



Universidade Federal do Piauí

Rede Nordeste de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

-Ponto Focal -

**Taxonomia, sistemática e genética populacional do caranguejo-
uçá, *Ucides cordatus*: desenvolvimento de ferramentas
moleculares e inferências filogenéticas**

Antonia Maria de Farias

Teresina – PI
2018

ANTONIA MARIA DE FARIAS

Taxonomia, sistemática e genética populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus*: desenvolvimento de ferramentas moleculares e inferências filogenéticas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da RENORBIO como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Fábio Mendonça Diniz

Teresina – PI
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

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

F224t Farias, Antonia Maria de.
Taxonomia, sistemática e genética populacional do Caranguejo-Uçá, *Ucides cordatus* : desenvolvimento de ferramentas moleculares e inferências filogenéticas / Antonia Maria de Farias. – 2018.
185 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

“Orientador: Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz”.

1. Biotecnologia. 2. Marcador populacional.
3. Domínios hiperváriavel. 4. Análise filogenético. I. Título.

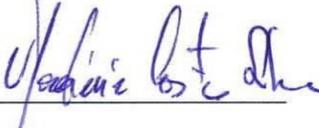
CDD 660.6j

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: ANTONIA MARIA DE FARIAS

TÍTULO DO PROJETO: “Taxonomia, sistemática e genética populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus*: desenvolvimento de ferramentas moleculares e inferências filogenéticas..”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz - EMBRAPA (Presidente)	<u>SATISFATORIO</u>	<u></u>
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima - UESPI (Examinador)	<u>satisfatório</u>	<u></u>
Profa. Dra. Adriana Mello de Araújo - EMBRAPA (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Profa. Dra. Maria Christina Sanches Muratori – UFPI (Examinadora)	<u>satisfatório</u>	<u></u>
Prof. Dr. Vladimir Costa Silva - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 07 de agosto de 2018.

HORÁRIO: 08h30

LOCAL: Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco -
NUPCelt/CCA/UFPI

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”.

Isaac Newton

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”.

Cora Coralina

Dedicatória

O DEUS oferta mais essa conquista, à poderosa intercessão de minha mãe
Maria Santíssima, agradeço por todo dia colocar no meu coração que sou
amada, sou feita para amar.

Aos meus pais, **Bento Fernandes Farias e Angelica de Sousa Farias** In
memóriam Em especial a minha Irmã **Rita Maria de Farias**, onde busco
minhas referências de boa conduta. Você é minha Irmã, mãe, amiga
companheira de todas as horas, você foi o gigante que me trouxe nos ombros até
aqui.

À minha filha Ana **Angelica**, minha vidinha que sonhou e idealizou esse dia,
minha força no meu cansaço.

Agradecimentos

Agradeço, acima de tudo, a meu **Deus** que sua destra sempre me sustentou;

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

À 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;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa.

Agradeço a minha família por todo amor e compreensão a minha ausência apoio incondicional;

À Minha Irmã *Rita Farias* meu orgulho de poder ter-la sempre ao meu lado.

À minha filha *Ana Angelia de Farias*, motivos de todas as minhas lutas.

Aos meus irmãos, *Luis Farias* e *Maria do Socoro Farias* sempre ao meu lado.

À Minha filha do coração *Susi Farias dos Santos*, sempre presente na minha vida.

Agradeço a Dra. *Adriana Mello de Araujo*, Pesquisadora da Embrapa Meio-Norte, pela amizade e disponibilidade sempre.

Agradeço a minha amiga madrinha de doutorado *Natildes Lima Verde Santo* a primeira a dizer: seu sonho pode ser realizado, quer fazer doutorado vai fazer.

Agradeço a Doutora *Maria Celina Martins de Carvalho* do Nupcelt -UFPI, por ser exemplo de conduta e profissionalismo e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte pela amizade, o incentivo, as gargalhadas, os bons momentos de descontração e de trabalho. *Isis Gomes de Brito Souza* foi onde tudo começou, *Maria Fernanda da Costa Gomes* sempre solícita, meiga e pronta a ajudar, em especial a *Geice Ribeiro da Silva*, por todo ensinamento paciência e carinho.

Agradeço especialmente *Willame Rodrigues do Nascimento* amigo e companheiro de todas as horas, irmão do coração.

À amiga professora Dra. *Elizangela Pereira da Silva Sousa*, pela força, colaboração em todos os momentos.

À minha afilhada *Selma Maria Dias Morais Costa* e a amiga *Irmã Rejane Pessoa*, que sempre me incentivaram me apoiaram e me ajudaram a ter êxito neste sonho.

À amiga *Carla Patrícia Azevedo Viana Santos* que desde inicio esteve me apoiando, me ajudando.

À professora *Lucile Moura* por seu incentivo e liberação do trabalho para eu realizar este sonho.

À amiga *Vanessa Oliveira Silva*, pela força e incentivo e amizade.

Ao amigo professor Dr. *Ricardo Silva de Sousa* sempre disposto a me dar uma força amigo de fé.

Agradeço ao Dr. *Fábio Mendonça Diniz*, atualmente pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, por toda paciência ao me orientar, por ser um profissional honrado e pela humildade de compartilhar seus conhecimentos, todo meu afeto e respeito por esse grande ser humano.

Minha eterna gratidão a todos

FARIAS A. M. **Taxonomia, sistemática e genética populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus*: desenvolvimento de ferramentas moleculares e inferências filogenéticas**. Orientador: Fabio Mendonça Diniz. 2018. 185 pg. Tese- Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

RESUMO

O caranguejo-uçá, (*Ucides cordatus* Linnaeus, 1763), é uma espécie pertencente à família Ocypodidae e representa um dos mais importantes componentes da fauna dos manguezais, tem grande importância econômica e ecológica para as áreas de manguezal do Brasil. O objetivo desse trabalho foi estudar a sistemática molecular e estrutura genética populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus*, tendo em vista o fornecimento de subsídios à sua exploração racional como medida para permitir a sustentabilidade do recurso, e a maximização de aproveitamento do potencial já explorado do caranguejo de mangue. Foram desenhados *primers* nas regiões adjacentes à região controle isolaram a *mtDNA* do *Ucides cordatus* (Decapoda, Brachyura); e realizados os sequenciamento da RC do *mtDNA*. As regiões hipervariáveis também foram amplificadas com sucesso, HV1 (637 pb) e HV2 (445 pb). A região controle do DNA_{mt} em *U. cordatus* mostrou ser altamente polimórficas em as suas extremidades 5' e 3'. Avaliamos as relações entre *U. cordatus cordatus* e *U. cordatus occidentalis* usando sequências de nucleotídeos do RNA ribossômico de subunidade grande (LSUrRNA ou 16S), citocromo oxidase I (COX-1) e também citocromo b (Cyt -b) do genoma mitocondrial como caracteres moleculares para inferência de relações filogenéticas, livre da influência ambiental. As matrizes de distância evolutiva foram calculadas a partir de dados de seqüência de DNA. As árvores filogenéticas foram inferidas com base nessas seqüências de nucleótidos. Foi obtido um forte apoio filogenético que suporta uma filogenia bem resolvida do grupo Thoracotremata. O uso de genes codificadores de proteínas na reconstrução de filogenia também provou ser útil. Avaliamos a distribuição espacial da diversidade genética e das taxas de migração (fluxo genético) entre as populações de *Ucides cordatus* no Brasil. Os loci foram altamente polimórficos, com média de 12 alelos por locus. Apesar da alta variabilidade genética, observou-se uma falta de diferenciação populacional de acordo com os valores de *F_{ST}* (média = 0,016) e análise bayesiana. As altas taxas de migração encontradas entre as populações (~ 17,2 migrantes efetivos por geração entre cada par de população) parecem ser a principal força que atua para sustentar a distribuição homogênea da diversidade genética entre as populações. Esses achados são vitais para o estabelecimento de uma base de dados a ser usada no desenvolvimento de programas de conservação para a espécie.

Palavras-chave: Marcador populacional, domínios hipervariável análise filogenético, posição taxonomica.

FARIAS, A. M. *Taxonomia, sistemática e genética populacional do caranguejo-uçá, Ucides cordatus: desenvolvimento de ferramentas moleculares e inferências filogenéticas*. Orientador: Fabio Mendonça Diniz. 2018. 181pg. Tese – Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

ABSTRACT

The crab-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), is a species belonging to the family Ocypodidae and constitutes one of the important components of mangrove fauna. It has great economic and ecological importance for the mangrove areas of Brazil. The objective of this work was to study the molecular systematics and population genetic structure of the crab-uçá, *Ucides cordatus*, in order to provide subsidies to its rational exploitation as a measure to allow the sustainability exploitation of the potential of the mangrove. Primers designed in the regions adjacent to the control region isolated the mtDNA-CR from the *Ucides cordatus* (Decapoda, Brachyura); and the sequencing of mtDNA-CR was performed. Hypervariable regions were also successfully amplified, HV1 (637 bp) and HV2 (445 bp). The RC of mtDNA in *U. cordatus* showed to be highly polymorphic at its 5' and 3' ends. We evaluated the relationships between *U. cordatus cordatus* and *U. cordatus occidentalis* using nucleotide sequences of large subunit ribosomal RNA (LSUrRNA or 16S), cytochrome c oxidase I (COX-1) and also cytochrome b (Cyt-b) from the mitochondrial genome as molecular characters for inference of phylogenetic relationships free from environmental influence. The matrices of evolutionary distance were calculated from DNA sequence data. Phylogenetic trees were inferred based on these nucleotide sequences. A strong phylogenetic signal was obtained that supports a well resolved phylogeny of the Thoracotremata group. The use of protein-encoding genes in the reconstruction of phylogeny has also proved useful. We evaluated the spatial distribution of genetic diversity and migration rates (gene flow) among populations of *ucides cordatus* in Brazil. The loci were highly polymorphic, with a mean of 12 alleles per locus. Despite the high genetic variability, a lack of population differentiation was observed according to the values of F_{ST} (mean = 0.016) and Bayesian analysis. The high migration rates found among populations (~ 17.2 effective migrants per generation between each pair of population) appear to be the main force that supports the homogeneous distribution of genetic diversity among populations. These findings are vital for the establishment of a database to be used in the development of conservation programs for the species.

Keywords: Population marker, hypervariable, phylogenetic analysis, population structure, taxonomic position

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 - *Ucides cordatus*.....21

CAPITULO I REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - *Ucides cordatus*.....26

Figura 2 - Esquema genoma mitocondrial.....36

CAPITULO II

Figura 1- Localização das amostras coletadas de *Ucides cordatus* ao longo da costa.....**64**

Figura 2 - Genes presentes nas regiões adjacentes à região controle (RC) de diferentes espécies de caranguejos braquiúros, usados como referência para o desenho de *primers* no genoma mitocondrial do caranguejo *Ucides cordatus*.....**65**

Figura 3 - Gel de agarose 0,8% mostrando os resultados da extração de DNA genômico dos indivíduos BA1, BA2 (Comandatuba, BA) e CUR1, CUR2 (Soure-Curuçá, PA)**71**

Figura 4 - Gel de agarose 1% mostrando os produtos da amplificação do DNA mitocondrial de três espécimes de *U. cordatus* (Alm1, Cau1 e Cau2, coletados no Estado do Ceará) utilizando as seguintes combinações de *primers*: (1) 12SU1 x GlnU1; (2) 12SU1 x IleU1; (3) 12SU1 x MetU1; (4) 12SU2 x GlnU1; (5) 12SU2 x IleU1; (6) 12SU2 x MetU1. (cn = controle negativo) **72**

Figura 5 - Gel de agarose 1% mostrando os produtos da amplificação do DNA mitocondrial de *U. cordatus* (espécime Alm1) utilizando as seguintes combinações de *primers*: (1) 12SU4 x IleU1; (2) 12SU4 x CRUc1; (3) 12SU4 x CRUc2.....**73**

Figura 6 - Esquema da região controle (RC) e genes adjacentes, mostrando o local de anelamento dos *primers* desenhados que amplificaram. Também estão sendo mostrados os *amplicons* escolhidos para o sequenciamento nas três etapas realizadas.....**74**

Figura 7 - Gel de agarose 1% mostrando os produtos da amplificação do DNA mitocondrial de *U. cordatus* utilizando os *primers* 12SU4, IleU1, CRUc1 e CRUc2. (A) Amplificações realizadas com espécimes de Cananéia (SP) e Paracuru (CE). (B) Gel de onde foram extraídos os *amplicons* destinados ao sequenciamento. Foram

seqüenciados um espécime de Almofala, CE (Alm1) e um de Cananéia, SP (Can)..... **75**

Figura 8 - Géis de agarose 1% mostrando os produtos da amplificação do DNA mitocondrial de *U. cordatus* (espécimes de Soure-PA) utilizando as seguintes combinações de *primers*: (A) 12SU5 x CRUc3; (B) 12SU6 x CRUc3; (C) 12SU6 x CRUc4; (D) CRUc5 x lleU2; (E) 12SU5 x CRUc4; (F) CRUc6 x lleU2; (G) CRUc5 x lleU1; (H) CRUc6 x lleU1..... **76**

Figura 9 - Gel de agarose 1% mostrando os produtos da amplificação do DNA mitocondrial de *U. cordatus* utilizando os *primers* 12SU5, CRUc3, CRUc5 e lleU1. Amplificações realizadas com espécimes do Curuçá (PA)..... **77**

Figura 10 - Imagem com tom invertido de gel de agarose corada com Syber Green, mostrando produtos de PCR a partir da amplificação das amostras de *U. cordatus* usando as combinações de pares de *primers*: **12SU5xCRUc3** e **CRUc5xlleU1**. Faixas 1-3, 4-6, 7-9 (para HV1) e 10-12, 13-15 (para HV2). B: branco (marcador molecular de 50 bp) **80**

Figura 11 - Distribuição das sequências variáveis (entropia) através dos domínios hipervariáveis (A) HV1 e (B) HV2 da região controle do mtDNA do caranguejo do mangue *Ucides cordatus* **82**

Figura 12 Índices de saturação dos domínios hipervariáveis (A) HVI, (B) HVII e (C) de toda a região controle (CR) do mtDNA do *Ucides cordatus* **83**

Figura 13 - Análise Bayesiana das sequências (A) HV1, (B) HV2 e (C) CR dos três locais coletados para esta análise. Cada barra vertical representa um indivíduo e a respectiva probabilidade de pertencer a um dos dois haplogroups detectado..... **87**

CAPITULO III

Figura 1 - Mapa de distribuição de espécies de *Ucides* em áreas de mangueiras nas Américas **100**

Figura 2 - Sequências alinhadas de um gene LSURRNA parcial de todas as espécies de caranguejo usadas para análises filogenéticas em formato não intercalado **109**

Figura 3 - Árvores de Neibors-Joining (A) e máxima parcimônia (B) para fragmento de LSURRNA. O modelo de distâncias Kimura-2-parâmetro foi usado para reconstrução de árvores..... **111**

- Figura 4** - Sequências alinhadas de um gene COX-1 parcial de todas as espécies de caranguejo usadas para análises filogenéticas, em formato não intercalado113
- Figura 5** - Árvores de Neighbor-joining (A) e de máxima parcimônia (B) para o fragmento COX-1. O modelo de distâncias Kimura-2-parâmetro foi usado para reconstrução de árvores115
- Figure 6** - Sequências alinhadas parcial de um gene de Cyt b para todas as espécies de caranguejo usadas para análises filogenéticas em formato não intercalado 117
- Figura 7** - Árvores neighbor joining (A) e máxima parcimônia (B) para fragmento de Cyt-b. O modelo de distâncias de 2 parâmetros de Kimura foi usado para reconstrução de árvores.....119
- Figura 8** - Sequências alinhadas de um gene LSUrRNA parcial de todas as espécies de caranguejo usadas para análises filogenéticas, em formato não intercalado.....122
- Figura 9** - Sequências alinhadas de um gene COX-1 parcial de todas as espécies de caranguejo usadas para análises filogenéticas, em formato não intercalado124
- Figura 10** - Sequências alinhadas de um gene parcial de Cob de todas as espécies de caranguejo usadas para análises filogenéticas, em formato não intercalado126
- Figura 11** - (A) Árvore neighbors-joining para o fragmento LSUrRNA. (B) Árvore de evolução mínima para o fragmento LSUrRNA. O modelo Kimura 2-Parâmetro foi utilizado com um valor gama de 0,44. Os números são valores de bootstrap para 1000 repetições.....134
- Figura 12** (A) Árvore neighbors-joining para o fragmento COX-1. (B) Árvore de evolução mínima para o fragmento COX-1. O modelo Kimura 2-Parâmetro foi utilizado com um valor gama de 0,44. Os números são valores de bootstrap para 1000 repetições.135
- Figura 13** - (A) Árvore neighbors-joining para fragmento de Cob. (B) Árvore de evolução mínima para fragmento Cob. O modelo Kimura 2-Parameter foi utilizado com um valor gama de 0,44. Os números são valores de bootstrap para 1000 repetições.....136

CAPITULO IV

Figura 1 - Localidades de amostragem de populações de *Ucides cordatus* pesquisadas ao longo da costa brasileira. FLO, Florianópolis - SC (n = 11); CAN,

Cananéia - SP (n = 100); CAR, Caravelas - BA (n = 80); FOR, Fortim - CE (n = 54); GOI, Goiabeiras - CE (n = 23); CAU, Caucaia - CE (n = 48); PAR, Parnaíba - PI (n = 26); CUR, Curuçá - PA (n = 50); E SOU, Soure - PA (n = 50). As direções da Corrente Norte do Brasil (NBC) e da Corrente do Brasil (BC) também são mostradas.....**148**

Figura 2 - (a) número ótimo de clusters (= 6) definido pelo menor valor de bic (bayesian conteúdo da informação). (b) matriz de grupos reais e clusters inferidos. (c) distribuição da amostra de acordo com análise discriminante de componentes principais (as linhas negras que ligam os números 1 a 6 representam uma árvore de extensão mínima**157**

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

Tabela 1 - Sequências dos *primers* desenhados adjacentes à região controle e internos.....**67**

Tabela 2 - Combinações dos últimos *primers* desenhados na fase III.....**68**

Tabela 3 - Sequências e combinações dos *primers* oligonucleotídeos, de pares utilizados para amplificação por PCR e sequenciamento do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* da região controle do *mtDNA*.**69**

Tabela 4 - Análise de substituições de nucleotídeos, Número de transições, transversões e *singletons* em HV1, HV2, na região controle inteira (RC) do *mtDNA* para *Ucides cordatus***81**

Tabela 5 - Principais características das sequências de nucleotídeos e medidas de diversidade genética com base nos domínios hipervariáveis HV1, HV2 e toda a região controle mitocondrial (RC) do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* ao longo da costa brasileira**84**

Tabela 6 - Média de distâncias genética K2P estimados a partir de domínios hipervariáveis HV1 (acima diagonal) e HV2 (abaixo diagonal), e a região inteira controle (CR; abaixo as primeiras 4 linhas) dos locais de coleta em *Ucides cordatus* ao longo da costa brasileira**85**

Tabela 7 - A análise de variância molecular (AMOVA) calculada a partir dos domínios hipervariáveis HV1, HV2 e em toda região controle (CR) dos locais de coleta do *U. cordatus* ao longo da costa brasileira**86**

CAPITULO III

Tabela 1 - Caranguejos de manguezais usados para sequenciamento e análises filogenéticas.....**102**

Tabela 2 - Lista de iniciadores de DNA mitocondrial selecionados e / ou otimizados neste estudo para o estudo de filogenia de caranguejos de manguezal.**104**

Tabela 3 - Composição de nucleotídeos de todas as espécies de caranguejo examinadas para o fragmento LSUrRNA**108**

Tabela 4 - Matriz de distâncias genéticas corrigida pelo parâmetro Kimura-2 utilizando o gene LSUrRNA	110
Tabela 5 - Composição de nucleotídeos de todas as espécies de caranguejo examinadas para o fragmento COX-1.....	112
Tabela 6 - Matriz de distâncias genéticas corrigida pelo parâmetro Kimura-2 usando o gene COX-1.	114
Tabela 7 - As frequências de bases empíricas (%) para cada espécie de caranguejo examinada para 1, 2 e 3 posições de codon sozinhas para o gene COX-1.....	115
Tabela 8 - Composição de nucleotídeos de todas as espécies de caranguejo examinadas para o fragmento Cyt b.	117
Tabela 9 - As frequências de bases empíricas (%) para cada espécie de caranguejo examinada para 1, 2 e 3 posições de codão sozinhas para o gene Cob.....	118
Tabela 10 - Matriz de distâncias genéticas corrigida pelo parâmetro Kimura-2 utilizando o gene Cyt-b	119
Tabela 11 - Características gerais da sequência de nucleótidos das regiões do gene do rRNA da subunidade grande, do citocromo oxidase I e do citocromo b do mtDNA dos caranguejos de manguezal. A diversidade de nucleotídeos (Kimura, 1980) foi calculada usando uma correção gama de 0,44.....	121
Tabela 12 - Composição de nucleotídeos (frequências de base, % de valores) de todas as espécies de caranguejo examinadas para o fragmento LSUrRNA.....	123
Tabela 13 - Composição geral de nucleótidos (frequências de base, % de valores) e nas posições # 1, # 2 e # 3 de todas as espécies de caranguejo examinadas para o fragmento COX-1.....	125
Tabela-14 - Composição geral de nucleotídeos (frequências de base, % de valores) e nas posições # 1, # 2 e # 3 de todas as espécies de caranguejo examinadas para o fragmento Cob.....	127
Tabela 15 - Distância média de nucleotídeos entre <i>Ucides cordatus</i> e <i>Ucides occidentalis</i> estimada pelo Parâmetros...de Kimura- 2.....	128

Tabela 16 - Distância média de nucleotídeos dentro de cada morfótipo de *Ucides* estimado pelo Parâmetro de Kimura- 2128

Tabela 17- Matriz de distância em partes do número de diferenças de nucleotídeos entre espécies para o fragmento LSUrRNA. O fragmento usado para criar essa matriz foi de 479 bases nucleotídicas.....130

Tabela 18 - Matriz de distância em pares do número de diferenças de nucleótidos entre espécies para o fragmento COX-1. O fragmento usado para criar essa matriz foi de 571 bases nucleotídicas.....131

Tabela 19 - Matriz de distância em pares do número de diferenças de nucleotídeos entre espécies para o fragmento Cob. O fragmento usado para criar essa matriz era de 334 bases nucleotídicas.....132

CAPITULO IV

Tabela 1 - Caracterização dos loci microsátélites para *Ucides cordatus*, ampliada de 319 indivíduos de seis localidades. A = número total dos alelos; NA = probabilidade de ocorrência de Alelos Nulo; PIC = conteúdo de informação polimórfica; HO = heterozigosidade observada; HE = "dentro da amostra" heterozigosidade esperada; F = estimativa do FIT de Wright; q = estimativa do FST de Wright; f = estimativa do FIS de Wright; p_{HWE} = nível de diferença de significância do equilíbrio de Hardy-Weinberg,.....154

Tabela 2 - Informações gerais da amostra e índices de diversidade média por locus para cada localidade. A = média número de alelos por locus; AR = riqueza alélica média por locus; HO = heterozigosidade observada média por locus; HE = heterozigosidade esperada média por locus. Todas as estimativas são seguidas pelos respectivos desvios padrão entre parênteses155

Tabela 3 - Matrizes de distância triangular para cálculo do teste de Mantel com 1000 permutações entre populações de *Ucides cordatus* (P = 0,608). Acima da diagonal são linearizados em pares FST [i.e., $FST / (1-FST)$], de acordo com o modelo unidimensional. Com exceção dos valores em negrito, todos os valores de FST não foram significativos (P > 0,05). Abaixo da diagonal são aproximadas distâncias entre populações em quilômetros.....156

Tabela 4 - Comparação de diferentes modelos de migração para locais de amostra de *Ucides cordatus* agrupados de acordo com os resultados da FCT. Integração termodinâmica (T.I.) e log Fator Bayes (LBF) foram usados para estimar as probabilidades do modelo.....159

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados
AMOVA	Análise de variância molecular
BLAST	Basic local alignment search tool
COI ou COX	Citocromo oxidase
CytbB	Citocromo oxidase b
DMSO	Dimetilsulfóxido
FST	Índice de fixação da variação genética entre subpopulações
FSC	Índice de fixação da variação genética entre grupos/regiões
HV	Região hipervariável
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
K	Número máximo de clusters
MP	Máxima parcimonia
mtRNA	RNA mitocondrial
IBAMA	O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ISSR	Inter sequências simples repetidas
SSR	Sequências simples repetidas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIC	Conteúdo de informação polimórfica
RC	Região controle
RAPD	DNA polimórfico amplificado ao acaso
RFLP	Polimorfismo de Fragmento de Restrição
rRNA	RNA ribossômico
SPAR	Amplificação e reação de primers único
STR	. Short tandem repeats
tRNA	RNA transportador
VNTR	Números variáveis de repetições em Tandem

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XI
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XVIII
INTRODUÇÃO GERAL	21
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
CAPÍTULO I	26
1 MARCADORES MOLECULARES DE <i>UCIDES CORDATUS</i> , UMA REVISÃO	26
METODOLOGIA	26
1.2 REPRODUÇÃO	27
1.3 ECOLOGIA E COMPORTAMENTO DO CARANGUEJO-UÇÁ	29
1.4 IMPORTÂNCIAS DA ESPÉCIE: ECONÔMICA E AMBIENTAL	32
1.5 TAXONOMIA E SISTEMÁTICA MOLECULAR DO CARANGUEJO UÇA	33
1.6 CARACTERÍSTICAS MORFO-FISIOLÓGICAS	33
2 MARCADORES MOLECULARES	34
2.2 Marcadores mitocondriais	34
2.2.1 Região controle do mtDNA	36
2.2.2 COX- I	37
2.2.3 Cyt-B	38
2.2.4 Regiões de 16 S e 12 S	38
3 Taxonomia Molecular e Filogenética	40
4 Diversidade Genética	42
5 Genética de População Marinha	42
CAPÍTULO II	56
REGIÃO CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL EM <i>UCIDES CORDATUS</i> , (LINNAEUS, 1763), : ESTRUTURA, MARCADORES MOLECULARES E POTENCIAL COMO MARCADOR EM ESTUDOS DE GENÉTICA POPULACIONAL	56
RESUMO	57
ABSTRACT	58
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 COLETA DE AMOSTRAS	61
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA	62
2.3 DESENHO DE <i>PRIMERS</i> DA REGIÃO CONTROLE DO MTDNA	63
2.4 OTIMIZAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i>	65
2.5 AMPLIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO DOS AMPLICONS E SEQUENCIAMENTO DO DNA	66
2.6 ANÁLISE DOS DADOS DE SEQUÊNCIA DE DOMÍNIOS HV	67
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4 CONCLUSÕES	84

REFERÊNCIAS	85
CAPÍTULO III.....	90
POSIÇÃO TAXONÔMICA, DIFERENÇAS MITOGENÔMICAS E RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO CARANGUEJO <i>UCIDES CORDATUS</i> (CRUSTACEA, BRACHYURA) DENTRO DO GRUPO THORACOTREMATA A PARTIR DE <i>MTDNA</i>	90
RESUMO	91
1 INTRODUÇÃO	93
2 MATERIAIS E MÉTODOS	96
2.1 COLETA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS	96
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA	97
2.3 TESTES DE <i>PRIMERS</i> UNIVERSAIS	98
2.4 AMPLIFICAÇÃO DE <i>MTDNA</i> PARA SEQUENCIAMENTO.....	100
2.5 PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR E SEQUENCIAMENTO	100
2.6 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E ANÁLISES FILOGENÉTICA.....	101
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
3.1 ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DO GENE <i>LSURRNA</i>	103
3.2 A RECONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA INFERIDA DO GENE <i>LSURRNA</i>	105
3.3 ANÁLISE DE SEQUÊNCIA <i>COX-1</i>	106
3.4 A RECONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA INFERIDA DA <i>COX-1</i>	108
3.5 ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE <i>CYT-B</i>	110
3.6 RECONSTRUÇÃO DE ÁRVORE FILOGENÉTICA INFERIDA DO GENE <i>CYT-B</i>	112
3.7 ANÁLISE DE SEQUÊNCIA	114
3.8 RECONSTRUÇÃO DE ÁRVORES FILOGENÉTICAS	122
REFERÊNCIAS	132
CAPÍTULO IV	136
CONECTIVIDADE POPULACIONAL E DISPERSÃO LARVAL DO CARANGUEJO DE MANGUE <i>UCIDES CORDATUS</i> EXPLORADO AO LONGO DA COSTA BRASILEIRA*	136
1 INTRODUÇÃO	139
2 MATERIAIS E MÉTODOS	141
2.1 AMOSTRAS DE CARANGUEJO.....	141
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM DE MICROSSATÉLITES.	142
2.3 ANÁLISE DOS DADOS	143
2.3.1. <i>Controle de qualidade dos dados</i>	143
2.3.2. <i>Polimorfismo dos loci</i>	143
3 RESULTADOS	147
3.1 DIVERSIDADE DE MICROSSATÉLITES	147
3.2 INFERÊNCIAS DE FLUXO DE GENES	152
4 DISCUSSÃO	152
REFERÊNCIAS	158

INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Ucides cordatus* (**Figura 1**) conhecida popularmente como caranguejo-uçá ou caranguejo-verdadeiro pertencente à família Ocypodidae (Crustacea: Decapoda: Brachyura), tem grande importância econômica e ecológica para as áreas de manguezais do Brasil, especialmente no Norte e Nordeste do país. Sendo fonte de recurso pesqueiro para as populações ribeirinhas, *U. cordatus* é considerado espécie-chave do ecossistema manguezal por sua abundância, elevada biomassa e por ter relevância ecológica nos processos de reciclagem de nutrientes e revolvimento do solo durante o consumo de detritos orgânicos vegetais para a construção e manutenção de suas galerias. JUAN; WALTER, 2010).

Figura 1. *Ucides cordatus*. (Linnaeus, 1763)



Fonte: Jefferson Francisco Alves Legat, (Parnaíba)2018.

Os *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) são encontrados exclusivamente no continente americano, distribuído no Atlântico Ocidental, desde a Flórida (EUA), até o Brasil, onde sua ocorrência vai desde do Amapá até Santa Catarina (MELO 1996). É de grande valor para a culinária brasileira, e elevado teor proteico, além de sua carapaça também ser muito utilizada no artesanato.

Devido o alto índice de atividade extrativista de captura do caranguejo-uçá, os estoques pesqueiros têm diminuído, podendo resultar no esgotamento deste recurso em escala econômica e um grave desequilíbrio ecológico. São observações constantes e relatos de catadores de caranguejo sobre a diminuição dos estoques naturais (SOUSA et al 2015).

Os marcadores moleculares são utilizados como ferramenta fundamental no auxílio à identificação taxonômica de espécies animais com as relações filogenéticas entre os taxa sendo bem mais esclarecidas, com detalhes, inclusive das estruturas populacionais (POLIDO et al., 2012). Nesse contexto, marcadores moleculares baseados no DNA são utilizados nos estudos de conservação de recursos genéticos com interesse comercial (DINIZ et al., 2005).

Geralmente, para se realizar uma avaliação entre os taxa mais distantes é conveniente que se utilize marcadores mais conservados evolutivamente (por exemplo, regiões 16S, 12S, COX-1 do DNA mitocondrial), sendo que, para estudos de populações com taxa mais próximas utilizam-se marcadores mais variáveis (microssatélites, RAPD- Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso, AFLP-polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, RC- região controle do DNA mitocondrial, dentre outros). Como ferramenta de estudo para identificação genética, os microssatélites ainda são os mais utilizados para os *U. cordatus*, os microssatélites são repetições curtas de bases de DNA, repetidas em sequência. São marcadores codominantes altamente polimórficos, sendo, portanto um grande instrumento para estudos de genética de populações (DINIZ et al., 2008).

A região controle destaca-se por não possuir ferramentas de reparo, o que aumenta a carga de mutações e conseqüentemente sua alta variabilidade. Em invertebrados, encontram-se dois domínios periféricos com altos níveis de substituições e altas taxas de polimorfismos quando comparados ao domínio central (DINIZ et al., 2005).

Algumas pesquisas têm avançado utilizando o gene dos Citocromo oxidase (COX-1) e da região controle, do mtDNA para identificação da estruturação genética (VIANA, 2013).

Pesquisas que visam (buscar um eficiente planejamento, informações genéticas) minimizar e garantir o uso sustentável dos recursos dos manguezais são fundamentais para conter a exploração excessiva e a preservação da espécie em estudo.

Objetivou-se com este estudo desenvolver marcadores moleculares a partir do DNA mitocondrial (região controle do *mtDNA*); sequenciar e analisar a estrutura primária da região controle do DNA mitocondrial no caranguejo-uçá; bem como avaliar as relações filogenéticas do caranguejo-uçá dentro das famílias Gecarcinidae e Ocypodidae; analisar as diferenças genômicas entre *U. cordatus* e *U. occidentalis*, determinar a variabilidade genética e estrutura populacional do caranguejo-uçá nos manguezais do Norte e Nordeste brasileiro pela utilização de marcadores moleculares.

Esse estudo se insere na linha de pesquisa Biotecnologia em Agropecuária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Nível Doutorado) da Rede Nordeste de Biotecnologia (PPGB/RENORBIO), pela Universidade Federal do Piauí – UFPI. Dessa forma, seguindo as Normas do Programa, esta Tese será apresentada em forma de artigo, além da introdução geral:

No capítulo I: Revisão de literatura, este capítulo descreverá sobre o *Ucides cordatus* e marcadores moleculares.

O capítulo II: Dispõe sobre a região de controle do DNA mitocondrial em *Ucides cordatus*, sua estrutura, evolução e seu potencial como marcador em estudos de genética populacional.

O capítulo III: Revisa a posição taxonômica e relações filogenéticas do caranguejo *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura) dentro da tribo Thoracotremata inferido a partir de sequências do mtDNA.

*Artigo submetido na revista internacional Diversity; Qualis (Biotecnologia) = B1.

O capítulo IV: Investiga a conectividade populacional e dispersão de larvas exploradas do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* ao longo da costa brasileira

*Artigo publicado na revista internacional PeerJ; Impact fator = 2,993; Qualis (Biotecnologia) = B1.

REFERÊNCIAS

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.

JUAN, M.; WALTER, R. Situación actual del guariche *Ucides occidentalis* (Ortmann, 1897) em el atuário del Río Chone, Manabí durante abril 2009-2010. **Boletín Científico Técnico**, 20(8): 16-35, 2010.

