayseae* hydrothermal vent crabs (Crustacea: Bythograeidae): effects on DNA barcoding. **Molecular ecology resources**, v. 13, n. 5, p. 781-787, 2013.
- LARKIN, M. A. *et al.*, Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.
- LAURENT, V.; VOISIN, M.; PLANES, S. Genetic clines in the Bay of Biscay provide estimates of migration for *Sardina pilchardus*. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 1, p. 81-88, 2006.

- LIVERY, S. *et al.*, Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus* s.l. derived from mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 31, n. 1, p. 39-49, 2004.
- LEITE JR, N. O.; PETRERE JR, M. Growth and mortalities of the pink-shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* Latreille, 1970 and *F. paulensis* Pérez-Farfante 1967 in southeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2A, p. 523-536, 2006.
- LI, Yu Long *et al.* Genetic diversity and historical demography of Chinese shrimp *Feneropenaeus chinensis* in Yellow Sea and Bohai Sea based on mitochondrial DNA analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, 2009.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.
- LIS, J. T.; SCHLEIF R. Size fractionation of double -stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic Acids Research** v. 2, n. 3, p. 383-390, 1975.
- LISCHER, H. E. L.; EXCOFFIER, L. PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. **Bioinformatics**, v. 28, n. 2, p. 298-299, 2012.
- LUVESUTO, E. Análise Genética e Morfométrica da estrutura populacional do camarão branco *Litopenaeus schmitti* (Decapoda, Crustacea) na costa do Rio Grande do Norte, Brasil uma abordagem em fina escala. Dissertação (Mestrado). **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos (2006).
- LUVESUTO, E.; FREITAS, P. D.; GALETTI, P. M. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). **Genetics and Molecular Biology** v. 30, n. 4, p. 1156-1160, 2007.
- MARTINELLI-LEMOES, J. M., NAHUM, V. J. I., SCHNEIDER, S. Genetic variability among populations of *Xiphopenaeus kroyeri* (Decapoda, Penaeidae) from the

northern and northeastern coast of Brazil using DNA fingerprinting analysis. **International journal of Science Commerce and Humanities**, v. 2, n. 3, p. 103-122, 2014.

MA, K. Y.; CHAN, T.; CHU, K. H. Refuting the six-genus classification of *Penaeus* s.l. (Dendrobranchiata, Penaeidae): a combined analysis of mitochondrial and nuclear genes. **Zoologica Scripta**, v. 40, n. 5, p. 498-508, 2011.

MAGGIONI, D. E. Caracterização de espécies do gênero *Penaeus* do litoral brasileiro através de eletroenfoque. **Nauplius**, v. 4, p. 129-137, 1996.

MAGGIONI, R., *et al.* Molecular Phylogeny of Western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* Shrimp Based on Mitochondrial 16S Partial Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 18, n. 1, p. 66-73, 2001.

MAGGIONI, R.; ROGERS, A. D.; MACLEAN, N. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 12, p. 3213-3217, 2003.

MALPARTIDA, J.; VINATEA, L. Monitoramento do crescimento de juvenis de *Farfantepenaeus paulensis* (Perez-Farfante, 1967) com vistas a um futuro repovoamento da Lagoa de Ibiraquera, Imbituba, SC. **Biotemas**, v. 20, n. 3, p. 37-45, 2007.

MCLAUGHLIN, P. A. *et al.* A reply to T.W. Flegel. **Aquaculture**, v. 275, p. 370–373, 2008.

MCMILLEN-JACKSON, A. L.; BERT, T. M.; STEELE, P. Population genetics of the blue crab *Callinectes sapidus*: modest population structuring in a background of high gene flow. **Marine Biology**, v. 118, n. 1, p. 53-65, 1994.

