



Rede Nordeste de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

SULIMARY OLIVEIRA GOMES

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E GENÉTICA DO CARANGUEJO *Cardisoma*
ganhumi (Crustacea, Decapoda, Brachyura)**

TERESINA

2016

SULIMARY OLIVEIRA GOMES

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E GENÉTICA DO CARANGUEJO *Cardisoma
guanhumi* (Crustacea, Decapoda, Brachyura)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – Embrapa Meio- Norte – Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária

Orientador: Dr. Fábio Mendonça Diniz

Teresina

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

G633c Gomes, Sulimary Oliveira.
Caracterização genômica e genética do caranguejo *Cardisoma
ganhumi* (Crustacea, Decapoda, Brachyura) / Sulimary Oliveira
Gomes – 2016.
74 f ; il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO) –
Universidade Federal do Piauí, 2016.
“Orientador Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz.”

1. Conservação. 2. Gecarcinidae. 3. Microssatélites. 4.
Sequenciamento. I. Título.

CDD 595.386

Título: CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E GENÉTICA DO CARANGUEJO
Cardisoma guanhumi (Crustacea, Decapoda, Brachyura)

Autor (a): Sulimary Oliveira Gomes

Aprovado em: ___/___/_____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva
Universidade Federal do Piauí
(Membro externo)

Pesquisador Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima
Embrapa Meio Norte
(Membro externo)

Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes
Universidade Federal do Piauí
(Membro externo)

Profa. Dra. Ângela Celis de Almeida Lopes
Universidade Federal do Piauí
(Membro externo)

Pesquisador Dr. Fábio Mendonça Diniz
Embrapa Meio Norte
(Membro Interno - Orientador)

“Não temas; crê somente”

Marcos, 5, 36

A Deus, nosso Senhor....

OFEREÇO

À minha mãe, Fátima Gomes, aos amados irmãos Sulivan, Sulleandro, Suldblano e Francisco Vinicius; aos sobrinhos Victória Cristina, Lucas Ribeiro e Joffre Júnior; e em especial ao querido e amado esposo Everaldo Moreira da Silva.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor infinito;

A Universidade Federal do Piauí (UFPI) e ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), pela oportunidade de realização do curso;

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Meio-Norte) e ao Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização deste trabalho, aos funcionários pelo apoio e amizade;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Piauí (FAPEPI) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao pesquisador Dr. Fábio Mendonça Diniz, por seu profissionalismo, por todo encorajamento e ensinamentos;

Ao pesquisador Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima, pelo incentivo, ensinamentos e amizade;

A querida professora Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes, pelos conselhos e pela amizade sincera;

A todos os professores do curso, pela partilha do conhecimento e aos colegas de turma, pelo laço fraterno, incentivos e ensinamentos;

A minha família, meus maiores incentivadores, obrigada pelo amor e compreensão! A presença de todos vocês torna tudo mais fácil;

Ao Everaldo Moreira da Silva, pelo incentivo e amor incondicional;

Registro um agradecimento especial: a Isis Gomes de Brito Souza, Micheli Ferreira dos Santos, Geice Ribeiro da Silva, Brenda Yohara Santos e Silva, Maria Rosimere Xavier Amaral e Elisa Aparecida Alves Paiva;

A todos os estagiários do Laboratório de Biologia Molecular, por todo o companheirismo!

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!!!

RESUMO

GOMES, S. O. **Caracterização genômica e genética do caranguejo *Cardisoma guanhumi* (Crustacea, Decapoda, Brachyura)** 2016. 74 f. Tese (Doutorado) – RENORBIO. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016¹.

O caranguejo guaiamum, *Cardisoma guanhumi* Latreille (Decapoda: Gecarcinidae) possui ampla distribuição na região neotropical, é um recurso pesqueiro bastante apreciado na gastronomia. Sua comercialização tornou-se cada vez mais frequente, ocasionando preocupação devido à sobrepesca. Neste estudo, foi realizado o sequenciamento do genoma do *C. guanhumi* para a descrição de ferramentas moleculares, os microssatélites (SSR), visando estudo de diversidade e de estrutura populacional. Uma biblioteca Illumina *paired-end* foi criada seguindo o protocolo padrão de preparação de amostras da (Illumina Nextera DNA Kit) e em seguida as amostras foram sequenciadas por meio de um MiSeq Benchtop. As sequências contíguas (*contigs*) foram submetidas ao desenho de iniciadores (*primers*), dos 101.274 contíguas observados, 136 foram isolados e encaminhados para o desenho. No total foi possível obter 26 pares de iniciadores, com 11 locos polimórficos. A validação dos novos iniciadores foi dada pela análise de diversidade genética em populações da Flórida (n=25) e de Porto Rico (n=25). Como resultado, foi verificada a presença de diversidade genética, o número de alelos por loco variou entre dois (Cgua15796) e 13 (Cgua61432). A heterozigosidade esperada (H_e) foi de 0,248 a 0,837 (média 0,653), heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,045 a 0,739 (média 0,293). O $PIC=0,597$ variou de 0,215 a 0,805. Um alto nível de diferenciação $F_{ST} = 0,32$ foi estimado para as populações. As análises de PCoA e de estruturação (STRUCTURE) permitiram verificar a presença de dois grupos distintos. Em conclusão, os novos pares de microssatélites apresentados neste estudo demonstraram ser úteis em estudo populacional para a espécie, adicionalmente, o uso de ferramentas moleculares em *C. guanhumi* tende colaborar na sua conservação.

Palavras – chave: conservação, Gecarcinidae, microssatélites, sequenciamento

¹Orientador: Pesquisador Dr. Fábio Mendonça Diniz

ABSTRACT

GOMES, S. O. **Genetic and genomic characterization of crab *Cardisoma guanhumi* (Crustacea, Decapoda, Brachyura)** 2016. 74f. Thesis (Ph.D.) - RENORBIO. Federal University of Piauí, Teresina, 2016.¹

The crab, *Cardisoma guanhumi* Latreille (Decapoda: Gecarcinidae), has wide distribution in the Neotropical region. This crab is a fishing resource very appreciated in the gastronomy and its marketing has become increasingly common, which has caused concern due to the overfishing. In this study, it was performed the sequencing of the genome of *C. guanhumi* in order to develop molecular tools, the microsatellites (SSR), to study the diversity and population structure of the guanhumi crab. A Illumina *paired-end* library was generated by following the standard Illumina Nextera DNA Preparation Kit of samples and then the samples were sequenced by using a Benchtop MiSeq protocol. The contiguous sequences (contigs) were subjected to primer design, among the 101,274 observed contigs, 136 were eligible for the primer design. It was possible to obtain 26 pairs of primers, yielding 11 polymorphic loci. The validation of the new primers was given by the genetic diversity analysis in populations from Florida (n = 25) and Puerto Rico (n = 25). As a result, it was observed the presence of genetic diversity within populations, as well as genetic differentiation. The number of alleles per locus varied between two (Cgua15796) and 13 (Cgua61432). The expected heterozygosity (He) ranged from 0.248 to 0.837 (average 0.653), and the observed heterozygosity (Ho) ranged from 0.045 to 0.739 (average 0.293). These analyzes demonstrate that there was genetic diversity. The PIC = 0.597 obtained ranged from 0.215 to 0.805. A high level of differentiation $F_{ST} = 0.32$ was estimated for the population. The PCOA and structure (STRUCTURE) analyzes indicated the presence of two distinct groups. In conclusion, the new pairs of microsatellites developed in this study have shown to be useful in populational study for the specie and the use of molecular tools in *C. guanhumi* tends to collaborate with their conservation.

Keywords: conservation, Gecarcinidae, microsatellite, sequencing

¹ Supervisor: Researcher Dr. Fábio Mendonça Diniz

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Distribuição da espécie *Cardisoma guanhumi* ao longo do continente Americano. Fonte: Amaral, 2014..... 22
- Figura 2.** *Cardisoma guanhumi* acomodado em galeria na área de manguezal. Fonte: Animaldiversity.org..... 24
- Figura 3.** Produção anual do *Cardisoma guanhumi* no Brasil entre 1994 e 2007. Fonte: IBAMA/Disponível em: Plano de Gestão de recursos pesqueiros, Ministério do Meio Ambiente, 2011..... 26
- Figura 4.** Produção anual do caranguejo *Ucides cordatus* no Brasil nos período de 1994 a 2007. Fonte: IBAMA/Disponível em: Plano de Gestão de recursos pesqueiros, Ministério do Meio Ambiente, 2011..... 26

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Repetições tetranucleotídeos mais frequentes em *Cardisoma guanhumi*..... 51

CAPÍTULO III

- Figura 1.** (A) *Scatter-plot* análise de coordenadas principais (PCoA) usando locos microssatélites *C. guanhumi* (B) Estrutura genética de populações de *Cardisoma guanhumi* baseada na análise Bayesiana do *software* Structure (K=2). Os indivíduos são representados em cada linha vertical..... 66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Conteúdo de microssatélites do genoma <i>Cardisoma guanhumi</i>	48
Tabela 2.	Número, comprimento, comprimento médio, abundância relativa e densidade dos motivos de maior frequência em <i>Cardisoma guanhumi</i>	50
Tabela 3.	Características dos tipos de microssatélites em <i>Cardisoma guanhumi</i>	51

CAPÍTULO III

Tabela 1.	Características de iniciadores microssatélites descritos para <i>Cardisoma guanhumi</i> ($N = 50$)	64
Tabela 2.	Valores de diversidade genética em 50 indivíduos de <i>Cardisoma guanhumi</i> por meio de locos de microssatélites tetranucleotídeos polimórficos	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFLP	Amplified fragment length polymorphism
DNAmt	Mitochondrial DNA
dsDNA	double - stranded DNA
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium
ISSR	Inter simple sequence repeats
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next-Generation Sequencing
PCR	Polymerase chain reaction
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
tRNA	transporter RNA

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO I.....	18
Técnicas moleculares aplicadas em populações de caranguejo de mangue <i>Cardisoma guanhumi</i> (Latreille 1825) (Crustacea: Gecarcinidae): estado atual e estratégias emergentes	18
RESUMO	19
ABSTRACT	20
INTRODUÇÃO	21
1 Taxonomia e distribuição geográfica	22
1.2 O caranguejo de mangue (<i>Cardisoma guanhumi</i> Latreille, 1825)	22
2. Importância econômica	24
3. Estratégias emergentes: ferramentas moleculares visando à conservação	28
REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO II	43
Isolamento e análise de sequências microssatélites em caranguejo guanhumi (<i>Cardisoma guanhumi</i>).....	43
RESUMO	44
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO III	55
Descrição e caracterização de marcadores microssatélites para a avaliação da diversidade genética em <i>Cardisoma guanhumi</i> em populações do Caribe.....	55

RESUMO	56
ABSTRACT	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS	70

INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825, pertencente à família Gecarcinidae (Crustacea: Decapoda: Brachyura), cuja dispersão se estende ao longo da Costa Atlântica Americana, compreendendo desde o estado da Flórida, nos Estados Unidos até Santa Catarina, no Sul do Brasil. Dentre outras denominações são popularmente conhecidos como caranguejo terrestre, caranguejo azul, guaiamum, guaiamú, goiamum. São semiterrestres e habitam o ambiente de manguezal (MELO, 1996; FERREIRA et al., 2009; FELDER et al., 2009).

Nos mangues, a captura (pesca ou cata) de caranguejos caracteriza-se como uma atividade extrativista tradicional, geradora de renda para a comunidade local, portanto, a exploração e comercialização do *C. guanhumi* é uma atividade importante para a economia. Além disso, esses animais desempenham funções importantes quanto, a ciclagem de nutrientes, pois participam ativamente no processo de decomposição da matéria orgânica, assim como na aeração solo (CANESTRI, RIUZ, 1973; PINHEIRO; FISCARELLI, 2001; GEO BRASIL, 2002).

Entretanto, mesmo a espécie apresentando importância econômica, social e ecológica, seu estoque natural vem sofrendo reduções significativas ao longo da costa brasileira. Entre os principais motivos, estão à captura excessivamente praticada e a degradação do habitat (BOTELHO et al., 2009). Tal problemática não ocorre apenas no Brasil, há registros dessas reduções em países como Porto Rico, Cuba, Honduras, México e Venezuela (RICO; MEDINA, 2010; CARMONA-SUÁRES, 2011). Como consequência, a espécie *C. guanhumi* foi incluída na “Lista nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes sobreexplorados ou ameaçados de sobreexploração”, na Instrução Normativa do Ministério do Meio Ambiente (MMA) nº. 05, de 21 de maio de 2004.

Conforme descrito por Lopilusa, Heilveil e Oneonta (2012), a ausência de ferramentas moleculares - marcadores polimórficos - específicos para a espécie *C. guanhumi* dificulta os avanços em estudos de conservação genética para esta espécie. Em geral, o conhecimento sobre a variabilidade genética contida em populações ameaçadas de extinção, é um requisito indispensável em programas de manejo e de conservação.

Dentre os marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são amplamente utilizados, destacam-se quanto à sua versatilidade como ferramentas moleculares (CHAMBERS; MACAVOY, 2000). São definidos como

repetições em tandem de pequenos motivos de DNA de 2-6 pares de base (pb) em comprimento. São multialélicos, codominantes, hipervariáveis, e estão dispersos por todo o genoma dos organismos eucarióticos (SCHLÖTTERER; PEMBERTON, 1998; DINIZ et al., 2007). Nos últimos anos, a tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) tem sido aplicada para produzir dados da sequência do genoma, para posterior caracterização estrutural e funcional, podendo ser utilizado também para isolar e desenvolver marcadores moleculares.

Apesar de toda difusão desses marcadores em estudos genéticos, sua aplicação para a espécie *C. guanhumi* encontra-se em fase inicial, pois até o momento, somente 13 SSRs estão registrados no GenBank®, banco de dados genômicos do NCBI (Centro Nacional para Informações de Biotecnologia). Havendo, portanto, uma necessidade em aumentar o número de marcadores específicos para a espécie *C. guanhumi*.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo realizar a caracterização genética e genômica do caranguejo *C. guanhumi* a partir de dados do sequenciamento, visando também, desenvolver e validar marcadores de microssatélites polimórficos.

O conteúdo descrito neste estudo está estruturado em forma de capítulos, conforme segue: O capítulo I apresenta uma revisão na qual foi feito um levantamento dos principais trabalhos realizados com *Cardisoma guanhumi*, abordando a aplicação de ferramentas moleculares, com vistas à diversidade e conservação da espécie. Deste capítulo foi gerado o seguinte artigo de revisão “*Molecular techniques in mangrove crab populations Cardisoma guanhumi (Latreille 1825) (Crustacea: Gecarcinidae): current state and emerging strategies*”. O capítulo II descreve os dados do sequenciamento do caranguejo *Cardisoma guanhumi*, no qual foi possível realizar o isolamento e a análise de sequências de microssatélites, algo inédito para esta espécie. O artigo deste capítulo é intitulado “*Isolation and analysis of microsatellite sequences in guanhumi crab (Cardisoma guanhumi)*”. O capítulo III relata a descrição e a validação de marcadores de microssatélites, tendo como artigo “*Development and characterization of tetranucleotide microsatellite markers for the blue land crab Cardisoma guanhumi using Illumina paired-end sequencing data and a preliminary evidence of genetic differentiation in the Caribbean*”.

REFERÊNCIAS

- BOTELHO, E. R. R. O.; SANTOS, M. C. F.; ALMEIDA, L.; SILVA, C. G. M. Caracterização biológica do guaiamum, *Cardisoma guanhumi*, Latreille, 1825 (DECAPODA: GECARCINIDAE) DO ESTUÁRIO DO RIO CARAVELAS (CARAVELAS – BAHIA). **Boletim Técnico-Científico do CEPENE**, Tamandaré – PE. v.17, n.1, p.65-75, 2009.
- CANESTRI, V.; RIUZ, O. Destruction of mangroves. **Marine Pollution Bulletin**. v. 4, p. 83-185, 1973.
- CARMONA-SUÁREZ, C. Present status of *Cardisoma guanhumi* Latreille (Crustacea: Brachyura: Gecarcinidae) populations in Venezuela. **Interciência**, v. 36, n. 12, p. 908-913, 2011.
- CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: Consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 126, p. 455-476, 2000.
- DINIZ, F. M.; IYENGAR, A.; LIMA, P. S. C.; MACLEAN, N.; BENTZEN, P. Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for high throughput genotyping. **Genetics and Molecular Biology**. v. 30, p. 380-384, 2007.
- FELDER, D. L.; ÁLVAREZ, F.; GOY, J.; LEMAITRE, R. Decapoda (Crustacea) of the Gulf of Mexico, with Comments on the Amphionidacea. In: FELDER, D. L.; CAMP, D. K. **Gulf of Mexico Origin, Waters, and Biota: Biodiversity**. First edition. Texas A&M University Press. p. 1019-1104, 2009.
- FERREIRA, E. M.; MOURÃO, J. S.; ROCHA, P.D.; NASCIMENTO, D. M.; BEZERRA, D. M. M. S. Q. Folk classification of the crabs and swimming crabs (Crustacea – Brachyura) of the Mamanguape river estuary, Northeastern – Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v.5, p. 22, 2009.
- GEO BRASIL. **Perspectivas do Meio Ambiente**. 1ª ed. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis, Brasília, Brasil, 447p, 2002.
- LAPILUSA, T. L.; HEILVEIL, J. S.; ONEONTA, S. **Microsatellite genetic marker development for gecarcinid land crabs in The Bahamas**, The College at Oneonta Founda, 2012.
- MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. São Paulo, Plêiade/ FAPESP. 604p, 1996.
- PINHEIRO, M. A. A.; FISCARELLI, A. G. **Manual de apoio à fiscalização do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*)**. Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros do Litoral Sudeste e Sul do Brasil. IBAMA, Itajaí, Brasil. 43p, 2001.