MELO G.A.S. **Manual de Identificação dos Brachyura (Caranguejos e Siris) do Litoral Brasileiro.** Editora Plêiade, 604p, 1996.

POLIDO, P. B.; FERREIRA, F. G.; ALBERTON, O.; SOUZA, S. G. H. de. Marcadores moleculares aplicados no melhoramento genético de bovinos. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 161-169, jul./dez. 2012.

SOUSA, D. B.; SANTOS, N. B.; OLIVEIRA, V. M.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; ALMEIDA, Z. S.. Carcinofauna bêntica estuarina de dois manguezais da costa amazônica maranhense, Brasil. Iheringia. **Série Zoologia**, 105, 339- 347. 2015

VIANA, L. A. **Estrutura genética e demográfica do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) na costa do Brasil.** Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2013.

**Taxonomia, sistemática e genética populacional do caranguejo-uçá,
Ucides cordatus: desenvolvimento de ferramentas moleculares e inferências
filogenéticas.**

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a sistemática molecular e a estrutura genética populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus*.

2.2 Objetivos Específicos

- **Capítulo I:** Descrever sobre o *Ucides cordatus* e marcadores moleculares.
- **Capítulo II:** Desenvolver um marcador genético altamente polimórfico e explorar o potencial de utilização dos domínios hipervariáveis 5'- e 3'- terminais da região controle do mtDNA como marcadores genéticos para avaliar a variabilidade genética do caranguejo de mangue *Ucides cordatus*.
- **Capítulo III:** Esclarecer as relações entre *U. cordatus cordatus* e *U. cordatus occidentalis* usando sequências de nucleotídeos da grande subunidade ribossomal (LSUrRNA ou 16S), citocromo c oxidase I (COX-1) e também citocromo b (Cyt -b) do genoma mitocondrial como caracteres moleculares para inferência de relações filogenéticas
- **Capítulo IV:** Estimar e avaliar a distribuição espacial da diversidade genética, taxas de migração e fluxo genico e diretividade entre populações de *U. cordatus* no Brasil.

CAPÍTULO I

1 MARCADORES MOLECULARES DE *UCIDES CORDATUS*, UMA REVISÃO

Metodologia

O método utilizado para realização desta revisão de literatura foi feito através de um levantamento bibliográfico, onde se pesquisou nas diversas bibliotecas físicas e virtuais de instituições públicas nacionais e internacionais, trabalhos, artigos científicos com conteúdos relevantes ao meio científico.

Foram pesquisados os dados virtuais em diversas bibliotecas utilizadas no âmbito institucional, com destaque a Scientific Electronic Library Online (SCIELO), (www.scelo.org) Web of science. Foi pesquisado no portal de periódicos, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (CAPES), Google acadêmico ([scholar Google.com.br](http://scholar.google.com.br)).

O *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) caranguejo-uçá (**Figura 1**), é um crustáceo semiterrestre, exclusivo de manguezais, popularmente conhecido no Brasil como caranguejo-uçá, caranguejo do mangue ou caranguejo-verdadeiro (BRANCO 1993, NORDHAUS, 2003). A espécie foi registrada pela primeira vez no litoral brasileiro no início do século XIV por jesuítas e viajantes portugueses (MELO 1996).

Figura 1 -. *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763).



Fonte projeto carangue-uçá, 2013.

É endêmico da costa atlântica do Continente Americano, o caranguejo-uçá, *U. cordatus*, Crustacea, Brachyura, Ocypodidae, tem uma distribuição geográfica que abrange os manguezais desde a Flórida (E.U.A.) até Santa Catarina (sul do Brasil) (COSTA, 1979; MELLO, 1996; BLANKENSTEYN et al., 1997; DIELE, 2000; SILVA, 2002).

Possui grande porte e sua coloração varia do azul-celeste ao marrom-escuro, conforme a época do ano e o tempo que permanece com o exoesqueleto. Suas patas possuem coloração lilás ou roxa. É um crustáceo onívoro com hábito noturno.

Esta espécie já esteve integrada à família Ucididae, sendo composta por um único gênero (ŠTEVČIĆ, 2005; Ng et al., 2008), representado por duas espécies: *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) e *Ucides occidentalis*. Entretanto, foi realocada, novamente, na família Ocypodidae, subfamília Ucidinae por Shih et al., (2016)., utilizando análises de relações filogenéticas (rDNA nuclear 28S, rDNA mitocondrial 16S e citocromo oxidase I),

Com relação aos Ocypodidae existem duas subfamílias: Ocypodinae e Ucininae, sendo os representantes do gênero Ocypode, típicos de praias arenosas e encontrados em áreas de manguezal (NG et al., 2008).

O caranguejo *Ucides cordatus* é um dos crustáceos mais explorados do Brasil. No Nordeste do Brasil este crustáceo é muito abundante, sendo um dos mais importantes recursos dos manguezais da região, devido à espécie ter um alto índice e comercialização (PAIVA et al., 1997).

1.2 Reprodução

Estudos sobre a reprodução de *U. cordatus* aumentaram nos últimos anos (GÓES et al., 2000, HATTORI ; PINHEIRO 2003,). Em particular por causa de danos aos estoques naturais como resultado da intensa exploração. No sul e sudeste do Brasil, esse caranguejo também é explorado, levando a uma preocupação com a sua reprodução (GÓES et al., 2000)

Segundo Nascimento (1993) o caranguejo-uçá apresenta dimorfismo sexual bastante acentuado, sendo os machos sempre maiores do que as fêmeas e com mais pêlos nas patas, as fêmeas possuem abdômen semicircular, com seis segmentos visíveis e não fusionados com quatro pares de pleópodos modificados

incubações dos ovos. Os machos, por sua vez, apresentam o abdômen longo, estreito e triangular, tendo o 5° e 6° segmentos soldados em um único segmento.

No período da reprodução, *U. cordatus* machos e fêmeas saem das galerias, migram para o acasalamento em um fenômeno denominado pelas comunidades litorâneas de “soatá”, “andada”, “andança”, “corrida” ou “carnaval”. Esse período varia em cada região, mas sempre ocorre nos meses de maior fotoperíodo, temperatura e precipitação, alguns trabalhos relatam que os *U. cordatus* realiza dois tipos de a "Andada": uma para acasalamento e outra para lançamento de larvas.

Góes et al. (2000) Diele et al (2005) e citam que a "andada" de *U. cordatus* ocorre nos primeiros dias do período da lua cheia e da lua nova, sincronia com as amplitudes de maré mais amplas.

Segundo trabalho de Diele (2000), a reprodução tem caráter sazonal, seguindo um ritmo estritamente lunar. As fêmeas liberam as larvas nos manguezais inundados no estófo de maré, precedendo as marés vazantes, com os picos de eclosão sempre ocorrendo antes da lua nova. As fêmeas podem liberar larvas mais de uma vez dentro de um mesmo período reprodutivo e as desovas ocorrem preferencialmente à noite, o que presumivelmente reduz a mortalidade ligada à predação. O crescimento segue um padrão indeterminado, com aumentos relativos de crescimento e frequência de muda diminuindo distintamente com tamanho.

Góes et al. (2000), estudando o comportamento reprodutivo de *U. cordatus*, definiram a ocorrência de quatro eventos principais relacionados à reprodução:

- a) Caranguejo espumando, em um período três a nove dias antes da a "andada" (evento observado apenas em machos), que produzem uma espuma branca na região acima dos terceiros maxilípedes, na altura dos meropoditos, exalando odor característico de caranguejo por todo o mangue, possivelmente para atração sexual das fêmeas pelos feromônios.
- b) a "Andada" para acasalamento comportamento pré-copulatório caracterizado por grande movimentação e batalhas e troca de golpes com quelípodos entre machos, para a atração/posse das fêmeas.
- c) Acasalamento (observado na entrada das galerias, ocorre quando macho e fêmea permanecem entrelaçados ventre a ventre).
- d) Liberação das larvas que segundo estudo realizado pelo autor ocorreu durante todo o período de baixa-mar, nas margens dos canais de maré, quando as fêmeas

abrem e fecham o abdome várias vezes enquanto liberam um líquido da região acima dos terceiros maxilípedes sobre os ovos.

O *Ucides cordatus* é uma espécie de *Brachyura* longeva, com um período de vida de mais de dez anos e fêmeas alcançando a maturidade sexual em torno de 2,1 a 3,0 anos (DIELE, 2000; PINHEIRO et al., 2005). Ambos os sexos apresentam quatro morfotipos: juvenil, pré-puberdade, sub-adulto e adulto (PINHEIRO E HATTORI, 2006).

Foi verificado o pico de fêmeas com ovários maduros em manguezais de Iguape/SP, no mês de novembro, seguido pela maior ocorrência de fêmeas ovígeras de dezembro a fevereiro (CASTILHO, 2006).

A fecundação, provavelmente, é interna e ocorre durante a ovoposição. Fêmeas de *U. cordatus* são capazes de manter espermatozoides viáveis armazenados em suas espermatecas por vários meses ou, pelo menos, por um ano (CASTILHO, 2006).

1.3 Ecologia e Comportamento do caranguejo-Uçá

Os manguezais são ecossistemas tropicais, que ocorrem geralmente em regiões quentes, cuja precipitação pluviométrica está acima de 1200 mm/ano. As florestas de mangue ocorrem quase sempre em locais abrigados e nas zonas de marés, com abundante suprimento de água doce (fluvial), temperaturas constantes, aproximadas de 20 °C ao longo do ano, relativa flutuação de salinidade da água, entre 3 e 35 Kl/g de substrato lodoso muito rico em matéria orgânica, com baixo teor de oxigênio e inundado frequentemente pelas marés (RAMOS, 2002).

Segundo Lacerda et al. (2003), nas Américas, as florestas de mangue são compostas principalmente por espécies dos gêneros *Rhizophora*, *Avicennia* e *Laguncularia* e *Conocarpus*. Essas plantas são caracterizadas por apresentarem adaptações morfológicas e fisiológicas que lhes permitem viver em um ambiente tão peculiar, com adaptações no seu sistema radicular, como as raízes aéreas; raízes escoras, que servem para ancorar a planta ao solo mole, móvel e ainda tem pneumatóforos e lenticelas, que ajudam a planta a respirar em um solo anóxico; glândulas secretoras de sal; viviparidade, dentre outras (VANNUCCI, 2003).

Com uma fitofisionomia bastante própria, o ecossistema do manguezal possui uma grande variedade de nichos ecológicos, com uma fauna diversificada, como:

mariscos, caramujos, camarões, caranguejos, siris, peixes e aves residentes e migratórias. Estes organismos utilizam-se do manguezal em busca de alimento, reprodução, crescimento e proteção contra predadores, os últimos, atraídos por uma predominância de indivíduos jovens no ambiente (FEMAR, 2001).

Entre a macrofauna comumente encontrada em manguezais, os crustáceos *Brachyura* são os taxa mais importantes com considerável número de espécies, densidade e total de biomassa, desempenhando um papel relevante na dinâmica e estruturação dos manguezais (SKOV et al., 2002).

Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil que se encontram aproximadamente 85% dos manguezais do país (HERZ, 1991).

U. cordatus apresenta comportamento semi terrestre, é a segunda maior espécie dos manguezais brasileiros, são de hábitos noturnos e vivem na região do mesolitoral, escavando galerias no chão das florestas de mangue (PINHEIRO et al., 2005). Encontrado exclusivamente em manguezais, *U. cordatus* habita áreas entre mares, em substratos lodosos, onde constrói tocas com uma profundidade máxima de 0,6 a 1,52 metros dependendo da época do ano. Os indivíduos adultos ocorrem em áreas de sedimento lodoso, com predomínio de silte e argila, enquanto os juvenis são mais frequentemente encontrados em sedimentos arenosos, com predomínio de areia fina (PINHEIRO; FISCARELLI, 2001). As tocas são construídas abaixo do mais alto nível de maré alta, tem aspecto uniforme, geralmente rasa, relativamente em linha reta e frequentemente com múltiplas entradas, que se cobrem diariamente, com a elevação de maré (BRIGHT; HOGUE, 1972). Os caranguejos permanecem dentro das tocas quando submersas, obtendo proteção contra predadores e contra a dessecação (NORDHAUS, 2003).

Durante a maré baixa saem à procura de alimento e realizam a limpeza das tocas, retirando todo o excesso de substrato introduzido em seu interior durante a maré alta (PINHEIRO; FISCARELLI, 2001).

A observação de aspectos etológicos de *U. cordatus* revela como comportamentos mais comuns: a) limpeza das galerias, quando parcialmente inundada; b) fuga do contato com os seres humanos. O caranguejo-uçá apresenta comportamento territorialista, construindo galerias individuais que são intensamente protegidas contra invasores por seus habitantes (BRANCO 1993).

No entanto, a competição local entre caranguejos provoca uma maior movimentação e mudança de tocas (PIOU et al., 2007).

O recrutamento do caranguejo-uçá ocorre em zonas pouco alagadas, principalmente nos apicuns, particularmente dentro de galerias de indivíduos maiores (SCHMIDT et al.,2005). Segundo Hattori (2006), manguezais com predominância de *Rhizophora mangle* apresentaram maior potencial extrativo (85,7%) de *U. cordatus*, seguida por *Avicennia schaueriana* (79,3%) e menor em *Laguncularia racemosa* (34,3%). Áreas de *L. racemosa*, por apresentar em elevada abundância de *U. cordatus* de pequeno porte, devem ser preservadas e consideradas como uma reserva dos estoques naturais desse recurso. A umidade do sedimento, o enraizamento, o diâmetro e a altura das árvores influenciam, positivamente, no grau de agregação entre indivíduos, na população de *U. cordatus*. No entanto, a resistência mecânica a penetração do sedimento e a densidade arbórea diminuem esse grau de agregação (OLIVEIRA, 2005). Abrunhosa et al, (2002) concluíram que larvas de *U. cordatus* necessitam de alimento para realizar a muda, diferente de muitas espécies de crustáceos, que completam um estágio (ou mesmo todo o desenvolvimento larval) sem buscar alimentos. Para esse autor, náuplios de *Artemia* não parecem ser o alimento adequado para as larvas de *U. cordatus* no 1º estágio. Entretanto, a microalga *Dunaliella* sp., além de contribuir para a manutenção da qualidade da água em condições de cultivo, influencia positivamente na muda e na atividade dos indivíduos. Sem alimentação, apenas um pequeno percentual das larvas conseguiu atingir o estágio subsequente de zoea II .

O alimento ingerido por *U. cordatus* é obtido durante a maré baixa, nas proximidades das tocas. A grande variedade de alimentos que faz parte da dieta de *U. cordatus* permite classificar a espécie como onívora (BRANCO, 1993. Análises de conteúdo estomacal indicam que sua dieta é constituída por folhas de mangue (61,2%), material vegetal não identificado e detritos (28,0%), raízes (4,9%), sedimento (3,3%), casca de árvores (2,5%) e material de origem animal, (0,1%) como crustáceos, poliquetos, insetos, bivalves e gastrópodes (NORDHAUS; WOLFF, 2007). Pelo exposto Christofolletti (2005) observando que as folhas corresponderam ao principal item na dieta desta espécie.).

Segundo Wolff et al. (2000), *U. cordatus* é um dos principais consumidores da serapilheira oriunda dos mangues. Apresenta hábito predominantemente diurno, pois depende da visão para a coleta de folhas embora, de acordo com Nordhaus (2003), também seja ativo durante a noite.

1.4 Importâncias da espécie: Econômica e Ambiental.

Essa espécie dentro do sistema de mangues é considerada a atividade econômica mais importante em escala comercial no Brasil, por ser um dos crustáceos muito explorados em varias regiões (VIEIRA et al,2004). Este é um recurso natural econômico muito importante em toda sua ocorrência nas áreas de mangue do Brasil, especialmente nas regiões norte e nordeste do país (IBAMA 1994, MONTEIRO; COELHO-FILHO, 2004).

Devido a seu grande valor na culinária brasileira, Glaser (2004), a cata de centenas de toneladas deste caranguejo é realizada todos os anos em áreas de mangues, sendo bastante utilizado na culinária. Sua carne apresenta elevado teor proteico (72%) bem como teor reduzido de gordura (1,8%) Blankensteyn et al. (1997). Sua carapaça também é utilizada no artesanato, é usado como peça para confecção de souvenir, como cinzeiro.

A exploração do caranguejo-uçá é uma das atividades extrativistas mais antigas em áreas litorâneas, constituindo fonte de renda para parte da população com baixo poder aquisitivo da região Norte e Nordeste do Brasil (Glaser 2004), devido sua grande exploração, tem gerado expressivo impacto em suas populações naturais e com o alto índice de atividade extrativista de captura de caranguejo-uçá, os estoques pesqueiros de caranguejo-uçá têm ocorrido redução na sua reprodução, podendo resultar no esgotamento deste recurso em escala econômica e um grave desequilíbrio ecológico (PIOU et al.,2007). Observações e relatos de catadores de caranguejos sobre a diminuição dos estoques naturais são constantes (SOUTO 2007).

Dentro de uma visão ecológica, *U. cordatus* é uma espécie-chave na reciclagem dos nutrientes dos manguezais, A espécie é responsável pela degradação da matéria vegetal senescente (folhas e propágulos) disponível sobre o sedimento (CHRISTOFOLETTI, 2005),estima se que cerca de 80% da biomassa da epifauna dos manguezais é constituída pelo caranguejo-uçá, que serve como recurso alimentar para muitos grupos de animais que habitam ou visitam regularmente este ecossistema (KOCH,1999). Bem como por sua transformação em matéria orgânica particulada. O processamento desse alimento fornece a essa espécie de caranguejo o segundo lugar no fluxo energético e a maior biomassa no manguezal

1.5 Taxonomia e Sistemática Molecular do Caranguejo Uça.

. Táxon é uma unidade taxonômica essencialmente associada a um sistema de classificação, o que significa dizer que pode ser um reino, uma família, um gênero, uma espécie Junqueira (2005), ou seja, entidades que de alguma maneira podem ser discernidas umas das outras.

O *Ucides cordatus* apresenta seguinte classificação taxonômica (ŠTEVČIĆ, 2005;).

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Subfilo: Mandibulata

Classe: Crustacea

Subclasse: Malacostraca

Ordem: Decapoda

Infraordem: Brachyura

Super-Família: Ucydoidea Rafinesque (1815)

Família: Ocypodidae Rafinesque (1815)

Subfamília: Ucidinae Števcic (2005)

Gênero: *Ucides* Rathbun (1897)

Espécie: *Ucides cordatus* Linnaeus (1763)

1.6 Características morfo-fisiológicas

Ucides cordatus apresenta um exoesqueleto com cefalotórax ovalado, que se estreita na parte posterior, cujo comprimento é 4/5 menor do que a largura (ALCÂNTARA FILHO, 1978; NASCIMENTO, 1984; SANTOS; COELHO, 2000). O exoesqueleto é resistente, composto por substâncias como: Magnésio, Zinco, Fósforo, Nitrogênio, Cálcio, Sódio, Potássio, Ferro, Manganês, Cobre e Chumbo. O lado dorsal do cefalotórax é mais resistente e mais duro no primeiro par de patas (quelípodo), enquanto que nos pontos de articulação dos apêndices do corpo, a calcificação é mais fraca, permitindo a articulação e movimentação do animal (NASCIMENTO, 1984). Sua coloração varia do azul-celeste ao marrom escuro, de acordo com o período do ano e o tempo de duração da intermuda. Suas patas são de cor lilás ou roxa em todas as fases, mas podem adquirir tonalidade ferruginosa ou marrom-escuro à medida que o animal envelhece ou pouco antes da muda (ecdise). Internamente possui seis pares de brânquias encerradas nas câmaras laterais da carapaça, com uma dilatação dorsal expressiva na fase adulta, o que permite

armazenar maior quantidade de ar atmosférico (PINHEIRO; FISCARELLI, 2001). De acordo com esses autores, não existem diferenças significativas quanto ao consumo de oxigênio entre machos e fêmeas, quando indivíduos do mesmo peso são considerados. A respiração do caranguejo-uçá é tão eficiente que proporciona sua permanência em galerias subterrâneas, onde o consumo de oxigênio é relativamente baixo e sua presença sobre o substrato lamoso, cujo teor de O₂ é bem mais elevado (ALVES; MADEIRA JÚNIOR, 1980.)

2 MARCADORES MOLECULARES

O uso de marcadores moleculares em estudos de genética populacional provou ser decisivo para esclarecer diversos aspectos relacionados à biologia, à ecologia e à evolução de muitos organismos.

No entanto, ao escolher um marcador molecular específico, deve-se considerar não somente o objetivo do estudo, mas também outros aspectos importantes relacionados à acessibilidade e viabilidade das técnicas.

Os marcadores microssatélites são muito utilizados nos estudos de diversidade genética animal, sendo bastante aceito no meio científico, principalmente por possibilitar que os *primers* heterólogos permitam a transferência dos marcadores em espécies evolutivamente próximas, não precisando, portanto, passar por todo o processo de desenvolvimento. Porém, o fator limitante no uso dos marcadores transferidos é a perda de informação genética referente à variabilidade, principalmente devido à presença de alelos nulos (mutações nas regiões flangeadoras dos *primers*) que subestimam as diferenças genéticas e que aumentam à medida que aumenta as distâncias genéticas (FERNANDES et al., 2010; ALVES et al., 2011; OLIVATTI et al., 2011).

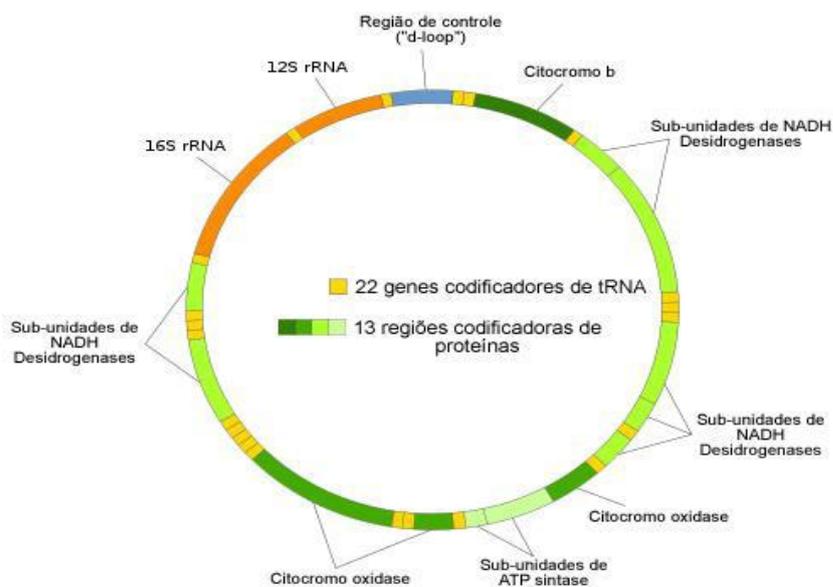
2.2 Marcadores mitocondriais

A utilização de marcadores moleculares baseados em amplificação de DNA, é uma alternativa importante, uma vez que eles podem amplificar qualquer genoma. Entre estes marcadores, a repetição de sequência simples (ISSR) tem sido utilizada em várias espécies devido à sua alto nível de polimorfismo (PANARARI, 2006).

Dentre os marcadores as mitocôndrias são as organelas onde ocorrem a fosforilação oxidativa, sendo esta uma reação essencial para a produção de Adenosina trifosfato - ATP, bem como outras variedades de reações bioquímicas. As mitocôndrias desempenham um papel central na apoptose, no metabolismo e no envelhecimento celular. Essas organelas possuem carga genética própria, conhecido como DNA mitocondrial (**mtDNA**), que são genoma exclusivo, separado da cromatina nuclear, comumente utilizado em estudos de filogenia molecular (ALBERTS et al., 2008).

Esta organela, se apresenta diferente das outras, o mtDNA representa apenas 1 a 2% do DNA celular, em duplo filamento circular, codificando apenas 37 genes (**Figura 2**). Todos os 37 genes tipicamente encontrados no mtDNA de animais têm homólogos no mtDNA de plantas, fungos e protistas. Possuem de modo geral, uma grande região não codificante rica em Adenina e Timina (AT,) que para alguns animais, é conhecida por conter elementos controladores de replicação e transcrição. A comparação de genomas mitocondriais pode nos dar novos pressuposto sobre a evolução dos organismos e dos próprios genomas (BOORE, 1999).

Figura 2. - Esquema genoma mitocondrial.



Fonte: <https://www.infoescola.com/genetica/dna-mitocondrial/>

O DNA mitocondrial animal apresenta vantagens que difere dos outros marcadores moleculares para a análise filogenéticas. Por estarem presentes em cópias únicas, a

comparação entre genes parálogos geralmente não é uma preocupação; o padrão de herança materna, característico do *mtDNA* da maioria dos animais, permite a reconstrução direta de uma topologia de árvore bifurcada; a herança uniparental pode reduzir tamanho efetivo da população de genes mitocondriais, acarretando a fixação mais rápida das mutações. O DNA mitocondrial também tem uma taxa de substituição de bases mais elevada do que a maioria dos genes nucleares. Estas características fizeram do *mtDNA* um marcador genético bastante frequente em estudos evolutivos (CUROLE E KOCHER, 1999).

O *mtDNA* além de ser considerado uma molécula que tem função vital na célula, pode sofrer processos biológicos que influenciam história evolutiva (BANDELT, 2006). Muitos aspectos da evolução podem ser estudados em sistemas mitocondriais em níveis de detalhamento e de compreensão superiores aos observados nos sistemas nucleares. Com poucas exceções, os arranjos gênicos são relativamente estáveis dentro de grandes grupos, mas apresentam variação quando esses mesmos grupos são comparados entre si. Comparações de arranjos gênicos mitocondriais têm fornecido convincentes reconstruções filogenéticas. (BOORE, 1999).

2.2.1 Região controle do *mtDNA*

NA região codificante do DNA mitocondrial (*mtDNA*), possuem marcadores moleculares utilizados nas pesquisas de estruturas genéticas e em reconstrução (BUENO -SILVA,2012). O *mtDNA* é um dos principais marcadores moleculares utilizados em estudos filogenéticos e em genética populacional de organismos aquáticos e terrestres. É extranuclear, apresenta genoma pequeno e contém uma região hipervariável, não codificante, conhecida como região controle (FARIAS et al., 2003; OLIVEIRA-NETO et al., 2008).

A região codificante do *mtDNA* apresenta 37 genes, os quais correspondem a 13 polipeptídios, duas moléculas de rRNA e 22 tipos de tRNA; sua região não codificante corresponde à região denominada região controle ou *D-Loop*, a qual apresenta aproximadamente 1122 pares de bases, sendo a mesma dividida em regiões hipervariáveis I, II e III (HV I, II e III). Esta é responsável pela regulação da replicação e transcrição de todo o *mtDNA* (ANDERSON *et al.*, 1981; ANDREWS, et al.,1999; BLUTER, 2010).

O *mtDNA* evolui pelo acúmulo de mutações nas linhagens maternas (BROWN et a.; 1979), e acredita-se fixar novas mutações dez vezes mais rápido do que o

DNA nuclear (WALLACE *et al.*, 1987). O mtDNA, além de ser considerado uma molécula com função vital na célula, está sujeito a processos biológicos que influenciam a história evolutiva (BANDELT *et al.*, 2006). A região controle do DNA mitocondrial pode ser utilizada como um eficiente marcador molecular, devido a seu padrão de herança genética e alta taxa de polimorfismo. Essa região tem sido muito utilizada em estudos populacionais, filogeográficos e de análises evolutivas. Como pod-se observar nos estudos de genética populacional de invertebrados semi-terrestres ou aquáticos, por exemplo o da lagosta *Panulirus argus* (DINIZ *et al.*, 2005) do siri e *Portunus trituberculatus* (GUO *et al.*, 2012).

Outra constatação de aplicabilidade do marcador foi o observado por Liu *et al.* (2014) ao obterem informações importantes referentes a diversidade e estruturação genética de populações de peixes de água doce *Brachymystax lenok tsinlingensis*, típicas das montanhas Qinling na China, que atualmente estão ameaçadas de extinção.

As características de herança genética do *mtDNA* tais como: herança materna, genoma haplóide, ausência de recombinação, sensível aos efeitos da deriva genética e alta taxa evolutiva configuraram este genoma como *Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas* excelente fonte de informações genéticas para estudos voltados à taxonomia e conservação de diversos organismos.

2.2.2 COX- I

O gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI ou Cox1) é um gene que codifica parte da enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial. Caracterizado pela sua alta taxa de mutação, mesmo quando comparado com outros genes mitocondriais, é composto por um curto segmento de 648 pares de bases, foi indicado para identificação molecular em nível de espécie (HEBERT *et al.*, 2003a; 2003b). O estudo dessa região do mtDNA, também denominado de DNA “barcoding”, utiliza sequências parciais de DNA do gene COI e permite identificar e designar espécimes desconhecidos e espécies previamente descritas; e facilitar a descoberta e o diagnóstico de novas espécies, auxiliando a desvendar a diversidade (BOLZAN, 2011).

Algumas pesquisas utilizaram os genes, citocromo oxidase (COI) e a região controle, do DNAm para estruturação genética, entre elas pode-se observar, os trabalhos, de PIE et al. (2008) e VIANA et al (2013), respectivamente.

2.2.3 Cyt-B

O marcador molecular citocromo b (Cyt-b ou Cob) que é a subunidade catalítica central da ubiquinol citocromo c reductase, uma enzima que está presente na cadeia respiratória da mitocôndria e na cadeia respiratória do ciclo foto-redox de muitas bactérias (MEYER, 1994), todos os organismos eucariotos carecem desta classe de enzima redox, e conseqüentemente do citocromo b para a transformação de energia (ORREGO, 2012). Sua utilização se justifica pela presença de regiões conservadas e variáveis, as quais contem sinais que podem ser utilizados em análises filogenéticas em níveis taxonômicos diferentes, sendo considerado excelente marcador molecular, amplamente utilizado como ferramenta em filogenias moleculares (ORREGO, 2012).

O gene mitocondrial do cyt-b é bastante utilizado em estudos sistemáticos para explicar divergência em muitos níveis taxonômicos. A pesquisa de Izeni et al. (2001) enfoca principalmente a utilidade do cyt-b como marcador molecular para inferir relações filogenéticas em vários níveis dentro da família de peixes Cichlidae. As árvores de genes obtidas de cyt-b são comparadas com uma árvore de evidências total publicada derivada de estudos anteriores. Árvores de evolução mínima baseadas em dados cyt-b resultaram em topologias congruentes com todas as análises anteriores.

2.2.4 Regiões de 16 S e 12 S

Para as análises filogenéticas de taxa distantes, os marcadores mais convenientes são aqueles que codificam as regiões 16S e 12S do RNA ribossômico, os quais são sequências que em sua grande extensão se mantêm conservadas. Ambas as regiões são responsáveis por codificarem RNAs ribossômicos necessários para a tradução de RNA mensageiros de proteínas mitocondriais. Tais análises são importantes principalmente quando se pretende solucionar a relação filogenética entre grupos que a priori não foram identificadas (YANG et al., 2014).

Pesquisa utilizando 21 táxons do gênero *Panulirus* para análises filogenética foram investigados com dados de sequência de nucleotídicas parciais de porções de

dois genes mitocondriais, 28 RNA ribossomal grande subunidade (16S rRNA) buscando fornecer evidências moleculares (NAYAK et al., 2012).

Estudos realizados através de sequências nucleotídicas da região 16S do mtDNA, também foram utilizadas na espécie *Panulirus echinatus*, nesta pesquisa obtiveram resultados que identificaram as larvas como sendo *P. echinatus*, e junto com a observação morfológicas, e de acordo com os resultados da árvore filogenética molecular com outras espécies do mesmo gênero (KONISHI; SUZUKI; CHOW, 2006).

2.3 Marcadores nucleares

Frente aos avanços obtidos pelas técnicas de sequenciamento, não se pode deixar de comentar a importância do uso dos marcadores referentes às sequências presentes no genoma nuclear na identificação de espécies.

2.3.1 Microsatélites

São Trechos de DNA que consistem em unidades curtas repetidas, mais conhecidas como microsatélites, têm sido amplamente utilizados como marcadores moleculares, são conhecidos por SSR (*Simple Sequence Repeats*), STRs (*Short Tandem Repeats*) e VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) são úteis 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).

Os Microsatélites possuem características altamente polimórficos e podem ocorrer em áreas codificadoras e nas não codificadoras do DNA. (ELLEGREN, 2004). Os Marcadores Microsatelites, conhecido como ISSR (repetição de sequência simples), têm sido utilizada em pesquisas de várias espécies devido à seu elevado nível de polimorfismo e reprodutibilidade (PANARARI, 2006).

Os ISSRS vêm se mostrando bastante proveitoso em estudos de estrutura genética de populações e reconstrução filogenética em vários organismos (LUQUE et al 2001).

Em pesquisas (MAIA; TORRES, 2016). com *Cardisoma guanhumi*, o marcador ISSR demonstrou ser eficiente, demonstrando devido a capacidade de identificar as diferenças genéticas entre populações. Recentemente, foi observada elevada diversidade genética em *C. guanhumi*, tendo como maior registro, a

alteração 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, procedentes de cinco estuários do Litoral Norte, Central e Sul do estado de Pernambuco, Brasil.

Dentre as vantagens que tornaram esses marcadores amplamente utilizados, podem-se destacar a alta frequência e a distribuição ao acaso nos genomas eucariotos, além de serem co-dominantes e multialélicos, fornecendo um elevado nível de informação genética por loco. A técnica de SSR é de fácil execução e altamente reproduzível, quando comparada com outras metodologias, favorecendo o intercâmbio de informações entre diferentes grupos de pesquisa (ZIETKIEWICZ et al, 1994).

Considerado o avanço para a obtenção de dados quanto a caracterização do caranguejo do mangue, Brito et al, (2009) desenharam os primeiros microssatélites para essa espécie onde podem ser utilizados para discriminação genética de populações.

Britto et al, (2011) utilizou o marcador *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) para avaliar a eficiência desse marcador em estudo populacional do *U. cordatus*.