- MCMILLEN-JACKSON, A. L.; BERT, T. M. 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**, v. 12, n. 11, p. 2895-2905, 2003.
- MCMILLEN-JACKSON, A.; BERT, T. M. Genetic diversity in the mtDNA control region and population structure in the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 24, n. 1, p. 1001-109, 2004.
- VAN MEERBEECK, C. J.; RENSSSEN, H.; ROCHE, D. M. How did marine isotope stage 3 and Last Glacial Maximum climates differ? Perspectives from equilibrium simulations. **Climate of the Past Discussions**, v. 4, p. 1115-1158, 2008.
- MENG, X. H *et al.* Genetic differentiation in seven geographic populations of the fleshy shrimp *Penaeus* (*Fenneropenaeus*) *chinensis* based on microsatellite DNA. **Aquaculture**, v. 287, n. 1, p. 46-51, 2009.
- MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. **PLoS biology**, v. 3, n. 12, p. 2229, 2005.
- MIRALLES, A.; VENCES, M. New metrics for comparison of taxonomies reveal striking discrepancies among species delimitation methods in *Madascincus* lizards. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68242, 2013.
- MUNASINGHE, DH N.; MURPHY, N. P.; AUSTIN, C. M. Utility of mitochondrial DNA sequences from four gene regions for systematic studies of Australian freshwater crayfish of the genus *Cherax* (Decapoda: Parastacidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 23, n. 2, p. 402-417, 2003.
- MUNOZ, J. *et al.* Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca). **Molecular Ecology**, v. 17, n. 13, p. 3160–3177, 2008.

- NAHUM, V. J. I. *et al.* Síntese do estado de conhecimento sobre a pesca marinha e estuarina do Brasil. In: ISAAC, V. J.; MARTINS, A. S.; HAIMOVICI, M.; ANDRIGUETTO Filho, J. M. (orgs.). A pesca marinha e estuarina do Brasil no início do século XXI: recursos tecnologias, aspectos socioeconômicos e institucionais. **Belém: Editora Universitária UFPA**, 2006. v. 1, p. 181-188.
- NARUM, S. R.; HESS, J. E. Comparison of FST outlier tests for SNP loci under selection. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. s1, p. 184-194, 2011.
- NGUYEN, T. T. T., MURPHY, N. P., AUSTIN, C. M. Amplification of multiple copies of mitochondrial Cytochrome b gene fragments in the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark (Parastacidae: Decapoda). **Animal Genetic**, v. 33, n. 4, p. 304-308, 2002.
- PADIAL, J. M. *et al.* Review: The integrative future of taxonomy. **Front Zool**, v. 7, p. 1-14, 2010.
- PALUMBI, S. R. Genetic Divergence, reproductive isolation and marine speciation. **Annual review of ecology and systematics**, v. 25, p. 547-572, 1994.
- PALUMBI, S. R. *et al.* The Simple Fool's Guide to PCR. Special Publ. **Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory**, University of Hawaii, Honolulu, 2002 v. 2, 45p.
- PASCOAL, A. *et al.* Identification of shrimp species in raw and processed food products by means of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method targeted to cytochrome b mitochondrial sequences. **Electrophoresis**, v. 29, n. 15, p. 3220-3228, 2008.
- PAQUOTTE, P. *et al.* Intensive culture of shrimp *Penaeus vannamei* in floating cages: zootechnical, economic and environmental aspects. **Aquaculture**, v. 164, n. 1, p. 151-166, 1998.

- PEAKALL, R. O. D.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular ecology notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.
- PEREZ, J. A. et al. Relatório da reunião técnica de ordenamento da pesca de arrasto nas regiões sudeste e sul do Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 1-34, 2010.
- PÉREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. F. **Penaeoid Amd Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera**. Paris, França: Editions du Muséum, V. 175, p. 233, 1997
- PÉREZ-FARFANTE, I. Western Atlantic Shrimps of the Genus *Penaeus*. **Fishery Bulletin**, V. 67, n. 3, p. 461-469, 1969.
- PÉREZ-FARANTE, I. (1967). A new species and two new subspecies of shrimp of the genus *Penaeus* from the western Atlantic. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 80, p. 83-99, 1967
- PETERSON, B. K. et al. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37135, 2012.
- PETERSON, R. G.; STRAMMA, L. Upper-level circulation in the South Atlantic Ocean. **Progress in oceanography**, v. 26, n. 1, p. 1-73, 1991.
- PFEILER, E. et al. Population genetics of the swimming crab *Callinectes bellicosus* (Brachyura: Portunidae) from the eastern Pacific Ocean. **Marine Biology**, v. 146, n. 3, p. 559-569, 2005.