RICO, P.; MEDINA, A. **Plan de Manejo Pesquero del Refugio de Vida** “Aspectos biológicos y poblacionales de *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825), en la Laguna de Tampamachoco y Majahual en Tuxpan, Veracruz”. Silvestre Barras Cuero y Salado: La Ceiba, Honduras, p. 1–52. 2010.

SCHLÖTTERER, C.; PEMBERTON, J. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. In: **R. DeSalle and B. Schierwater, eds. Molecular approaches to ecology and evolution**. Birkhäuser, Basel, Switzerland. p. 71–86, 1998.

CAPÍTULO I

Técnicas moleculares aplicadas em populações de caranguejo de mangue *Cardisoma guanhumi* (Latreille 1825) (Crustacea: Gecarcinidae): estado atual e estratégias emergentes

Artigo de Revisão: *Molecular techniques in mangrove crab populations Cardisoma guanhumi (Latreille 1825) (Crustacea: Gecarcinidae): current state and emerging strategies*

RESUMO

A espécie *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825, pertencente à família Gecarcinidae (Crustacea: Decapoda: Brachyura), apresenta-se ao longo da Costa Atlântica Americana, compreendendo desde o estado da Flórida, nos Estados Unidos até Santa Catarina, no Sul do Brasil. É um crustáceo com alta aceitação na gastronomia brasileira. Porém, na costa brasileira, o habitat do *C. guanhumi* tem sido gravemente comprometido com o aumento da degradação ambiental, provocada especialmente por ações antrópicas. Tais problemas, o levou a ser inserido na lista de espécies com risco de extinção, e atualmente, está classificado como espécie “ criticamente em Perigo”. Desta forma, pesquisas baseadas em ferramentas moleculares, oferecem um suporte importante para se chegar a estratégias de conservação e de manejo. Diante do exposto, este artigo de revisão teve como objetivo estabelecer uma estreita relação entre a situação atual da espécie, com vistas em soluções emergentes, a partir de ferramentas moleculares.

Palavras – chave: Conservação; Gecarcinidae; marcadores moleculares.

ABSTRACT

The specie *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825, belonging to the family Gecarcinidae (Crustacea: Decapoda: Brachyura), is found along the American Atlantic coast, ranging from the state of Florida, in the United States, to Santa Catarina in southern Brazil. It is a crustacean with high acceptance in the Brazilian gastronomy. However, in the Brazilian coast, the *C. guanhumi* habitat has been seriously committed by the increasing of environmental degradation, especially caused by human actions. Such problems led the guanhumi crab to be inserted in the list of endangered species, and, currently, it is classified as "Critically Endangered" specie. Thus, researches based on molecular tools provide important support to reach management and conservation strategies. Therefore, this review article aimed to establish a close relationship between the current situation of the species and the use of molecular tools.

Keywords: Conservation; Gecarcinidae; molecular markers.

INTRODUÇÃO

Na costa brasileira, o habitat do *C. guanhum* tem sido gravemente comprometido com o aumento da degradação ambiental, provocada especialmente por ações antrópicas, sendo a pesca extrativista, uma das principais preocupações. Atualmente, esta espécie encontra-se em situação de risco de extinção, sendo classificado como espécie Criticamente em Perigo (BOTELHO et al., 2009; SUBIRÁ et al., 2012; IBAMA, 2014).

Desta forma, pesquisas baseadas em ferramentas moleculares, como os marcadores moleculares e o sequenciamento, oferecem um suporte importante para se chegar a estratégias de conservação, direcionam também ao melhor manejo da espécie. Nesse sentido, a caracterização genética atua de maneira eficiente, pois permite avaliar a variabilidade genética entre indivíduos em nível de DNA (MELCHINGER et al., 1994). Portanto, os marcadores moleculares são ferramentas que potencialmente colaboram em estudos de diversidade genética, estrutura genética e na conservação.

A utilização de marcadores moleculares na espécie *C. guanhum* ainda é reduzida, havendo poucos trabalhos com essa abordagem, todavia, é alta a demanda por informações moleculares, sobretudo, com vistas a estratégias de conservação. Entre os estudos realizados, destacam-se os de Oliveira-Neto et al. (2008), que pesquisaram a respeito da filogeografia, com base em marcadores microssatélites e mitocondrial; Pie et al. (2008), com abordagem sobre a organização da região controle do DNA mitocondrial; Heilveil et al. (2013) com a caracterização da diversidade genética na espécie com marcadores microssatélites, e mais recentemente, Amaral et al. (2015), com a identificação da alta diversidade genética e diferenciação genética em *C. guanhum* em populações no Atlântico Centro-Oeste, baseado no DNA mitocondrial.

A fim de ampliar a discussão, buscaram-se trabalhos descritos para o gênero *Eriocheir*, que conforme visto em estudo preliminar, as espécies desse gênero indicam ser relacionadas ao *C. guanhum* (dados não mostrados).

Esta revisão teve por objetivo reunir os principais estudos realizados a partir da aplicação de marcadores moleculares, visando à conservação do caranguejo *C. guanhum*, a partir de ferramentas moleculares.

1 Taxonomia e distribuição geográfica

O caranguejo guaiamum pertence ao filo Arthropoda (Latreille, 1825), ao subfilo Crustacea (Brunnich, 1772), a subclasse Malacostraca (Latreille, 1802), a ordem Decapoda (Latreille, 1802), a infraordem Brachyura (Linnaeus, 1758), família Gecarcinidae (MacLeay, 1838) e ao gênero *Cardisoma* (Latreille, 1825) (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA, 2011).

A espécie *Cardisoma guanhumi* apresenta ampla distribuição na região Neotropical. Tem ocorrência no leste da costa americana, na Flórida, passando pelas Ilhas do Caribe, até chegar à costa atlântica brasileira, mais especificamente ao Estado de Santa Catarina, no sul do país (GIFFORD, 1962, BURGGREN; MCMAHON, 1988; BRANCO, 1991) (Figura 1).



Figura 1 - Distribuição da espécie *Cardisoma guanhumi* ao longo do continente Americano. Fonte: Amaral (2014)

1.2 O caranguejo de mangue (*Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825)

O caranguejo guaiamum possui características peculiares quanto ao habitat, que é semiterrestre e quanto à coloração, que muda conforme a fase biológica do indivíduo. Popularmente, é conhecido como caranguejo terrestre, caranguejo azul, guaiamum, guaiamú, goiamum. Habitam áreas dos manguezais que ficam acima da marca da preamar

(nível máximo de uma maré cheia), são animais de hábitos noturnos, ao longo do mangue, constroem galerias que utilizam como abrigo e como proteção de predadores (Figura 2) (BRANCO, 1991, MELO, 1996; BOTELHO; SANTOS; SOUZA, 2001; BOTELHO, SANTOS, 2005). Essas galerias permitem a entrada de ar no solo, com isso aumenta a aeração nas camadas mais profundas, beneficiando a microbiota.

Silva, Schwamborn e Lins Oliveira (2014) realizaram um estudo de biologia populacional, com indivíduos do Estado do Rio Grande no Norte (Brasil), e concluíram que a espécie apresenta um crescimento lento, sendo os machos maiores que as fêmeas. Em relação à cor, houve comprovação que a mudança de tonalidade da carapaça está relacionada com as fases de desenvolvimento e de maturidade sexual, além disso, não foi possível estabelecer o período exato do recrutamento.

O tamanho do cefalotórax em machos é superior, em comparação ao das fêmeas. Essa informação foi obtida no estudo realizado por Shinozaki-Mendes et al. (2008), no qual tamanho médio das fêmeas foi de 4,34 a 8,56 cm, enquanto nos machos a variação foi de 2,84 a 9,22 cm, em indivíduos de *C. guanhumi* oriundos rio Jaguaribe, no Ceará. Além do Brasil, no México e em Cuba, também foi verificado o tamanho maior em machos (BOZADA; CHÁVEZ, 1986; SILVA; OSHIRO, 2002; RIVERA, 2005). Outro aspecto da biologia, destes animais, é que estão entre os maiores caranguejos de mangue e apresentam maturidade sexual tardia (JENNINGS; REYNOLDS; POLUNIN, 1999; DIELE et al., 2005).

A maturidade sexual no guaiamum ocorre quando o indivíduo está com cerca de quatro anos, período em que está pesando aproximadamente 40 g, não sendo raro encontrar pesos acima do citado. O *C. guanhumi* apresenta uma característica peculiar com relação à mudança do exoesqueleto (ecdise), em que, até atingir a fase adulta esses animais sofrem cerca de 60 mudas, enquanto em outras espécies de caranguejo, normalmente ocorrem 20 mudas até a fase adulta (HOSTETLER; MAZZOTTI; TAYLOR, 2013).

O período reprodutivo está associado ao sistema lunar e as marés. No momento em que as fêmeas lançam suas larvas, corresponde ao período de lua nova e de marés altas, sendo, portanto, aspectos importantes no ciclo reprodutivo da espécie. Outro fator importante é a salinidade, quando presente em níveis elevados compromete a sobrevivência das larvas, caracterizando um fato preocupante, pois é nessa fase onde ocorre a dispersão dos indivíduos, sendo fundamental para a estruturação da espécie (GIFFORD, 1962; HOSTETLER; MAZZOTTI; TAYLOR, 2013).

Abrunhosa et al. (2000) realizaram o cultivo de caranguejo em condições controladas e indicaram que a salinidade para o cultivo larval não deve ultrapassar a faixa de 20 a 25%, destacaram a necessidade em realizar estudos sobre larvicultura, afim de permitir o cultivo em larga escala e viabilizar o repovoamento em áreas afetadas com a sobrepesca.

Dentre os trabalhos disponíveis, constam na literatura abordagens relacionadas à fisiologia (HERREID, et al., 1979; PINDER; SMITS, 1993; GANNON; HENRY, 1996), biologia e ecologia (BOTELHO et al., 2001; SILVA; OSHIRO, 2002; SHINOZAKI-MENDES et al., 2008; BOTELHO et al., 2009; SHINOZAKI-MENDES et al., 2011; FIRMO et al., 2012; SILVA; SCHWAMBORN; LINS OLIVEIRA, 2014) e a distribuição e ocorrência da espécie (SILVA; COELHO, 1960; FARIAS, 1980), além daqueles relacionados com a reprodução e diversidade genética.

Contudo, tendo em vista à importância da espécie *C. guanhumi* e a carência de informações, sobretudo com abordagens específicas para a região Nordeste do Brasil, justifica-se a necessidade de ampliar os estudos nas mais variadas áreas, como genética, ecologia, melhoramento genéticos, dentre outros.



Figura 2 - *Cardisoma guanhumi* acomodado em galeria na área de manguezal. Fonte: Animaldiversity.org

2. Importância econômica

Compreende-se como manguezal, um ecossistema de transição entre os ambientes terrestre e marinho que se desenvolve nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, entre as latitudes de 30° N e 30° S (GIRI et al., 2011). Nos manguezais, a captura de caranguejos

caracteriza-se como uma atividade extrativista tradicional, geradora de renda para a comunidade local (PINHEIRO; FISCARELLI, 2001; GEO BRASIL, 2002). Portanto, a exploração e comercialização do caranguejo guaiamum é uma atividade importante para a economia, além disso, os mangues são identificados como unidade ecológica que dão suporte a dois terços da população pesqueira mundial (CANESTRI, RIUZ, 1973).

A comercialização do caranguejo guaiamum tem elevada expressão no Nordeste brasileiro, além de países como Porto Rico, Venezuela e nas ilhas do Caribe (FELICIANO 1962; TAISSOUN, 1974; WOLCOTT, 1988; RODRÍGUEZ-FOURQUET; SABAT, 2009). Apesar a explícita importância econômica, ainda existe inúmeras lacunas que seguramente precisam ser preenchidas para culminar em uma atividade mais estável, havendo a necessidade de estudos em toda sua cadeia produtiva, englobando conhecimentos na área de manejo, reprodução, sanidade, beneficiamento e especialmente, na área de melhoramento genético, genética molecular e conservação, exatamente por serem capazes de gerar informações complementares as áreas anteriormente mencionadas.

Na Índia, Patterson e Samuel (2005) obtiveram resultados significativos com o desempenho do caranguejo do gênero *Scylla* spp. (Brachyura; Portunidae), em uma dieta de engorda, realizada por um período entre 21 a 30 dias. Como resultado, os indivíduos tornaram-se mais valorizados, havendo também, aumento nas vendas, devido a maior qualidade oferecida, a mudança dos preços foi US\$ 4,63 para US\$ 9,53/ kg (SHELLEY, 2008). Isso demonstra como os estudos podem contribuir com o desempenho desses animais, e também para a economia.

Em 2013, a produção mundial de peixes, crustáceos e moluscos, atingiu 70.189,830 toneladas, sendo liderada pela China, que atingiu 43. 549,738 t; para o Brasil o valor alcançado foi de 473,429 t (FAO, 2014). Tem-se como registro único na produção brasileira de guaiamum o período compreendido entre 1994 a 2007 (Figura 3). Durante essa série histórica, foi observada uma drástica redução na produção do *C. guanhumi*, passando de 685 t (1994) para 89,5 t (2007), não havendo, porém, claros motivos para esses registros. Entretanto, para *Ucides cordatus* (caranguejo uça) uma espécie com elevada importância econômica, também registrou-se queda na produção anual. Mas nesse caso, o decréscimo da produção foi associado a práticas como, a captura ou cata, em exaustão do recurso em áreas específicas, como as do litoral do Ceará, e com a degradação dos manguezais (Figura 4), provavelmente, o mesmo se aplica para *C. guanhumi*.

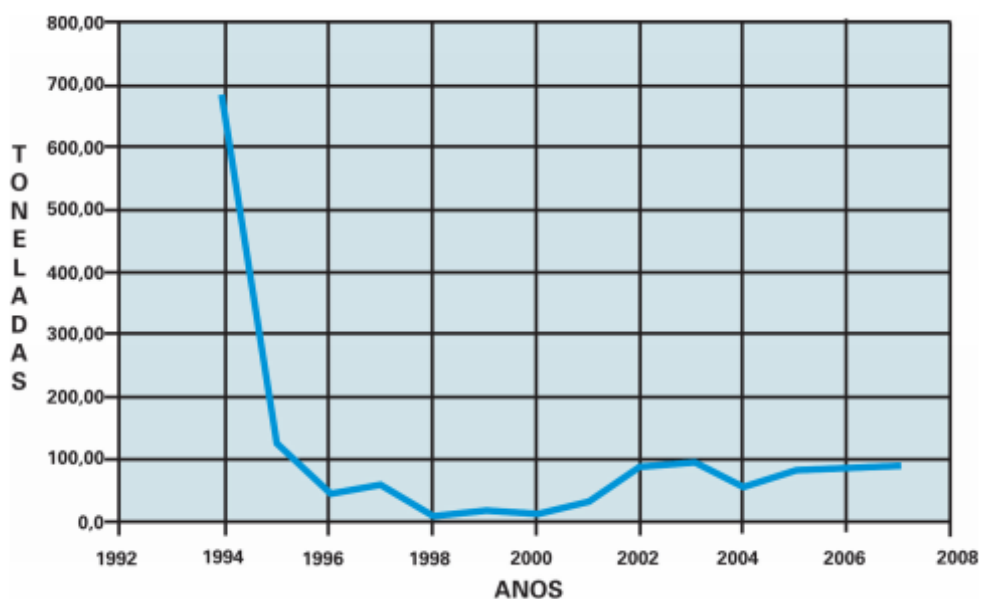


Figura 3 - Produção anual do *Cardisoma guanhumi* no Brasil, entre 1994 e 2007.

Fonte: IBAMA/Disponível em: Plano de Gestão de recursos pesqueiros, Ministério do Meio Ambiente, 2011.