3 Taxonomia Molecular e Filogenética

O advento da taxonomia molecular foi acompanhado de um fenômeno mundialmente conhecido como “impedimento taxonômico”. Entre os pesquisadores havia uma controvérsia que esse fenômeno reduziria o número de taxonomistas e de publicações em taxonomia nas últimas décadas (HOPKINS; FRECKLETON, 2002). No entanto, outros defendem que os investimentos destinados à taxonomia tradicional estão sendo redirecionados para pesquisas com taxonomia molecular. Porém, mesmo o número de taxonomistas sendo satisfatório no Brasil, pelo menos para alguns grupos taxonômicos Carvalho et al. (2005), está cada vez mais difícil publicar descrições de espécies baseadas exclusivamente em dados morfológicos no mundo todo. Este fato deve ter sido ocasionado por dois motivos: (1) o número de periódicos da área que aceita descrição taxonômica tradicional tem diminuído nos últimos anos; e (2) devido o aumento da ideia de que descrições de táxons baseadas exclusivamente em dados morfológicos podem gerar dubiedades taxonômicas na determinação das espécies. Embora haja essas diferenças entre taxonomistas tradicionalistas e taxonomistas moleculares, parece mais provável que

o uso conjunto de dados genéticos e morfológicos pode contribuir muito mais para a taxonomia animal (LEMEY, et al., 2009) do que simplesmente adotar um ou outro método de forma isolada, já que ambas, morfologia e genética, são complementares e constituem fontes independentes de evidência.

O estudo filogenético de sequências de DNA é uma ferramenta muito relevante na pesquisa da história evolutiva dos organismos. As análises filogenéticas são importantes também para elucidar os padrões evolutivos de uma variedade gênica e para compreender os processos da evolução adaptativa em um nível molecular. A reconstrução de árvores filogenéticas mediante o uso de métodos estatísticos teve início, de forma independente, na taxonomia numérica com dados morfológicos e na genética de populações com dados de frequência gênica (NEI; KUMAR, 2000). As árvores filogenéticas são representações gráficas que mostram as conexões evolutivas entre organismos e são construídas a partir de uma matriz contendo os dados disponíveis (morfológicos, taxonômico ou genéticos) sobre os táxons pesquisados.

A filogenia inclui o uso de dados moleculares em taxonomia e biogeografia. Estes dados estudados são comparados e os táxons agrupados pelas semelhanças e diferenças entre si em clados. Podendo ser apresentado de várias formas ((PAGE et al., 1998) cladogramas, os quais demonstram qual o ancestral mais próximo; filogramas, que mostram o número de substituições que ocorreram por meio de um coeficiente de similaridade; e ultramétricas, que podem ser usadas para representar o tempo da evolução corretamente

O sequenciamento de DNA passou a ser uma ferramenta muito importante para estudos de taxonomia e filogenia do laboratório. O trabalho de (BUENO-SILVA, et al. 2012) constitui um exemplo de como é possível aliar dados morfológicos e genéticos para entender os processos evolutivos e ajudar de limitação de espécie.

Com base nos estudos filogenéticos com o gênero *Aegla Leach* foram descritas pelo menos seis novas espécies (BOND-BUCKUP et al., 2008). Outra pesquisa bastante significativa foi o realizado por Dudu et al. (2011) uma vez que permitiu verificar o enquadramento filogenético dos peixes salmonídeos Romenos em relação à família Salmonidae.

4 Diversidade Genética

A diversidade genética é a variação que existe entre os indivíduos em termos de combinação do DNA. Refere-se à variação na composição da informação genética ou unidades hereditárias (genes) contidas em todas as espécies vivas. Esta diversidade compreende não apenas as espécies como tal, mas também as populações de indivíduos de uma mesma espécie, as quais compartilham características semelhantes. A diversidade genética é fundamental para a manutenção da vida e para a evolução das espécies, pois quanto mais heterogênea for uma população na sua constituição genética, mais eficiente será na resposta às espécies ameaçadas de extinção, tendo assim uma grande relevância, (FRANKHAM et al., 2008). O êxito de um processo de conservação e manejo, será conseguido se efetivamente durante o estudo, se obtiver a compreensão da variação genética da espécie em estudo.

A compreensão do estado do fluxo gênico da diversidade genética e tamanho efetivo da população são a base de sustentação de planejamento de conservação (FRANKHAM et al, 2008). Espécies como larvas pelágicas marinhas geralmente possuem pouca identificação genética devido ao alto grau de fluxo gênico. Entretanto, estudos com alguns crustáceos braquiuros tem mostrado graus de estruturação que variam de baixo a intermediário ou alto, (OLIVEIRA-NETO et al., 2007a, 2008; ROMAN, PALUMBI, 2004).

Com o aumento do número de ferramentas para o estudo sobre variabilidade genética tem revelado uma grande variedade de padrões de fluxo gênico (OLIVEIRA-NETO et al., 2007b) e estudos sobre variabilidade intraespecífica têm permitido o refinamento do *status* taxonômico de algumas espécies (MCLAY et al., 2011; NEGRI et al., 2012; TOURINHO et al., 2012).

5 Genética de População Marinha

A estabilidade de uma diversidade biológica aquático faz necessário o conhecimento de variáveis fisiológicas, comportamentais e ecológicas, que são importantes na determinação de como uma dada população sobrevive e se reproduz em diferentes ambientes (DANZMANN et al, 1991). A compreensão da base genética populacional de uma determinada espécie é muito importante neste processo, pois permite conhecer as diferenças genéticas geradas por processos de

fragmentação e suas relações com as diferenças adaptativas das populações (AVISE, 1994).

A diversidade dos recursos genéticos aquáticos, pode ser interpretada pelo conjunto da diversidade de espécies e pela própria diversidade genética, dentro e entre espécies, sendo um fator importante da biodiversidade como um todo.

De forma geral, as preocupações e ações referentes aos impactos sobre a biodiversidade nos ecossistemas aquáticos estão muito mais relacionadas à percepção do desaparecimento de uma dada espécie do que à diminuição da diversidade genética de uma espécie. O empobrecimento da variabilidade genética dentro e entre populações pode ser o fator responsável pela sobrevivência da espécie, dentro de um prazo médio ou longo. A capacidade de uma espécie de se adaptar às variações constantes do meio ambiente dependerá em grande parte do nível de diversidade genética encontrada na mesma (SOLÉ-CAVA, 2001).

A genética da preservação corresponde ao conjunto de estudos genéticos que buscam compreender os processos populacionais e evolutivos presentes em populações sob o risco de ameaça. O estudo de preservação e conservação está baseado em estudos populacionais marinhos, estes fazem uma interpelação mais específica, quanto ao uso de ferramentas moleculares em estudos de diversidade, estruturação, filogenia e conservação genética, em diferentes espécies de caranguejos (AVISE, 2010).

Sendo assim as ferramentas moleculares acessam o nível informações do DNA como a diversidade genética, que revelam por meio de análises estatísticas a estruturação das populações, inclusive, as de diferentes regiões geográficas distintas, e assim, esclarecem o histórico evolutivo e a dinâmica populacional das espécies marinhas (CABALLERO et al., 2010).

Existem algumas pesquisas com o uso de ferramentas moleculares como exemplo 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). Essas pesquisas revelam a importância dos estudos na área de genética molecular para a população marinha.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; ALEXANDER, J, LEWIS.; RAFF,M.; KEITH,R.;WALTER.P. Molecular Biology of the Cell.. 5th edition. **Garland Science**: New York. 2008.

ALVES, D.A.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; WENSELEERS, T. first Discovery of a rare polygyne colony in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Apidaem Meliponini). **Apidologie**, v.42, p.211-213, 2011.

ABRUNHOSA, F. A.; SILVA NETO, A. A.; MELO,M. A.; CARVALHO, L. O. Importância da alimentação e do alimento no primeiro estágio larval de *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763)(Decapoda: Ocypodidae), **Revista Ciência Agrônômica**, v. 33, n. 2, p. 5 – 12. 2002.

ALCÂNTARA-FILHO, P.. Contribuição ao estudo da biologia e ecologia do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Brachyura), no manguezal do rio Ceará (Brasil). **Arquivo de ciências do Mar, UFC**, 18 (1/2): 1-41, 1978

AVISE, J. C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. **Conservation Genetics**. v. 11, p. 665–669, 2010.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history e evolution**. New York: Chapman e Hall, Inc. 511p. 5ª edição. Garland science, New York. 1725pp, 1994.

AMARAL, M. R. X. **Estudo da estrutura genética populacional do caranguejo guaíamum, *Cardisoma guanhumi*, através da região controle do DNAm**. 91p. Dissertação (Mestrado/Genética e Melhoramento) – UFPI, Teresina, Piauí, 2015.

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.

ALVES, M. I. M. & MADEIRA JUNIOR, P. H. Algumas considerações sobre a respiração do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustácea: Decapoda). **Arq. Ciên. Mar**, Fortaleza, v.20 (1/2), p.63 – 69. 1980.

ANDREWS, R.M. *et al.* Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. **Nature Genetics**, v.23, 1999.

ANDERSON, S.; BANKIER, A.T.; BARRELL, B. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, v. 290, p. 457-465, 1981.

BLANKENSTEYN, A.; CUNHA FILHO, D.; FREIRE, A..S. - Distribuição, estoque pesqueiro, e conteúdo protéico do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)(BRACHYURA, OCYPODIDAE) nos manguezais da Baía de Laranjeiras, Paraná, Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 40(2):331-349, Curitiba, PR, Brasil,1997.

BOLZAN, A. R. DNA *barcode* de *Drosophilídeos micófagos* pertencentes ao gênero *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila*. *Zigothrica*. Universidade Federal da Santa Maria. Santa Maria, Brasil 2011.

BOND-BUCKUP, G. Global diversity of crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 267–273, 2008.

BRIGHT, D. B.; HOGUE, C. L. **A synopsis of the burrowing land crabs of the world and list of their arthropod symbionts and burrow associates**, Los Angeles – USA: Natural History Museum, n° 220, 1972.

BRITTO, F. B. et al. Polymorphic microsatellite DNA markers in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). **Molecular Ecology Resources**.v.9, n. 4, p. 1249-52, 2009.

BRITTO F.B..Single primer-based DNA amplification as a suitable and low-cost tool for assessing genetic diversity in mangrove crabs. **Genetics and Molecular Research**. v. 10, n. 4, p. 4084-4092, 2011.

BRANCO, J. O. Aspectos bioecológicos do caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda) do manguezal do Itacorubi, Santa Catarina, Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, n. 1, p. 133-148. 1993.

BUTLER, J.M. Mitochondrial DNA analysis In:____Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. 2.ed. Elsevier, Capítulo 10, p.376-389, 2010.

BOORE J.L Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Res** 27:1767–1780, 1999.

BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudos de Biologia Ambiente e Diversidade**, v. 34, n. 83, p. 157-163, 2012.

]

BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, p., 1979.

BUDOWLE, B. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. **Annu Genomics Hum Genet.**, v.4, p.119-141, 2003.

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**, 13:77-96. 29, 2005.

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

BANDELT, H. J.; KONG, Q. P.; RICHARDS, M.; MACAULAY, V. Estimation of mutation rates and coalescence times: some caveats. In: BANDELT, H. J.; MACAULAY, V.; RICHARDS, M. Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens. **Berlin: Springer-Verlag.** p. 47–90, 2006.

CANESTRI, V.; RIUZ, O. Destruction of mangroves. **Marine Pollution Bulletin.** v. 4, p. 83-185, 1973.

CHOW, S.; SUZUKI, N.; IMAI, H.; Molecular species identification of spiny lobster phyllosoma larvae of the genus *Panulirus* from the northwestern Pacific. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 260–267, 2006.

(CARAVELAS – BAHIA). **Boletim Técnico-Científico do CEPENE**, Tamandaré - PE - v. 17, n. 1, p. 65-75, 2009.

CARVALHO, M. R.; BOCKMANN, F. A.; AMORIM, D. S.; VIVO, M.; TOLEDO-PIZA, M.; MENEZES, N. A. Revisiting the taxonomic impediment. **Science**, 307(5708), 353. doi:10.1126/science.307.5708.353b. 2005.

CUROLE, J.P.; KOCHER, T. D. **Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes.** Trends Ecol Evol 14:394-398. (1999)

CASTILHO, G. G. **Aspectos reprodutivos do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), na Baía de Antonina, Paraná, Brasil.** Curitiba, 2006. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

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.

CHRISTOFOLETTI, R. A. **Ecologia trófica do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Ocypodidae) e o fluxo de nutrientes em bosques de mangue, na região de Iguape (SP)**. São Paulo, 2005. 127f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

COSTA, R. S. Bioecologia do Caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) – Crustáceo, Decápode – no nordeste brasileiro. **Boletim Cearense de Agronomia**, v. 20, p. 1-74. 1979.

DANZMANN, R.G.; IHSSSEN, P.E.; HERBERT, P.D.N. Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook char, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), in Ontario using mitochondrial DNA analysis. **Journal of Fish Biology**, v. 39 (A), p. 69-77,1991

DIELE, K. 2000. Life history and population structure of the exploited mangrove crab *Ucides cordatus cordatus* (L.) (Decapoda: Brachyura) in the Caeté estuary, North Brazil. **Zentrum für Marine Tropenökologie – ZMT. Bremen**, 130 p., 2000.

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, Northn Brazil: Indications for overfishing? **Aquatic Living Resources**, 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.

DRUMMOND A.J.; RAMBAUT. A BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evol Biol.** 7:214. .2007.

ELLEGREN, H. Microsatellit es: simple sequence with complex evolution. **Nature**, v. 5: p. 438-445, 2004.

FEMAR. Fundação de Estudos do Mar. Manguezais educar para proteger Rio de Janeiro. SEMADS 96 p. 2001.

FARIAS, I. P. The cyt-b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analysing relationships among cichlid fishes. **Journal of Molecular Evolution** v. 53, p. 89-103, 2003.

FERNANDES, M. E. B.; OLIVEIRA, F.P.; SILVA, L.L. & TAKAYUKI, T. A recuperação de áreas degradadas de manguezal no contexto sócio-ambiental. In: Ensino, Pesquisa e Extensão: reflexões e práticas científico-acadêmicas. (Simões, M.S. org.), Gráfica da UFPA, Belém, pp. 39-52. 2010.

FRANKHAM R, BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. Fundamentos da Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética. 262pp.2008.

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.

GÓES, P.; SAMPAIO, F. D. F; CARMO, T. M. S.; TOSO, G. C; LEAL, M. S. Comportamento e período reprodutivo do caranguejo do mangue *Ucides cordatus*. **Anais do V Simpósio de Ecossistemas Brasileiros: Conservação**, Universidade Federal do Espírito Santo, v. 2, p. 335-345. 2000.

GARCIA DE GERALDES, M.; BONNELLI DE CALVENTI, I. Experimental surveys on the maintenance in of *Ucides cordatus*. **Ciencia Interamericana**, v. 23, n. 1-4, p. 41-53. 1983.

GAMA-MAIA DJ.; TORRES R.A. Fine scale genetic-structuring, divergent selection, and conservation prospects for the overexploited crab *Cardisoma ganhumi* in tropical mangroves from Northeastern Brazil. **J Mar Biol Assoc UK** (In Press),2016. 249. doi:org/10.1017/S1367943002002299,2002.

GLASER, M. e DIELE, K. Asymmetric outcomes: assessing central aspects of the biological, economic and social sustainability of a mangrove crab fishery, *Ucides cordatus* (Ocypodidae), in North Brazil. **Ecological Economics**, 49: 361-373. 2004.

HATTORI, G. Y.; PINHEIRO, M. Fertilidade do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), em Iguape (São Paulo, Brasil). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 2, p. 309-313. 2003

HATTORI, G. Y. **Densidade populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), na Região de Iguape**

(SP). São Paulo, 146f. Tese (Doutorado em Zootecnia - Produção Animal), Faculdade, 2006.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Biological Sciences Society of London, Series B* 270:313–322, . 2003a..

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWARD, J. R.. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* 270:96–99. 2003b.

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

HERZ, R. **Manguezais do Brasil**. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. São Paulo. 227p, 1991.

HOPKINS, G. W.; FRECKLETON, R. P. Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: Implications for conservation. *Animal Conservation*, 5, 245- de Ciências Agrárias e Veterinárias –UNESP, Campus de Jaboticabal.2009

IZENI, P. FARIAS.; GUILLERMO, O.; IRACILDA, S.; HORACIO, S.; AXEL, M. The Cytochrome *b* Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. **J Mol Evol**. 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Lagosta, Caranguejo-Uçá e Camarão-do-Nordeste**. Coleção Meio Ambiente. Série Estudos de Pesca, IBAMA/Brasília, v. 10,190 p, 1994.

JUNQUEIRA L.C.U; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 332p. 2005.

KOCH, V. **Epibenthic production and energy flow in the Caeté mangrove estuary, North Brazil**. ZMT Contribution 6, Bremen, 97p., 1999.

KONISHI, K.; SUZUKI, N.; CHOW, S. A late-stage phyllosoma larva of the spiny lobster *Panulirus echinatus* Smith, 1869 (Crustacea: Palinuridae) identified by DNA analysis. **Journal of Plankton Research**, v. 28, n. 9, p. 841–845, 2006.

LACERDA, L. D.; CONDE, J. E.; KJERFE, B.; ALVAREZ-LEON, R.; ALARCÓN, C.; LUTZ-BENENEGEL, S.. Sequence polymorphisms with the human mitochondrial genes MTATP6, MTATP8 e MTND4. **Int J Legal Med.**, v.177, p.133-142, 2003.

LEMEY, P., Salemi, M.; Vandamme, A.,M. **The Phylogenetic Handbook. A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing** (2nd ed.). New York: Cambridge University Press, 2009.

LUQUE C.; LEGAL L.; STAUDTER H.; GERS C.; WINK M. Brief report ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in **Noctuids** (Lepidoptera). *Hereditas* 136: 251-253. 2001.

MAIA, D. J. G.; TORRES, R. A. Fine-scale genetic structuring, divergent selection, and conservation prospects for the overexploited crab (*Cardisoma guanhum*) 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**. São Paulo: Editora Plêiade, 1996.

MEYER, A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. **Trends in Ecology & Evolution** 9(8):278–280. 1994.

MONTEIRO, B.R.; COELHO-FILHO, P.A. - Estrutura populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae), no estuário do Rio Paripe, Itamaracá - Pernambuco. **Boletim Técnico-Científico do CEPENE** (ISSN: 0104– 6411), 12(2):101-114, Tamandaré, PE, Brasil,,2004.

MCLAY, C.L.; Hinnendael, F.; Lavery, S.; Riquelme-Bugueño, R. Morphological and molecular comparison of *Hemigrapsus crenulatus* (Milne Edwards, 1837) (Brachyura: Varunidae) from New Zealand and Chile: was miss Rathbun right? **Journal of Crustacean Biology**, 31(4): 582-589, 2011.

NAYAK, S.; UMADEVI, K. In silico comparative molecular phylogeny of mitochondrial 16s rna and coi genes of the spiny lobster genus *Panulirus* (Decapoda : Palinuridae). v. 3, n. 3, p. 364–373, 2012.

NORDHAUS, I. **Feeding ecology of the semiterrestrial crab *U. cordatus* (Decapoda: Brachyura) in a mangrove forest in northern Brazil**. Bremen, 2003. 217f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Zentrum für Marine Tropenökologie, Universität Bremen.

NORDHAUS, I.; WOLFF, M. Feeding ecology of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae): food choice, food quality and assimilation efficiency. **Marine Biology**, v. 151, n. 5, 07p. 1665-1681, 2007.

NASCIMENTO, S. A. C. **Estudos bioecológicos do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus***. 1984

NEGRI, M.; PILEGGI, L.G.;MANTELATTO,F.L. Molecular barcode and morphological analyses reveal the taxonomic and biogeographic status of the striped-legged hermit crab species *Clibanarius scolopetarius* (Herbst, 1796) and *Clibanarius vittatus* (Bosc, 1802) (Decapoda: Diogenidae). **Invertebrates Systematics**, 26: 561-571, 2012.

NG, P.K.L. Systema Brachyurorum: Part I. Na Annotated Checklist of Extant Brachyuran Crabs of The World. **The Raffles Bulletin of Zoology** 17: 1- 286. 2008.

NOBBS, M.; MCGUINESS, K. A. Developing methods for quantifying the apparent abundance of fiddler crabs (Ocypodidae: *Uca*) in mangrove habitats. **Australian Journal of Ecology**, 24: 43-49, 1999.

NASCIMENTO, S.A. **Biologia do caranguejo-uçá *Ucides cordatus***. ADEMA, 48p. 1993

NEI M E KUMAR S .Molecular Evolution and Phylogenetics. 1ª edição, Oxford University Press, New York, 333pp. 2000

OLIVEIRA, D. A. F. **Distribuição espacial do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae)**, São Vicente-SP, 2005.

OLIVATTI, A.M.; BONI, T.A.; SILVA-JUNIOR, N.J.; RESENDE, L.V.; GOUVEIA, F.O. TELLES, M.P.C. Heterologous amplification and characterization of microsatellite markers in the Neotropical fish *Leporinus friderici*. **Genetics and Molecular Research**, v.10, n.3, p.1403-1408, 2011.

OLIVEIRA-NETO, J. F.; PIE, M. R.; BOEGER, W. A.; OSTRENSKY, A. Population genetics and evolutionary demography of *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). **Marine Ecology**, v. 28. p, 460-469, 2007.

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*, 583, 69-76. DOI 10.1007/s10750. 2007.

OSTRENSKY, A.; STERNHAIN, U.S.; BRUN, E. ; WEGBECKER, F.X.;PESTANA, D. Análise da viabilidade técnico - econômica dos cultivos do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) no litoral paranaense. **Arq.Biol. Tecnol.**, v. 38, n. 3, p. 939-947, 1995.

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, p. 1417–1423, 2008.

ORREGO, L.E.O. **Análise filogeográfica de *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae)**. Universidade Estadual Paulista. Botucatu Brasil.2012.

PANARARI, R.S. **Variabilidade Genética, Evidenciada por Marcadores Nucleares e do Genoma Mitocondrial, de Espécies do Gênero *Brycon* (Cbaraciformes: Cbaracidae)** de Tres Bacias Hidrográficas. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 79pp. 2006.

PINHEIRO, M. A. A.; HATTORI, G. Y. Embryology of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 23, n. 3, p. 729-737, 2003.

PINHEIRO, M. A.; FISCARELLI, A. G. **Manual de Apoio à Fiscalização do Caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*)**. CEPISUL. Itajaí (Santa Catarina). 43p. . 2001
PINHEIRO, M. A. A.; FISCARELLI, A. G.; HATTORI, G. Y. Growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 25, n. 2, p. 293-301. 2005.

PAIVA, M.P. **Recursos pesqueiros estuarinos e marinhos do Brasil**.Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, v.1, 278 p.,1997.

PINHEIRO, M. A. A.; FISCARELLI, A. G.; HATTORI, G. Y. Growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (BRACHYURA, OCYPODIDAE). **Journal of crustacean biology**, **25(2)**:293–301, 2005.

PINHEIRO, M. A. A.; HATTORI, G. Y. Relative Growth of the Mangrove Crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) at Iguape, São Paulo, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology – an International Journal**, v.49, n. 5, p. 813-823. 2006.

PINHEIRO, M.A.A., FISCARELLI, A.C. **Manual de apoio a fiscalização do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*)**. UNESP/CEPSUL/IBAMA. 43 p. 2001.

PETER, K. L. NG; GUINOT, DANIELÉ.; PETER, J. F. D.. **Sistema Brachyrorum: Part I. Na annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world.** The Raffles Bulletin of Zoology 17: 1-286, 2008.

PIOU, C.; BERGER, U.; HILDENBRANDT, H.; GRIMM, V.; DIELE, K.; D'LIMA, C. Simulating cryptic movements of a mangrove crab: Recovery phenomena after small scale fishery. **Ecological Modelling**, v. 205, n. 1, p.110–122. 2007.

PIE, M. R.; OLIVEIRA-NETO, J. F.; BOEGER, A. W.; OSTRENSKY, A.; GAGGIO, R. A. The Organization 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.

PAGE, R.D.M.; HOLMES, E.C. **Molecular evolution: a Phylogenetic Approach.** Oxford: Blackwell Science Ltd.,352p., 1998.

PEREIRA FILHO, O.; ALVES, J. R. P. Conhecendo o manguezal. **Apostila técnica, Grupo Mundo da Lama.** Rio de Janeiro: 4ª ed., 1999.

PANETO, G.C *et al.* Heteroplasmy in hair: study of mitochondrial DNA third hypervariable region in hair and blood samples. **J Forensic Sci.**, v.55, n.3, p.715-718, maio.2010.

RAMOS, S. **Manguezais da Bahia – Breves considerações.** Ilhéus – Bahia. Editus.103p. 2002.

ROMAN, J.; PALUMBI, S.R. A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. **Molecular Ecology**. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02255.x.. 2004.

SHIH, H.-T., J.H. LEE.; P.-H.; HO, H..C.; LIU, C.H.; Wang, H.; Suzuki, S.J. Teng Species diversity of fiddler crabs, genus *Uca* Leach, 1814 (Crustacea: Ocypodidae), from Taiwan and adjacent islands, with notes on the Japanese species. **Zootaxa** 4083(1):57–82, 2016.

SANTOS, M. A. C.; COELHO, P. A.. Crustáceos decápodos estuarinos do Nordeste do Brasil. In: **Mangrove, sustainable use of estuaries and mangroves: Challenges and prospects**; 22 a 28 maio 2000, Recife –Brasil. 2000.

SILVA, U.A.T. **Cultivos experimentais de caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1673).** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 89 p., 2002.

SOUTO FJB. Uma abordagem etnoecológica da pesca do caranguejo, *Ucides cordatus*, Linnaeus, 1763 (Decapoda: Brachyura), no manguezal do Distrito de Acupe (Santo Amaro-BA). **Biotemas** 20(1): 69-80. 2007.

SCHMIDT, A. J.; ARAÚJO, S. M. B.; SOUZA, E. P.; MAY, M.; OLIVEIRA, M. A.; TARARAM, A. S. O papel dos apicuns na dinâmica populacional do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus cordatus*) em manguezais de Canavieiras – BA. **Anais do II Congresso Brasileiro de Oceanografia**, Vitória –ES. 2005.

SCHORIES, D.; BARLETTA-BERGAN, A.; BARLETTA, M.; KRUMME, U.; MEHLIG, U.; RADEMAKER, V. The keystone role of leafremoving crabs in mangrove forests of North Brazil. **Wetlands Ecology and Management**, v. 11, p. 243–255. 2003.

SCHMID, H.; HAESLER, V. A Phylogenetic inference using maximum likelihood methods. In Lemey P, Salemi M, Vandamme AM (eds) **The Phylogenetic Handbook**. Second Edition. pp181-207. 2009.

STEVČIĆ Z. The reclassification of **brachyuran crabs** (Crustacea: Nat. Decapoda: **Brachyura**). Croat., Vol. 14, Suppl. 1, 1–159, 2005.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In MATIOLI, S.R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**, Ribeirão Preto: Holos Editora, p.172-192. 2001.

SKOV, M.W.; J.P. VANNIN, R.G.; SHUNNULA; R.G. HARTNOLL; CANNICH, S. Quantifying the density of mangrove crabs: Ocypodidae and Grapsidae. *Marine Biology* 141: 725-732. 2002.

TOURINHO, J.L.; SOLÉ-CAVA, A.M. ; C. LAZOSKI. Cryptic species within the commercially most important lobster in the tropical Atlantic, the spiny lobster *Panulirus argus*. **Marine Biology**, 159: 1897-1906, 2012.

VANECEK, T.; VOREL, F.; SIP, M. Mitochondrial DNA D-loop hypervariable regions: Czech population data. *Int. J. Legal Med.*, v. 118, p. 14-18, 2004.

VANNUCCI, M. Os manguezais e nós. Uma síntese de percepções. Editora da Universidade de São Paulo. 1 244p, 2003.

VIANA, L. A. **Estrutura genética e demográfica do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) na costa do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2013.

VIEIRA, R.H.S.F.; LIMA, E.A.; SOUSA, D.B.R.; REIS, E.F.; COSTA, R.G., RODRIGUES. D.P. *Vibrio spp.* and *Salmonella spp.*, presence and susceptibility in crab *Ucides cordatus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 46 (4): 179-182. (2004).

WALLACE, D. C.; YE, J.; NECKELMANN, S. N. Sequence Analysis of cDNAs for the Human and Bovine ATP Synthase Beta Subunit: Mitochondrial Genes Sustain Seventeen Times more Mutations. *Current Genetics*, v. 12, p. 81-90, 1987.

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.

WILL, K. W.; MISHLER, B. D.; WHEELER, Q. D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 844-851. 2005.

WOLFF, M.; KOCH, V.; ISAAC, V.A. Trophic flow model of the Caeté mangrove Estuary (North Brazil) with considerations for the sustainable use of its Resources *Estuar. CoastShelf Sci.*, v. 50, p. 789-803, 2000.

WEBER, L.I.; LEVY, J.A.. Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. *Hydrobiologia*, 420(1), 203-210. 2000.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (Ed.). *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*. Boston: Kluwer,. p.43-86. 1998.

ZIETKIEWICZ,E.; RAFALSKI, A.; LABUIJA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomies*, v.20, n.2, p.176-183, Mar. 1994.

CAPÍTULO II

**Região controle do DNA mitocondrial em *Ucides cordatus*, (Linnaeus, 1763), :
Estrutura, marcadores moleculares e potencial como marcador em estudos de
genética populacional**

Resumo

O caranguejo-uçá é uma das espécies mais importantes que compõe a fauna dos manguezais brasileiros, ocorrendo em abundância variada em toda a extensão da costa do Brasil, desde o Amapá até Santa Catarina. No Nordeste brasileiro este crustáceo representa um dos mais importantes recursos dos manguezais da região, não só pelo volume das capturas como pelo seu elevado valor comercial. O desenho e validação de *primers* de PCR para amplificar uma parte do mtDNA de *Brachyura* e detectar polimorfismos da região controle, torna-se assim fundamental para obtenção de informações da variabilidade genética e estruturação de suas populações no intuito da conservação da espécie, bem como o fornecimento de dados de grande importância para formulação de medidas de gestão que visem a exploração sustentável deste recurso. A região controle do DNA mitocondrial é um excelente marcador populacional em estudos genéticos, mas pouco se sabe sobre a estrutura e a evolução desta região mitocondrial para os decapodes. O objetivo deste estudo foi desenvolver um marcador genético altamente polimórfico e explorar o potencial de utilização dos domínios hipervariáveis 5'- e 3'- terminais da região controle do mtDNA como marcadores genéticos para avaliar a variabilidade genética do caranguejo de mangue *Ucides cordatus*. As regiões hipervariáveis foram amplificadas com sucesso, HV1 (637 pb) e HV2 (445 pb). A RC do mtDNA em *U. cordatus* mostrou ser altamente polimórficas em suas extremidades 5' e 3'. O padrão de substituição de nucleotídeos foi a favor de transições sobre transversões. Transições foram fortemente correlacionadas com as distâncias genéticas, e, pelo menos, 94,5% (HV1), 93,8% (HV2), 94,6% (RC) da variação em transições podem ser mostrada por regressão linear. A análise de saturação de substituição mostrou um ISS (0,067 para HV1; 0,046 para HV2; 0,051 para RC) muito menor do que o valor ISS.C crítico (0,706 para HV1; 0,689 para HV2; 0,730 para RC), indicando que as sequências são muito úteis na reconstrução filogenética. Média haplotípica e diversidade de nucleotídeos foram, respectivamente, 0,988 para todos os domínios e a RC, e 4,5% para HV1, 2,8% para HV2, e de 3,4% para toda a RC. A análise de variância molecular (AMOVA) revelaram estimativas mais elevadas para HV1 (0,0461) do que para HV2 (0,0457) e toda a RC (0,0451). Para HV1, maior parte da variação (95,4%) foi encontrada dentro das populações. Dois haplogrupos distintos foram encontrados pela análise bayesiana de estrutura populacional (BAPS) para ambos HV1 e RC. No geral, os resultados indicaram que a adição, nas análises, do seguimento final da região de controle (HV2) não irá contribuir de forma significativa para caracterização das populações. Os resultados sugerem que o uso da região HV1 fornece uma melhor estimativa da diversidade genética da população de base, e isto pode ser visto como um modelo para as outras espécies de braquiúros em estudos genéticos de população.

Palavras-chave: *primers*, genoma mitocondrial, polimorfismo, hipervariável

Abstract

The uçá crab is one of the most important species that make up the Brazilian mangrove fauna, occurring in varied abundance along the entire coast of Brazil, from the state of Amapá to the state of Santa Catarina. In the Northeast of Brazil, this crustacean represents one of the most important mangrove resources in the region, not only because of the volume of catches but also because of its high commercial value. The mitochondrial DNA control region is an excellent population marker in genetic studies, but little is known about the structure and evolution of this mitochondrial region in decapods. The design and validation of PCR primers to amplify part of the *Brachyura* *mtDNA* and to detect polymorphisms of the control region, thus becomes fundamental to obtain information of the genetic variability and structuring of its populations in order to the conservation of the species, as well as the provision of data of great importance for the formulation of management measures aimed at the sustainable exploitation of this resource. Thus, this study was aimed to design primers (oligonucleotides) based on sequences from the mitochondrial genome of other species of mangrove crabs in order to develop a highly polymorphic genetic marker based on the mitochondrial genome for population genetic studies. The hypervariable regions were also successfully amplified, HV1 (637 bp) and HV2 (445 bp). The *mtDNA* CR in *U. cordatus* was found to be highly polymorphic at its 5'- and 3'-ends. The pattern of nucleotide substitution was biased in favor of transitions over transversions. Transitions were strongly correlated with genetic distances, and at least 94.5% (HV1), 93.8% (HV2), 94.6% (CR) of the variation in transitions can be explained by a linear regression. The substitution saturation analysis showed an ISS (0.067 for HV1; 0.046 for HV2; 0.051 for CR) much smaller than the critical ISS.C value (0.706 for HV1; 0.689 for HV2; 0.730 for CR), indicating that sequences are highly useful in phylogenetic reconstruction. Average haplotype and nucleotide diversity were respectively 0.988 for all domains and the *mtDNA* CR, and 4.5% for HV1, 2.8% for HV2, and 3.4% for the entire CR. The analysis of molecular variance (AMOVA) revealed higher estimates for HV1 (0.0461) than for HV2 (0.0457) and the entire CR (0.0451). For HV1 most of the variation (95.4 %) was found within populations. Two distinct haplogroups were resolved through a Bayesian analysis of population structure (BAPS) to both HV1 and CR. Overall, results indicated that the addition of the remaining control region segment (HV2) does not contribute significantly in further characterizing populations. Likewise, the use of HV2 to estimate population based genetic diversity has in fact decreased performance of the analysis. The results suggest that the use of the HV1 region provides a better estimate of the genetic diversity of the base population, and this can be seen as a model for the other species of brachii in population genetic studies.