- PINHEIRO, A. P. Estrutura genética e biométrica de *Farfantepenaeus brasiliensis* em três localidades do Estado do Rio Grande do Norte. Tese (Doutorado). **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos, 2008.
- PRETO, A. L. Estruturação populacional do camarão rosa sobre-explotado *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) no litoral sul-suldeste brasileiro e seu significado para a conservação. Tese (Doutorado). **Universidade Federal de São Carlos, São Carlos**, 2009.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.
- PROSSER, S.; MARTÍNEZ-ARCE, A.; ELÍAS-GUTIÉRREZ, M. A new set of *primers* for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular ecology resources*, v. 13, n. 6, p. 1151-1155, 2013.
- PROVAN, J.; BENNETT, K. D. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. **Trends in ecology & evolution**, v. 23, n. 10, p. 564-571, 2008.
- PUILLANDRE, N. *et al.* ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular ecology**, v. 21, n. 8, p. 1864-1877, 2012.
- RADULOVICI, A. E.; SAINTE-MARIE, B.; DUFRESNE, F. DNA barcoding of marine crustaceans from the Estuary and Gulf of St Lawrence: a regional-scale approach. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. s1, p. 181-187, 2009.
- RAJAKUMARAN, P., VASEEHARAN, B., YESHVADHA, V. A. Molecular Characterization of Economically Important Penaeid Population in South East Coast of India. **International Journal of Aquaculture**, v. 3, n. 9, p. 105-114 , 2013.

- RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. **Molecular biology and evolution**, v. 19, n. 12, p. 2092-2100, 2002.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular ecology notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.
- REITZEL, A. M. et al. Going where traditional markers have not gone before: utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. **Molecular ecology**, v. 22, n. 11, p. 2953-2970, 2013.
- RODRÍGUEZ-REY, G. T.; SOLÉ-CAVA, A. M.; LAZOSKI, C. Genetic homogeneity and historical expansions of the slipper lobster, *Scyllarides brasiliensis*, in the south-west Atlantic. **Marine and Freshwater Research**, v. 65, n. 1, p. 59-69, 2014.
- ROBAINAS-BARCIA, A.; GARCÍA-MACHADO, E. Genetic diversity and demographic variation in *Farfantepenaeus notialis* (Pérez-Farfante, 1969) from southern Cuban platforms. **Rev. Invest. Mar**, v. 32, n. 1, p. 74-84, 2012.
- ROCHA, L. A. et al. Adult habitat preferences, larval dispersal, and the comparative phylogeography of three Atlantic surgeonfishes (Teleostei: Acanthuridae). **Molecular Ecology**, v. 11, n. 2, p. 243-251, 2002.
- ROCHA, L. A. et al. Ecological speciation in tropical reef fishes. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1563, p. 573-579, 2005.

- ROCHA, L. A. et al. Comparative phylogeography of Atlantic reef fishes indicates both origin and accumulation of diversity in the Caribbean. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, p. 157, 2008.
- ROLAN-ALVAREZ, E.; JOHANNESSON, K.; ERLANDSSON, J. The maintenance of a cline in the marine snail *Littorina saxatilis*: the role of home site advantage and hybrid fitness. **Evolution**, p. 1838-1847, 1997.
- ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular biology and evolution**, v. 9, n. 3, p. 552-569, 1992.
- ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular ecology resources**, v. 8, n. 1, p. 103-106, 2008.
- CASTRO, B. M. *et al.* Estrutura termohalina e circulação na região entre o cabo de São Tomé (RJ) e Chuí (RS). *in* Rossi-Wongischowski C.L.D.B.; Madureira L. S. O Ambiente Oceanográfico da Plataforma Continental e do Talude na Região Sudeste-Sul do Brasil. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 11-120, 2006
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY**, 1989.
- SANTOS, M. C. F.; COELHO, P. A.; PORTO, M. R. Sinopse das informações sobre a biologia e pesca do camarão-sete-barbas, *xiphopenaeus kroyeri* (heller, 1862) (Decapoda, Penaeidae), no nordeste do Brasil. **Boletim Técnico-Científico Do Cepene**, v. 14, n. 1, p. 141-178, 2006.
- SAKAI, K.; SHINOMIYA, S. Preliminary report on eight new genera formerly attributed to *Parapenaeopsis* Alcock, 1901, sensu lato (Decapoda, Penaeidae). **Crustaceana**, v. 84, n. 4, p. 491-504, 2011.