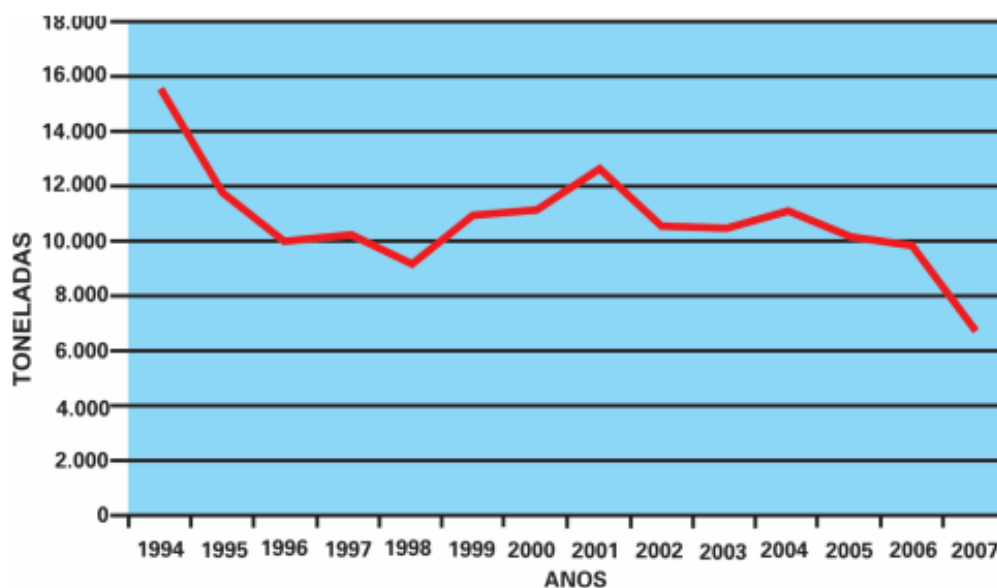


Figura 4 - Produção anual do caranguejo *Ucides cordatus* no Brasil, nos período de 1994 a 2007.

Fonte: IBAMA/Disponível em: Plano de Gestão de recursos pesqueiros, Ministério do Meio Ambiente, 2011.

Certamente, as informações descritas, despertaram a atenção, inclusive como um alerta, e provavelmente, incentivaram a inclusão dessas espécies na lista de espécies ameaçada de extinção. De maneira que o Ministério do Meio Ambiente (MMA) publicou, em 2004, a Lista Nacional das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Sobre-Explotados ou Ameaçados de Sobre-Exploração, por meio da Instrução Normativa nº 05/2004 (IN-MMA nº 5, de 21 de maio de 2004). Está presente nessa lista, um total de 11

espécies de invertebrados aquáticos, entre as espécies, dois caranguejos de mangue (*Cardisoma guanhumi* e *Ucides cordatus*) e uma de siri (*Callinectes sapidus*) (IBAMA, 2011), compõem ainda, os crustáceos, como as lagostas (*Panulirus argus* e *P. laevicauda*) e os camarões (*Farfantepenaeus brasiliensis*, *F. paulensis* e *F. subtilis*; *Litopenaeus schmitti* e *Xyphopenaeus kroyeri*) (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE-MMA, 2004). Em 2012, foi divulgada uma nova lista das espécies com risco de extinção da fauna brasileira e o guaiamum já aparece como espécie Criticamente em Perigo (CR) (SUBIRÁ et al., 2012; IBAMA, 2014).

3. Estratégias emergentes: ferramentas moleculares visando à conservação

Os manguezais são ecossistemas que desempenham função primordial com relação à manutenção do equilíbrio ecológico em regiões costeiras, destaca-se entre os ecossistemas, como grandes transformadores da matéria orgânica, resultando na ciclagem dos nutrientes. É um ambiente que apresenta condições ideais de alimentação, proteção e reprodução para várias espécies aquáticas (CORREIA; SOVIERZOSKI, 2005). De maneira, que a ampla biodiversidade presente nesse ecossistema resume toda sua importância como recurso global.

Dentre os crustáceos presentes no mangue, o caranguejo guaiamum encontra-se classificada pelo IBAMA, como espécie “Criticamente em Perigo”, isso causa preocupação, pois essa categoria antecede a classificação mais grave que é o “risco de extinção”. Como consequência, a perda de uma espécie tende a provocar impactos negativos para a sociedade, com clara implicação econômica. Desta maneira, é fundamental que seja estabelecido estratégias de conservação.

Conforme definido por Avise (2010), a genética da conservação corresponde ao conjunto de estudos genéticos que buscam compreender os processos populacionais e evolutivos presentes em populações sob o risco de ameaça. De maneira, que, ferramentas moleculares acessam em nível de DNA informações como a diversidade genética, revelando por meio de análises estatísticas, a estruturação das populações, inclusive, de regiões geográficas distintas, e assim esclarecem pontos como o histórico evolutivo e a dinâmica populacional das espécies (CABALLERO et al., 2010).

O estudo de conservação está baseado em estudos populacionais, a fim de definir as unidades prioritárias e assim traçar as estratégias de manejo (EIZIRIK, 1996). No caso do *C. guanhumi*, no Brasil, praticamente, inexistente um gerenciamento dos recursos que possa definir estratégias eficientes. A sobreexploração tem provocado reduções drásticas nos estoques naturais em países como Porto Rico, Cuba, Honduras, México e Venezuela (RICO; MEDINA, 2010; CARMONA-SUÁRES, 2011). Na literatura, inúmeros estudos recomendam que mais pesquisas sejam realizadas, para ampliar e complementar os resultados já disponíveis sobre a estruturação populacional para essa espécie (AMARAL et al., 2015; MAIA; TORRES, 2016).

A discussão sobre a conservação do caranguejo de mangue é muito ampla e envolve um esforço multidisciplinar. Porém, nesse levantamento, o foco principal foi

realizar uma abordagem mais específica, quanto ao uso de ferramentas moleculares em estudos de diversidade, estruturação, filogenia e conservação genética, em diferentes espécies de caranguejos.

Entre os trabalhos realizados com *C. guanhumi* destacam-se os de Oliveira-Neto et al. (2008), Pie et al. (2008), Heilveil et al. (2013), Amaral et al. (2015) e Maia e Torres (2016). Esses poucos estudos na área de genética molecular indicam a necessidade de informações que devem ser geradas. Entretanto, na tentativa de demonstrar que a aplicação de ferramentas moleculares exprime eficiência na elaboração de estratégias de conservação, foi feita uma abordagem em caranguejos do gênero *Eriocheir*, espécies filogenicamente relacionada com o *C. guanhumi* (dados não mostrados).

Como ferramentas moleculares, pode ser citado o RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*), que está baseado na amplificação aleatória de fragmentos de DNA, em reação de polimerase em cadeia (PCR). Caracteriza-se pela simplicidade da técnica, pelo baixo custo e por ser um marcador dominante, ou seja, é um marcador que não permite diferenciar indivíduos homozigotos dominantes de heterozigotos em uma população (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Outro marcador com características semelhantes é o ISSR (*inter simple sequence repeats*), diferindo do anterior basicamente por apresentarem, maior comprimento dos iniciadores (16 a 25 pb) e temperaturas mais elevadas (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). O AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) também é caracterizado por ser dominante, simples e rápido. Essa técnica envolve uma etapa de digestão do DNA genômico total com enzimas de restrição, seguida da ligação de adaptadores e da amplificação seletiva (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Enquanto que os microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*) são trechos de DNA que consistem em unidades curtas em tandem repetidas de 1-6 pares de base (pb) em comprimento. São multialélicos, codominantes e hipervariáveis, e dispersos por todo o genoma dos organismos eucarióticos (SCHLÖTTERER; PEMBERTON, 1998; DINIZ et al., 2007). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de iniciadores específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Outro marcador que está sendo útil em estudos de diversidade genética é o baseado em regiões do DNA mitocondrial (DNAm_t), que representa outra categoria de marcador

molecular, empregado em estudos populacionais e evolutivos. Entre suas principais características, destaca-se por possuir poucos genes, tendo então, um genoma compacto, com 16 a 20 quilobase (Kb), no total são 37 genes, sendo 13 genes de RNA mensageiros, 22 para RNA transportadores e dois de RNA ribossômicos. Possui uma região não codificada, conhecida como “D - loop” (*Displacement-loop*) em vertebrados e equinodermos ou região rica em adenina e timina (*AT-rich*) em invertebrados, que pode ainda ser chamada de região hipervariável, tem aproximadamente 0,8 Kb (ARIAS; SILVESTRE, 2003).

As técnicas RAPD e AFLP ainda não foram testadas na espécie *C. guanhumi*, ao contrário, porém, das espécies do gênero *Eriocheir*, em que inúmeros trabalhos já foram realizados, tendo como objetivo principal não só acessar a diversidade genética em populações, como também conservação, ecologia, filogenia, e demais abordagens permitidas pelos marcadores moleculares.

Qiu et al. (1997) utilizaram os marcadores RAPD para verificar a diversidade genética em três populações de *Eriocheir sinensis*. Outro estudo foi realizado por Xie et al. (1999), em que os autores descreveram a relação entre as espécies *Eriocheir sinensis*, *Eriocheir japonica* e *E. j. hepuensis*. Já, Jinliang e Sifa (1999), analisaram as diferenças genéticas bioquímicas de duas variedades de caranguejos *E. sinensis* e *E. japonica*.

A China lidera a produção e o consumo de organismos marinhos, com destaque para o caranguejo *Eriocheir sinensis*, que é muito apreciado. Todavia, na década de 1980, foi registrada redução drástica nos estoques naturais, provocadas pela sobreexploração e também por construções de barragens. Mas, de 1993 a 2004, as pesquisas com o gênero foram focadas, principalmente, para a melhoria da produção, e a partir de 2005 para aspectos de qualidade, como o tamanho corporal (SUI et al., 2011). Certamente, a realização de tais estudos foi amparada por relevantes contribuições de ferramentas moleculares.

As espécies *Eriocheir sinensis* e *Eriocheir japonica* apresentam elevado valor comercial na Coreia. Como estratégia de conservação, o repovoamento é realizado para aumentar o estoque natural das espécies de interesse. Então, visando gerar informações úteis na recuperação ecológica no habitat dos caranguejos, e assim colaborar com a manutenção dos recursos pesqueiros, Cho et al. (2014) realizaram um estudo com o marcador RFLP-PCR, cujo objetivo era identificar entre duas espécies de caranguejo, *E. sinensis* e *E. japonica*, indivíduos no estágio juvenil. O estudo foi conduzido, a partir do

fragmento do gene mitocondrial *Cyt b*, da aplicação de nove iniciadores de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e do uso de uma enzima de restrição (*MboII*).

O marcador ISSR demonstrou ser eficiente, tendo capacidade de detectar diferenças genéticas entre populações de *C. guanhumi*. Recentemente, foi observada elevada diversidade genética em *C. guanhumi*, tendo como maior registro, a variação dentro das populações, com 80,95% e 19,05%, entre as populações. Esses resultados foram obtidos a partir da avaliação de nove iniciadores ISSR em 154 indivíduos, oriundos de cinco estuários do Litoral Norte, Central e Sul do estado de Pernambuco (Brasil). A estruturação populacional revelou duas populações (pela simulação bayesiana $K=2$), a primeira composta pelos indivíduos do Litoral Norte e Central (Goiana, Jaguaribe e Capibaribe), e a segunda pelo Litoral Sul (Sirinhaém e Rio Formoso). Os autores sugerem que mais estudos sejam feitos e alertam para a conservação da espécie, temendo os impactos ecológicos e socioculturais (MAIA; TORRES, 2016).

A ausência de informações do *C. guanhumi* relacionadas à variabilidade genética, estruturação, conservação, bem como reprodução, fitossanidade, ecologia, e tantas outras áreas do conhecimento, limita a discussão frente às espécies mais pesquisadas. Para estabelecer a exploração dos recursos marinhos de maneira sustentável, informações como o tamanho das populações, a redução da variação genética e principalmente, o risco de extinção compreendem fatores que necessitam ser respondidos para que se possam traçar metas de conservação (MOREIRA; TOMÁS; HILSDORF, 2011).

Heilveil, Lopilusa e Turner (2013) registraram os primeiros e únicos, marcadores de microssatélites específicos para a espécie *C. guanhumi*, visando colaborar com as pesquisas de conservação. Os marcadores SSRs foram caracterizados em indivíduos de *C. guanhumi* e *Discoplax celeste* (espécie de caranguejo indicada a conservação). Foram desenvolvido 40 locos, dos quais 13 foram passíveis de amplificação, sendo observado oito como polimórficos e cinco monomórficos. O tamanho do produto foi estimado entre 177 e 471 pb e cinco dos locos polimórficos foram comuns às duas espécies. De acordo com Lopilusa, Heilveil, Oneonta (2012), a ausência de marcadores moleculares polimórficos específicos para a espécie *C. guanhumi* dificulta os avanços em estudos de conservação genética.

Os primeiros marcadores de microssatélites para a espécie de caranguejo *Eriocheir japonica* foram desenvolvidos por Cheng et al. (2010). Um total de 20 locos foram

isolados e testados em 15 amostras da espécie *E. japonica* e em 60 amostras da espécie *E. sinensis*. A validação dos iniciadores demonstrou que é possível a amplificação cruzada entre espécies distintas - amplificação heteróloga - embora, os marcadores microssatélites sejam específicos para determinada espécie, são eficientes também, em indivíduos relacionados.

Com base em 24 microssatélites, Tao et al. (2007) verificaram a estrutura da população e conservação entre populações *E. sinensis*. Chang et al. (2008) também realizaram análises da diversidade genética e da estrutura populacional nessa espécie. Além de Li et al. (2016), que mais recentemente avaliaram um conjunto de 30 locos de microssatélites hipervariáveis. Os marcadores caracterizados foram adequados para avaliar a diversidade genética e a estrutura da população nos estudos. Pesquisas similares foram desenvolvidas por Hanfling e Weetman (2003); Chang et al. (2006) e Zhu, Shi e Le (2006).

Em estudo também baseado em microssatélites, Qiu et al. (2016) construíram mapa de ligação genética, entre populações do *Eriocheir sinensis* provenientes do norte e do sul da China. A construção do mapa de ligação constitui uma ferramenta que permite detectar locos com características quantitativas (QTL) e também ajudam a compreender a organização do genoma e da evolução.

A maior parte dos trabalhos sobre a estrutura da região controle (RC) concentra-se em vertebrados e em insetos, em crustáceos, alguns trabalhos descreveram a região controle, a exemplo do camarão (*Farfantepenaeus duorarum*) (GRABOWSKI; STUCK, 1999), da lagosta (*Panulirus argus*) (DINIZ et al., 2005), da barata do mar (*Ligia oceânica*) (KILPERT; PODSIADLOWSKI, 2006), tendo ainda, estudos de variabilidade genética e estrutura da população em camarão (*Oratosquilla oratoria*) (LUI et al. 2010), no siri (*Portunus trituberculatus*) (GUO et al., 2012) e na lagosta (*Panulirus homarus*) (FARHADI et al., 2013).

Em estudo realizado por Oliveira-Neto et al. (2008), foi possível verificar ausência de uma estruturação genética entre populações de *C. guanhumi*. Um fragmento da região controle do DNAm (750 bp) foi sequenciado para 95 indivíduos coletados em cinco estados brasileiros (Rio Grande do Norte, Pernambuco, Sergipe, Rio de Janeiro e Santa Catarina).

Pie et al. (2008) realizaram a organização da região controle do DNA mitocondrial para *C. guanhumi* (indivíduos de Aracaju, Sergipe, Nordeste do Brasil) e na espécie *Ucides cordatus* (Ocypodidae) (indivíduos de Guaratuba, Paraná, Sul do Brasil), com o intuito de

verificar possíveis semelhanças estruturais entre ambas. Apesar de pouca correspondência em nível dos nucleotídeos, as espécies parecem possuir uma concordância no padrão da organização estrutural.

Uma alta diversidade e diferenciação genética foram observadas em cinco populações de *C. guanhumi* do Atlântico Centro-Oeste (Alagoas, Bahia, Sergipe, Flórida, Porto Rico). O estudo realizado por Amaral et al. (2015), foi baseado na análise das sequências do DNAm_t, no qual, os padrões da estrutura genética populacional e da demografia histórica da espécie foram avaliadas com uma sequência parcial 12S rRNA concatenada com sequência da região controle, visando gerar dados importantes, úteis nas estratégias de conservação e na tomada de decisões em gestão de pesca. Foram revelados 234 sítios polimórficos na análise das sequências (DNAm_t), definidos por 93 haplótipos únicos, além de uma clara ruptura entre as populações do Caribe e do Brasil. Os autores alertam sobre a conservação e o *status* taxonômico do *C. guanhumi*, tendo em vista que existe a atuação do fator biogeografia, como barreira marinha, que dificulta fluxo gênico.

De acordo com Thorpe et al. (2000) a realização de estudos de genética de populações, são importante em espécies que sofrem algum tipo de ameaça de extinção, pois assim, é possível conhecer a estruturação populacional, além de identificar os estoques genéticos e de possibilitar o desenvolvimento de novas linhagens em cativeiro.