Keywords: primers, mitochondrial genome, polymorphism, hypervariable

1 Introdução

O conhecimento da variabilidade e estrutura genética populacional é fundamental para os programas de conservação de espécies em situação de risco, por exemplo, sob excessiva exploração pesqueira (MACHUGH et al., 1994). Alterações no habitat natural pelas atividades do homem tais como a exploração desordenada deste recurso, podem levar a um declínio da população, em termos de abundância, e a uma eventual perda do estoque (AVISE, HAMRICK, 1996). Organismos com diferentes ciclos de vida e padrões de estrutura populacional podem ser afetados por distúrbios no habitat de diferentes maneiras. Por exemplo, espécies naturais que migram e com diferentes ciclos de vida podem se tornar fragmentadas em populações isoladas ocasionando também a perda da variabilidade genética. Inversamente, espécies caracterizadas por uma migração limitada e/ou um comportamento de movimentação restrita à área de origem podem sofrer adaptações genéticas e ecológicas frente à região habitada (AVISE;HAMRICK, 1996).

A captura intensa de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) no Nordeste brasileiro pode levar à redução de estoques únicos, os quais estão geneticamente adaptados a um ambiente específico. O resultado é a perda na variabilidade genética e no potencial adaptativo da espécie. É provável que estas alterações já tenham ocorrido em estoques de *U. cordatus*. No entanto, pouca informação genética, existe para confirmar tal possibilidade para esta espécie. Essa preocupação é fundamentada no uso sustentável desse recurso pesqueiro que é classificado como uma espécie *Sobreexplotadas* ou *Ameaçadas de Sobreexploração* (IBAMA, anexo II da IN nº 05/04). Este crustáceo Brachyura é considerado um dos componentes mais importantes da fauna de manguezais.

Tais considerações ilustram como o conhecimento da estrutura genética das populações pode ser usado para prever o potencial de impacto de distúrbios ao habitat e para o desenvolvimento de uma política de gerenciamento de importantes recursos pesqueiros. Os parâmetros genéticos populacionais estimados com base em marcadores moleculares podem ser utilizados para a conservação da espécie como elementos para elaboração de regulamentação pesqueira específica que vise o uso sustentável deste recurso, sendo assim, úteis na detecção de populações que apresentem diferentes magnitudes de variabilidade genética e que, portanto,

requerem diferentes estratégias para sua conservação (AVISE; HAMRICK, 1996; NEWTON et al., 1999).

Nesse contexto, marcadores moleculares baseados no DNA vêm sendo usados cada vez mais amplamente na conservação de recursos genéticos de interesse comercial (DINIZ et al., 2004; 2005), tais como o caranguejo-uçá, o qual se encontra sob forte pressão da pesca e influência do ambiente aquático. Dentre as técnicas mais usadas para a identificação de marcadores genéticos específicos, tem destaque o sequenciamento do DNA mitocondrial, particularmente sua região mais variável (polimórfica), região controle (RC), a qual tem sido constantemente mencionada como uma importante e eficiente ferramenta para estudos de genética populacional (AVISE, 1994).

Pouco se sabe sobre a estrutura e a evolução da região controle mitocondrial dos decápodes, mas acredita-se ser dividido em domínios polimórficos (GRABOWSKI; STUCK, 1999). Embora a RC mitocondrial seja uma região não codificante, as partes mais conservadas em seu interior servem como a origem de replicação para uma das cadeias de DNA mitocondrial.

Os segmentos periféricos, adjacente às regiões flangeadoras codificantes, são extremamente polimórficos, com um nível de substituição maior do que o domínio central. Essas regiões são, normalmente, denominadas regiões hipervariáveis (HV) e frequentemente utilizadas como marcador em estudos de genética populacional (GRABOWSKI, STUCK, 1999; GRABOWSKI et al., 2004).

Independente das altas taxas de evolução dentro da região de controle de genomas mitocondriais de vertebrados cria-se uma expectativa para que esta região seja uma ferramenta de detecção de subdivisão populacional sensível, porém isso pode não ser totalmente verdade para todos os vertebrados e invertebrados (ZHANG ;HEWITT, 1997) e devem ser levados em consideração quando um marcador é selecionado para estudos populacionais. Na literatura é possível ver exemplos, no qual a RC detecta somente níveis moderados de variabilidade intraespecífica para muitas espécies, tais como peixes (WILSON et al. 1997), borboletas (TAYLOR et al. 1993), mosquitos (CACCONI et al. 1996), gafanhotos (ZHANG et al. 1995), pepinos do mar (ARNOLD, SMITH, 1998) e crustáceos (STRAUGHAN, LEHMAN, 2000). Por outro lado, a região de controle tem sido usada com sucesso para estudar a genética da população de outros invertebrados

(GRABOWSKI; STUCK, 1999; SCHULTHEIS et al. 2002; MCMILLEN-JACKSON , BERT, 2003; MCMILLEN-JACKSON;BERT, 2004).

Mesmo já sendo detectada, ainda não se sabe explicar heterogeneidade encontrada nas taxas de substituição entre os domínios da região controle determinadas em regiões hipervariáveis I e II (HV-I e HV-II) do mtDNA humano (EXCOFFIER;YANG, 1999; MEYER et al. 1999). Apesar da utilidade em potencial da RC do mtDNA em estudos populacionais de decápodes, o outro domínio hipervariável e a região controle por inteira nunca tinha sido utilizada em estudos genéticos populacionais de decápodes em decorrência da falta de conjuntos de *primers*.

Assm, com este estudo objetivou-se desenhar *primers* (oligonucleotídeos) tendo como base sequências do genoma mitocondrial de outras espécies de caranguejos de manguezais e explorar o potencial de utilização dos domínios hipervariáveis terminal 5'-e 3'- da região de controle (RC) do *mtDNA*, denominada HV1 e HV2, respectivamente, a fim de desenvolver um marcador molecular altamente polimórfico com base no genoma mitocondrial para avaliar a variabilidade genética do caranguejo uçá, *Ucides cordatus*.

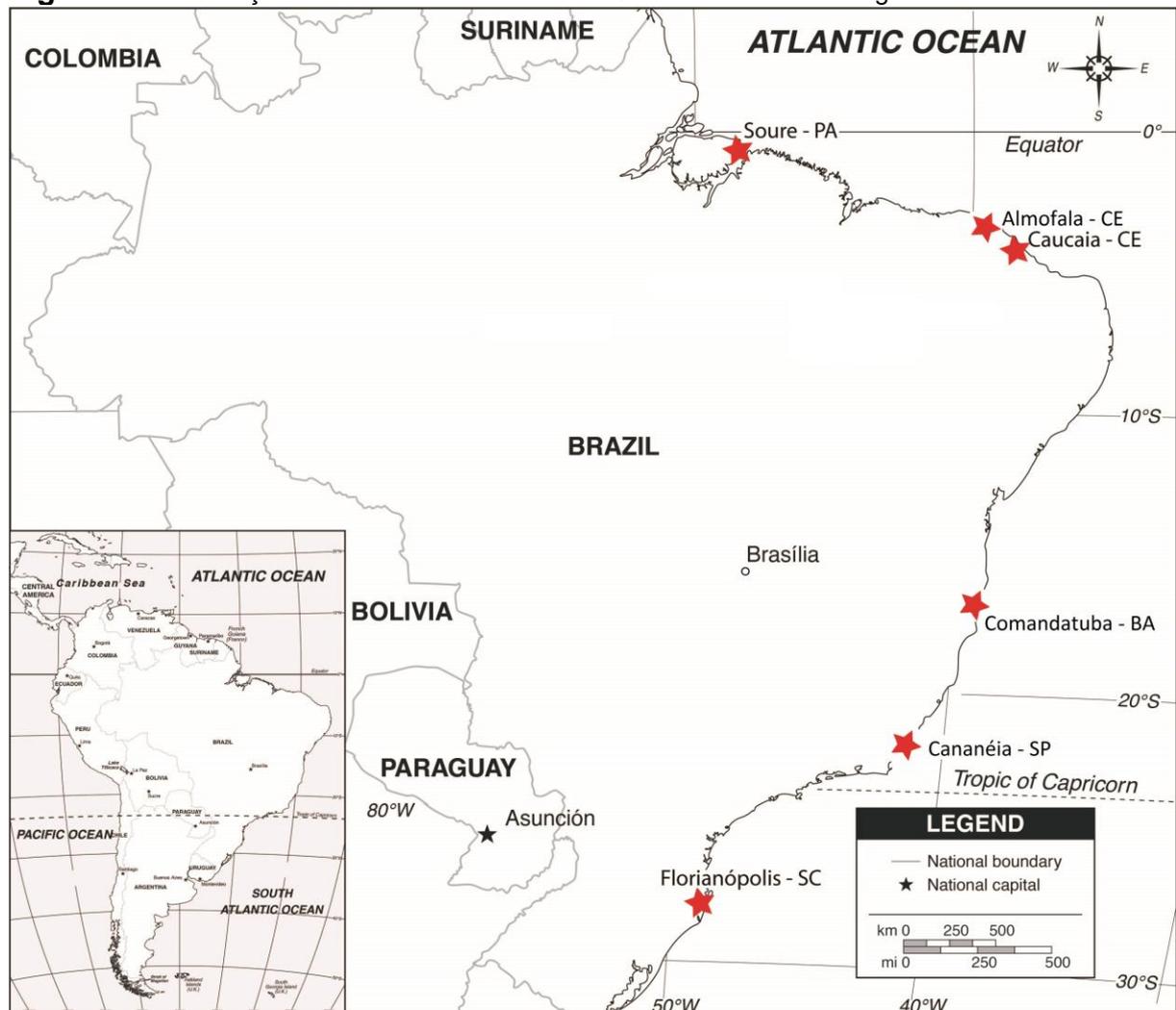
2 Material e Métodos

2.1 Coleta de amostras

Espécimes de caranguejo *Ucides cordatus* (n =428) foram capturados por catadore profissionais em 2006 em diferentes manguezais no Brasil: em Soure (Curuçá), Pará (0°40'02" S e 48°30'27" W; n = 107); Almofala (3°42'54" S e 38°37'19" W, n = 43), e Caucaia (3°42'54" S e 38°37'19" W; n = 90) no Ceará; Comandatuba, Bahia (15°22'58,46"S e 38°58'24,02"W; n = 80), Cananéia, São Paulo (25° 00' 53" S e 47° 55' 36" W; n = 100) e Florianópolis, Santa Catarina (27°35'21" S; 48°32'07" W, n = 8).

Amostras de tecido de um segmento do último pereópode (ou pereiópode) foram removidas usando um método não letal e imediatamente preservado em etanol a 95 a 100% em um microtubo eppendorf de 2,0 mL. Todas as amostras foram depois levadas para o laboratório e armazenadas a -20°C até posterior utilização.. (**Figure 1**).

Figura 1 - Localização das amostras coletadas de *Ucides cordatus* ao longo da costa brasileira.



Fonte: <https://freevectormaps.com/> modificado. Farias, A.M.

2.2 Extração de DNA

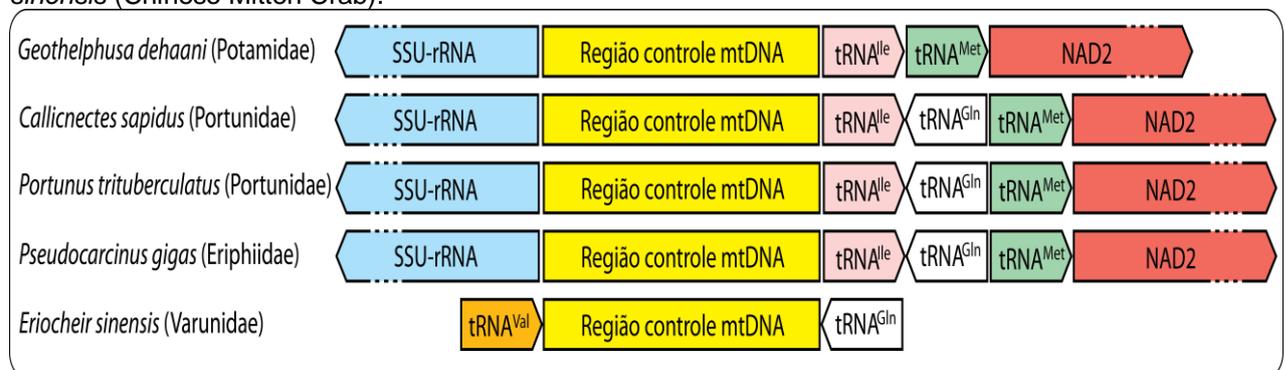
A extração do DNA genômico total foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI. O DNA foi extraído seguindo protocolo padrão por meio da digestão de um fragmento de aproximadamente 1,0 mg de tecido muscular de um segmento do último pereópode em presença de proteinase K a 55°C, seguido de purificação com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1; v:v:v), clorofórmio-álcool isoamílico (24:1; v:v) e precipitação por centrifugação a 10.000 g em etanol absoluto (SAMBROOK et al., 2005).

Por comparação com um marcador de 1;kb (Invitrogen), a qualidade e concentração do DNA extraído foram estimadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, + corante SyberSafe™ na proporção de 1,0 µL para cada 10 mL de gel e visualizados em fotodocumentador com transmissão ultravioleta (UV).

2.3 Desenho de *primers* da região controle do mtDNA

Sequências de outros Brachyuras disponíveis no Genbank do Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) foram utilizadas para o desenho de *primers* adjacentes à região controle do DNA mitocondrial em *Ucides cordatus*. Foram utilizadas as espécies *Geothelphusa dehaani*, *Callinectes sapidus*, *Portunus trituberculatus*, *Pseudocarcinus gigas* e *Eriocheir sinensis* com os respectivos números de acesso no GenBank: NC007379, NC006281, NC005037, NC006891, NC006992 (**Figura 2**).

Figura 2 - Genes presentes nas regiões adjacentes à região controle (RC) de diferentes espécies de caranguejos braquiúros, usados como referência para o desenho de *primers* no genoma mitocondrial do caranguejo *Ucides cordatus*. As setas indicam o sentido de transcrição do gene. *Geothelphusa dehaani* (Japanese Freshwater Crab); *Callinectes sapidus* (Blue Crab); *Portunus trituberculatus* (Japanese Blue Crab); *Pseudocarcinus gigas* (Australian Giant Crab); *Eriocheir sinensis* (Chinese Mitten Crab).



Com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999), as sequências da região controlem e genes adjacentes destas espécies escolhidas foram alinhadas e os locais conservados foram utilizados para o desenho de *primers*, utilizando-se o programa PRIMER3 (ROZEN; RKALETSKY, 2000). Inicialmente, foram desenhados dois *primers* no sentido *forward* baseados na região codificante da subunidade ribossomal 12S (*Primers* 12SU1 e 12SU2) e outros três no sentido *reverse* baseados nas regiões dos tRNAs de Isoleucina (*Primer* IleU1), de Glutamina (*Primer* GlnU1) e de Metionina (*Primer* MetU1) (**Tabela 1**). Após o sequenciamento dos fragmentos amplificados por estes *primers* desenharam-se outros quatro. Desta vez, os novos *primers* foram desenhados em regiões conservadas no interior da região controle do

próprio *Ucides*, estes foram: 12SU3 e 12SU4 (sentido *forward*) e CRUc1 e CRUc2 (sentido *reverse*) (**Tabela 1**). Depois de sequenciados os fragmentos amplificados por estes *primers* desenhados nesta 2ª fase (após o sequenciamento), foram desenhados novos *primers* para completar a sequência da região controle de *Ucides cordatus*: IleU2, 12SU5, 12SU6, CRUc3, CRUc4, CRUc5 e CRUc6 (**Tabela 1**). Os *primers* foram validados por meio de uma PCR. A busca de possíveis estruturas secundárias, tais como dímeros - iniciador, foi realizada usando o programa de computador GENERUNNER v 3.05 (Hastings Software).

Tabela 1 - Sequências dos *primers* desenhados adjacentes à região controle e internos de *ucides cordatus*

Nome do Primer	Fase	Sentido da amplificação	Sequencia nucleotídicas (5' – 3')
<i>Adjacentes à região controle</i>			
12SU1		<i>forward</i>	CTA CTA TGT TAC GAC TTA TYT CA
12SU2		<i>forward</i>	AAA GCG ACG GGC GAT ATG TAC
IleU1	I	<i>reverse</i>	TAC ATK ATT AGC TCT ATC AAA GCT A
MetU1		<i>reverse</i>	TCA TTT ACR GGG TAT GAR CC
GlnU1		<i>reverse</i>	GTA AAG RGC ACA WAAAGT TTT GAT C
<i>Após sequenciamento</i>			
12SU3		<i>forward</i>	ATA ATA GGG TAT CTAATC CTA GTT TA
12SU4	II	<i>forward</i>	TAT AAC CGC GAM TGC TGG CAC
CRUc1		<i>reverse</i>	CTG GTT TTC AGA AGG GTG ATG
CRUc2		<i>reverse</i>	TGG TCC TCT TTC TCC GGT TA
<i>Primers internos e adjacentes</i>			
12SU5		<i>forward</i>	CCT ATT CTA CTA CTC GCA ATA ACC
12SU6		<i>forward</i>	CGC AAT AAC CTT CAT GCA AT
IleU2		<i>reverse</i>	GCT ACC CTT TTA GTC AGG CAC T
CRUc3	III	<i>reverse</i>	TRR TTT TYA GAA GGG TGA TGT A
CRUc4		<i>reverse</i>	YAG AAG GGT GAT GTA RAT AGA TTA G
CRUc5		<i>forward</i>	TCT CTA RCC GGA GAA AGA GGA
CRUc6		<i>forward</i>	CTA AWA CTG AAG TGA TTT TAG TC

Bases nucleotídicas degeneradas : **K** = G ou T; **R** = A ou G; **W** = A ou T; **Y** = C ou T; **M** = A ou C.

2.4 Otimização dos *primers*

Após a extração do DNA, as amostras de *Ucides cordatus* provenientes de diversas localidades (**Figura 1**) foram submetidas à PCR para validação dos *primers* (12SU1 e 12SU2, 12SU3, 12SU4, MetU1, IleU1, GlnU1, CRUc1, CRUc2) e checagem do comprimento dos fragmentos gerados. As reações foram otimizadas e realizadas em volume de 20 µL nas seguintes condições: Tampão de PCR 1,35x [20 mM Tris HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl₂ a 2,0 mM; dNTP mix a 0,8 mM; 0,25 µM de cada *primer*; 1,0 U de *Taq* DNA polimerase; 20 a 100 ng de DNA. O programa para a amplificação dos fragmentos ocorreu com desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 min.

Dos sete *primers* desenhados por último (IleU2, 12SU5, 12SU6, CRUc3, CRUc4, CRUc5 e CRUc6), oito combinações diferentes foram testadas (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Combinações dos últimos *primers* desenhados na fase III.

Primer	Sequência (5'↔ 3')	Primer	Sequência (5'↔ 3')
12SU5	CCT ATT CTA CTA CTC GCA ATA ACC	× CRUc3	TRR TTT TYA GAA GGG TGA TGT A
12SU5	CCT ATT CTA CTA CTC GCA ATA ACC	× CRUc4	YAG AAG GGT GAT GTA RAT AGA TTA G
12SU6	CGC AAT AAC CTT CAT GCA AT	× CRUc3	TRR TTT TYA GAA GGG TGA TGT A
12SU6	CGC AAT AAC CTT CAT GCA AT	× CRUc4	YAG AAG GGT GAT GTA RAT AGA TTA G
CRUc5	TCT CTA RCC GGA GAA AGA GGA	× IleU2	GCT ACC CTT TTA GTC AGG CAC T
CRUc6	CTA AWA CTG AAG TGA TTT TAG TC	× IleU2	GCT ACC CTT TTA GTC AGG CAC T
CRUc5	TCT CTA RCC GGA GAA AGA GGA	× IleU1	TAC ATK ATT AGC TCT ATC AAA GCT A
CRUc6	CTA AWA CTG AAG TGA TTT TAG TC	× IleU1	TAC ATK ATT AGC TCT ATC AAA GCT A

As reações foram realizadas em volume de 20 µL nas seguintes condições: Tampão de PCR 1x [20 mM Tris HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl₂ a 2,5 mM; dNTP mix a 0,8 mM; 0,5 µM de cada *primer*; 1U de *Taq* DNA polimerase; 20 ng de DNA.

O programa para amplificação dos fragmentos ocorreu com desnaturação inicial a 94°C por quatro min, seguida de 30 ciclos a 94°C por um min, 50°C por um min e 72°C por um min. A extensão final foi realizada a 72°C por sete min.

Dentre as combinações citadas na **Tabela 2** foram otimizadas com sucesso apenas duas: (1) 12SU5 x CRUc3 e (7) CRUc5 x IleU1.

A reação para os *primers* no sentido *forward* (12SU5) e o outro no sentido *reverse* (CRUc3) foram otimizadas e realizadas em volume de 20 µL nas seguintes condições: Tampão de PCR 1x [20 mM Tris HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl₂ a 3,0 mM; dNTP mix a 0,8 mM; 0,5 µM de cada primer, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase; 20 ng de DNA. O programa para amplificação dos fragmentos ocorreu com desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos a 94°C por um min, 57°C por um min e 72°C por um min. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 min.

A outra reação otimizada foi a que utilizou os *primers* CRUc5 e IleU1 que foi realizada em volume de 20 µL nas seguintes condições: Tampão de PCR 1x [20 mM Tris HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl₂ a 2,5 mM; dNTP mix a 0,8 mM; 0,5 µM de cada primer; 0,5 U de *Taq* DNA polimerase; 20 ng de DNA. O programa para amplificação dos fragmentos ocorreu com desnaturação inicial a 94°C por quatro min, seguida de 30 ciclos a 94°C por um min, 53°C por um min e 72°C por um min. A extensão final foi realizada a 72°C por sete min. A mistura de todas as reações foi realizada em um termociclador programável, Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems Inc.)

2.5 Amplificação, purificação dos amplicons e sequenciamento do DNA

As combinações **12SU5–CRUc3** e **CRUc5–IleU1** foram selecionadas para o sequenciamento completo da região controle do DNA mitocondrial de *U. cordatus*, tendo em vista a amplificação das extremidades 5', denominada região hipervariável I (HVI) e extremidade 3', região hipervariável II (HVII), respectivamente (**Tabela 3**).

Tabela 3. - Sequências e combinações dos *primers* oligonucleotídeos, de pares utilizados para amplificação por PCR e sequenciamento do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* da região controle do *mtDNA*.

Primer	Sequência de oligonucleotídeos (5' ↔ 3')	Primer	Sequência de oligonucleotídeos (5' ↔ 3')	Ta (°C)	Tamanho fragmento (bp)
12SU5	CCTATTCTACTACTCGCAATAACC	CRUc3	TRRTTTYAGAAGGGT GATGTA	55	637
CRUc5	TCTCTARCCGGAGAAAGAGGA	IleU1	TACATKATTAGCTCTATCAAA GCTA	51	445

A amplificação por PCR dos domínios HVI e HVII foi realizada em volume de reação de 20 mL, contendo 20-100 ng de DNA, 10 mM de cada dNTP, 0,5 µL de cada primer, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase e 1× PCR buffer com 1-3 mM MgCl₂. O perfil da PCR foi de uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, 30 ciclos de um min a 94°C, um min a Ta (°C; dependendo da combinação de pares de iniciadores; **Tabela 3**), e um min a 72°C, e uma extensão final de sete min a 72° C. As reações foram realizadas em um Veriti® 96-well thermalcycler (Applied Biosystems). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corados com Syber Green (Invitrogen). Amplicons foram purificados com Invisorb Spin Rapid PCR Kit (Invitex, Germany) a fim de remover o excesso de primers e nucleotídeos, além de concentrar os fragmentos amplificados pela PCR. Em seguida, os produtos foram sequenciados em ambas as direções (*forward* e *reverse*). O ciclo de sequenciamento foi realizado utilizando o ABI Prism BigDye™ Ready Mix (Applied Biosystems Inc.) e com os *primers* anteriormente desenhados (**Tabela 3**). Os produtos do sequenciamento foram também purificados por precipitação com isopropanol para remover marcas fluorescentes que não reagiram. A análise dos produtos de sequenciamento foi realizada no ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.).

2.6 Análise dos dados de sequência de domínios HV.

As estimativas da divergência da sequência de nucleotídeos entre HVI e HVII haplótipos e grupos de amostragem foram calculados com o método dois parâmetros de Kimura (KIMURA, 1980). As distâncias resultantes foram utilizadas para testar conexões evolutivas entre grupos populacionais através de uma árvore

neighbor-joining (NJ) (SAITOU , NEI, 1987) usando o programa MEGA versão 2.1 (KUMAR et al., 2001). Os sites com lacunas de alinhamento e dados faltantes foram omitidos.

Para avaliar os níveis de significância e a consistência dos nós (topologia da árvore) derivados da análise filogenética, foram realizadas 1000 replicações do bootstrap do conjunto de dados original (FELSENSTEIN, 1985).

A visualização e o desenho da árvore foram realizados utilizando a versão 0.4.1 de TREEVIEWX .As estatísticas de variação de sequência, diversidade de haplótipos (Hd) e diversidade de nucleotídeos (π) foram calculadas utilizando o programa DNAsp v.4.0.4 (ROZAS , ROZAS, 1999). A presença de saturação na substituição de base para a região HV-CRD1 foi testada comparando a metade do índice de saturação teórico esperado quando assumindo a saturação total (ISS.c, valor crítico) com o índice de saturação observado (ISS) (XIA et al., 2003).

Os índices de saturação de substituição e entropia (Hx), uma medida da quantidade de variabilidade pelas sequências de haplotipos (Schneider e Stephens, 1990), foram calculados com o programa DAMBE versão 2 4.2.13 (XIA ; XIE, 2001).

A análise de variância molecular (AMOVA) para as três populações foi realizada para determinar a θ , um análogo da FST, usando ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al. 2005), em todos os domínios HV. Análise Bayesiana da estrutura populacional (BAPS) (CORANDER,MARTTINEN, 2006) foi empregada para investigar a estrutura genética das espécies, agrupando indivíduos geneticamente semelhantes. Agrupamentos populacionais foram testados por cinco repetições, com k (k é o número máximo de clusters) variando de 2 a10, e os resultados foram ponderados de acordo com as contagens resultantes de probabilidade.

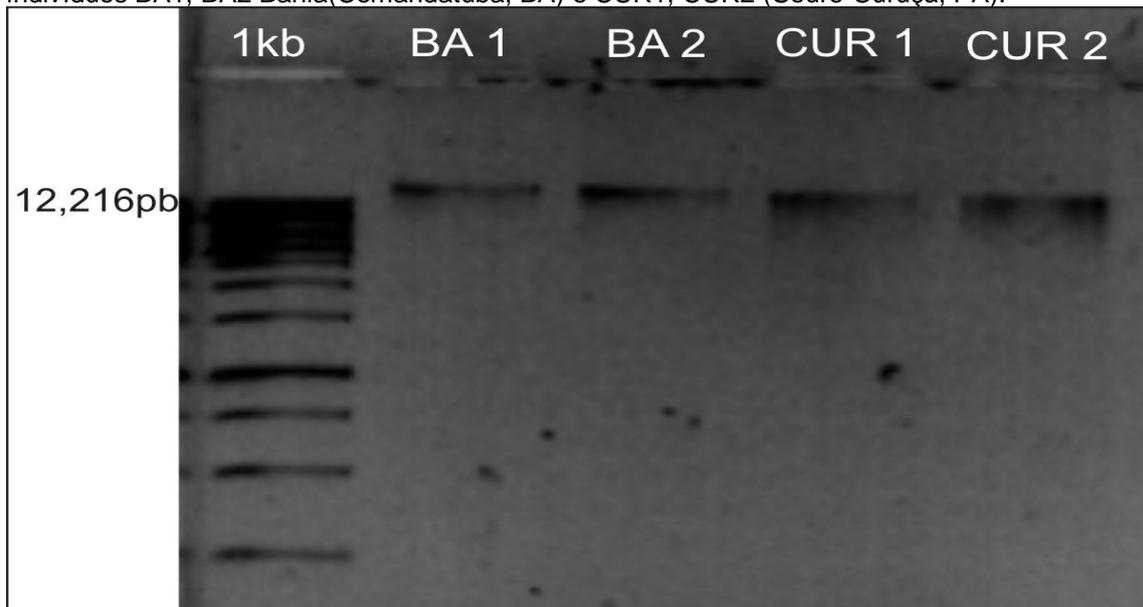
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimentos de primers

A extração de DNA utilizando o método fenol-clorofórmio-álcool isoamílico também conhecido como PCI (SAMBROOK et al., 2005) gerou um material em baixa concentração, porém de alto peso molecular. A Figura 3 mostra exemplo do processo de extração com espécimes provenientes dos municípios de Comandatuba e Curuçá.

Assim, todas as 2 amostras de cada localidade foram submetidas à PCR para testar a funcionalidade dos *primers* 12SU1, 12SU2, IleU1, GlnU1 e MetU1 que foram obtidos pelo alinhamento da região controle de cinco espécies de *Brachyura* cujas sequências estão disponíveis no banco de dados do GenBank (MANTELATTO et al., 2006; FEIJÓ et al., 2008).

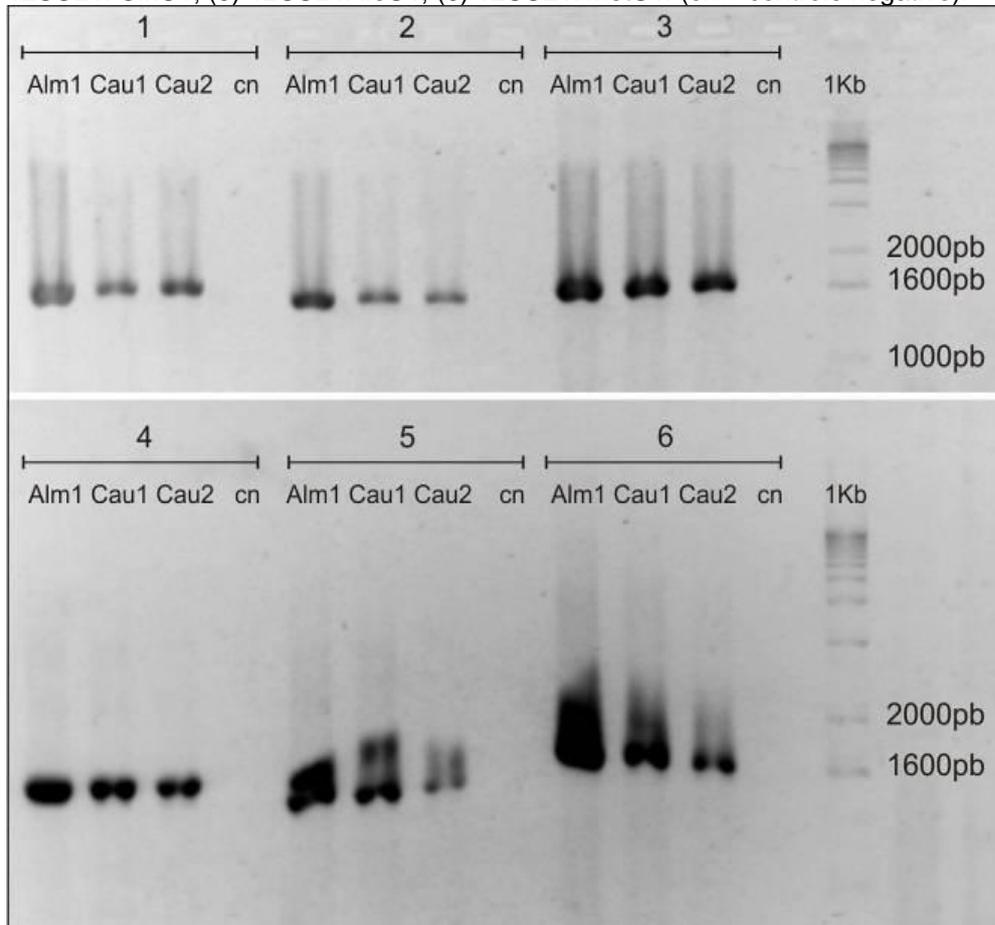
Figura 3 - Gel de agarose 0,8% mostrando os resultados da extração de DNA genômico dos indivíduos BA1, BA2 Bahia(Comandatuba, BA) e CUR1, CUR2 (Soure-Curuçá, PA).



Algumas regiões das sequências analisadas mostraram-se conservadas em espécies de famílias muito distintas, e desta forma, provavelmente, também poderiam ser encontradas na espécie *Ucides cordatus* como foi comprovado pela amplificação dos fragmentos pelos *primers* citados acima.

Observou-se que no gel os maiores fragmentos gerados foram os amplificados pelo *primer* MetU1, mostrando que este *locus* é o mais externo, quando comparado com os *loci* amplificados com IleU1 e GlnU1. Já o menor fragmento foi gerado com o *primer* IleU1, mostrando sua maior proximidade à região controle (**Figura 4**).

Figura 4 - Gel de agarose 1% mostrando os produtos da amplificação do DNA mitocondrial de três espécimes de *U. cordatus* (Alm1, Cau1 e Cau2, coletados no Estado do Ceará) utilizando as seguintes combinações de *primers*: (1) 12SU1 x GlnU1; (2) 12SU1 x IleU1; (3) 12SU1 x MetU1; (4) 12SU2 x GlnU1; (5) 12SU2 x IleU1; (6) 12SU2 x MetU1. (cn = controle negativo).