- SCHNEIDER, S; EXCOFFIER, L. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. **Genetics**, v. 152, n. 3, p. 1079-1089, 1999.
- SCHIZAS, N. V. Misconceptions regarding nuclear mitochondrial pseudogenes (Numts) may obscure detection of mitochondrial evolutionary novelties. **Aquat Biol**, v. 17: p. 91-96, 2012.
- SHIH, C. et al. Genetic diversity and historical demography of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) species complex off China based on mitochondrial DNA analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 7, p. 1065-1072, 2011.
- SILVA, K. C. A., PORTO, M. R., CINTRA, I. H. A. Ocorrência de espécies da família Penaeidae em águas da costa norte do Brasil (Crustacea: Decapoda). Bol. Téc. Cient. CEPENE. Tamandaré. V. 6, n. 1, p. 7-15, 1998.
- SIMON, Chris et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction *primers*. **Annals of the entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.
- SIVASUNDAR, A.; PALUMBI, S. R. Life history, ecology and the biogeography of strong genetic breaks among 15 species of Pacific rockfish, *Sebastes*. **Marine biology**, v. 157, n. 7, p. 1433-1452, 2010.
- SOFIA, The State Of Woeld Fisheries. FAO - Fisheries and Aquaculture Department. **Food And Agriculture Organization Of The United Nations**, Rome, 2008.
- SONG, H. *et al.* Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36, p. 13486-13491, 2008.

- SOTKA, Erik E. et al. Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 8, p. 2143-2156, 2004.
- SPALDING, M. D. et al. Marine ecoregions of the world: a bioregionalization of coastal and shelf areas. **BioScience**, v. 57, n. 7, p. 573-583, 2007.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.
- TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- TAVARES, M., Shrimps. In: Carpenter, K.E. (ed.) **The living marine resources of the Western Central Atlantic**. Volume1: introduction, molluscs, crustaceans, hagfishes, sharks, batoid fishes, and chimaeras. FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication N°5. Rome, FAO, p. 251-291, 2002.
- TEODORO, S. S. A. et al. Genetic homogeneity in the commercial pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* revealed by COI barcoding gene. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 166, p. 124-130, 2015.
- TIAN-JUN, X. et al. Genetic differentiation and structure of four cultured stock of *Marsupenaeus japonicus* in china. *Oceanologia Et Limnologia Sinica* v. 40, n. 6, p. 786-796, 2009.
- TSOI, K. H.; CHAN, T. Y.; CHU, K. H. Molecular population structure of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* species complex in western Pacific. **Marine Biology**, v. 150, n. 6, p. 1345-1364, 2007.
- TSOI, K. H.; WANG, Z. Y.; CHU, K. H. Genetic divergence between two morphologically similar varieties of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus*. **Marine Biology**, v. 147, n. 2, p. 367-379, 2005.

- VALENTIN, J. L. The Cabo Frio upwelling system, Brazil. In: **Coastal marine ecosystems of Latin America**. Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 97-105.
- VALLES-JIMENEZ, R.; CRUZ, P.; PEREZ-ENRIQUEZ, R. Population Genetic Structure of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA Variation. **Marine Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 475-484, 2005.
- VASEEHARAN, B. *et al.* Molecular markers and their application in genetic diversity of penaeid shrimp. **Aquacult International**, v. 21, n. 2, p. 219-241, 2013.
- VOLOCH, C. M.; SOLÉ-CAVA, A. M. Genetic structure of the sea-bob shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri* Heller, 1862; Decapoda, Penaeidae) along the Brazilian southeastern coast. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 254-257, 2005.
- WAQAIRATU, S. S. *et al.* Genetic analysis of Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) across its natural distribution range reveals more recent colonization of Fiji and other South Pacific islands. **Ecology and Evolution**, v. 2, n. 8, p. 2057-2071, 2012.
- WARD, R. D. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.
- WATERS, J. M.; ROY, M. S. Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene-flow?. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 9, p. 2797-2806, 2004.
- WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays**, v. 29, n. 2, p. 188-197, 2007.

- WILLIAMS, S. T.; KNOWLTON, N. Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 8, p. 1484-1493, 2001.
- WINTER, G. Towards Sustainable Fisheries Law: A Comparative Analysis. **International Union for Conservation of Nature**. Gland, Switzerland. 340 p.
- ZENGER, H. H.; AGNES, J. L. Distribuição do camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*) ao longo da costa sudeste e sul do Brasil. **SUDEPE/PDP Documentos Técnicos**, v. 21, 1977.
- ZHANG, De-X.; GODFREY, M. H. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 6, p. 247-251, 1996.