Complementando, dentre os parâmetros populacionais de elevada importância, o fluxo gênico e a riqueza alélica tendem ser os mais adequados na determinação de estratégias de conservação em espécies de interesse (SLATKIN, 1987; STORFER, 1999; AVISE, 2010; CABALLERO et al., 2010). Assim, devido ocorrência da sobrepesca e da degradação de habitats, em inúmeras espécies de vertebrados e de invertebrados marinhos, é fundamental identificar populações/regiões que possam ser direcionadas a programas de conservação, e assim, investigar questões reprodutivas (THORPE et al. 2000).

Para o *C. guanhumi*, pesquisas com abordagens sobre aspectos biológicos e de ecologia também tem sido realizadas, como por exemplo, Botelho et al. (2001); Silva e Oshiro, (2002); Duarte, Maia-Lima, Molina (2008); Shinozaki-Mendes et al. (2008); Botelho et al. (2009); Shinozaki-Mendes et al. (2011); Firmo et al. (2012); Souza et al. (2013); Silva, Schwamborn e Lins Oliveira (2014), dentre outros, porém a demanda por mais pesquisas persistem.

Dentre as medidas que podem resultar em conservação e recuperação das espécies ameaçadas, encontra-se a criação e ampliação de unidades de conservação, a elaboração de

planos de ação nacional para conservação de espécies ameaçadas de extinção, a instituição de medidas que aumentem a sustentabilidade das atividades pesqueiras, e a proibição de captura para espécies com risco muito alto e extremamente alto de extinção. Sabe-se, portanto, que o próprio reconhecimento do grau de ameaça em determinada espécie já é um instrumento importante de conservação (MMA, 2015).

Desta forma, a realização de estudos que visam conhecer a diversidade genética em populações *C. guanhumi* tende auxiliar no estabelecimento de estratégias de conservação, de modo que o uso de ferramentas moleculares torna-se um recurso capaz de gerar informações precisas em um curto espaço de tempo, atendendo, a situação de vulnerabilidade a qual a espécie se encontra. Porém, com esta abordagem, foi observado um baixo número de trabalhos para o caranguejo guaiamum, indicando a necessidade da realização de mais estudos, buscando aumentar, o número de indivíduos, os locais de coletas e o uso de ferramentas moleculares.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, F. A.; MENDES, L. N.; LIMA, T. B.; YAMAMOTO, S. O.; OGAWA, C. Y.; OGAWA, M. Cultivo do Caranguejo Terrestre *Cardisorna guanhumi* (Latreille, 1825) do Ovo ao Estágio Juvenil. **Revista científica de produção animal**. v. 2, n. 2, p. 190–197. 2000.
- AMARAL, M. R. X. **Estudo da estrutura genética populacional do caranguejo guaiamum, *Cardisoma guanhumi*, através da região controle do DNAm**. 91p. Dissertação (Mestrado/Genética e Melhoramento) – UFPI, Teresina, Piauí, 2014.
- AMARAL, M. R. X.; ALBRECHT, M.; MCKINLEY, A. S.; CARVALHO, A. M. F.; SOUSA, S. C.; DINIZ, F. M. Mitochondrial DNA variation reveals a sharp genetic break within the distribution of the blue land crab *Cardisoma guanhumi* in the Western Central Atlantic. **Molecules**. v. 20, p. 15158–15174, 2015.
- ARIAS, M. C.; SILVESTRE, D. **O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos**. Apoidea Neotropica: Homenagem Aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure, p. 305–309, 2003.
- AVISE, J. C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. **Conservation Genetics**. v. 11, p. 665–669, 2010.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa-MG: UFV, 532p, 2009.
- BOTELHO, E. R. R. O.; SANTOS, M. C. F.; ALMEIDA, L.; SILVA, C. G. M. Caracterização biológica do guaiamum, *Cardisoma guanhumi*, Latreille, 1825 (Decapoda: Gecarcinidae) do estuário do rio caravelas (Caravelas – Bahia). **Boletim Técnico-Científico do CEPENE**, Tamandaré – PE. v. 17, n. 1, p. 65-75, 2009.
- BOTELHO, E. R. R. O.; SANTOS, M. C. F. A cata de crustáceos e moluscos no manguezal do Rio Camaragibe - Estado de Alagoas: aspectos socioambiental e técnico-econômico. **Boletim Técnico-Científico do CEPENE** v.13, p. 77-96, 2005.
- BOTELHO, E. R. R. O.; SANTOS, M. C. F.; SOUZA, J. R. B. Aspectos populacionais do goiamum, *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825, do estuário do Rio Una Pernambuco - Brasil. **Boletim Técnico-Científico do CEPENE** v. 9, p. 123-146, 2001.
- BOZADA, L.; CHÁVEZ, Z. **La fauna acuática de la laguna del ostion**. Centro de Ecodesarrollo. México. 1986.
- BRANCO, J. O. Aspectos ecológicos dos Brachyura (Crustacea: Decapoda) no manguezal do Itacorubi, SC, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba. v.7, p.165- 179, 1991.
- BURGGREN, W.W.; MCMAHON, B. R. **Biology of the Land Crabs**. Cambridge University Press: Cambridge, UK. v. 1, p. 1–5, 1988.

- CABALLERO, A.; RODRÍGUEZ-RAMILO, S. T.; ÁVILA, V.; FERNÁNDEZ, J. Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. **Conservation Genetics**. v. 11, p.409 – 419, 2010.
- CANESTRI, V.; RIUZ, O. Destruction of mangroves. **Marine Pollution Bulletin**. v. 4, p. 183-185, 1973
- CARMONA-SUÁREZ, C. Present status of *Cardisoma guanhumi* Latreille (Crustacea: Brachyura: Gecarcinidae) populations in Venezuela. **Interciência**, v. 36, n. 12, p. 908-913, 2011.
- CHANG, Y. M.; LIANG, L. Q.; MA, H.; HE, J.; SUN, X.W; Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). **Journal of Genetics and Genomic**. v.35, n.3,p.171–176, 2008.
- CHANG, Y. M.; LIANG, L. Q.; LI, S. W.; MA, H. T.; HE, J. G.; SUN, X. W. A set of new microsatellite loci isolated from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Molecular Ecology Notes**. v. 6, p. 1237-1239, 2006.
- CHENG, Q.; YUAN, C.; WANG, J.; XU, J.; LEE, T.; WANG, C. Development of 20 microsatellite loci in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* and cross amplification in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. **Conservation Genetics Resources**. v. 2, p. 47–50, 2010.
- CHO, Y. A.; KIM, E. M.; KIM, M. J.; KANG, J. H.; DONG, C. M.; AN, H. S.; PARK, J. Y. A rapid and simple method for distinguishing two mitten crabs (*Eriocheir sinensis* and *Eriocheir japonica*) in Korea using PCR-RFLP and PCR. **Food Control**, v.36, p. 20–23, 2014.
- CORREIA, M. D.; SOVIERZOSKI, H. H. **Ecosistemas marinhos: recifes, praias e manguezais – Maceió**, (Conversando sobre ciências em Alagoas), EDUFAL, p. 54-55. 2005.
- DIELE, K; KOCH, V; SAINT-PAUL, U. Population structure, catch composition and CPUE of the artisanally harvested mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) in the Caeté estuary, North Brazil: Indications for overfishing. **Aquatic Living and Resource**. v. 18, p. 169-178, 2005
- DINIZ, F. M.; MACLEAN, N.; OGAWA, M.; CINTRA, I. H. A.; BENTZEN, P. The hypervariable domain of the mitochondrial control region in Atlantic spiny lobsters and its potential as a marker for investigating phylogeographic structuring. **Marine Biotechnol.** v. 7, p. 462-473, 2005.
- DINIZ, F. M.; IYENGAR, A.; LIMA, P. S. C.; MACLEAN, N.; BENTZEN, P. Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for high throughput genotyping. **Genetics and Molecular Biology**. v. 30, p. 380-384, 2007.

DUARTE, M. S.; MAIA-LIMA, F. A.; MOLINA, W. F. Interpopulational morphological analyses and fluctuating asymmetry in the brackish crab *Cardisoma guanhumi* Latreille (Decapoda, Gecarcinidae), on the Brazilian northeast coastline. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 3, n. 3, 294–303, 2008.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação, e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. **Revista Brasileira de Genética**. v. 19, p. 23-29, 1996.

FAO: **World aquaculture production of fish, crustaceans, molluscs**. by principal producers in 2014 Disponível em :<ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/a-4.pdf> Acessado em 10/05/2016.

FARIAS, M. C. Q. Crustáceos decápodos da Ilha da Restinga. **Boletim do Instituto Oceanográfico**. São Paulo, v. 29, n. 2, p. 169- 172, 1980.

FARHADI, A.; FARHAMAND, H.; NEMATOLLAHI, M. A.; JEFFS. A.; LAVERY. S. D. Mitochondrial DNA population structure of the scalloped lobster *Panulirus homarus* (Linnaeus 1758) from the West Indian Ocean. **ICES J. Journal of Marine Science**. v. 70, p. 1491–1498, 2013.

FELICIANO, C. **Notes on the biology and economic eille of Puerto Rico**. 1962

FIRMO, A. M. S.; TOGNELLA, M. M. P.; SILVA, S. R.; BARBOZA, R. R. R. D.; ALVES, R. R. N. Capture and commercialization of clue land crabs (guaiaumum) *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825) along the coast of Bahia State, Brazil: an ethnoecological approach. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** v. 8, n. 12, p. 2-12, 2012.

GANNON, A. T.; HENRY. R. P. Respiratory, cardiovascular, and hemolymph acid-base changes in the amphibious crab, *Cardisoma guanhumi*, in response to emersion and immersion. **The FASEB Journal**. v.11, n.3, 1996.

GEO BRASIL. **Perspectivas do Meio Ambiente**. 1ª ed. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis, Brasília, Brasil, 447p, 2002.

GIFFORD, C. A. Some observations on the general biology of the land crab, *Cardisoma guanhumi* (Latreille) in South Florida. **Bulletin of the Marine Biology Laboratory Woods**. v. 123, p. 207-223, 1962.

GIRI, C.; OCHIENG, E.; TIESZEN, L. L.; ZHU, Z.; SINGH, A.; LOVELAND, T.; MASEK, J.; DUKE, N. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**. v. 20, n. 1, p. 154-159, 2011.

GRABOWSKI, M.; STUCK, K. C. Structure and intraspecific variability of the control region mtDNA in the pink shrimp, *Farfantepenaeus duorarum* (Decapoda, Penaeidae). In: **Crustaceans and the biodiversity crisis**, Leiden (The Netherlands): Brill Academic Publishers. v. 1, p. 333-344, 1999.

GUO, E.; LIU, Y.; CUI, Z.; LI, X.; CHENG, Y.; WU, X. Genetic variation and population structure of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) inferred from mitochondrial control region. **Molecular Biology Report**. v. 39, n. 2, p.1453-1463,2012.

HANFLING, B.; WEETMAN, D. Characterization of microsatellite loci for the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Molecular Ecology Notes**. v. 3, p. 15–17, 2003.

HEILVEIL, J. S.; LAPILUSA, T. L.; TURNER, L. M. Characterization of microsatellite markers from the commodity species *Cardisoma guanhumi* Latrille and the Christmas Island blue crab (*Discoplax celeste*). **Conservation Genetics Resources**. v. 6, p. 99-101, 2013.

HERREID, C. F.; O'MAHONEY, P. M.; SHAH, G. M. Cardiac and respiratory response to hypoxia in the land crab, *Cardisoma guanhumi* (Latreille). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 63, p.145–15, 1979.

HOSTETLER, M. E.; MAZZOTTI, F. J.; TAYLOR, A. K. **Blue Land Crab**. (*Cardisoma guanhumi*) Wec 30 of University of Florida, IFAS Extension., 30–31, 2013.

IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável do Caranguejo-Uçá, do Guaiamum e do Siri-Azul** / José Dias Neto, organizador. – Brasília: Ibama, 2011.

IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Lista das Espécies da Fauna Brasileira ameaçadas de Extinção**. Anexo a: Instrução normativa no. 445 de 17 de dezembro de 2014. Brasília. 2014.

JENNINGS, S. J. D.; REYNOLDS, J. D.; POLUNIN, N. V. C. Predicting the vulnerability of tropical reef fishes to exploitation with phylogenies and life histories. **Conservation Biology**. v. 13, 1466-1475, 1999.

JINLIANG, Z.; SIFA, L. Phylogenesis of populations of mitten crabs (*Eriocheir sinensis*, *Eriocheir japonicus*) in six rivers of mainland China: biochemical genetic difference analysis. **Journal of Fisheries of China**. v. 23, n. 4, p. 331-336, 1999.

KILPERT, F.; PODSIADLOWSKI, L. The complete mitochondrial genome of the common sea slater, *Ligia oceanica* (Crustacea, Isopoda) bears a novel gene order and unusual control region features. **BMC Genomics**. v. 7, p. 241, 2006.

LAPILUSA, T. L.; HEILVEIL, J. S.; ONEONTA, S. **Microsatellite genetic marker development for gecarcinid land crabs in The Bahamas**, The College at Oneonta Founda, 2012.

LI, J.; GENG, X.; CHEN, L.; SUN, J. Identification and characterization of thirty novel microsatellite DNA markers from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* expressed sequence tags. **BMC Research Notes**. v. 9, n. 1, p.105, 2016.

LUI, K. K. Y.; LEUNG, P. T. Y.; NG, W. C.; LEUNG, K.M.Y. Genetic variation of *Oratosquilla oratoria* (Crustacea: Stomatopoda) across Hong Kong waters elucidated by

mitochondrial control region sequences. **Journal of The Marine Biological Association of The United Kingdom**. v. 90, n. 3, p. 623–631, 2010.

MAIA, D. J. G.; TORRES, R. A. Fine-scale genetic structuring, divergent selection, and conservation prospects for the overexploited crab (*Cardisoma guanhumi*) in tropical mangroves from North-eastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 1, p. 1–10, 2016.

MELCHINGER, A. E.; GRANER, A.; SING, M.; MESSMER, M. M. Relationships among *European barley* germplasm: I. Genetic diversity among winter and spring cultivars revealed by RFLPs. **Crop Science**. v. 34, p. 1191-1199, 1994.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos *Brachyura* (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. São Paulo, Plêiade/ FAPESP. 604p, 1996.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE-MMA. **Lista Nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração**. Instrução normativa Nº 5, 2004.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE-MMA. **Proposta de Plano Nacional de estão para o uso sustentável do caranguejo- Uça, Guaiamum e do Siri-azul**. Brasília: Ibama. 156 p, 2011.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE-MMA. **Pesquisa traça comportamento de peixes e invertebrados aquáticos**, 2015. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2015/01/pesquisa-traca-comportamento-de-peixes-e-invertebrados-aquaticos> acessado em 26/05/2016.

MOREIRA, A. A.; TOMÁS, A. R. G.; HILSDORF, A. W. S. Evidence for genetic differentiation of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) fishery populations from the southern coast of Brazil as revealed by microsatellites. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 407, p. 34–40, 2011.

OLIVEIRA-NETO, J. F.; PIE, M. R.; CHAMMAS, M. A.; OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. A. Phylogeography of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* (Decapoda:Gecarcinidae) along the Brazilian coast. **Journal of The Marine Biological Association of The United Kingdo**.v. 88, n. 7, p. 1417–1423, 2008.

PATTERSON, J.; SAMUEL, V.D. Participatory approach of fisherwomen in crab fattening for alternate income generation in Tuticorin, Southeast Coast of India. **Asian Fisheries Science**. v.18, p. 153–159, 2005.

PINDER, A.W.; SMITS, A.W. The burrow microhabitat of the land crab *Cardisoma guanhumi*: respiratory/ionic conditions and physiological response of crabs to hypercapnia. **Physiological zoology**.v. 66, p. 216– 236, 1993.

PIE, M. R.; OLIVEIRA-NETO, J. F.; BOEGER, A. W.; OSTRENSKY, A.; GAGGIO, R. A. The Organiization of the Mitochondrial Control Region in 2 Brachyuran Crustaceans:

Ucides cordatus (Ocypodidae) and *Cardisoma guanhumi* (Gecarcinidae). **Journal of Heredity**. v, 99. n. 4, p. 432-437, 2008.

PINHEIRO, M. A. A.; FISCARELLI, A. G. **Manual de apoio à fiscalização do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*)**. Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros do Litoral Sudeste e Sul do Brasil/IBAMA, Itajaí, Brasil. 43p, 2001.

QIU, G. F.; XIONGA, L. W.; LIUA, Z. Q.; YANC, Y. L.; SHEND, H. A. First generation microsatellite-based linkage map of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* and its application in quantitative trait loci (QTL) detection. **Aquaculture**. v. 451, p. 223–231, 2016.

QIU, T.; LU, R. H.; XIANG, C.; ZHANG, J. Studies on the genomic DNA genetic diversity in there populations of *Eriocheir sinensis* using RAPD. **Freshwater Fisheries**, v. 27, n. 5, p. 3-6, 1997.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**. v.128, p. 9-17, 2002.

RICO, P.; MEDINA, A. **Plan de Manejo Pesquero del Refugio de Vida** “Aspectos biológicos y poblacionales de *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825), en la Laguna de Tampamachoco y Majahual en Tuxpan, Veracruz”. Silvestre Barras Cuero y Salado: La Ceiba, Honduras, p. 1–52. 2010.