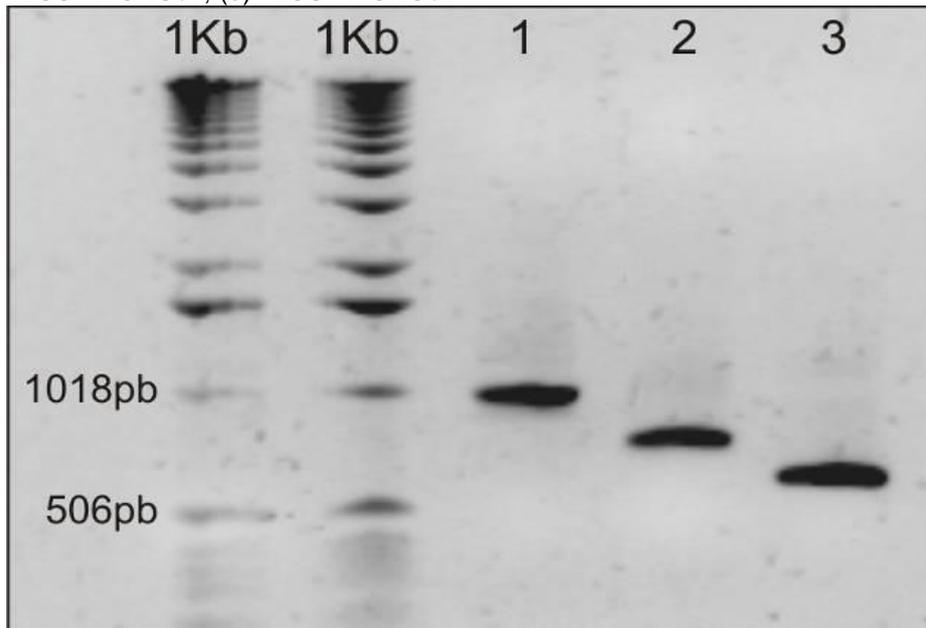


Dessa maneira os *amplicons* gerados foram submetidos a reações de purificação e sequenciamento. Após este último procedimento, os resultados evidenciaram sequências nítidas nas extremidades da região controle. Entretanto, não se puderam observar sequências mais internas desta região, necessitando desenhar novos *primers* (12SU3, 12SU4, CRUc1 e CRUc2), os quais foram desenhados em regiões conservadas no interior da região controle do próprio caranguejo-uçá. Após o desenho dos primers e posterior síntese, foram submetidos à PCR para observar a ocorrência de amplificação e o comprimento dos fragmentos gerados. Além dos *primers reverse* CRUc1 e CRUc2, o primer IleU1 foi novamente utilizado nas reações, servindo de base de comparação com os novos *primers* e para ser novamente sequenciado em novas combinações, agora com 12SU3 e 12SU4.

As amplificações foram realizadas com sucesso para todos os *primers* (Figura 5), com exceção do 12SU3 que não funcionou provavelmente pela ausência

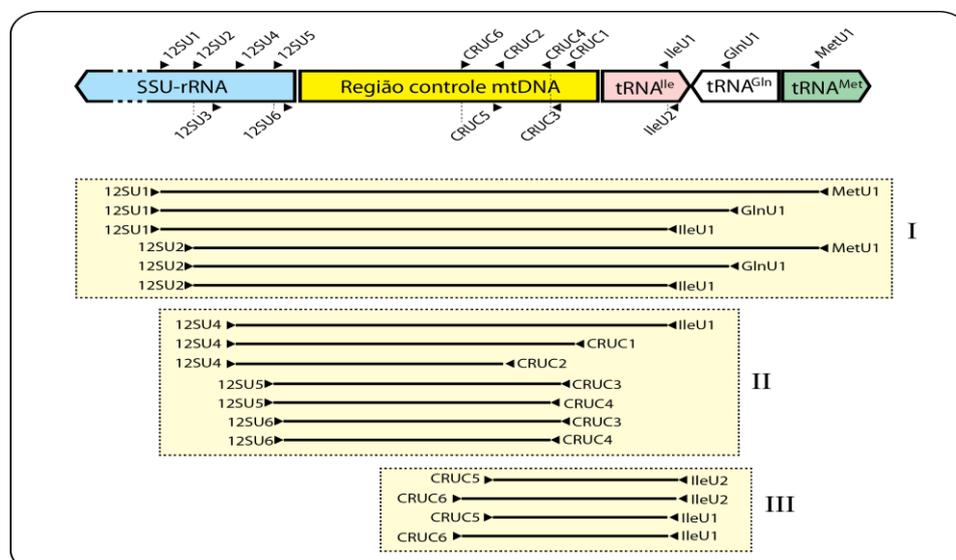
na extremidade 3' deste *primer* de grampos GC (*GC clamp*). Esta estrutura permite uma maior estabilidade no anelamento do *primer* ao DNA molde (FERRIS et al., 1996), uma vez que possui um maior número de ligações de hidrogênio em relação ao “grupamento” AT.

Figura 5 - Gel de agarose 1% mostrando os produtos da amplificação do DNA mitocondrial de *U. cordatus* (espécime Alm1) utilizando as seguintes combinações de *primers*: (1) 12SU4 x IleU1; (2) 12SU4 x CRUC1; (3) 12SU4 x CRUC2.



Os locais de anelamento dos novos *primers*, juntamente com os desenhados na primeira etapa, e os comprimentos dos fragmentos obtidos com os mesmos podem ser visualizados na (**Figura 6**)

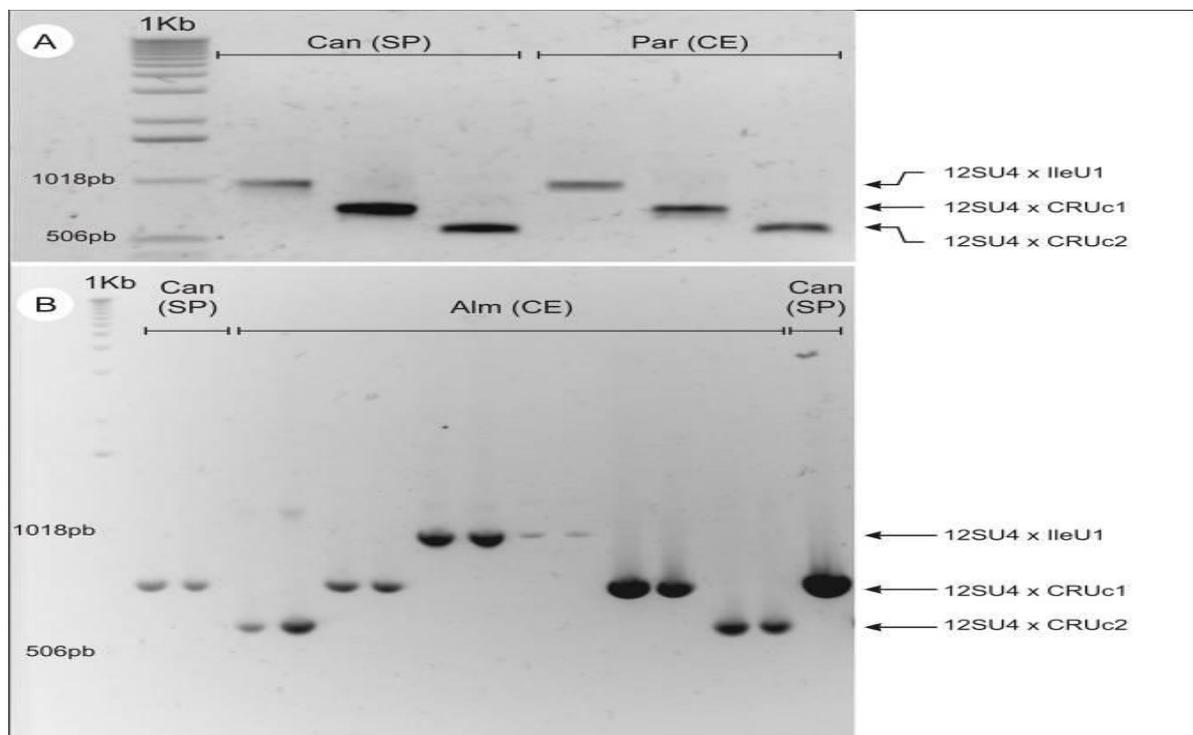
Figura 6 - Esquema da região controle (RC) e genes adjacentes, mostrando o local de anelamento dos primers desenhados que amplificaram. Também estão sendo mostrados os amplicons escolhidos para o sequenciamento nas três etapas realizadas.



As eletroforeses mostraram que os comprimentos das bandas geradas estão dentro dos valores esperados, comprovando assim, que a região desejada foi amplificada. Neste caso, esperava-se que o CRUc2 apresentasse bandas com menor número de pares de bases que foi desenhado mais internamente à região controle. Além disto, para determinar o potencial dos novos *primers* desenhados como marcadores efetivos para caranguejos presentes em localidades distintas, as mesmas reações de PCR foram realizadas com espécimes de outras populações (**Figura 7**).

As bandas esperadas foram amplificadas, porém, outras inespecíficas também apareceram em algumas reações e poderiam atrapalhar no processo de sequenciamento. Assim, optou-se pela extração dos *amplicons* diretamente do gel, após eletroforese (**Figura 7**). Os fragmentos obtidos com os *primers* 12SU4, CRUc1, CRUc2 e IleU1 foram extraídos com o kit Quick Gel Extraction (Invitrogen®), purificados e enviados para um novo sequenciamento.

Figura 7 - Gel de agarose 1% mostrando os produtos da amplificação do DNA mitocondrial de *U. cordatus* utilizando os *primers* 12SU4, IleU1, CRUc1 e CRUc2. (A) Amplificações realizadas com espécimes de Cananéia (SP) e Paracuru (CE). (B) Gel de onde foram extraídos os *amplicons* destinados ao sequenciamento. Foram seqüenciados um espécime de Almofala, CE (Alm1) e um de Cananéia, SP (Can).

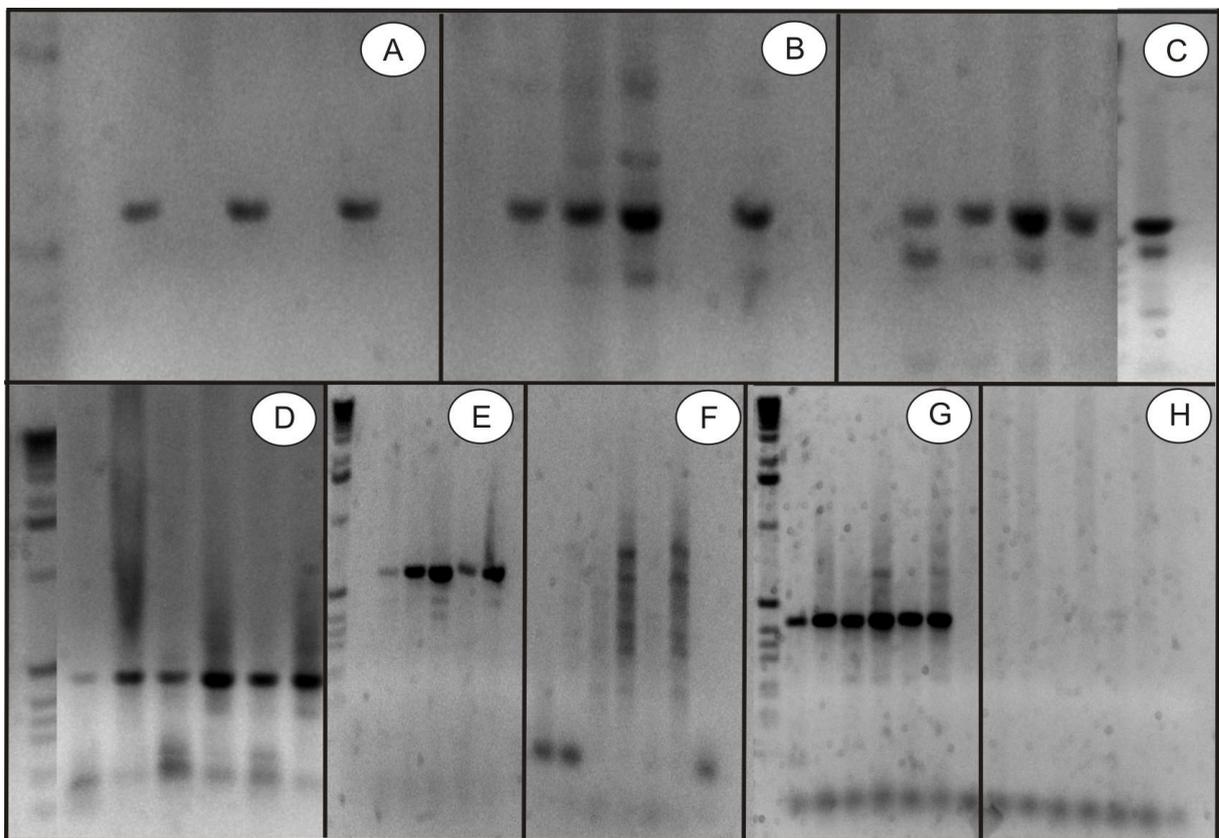


Os produtos do segundo sequenciamento mostraram avanços na determinação das bases da porção ainda desconhecida. Porém, ainda restou uma

pequena parte que não foi possível de se determinar. Desta maneira foram desenvolvidos novos *primers* (IleU2; 12SU5; 12SU6; CRUc3; CRUc4; CRUc5 e CRUc6) em cima das sequências já conhecidas para completar o sequenciamento da região controle.

As oito combinações mostradas anteriormente (**Tabela 1**) destes novos *primers* tiveram sua funcionalidade testada para amplificação da região controle ainda não determinada no último sequenciamento através de PCR (**Figura 8**).

Figura 8 - Géis de agarose 1% mostrando os produtos da amplificação do DNA mitocondrial de *U. cordatus* (proveniente de Soure-PA) utilizando as seguintes combinações de *primers*: (A) 12SU5 x CRUc3; (B) 12SU6 x CRUc3; (C) 12SU6 x CRUc4; (D) CRUc5 x IleU2; (E) 12SU5 x CRUc4; (F) CRUc6 x IleU2; (G) CRUc5 x IleU1; (H) CRUc6 x IleU1. Sendo o marcador, 1 kb ladder (Invitrogen®), utilizado como base para comparar os comprimentos dos fragmentos gerados

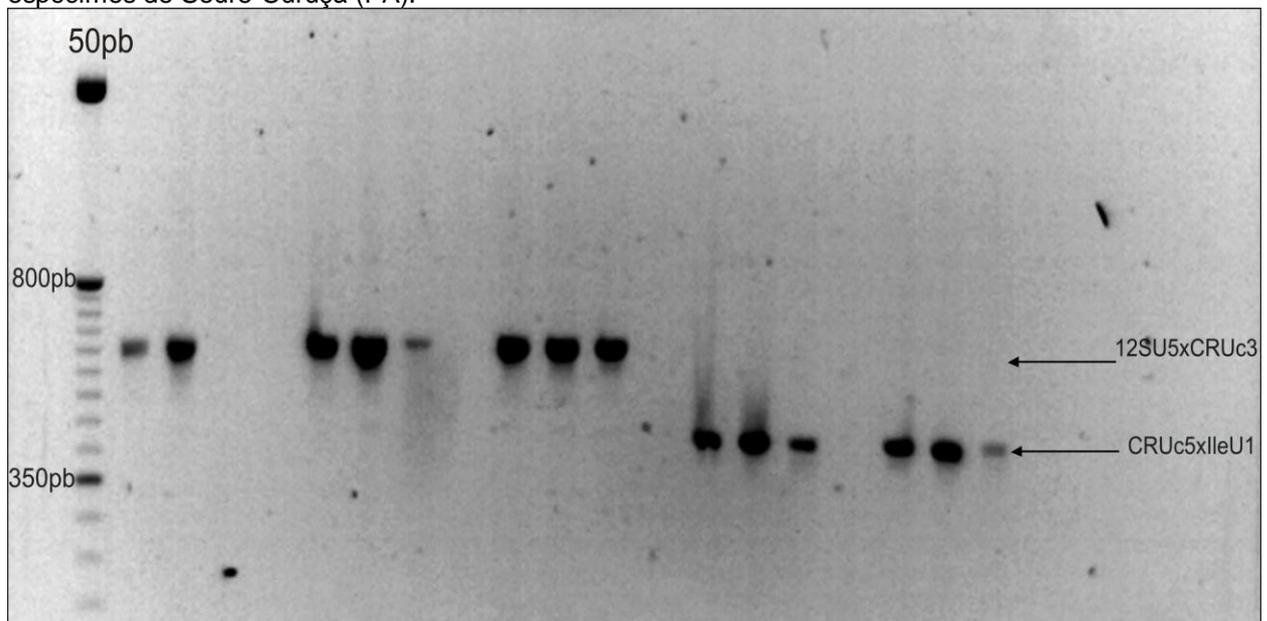


Todos os *primers* amplificaram suas sequências correspondentes, exceto o *primer* CRUc6 que, combinado com o *primer* IleU2 mostrou em alguns espécimes um padrão de bandas incomum à amplificação de *mtDNA* provavelmente devido ao elevada concentração de cloreto de magnésio e dNTP e quando combinado com o *primer* IleU1 não obteve resultado satisfatório, provavelmente uma junção dos fatores anteriormente citados somados à diferenças significantes na Temperatura

de melting (T_m) dos *primers* (CRUc6 $T_m = 60^\circ \text{C}$; IleU1 $T_m = 64^\circ \text{C}$). Admite-se que para o aumento na consistência dos resultados moleculares estas temperaturas devem possuir uma distinção mínima (STRES, MUROVEC, 2008).

Apesar das combinações citadas acima terem amplificado suas sequências, o conjunto de *primers* 12SU5 x CRUc3 e CRUc5 x IleU1 abrangem toda a *mtDNA*-CR incluindo os domínios hipervariáveis por isso somente eles passaram por um processo de otimização (**Figura 9**), pois estes amplificaram regiões periféricas da região controle, consideradas hipervariáveis (OLIVEIRA-NETO, 2008) em relação ao seu domínio central (GRABOWSKI; STUCK, 1999) de grande importância para o estudo de genética populacional (MCMILLEN-JACKSON; BERT, 2004).

Figura 09 - Gel de agarose 1% mostrando os produtos da amplificação do DNA mitocondrial de *U. cordatus* utilizando os *primers* 12SU5, CRUc3, CRUc5 e IleU1. Amplificações realizadas com espécimes de Soure-Curuçá (PA).



O estudo populacional do caranguejo-uçá pode ser considerado uma iniciativa importante do ponto de vista ambiental, econômico e social (Vopel; Hancock, 2005). Para isto, o presente trabalho propõe uma análise abrangente tanto das populações da região nordeste quanto das demais regiões brasileiras. Isto demonstra a preocupação com a preservação da espécie além de evidenciar o potencial regional do nordeste para o desenvolvimento de pesquisas em escalas significativas, abrangendo todo o litoral brasileiro. Até o momento, a pesquisa realizada com este caranguejo conta com espécimes de distintas regiões, tendo sido coletadas amostras desde o Pará, passando por uma porção significativa do litoral da região Meio-Norte (Nordeste). No outro extremo estão espécimes coletados no litoral

Sudeste e Sul, abrangendo indivíduos do Estado de São Paulo e Santa Catarina (limite extremo sul de ocorrência da espécie, (MELO 1996).

Apesar de algumas amostras de DNA terem apresentado certo grau de fragmentação, essas amostras podem ser utilizadas para a realização de PCR's, já que possuem quantidades suficientes de alto peso moléculas. Diversos trabalhos relatam a realização de reações de amplificação de DNA em condições ainda mais adversas, como em análises forenses (GÓES *et al.*, 2000; SCHMERER, 2000) ou em recuperação de DNA de tecidos destinados para outros fins que não a análise genética (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

No presente estudo, um dos marcadores utilizados é a região controle (RC) do mtDNA. A alta variabilidade da região controle vem cumprindo um importante papel como ferramenta molecular para diversos estudos evolutivos em animais, atuando na realização de inferências filogenéticas, identificação da origem das espécies, filogeografia, análise da estrutura e dinâmica populacional e evolução molecular (AVISE, 1994). A região controle não codifica genes funcionais, o que leva a uma alta taxa de substituição dos seus nucleotídeos (SACCONI *et al.*, 1987). Isto a torna uma fonte de informação evolutiva muitas vezes mais sensível do que os *loci* codificadores de proteínas (CACCONI *et al.* 1996; AVISE, 2000). Além disto, sua taxa de substituição já foi considerada de cinco a dez vezes maiores do que a presente no DNA nuclear (BROWN *et al.*, 1979), fazendo-a particularmente útil para resolver questões em nível populacional. Apesar de alguns autores questionarem a eficiência da região controle em invertebrados (STEVENS ; WALL, 1997; ZHANG *et al.*; GODFREY, 1997; TAYLOR *et al.*, 1993), trabalhos realizados com crustáceos demonstraram a eficiência desta região para estudos populacionais (GRABOWSKI *et al.*, 2004; DINIZ *et al.*, 2005). Como uma molécula de exclusiva herança materna, o mtDNA tem ainda, a vantagem de passar intacta por gerações subsequentes, como um genoma haploide, não sendo afetada por eventos de recombinação (DAWID, BLACKLER, 1972).

Entretanto, os genes presentes adjacentes a esta região variam muito em invertebrados e, assim, *primers* que funcionam bem em alguns táxons, podem não funcionar bem em outros, devido à variação dos genes vizinhos à região controle (ZHANG *et al.*, 1995). Os primeiros primers desenvolvidos no presente trabalho foram desenhados a partir de sequências de outros caranguejos e mostraram-se funcionais, amplificando com sucesso a região controle de *U. cordatus*. Os maiores

fragmentos gerados foram amplificados com o uso do *primer* MetU1 (em conjunto com os que codificaram a região 12S), mostrando que o *locus* tRNA^{Met} está mais externamente localizado à região controle de *Ucides*. O menor fragmento foi obtido com o *primer* IleU1, evidenciando sua maior proximidade com o *locus* tRNA^{Ile}. Na posição central localizou-se o *locus* tRNA^{Gln}. Este fato demonstrou que estes *loci* apresentam localização idêntica às espécies de caranguejos *C. sapidus*, *P. trituberculatus* e *P. gigas*, utilizadas para o desenho dos *primers*.

Entretanto, apesar do sucesso na amplificação da região controle, seu grande comprimento não permitiu o sequenciamento completo. Assim, outros *primers* mais internos foram desenvolvidos, utilizando-se como referência as sequências conservadas do próprio *U. cordatus* que puderam ser lidas. Os novos *primers* mostraram-se funcionais, amplificando fragmentos consistentes com comprimento dentro dos valores esperados. Os novos amplicons gerados foram sequenciados, mas, mesmo nestas condições, a sequência completa da região ainda não foi completamente determinada. Novas reações de sequenciamento foram realizadas para completar esta etapa do trabalho e dar prosseguimento com as análises populacionais.

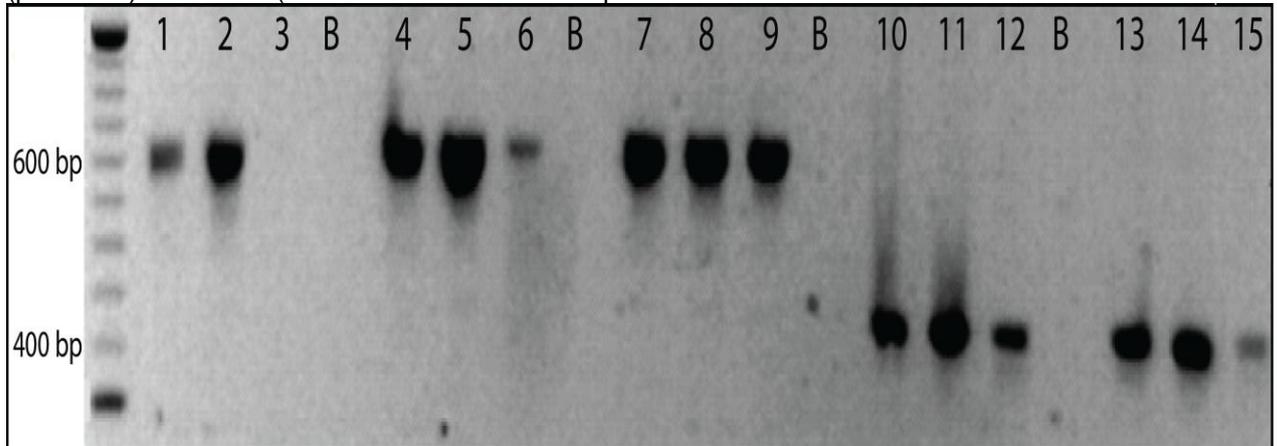
Informações a este respeito são importantíssimas, visto que o nível de conhecimento genético a respeito deste caranguejo ainda é muito novo. (OLIVEIRA-NETO, 2007).

4.2 Caracterizações da região controle do *Ucides cordatus*

Os *primers* 12SU5–CRUc3 e CRUc5–IleU1 amplificaram com sucesso toda a região de controle de *Ucides cordatus* (**Figura 10**). O comprimento da região controle foi estimado em 758 pb.

Nenhum polimorfismo de tamanho ou heteroplasmia foi observado dentro ou entre indivíduos das populações amostradas. Estes *primers* também podem ser utilizados para outras espécies de Brachyura, uma vez que se desenham as famílias de caranguejo (Patamidae, Portunidae, Eriphiidae e Varunidae).

Figura 10. Imagem com tom invertido de gel de agarose corada com Syber Green, mostrando produtos de PCR a partir da amplificação das amostras de *U. cordatus* usando as combinações de pares de primers: **12SU5–CRUc3** e **CRUc5–IleU1**. Faixas 1-3, 4-6, 7-9 (para HV1) e 10-12, 13-15 (para HV2). B: branco (marcador molecular de 50 pb



A composição nucleotídica da região estudada em *U. cordatus* apresentou-se rica em A+T (A+T = 76,38%, C+G = 23,62%), sendo que esta relação A+T > C+G está de acordo com a composição nucleotídica encontrada para outros invertebrados como insetos e crustáceos. Lunt et al.,(1996) encontrou uma porcentagem de 69,4% A+T no inseto *Chorthippus parallelus*. Em crustáceos, a proporção média observada para estas bases variou de 64,5% a 79% (VALVERDE et al., 1994; GRABOWSKI E STUCK, 1999; MCMILLEN-JACKSON, BERT, 2004; DINIZ et al. 2005). A composição média de nucleotídeos na CR de *U. cordatus* está de acordo com a seguinte relação: A (39,6%)> T (37,1%)> C (15,4%)> G (7,9%), similar a outros decápodes (DINIZ et al., 2005).

A região controle do *mtDNA* em *U. cordatus* apresentou alto nível de polimorfismo em suas extremidades 5'- e 3'-, uma característica comum a esta região não-codificante na maioria das espécies decápodes estudados (GRABOWSKI,STUCK 1999; CHU et al. 2003; SCHULTHEIS et al. 2002; MCMILLEN-JACKSON,BERT 2003; GRABOWSKI et al. 2004; DINIZ et al. 2005).

Um grande número de haplótipos distintos e não sobrepostos foram encontrados em toda a região geográfica estudada para os dois domínios hipervariáveis (HVI e HVII). No entanto, esses padrões aparentes são provisórios, devido ao relativo pequeno número de amostras.

O padrão de substituição de nucleotídeos foi maior para transições do que transversões (**Tabela 4**). Esses resultados foram similares ao relatado por outros estudos de substituições do *mtDNA* (MORITZ et al. 1987). A relação sv/si estimada foi de 5,4 para HVI, 9,3 para HVII e 5,5 para toda a RC.

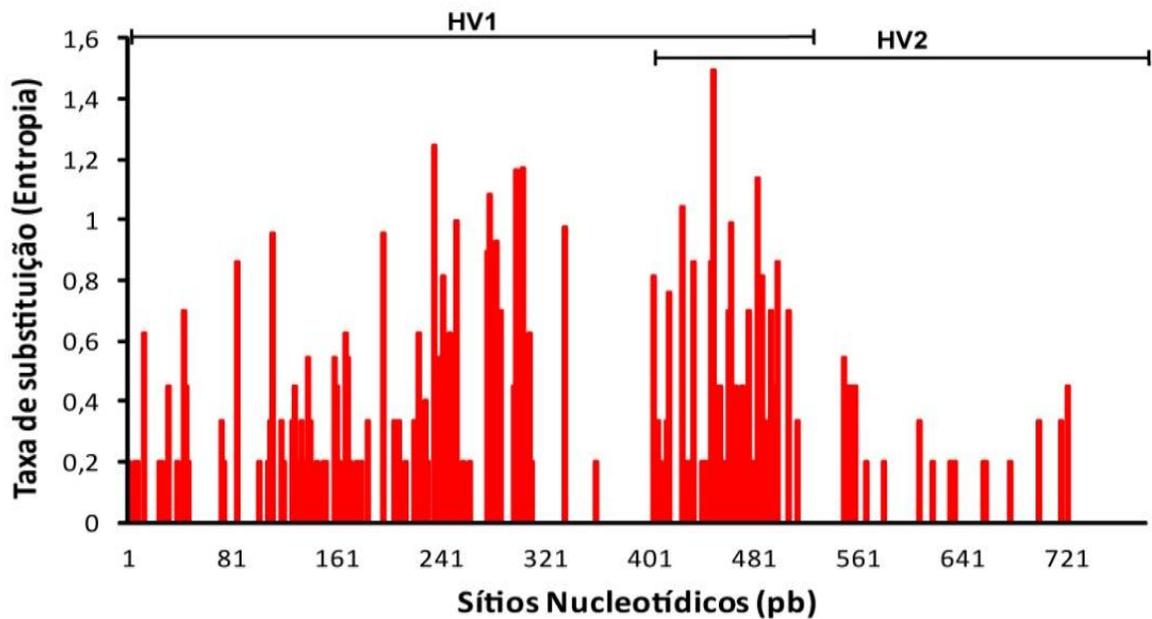
Tabela 4 - Análise de substituições de nucleotídeos, Número de transições, transversões e *singletons* em HV1, HV2, na região controle inteira (RC) do *mtDNA* para *Ucides cordatus*. espécimes de Soure-Curuçá (PA).

Tipo de mutação	Alterações nucleotídicas	HV1	HV2	RC
Transição pirimidina	T→C	40 (177)	27 (99)	46 (195)
	C→T	19 (69)	12 (25)	25 (67)
Transição purina	A→G	55 (143)	19 (39)	59(149)
	G→A	10 (38)	7 (28)	13 (61)
Transversões	C→A	5 (7)	1 (3)	6 (10)
	A→C	2 (2)	0 (0)	2 (2)
	G→C	3 (8)	0 (0)	3 (8)
	A→T	5 (6)	1 (1)	6 (7)
	T→A	4 (12)	4 (13)	5 (13)
	T→G	1 (1)	0 (0)	1 (1)
	G→T	3 (3)	1 (1)	3 (3)
	<i>Singletons</i>		60	30
Total de sítios polimórficos		147 (466)	72 (209)	169 (516)

Os números representam posições polimórficas em cada domínio HV. Os números entre parênteses são os números absolutos de mutações identificadas. Por exemplo, existem 10 posições em HV1 onde ocorreu a transição de G para A de um total de 38 polimorfismos encontrados nestas 10 posições.

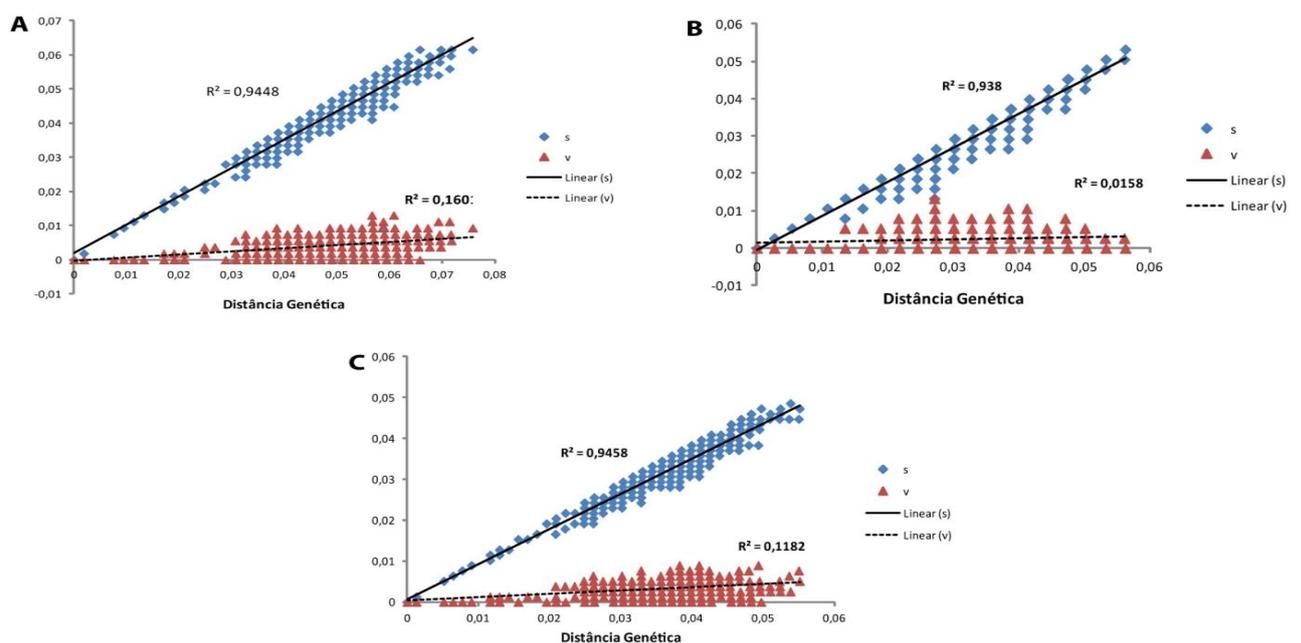
A substituição nucleotídica mostrou-se mais frequente no domínio hipervariável HVI (**Figura 11**). Um maior número de trechos no domínio HVII foi considerado não variável no alinhamento das sequências na extremidade 3'.

Figura 11 - Distribuição das sequências variáveis (entropia) pelos os domínios hipervariáveis (A) HV1 e (B) HV2 da região controle do mtDNA do caranguejo do mangue *Ucides cordatus*



A saturação nas substituições nucleotídicas para HVI e HVII e a RC completa está representada na **Figura 12**. Transições estão fortemente correlacionadas com as distâncias genéticas, HV1 (94,5%), HV2 (93,8%) e RC (94,6%). No entanto, transversões não puderam se ajustar a uma regressão linear. A elevada taxa de mutação da região controle do DNA mitocondrial em vários decápodes marinhos é provavelmente responsável pela rápida taxa média de substituição encontrada em *U. cordatus* (CHU et al. 2003; DINIZ et al. 2005).

Figura 12 -. Índices de saturação dos domínios hipervariáveis (A) HVI, (B) HVII e (C) de toda a região controle (RC) do mtDNA do *Ucides cordatus*.



A análise dos índices de saturação de substituição, transição (S) e transversão (V), calculado pelo programa DAMBE, apoia a utilização dos domínios HV e toda a RC para reconstruir as suas relações filogeográficas. O índice de saturação de substituição (ISS) foi substancialmente menor do que o valor crítico (ISS.C) para toda a RC. Os resultados da análise de saturação mostraram uma substituição ISS (0,067 para HV1; 0,046 para HV2 e 0,051 para toda a RC) muito menor do que o valor crítico ISS.C (0,706 para HV1; 0,689 para HV2 e 0,730 para RC), indicando que as sequências são altamente úteis na reconstrução filogenética (XIA et al. 2003; XIA ,LEMEY 2009).