RIVERA, J. J. **El cangrejo terrestre *C. guanhumi* un recurso pesquero**. Ecofronteras. N 25. 2005.

RODRÍGUEZ-FOURQUET, C.; SABAT, A. M. Effect of harvesting, vegetation structure and composition on the abundance and demography of the land crab *Cardisoma guanhumi* in Puerto Rico. **Wetlands Ecology and Management**. v.7, p 627-640, 2009.

SCHLÖTTERER, C.; PEMBERTON, J. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. In: **R. DeSalle and B. Schierwater, eds. Molecular approaches to ecology and evolution**. Birkhäuser, Basel, Switzerland. p. 71–86, 1998.

SHELLEY, C. Capture-based aquaculture of mud crabs (*Scylla spp.*). In: Lovatelli, A.; Holthus, P.F. **Capture-based aquaculture. Global overview**. FAO Fisheries Technical Paper. v. 508, p. 255–269, 2008.

SHINOZAKI-MENDES, R. A.; SANTANDER-NETO, J.; HAZIN, F. H. V.; SILVA, J. R. F. Alometria do guaiamum, *Cardisoma guanhumi* LATREILLE, 1828 (Decapoda, Gecarcinidae) no estuário do rio Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**. v. 3, p. 24-27, 2008.

SHINOZAKI-MENDES, R. A.; SILVA, J. R. F.; SOUZA, L. P.; HAZIN, F. H. V. Histochemical study of the ovarian development of the blue land crab *Cardisoma guanhumi* (Crustacea: Gecarcinidae). **Invertebrate Reproduction and Development** p. 1-9, 2011.

SILVA, C.; SCHWAMBORN, R. C.; LINS OLIVEIRA, J. E. Population biology and color patterns of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* (Latreille 1828) (Crustacea: Gecarcinidae) in the Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v. 74, n. 4, p. 949-958, 2014.

SILVA, O. C.; COELHO, P. A. Estudo ecológico da Barra das Jangadas (Nota Prévia). *Trabalhos do Instituto de Biologia Marítima e Oceanográfica da Universidade Federal de Pernambuco*. Recife, 25 n. 2, v. 1, p. 235-46, 1960.

SILVA, R.; OSHIRO, L. M. Y. Aspectos reprodutivos do caranguejo Guaiamum, *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828 (Crustacea, Decapoda, Brachyura) da Baía de Sepetiba, RJ. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 19, p. 71-78, 2002.

SLATKIN, M. Gene flow and geographic structure of natural population. **Science**, v. 236, p. 787-792. 1987.

SOUZA, L. P.; SILVA, J. R. F.; ARAÚJO, A. M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphology of the female genital ducts of the blue land crab *Cardisoma guanhumi* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinidae). **Acta Zoologica**, v. 94, p. 300-307, 2013.

STORFER, A. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. **Conservation Biology**, v. 87, p. 173-180, 1999.

SUBIRÁ, R. J.; SOUZA, E. C. F.; GUIDORIZZI, C. E.; ALMEIDA, M. P.; ALMEIDA, J. B.; MARTINS, D. S. Avaliação científica do risco de extinção da fauna brasileira – Resultados alcançados em 2012. **Biodiversidade Brasileira**. v. 2, p. 17-24, 2012.

SUI, L.; WILLE, M.; CHENG, Y.; WU, X.; SORGELOOS, P. Larviculture techniques of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. **Aquaculture**. v. 315, n. 1, 16–19, 2011.

TAISSOUN, E. El cangrejo de tierra *Cardisoma guanhumi* (Latreille) em Venezuela. **Boletín do Centro de Investigaciones Biológicas**. v. 10, p. 4-9, 1974.

TAO, H. M. A.; CHANG, Y. M.; YU, D. M.; SUN, X. W. Microsatellite Variations Among Four Populations of *Eriocheir sinensis*. **Zoology Research**, v. 28, n. 2, p. 128-133, 2007.

THORPE, J. P.; SOLÉ-CAVA, A. M.; WATTS, P. C. Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. **Hydrobiologia**, v. 420, p. 165–184, 2000.

WOLCOTT, T. G. Ecology. In: BURGGREN, W. W.; MCMAHON, B. R. **Biology of the land crabs**. New York: Cambridge Press, p: 55- 96, 1988.

XIE, H.; LU, R. H.; XIANG, C. M.; ZHANG, J.; QIU, T. Studies on the relationship of three mitten crabs using RAPD technique. **Acta Hydrobiologica Sinica**.v. 23, n. 2, p 120–126, 1999.

ZHU, Z. Y.; SHI, Y. H.; LE, G. W. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Molecular Ecology Notes**. v. 6, p. 838–839, 2006.

CAPÍTULO II

Isolamento e análise de sequências microssatélites em caranguejo guanhumi (*Cardisoma guanhumi*)

Artigo: *Isolation and analysis of microsatellite sequences in guanhumi crab (Cardisoma guanhumi)*

RESUMO

Entre os vários tipos de marcadores moleculares, os microssatélites, também conhecidos como sequências simples repetidas ou SSR (*simple sequence repeats*), compreendem sequências de repetições curtas de 2-6 nucleotídeos, que estão dispersas por todo o genoma dos organismos eucarióticos. No genoma sequenciado do caranguejo *Cardisoma guanhumi*, foram realizadas buscas de locos microssatélites, a análise estatística foi realizada no *software* MSDB, versão 2.4.3. Uma biblioteca de extremidades emparelhadas da Illumina foi produzida conforme especificações do kit de preparação da Illumina Nextera (Illumina Inc.). O sequenciamento foi conduzido usando o sequenciador Miseq Benchtop (Illumina Inc.). As sequências contíguas (*contigs*) foram criadas a partir dos dados emparelhados pelas extremidades obtidas por meio do CLC Genomics Workbench 7.0.4. De modo que, neste estudo foram identificados um total de 114.702 SSRs, a abundância relativa foi de 2.588,28 SSRs/Mb, sendo que os mononucleotídeos foram os mais abundantes, perfazendo 46,72% de todos os SSRs, seguido por dinucleotídeos (27,74%), trinucleotídeos (18,65%) tetranucleotídeos (6,35%), pentanucleotídeos (0,46%) e hexanucleotídeos (0,09%). Para a obtenção das leituras (*reads*) foram utilizados 1 ng de DNA genômico. Nesse contexto, o presente estudo tem por objetivo realizar a detecção e caracterização dos microssatélites no genoma do *C. guanhumi*, para possibilitar maior compreensão e auxiliar no processo de descrição dos marcadores específicos, usando a tecnologia de sequenciamento de nova geração.

Palavras - chave: Desenho de iniciadores; genoma; variabilidade genética.

ABSTRACT

Among the various types of molecular markers, the microsatellites, also known as single repeated sequences or SSR (*Simple Sequence Repeats*), comprise short sequence repetitions from 2-6 nucleotides, which are dispersed throughout the genome of eukaryotic organisms. In the sequenced genome of the crab *Cardisoma guanhumi*, searches of microsatellite loci were conducted. The statistical analysis was performed on the MSDB software, version 2.4.3. A Illumina *paired-end* library was generated according to the kit specifications of Illumina Nextera (Illumina Inc.). The sequencing was carried out using the Sequencer Miseq Benchtop (Illumina Inc.). The contigs were created from the data of the sequences matched by the edges obtained through the CLC Genomics Workbench 7.0.4. Thus, in this study, we identified a total of 114 702 SSRs, the relative abundance was 2588.28 SSRs / Mb. The mononucleotides were the most abundant, accounting for 46.72% of all the SSRs, followed by dinucleotides (27.74%), trinucleotide (18.65%) tetranucleotídeos (6.35%), pentanucleotide (0.46%) and hexanucleotídeos (0.09%). In order to obtain the *reads*, 1 ng of genomic DNA was used as sample. This was the first study that searched for microsatellite loci for *C. guanhumi*. From these data, molecular tools can be developed to being used in genetic characterization studies.

Keywords: Primer design; genome; genetic variability.

INTRODUÇÃO

Entre os vários tipos de marcadores moleculares, os microssatélites, também conhecidos como sequências simples repetidas ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), compreendem sequências de repetições curtas de 2-6 nucleotídeos, que estão dispersas por todo o genoma dos organismos eucarióticos (SCHLÖTTERER; PEMBERTON, 1998; DINIZ et al., 2007). Esses marcadores são amplamente usados na construção de mapas genéticos, na análise de diversidade e de estruturação populacional, além de estudos na área de filogenia. O que garante o seu amplo uso é o fato de apresentarem herança mendeliana, serem multialélicos, codominantes e hipervariáveis (ELLEGREN, 2004; JONES et al., 2010; JIAO et al., 2012). No genoma, podem ser classificados em perfeitos (sem interrupções), imperfeitos (com uma ou interrupções) e compostos (repetições adjacentes de uma sequência diferente) (WEBER, 1990; HANCOCK, 1999; SCHLÖTTERER; WIEHE, 1999).

A fim de direcionar estudos posteriores de isolamento e descrição de marcadores microssatélites, torna-se necessário, conhecer a sua frequência e abundância no genoma dos organismos a serem estudados. Para isso, diversas técnicas de sequenciamento tem sido implementadas, destacando-se os métodos de sequenciamento de nova geração (NGS), uma vez que possibilitam a produção de grande número de sequencias contíguas que cobrem grande parte do genoma. O conhecimento sobre a distribuição de microssatélites em *Cardisoma guanhumi* ainda é limitado, portanto, uma abordagem detalhada a respeito da frequência de microssatélites, é algo inédito e importante para a espécie, especialmente, por proporcionar a descrição de marcadores de microssatélites.

A espécie *C. guanhumi* possui elevado valor comercial, sua ocorrência é bastante vasta, estendendo-se ao longo da Costa Atlântica Americana, compreendendo desde o estado da Flórida, nos Estados Unidos até Santa Catarina, no Sul do Brasil (MELO, 1996; FERREIRA et al., 2009). Entretanto, práticas eficientes no manejo e na conservação são necessárias, pois a espécie encontra-se em situação de risco de extinção (Críticamente em perigo) devido constante decréscimo em seus estoques naturais (IBAMA, 2014).

Nesse contexto, o presente estudo tem por objetivo realizar a detecção e caracterização dos microssatélites no genoma do *C. guanhumi*, para possibilitar maior

compreensão e auxiliar no processo de descrição dos marcadores específicos, usando a tecnologia de sequenciamento de nova geração.

MATERIAL E MÉTODOS

Os indivíduos de *C. guanhumi* foram coletados em manguezais nos estados de Alagoas e da Bahia (Nordeste, Brasil), dos quais foram retiradas amostras de tecido muscular das patas torácicas, que foram identificadas e armazenadas em etanol absoluto, sendo mantidas a - 20°C. A extração do DNA genômico total foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI, utilizou-se o protocolo com fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (SAMBROOK; FRISTISCH; MANIATIS, 2005), o tecido muscular foi digerido com proteinase K e ressuspenso em Tris EDTA-tampão (TE) (pH 7,5). O DNA de elevado peso molecular foi quantificado por eletroforese em gel (0,8% de gel de agarose).

Para a obtenção das leituras (*reads*) foram utilizados 1 ng de DNA genômico, que geraram uma biblioteca de extremidades emparelhadas da Illumina, produzida conforme especificações do kit de preparação da Illumina Nextera (Illumina Inc.). O sequenciamento foi conduzido no sequenciador Miseq Benchtop (Illumina Inc.). As sequências contíguas foram criadas a partir dos dados emparelhados pelas extremidades obtidas por meio do CLC Genomics Workbench 7.0.4 (Qiagen). Esta etapa foi desenvolvida em parceria com Marine Gene Probe Lab - Department of Biology Dalhousie University (Nova Scotia - Canadá).

A análise estatística foi realizada no *software* MSDB, versão 2.4.3 (DU et al., 2013). Para identificar os microssatélites foram feitas análises para mononucleotídeos, dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos com número mínimo de repetições de 12, 7, 5, 4, 4 e 4, respectivamente.

A partir desses critérios foram gerados dados referentes: ao número de motivos, comprimento total e média de todos os motivos, abundância relativa (Nº de motivos/tamanho total das sequências analisadas em Mb) e densidade (comprimento total do motivos em bp/tamanho total das sequências analisadas em Mb).

Na análise foi considerada seis categorias de microssatélites: (1) puro ou perfeito (P) SSRs [ex., -(AC)₁₄-], (2) puros interrompidos [ex., -TA-(CA)₄-TA-(CA)₇-], (3)

compostos [ex., -(CT)22-(CA)6-], (4) compostos interrompidos [ex., -(AC)14-AGAA-(AG)12-], (5) complexos [ex., -(TG)22-(AG10-(ACAG)5-] e (6) complexos interrompidos [ex., -(CT)28-CGCACGCACG-(CA)13-GACAG-(AC)9-], conforme preconiza o manual do *software* MSDB.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, a partir do sequenciamento do genoma do *C. guanhumi*, foi possível realizar a identificação de microssatélites, sendo no total 114.702 SSRs, com a abundância relativa de 2.588,28 SSRs/Mb (Tabela 1). Sendo que os mononucleotídeos foram os mais abundantes, perfazendo 46,72% de todos os SSRs, seguido por dinucleotídeos (27,74%), trinucleotídeos (18,65%) tetranucleotídeos (6,35%), pentanucleotídeos (0,46%) e hexanucleotídeos (0,09%), esses dados foram obtidos após 3.408.799 leituras.

Tabela 1. Conteúdo de microssatélites do genoma *Cardisoma guanhumi*

Nucleotídeos	Total	Comprimento (bp)*	Média do comprimento (bp)	Abundância relativa (locos/Mb)**	Densidade (bp/Mb)	Percentual de cada repetição (%)
Mononucleotídeo	53.587	779.246	14,54	1.209,20	17.583.884	46,72
Dinucleotídeo	31.813	1.025.440	32,23	717,87	23.139.315	27,74
Trinucleotídeo	21.397	484.518	22,64	482,83	10.933.272	18,65
Tetranucleotídeo	7.279	151.300	20,79	164,25	3.414.123	6,35
Pentanucleotídeo	526	12.715	24,17	11,87	286.917	0,46
Hexanucleotídeo	100	2.454	24,54	2,26	55.375	0,09

*bp = pares de bases, **Mb=mega pares de base - 10⁶ bp

Os microssatélites estão entre os marcadores de DNA mais amplamente utilizados em estudos de genética na área de aquicultura (LIU; CORDES, 2004). Contudo, para *C. guanhumi*, a aplicação ainda é limitada, havendo poucos registros, a exemplo do estudo de caracterização realizado por Heilveil, Lopilusa e Turner (2013). Estudos realizados com outros tipos de marcadores, como DNAmT (AMARAL et al., 2015) e com ISSR (*inter simple sequence repeats*) (MAIA; TORRES, 2016), tem destacado que mais pesquisas sejam realizadas para ampliar e complementar os resultados já disponíveis sobre a estruturação populacional para o *C. guanhumi*.

Os recentes avanços no sequenciamento de nova geração NGS tornaram as descobertas de novos locos de microssatélites muito mais eficazes, já que os potenciais

marcadores microssatélites são identificados mais rapidamente, além de ser uma técnica de menor custo e mais precisa (GUICHOUX et al., 2011; LI et al., 2014; RICO et al., 2014). Apesar do isolamento e a descrição de marcadores de microssatélites serem específicos para determinada espécie, a amplificação heteróloga, pode ser utilizada. Neste caso, os marcadores específicos podem ser aplicados em outras espécies geneticamente relacionadas, ou seja, a proximidade evolutiva permite que os pares de marcadores sejam utilizados em espécies pertencentes a táxons relacionados (BARBARÁ et al., 2007).

Em maiores detalhes, a análise indicou que a maior parte dos microssatélites apresentaram comprimentos médios variando entre 14,54 e 32,23 bp. O comprimento dos microssatélites pode influenciar o processo de mutação, ocasionada pelo deslizamento da replicação do DNA (DIERINGER; SCHLÖTTERER, 2003; XU et al., 2000). De acordo com Chistiakov, Hellemans e Volckaert (2006), os tamanhos das repetições, especialmente os dinucleotídeos, pode provocar uma forte influência no aumento das taxas de mutações nos microssatélites.

Entre todas as repetições, mononucleotídeos, (A)_n e (T)_n foram os mais abundantes e o (G)_n foi o que apresentou a menor frequência (Tabela 2). Na repetição da categoria de dinucleotídeos, (AG)_n e (AC)_n foram os dois motivos mais frequentes de microssatélites, com 208,39 e 184,34 bp/Mb, respectivamente. Huang et al. (2015), também obtiveram (A)_n e (T)_n como motivos de maior frequência. A abundância de A(n) é comum nos organismos vertebrados e invertebrados (TÓTH; GÁSPÁRI; JURKA, 2000), enquanto que os trinucleotídeos do tipo (CAG)_n e (AGAT)_n predominam em marcadores SSR nos vertebrados. Entretanto, estudos realizados com peixes, revelaram que são os dinucleotídeos (CA)_n os marcadores SSR com maior frequência (ZHENG et al., 2010; IRANAWATI et al., 2012).

Os motivos de AC/GT, AAT/ATT e AGAT/ATCT foram abundantes e apresentaram elevada percentagem de locos, sendo adequado para o desenho de iniciadores nos peixes da América do Norte (*Etheostoma okaloosae*); foram abundantes também os motivos SSR no genoma de *Epinephelus bruneus* (SAARINEN; AUSTIN, 2010; KUBOTA et al., 2014).

Tabela 2. Número, comprimento, comprimento médio, abundância relativa e densidade dos motivos de maior frequência em *Cardisoma guanhumí*

Repetição	Total	Comprimento (bp)	Comprimento médio (bp)	Abundância relativa (locos/Mb)	Densidade (bp/Mb)
Mononucleotídeos					
A	30.257	438.686	14,50	682,76	9.899,06
C	498	8.118	16,30	11,24	183,18
G	381	6.266	16,45	8,60	141,39
T	22.451	326.176	14,53	506,61	7.360,24
Dinucleotídeos					
AC	8.169	229.792	28,13	184,34	5.185,32
AG	9.235	330.942	35,84	208,39	7.467,79
CT	7.981	282.968	35,46	180,09	6.385,24
GT	5.828	166.908	28,64	131,51	3.766,32
Trinucleotídeos					
AAT	1.366	38.637	28,28	30,82	871,85
ACT	3.512	86.772	24,71	79,25	1.958,03
AGT	3.342	81.735	24,46	75,41	1.844,37
CCT	2.159	39.255	18,18	48,72	885,80
Tetranucleotídeos					
AAGG	591	12.152	20,56	13,34	274,21
ACAG	1.431	31.676	22,14	32,29	714,78
CCTT	540	11.432	21,17	12,19	257,97
CTGT	1.040	22.396	21,53	23,47	505,37
Pentanucleotídeos					
AACAC	55	1.295	23,55	1,24	29,22
AACCT	60	1.750	29,17	1,35	39,49
AGGTT	48	1.285	26,77	1,08	29,00
CCTCT	28	630	22,50	0,63	14,22
Hexanucleotídeos					
AACAAG	8	204	25,50	0,18	4,60
ACAGAG	7	180	25,71	0,16	4,06
CTACTG	4	102	25,50	0,09	2,30
TGATGG	6	144	24,00	0,14	3,25

Os motivos tetranucleotídeos (ACAG)_n e (CTGT)_n foram as mais abundantes (Figura 1), mantiveram também a maior frequência relativa, densidade e comprimento. De acordo com Katti, Ranjekar e Gupta (2001), a densidade das SSRs tende a ser positivamente correlacionada com o tamanho do genoma. As repetições do tipo tetranucleotídeos são adequadas para a descrição de marcadores microssatélites, já que têm a tendência de serem mais informativas e mais estáveis sob as condições de PCR, do que, por exemplo, as repetições di- ou tri-nucleotídeos (GUO et al., 2013).

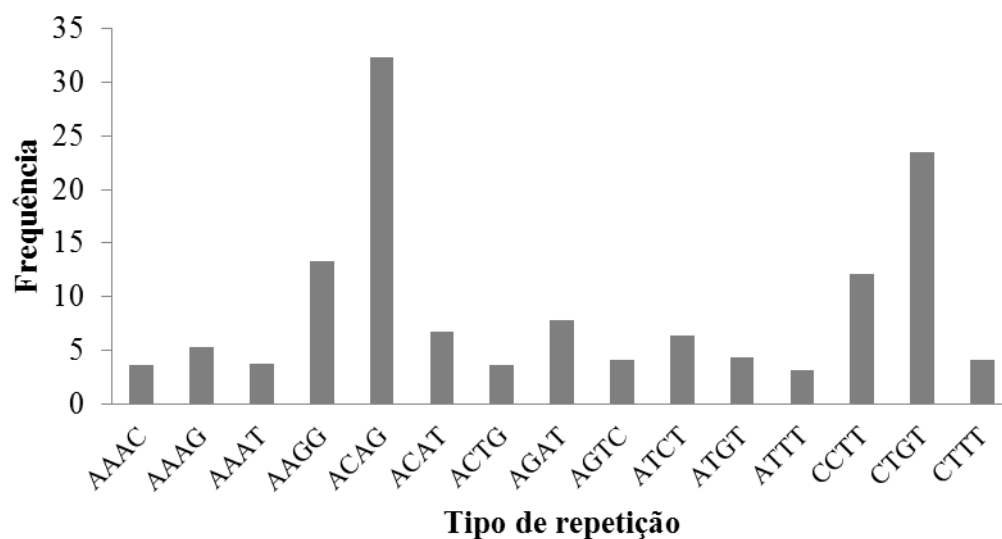


Figura 1. Repetições tetranucleotídeos mais frequentes em *Cardisoma guanhumii*

Os microssatélites puros foram os mais abundantes (96.956), além de obterem a maior frequência (2.187,84) e densidade (45.402,49), em contraste apresentaram o menor comprimento médio (20,75) (Tabela 3). Resultados semelhantes foram relatados por Araújo et al. (2015), para o caranguejo da espécie *Ucides cordatus*, em que a maioria dos locos encontrados foram puros (51,4%), sendo 20% e 28,6% para locos compostos e imperfeitos, respectivamente.

Tabela 3. Características dos tipos de microssatélites em *Cardisoma guanhumii*

Tipo de motivo	Total	Comprimento total (bp)	Comprimento médio (bp)	Frequência (locos/Mb)	Densidade (bp/Mb)
Composto	1.374	77.181	56,17	31,00	1.741,61
Completo	64	5.213	81,45	1,44	117,63
Composto interrompido	3.330	179.386	53,87	75,14	4.047,89
Complexo interrompido	1.076	97.436	90,55	24,28	2.198,67
Puro interrompido	2.209	114.388	51,78	49,85	2.581,19
Puro	96.956	2.012.053	20,75	2.187,84	45.402,49

No entanto, os dados obtidos contradizem o estudo feito por Behura e Severson (2015), ao estudarem 20 espécies de insetos representantes de cinco ordens taxonômicas, revelando diferentes proporções (15-46%) de microssatélites identificados como imperfeitos. Este foi o primeiro estudo que realizou a busca por locos de microssatélites para *C. guanhumii*, visando realizar a descrição de marcadores moleculares para aplicação em estudos na área de genética. Em conclusão, um conjunto de marcadores de microssatélites tetranucleotídeos pode ser descrito para o caranguejo *Cardisoma guanhumii*.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, M. R. X.; ALBRECHT, M.; MCKINLEY, A. S.; CARVALHO, A. M. F.; SOUSA JUNIOR, S. C.; DINIZ, F. M. Mitochondrial DNA Variation Reveals a Sharp Genetic Break within the Distribution of the Blue Land Crab *Cardisoma guanhumi* in the Western Central Atlantic. **Molecules** (Basel. Online), v. 20, p. 15158-15174, 2015.
- ARAÚJO, E. S.; BRITTO, F. B.; CARVALHO, A. M. F.; ORASMO, G. R.; DINIZ, F. M. Isolation and identification of a new set of microsatellite loci from *Ucides cordatus* genome. **Archives of Biological Sciences**, v. 67, n. 4, 1369–1376, 2015.
- BARBARÁ, T.; SILVA, C. P.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**. v. 16, p. 3759-3767, 2007.
- BEHURA, K. S.; SEVERSON, W. D. Motif mismatches in microsatellites: insights from genome-wide investigation among 20 insect species. **DNA Research**, v. 22, n. 1, 29–38, 2015.
- CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**. v. 255, p. 1-29, 2006.
- DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. Two distinct modes of microsatellite mutation processes: evidence from the complete genomic sequences of nine species. **Genome Research**, v. 13, p. 2242-2251, 2003.
- DINIZ, F. M.; IYENGAR, A.; LIMA, P. S. C.; MACLEAN, N.; BENTZEN, P. Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for high throughput genotyping. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 380-384, 2007.
- DU, L.; LI, Y.; XIUYUE, L.; YUE, B. MSDB: A user-friendly program for reporting distribution and building databaess of microsatellites from genome sequences. **Journal of Heredity**, v.104, n. 1, p. 154-157, 2013.
- ELLERGREEN, H. Microsatellites: simple sequence with complex evolution. **Nature review: Genetics**, v.5, p.435-445, 2004.
- FERREIRA, E. M.; MOURÃO, J. S.; ROCHA, P. D.; NASCIMENTO, D. M.; BEZERRA, D. M. M. S. Q. Folk classification of the crabs and swimming crabs (Crustacea – Brachyura) of the Mamanguape river estuary, Northeastern – Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v. 22, n. 5, 2009.
- GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LE´ GER, P.; LEPAIS, O. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**. V. 1, p. 591–611, 2011.
- GUO, X. Z.; ZHANG, G. R.; WEI, K. J.; GUO, S. S.; GARDNER, J. P. A.; XIE, C. X. Development of twenty-one polymorphic tetranucleotide microsatellite loci for

Schizothorax o'connori and their conservation application. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 259–263, 2013.

HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: Genomic context and mutational mechanisms, p.1-9. In D.B. **Goldstein & C. Schlötterer** (eds.), *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York, 368p, 1999.

HEILVEIL, J. S.; LAPILUSA, T. L.; TURNER, L. M. Characterization of microsatellite markers from the commodity species *Cardisoma guanhumi* Latreille and the Christmas Island blue crab (*Discoplax celeste*). **Conservation Genetics Resources** 6: 99-101, 2013.

HUANG, J.; LI, Y. Z.; DU, L. M.; YANG, B.; SHEN, F. J.; ZHANG, H. M. Genome-wide survey and analysis of microsatellites in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), with a focus on the applications of a novel microsatellite marker system **BMC Genomics**, v. 16, n. 61, p. 1-12, 2015.

IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Lista das Espécies da Fauna Brasileira ameaçadas de Extinção**. Anexo a: Instrução normativa no. 445 de 17 de dezembro de 2014. Brasília. 2014.

IRANAWATI, F.; JUNG, H.; CHAND, V.; HURWOOD, D. A.; MATHER, P. B. Analysis of genome survey sequences and SSR marker development for Siamese mud carp, *Henicorhynchus siamensis*, using 454 pyrosequencing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 10807- 10827, 2012.

JIAO, Y.; JIA, H. M.; LI, X. W.; CHAI, M. L.; JIA, H. J.; CHEN, Z. Development of simple sequence repeat (SSR) markers from a genome survey of Chinese bayberry (*Myrica rubra*), **BMC Genomics**, v. 13, n. 201, 2012.

JONES, A. G.; SMALL, C. M.; PACZOLT, K. A.; RATTERMAN NL, A. Practical guide to methods of parentage analysis. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 6–30, 2010.

KATTI, M. V.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 18, p. 1161-1167, 2001.

KUBOTA, S.; LIU, Q.; KESSUWAN, K.; OKAMOTO, N.; SAKAMOTO, T.; NAKAMURA, Y. High-throughput simple sequence repeat (SSR) markers development for the kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) and cross-species amplifications for Epinephelinae species **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 5, p. 117-130, 2014.

LI, S.; QIAN, Z.; FU, Y.; ZHENG, W.; LI, H. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the Tibetan cypress *Cupressus gigantea* using paired-end Illumina shotgun sequencing. **Conservation Genet Resour**, v. 6, p. 795–797, 2014.

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture** 238, 1–37, 2004.

MAIA, D. J. G.; TORRES, R. A. Fine-scale genetic structuring, divergent selection, and conservation prospects for the overexploited crab (*Cardisoma guanhumi*) in tropical

mangroves from North-eastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 1, p. 1–10, 2016.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. Editora Plêiade, São Paulo, 603pp, 1996.

RICO, P.; MEDINA, A. Plan de Manejo Pesquero del Refugio de Vida “Aspectos biológicos y poblacionales de *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825), en la Laguna de Tampamachoco y Majahual en Tuxpan, Veracruz” **Silvestre Barras Cuero y Salado**, Honduras. p. 52, 2014.

SAARINEN, E. V.; AUSTIN, J. D. When technology meets conservation: Increased microsatellite marker production using 454 genome sequencing on the endangered Okaloosa darter (*Etheostoma okaloosae*). **Journal of Heredity**, v. 101, p. 784–788, 2010.

SAMBROOK, J.; FRISTISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning—A Laboratory Manual**, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, v. 6, p. 4–12, 2005.

SCHLÖTTERER, C.; PEMBERTON, J. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations—a critical review. Pp. 71–86 in R. DeSalle and B. Schierwater, eds. **Molecular approaches to ecology and evolution**. Birkhäuser, Basel, Switzerland. 1998.

SCHLÖTTERER, C.; WIEHE, T. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps, p.238-248. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (Eds.). **Microsatellites: Evolution and applications**. New York: Oxford University Press, 368p, 1999.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**.v. 10,p. 967–981, 2000.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n×(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics** v. 7, p. 524-530, 1990.

XU, X.; PENG, M.; FANG, Z.; XU, X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. **Nature Genetics**, 24: 396-399, 2000.

ZHENG, X. H.; LU, C. Y.; ZHAO, Y. Y.; LEE, C.; CAO, D. C.; CHANG, Y. M.; LIANG, L. Q.; SUN, X. W. A set of polymorphic trinucleotide and tetranucleotide microsatellite markers for silver Crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) and cross-amplification in Crucian carp. **Biochemical Genetics**, v. 48, p. 624-635, 2010.

CAPÍTULO III

Descrição e caracterização de marcadores microssatélites para a avaliação da diversidade genética em *Cardisoma guanhumi* em populações do Caribe

Artigo: Development and characterization of tetranucleotide microsatellite markers for the Blue Land Crab Cardisoma guanhumi using Illumina paired-end sequencing data and their utility in revealing genetic diversity

RESUMO

O caranguejo guaiamum, *Cardisoma guanhumi* Latreille (Decapoda: Gecarcinidae) é um recurso alimentar altamente valorizado, possui ampla ocorrência em regiões tropicais e subtropicais do Atlântico Centro-Oeste. No entanto, o aumento da captura, as populações de caranguejo sofreram declínio em seus estoques naturais. Os marcadores moleculares são úteis por proporcionar informação sobre a diversidade genética dentro e entre as populações. Desta forma, foram descritos 12 novos marcadores microssatélites, selecionados a partir da montagem do genoma parcial da Illumina *reads*, posteriormente, estes microssatélites podem ser utilizados para avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional de *C. guanhumi* em toda a área de distribuição geográfica. Também foi realizada, uma visão geral de sua variação genética, a fim de avaliar o seu potencial para aplicação na genética de conservação. O número médio de alelos por loco foi de 5,9, e média da heterozigosidade observada e esperada, foi de 0,293 e 0,653, respectivamente. A natureza altamente informativos destes marcadores foi também determinado pelo conteúdo de informação polimórfica significativo (0,597). Uma análise de diversidade genética preliminar revelou altos valores de estimativas de diferenciação da população ($F_{ST} = 0,310$, $R_{ST} = 0,100$, e $D_{EST} = 0,526$). PCoA e agrupamento Bayesiano detectaram dois grupos geneticamente distintos com base nas duas populações pré-definidas do Caribe.

Palavras-chave: Conservação; diferenciação genética; genética de população; marcadores moleculares; tecnologia NGS.

ABSTRACT

The blue land crab *Cardisoma guanhumi* Latreille (Decapoda: Gecarcinidae) is a highly valued food resource of wide occurrence in tropical and subtropical regions in the Western Central Atlantic. However, actual overharvesting has leading the species to stock decline. Molecular markers are useful in providing direct information on genetic diversity within and between populations. Hereby, we describe the development of 12 new microsatellite markers, by next-generation sequencing, for evaluating genetic diversity and population structure across the distributional range of *C. guanhumi*. A glimpse into the genetic variation of the species in the Caribbean Sea is also provided. The mean number of alleles per locus was 5.9, and observed and expected heterozygosities averaged 0.293 and 0.653, respectively. The highly informative nature of these markers was also given by the mean polymorphic information content (0.597). A preliminary genetic diversity analysis revealed high values for population differentiation estimates ($F_{ST} = 0.310$, $R_{ST} = 0.100$, and $D_{EST} = 0.526$). PCoA and Bayesian clustering detected two genetically distinct groups based on the two predefined populations from the Caribbean.

Keywords: Conservation; genetic differentiation; population genetics, molecular markers; NGS technology.

INTRODUÇÃO

O caranguejo guaiamum, *Cardisoma guanhumi* Latreille (Decapoda: Gecarcinidae) é uma espécie semiterrestre que possui ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais do Atlântico Centro-Oeste (GIFFORD, 1962; BURGGREN, MCMAHON, 1988). É um recurso alimentar altamente valorizado em muitos países, ao longo da costa atlântica da América do sul e no Caribe (CARMONA-SUÁREZ, 2011; RODRÍGUEZ-FOURQUET, 2009; FIRMO et al., 2012).