Os dados de diversidade haplotípica (HD) e diversidade de nucleotídeos (π) foram comparados entre os locais de amostragem e domínios estudados (**Tabela 5**). Foram observadas estimativas de π mais elevados para o HV1 que para HV2 e RC. As médias haplotípica e diversidade de nucleotídeos foram, respectivamente, 0,988 para todos os domínios e a *mtDNA* RC, e 4,5% para HV1, 2,8% para HV2, e de 3,4% para todo o RC. O grande número de sítios polimórficos e haplótipos distintos de cada domínio e de toda a região viabiliza a utilização da região de controle para avaliar a variação genética intrapopulacional (CHU et al. 2003).

Tabela 5 - Principais características das sequências de nucleotídeos e medidas de diversidade genética com base nos domínios hipervariáveis HV1, HV2 e toda a região controle mitocondrial (RC) do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* ao longo da costa brasileira.

Domínio hipervariável	Localização	A+T (%)	Nh (Seqs)	Nps	M	Hd ± SD	π ± SD
HV1	Santa Catarina	76.31	7 (7)	73	25.286 ± 12.676	1.000 ± 0.076	0.047 ± 0.027
	Ceará	76.27	17 (17)	100	24.456 ± 11.308	1.000 ± 0.020	0.046 ± 0.024
	Pará	76.12	7 (8)	61	22.641 ± 11.183	0.964 ± 0.077	0.042 ± 0.024
HV2	Santa Catarina	78.53	7 (7)	33	12.286 ± 6.330	1.000 ± 0.076	0.033 ± 0.019
	Ceará	79.15	17 (17)	50	11.691 ± 5.572	1.000 ± 0.020	0.031 ± 0.016
	Pará	78.96	7 (8)	25	9.000 ± 4.642	0.964 ± 0.077	0.021 ± 0.014
RC	Santa Catarina	76,60	7 (7)	83	28.714 ± 14.348	1.000 ± 0.076	0.037 ± 0.021
	Ceará	76,77	17 (17)	114	27.073 ± 12.481	1.000 ± 0.020	0.035 ± 0.018
	Pará	76,60	7 (8)	64	23.393 ± 11.543	0.964 ± 0.077	0.030 ± 0.017

Nh, número de haplótipo; Nps, número de sítios polimórficos; M, número médio da diferença *pairwise*; Hd, diversidade háplotípica; π diversidade nucleotídica e SD desvio padrão.

As distâncias genéticas (estimado no parâmetro de Kimura 2 ou K2P) entre as populações, dentro de ambos os domínios são apresentadas na **Tabela 6**. Foram encontrados os maiores valores entre os locais mais distantes (Pará e Santa Catarina) para HV1 e RC. Foi encontrado a menor proporção deste índice entre os locais de amostragem do Ceará e Pará, isso observando todos os domínios sendo a RC completa.

Sítios variáveis selecionados para análise filogenética, não incluíam inserções e deleções. Os resultados de inferências das distâncias genéticas foram estimado no parâmetro de Kimura dois, em todos os locais das amostras, não mostrou qualquer ligação evolutiva clara entre as populações, e, portanto, a árvore filogenética não é mostrada aqui. Assim, diferenças genéticas não formam população/estoque específico para nenhum domínio e nem para a região toda. Mais

uma vez, o número de amostras de indivíduos pode ter afetado a validade da árvore e um clado significado (LEE 1996).

Tabela 6. Média de distâncias genética modelo parâmetro de Kimura 2 estimados a partir de domínios hipervariáveis HV1 (acima diagonal) e HV2 (abaixo diagonal), e a região inteira controle (RC; abaixo as primeiras 4 linhas) dos locais de coleta em *Ucides cordatus* ao longo da costa brasileira.

Locais de coleta	Santa Catarina	Ceará	Pará
Santa Catarina		0,0491	0,0527
Ceará	0,0339		0,0486
Pará	0,0317	0,0301	
	Santa Catarina	Ceará	Pará
Santa Catarina			
Ceará	0,0375		
Pará	0,0385	0,0351	

A análise de variância molecular (AMOVA), que é uma medida de heterogeneidade da população, revelou estimativas F_{ST} mais elevadas. Este aumento foi observado para o domínio HV1, em comparação com HV2 e RC separadamente. As estimativas foram maiores para HV1 (0,0461) do que para HV2 (0,0457) e RC (0,0451). Foi encontrado na região HV1 a maior variação (95,4%) dentro das populações (**Tabela 7**).

Tabela 7 - A análise de variância molecular (AMOVA) calculada a partir dos domínios hipervariáveis HV1, HV2 e em toda região controle (CR) dos locais de coleta do *U. cordatus* ao longo da costa brasileira.

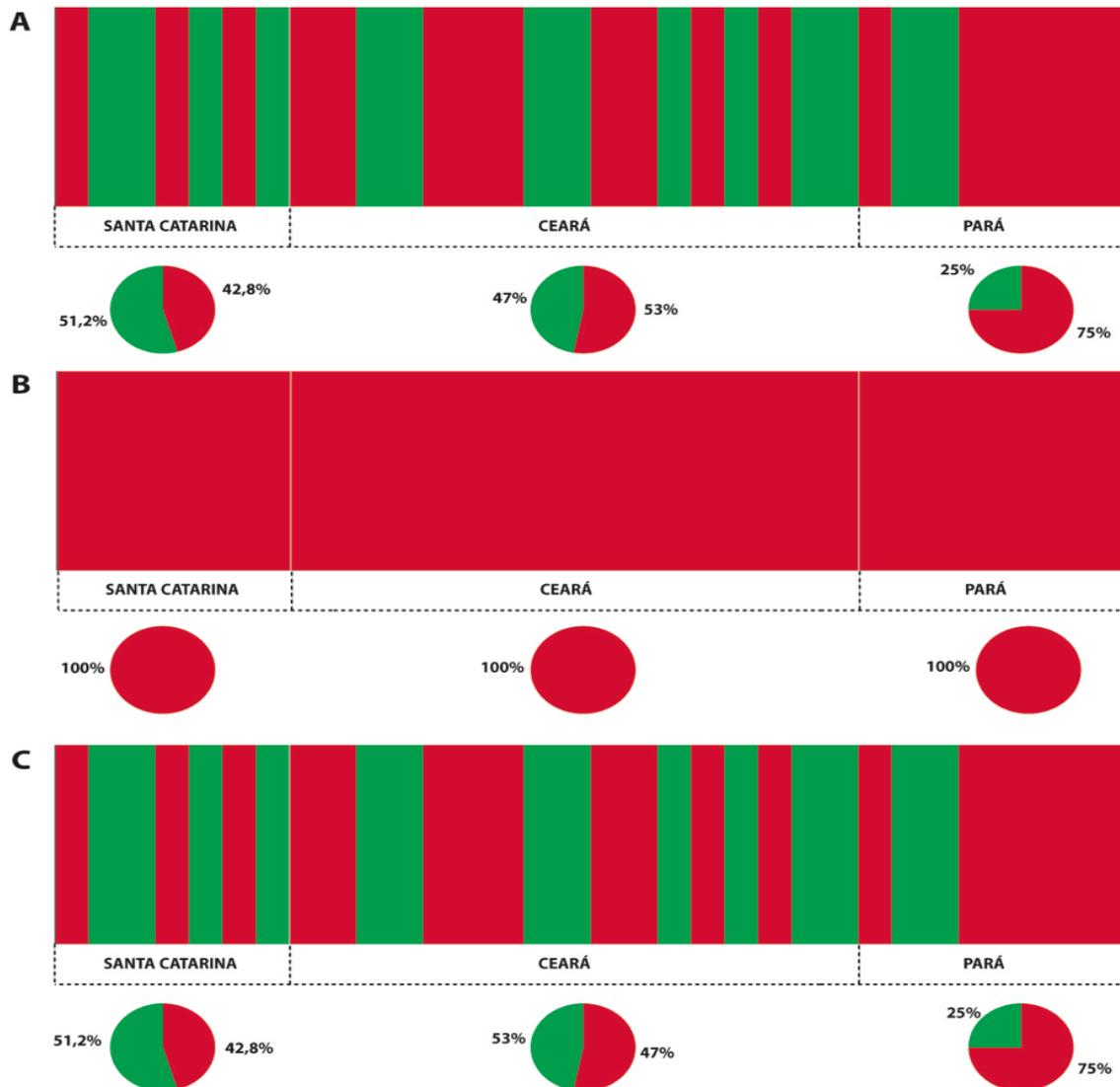
Fonte de variação	df	Soma dos quadrados			Componentes de variação			Porcentagem de variação		
		HV1	HV2	CR	HV1	HV2	CR	HV1	HV2	CR
Entre Populações	2	35,558	16,363	38,706	0,585 Va	0,267 Va	0,627 Va	4,61	4,57	4,51
Dentro das populações	29	350,754	161,887	38,606	12,095 Vb	5,582 Vb	13,262 Vb	95,39	95,43	95,49
Total	31	386,312	178,250	423,312	12,680	5,850	13,889			

Índice de fixação (F_{ST}) Para HVI: **0,04613** ($P < 0,05$) Para HVII: **0,04572** ($P < 0,05$) Para CR: **0,04512** ($P < 0,05$)

Apesar do tamanho reduzido no número de amostra, dois haplogrupos distintos foram detectados através da análise Bayesiana de estruturação populacional (BAPS) (**Figura 13**). Os resultados foram semelhantes para HV1 e RC, então basta sequenciar do domínio HV1 em vez de toda a região controle para obter

resultados de estruturação genética em *U. Cordatus*. Em todas as populações foram detectados a ocorrência dos dois haplogrupos em HV1 e RC.

Figura 13. Análise Bayesiana das sequências (A) HV1, (B) HV2 e (C) RC dos três locais coletados para esta análise. Cada barra vertical representa um indivíduo e a respectiva probabilidade de pertencer a um dos dois haplogroups detectados.



No geral, os resultados indicaram que a inclusão de HV2 nas análises não contribui de forma significativa na caracterização populacional. Nenhum resultado significativamente diferente foi observado pela inclusão do HV2 nos resultados de diversidade nucleotídicas, F_{ST} , AMOVA e análise Bayesiana. Isso sugere que análises utilizando a região controle completa não é necessária. Pois os dados obtidos não contribuíram significativamente para uma melhor resolução das estimativas populacionais. Os resultados sugerem que o uso de HV1 no lugar de HV2 ou todo o RC fornece uma melhor estimativa da população com base

diversidade genética e isto pode ser visto como um modelo para as outras espécies braquiúros em estudos genéticos de população.

4 Conclusões

- Os *primers* desenhados nas regiões adjacentes à região controle das cinco espécies utilizadas do Genbank isolaram a *mtDNA*-CR do *Ucides cordatus* (Decapoda, Brachyura);
- O sequenciamento da *mtDNA*-CR mostrou uma composição nucleotídica de 758 pb.
- Os *primers* 12SU5 e CRUc3, e o CRUc5 e IleU2 amplificaram fragmentos pertencentes aos domínios hipervariáveis da *mtDNA*-CR. Estes poderão ser utilizados em futuros estudos de genética populacional para a espécie *Ucides cordatus*.
- A utilização da região HV1 é suficiente para discriminação de populações geneticamente distintas na costa do Brasil, entre os estados do Pará e Santa Catarina.

REFERÊNCIAS

ARNDT, A.; SMITH, M.J. Genetic diversity and population structure in two species of sea cucumber: differing patterns according to mode of development. *Mol Ecol* 7:1053-1064 1998.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. London, UK: Chapman & Hall. 1994.

AVISE, J.C., HAMRICK, J.L. **Conservation genetics: case histories from nature**. New York: Chapman & Hall, 284p. 1996.

BROWN, W.M., GEORGE, M.JR., WILSON, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 76: 1967-1971.1979.

CACCONI, A.; GARCIA B.A.; POWELL, J.R. Evolution of the mitochondrial DNA control region in the *Anopheles gambiae* complex. **Insect Mol Biol** 5:51-9. 1996.

CHU, K.H.; LI, C.P.; TAM, Y.K.; LAVERY, S. Application of mitochondrial control region in population genetic studies of the shrimp *Penaeus*. **Mol Ecol Notes**. 3, 120–122. 2003.

CORANDER, J.; MARTTINEN, P. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. **Mol Ecol**. 15: 2833–2843. 2006.

DAWID, I.B., BLACKLER, A.W). Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. **Developmental Biology**, 29: 152-161. 1972.

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 Biotechnology (New York, N.Y.)**.7, 462–473. 2005.

EXCOFFIER, L.; Z. YANG. Substitution rate variation among sites in mitochondrial hypervariable region I of humans and chimpanzees. **Mol. Biol. Evol.**,16:1357–1368. 1999.

FEIJÓ, R.G. Avaliação da variabilidade genética do vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (ihhnv) no camarão rosa, *Farfantepenaeus subtilis*, infectado

experimentalmente. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, 41(1), p. 113 -117, 2008.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** 39:783-791.1985.

FERRIS, M. J. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 340-346, 1996.

GÓES, A.C.S.; FIGUEIREDO, A.L.S.; SINOHARA, L.E.; CARVALHO, E.F. Variation of PCR parameters to optimize amplification from severely degraded bone DNA. **1th International Symposium on Human Identification**, Biloxi, Mississippi. 2000.

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, vol. I—Schram FR, Vaupel Klein JC, eds. Leiden (The Netherlands): **Brill Academic Publishers**, p. 333-344, 1999.

GRABOWSKI, M., GRATER, W.D., and Stuck K.C. A novel polymorphic *mtDNA* marker for population studies of the pink shrimp, *Farfantepenaeus duorarum* (Crustacea, Penaeidae). **Oceanologia** 46:147-151. 2004.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B. AND NEI, N. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, **Bioinformatics**, 17: 1244-1245.2001

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol.** 16, 111–120 **1980**,

LEE, M.S.Y. Tree Robustness and Clade Significance. **Syst. Biol.** 49: 829–836. 2000

LUNT, D.H.;ZHANG, D.X.;SZYMURA, J.M.;HEWITT, G.M. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. **Insect Mol Biol** 5:153-165. 1996.

MACHUGH, D.E., LOFTUS, R.T., BRADLEY, D.G., SHARP, P.M., CUNNINGHAM, P. Microsatellites DNA variation within and among European cattle breeds. In: **Proceedings of the Royal Society**, London B, 256: 25-31, 1994.

MANTELATTO, F.L.M. et al. Molecular analysis of the taxonomic and distributional status for the hermit crab genera *Loxopagurus* Forest, 1964 and *Isocheles* Stimpson, 1858 (Decapoda, Anomura, Diogenidae). **Zoosystema**, v. 28 (2), p. 495-506, 2006.

MCMILLEN-JACKSON, A.L.; BERT, T.M. Disparate patterns of population genetic structure and population history in two sympatric penaeid shrimp species (*Farfantepenaeus aztecus* and *Litopenaeus setiferus*) in the eastern United States. **Mol Ecol** 12:2895-2905. (2003).

MCMILLEN-JACKSON, A.L.; BERT, T.M. Genetic diversity in the mtDNA control region and population structure in the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*. **J Crustacean Biol** 24:101-109. 2004.

MELO, G. A. S.. **Manual de identificac_ão dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. Pleiade: FAPESP. 1996.

MEYER, S; WEISS, G.; VON HAESELER, A. Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. **Genetics**. 152:1103–1110. 1999.

MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annu Rev Ecol Syst**. 18, 269–292. 1987.

NEWTON, A.C.; ALLNUTT, T.R.; GILLIES, A.C.M.; LOWE, A.J.; ENNOS, R.A.. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, p. 140-145, 1999.

OLIVEIRA-NETO, J. F.; PIE, R. MARCIO.; BOEGER. A.W.; OSTRENSKY.A.; BAGGIO. R. The Organization of the Mitochondrial Control Region in 2 Brachyuran Crustaceans: *Ucides cordatus* (Ocypodidae) and *Cardisoma guanhumi* (Gecarcinidae). **Journal of Heredity**, v. 99 (4), p. 432–437, 2008.

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

ROZAS, J.; ROZAS, R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. **Bioinformatics** 15:174-175. 1999

ROZEN, S., SKALETSKY, H.J. PRIMER 3 on the WWW for general users and biologist programmers. In: **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**, Krawetz S., Misener, S. (eds.). Totowa N.J.: Humana Press, 365-386, 2000.

SAMBROOK, J.; FRISTISCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA: **2005**.

SACCONE, C.; ATTIMONELLI M.; SBISA, E. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA. **J Mol Evol**, 26, 205–211. 1987.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol** 4:406-425. 1987.
SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.E, MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, 1989.

SCHMERER, W.M. STR genotyping of highly degraded DNA: reproducibility and methodical optimization. **1th International Symposium on Human Identification**, Biloxi, Mississippi. 2000.

SCHULTHEIS A.S., WEIGT, L.A., AND HENDRICK, A.C. Arrangement and structural conservation of the mitochondrial control region of two species of Plecoptera: utility of tandem repeat-containing regions in studies of population genetics and evolutionary history. **Insect Mol Biol** 11:605-610. 2002.

STEVENS, J.; WALL, R. Genetic variation in populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Random amplified polymorphic DNA analysis and mitochondrial DNA sequences. **Biochemical Systematics and Ecology**, 25: 81-97. 1997

STRAUGHAN, D.J.; LEHMAN, N. Genetic differentiation among Oregon lake populations of the *Daphnia pulex* species complex. **J Hered.**, 91, 8–17. 2000.

STRES, B., MUROVEC, B. Differences in melting temperatures of degenerated Oligonucleotides targeting nitrous oxide reductase (nosZ) Genes. **Acta agriculturae Slovenica**, v. 92, p. 75–82, 2008.

TAYLOR, M.F.J.; MCKECHNIE, S.W.; PIERCE, N.; KREITMAN, M. (1993). The lepidopteran mitochondrial control region: Structure and Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, 10(6): 1259-1272..

TAYLOR, M.F.J.; MCKECHNIE, S.W.; PIERCE, N.; KREITMAN, M. The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. **Mol Biol Evol.**, 10, 1259–1272. 1993.

VALVERDE, J.R.; BATUECAS, B.; MORATILLA, C.; MARCO, R.; GARESSE, R. The complete mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Artemia franciscana*. **J Mol Evol** 4, 400–408. 1994.

VOPEL, K.; HANCOCK, N.). More than just a crab hole. **Water and Atmosphere**, 13(3): 18-19. 2005.

WILSON, R.R. JR.; DONALDSON, K.A.; FRISCHER, M.E.; YOUNG, T. B. Mitochondrial DNA control region of common snook and its prospect for use as a genetic tag. **T Am Fish Soc**, 126, 594–606. 1997.

XIA, X., XIE, Z. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 19 92:371-373. 2001.

XIA, X., XIE, Z., SALEMI, M., CHEN, L., AND WANG, Y. An index of substitution saturation and 21 its application. **Mol Phylogenet Evol** 26:1-7. 2003.

XIA, X.; LEMEY; P. Assessing substitution saturation with DAMBE. Pp. 615-630 in Philippe Lemey, Marco Salemi and Anne-Mieke Vandamme, eds. In: *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. 2nd edition Cambridge University Press, 2009.

ZHANG D-X.; HEWITT, G.M. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Biochem Syst Ecol.**, 25, 99–120. 1997.

ZHANG, D.-X.; SZYMURA, J.M.; HEWITT, G.M. Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. **J Mol Evol** 40:382-391. 1995.

CAPÍTULO III

Posição taxonômica, diferenças mitogenômicas e relações filogenéticas do caranguejo *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura) dentro do grupo Thoracotremata a partir de *mtDNA*

Parte deste capítulo foi submetido à revista Diversity – Qualis B1– sob o título:

Mitogenomic differences between *Ucides cordatus cordatus* and *Ucides cordatus occidentalis* (Brachyura, Ocypodidae)

Resumo

Propõe-se que a identificação e diferenciação da subespécie seja examinada geneticamente. As relações filogenéticas entre *U. cordatus cordatus* e *U. cordatus occidentalis* não foram ainda examinadas usando dados moleculares. Sob estas considerações, a certeza taxonômica dessas duas subespécies ou espécies deve ser questionada. O objetivo deste estudo é esclarecer as relações entre *U. cordatus cordatus* e *U. cordatus occidentalis* usando sequências de nucleotídeos da grande subunidade ribossomal (LSUrRNA ou 16S), citocromo c oxidase I (COX-1) e também citocromo b (Cyt -b) do genoma mitocondrial como caracteres moleculares para inferência de relações filogenéticas, livre da influência ambiental e também comparando essa diferença com a das espécies de Ocypodidae estreitamente relacionadas. As amostragem de caranguejo *U. cordatus cordatus* e *U. cordatus occidentalis* foram capturados em diferentes manguezais no Brasil (areas atlântica) e no México e no Equador (areas do Pacífico). O presente estudo também incluiu o caranguejo terrestre azul *Cardisoma guanhumi* que representa uma família Brachyura , Gecarcinidae, usada como *out group* e como uma tentativa de aumentar a resolução e o suporte para os nós basais na árvore. As espécies foram identificadas morfológicamente. As amostras de tecido foram imediatamente preservadas em 20% de sulfóxido de dimetilo (DMSO) em uma solução saturada de cloreto de sódio ou em etanol a 95% até ainda ser utilizado e congelado a -20°C dentro de 12h. Todos os espécimes utilizados neste estudo eram adultos. Apesar do fato de ter sido observada uma alta divergência genética das formas do Atlântico e Pacífico do gênero *Ucides*, mostrando que pertencem ao mesmo gênero, sugere-se a inclusão de um gene mais variável para reforçar a evidência de que se tratam de duas espécies diferentes, neste estudo. Uma vez que a divergência foi examinada usando três genes mitocondriais diferentes, recomenda-se empregar um fragmento nuclear, altamente variável para detectar de forma mais expressa as diferenças genéticas entre as duas espécimes de *Ucides*.

Palavras-chave: Identificação, sequencias de nucleotideos, divergencia genetica

Abstract

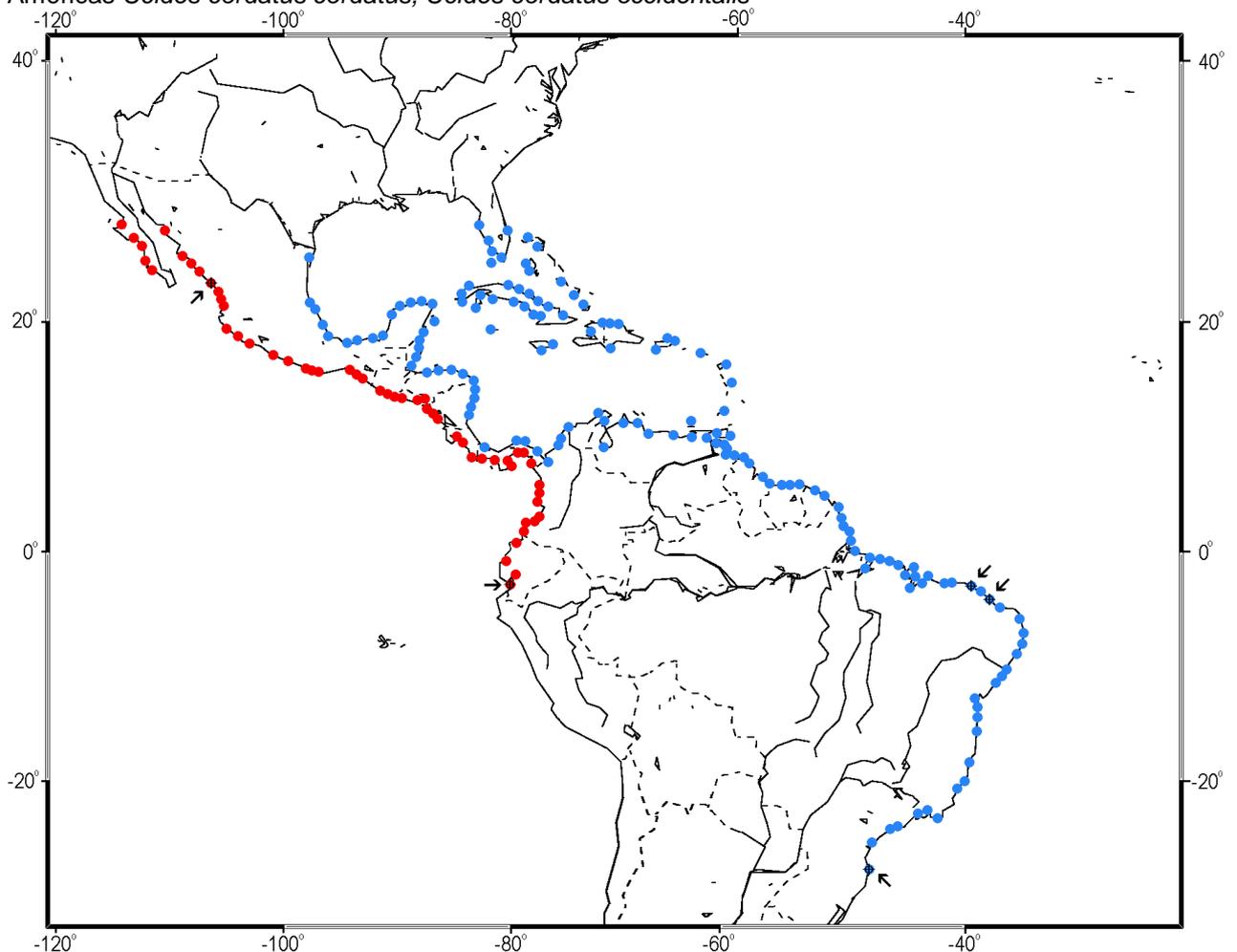
It is proposed that the identification / differentiation of the subspecies be examined at the genetic level. To date, phylogenetic relationships between *U. cordatus cordatus* and *U. cordatus occidentalis* have not been examined using molecular data. Under these considerations, the taxonomic certainty of these two subspecies or species should be questioned. The aim of this study is to clarify the relationships between *U. cordatus cordatus* and *U. cordatus occidentalis* using nucleotide sequences of the large ribosomal subunit (LSUrRNA or 16S), cytochrome c oxidase I (COX-1) and also cytochrome b (Cyt -b) of the mitochondrial genome as molecular characters for inference of phylogenetic relationships, free of environmental influence and also comparing this difference with that of closely related Ocypodidae species. The crabs *U. cordatus cordatus* and *U. cordatus occidentalis* were collected in different mangroves in Brazil (Atlantic areas) and in Mexico and Ecuador (Pacific areas). The present study also included the blue terrestrial crab *Cardisoma guanhumi* which represents a Brachyura family, Gecarcinidae, used as an out group as an attempt to increase resolution and support for the basal nodes in the tree. The species were morphologically identified. The tissue samples were immediately preserved in 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) in a saturated sodium chloride solution or in 95% ethanol until further utilized and frozen at -20 ° C within 12h. All the specimens used in this study were adults. Although a high genetic divergence of the Atlantic and Pacific forms of the genus *Ucides* was observed, showing that they belong to the same genus, it is suggested to include a more variable gene to reinforce the evidence that they are two different species in this study. Since the divergence was examined using three different mitochondrial genes, it is recommended to employ a highly variable nuclear fragment to more accurately detect the genetic differences between the two forms of *Ucides*.

Keywords: Identification, nucleotide sequences, genetic divergence.

1 INTRODUÇÃO

O caranguejo *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Ocypodidae) é um dos mais importantes invertebrados de habitats estuarinos (manguezais) nas Américas. O gênero *Ucides*, que é restrito às Américas, compreende duas subespécies atlântica *Ucides cordatus cordatus* distribuída ao longo do litoral desde a América tropical e subtropical, Flórida nos (EUA) ao sul do Brasil e ao longo do Mar do Caribe e a forma pacífica *Ucides cordatus occidentalis* distribuídos ao longo da costa do Pacífico (**Figura 1**). Além disso, a ocorrência de formas transitórias ocorreu no Norte do Peru, Colômbia e Panamá (TÜRKYAY, 1970; ALCANTARA-FILHO, 1978; DIELE, 2000). A diferenciação desta espécie em subespécies é aceita, embora se baseie na análise morfológica de apenas alguns espécimes (DIELE, 2000; RODRIGUES E HEBLING, 1989).

Figure 1 - Mapa de distribuição de espécies de *Ucides* em áreas de manguezais nas Américas *Ucides cordatus cordatus*; *Ucides cordatus occidentalis*



Fonte: (Diele 2000; Melo, 1996; Alcantara-Filho, 1978).

A compreensão da evolução dos organismos vivos e suas relações filogenéticas estão fortemente vinculadas às designações precárias das espécies/subespécies (ENDLER, 1989). Além disso, a clareza sobre o status taxonômico do organismo ajuda a estabelecer estratégias eficientes de gerenciamento e conservação de importantes recursos genéticos. As diferenças de distribuição e abundância podem ser um reflexo da diferenciação no nível taxonômico e/ou nos padrões de diversidade e estrutura genética da população. Propõe-se que a identificação/diferenciação da subespécie seja examinada no nível de traços genéticos (AVISE;BALL,1990). as relações filogenéticas entre *U. cordatus cordatus* e *U. cordatus occidentalis* não foram examinadas usando dados moleculares.

Sob estas considerações, a certeza taxonômica dessas duas subespécies ou espécies deve ser questionada: pode *Ucides cordatus cordatus* (forma do Oceano Atlântico) e *Ucides cordatus occidentalis* (forma do Oceano Pacífico) serem tratados como subespécies ou são espécies alopátricas distintas?

Geralmente aceita-se que a família Ocypodidae seja subdividida em cinco subfamílias: Ocypodinae Rafinesque, 1815; Dotilinae Stimpson, 1858; Macrophtalmina Dana, 1851, Camptandriinae Stimpson, 1858 e Heloeciinae Milne Edwards, 1837 (Türkay, 1970; Manning e Holthuis, 1981; Fielder e Greenwood, 1985; Coelho, 1995). Türkay (1983) e Dielle (2000) sugerem que o gênero *Ucides* deve ser incluído na subfamília Heloeciinae ou mesmo em uma família separada, Ucididae (CHACE;HOBBS, 1969; TÜRKAY, 1970; NG et al., 2008). Por outro lado, Rodrigues e Hebling (1989) indicam que o gênero *Ucides* pertence à subfamília Ocypodinae e Števcíć (2005) e Shih et al., (2016) propuseram uma subfamília Ucidinae de Ocypodide diferente, mostrando que a sua posição taxonômica no nível da subfamília também seja incerta e controversa. Com base nestas observações, as relações filogenéticas em relação ao gênero *Ucides* foram questionadas:

a) O gênero *Ucides* realmente pertence à família Ocypodidae ou Gecarcinidae?

b) Considerando que *Ucides* está incluído na família Ocypodidae, em que subfamília devem ser agrupados: Ocypodinae, Heloeciinae ou Ucidinae?

Portanto, as relações filogenéticas e a posição de *U. cordatus* dentro do infraordem Brachyura precisam ser reexaminadas usando mais dados moleculares.

Além disso, não foram realizadas análises de diversidade de estoque, embora se saiba que a fase larvária do caranguejo *U. cordatus* é dispersa no estuário e levada para longe na costa e, portanto, submetida a diferentes padrões de superfície atual (DIELE, 2000). Um estudo de identificação de estoque é relevante para estabelecer estratégias de gerenciamento e conservação desse importante recurso.

Para responder a estas questões, o presente estudo usou sequências de nucleotídeos de porções do RNA ribossômico de grande subunidade (LSUrRNA), citocromo c oxidase 1 (COX-1) e citocromo b (Cyt-*b*) do genoma mitocondrial como possíveis caracteres moleculares para inferência de relações filogenéticas, livres da influência ambiental e a posição taxonômica do manguezal *Ucides cordatus* dentro da infraferência Brachyura, grupo Thoracotremata.

Esses genes mitocondriais têm sido utilizados para inferir relações filogenéticas e posição taxonômica em família e subfamília e nível de espécies muito bem sucedidas em crustáceos como camarão (MAGGIONI, 2001), lagosta (TAM, KORNFIELD, 1998) e caranguejos (LEVINTON et al., 1996). Além disso, há relatos que apresentam variações suficientes em algumas espécies para serem úteis em estudos de nível populacional (PALUMBI, 1991, SCHUBART et al, 2001).

As sequências de DNA mitocondrial parcial obtidas também podem ser usadas para a identificação de larvas e juvenis em regiões estuarinas para a detecção do fluxo de ambos os estágios da vida, o que pode influenciar a distribuição e a abundância de populações adultos bentônicas. O estágio larvário do caranguejo *Ucides cordatus* é disperso no estuário e levado para longe na costa e, portanto, submetido a padrões de superfície diferentes (DIELE, 2000).

O objetivo deste estudo foi esclarecer as relações entre *U. cordatus cordatus* e *U. cordatus occidentalis* usando sequências de nucleotídeos do RNA ribossômico de subunidade grande (LSUrRNA ou 16S), citocromo c oxidase I (COX-1) e também citocromo b (Cyt -*b*) do genoma mitocondrial como caracteres moleculares para inferência de relações filogenéticas e posição taxonômica, livre da influência ambiental, e também comparar essas diferenças genéticas mitocondriais com outras espécies de Ocypodidae.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e preservação de amostras

Amostras de caranguejo eurialinos *Ucides cordatus cordatus* e *Ucides cordatus occidentalis* foram capturados de 2006 até 2009 em diferentes manguezais no Brasil (Atlântico), no México e Equador (Pacífico). O presente estudo também incluiu representantes de espécies da mesma família de Ocypodidae, estreitamente relacionados, e , espécies das família Gecarcinidae (**Tabela 1**). *Eurytium limusum* e *Panopeus harttii* que representam uma família Brachyura diferente, foram utilizados como grupo externo (*outgroup*) em uma tentativa de aumentar a resolução e suporte para os nós basais em grupo (MADDISON et al., 1984).

Para todas as espécies, o DNA de mais de três espécimes foi sequenciado para confirmar os resultados obtidos e testar as diferenças populacionais. As espécies foram identificadas morfológicamente usando as chaves propostas por Coelho (1995) e Melo (1996). As amostras de tecido fresco das pernas ou (pereopodes) foram imediatamente preservadas em 20% de Dimetilsulfóxido (DMSO) em uma solução saturada de cloreto de sódio (AMOS, HOELZEL, 1991; DAWSON et al., 1998) ou em etanol a 95% uso posterior, e depois congelado a -20°C dentro das 12h. Todos os espécimes utilizados neste estudo eram adultos.

Tabela 1 - Caranguejos de manguezais usados para sequenciamento e análises filogenéticas.

Espécie	N	Família	Sub-família	Habitat	Local de coleta
<i>Ucides c. cordatus</i>	5	?	?	Mangue	Santa Catarina – Brazil
<i>Ucides c. cordatus</i>	5	?	?	Mangue	Caucaia – Brazil
<i>Ucides c. cordatus</i>	5	?	?	Mangue	Almofala – Brazil
<i>Ucides c. cordatus</i>	5	?	?	Mangue	Piauí- Brazil
<i>Ucides c. cordatus</i>	5	?	?	Mangue	Sao Paulo – Brazil
<i>Ucides c. occidentalis</i>	5	?	?	Mangue	Mazatlan - Mexico
<i>Ucides c. occidentalis</i>	5	?	?	Mangue	Equator - Guayaquil
<i>Ocypode quadrata</i>	5	Ocypodidae	Ocypodinae	Areia da praia	Almofala - Brazil
<i>Uca rapax</i>	3	Ocypodidae	Ocypodinae	Mangue	Caucaia - Brazil
<i>Uca maracoani</i>	5	Ocypodidae	Ocypodinae	Mangue	Caucaia - Brazil
<i>Uca uruguayensis</i>	3	Ocypodidae	Ocypodinae	Mangue	Argentina
<i>Uca inversa</i>	5	Ocypodidae	Ocypodinae	Mangue	United Arab Emirates
<i>Uca pugilator</i>	3	Ocypodidae	Ocypodinae	Mangue	Museum Collection
<i>Uca annulipes</i>	3	Ocypodidae	Ocypodinae	Mangue	United Arab Emirates
<i>Uca hesperiae</i>	3	Ocypodidae	Ocypodinae	Mangue	United Arab Emirates
<i>Uca tangeri</i>	3	Ocypodidae	Ocypodinae	Mangue	United Arab Emirates
<i>Uca sp.</i>	3	Ocypodidae	Ocypodinae	Mangue	Equator - Guayaquil
<i>Heloecius cordiformis</i>	3	Ocypodidae	Heloeciinae	Mangue	Australia
<i>Macrophthalmus depressus</i>	3	Ocypodidae	Macrophthalminae	Mangue	United Arab Emirates
<i>Cardisoma guanhumi</i>	6	Gecarcinidae	-	Mangue	Caucaia - Brazil
<i>Goniopsis cruentata</i>	3	Grapsidae	-	Mangue	Caucaia - Brazil
<i>Eurytium limosum</i>	3	Xanthidae/ Panopeidae	-	Mangue	Caucaia - Brazil
<i>Panopeus harttii</i>	3	Xanthidae/ Panopeidae	-	Mangue	Caucaia - Brazil
<i>Gecarcinus quadratus</i>	3	Gecarcinidae	-	Mangue	Mazatlan - Mexico
<i>Cardisoma crassum</i>	3	Gecarcinidae	-	Mangue	Mazatlan - Mexico

2.2 Extração de DNA

A extração do DNA genômico total foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI. O DNA foi extraído do tecido muscular (pleópodes) usando DNeasy™ Tissue Kit (Qiagen) ou fenol/clorofórmio/alcool isoamyl (25:24:1, v:v:v) com SDS/proteinase-K (SAMBROOK et al., 1989). O DNA foi isolado por precipitação com etanol (2:1 com 100% etanol

gelado). O álcool foi removido completamente e o sedimento foi seco. Chaela ou pernas foram selecionadas como tecido alvo para a extração de DNA em vez de qualquer outra parte por se tratar um processo não letal e também porque o tecido muscular deve conter uma maior quantidade de mitocôndrias. O DNA isolado foi visualizado por electroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão de pH 8,0 TBE e pós-corado com brometo de etídio (1 mg/L) a 1,5 volts/cm².

2.3 Testes de *primers* universais

Os *primers* universais descritos na **Tabela 2** foram utilizados para amplificar sub-regiões das regiões 16S, COI e Cyt-b do genoma mitocondrial. Cada 20 µL de reação continha 10-50 ng de DNA modelo; 2,0 unidades de *Taq* DNA polymerase (Qiagen), 0,2 µM de cada *primer*, Q-solução (Qiagen); 1,5 mM de MgCl₂ e 0,25 mM de dNTPs (Applied Biosystems). Um controle negativo com os reagentes acima sem a adição do DNA molde foi incluído em todas as reações de PCR. As condições de PCR são também descritas na **Tabela 2**. Todas as reações foram seguidas por um passo de extensão final de seis minutos a 72°C. As reações foram realizadas em um termociclador programável Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems Inc.). Após a amplificação, as reações foram visualizadas num gel de agarose a 1% e o tamanho dos produtos foi comparado com um marcador molecular padrão de 50 (Invitrogen).

Tabela 2.- Lista de iniciadores de DNA mitocondrial selecionados e / ou otimizados neste estudo para o estudo de filogenia de caranguejos de manguezal.

Região do <i>mtDNA</i>	Referência	Nome dos primers e sequência de DNA (5'-3')	Condições ótimas da PCR		Resultado* ²
			Ta* ¹ / [MgCl ₂]	Condições de ciclos	
Grande subunidade RNA ribossômico (LSUrRNA)	Palumbi (1996)	16S ar: 5'- CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3' 16S br: 5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'	54-60°C/2.5 mM	94°C - 1 min Ta°C - 1 min 72°C - 1 min ×30	Adequado para todas as espécies de caranguejo. Resultados claros e reproduzíveis.
Citocromo -b (Cyt-b)	Palumbi (1996)	GLUDG-L: 5'- TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG T-3' GLU-L-SH: 5'- TGC ATT GAA AAT GCA TTG TAT T-3'	45-60°C/1.0-3.0 mM	Várias testadas	Sem amplicons.
	Merritt <i>et al.</i> (1998)	Cyt-bF: 5'- TGT GGR GCN ACY GTW ATY ACT AA -3' Cyt-bR: 5'- AAN AGG AAR TAY CAY TCN GGY TG -3'	52°C/2.0 mM	94°C - 1 min Ta°C - 1 min 72°C - 2 min ×35	Adequado para todas as espécies de caranguejo. Resultados claros e reproduzíveis.
Citocromo oxidase I (COX1)	Palumbi (1996)	CO1a-H: 5'- AGT ATA AGC GTC TGG GTA GTC -3' CO1f-L: 5'- CCT GCA GGA GGA GGA GAY CC -3'	57-61°C/2.0 mM	94°C - 1 min Ta°C - 1 min 72°C - 1 min ×30	Adequado para todas as espécies de caranguejo. Resultados claros e reproduzíveis.
	Palumbi (1996)	CR-L-16007: 5'- CCC AAA GCT AAA ATT CTA A -3' CR-H-00651: 5'- TAA CTG CAG AAG GCT AGG ACC AAA CCT -3'	45-60°C/1.0-3.0 mM	Várias testadas	Sem amplicons
Região Controle	Este estudo	12S-Fb1: 5'- ATG TAC ATA TCG CCC GTC GC -3' tRNA-Ru1: 5'- CCR NKA GCT TWA HTT AGC TTA -3'	45-60°C/1.0-3.0 mM	Várias testadas	Fragmentos não específicos, inconsistência.
	Este estudo	12S-Fb1: 5'- ATG TAC ATA TCG CCC GTC GC -3' tRNA- Ru2: 5'- GGG KYA TGA RCC CRN KAG CTT -3'	45-60°C/1.0-3.0 mM	Várias testadas	Fragmentos não específicos, inconsistência.

*¹ Temperatura de anelamento; *² Adequação como marcador genético para espécies de caranguejo de mangue (Brachyura).

2.4 Amplificação de mtDNA para sequenciamento

Os segmentos de genes mitocondriais, LSUrRNA (16S), COX-1 e Cyt-b foram amplificados a partir do DNA total pelas as reação em cadeia da polimerase (PCR) de cada amostra de DNA individual com *primers* conservados. As sequências dos *primers* também são descritas na **Tabela 2**.

Cada reação de PCR de 20 μ L continha 10 ng do DNA extraído, diluído em ddH₂O (1:10), 3,3 μ L de 10x tampão de PCR (Qiagen); 1,6 μ L de dNTPs a 10 mM, 4,0 μ L de 5x Q-solução (Qiagen); 1,0 μ L de cada *primer* (10 μ M); 0,2 μ L de *Taq* DNA polimerase (5 U/ μ L) e 6,9 μ L de UVi Milli-Q H₂O. Todas as reações apresentaram controles negativos, que consistiam em todos os reagentes de PCR sem DNA molde. As reações foram realizadas em termociclador programável, Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems Inc.) usando 30 ciclos de um min a 94°C , um min em Ta°C (Tabela 2), um min a 72°C; o passo de desnaturação inicial a 94°C durante 4 min e a extensão final a 72°C durante seis min.

Após a amplificação, as reações foram visualizadas num gel de agarose a 2,0% e o tamanho dos produtos foi comparado com um marcador molecular padrão de 50 (Invitrogen).

2.5 Purificação de produtos de PCR e sequenciamento

A fim de remover o excesso de iniciadores e nucleotídeos e concentrar os fragmentos de PCR amplificados, as reações foram purificadas com Qiagen Qiaquick PCR Purification (Cat. No. 28106), conforme as instruções do fabricante. Os produtos de amplificação de cadeia dupla purificados foram utilizados como modelo nas reações de sequenciamento.

O sequenciamento do ciclo foi realizado utilizando o kit de reação ABI Prism BigDye Terminator Ready (nº de cat. 4303152) que contém AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os volumes da solução de Reação pronta recomendada foram reduzidos para metade para fazer "meia reação". A cada metade da reacção (10 μ L) adicionou-se 4,0 μ L de BigDye, 4 ,0 picomoles de iniciador (0,5 μ L) e uma quantidade suficiente de produtos de PCR, geralmente foram adicionados 3 a5 μ L e finalmente HPLC H2O UV.

A quantidade de DNA utilizada na reação de sequenciamento variou de acordo com o tamanho do fragmento PCR (bases) de todo o molde de DNA e

também o rendimento dos fragmentos PCR após a purificação por PCR. Tipicamente, foram utilizados 5-20 nanogramas para cada 300-1000 bases de modelo de DNA.

O início do ciclo começou com a desnaturação a 96°C por 20 segundos, anelamento dos primers a 50°C por 10 segundos, e extensão a 60°C por 4 minutos. Este ciclo foi repetido durante por 30 vezes em um termociclador programável (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems, Foster City, CA). Os produtos de sequenciação de ciclos foram purificados pelos kits Qiagen DyeEx Spin (n. ° 63104) para remover os terminadores BigDye fluorescentes não reagidos. As reações purificadas foram secas em um hotblock. As amostras foram então carregadas em um gel de sequenciamento de 48 cm, bem lido, feito de concentrado Page Plus 40% (Amresco, Solon, OH) até uma concentração final de acrilamida a 5% e ureia 6M. A eletroforese foi realizada durante nove horas a 51°C no ABI Prism Model 377 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado com um computador Macintosh Power PC G3 com software de análise de sequenciação (versão 3.3). Todos os produtos de PCR foram sequenciados tanto em direção direta como reversa para verificação.

2.6 Alinhamento de Sequências e Análises Filogenética.

As sequências amplificadas do gene do caranguejo foram inicialmente submetidas ao BLAST/NCBI (Altschul et al., 1990). Buscou-se aqui uma confirmação adicional da identidade genética com base em semelhanças entre as sequências isoladas e os dados publicados anteriormente de espécies estreitamente relacionadas. As sequências diretas e reversas, para cada indivíduo para a região do DNA mitocondrial, foram inspecionadas por olho com o auxílio do software de edição de sequência EDITSEQ do LASERGENE Software Package disponível no School of Medicine Information System (MEDIS, University of Southampton, Reino Unido).

As sequências de nucleotídeos de uma determinada espécie também foram confirmadas por referência aos dados de sequência de pelo menos três indivíduos. As sequências homólogas de todas as espécies foram alinhadas usando MEGALIGN (Pacote LASERGENE) com os seguintes conjuntos de parâmetros: penalidade de intervalo 5-10 e penalidade de comprimento de intervalo 1-5. O

alinhamento foi verificado pelo olho. As sequências de consenso para cada espécie/população foram extraídas do conjunto inicial.

Todas as novas sequências de nucleótidos produzidas para este estudo serão submetidas ao banco de dados GenBank (National Center for Biotechnology Information).

As análises evolucionárias filogenéticas e moleculares foram analisadas utilizando distâncias os parâmetros de Kimura dois, análise de cluster de UPGMA e análise de distância de junção de vizinhança (NJ) (SAITOU , NEI, 1987) com o programa MEGA versão 2.1 (KUMAR et al., 1993). Foi utilizada uma correção de gama para explicar a mutação não uniforme em todas as posições de nucleotídeos.

O parâmetro de forma gamma foi escolhido para ser 0,44; o que significa que a maioria das posições de nucleotídeos têm uma baixa taxa de substituição, mas algumas posições têm uma alta taxa de mutação. Yang (1996) estimou que o parâmetro da forma era de 0,44 para as sequências de genes que codificavam a proteína mitocondrial de 16 espécies de deuterostomes. O significado estatístico dos grupos dentro das árvores inferidas foi avaliado pelo método do ramo interior (RZHETSKY, NEI, 1992).

Como um segundo método filogenético, uma análise máxima de parcimônia (MP) foi realizada com uma pesquisa heurística e adição de sequência aleatória (oração de árvore e reconexão como opção de troca de ramo) e por omissão de lacunas com o programa PAUP * v4.0b10 (SWOFFORD, 2001). Para avaliar os níveis de significância e a consistência dos nós (topologia de árvore) derivadas pelas análises filogenéticas, foram realizados o método de replicação de bootstrap heurístico 2000 do conjunto de dados original. A visualização e o desenho da árvore foram realizados usando o TreeView version 1.5 (Page, 1996).

O número de sítios informativos variáveis e potencialmente filogenéticas, diversidades de nucleotídeos e divergências dentro de populações e espécies foram calculados pelo programa DNAsp v.3.53 (ROZAS , ROZAS, 1999). Todos os sítios contendo lacunas (inserção/exclusão) ou informações faltantes foram removidos antes de uma análise posterior.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise de Sequência do gene LSUrRNA

Os resultados das buscas no BLAST obtiveram correspondências extremamente significativas com rRNA 16S de caranguejos para as famílias Ocypodidae e Gecarcinidae. As sequências de 16S rRNA de até 570 pares de bases foram obtidas de todas as espécies investigadas. No entanto, foram utilizados alinhamentos até 476 pb para análises evolutivas filogenéticas e moleculares (Tabela 3). A partir deste número total de sítios no alinhamento da sequência LSUrRNA; 334 sítios eram constantes (monomórficos) e 124 caracteres eram polimórficos, com 147 mutações no total.

Tabela 3 - Composição de nucleotídeos de todas as espécies de caranguejo examinadas para o fragmento LSUrRNA.

Espécies	Nucleotídeos						Total
	T	C	A	G	A+T	C+G	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	36,1	9,9	35,3	18,7	71,4	286	476
<i>Ucides c. cordatus</i>	36	10,1	34,7	19,2	70,7	29,3	475
<i>Uca maracoani</i>	35,6	11	35,1	18,3	70,7	29,3	464
<i>Ocypode quadrata</i>	33	10,9	34,8	21,3	67,8	32,2	460
<i>Cardisoma guanhumi</i>	34,2	10	34,2	21,6	68,4	31,6	468
média ± SD	35±1,3	10,4±0,5	34,8±0,4	19,8±1,5	69,8±1,6	30,2±1,6	-

A região parcial 16S para essas taxa foi 69,8% A + T rica, que é semelhante ao viés A/T relatado entre espécies de crustáceos, (OVENDEN et al. 1997) e é relatada para insetos por (LUNT et al., 1996). O teor de nucleotídeos foi em média 35% T; 10,4%; 34,8% A e 19,8% G, com muito pouco desvio entre as taxa. O número total de transições e transversões foi respectivamente 64 e 31, resultando em uma relação de transição/transversão de 2,1.

As diferenças de sequência entre os táxons consistiram em substituições de pares de bases simples e 22 mutações de indel (Figura 2). Destas 22 lacunas, três regiões tinham mais de um indel de 2,0 pb. O restante dessas mutações consistiu em um único par de bases simples. As lacunas foram tratadas como dados perdidos e não foram consideradas nas análises filogenéticas.

Figura 2:- Sequências alinhadas de um gene LSURRNA parcial de todas as espécies de caranguejo usadas para análises filogenéticas em formato não intercalado.

		10	20	30	40	50	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	1	AAAAGTCTAGCCTGCCCACTGATAATA	GTGATT	TTAAAGGGCCGCGGTA			50
<i>Ucides c. cordatus</i>	1	AAAAGTCTAGCCTGCCCACTGATAATA	GTG-TTT	TAAAGGGCCGCGGTA			49
<i>Uca maracoani</i>	1	AGAAAGTCTGATCTGCCCACTGATA	TTAA	TTAAAGGGCCGCGGTA			45
<i>Ocypode quadrata</i>	1	AAAGAGTCTAATCTGCCCGCTGAAATGA		TTAAAGGGCCGCGGTA			44
<i>Cardissoma guanhumi</i>	1	AAAAGAGTCTAACCTGCCCACTGATA	AAA	TTAAAGGGCCGCGGTA			44
		60	70	80	90	100	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	51	ATTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAAATCGTTAGT	TTTTTAATTGGAATCTT				100
<i>Ucides c. cordatus</i>	50	ATTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAAATCGTTAGT	TTTTTAATTGGAATCTT				99
<i>Uca maracoani</i>	46	ATCTGACCGTGCAAAGGTAGCATAAATAGTTAGT	TTTTTAATTGGAATCTT				95
<i>Ocypode quadrata</i>	45	ATTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAAATCGTTAGT	TTTTTAATTGGAATCTT				94
<i>Cardissoma guanhumi</i>	45	TTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAAATCGTTAGT	TTTTTAATTGGAATCTT				94
		110	120	130	140	150	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	101	GTATGAATGTTTGACAAAAGAAAATCTGTCTCTAT	TTTTTCTCTT	CGAA			149
<i>Ucides c. cordatus</i>	100	GTATGAATGTTTGACAAAAGAAAATCTGTCTCTAT	TTTTTCTCTT	CGAA			148
<i>Uca maracoani</i>	96	GTATGAATGATTGGACAAAAGAAAATCTGTCTCTA	GCTTTTATC	CGAA			144
<i>Ocypode quadrata</i>	95	GTATGAATGATTGGACAAAGGGGAACTGTCTCTAT	GTTTATTCT	CGAA			143
<i>Cardissoma guanhumi</i>	95	GTATGAATGTTTGACAAAAGAAAATCTGTCTCTAT	GGCTATAAAG	CGAA			144
		160	170	180	190	200	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	150	TTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAATAG	TTTAAAAAGCAGATAAGACC				199
<i>Ucides c. cordatus</i>	149	TTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAATAG	TTTAAAAAGCAGATAAGACC				198
<i>Uca maracoani</i>	145	TTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAATAT	TTTAAAAAGCAGATAAGACC				194
<i>Ocypode quadrata</i>	144	TTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAATTT	TTTAAAAAGCAGATAAGACC				193
<i>Cardissoma guanhumi</i>	145	TTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAAT	GAATTAAGGGACGATAAGACC				194
		210	220	230	240	250	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	200	CTATAAAGCTTTATAAAATGTTTGTACTAAGCTGAATTAAT	TTTAAATA				246
<i>Ucides c. cordatus</i>	199	CTATAAAGCTTTATAAAATGTTTGTATTAAAGCTGAATGGT	TTTAAATA				245
<i>Uca maracoani</i>	195	CTATAAAGCTTGATAAAATCGATA-TTATTGGTTAAATGGT	TTTAAATA				239
<i>Ocypode quadrata</i>	194	CTATGAAGCTTGATAAAATCGATAAAT-T-ATTAACTGAATTA	TTTAAATA				237
<i>Cardissoma guanhumi</i>	195	CTATAAAGCTTGATATGTAAGTT-TTATTAGTTGAATTTTACC	GATATA				243
		260	270	280	290	300	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	247	ATAGTTTGTAGTAAGAGAAGTTTATTTTATTGGGGCGATAG	TGGTAAATGT				296
<i>Ucides c. cordatus</i>	246	ATAGTTTGTAGTAAGGAAGTTTATTTTATTGGGGCGATAG	TGGTAAATGT				295
<i>Uca maracoani</i>	240	AAAATTAATGGTT-GAATTTATTTTGTGGGGCGACAAAT	AGTAAATGG				288
<i>Ocypode quadrata</i>	238	AAAGTTGAGTGGTT-GAATTTATTTTGTGGGGCGACAAAT	GGTAAATGA				286
<i>Cardissoma guanhumi</i>	244	AAGGTTTGTAGTAATTTGGAAGTATTGTTATTGGGGCGATAA	AGGTAATGA				293
		310	320	330	340	350	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	297	TTATTAACCTGTTAAAATTTTAAAGACAAAATATAGTTGAGT	AAAAGTTGTATA				346
<i>Ucides c. cordatus</i>	296	TTATTAACCTGTTAAAATTTTAAAGACAAAATATAGTTGAGT	AAAAGTTGTATA				345
<i>Uca maracoani</i>	289	TTACTAACCTGCTAAAATTTTAAACAGTTTATAAATGGT	TTAAAATATA				336
<i>Ocypode quadrata</i>	287	TTATTAACCTGCTAAAATTTAAG-ACAAAATAAGTGAATGA	AGGTGTA				333
<i>Cardissoma guanhumi</i>	294	TTGTTAACCTGCTTTTGGTTTAA-ACAAAAGGTAGGTGAT	TGAAATGTA				340
		360	370	380	390	400	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	347	AATTGATCCTGGAAATATAGATTAAGTTTAAAGTTACTTT	TAGGGATAACA				396
<i>Ucides c. cordatus</i>	346	AATTGATCCTGAAATACAGATTAAGTTTAAAGTTACTTT	TAGGGATAACA				395
<i>Uca maracoani</i>	336	-AATGATCCTTGT-TAAAGATTAAGTTTAAAGTTACTTT	TAGGGATAACA				384
<i>Ocypode quadrata</i>	333	-AATGAACCTTGA-TG-AGATTGGAAGATTAAGTTACTTT	TAGGGATAACA				380
<i>Cardissoma guanhumi</i>	340	-AAGATCCTAGT-TATGATTAAGTTTAAAGTTACTTT	TAGGGATAACA				388
		410	420	430	440	450	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	397	GCGTTATTTTTTTTGGAGAGTTTCAATATCGAAAAAAGTT	TGCGACCTCGA				446
<i>Ucides c. cordatus</i>	396	GCGTTATTTTTTTTGGAGAGTTTCAATATCGAAAAAAGTT	TGCGACCTCGA				445
<i>Uca maracoani</i>	385	GCGTTATTTTTTTTGGAGAGTCTTATCGAAAAGAAAAGTT	TGCGACCTCGA				434
<i>Ocypode quadrata</i>	381	GCGTTATTTTTTTTGGAGAGTCTTATCGAAAAAAGTT	TGCGACCTCGA				430
<i>Cardissoma guanhumi</i>	389	GCGTTATTTTTTTTGGAGAGTCCAATATCGAGAAAAAAGTT	TGCGACCTCGA				438
		460	470	480			
<i>Ucides c. occidentalis</i>	447	TGTTGAATTAATAATGCTCTGTACAATTGCAG					476
<i>Ucides c. cordatus</i>	446	TGTTGAATTAATAATGCTCTGTACAATTGCAG					475
<i>Uca maracoani</i>	435	TGTTGAATTAATAATTTCCGCTTAATTTGTAG					464
<i>Ocypode quadrata</i>	431	TGTTGAATTAATAATGCCTATACAATTGCAG					460
<i>Cardissoma guanhumi</i>	439	TGTTGAATTAATAATATCTGTACAATTGCAG					468

Usando o gene LSUrRNA sete substituições de único par base (bp) e 1 indel distinguem o *Ucides occidentalis* mexicano / equatoriano e *U. cordatus* do Atlântico, indivíduos de *cordatus*, representando 1,7% de divergência. É possível que o mtDNA de 16S esteja simplesmente evoluindo muito devagar para detectar grandes divergências entre as formas de *Ucides* do Pacífico e do Atlântico.

3.2 A reconstrução da árvore filogenética inferida do gene LSUrRNA

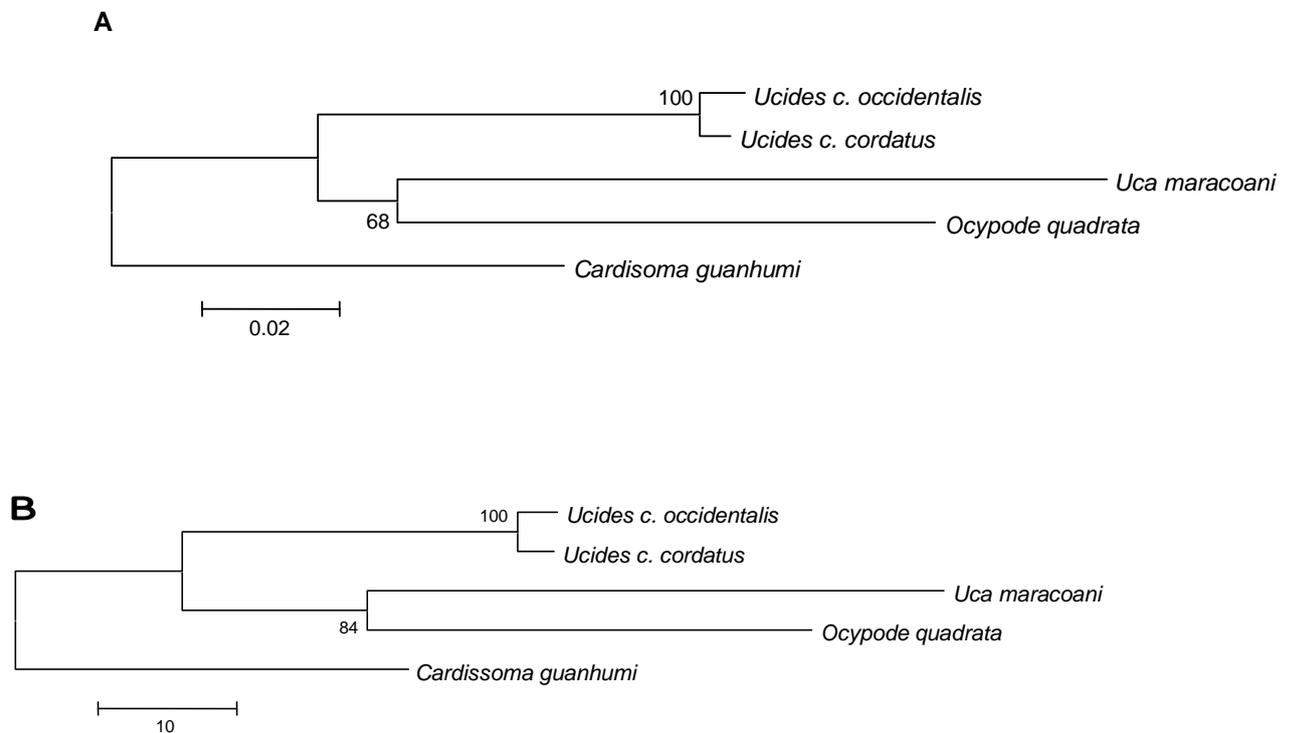
O alinhamento incluiu sequências de 476 pb. As divergências de sequência em pares baseadas no modelo de parâmetros de Kimura-dois, **Tabela 4**, que corrige o viés de transição 2:1 nas substituições de nucleotídeos de mtDNA, foram consistentemente menores no 16S do que nas regiões COX-1 e Cyt-b. Isto sugere que o gene LSUrRNA é mais conservado do que os genes de codificação de proteínas COX-1 e COB em *Ucides*, um achado semelhante ao relatado para espécies de diversos gêneros de insetos (SIMON et al., 1994). Os genes de RNA ribossômico (LSU e SSU) são muito distintos, codificando uma estrutura de RNA funcional dentro do ribossoma.

Tabela 4. - Matriz de distâncias genéticas corrigida pelo parâmetro Kimura-2 utilizando o gene LSUrRNA.

Espécies	<i>Ucides c. occidentalis</i>	<i>Ucides c. cordatus</i>	<i>Ocypode quadrata</i>	<i>Uca maracoani</i>	<i>Cardisoma guanhumi</i>
<i>Ucides c. occidentalis</i>		0.011	0.175	0.156	0.158
<i>Ucides c. cordatus</i>	0.011		0.166	0.159	0.158
<i>Ocypode quadrata</i>	0.175	0.166		0.182	0.217
<i>Uca maracoani</i>	0.156	0.159	0.182		0.181
<i>Cardisoma guanhumi</i>	0.158	0.158	0.217	0.181	

A árvore filogenética construída usando o mesmo modelo evolutivo com distâncias de sequência em pares por NJ e MP é mostrada na Figura 3. As topologias de árvores idênticas resultaram da reconstrução de árvores filogenéticas usando métodos de NJ e MP. A diversidade geral de nucleotídeos foi de 0,14.

Figura 3. - Árvores de Neighbor-Joining (A) e máxima parcimônia (B) para fragmento de LSURrRNA. O modelo de distâncias Kimura-2-parâmetro foi usado para reconstrução de árvores. Os números são valores de bootstrap para 2000 repetições



A análise filogenética do LSURrRNA mitocondrial, incluindo Ocypodides de outros gêneros, não encontrou suporte para o apoio à diferenciação de *Ucides* dos oceanos Atlântico e Pacífico em duas espécies distintas. Com os métodos de NJ e MP, as análises de bootstrapping, um método para avaliar a confiança em uma topologia de árvore, mostram os aglomerados do Atlântico e do Pacífico em conjunto em níveis muito elevados de confiança. No entanto, o gene 16S parece estar muito conservado para avaliar com precisão as relações entre essas subespécies.

3.3 Análise de Sequência COX-1

As sequências de DNA foram traduzidas usando o EMBOSS-Transeq (RICE et al. 2000) disponível no European Bioinformatics Institute (EBI/EMBL). Não continha mutações de mudança de quadro ou codons de terminação permitindo assim a comparação em pares de sequências ortográficas. As sequências de COX-1 de até 645 pares de bases foram obtidas de espécies investigadas. No entanto, alinhamentos até 572 pb foram utilizados para análises evolutivas filogenéticas e moleculares. A partir deste número, 328 sítios eram monomórficos e 240 eram

polimórficos (79 sitios polimórficos informativos de parcimônia), com 299 mutações no total

A região parcial COX-1 para esses taxa foi 62,7% A + T rica (**Tabela 5**). O teor de nucleotídeos foi em média de 28,5% T, 16,4% C, 34,2% A e 21,1% G, com pouco desvio entre os táxons (SD max foi de 2,5). O número total de transições e transversões foi, respectivamente, 61 e 66, resultando em uma relação de transição/transversão para este gene codificador de proteína de 1.1.

Tabela 5 - Composição de nucleotídeos de todas as espécies de caranguejo examinadas para o fragmento COX-1.

Espécies	Nucleotides					
	T	C	A	G	A+T	C+G
<i>Ucides c. occidentalis</i>	27,5	16	35,1	21,4	62,6	37,4
<i>Ucides c. cordatus</i>	29,7	14	35	2,3	64,7	35,3
<i>Ocypode quadrata</i>	27,5	17,2	34	21,4	61,5	38,6
<i>Cardisoma guanhumi</i>	27,8	18,6	30,1	23,6	57,.	42,2
<i>Uca inversa</i>	29,8	15,4	36,8	17,9	66,6	33,3
Média ± SD	2,5 ± 1,2	16,2 ± 1,8	34,2 ± 2,5	21,1 ± 2,0	62,7 ± 3,3	37,4 ± 3,4

As diferenças de sequência entre todos os taxa consistiram em substituições de pares de bases simples e cinco mutações de indel (Figura 4). Destas cinco lacunas, apenas uma região tinha um indel de 2 Pb. O restante dessas mutações consistiu em um único par de bases simples. As lacunas foram tratadas como dados perdidos e não foram consideradas nas análises filogenéticas. A diversidade geral de nucleotídeos foi de 0,22.

Figure 4 - Sequências alinhadas de um gene COX-1 parcial de todas as espécies de caranguejo usadas para análises filogenéticas, em formato não intercalado.