Devido o aumento da captura, as populações de caranguejo sofreram declínio em seus estoques naturais (GOVENDER, SABAT, CUEVAS, 2008; HURTADO et al., 2013). Entre os principais motivos para esta redução, estão à captura excessivamente praticada e a degradação do habitat, portanto, uma maior compreensão sobre sua diversidade genética também é fundamental para que possa definir estratégias eficientes de conservação nos estoques naturais e para manter a pesca em níveis elevados de produtividade (BERT et al., 2002; AMARAL et al., 2015).

Os marcadores moleculares são úteis por proporcionar informação sobre a diversidade genética dentro e entre as populações (MARSJAN; OLDENBROEK, 2007). Trechos de DNA que consistem em unidades curtas repetidas, mais conhecidas como microssatélites, têm sido amplamente utilizados como marcadores moleculares para a avaliação da diversidade genética e em estudos da estrutura populacional, devido à sua hipervariabilidade e abundância em todo o genoma eucariota (WAN et al., 2004). No entanto, apenas alguns marcadores microssatélite polimórficos (oito) foram desenvolvidos para estudos genéticos populacional de *C. guanhumi* (HEILVEIL, LAPILUSA, TURNER, 2013).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento de DNA (tecnologia de sequenciamento de nova geração - NGS) tornou-se mais rápido e rentável a identificação de locos de microssatélites, a partir dos dados gerados pela tecnologia NGS (ABDELKRIM et al., 2009). Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar novos marcadores microssatélites para *Cardisoma guanhumi* a partir do sequenciamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico e isolamento de DNA

Amostras de caranguejo, *Cardisoma guanhumi*, foram obtidas em áreas de mangues na região da Flórida e de Porto Rico, nos Estados Unidos. Para o isolamento e purificação de DNA, foram seguidas as recomendações do kit comercial, Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), utilizando o tecido muscular, presente nas patas torácicas (pereiópodes) de cada indivíduo. As amostras de DNA isolado foram em seguida, quantificado por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

Sequenciamento e preparação de biblioteca

Um único indivíduo contendo DNA de alta qualidade foi selecionado para o sequenciamento. O DNA foi quantificado utilizando um ensaio de Pico Green dsDNA (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, EUA), e foi executado utilizando o quantificador de DNA Perkin Elmer fusion (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). A partir de 1 ng de DNA genômica, foi construída uma biblioteca Illumina *paired-end*, conforme o protocolo padrão do Illumina Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, Califórnia). O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando o MiSeq Benchtop Sequencer (Illumina Inc., San Diego, Califórnia). As sequências contíguas foram criadas a partir dos dados emparelhados pelas extremidades obtidas por meio do CLC Genomics Workbench 7.0.4 (Qiagen).

Deteção de SSR e desenho de iniciadores

As sequências contíguas, resultantes do sequenciamento foram submetidos ao programa MSATCOMMANDER 0.8.2 (FAIRCLOTH, 2008) para detectar os locos microssatélites com duas a seis repetições. Os pares de iniciadores complementares às sequências que flanqueiam os elementos de repetição foram desenhados utilizando o *software* PRIMER3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Foram utilizados os seguintes

parâmetros para o desenho: (1) temperatura de melting (T_m) variando de 52 a 60°C; (2) proporção de GC entre 40 e 60%; (3) diferença máxima de 3°C na T_m entre os iniciadores de cada par; (4) tamanho do produto até 300 pb e (5) microssatélites do tipo tetranucleotídeos.

Amplificação e validação dos iniciadores

Inicialmente cinco indivíduos foram utilizados para validar todos os pares de iniciadores, via reação em cadeia da polimerase (PCRs). As reações foram realizadas em volume final de 10 μ L, contendo 15 ng de DNA genômico, 1,5 μ L de buffer 10 \times (Thermo Fisher Scientific Inc), 2,5 mM de $MgCl_2$ (Thermo Fisher Scientific Inc), 200 mM dNTPs (New England BioLabs Inc.), 0,75 μ M de *primer*, 2,0 μ L de Q-solution (Qiagen), 1U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific Inc). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®). Os ciclos das PCRs foram iniciados com uma etapa de desnaturação a 95°C por 5min., seguida de 35 ciclos, compostos por etapa de desnaturação a 95°C por 40 segundos, a temperatura de anelamento (Tabela 1) por 30 segundos e etapa de extensão à 72°C por 1 minuto, encerrando, com extensão final à 72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em géis de poliacrilamida desnaturado a 6%, corados com nitrato de prata. A fim de verificar a utilidade dos marcadores para estudos populacionais, foi feita genotipagem incluindo duas populações da Costa Oriental do Oceano Atlântico, Ilhas Vieques, Porto Rico (18°09'39.6" N, 65°23'21.3" W, N = 25) e Flórida (25°22'58.7" N, 81°11'47.4" W, USA, N = 25).

Locos de microssatélites e análise da população

Os dados genotipados foram analisados utilizando o programa MICRO-CHECKER v. 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) a fim de estimar possível presença de alelos nulos que possam provocar inconsistências nas análises. A heterozigosidade observada e esperada (H_O e H_E), o número de alelos (N_a) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram determinados a partir do programa CERVUS v. 3.0 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHAL, 2007).

O parâmetro riqueza alélica (AR) foi calculado pelo programa FSTAT versão 2.9.3.2. (GOUDET, 1995). O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi calculado

utilizando *software* GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 2009) por meio de comparações múltiplas simultâneas (RICE, 1989), com nível de significância ($P < 0,05$), aplicando-se a correção de Bonferroni para todos os locos.

A diferenciação populacional foi avaliada por meio do programa ARLEQUIN ver. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), que determinou o valor de θ (F_{ST}) e (F_{IS}) para cada locos empregando o conjunto amostral, além de ter sido realizado o teste para estimar o nível de fluxo genético (Nm) entre as populações. Ainda para verificar o grau de divergência entre as populações, também foram estimados o R_{ST} (SLATKIN, 1995), análogo ao F_{ST} , geralmente empregado para microssatélites, considerando o modelo de mutação SMM (*Stepwise Mutation Model*), e o estimador D_{est} (JOST, 2008) utilizado como medida de diferenciação real, com ambos calculados pelo programa GenAlEx v.6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

A fim de verificar graficamente a estruturação populacional, foi adotado o modelo de agrupamento Bayesiano, utilizando o *software* STRUCTURE v 2.3.3 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), com um *burn-in* de 500.000 corridas, seguido por 1.000.000 corridas para o teste de Monte Carlo em Cadeia de Markov (MCMC). A estimativa do melhor K foi calculado com base em cinco repetições para cada K (simulações de 1 a 10), como descrito por Evanno et al. (2005), empregando o *software* online STRUCTURE HARVESTER v.0.6.92 (link: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) (EARL; VONHOLDT, 2012).

O programa CLUMPP v.1.1.2 (JAKOBSSON, ROSENBERG, 2007) foi adotado para alinhar as cinco repetições do melhor K e o programa DISTRUCT v.1.1 (ROSENBERG, 2004) para visualizar graficamente os resultados produzidos pelo CLUMPP. A distinção genética entre os grupos amostrados foram também verificadas a partir da análise de coordenadas principais (PCoA - *Principal Coordinate Analysis*) empregando o programa GenAlEx v.6.5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pesquisa Genômica, montagem de sequência e identificação de locos SSRs

A biblioteca genômica foi carregada com 16% do MiSeq Reagente Kit v2 com 300 ciclos de execução de sequenciamento, foram produzidos 44.315.919 leituras, as quais foram reunidas em 101,274 contíguas. O *software* MSATCOMMANDER identificou 114,702 locos microssatélite, sendo a maioria das repetições de mononucleotídeos (46,72%), dinucleotídeo (27,74%) e trinucleotídeo (18,65%).

Para facilidade de imagem e de *scoring*, foi examinado somente os locos tetranucleotídeo (6,35%). As repetições do tipo tetranucleotídeos são adequadas para a descrição de marcadores microssatélites, já que têm a tendência de serem mais informativas e mais estáveis sob as condições de PCR, do que, por exemplo, as repetições di- ou tri-nucleotídeos (GUO et al., 2013).

Baseado nesses dados foi possível selecionar 26 regiões de repetições tetranucleotídeos, dentre as quais 12 (46,2%) obtiveram ampliações consistentes, com bandas específicas entre os indivíduos. Foi identificado polimorfismo em 11 locos (91,7%); sendo o loco (Cgua7) monomórfico para todo o conjunto de dados de 50 indivíduos (Tabela 1).

Heilveil, Lapilusa e Turner (2013) desenvolveram marcadores para *C. guanhumii* (indivíduos, Bahamas) utilizando, principalmente, locos de microssatélites di- e trinucleotídeos. Dos 40 pares de iniciadores que testaram 13 locos (32,5%) amplificaram bandas contáveis, dos quais oito locos (61,2%) foram polimórficos. Todas as sequências microssatélites isolados neste estudo foram depositados no NCBI no banco de dados GenBank sob os números de acesso KX258706 a KX258717.

Validação dos locos SSRs e polimorfismo

A genotipagem de todo o conjunto de dados ($n = 50$) revelou 65 alelos em todos os 11 locos polimórficos, com uma variação de dois (Cgua2) a 13 (Cgua11), e média de $5,9 \pm 3,5$ alelos por locos (Tabela 1). A riqueza alélica, no entanto, variou de 2 a 7,4 (média de

4,5 ± 1,8) e o tamanho de alelo variou entre 80 bp (Cgua8) e 219 bp (Cgua6). A média da heterozigosidade esperada foi de 0,653, com valores que variam em cada locos de 0,248 (Cgua2) a 0,837 (Cgua6). A heterozigosidade observada variou entre 0,045 (Cgua4) e 0,739 (Cgua10), enquanto que a média da heterozigosidade esperada foi 0,653. A diferença entre heterozigosidade observada (*Ho*) e esperada (*He*) foi revelada em oito locos, indicando uma tendência para deficiência de heterozigotos em todo o conjunto de dados. Os valores de PIC foram entre 0,215 (Cgua2) e 0,805 (Cgua6) e média de 0,597.

Marcadores com PIC superior a 0,500 são consideradas como altamente informativos (BOTSTEIN; WHITE; SKOLNICK, 1980). A heterozigosidade esperada e o PIC são comumente usados em genética, como uma medida de polimorfismo para um marcador molecular. O nível de polimorfismo detectado neste conjunto de marcadores tetranucleótidos foi maior do que o indicado na literatura para o *C. guanhum* (HEILVEIL; LAPILUSA; TURNER, 2013).

Oito locos estiveram em desacordo com o equilíbrio Hardy-Weinberg, após a correção de Bonferroni (P-valor ajustado < 0,0045), que refletiu em altos valores para F_{IS} . Todos os desvios estão relacionados com a deficiência de heterozigotos. Isto pode estar associado à endogamia, a amostragem da população não exaustiva, erro de pontuação, ou estrutura dentro de amostra (efeito Wahlund) (ZOUROS; FOLTZ, 1984; WAPLES, 2015).

Tabela 1. Características de iniciadores microsatélites descritos para *Cardisoma guanhumi* ($N = 50$)

Locos	Contígua	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tipo de repetição	Ta (°C)	Na	Tamanho (bp)	A _R	H _O	H _E	PIC	pHWE	F _{IS}	Acesso Genbank
<i>Cgua1</i>	10488	F: CTTTGACTGGCTGGCTATTTG R: GGAGGGATAGAGGGACAAGAGT	(ACTG) ₁₄	51	4	107-124	3,96	0,700	0,730	0,672	0,622	- 0,558	KX258706
<i>Cgua2</i>	15796	F: GCTTTCTGTCTGTATGTCTGTATGC R: TAGTGAGTGAGTGGCGCTTG	(ATGT) ₁₁	53	2	139-151	1,97	0,114	0,248	0,215	0,010	0,552	KX258707
<i>Cgua3</i>	17837	F: CTTTCTTCTCCCTCCTGCTT R: ATTACTCTGCTTGGACTGACCG	(CCTT) ₁₀	56	8	148-168	6,33	0,410	0,810	0,773	0,000*	0,348	KX258708
<i>Cgua4</i>	23883	F: CAGGCTTTCTGTCTGTATGTCTGT R: CGTATGTATATGTATGTATGGATGTATATATC	(ATGT) ₁₁	51	3	150-158	2,96	0,045	0,492	0,428	0,000*	0,858	KX258709
<i>Cgua5</i>	323	F: GACGCATGAAAACGAGGC R: CGTCCTTCCTTTCCTTCCTG	(GAAG) ₁₈	51	6	110-124	4,53	0,179	0,649	0,579	0,002*	0,729	KX258710
<i>Cgua6</i>	41035	F: GATTGATGGATGGATTGATGG R: TGTCAGTCAAGTCAGAAAGTCAGAA	(TGAC) ₁₄	49	10	181-219	7,37	0,105	0,837	0,805	0,000*	0,843	KX258711
<i>Cgua7</i>	41111	F: GGGAAGGCAGACAGATACAAAG R: CCTGCTTATGTCAGTGGGAGTA	(ACAG) ₁₁	52	1	109	-	-	-	-	-	-	KX258712
<i>Cgua8</i>	41949	F: AAGGGAACGCAACAGAAGG R: TCCTCTTTCCACATCTCACAAA	(AGAC) ₁₃	54	5	80-139	4,80	0,219	0,744	0,690	0,000*	0,697	KX258713
<i>Cgua9</i>	47017	F: GTGGTGGAGGTGGTGGTG R: TCGAGATATTCACATGACTGGG	(GTCT) ₁₆	54	3	139-175	2,95	0,233	0,582	0,494	0,000*	0,501	KX258714
<i>Cgua10</i>	48525	F: TTTATTCCTATTGGTGTGCCC R: ATTCCGTCAGTCAGTCCACC	(TGAC) ₁₄	53	8	129-138	5,37	0,739	0,724	0,672	0,091	- 0,025	KX258715
<i>Cgua11</i>	61432	F: TCAGTCTACCCACTTATCTGGC R: CCTCTCAGGCACACACAGA	(CTGT) ₁₄	54	13	118-172	6,72	0,356	0,761	0,725	0,003*	0,293	KX258716
<i>Cgua12</i>	64859	F: AACGGAAGTCAAGTGTGAGAAT R: GATGGATTGATGGATTGACTGA	(TCAG) ₁₅	51	3	165-189	2,97	0,121	0,604	0,516	0,000*	0,739	KX258717
Média			-	-	5,9 1*	-	4,53	0,293	0,653	0,597	-	0,452	

Ta: temperatura de anelamento; Na: número de alelos observados, *calculada somente sobre locos polimórficos; A_R: Riqueza alélica; H_O: heterozigosidade observada; H_E: heterozigosidade esperada; N: número de indivíduos amostrados; PIC: conteúdo de informação polimórfica; *pHWE: desvio significativo Hardy-Weinberg; F_{IS}: índice de fixação ou coeficiente de endogamia

População diversidade genética

Ao comparar a população de *C. guanhumi* da Flórida-EUA, verificou-se que houve maior nível de polimorfismo do que a de Porto Rico. Os valores médios estimados para riqueza alélica (A_R), a diversidade genética (H_E) e PIC foram de 3,9, 0,593, 0,517, na Flórida e 2,9, 0,450, 0385, em Porto Rico.

Uma alta divergência genética foi observada nos índices F_{ST} (0,310) e R_{ST} (0,100) (F_{ST} -análogo), esses índices são comumente empregados em estudos de diferenciação populacional. Os altos valores de F_{ST} e R_{ST} sugerem baixo fluxo gênico entre as populações da Flórida e de Porto Rico, provavelmente devido à existência de barreiras oceânicas que dificultam a dispersão larval. O estimador D_{EST} é mais preciso para detectar a diferenciação população do que F_{ST} (JOST, 2008; GERLACH et al., 2010). Ambas estimativas, F_{ST} e D_{EST} apresentam resultados semelhantes, no entanto, a melhor estimativa foi de D_{EST} (0,526), demonstrando alta diferenciação genética entre as duas populações (Tabela 2).

O padrão de diferenciação genética foi representada graficamente por uma *scatter-plot* da análise de componentes principais (PCoA) e a análise de variação de microssatélites, utilizando o modelo de mistura STRUCTURE, no primeiro nível da separação subpopulação ($K = 2$) (Figura 1). Estes grupos representam separadamente as duas populações pré-definidas pela origem de cada indivíduo.

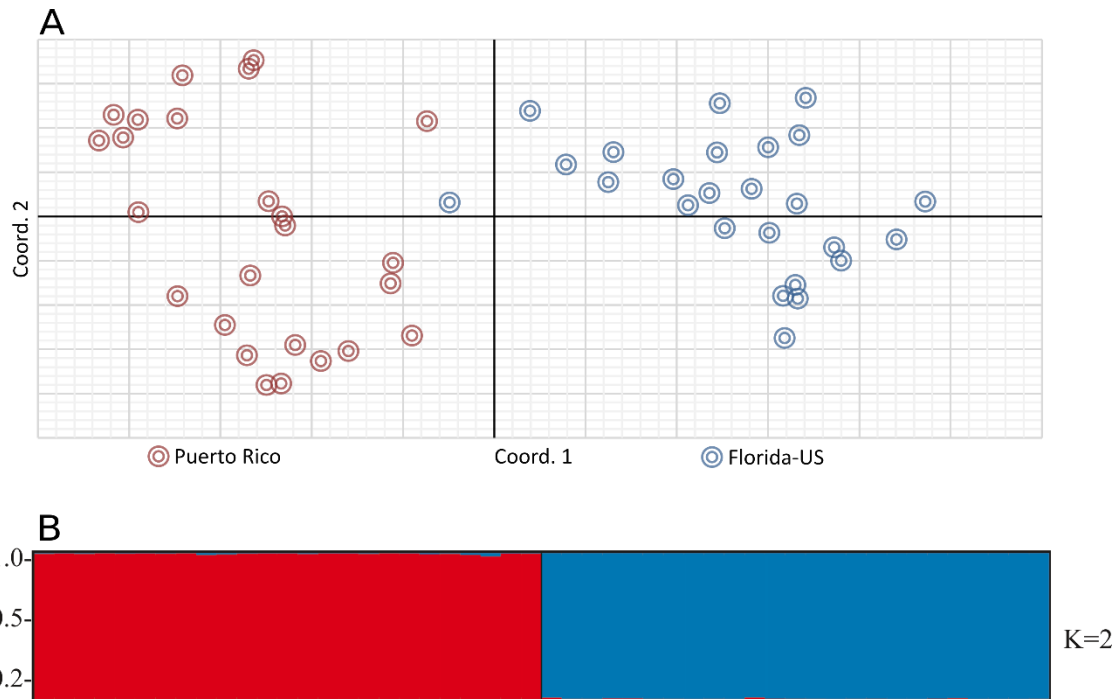


FIGURA 1. (A) *Scatter-plot* análise de coordenadas principais (PCoA) usando locos microssatélites *C. guanhumii* (B) Estrutura genética de populações de *Cardisoma guanhumii* baseada na análise Bayesiana do *software* Structure (K=2). Os indivíduos são representados em cada linha vertical

Tabela 2. Valores de diversidade genética em 50 indivíduos de *Cardisoma guanhumí* por meio de locos de microssatélites tetranucleotídeos polimórficos

Locos	Flórida - US (N = 25)						Porto Rico (N = 25)						F_{ST}	R_{ST}	D_{EST}
	A_R	H_o	H_E	PIC	pHWE	F_{IS}	A_R	H_o	H_E	PIC	pHWE	F_{IS}			
<i>Cgua1</i>	2,00	0,840	0,497	0,369	0,001*	-0,714	2,00	0,560	0,411	0,322	0,132	-0,371	0,551	0,068	1,000
<i>Cgua2</i>	1,98	0,118	0,214	0,186	0,176	0,458	2,00	0,111	0,286	0,239	0,038	0,618	-0,036	-0,016	-0,012
<i>Cgua3</i>	3,82	0,118	0,635	0,555	0,000*	0,819	3,67	0,636	0,614	0,537	0,210	-0,037	0,370	0,151	1,000
<i>Cgua4</i>	3,00	0,100	0,679	0,572	0,001*	0,859	1,000	0,000	0,000	0,000	Mono	Mono	0,522	-0,011	0,537
<i>Cgua5</i>	5,43	0,313	0,74	0,677	0,000*	0,586	2,000	0,000	0,507	0,368	0,001*	1,000	-0,004	0,023	-0,006
<i>Cgua6</i>	6,06	0,130	0,776	0,724	0,000*	0,835	2,90	0,067	0,467	0,393	0,000*	0,861	0,350	0,263	1,000
<i>Cgua8</i>	3,68	0,118	0,606	0,513	0,000*	0,811	4,99	0,333	0,821	0,760	0,000*	0,602	0,073	-0,001	0,210
<i>Cgua9</i>	2,97	0,250	0,447	0,395	0,034	0,448	3,00	0,200	0,484	0,410	0,003	0,600	0,360	0,291	0,500
<i>Cgua10</i>	4,34	0,818	0,664	0,586	0,007*	-0,239	5,68	0,667	0,775	0,722	0,000*	0,142	0,007	0,031	0,020
<i>Cgua11</i>	6,47	0,583	0,776	0,727	0,000*	0,252	2,68	0,095	0,182	0,172	0,000*	0,484	0,507	-0,020	1,000
<i>Cgua12</i>	2,56	0,111	0,494	0,388	0,000*	0,780	2,00	0,133	0,405	0,315	0,019	0,678	0,383	-0,007	0,534
Média	3,84	0,318	0,593	0,518	0,020	0,445	2,90	0,255	0,450	0,385	0,040	0,458	0,310	0,100	0,526

A_R : Riqueza alélica; H_o : heterozigosidade observada; H_E : heterozigosidade esperada; N: número de indivíduos amostrados; PIC: conteúdo de informação polimórfica; *pHWE: desvio significativo Hardy-Weinberg; F_{IS} : índice de fixação ou coeficiente de endogamia; F_{ST} , R_{ST} , D_{EST} : índices de diversidade genética.

Apesar de a homogeneidade populacional ser relatadas em várias espécies de invertebrados, em fase de larvas planctônicas, ao longo da costa atlântica, como por exemplo, *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Litopenaeus schmitti* (GUSMÃO; LAZOSKI; SOLE-CAVA, 2005); *Ucides cordatus* (OLIVEIRA-NETO et al., 2007); *Uca maracoani* (WIEMAN et al., 2014). O cenário de diferenciação genética, observada neste estudo é similar ao encontrado para a mesma espécie, utilizando marcadores microssatélites ancorados (ISSRs) (MAIA; TORRES, 2016), porém em uma escala geográfica mais restrita.

A análise morfológica interpopulacional em populações *C. guanhumí* também indicaram a presença de estoques populacionais estruturados ao longo da costa Nordeste brasileiro (DUARTE; MAIA-LIMA; MOLINA, 2008). Variação no DNA mitocondrial também revelou um padrão geográfico possível dentro *C. guanhumí* em populações Caribenhas (AMARAL et al., 2015).

Por outro lado, os dados obtidos neste estudo, divergem com os resultados de Oliveira-Neto et al., (2008) e Amaral et al., (2015). Em que, baseando-se no estudo do fragmento da região controle do mtDNA, não indicaram qualquer evidência de estrutura geográfica da diversidade genética do caranguejo *C. guanhumí* ao longo da costa brasileira. Além disso, uma análise preliminar utilizando sequenciamento de genes da quinase arginina e dois locos microssatélites interespecíficos sugeriram que *C. guanhumí* em Andros Island (Bahamas) compreende uma população com a diversidade genética limitada (LAPILUSA; HEILVEIL, 2011).

Em sistemas marinhos, populações com homogeneidade genética em espécies com desenvolvimento planctotróficas, parecem estar correlacionadas com alta habilidade de dispersão larval (NEETHLING et al., 2008; WIEMAN et al., 2014). No entanto, a estrutura populacional crítica pode ser revelada dentro destas espécies, por aspectos biogeográficos, processos históricos que afetaram a distribuição e abundância das espécies, a retenção de larvas nas imediações da população de origem, preferência de habitat ou fidelidade ao local do acasalamento (HELLBERG et al., 2002; HAYE et al., 2014; WIEMAN et al., 2014).

No geral, os resultados da presente análise genética populacional poderia fornecer informações úteis sobre a conservação das populações Caribenhas de *C. guanhumi*. Qualquer contribuição para o conhecimento da presença de estoques de caranguejo estruturados, propensos a ser moldada por correntes oceânicas afetando os padrões de dispersão larval e restringindo o fluxo de genes entre a Flórida e Porto Rico, irá auxiliar os gestores da pesca estabelecer unidades de conservação viáveis, uma vez que há falta de informação genética sobre as espécies.

CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares descritos (12 microssatélites) neste estudo revelam potencial para análises genéticas em populações. Podem ser usados como ferramentas moleculares para auxiliar na conservação e manejo da espécie *Cardisoma guanhumi*;

Este conjunto de marcadores são os primeiros microssatélites com locos tetranucleotídeos descritos para *C. guanhumi*;

Os resultados da análise de diferenciação genética podem fornecer também uma forte indicação da presença de estoques de caranguejo estruturados;

Os marcadores microssatélites descritos devem ser utilizados em um maior número de amostras e de populações.

REFERÊNCIAS

- ABDELKRIM, J.; ROBERTSON, B. C.; STANTON, J. A. L.; GEMMELL, N. J. Fast, cost effective development of species specific microsatellite markers by genomic sequencing. **Biotechniques**. v. 46, p. 185-192, 2009.
- AMARAL, M. R. X.; ALBRECHT, M.; MCKINLEY, A. S.; DE CARVALHO, A. M. F.; DE SOUSA, S. C.; DINIZ, F. M. Mitochondrial DNA variation reveals a sharp genetic break within the distribution of the blue land crab *Cardisoma guanhumi* in the Western Central Atlantic. **Molecules**. v. 20, p. 15158-15174, 2015.
- BERT, T. M.; SEYOUM, S.; TRINGALI, M. D.; MCMILLEN-JACKSON, A. Methodologies for conservation assessments of the genetic biodiversity of aquatic macro-organisms. **Brazilian Journal of Biology** v. 62, p. 387-408, 2002.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics** v. 32, p. 314-331, 1980.
- BURGGREN, W.W.; MCMAHON, B. R. **Biology of the Land Crabs**. Cambridge University Press: Cambridge, UK. v. 1, p. 1-5, 1988.
- CARMONA-SUÁREZ, C. Present status of *Cardisoma guanhumi* Latreille (Crustacea: Brachyura: Gecarcinidae) populations in Venezuela. **Interciência**, v. 36, n. 12, p. 908-913, 2011.
- DUARTE, M. S.; MAIA-LIMA, F. A.; MOLINA, W. F. Interpopulational morphological analyses and fluctuating asymmetry in the brackish crab *Cardisoma guanhumi* Latreille (Decapoda, Gecarcinidae), on the Brazilian northeast coastline. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 3, n. 3, 294-303, 2008.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation genetic resources** v. 4, n. 359-361, 2012.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v.14, p. 2611-2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite v3.5: a new series of programs to perform population genetic analysis under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p.564-567, 2010.
- FAIRCLOTH, B. Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 92-94, 2008.

FIRMO, A. M. S.; TOGNELLA, M. M. P.; SILVA, S. R.; BARBOZA, R. R. R. D.; ALVES, R. R. N. Capture and commercialization of clue land crabs (*guaiaumum*) *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825) along the coast of Bahia State, Brazil: an ethnoecological approach. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** v. 8, n. 12, p. 2-12, 2012.

GERLACH, G.; JUETERBOCK, A.; KRAEMER, P.; DEPPERMAN, J.; HARMAND, P. Calculations of population differentiation based on GST and D: forget GST but not all of statistics! **Molecular Ecology** v. 19, n. 18, p. 3845-3852, 2010.

GIFFORD, C. A. Some observations on the general biology of the land crab, *Cardisoma guanhumi* (Latreille) in South Florida. **Biological Bulletin of the Marine Biology Laboratory Woods Hole**. v. 123, p. 207-223, 1962.

GOUDET, J. FSTAT Version 2.9.3.2.: a computer program to calculate F-statistics. **Journal Heredity** 86: 485–486, 1995.

GOVENDER, Y.; SABAT, A. M.; CUEVAS, E. Effects of land-use/land-cover changes on land crab, *Cardisoma guanhumi*, abundance in Puerto Rico. **Journal of Tropical Ecology**. v. 24, p. 417-423, 2008.

GUO, X. Z.; ZHANG, G. R.; WEI, K. J.; GUO, S. S.; GARDNER, J. P. A.; XIE, C. X. Development of twenty-one polymorphic tetranucleotide microsatellite loci for *Schizothorax o'connori* and their conservation application. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 259–263, 2013.

GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLE-CAVA, A. M. Population genetic structure of Brazilian Shrimp species (*Farfantepenaeus* sp., *F. brasiliensis*, *F. paulensis* and *Litopenaeus schmitti*: Decapoda: Panaeidae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 28, p. 165-171, 2005.

HAYE, P. A.; SEGOVIA, N. I.; MUÑOZ-HERRERA, N. C.; GÁLVEZ, F. E.; MARTÍNEZ, A.; MEYNARD, A.; PARDO-GANDARILLAS, M. C.; POULIN, E.; FAUGERON, S. Phylogeographic Structure in Benthic Marine Invertebrates of the Southeast Pacific Coast of Chile with Differing Dispersal Potential. **PLoS ONE**. v. 9, n. 2, 2014.

HEILVEIL, J. S.; LAPILUSA, T. L.; TURNER, L. M. Characterization of microsatellite markers from the commodity species *Cardisoma guanhumi* Latreille and the Christmas Island blue crab (*Discoplax celeste*). **Conservation Genetics Resources** v. 6, p. 99-101, 2013.

HELLBERG, M. E.; BURTON, R. S.; NEIGEL, J. E.; PALUMBI, S. R. Genetic assessment of connectivity among marine populations. **Bulletin of Marine Science**. v. 70, p. 273-290, 2002.

HURTADO, E. G.; ESCALONA, R.; LINARES, J. T.; PALÁCIO, E. Situación actual del cangrejo de tierra, *Cardisoma guanhumi*, (Latreille, 1825) en Cabo Cruz, Parque Nacional Desembarco del Granma. Cuba. **Bohío boletín electrónico**. v. 3, p. 5-13, 2013.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics** v. 23, p. 1801–1806, 2007.

JOST, L. GST and its relatives do not measure differentiation **Molecular Ecology** v. 17, n. 18, p. 4015–4026, 2008.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHAL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology** v. 16, n. 1099–1106, 2007.

LAPILUSA, T. L.; HEILVEIL, J. S. Genetic diversity of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* Latreille (Crustacea: Decapoda), on Andros Island: implications for sustainable management The **14th Symposium on the Natural History of the Bahamas**. p.41-48, 2011.

MAIA, D. J. G.; TORRES, R. A. Fine-scale genetic structuring, divergent selection, and conservation prospects for the overexploited crab (*Cardisoma guanhumi*) in tropical mangroves from North-eastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 1, p. 1–10, 2016.

MARSJAN, P. A.; OLDENBROEK, J. K. Molecular Markers, a tool for exploring genetic diversity. In: The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, Italy: FAO **Research report**; p. 359-379, 2007.

NEETHLING, M.; MATTHEE, C. A.; BOWIE, R. C. K.; VON, D. E. R.; HEYDEN S. Evidence for panmixia despite barriers to gene flow in the southern African endemic, *Caffrogobius caffer* (Teleostei: Gobiidae). **BMC Evol. Biol.** 8: 325–333, 2008.

OLIVEIRA-NETO, J. F.; BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; OSTRENSKY, A.; Hungria, D.B. Genetic structure of populations of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) at local and regional scales. **Hydrobiologia**. v. 583, p. 69-76, 2007.

OLIVEIRA-NETO, J. F.; PIE, M. R.; CHAMMAS, M. A.; OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. A. Phylogeography of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) along the Brazilian coast. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom** v. 88, n. 1417–1423, 2008.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 65: Genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research: An update. **Bioinformatics** v. 28, p.2537–2539, 2012.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** v. 155, n. 2, p.945–959, 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation **Evolution**. v. 49, p. 1280–1283, 2009.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution** v. 43, p. 223–225, 1989.

RODRÍGUEZ-FOURQUET, C.; SABAT, A. M. Effect of harvesting, vegetation structure and composition on the abundance and demography of the land crab *Cardisoma guanhumi* in Puerto Rico. **Wetlands Ecology and Management**. v.7, p 627-640, 2009.

ROSENBERG, N. A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. **Mol. Ecol. Notes**, 4, 137–138, 2004.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. **In:** Krawetz S, Misener S(ed) *In Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, p. 365–386, 2000.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics** v. 139, p. 457–462, 1995.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.535-538, 2004.

WAN, Q. H.; WU, H.; FUJIHARA, T.; FANG, S. G. Which genetic marker for which conservation genetics issue? **Electrophoresis**. v. 5, n. 14, p. 2165-2176, 2004.

WAPLES, R. S. Testing for Hardy-Weinberg proportions: have we lost the plot? **Journal Heredity**. v. 106, p. 1-19, 2015.

WIEMAN, A. C.; BERENDZEN, P. B.; HAMPTON, K. R.; JANG, J.; HOPKINS, M. J.; JURGENSON, J.; MCNAMARA, J. C.; THURMAN, C. L. A panmictic fiddler crab from the coast of Brazil? Impact of divergent ocean currents and larval dispersal potential on genetic and morphological variation in *Uca maracoani*. **Marine Biology**. v. 161, p. 173-185, 2014.

ZOUROS, E.; FOLTZ, D. W. Possible explanations of heterozygote deficiency in Bivalve mollusks. **Malacologia**. v. 25, p. 583-591, 1984.