			10	20	30	40	50	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	1	AA	GTGTTGGGG-GAAGAAGGTTA	TATT	AACTCCAATAAATGTTACTAGGA			49
<i>Ucides c. cordatus</i>	1	AA	TGTTGAGG-GAAGAAGGTTAAATTGACTCCAATAAATGTTACTAGAA					49
<i>Ocypode quadrata</i>	1	TCTCCTCCTCCTGACAGGAGTTAAATTTACTCCAATAAATGTTACTAAGA						50
<i>Cardisoma guanhumi</i>	1	GA	ATGTTGGGGGAAAAACC	GTTAAGTGGACCCAAATAATGTTCCCTAAAA				50
<i>Uca inversa</i>	1	AA	GTGTTGAGG-GAAAAAGGTTAAATTAACTCCAATAAATGTTACTAGGA					49
			60	70	80	90	100	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	50	AA	TGTATTTTCAGTCATTTAGGGTTT	AATGAAAGGCCTGTAAATAGGGAA				99
<i>Ucides c. cordatus</i>	50	AG	TGTATTTTATGTTATTTAGGGTTT	TAGTGAAAGGCCTGTAAATAGGGAG				99
<i>Ocypode quadrata</i>	51	AA	TGTATTTTAAGTCATTTAGGATTT	TAGTGATAAACCTGTTATTAAGAA				100
<i>Cardisoma guanhumi</i>	51	GAG	GCTTTTATGTCCTTTAAGGGTTAAGGGTT	ACCCCTGTTTATAGGGAA				100
<i>Uca inversa</i>	50	AA	TGTATTTTAAGTCATTTAGTGTTAAGAGAAAGCCCTGTTATAAGTGA					99
			110	120	130	140	150	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	100	AA	TCAAGTGGCAATTCC	TGCGAAAATACCAAATACGGCTCCTATAGAAAG				149
<i>Ucides c. cordatus</i>	100	AA	TCAAGTGGCAATTCC	TGCGAAAATACCAAATACGGCTCCTATAGAAAG				149
<i>Ocypode quadrata</i>	101	AA	CCAGTGAGCAATTCCCGCAAAAATTCGAAATACGGCTCCTATAGATA					150
<i>Cardisoma guanhumi</i>	101	AT	TAAAGGGCCAATCC	ACCAAAAATTCCAAATCCGGCCCTGTGGAGAG				150

<i>Uca inversa</i>	100	AATCAGTG	TACAATACC	AGCGAAAAT	CCAAATACT	GCTCCTATAGATAG	149
		160	170	180	190	200	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	150	AACGTAGTGGAAAGTGC	CCAACTACATAGTAC	GTATCATGGAGAAAT	TACGT		199
<i>Ucides c. cordatus</i>	150	AACATAGTGGAAAGTGC	CAACTACGTAATATGT	TCGTGGAAGAATAACAT			199
<i>Ocypode quadrata</i>	151	GACGTAGTGGAAATGAG	CTACGACATAGTATGT	TATCATGGAAGAATAAT			200
<i>Cardissoma guanhumi</i>	151	ACCGTAGGGAAATGGCC	TCCACCGTATTAGGt	GTCatGGAAAATAa	CaAT		200
<i>Uca inversa</i>	150	TACATAATGGAAAGTGA	GTACAACATAATATGT	TCGTGCAGGATTACAT			199
		210	220	230	240	250	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	200	CAATAGATGAGTTGGCTA	GAAC	TACCCAGTTAAC	CCTCCGACAGTAAAT		249
<i>Ucides c. cordatus</i>	200	CGATAGAGGAGTTAGCTA	GTACTATGCCAGTTAGAC	CTCCAAACAGTAAAT			249
<i>Ocypode quadrata</i>	201	CAATAGAGGAGTTGGCTA	AAACAAC	TCCAGTTAAGCC	ACCCTGTGAAT		250
<i>Cardissoma guanhumi</i>	201	CATTGGATGAATGGCT	TGAAC	TACTCCTGTTAGGCC	CCCTCCGGTAAAT		250
<i>Uca inversa</i>	200	CAATTGAGGAGTTGCTA	ATACAAC	TCCAGTTAAC	CCTCCTACTGTAAT		249
		260	270	280	290	300	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	250	AAGAA--AATGAA	CCCTAGGGCTCAGAT	TAAGGATGGT	GAGAAATTTAAT		297
<i>Ucides c. cordatus</i>	250	AAAAATAAATGAAT	CCTAAAGTCAAA	TCAGGGATGGT	GAAAAATTTAAC		299
<i>Ocypode quadrata</i>	251	AGAAA--AATAAAT	CCTAAGGCTCAAA	GATAGACGGG	GAGAAATTTAGT		298
<i>Cardissoma guanhumi</i>	251	AGGAA--AATAAA	CCCTAAGGCTAATA	ATGGT	GATGGGAGGTGGTTATT		298
<i>Uca inversa</i>	250	AGAAA--GATAAAT	CCTAAGGCTCAAA	TAAAGAGGG	GAAAGTTTAAAT		297
		310	320	330	340	350	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	298	TGTGAGCCGTGAAGT	GTTCTCAATCAC	CTAAAAATTTT	GATTCCGTGTTGG		347
<i>Ucides c. cordatus</i>	300	TGTGAACCGTTGAGT	GTTCTTAGCCAT	CCAAAAATTTT	GATTCCGTGTTGG		349
<i>Ocypode quadrata</i>	299	TGGGTGCCGTGGAGG	TCTTAATCAACT	GAAAAATTTA	AATCCAGTTGG		348
<i>Cardissoma guanhumi</i>	299	TGGGTCCCATGCAGG	TTTTAGTCAT	CTAAAGATTTT	AATCCGTTTGG		348
<i>Uca inversa</i>	298	TGAGACCCATGTAGG	TCTTAATCAT	CTAAAAATTTT	AATCCGTTGG		347
		360	370	380	390	400	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	348	AATGGCAATAAATTATAG	TTGCAGAAAGTAAAG	TATGCTCGAGTGT	CAACGT		397
<i>Ucides c. cordatus</i>	350	GATAGCAATAAATTATAG	TTGCGAAAGTAAAG	TATGCTCGGGTGT	CAACGT		399
<i>Ocypode quadrata</i>	349	GATGGCAATAAATTATAG	TTGGCTGATGTGAAG	TAAAGCTCGTGT	CTACGT		398
<i>Cardissoma guanhumi</i>	349	GATGGCAATGATTATAG	TACCTACCTTAAAG	-AAGGTGGGGATCAA	-GT		396
<i>Uca inversa</i>	348	AATAGCAATAAATTATT	TTGTTGCTGAGGT	GAAGTATGCTCGAGT	ATCAACGT		397
		410	420	430	440	450	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	398	CTATACCTACTGTGAAT	TATATGGTGGGCTCATA	CAACAAATCCTAAGAT			447
<i>Ucides c. cordatus</i>	400	CTATTCCCTACTGTAAA	TATGTGGTGGAGCTCATA	CAACAAATCCTAAGAT			449
<i>Ocypode quadrata</i>	399	CTATACCAACTGTAAAC	ATGTGATGCGCTCAA	ACTACGAATCCAGAAT			448
<i>Cardissoma guanhumi</i>	397	CTATACCCACTGTGAAC	CATATGGTGTGCTCAG	ACCACGAATCCAGAAT			446
<i>Uca inversa</i>	398	CTATTCCCTACTGTAAA	TATATGGTGGAGCTCAA	ACTACAAATCCTAAGATA			447
		460	470	480	490	500	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	448	CCAATGGCTAACATAGCA	TAAATATACCTAGAGT	ACCGAAGGATTCCTT			497
<i>Ucides c. cordatus</i>	450	CCAATAGCTAGTATAGCG	TAAACTATACCTAAAG	TTCGAATGATTCCTT			499
<i>Ocypode quadrata</i>	449	CCAATGGCTAGCATAGCG	TAAATATACCTAGG	TTCCAAATGATTCCTT			498
<i>Cardissoma guanhumi</i>	447	CCAGTGGCTAGCATAGCG	TAGATTATACCTAGG	TACCAAAAGATTCCTT			496
<i>Uca inversa</i>	448	CCAATAGCTAGCATAGCA	TAAATATACCTAAT	GTTCCAAATGATTCCTT			497
		510	520	530	540	550	
<i>Ucides c. occidentalis</i>	498	TTTACCAGATTCTTGACT	TAACAATATGAGAGACT	TATACCGAATGCTGGCA			547
<i>Ucides c. cordatus</i>	500	TTTACCGGATTCTTGACT	AACGATATGATAAAT	TATCCGAAATGCTGGTA			549
<i>Ocypode quadrata</i>	499	TTTCCCGATTCTTGCTA	ACGATATGAGAAAT	TATACCGAAGCGGGGA			548
<i>Cardissoma guanhumi</i>	497	TTTCCGGATTCTTGACT	TACAATATCAGAAAT	CATACCAATGCAGGTA			546
<i>Uca inversa</i>	498	TTTACCGGACTCTTGCT	TAACAATATGAGAGAT	TATACCGAATGCGGGTA			547
		560	570				
<i>Ucides c. occidentalis</i>	548	AAATTAGAATGTAAACT	TCTGGG				570
<i>Ucides c. cordatus</i>	550	AGATTAAAATGTAAAG	TCTGGG				572
<i>Ocypode quadrata</i>	549	GAATAAGAGTATAAG	TCTGGG				571
<i>Cardissoma guanhumi</i>	547	GAATTAAAATGTAAAC	TCTGGG				569
<i>Uca inversa</i>	548	AAATTAAAATATA	TACTTCTGGG				570

3.4 A reconstrução da árvore filogenética inferida da COX-1

O alinhamento compreendeu sequências de 572 pb. As divergências de sequência em pares baseadas no modelo de parâmetros de Kimura dois (Tabela 6) foram consistentemente maiores no COX-1 do que nas regiões 16S e Cyt-b. É

esperado que as regiões codificadoras de proteínas fossem mais variáveis do que os genes que codificam rRNA, devido ao fato de que uma mutação na terceira posição dentro do codon observado ainda pode codificar para o mesmo aminoácido (SIMON et al., 1994).

Tabela 6 - Matriz de distâncias genéticas, corrigida pelo parâmetro Kimura-dois usando o gene COX-1.

Espécies	<i>Ucides c. occidentalis</i>	<i>Ucides c. cordatus</i>	<i>Ocypode quadrata</i>	<i>Cardisoma guanhumi</i>	<i>Uca inversa</i>
<i>Ucides c. occidentalis</i>		0,10	0,248	0,336	0,190
<i>Ucides c. cordatus</i>	0,160		0,288	0,386	0,195
<i>Ocypode quadrata</i>	0,248	0,288		0,346	0,228
<i>Cardisoma guanhumi</i>	0,336	0,386	0,46		0,342
<i>Uca inversa</i>	0,190	0,195	0,228	0,342	

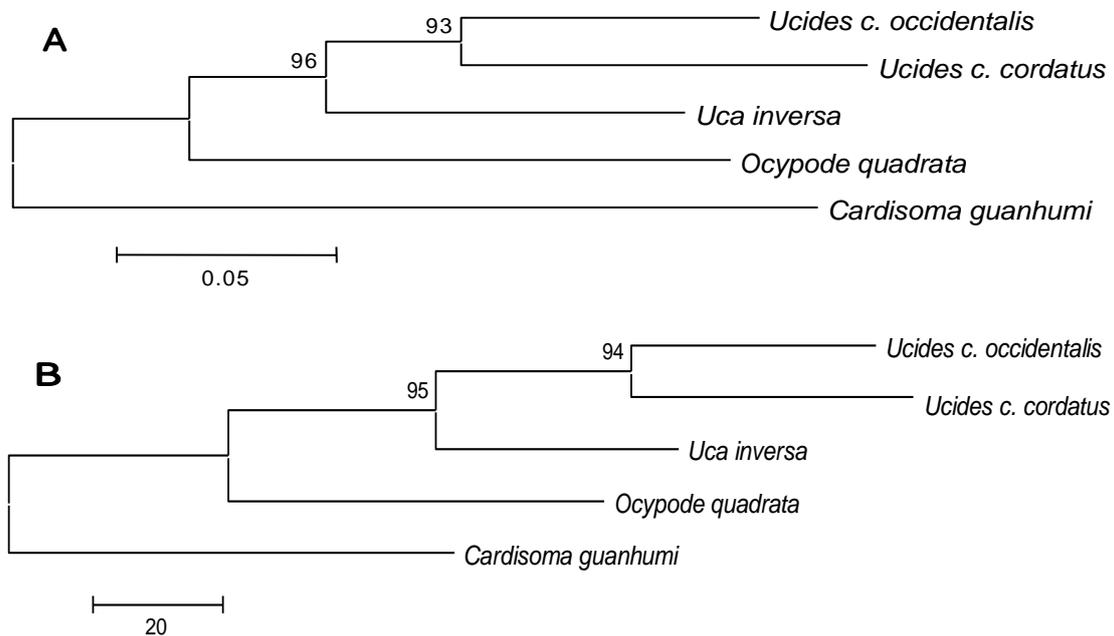
As sequências de COX-1(**Tabela 7**) das formas de *Ucides* do Atlântico e do Pacífico revelaram mutações de 80 pontos, sendo 63 transições e 17 transversões e uma diferença de 2 pb-indel entre as duas sequências. A divergência genética entre as duas subespécies presumivelmente foi de 14,4.

Tabela 7 - As frequências de bases empíricas (%) para cada espécie de caranguejo examinada para 1, 2 e 3 posições de codon sozinhas para o gene COX-1.

Espécies	Nucleotideo											
	Pos #1				Pos #2				Pos #3			
	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>Ucides c. occidentalis</i>	24,7	11,1	38,4	25,8	25,3	21,,	35,3	18,4	32,6	15,8	3,6	20
<i>Ucides c. cordatus</i>	26,2	8,9	39,3	25,7	26,2	19,9	35,6	18,3	36,8	13,2	30	20
<i>Ocypode quadrata</i>	24,7	12,1	40	23,2	25,8	22,6	31,6	20	31,9	16,8	30,4	20,9
<i>Cardisoma guanhumi</i>	25,4	11,1	37,6	25,9	27	24,9	25,4	22,8	30,9	19,9	27,2	22
<i>Uca inversa</i>	28,4	10	40,5	21,1	25,8	20,5	36,8	16,8,	35,3	15,8	33,2	15,8
Mean	25,9	10,6	39,2	24,3	26	21,8	32,9	19,3	33,5	16,3	30,5	19,7

A árvore filogenética construída usando o mesmo modelo evolutivo com distâncias de sequência em pares por NJ e MP são mostradas na Figura 5. As topologias de árvores idênticas resultaram da reconstrução de árvores filogenéticas usando métodos NJ e MP.

Figura 5 – árvore de Neighbor Joining (A) e de máxima parcimônia (B) para o fragmento COX-1. O modelo de distâncias do -parâmetro de Kimura dois foi usado para reconstrução de árvores. Os números são valores de bootstrap para 2000 repetições.



A análise filogenética da COX-1 mitocondrial corrobora os resultados obtidos com as análises da sequência 16S. Com os métodos de NJ e MP, as análises de bootstrapping, mostram os aglomerados do Atlântico e do Pacífico, agrupados em níveis muito elevados de confiança. Um forte apoio à diferenciação de *Ucides* dos Oceanos Atlântico e Pacífico em duas espécies distintas parece ser notado a partir deste gene. O gene COX-1 foi adequado para mostrar alta divergência genética entre as formas de *Ucides* e, portanto, parece ser suficientemente variável para avaliar com precisão as relações entre subespécies de caranguejos de Ocypodidae.

3.5 Análise de sequência de Cyt-b

As sequências de DNA foram traduzidas usando o EMBOSS-Transeq (Rice et al. 2000) disponível no European Bioinformatics Institute (EBI/EMBL). Não continha mutações de mudança de quadro ou codons de parada permitindo assim a comparação em pares de sequências ortográficas. As sequências de Cyt-b de até 390 pares de bases foram obtidas de todas as espécies investigadas. No entanto, alinhamentos até 334 pb foram utilizados para análises evolutivas filogenéticas e moleculares. A partir deste número, 222 sítios eram monomórficos e 112 eram polimórficos (65 sítios polimórficos informativos de parcimônia), com 137 mutações no total. Nenhum indel foi notado nos alinhamentos.

A região parcial Cyt-b para estes taxa foi 62,9% A + T rica (**Tabela 8**) muito semelhante à da COX-1. No entanto, o perfil de composição de nucleotídeos foi ligeiramente diferente. O teor de nucleotídeos foi em média 37,4% T, 23,8% C, 25,6% A e 13,2% G, com muito pouco desvio entre os taxa. O número total de transições e transversões foi respectivamente 42 e 22, resultando em uma relação de transição/transversão para este gene codificador de duas proteína (Tabela 9).

Tabela 8 - Composição de nucleotídeos de todas as espécies de caranguejo examinadas para o fragmento Cyt b.

Espécies	Nucleotídeos					
	T	C	A	G	A+T	C+G
<i>Ucides c. occidentalis</i>	35,9	24,3	26,9	12,9	62,8	37,2
<i>Ucides c. cordatus</i>	35,9	24,3	26,9	12,9	62,8	37,2
<i>Ocypode quadrata</i>	37,7	25,1	23,1	14,1	60,8	39,2
<i>Uca maracoani</i>	41,6	20,1	24	14,4	65,6	34,5,
<i>Cardisoma guanhumi</i>	35,6	25,4	26,9	12	62,5	37,4
Mean ± SD	37,4 ± 2,5	23,8 ± 2,1	25,6 ± 1,9	13,2 ± 1,0	62,9 ± 1,7	37,1 ± 17

As diferenças de sequência entre todos os taxos examinados consistiram em apenas substituições de pares de bases simples (**Figura 6**). A diversidade geral de nucleotídeos foi de 0,19.

Figura 6 Sequências I alinhadas parcial de um gene de Cyt b para todas as espécies de caranguejo usadas para análises filogenéticas em formato não intercalado.

		10	20	30	40	50
<i>Ucides c. occidentalis</i>	1	TTCCATT	TATTGGAACAGATCTAGTACAATGAATTTGAGGGGGATT	TTCT	50	
<i>Ucides c. cordatus SC</i>	1	TTCCATT	TATTGGAACAGATCTAGTACAATGAATTTGAGGGGGATT	TTCT	50	
<i>Ocypode quadrata</i>	1	TTCCATT	TATCGGGACTGATTTAGTTTCAAGTGAATTTGAGGGGGATT	TTCA	50	
<i>Uca maracoani</i>	1	TTCCATT	TATTGGTACTGATTTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGT	TTCTCC	50	
<i>Cardisoma guanhumi</i>	1	TTCCATT	TATCGGTACTGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGAGGATT	TTCTCC	50	
		60	70	80	90	100
<i>Ucides c. occidentalis</i>	51	TTTGATAACGCCACCTTAACCCGATTCTTTTCTTTCCACTTTTATTTTACC	100			
<i>Ucides c. cordatus SC</i>	51	TTTGATAACGCCACCTTAACCCGATTCTTTTCTTTCCACTTTTATTTTACC	100			
<i>Ocypode quadrata</i>	51	GTGGATAATGCCACTCTTACTCGATTTTCTTTTCCACTTTTATTTTACC	100			
<i>Uca maracoani</i>	51	TTTGATAATGCTACTCTTACCCGTTCTTCTCATTTCCATTTCATTCTACC	100			
<i>Cardisoma guanhumi</i>	51	GTAGACAACGGTACCTTAACCTCGATTCTTCTCATTTCCACTTTTATTTTACC	100			
		110	120	130	140	150
<i>Ucides c. occidentalis</i>	101	TTTATCGCCGAGCTTTCTCTATGATTCATATTTCTTTTCTCCACCAAG	150			
<i>Ucides c. cordatus SC</i>	101	TTTATCGCCGAGCTTTCTCTATAATTCATATTTCTTCTCCACCAAG	150			
<i>Ocypode quadrata</i>	101	CTTCATTGCAGCCGCTTTTCTATAATTCATATTTCTTCTACATCAAG	150			
<i>Uca maracoani</i>	101	TTTATGCGGGTGCCTTTTCTATAATTCATATTTTATTTCTACATCAAA	150			
<i>Cardisoma guanhumi</i>	101	CCTAATTGCGGCTGCATTTCTCCATAATTCATATTTTATTTCTCCACCAAG	150			
		160	170	180	190	200
<i>Ucides c. occidentalis</i>	151	CAGGAGCTAACAAATCCACTAGGAATTTCAAGCAAATAGACAAAGTACC	200			
<i>Ucides c. cordatus SC</i>	151	CAGGAGCTAACAAATCCACTAGGAATTTCAAGCAAATAGACAAAGTACC	200			

menor para as sequências de nucleótidos COX-1. Portanto, o gene COX-1 é o marcador mitocondrial mais adequado para avaliar a variabilidade genética dentro das subespécies, pelo menos para a família Ocypodidae.

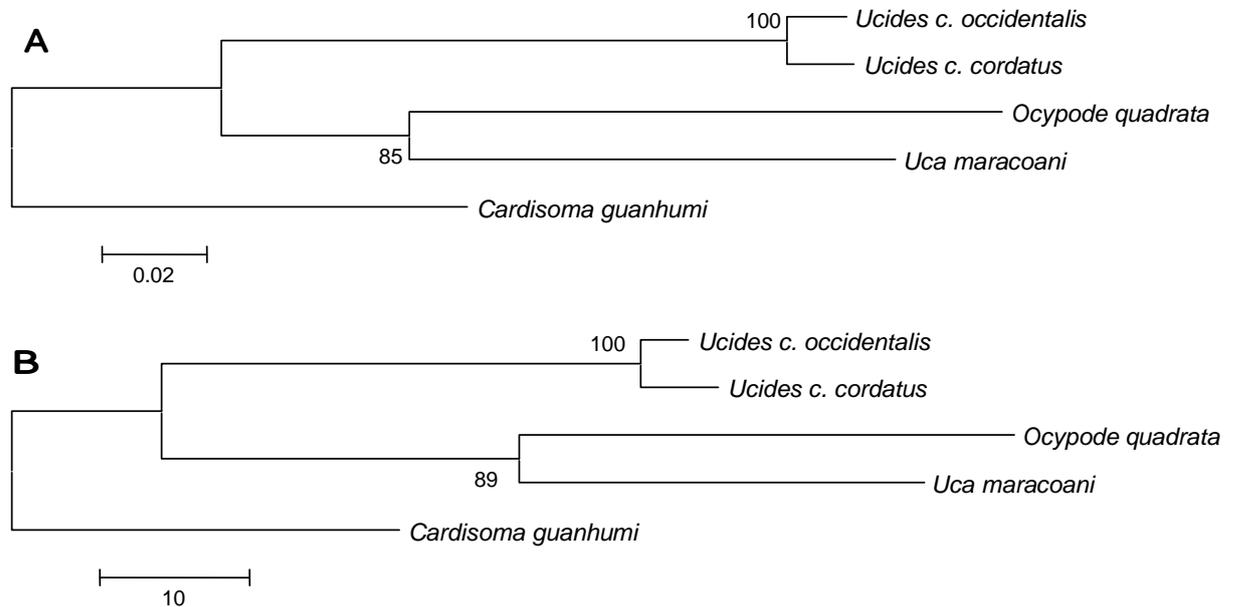
A árvore filogenética construída usando o modelo parametro de Kimura-dois (**Tabela 10**) com distâncias de sequência em pares por NJ e MP é mostrada na (**Figura 7**)

As topologias de árvores idênticas resultaram da reconstrução de árvores filogenéticas usando métodos NJ e MP. A análise filogenética da Cyt b mitocondrial também corrobora os achados obtidos com as análises da sequência 16S e COX-1. As análises de Bootstrapping também dão um forte apoio para agrupar os ucides do Atlântico e do Pacífico, em níveis muito elevados de confiança.

Tabela 10 - Matriz de distâncias genéticas corrigida pelo parâmetro Kimura-dois utilizando o gene Cyt-b.

espécies	<i>Ucides c. occidentalis</i>	<i>Ucides c. cordatus</i>	<i>Ocypode quadrata</i>	<i>Uca maracoani</i>	<i>Cardisoma guanhumi</i>
<i>Ucides c. occidentalis</i>		0,025	0,257	0,264	0,247
<i>Ucides c. Cordatus</i>	0,025		0,267	0,255	0,252
<i>Ocypode quadrata</i>	0,257	0,267		0,207	0,288
<i>Uca maracoani</i>	0,264	0,255	0,207		0,249
<i>Cardisoma guanhumi</i>	0,247	0,252	0,288	0,249	

Figura 7 - Árvores Neighbor Joining (A) e máxima parcimônia (B) para fragmento de Cyt-b. O modelo de distâncias de parâmetros de Kimura dois foi usado para reconstrução de árvores. Os números são valores de inicialização para 2000 repetições.



Apesar do fato de ter sido observada uma alta divergência genética das formas do Atlântico e Pacífico do *Ucides*, sugere-se a inclusão de um gene mais variável em estudos futuros.. Uma vez que a divergência foi examinada usando três genes mitocondriais diferentes, recomenda-se empregar um fragmento nuclear altamente variável para detectar de forma mais expressa às diferenças genéticas entre as duas formas de *Ucides*. O primeiro ou o segundo espaçador transcrito interno devem ser um marcador de interesse. Além disso, se as análises morfológicas podem ser adicionadas a este estudo, isso confirmaria o que tem sido evidente a partir dos traços genéticos.

3.7 Análise de Sequência

Os espécimes preservados com etanol (95%) e DMSO deram uma boa qualidade e quantidade de DNA genômico de peso molecular. Os *primers* para regiões LSUrRNA, COX-1 e Cyt-b de mitocôndrias amplificaram consistentemente todas as espécies estudadas e estas regiões foram alvo de estudo posterior. Resultados das buscas BLAST obtidos com regiões mitocondriais de caranguejos para as famílias Ocypodidae e Gecarcinidae, foram extremamente significativos e têm valores de BLAST menores ou iguais a 3.1×10^{-89} , por exemplo, o valor

para a relação de caranguejos de *Brachyura* dentro do gene COX-1. Um total de 1595 pb de DNA mitocondrial (560 pb do LSUrRNA, 645 do gene COX-1 e 390 pb do gene *cyt b* foi obtido a partir de cada mangrove crab I (**Tabela 11**).

Destes, 1334 sitios foram utilizados nas análises filogenéticas descritas na seção Material e Métodos. Os alinhamentos de cada região de gene a todas as espécies de manguezais são mostrados nas Figuras 8-10.

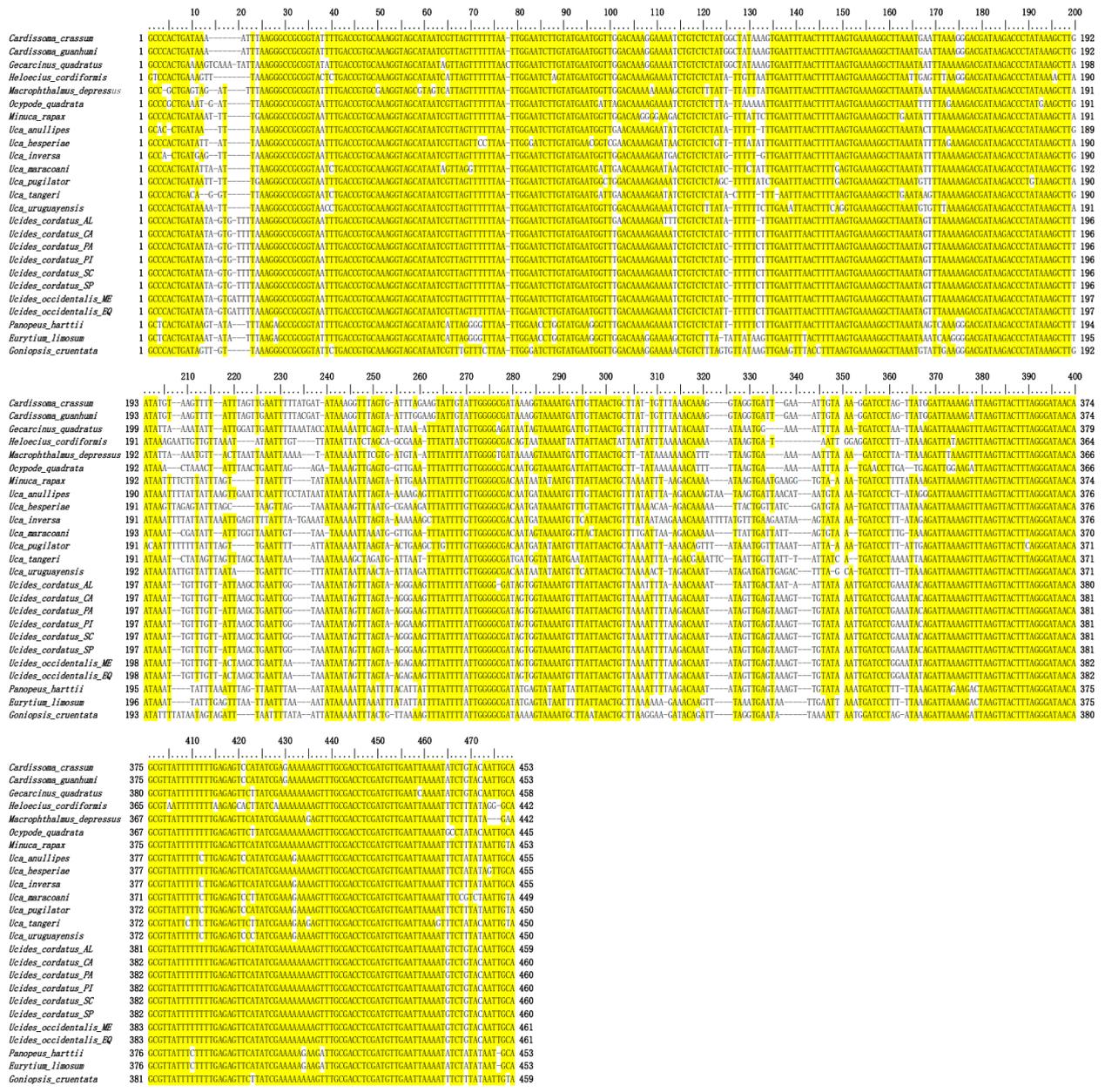
Tabela 11 - Características gerais da sequência de nucleótidos das regiões do gene do rRNA da subunidade grande, do citocromo oxidase I e do citocromo b do mtDNA dos caranguejos de manguezal. A diversidade de nucleotídeos (Kimura, 1980) foi calculada usando uma correção gama de 0,44.

	Região do gene mitocondrial		
	Grande Subunidade rRNA	Citocromo Oxidase I	Citocromo b
Comprimento da Sequência(bp)	560	645	390
Comprimento da sequência usado para análises filogenéticas (sites)	479	571	334
Número de sites monomórficos	238	268	182
Número de locais polimórficos	169	296	147
Número de sites informativos de parcimônia	118	198	124
Número de sites com lacunas	72	7	5
Número total de mutações	261	433	238
Frequências base (%)			
A	35.5	35.9	26,4
C	10.1	15.6	23,2
G	18.4	19.9	13,0
T	36.0	28.7	37,5
Pares transicionais (si)	28	58	38
Pares transversais (sv)	36	47	24
si/sv relação	0.8	1.2	1,6
Diversidade média de nucleotídeos (π)	0,125	0,187	0,182

Ambos os genes codificadores de proteínas revelaram maior número relativo de locais polimórficos, 51% para COx-1 e 44% para Cyt-b) em comparação com a sua contraparte codificadora de RNA ribossômica (35%). A região da citocromo oxidase I teve duas vezes mais transversões do que a região do citocromo b em todas as comparações parciais de caranguejos. em 85% de todos os locais polimórficos na região do gene da citocromo oxidase estavam na terceira posição de códon silenciosa. Na região do citocromo b, 82% de locais polimórficos estavam na terceira posição. Mais uma vez, ambos os genes codificadores de proteínas revelaram maior variabilidade entre os táxons. COX-1 e Cyt-b revelaram respectivamente 76% e 71% de mutações dentro das sequências alinhadas.

Foram obtidas sequências de LSUrRNA de até 560 pares de bases para espécies de famílias investigadas. A partir deste número de base total na sequência 16S, 479 sites foram utilizados para análises filogenéticas. Os alinhamentos revelaram 238 invariáveis e 169 locais polimórficos. Os caracteres informativos de parcimônia eram 70% do número total de sites variáveis (Tabela 11, Figura 8).

Figura 8.- Sequências alinhadas de um gene LSUrRNA parcial de todas as espécies de caranguejo usadas para análises filogenéticas, em formato não intercalado.



A região parcial LSUrRNA para esses taxa foi 71,5% A + T rica (Tabela 12). O teor de nucleotídeos foi em média 36,0% T, 10,1% C, 35,5% A e 18,4% G, com muito pouco desvio entre os táxons (SD max foi de 1,6). O número total de pares

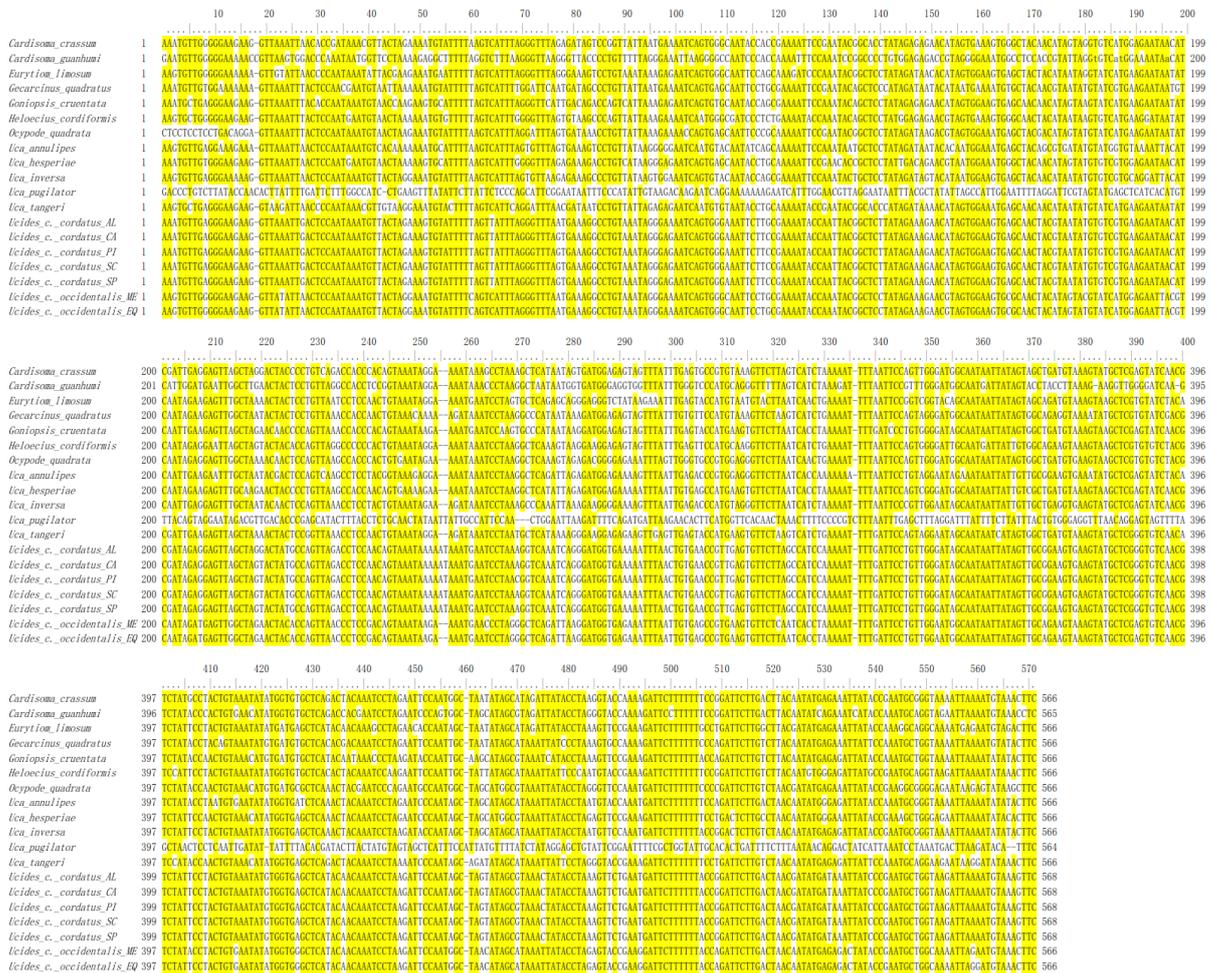
de transição e transversais foi respectivamente 28 e 36, resultando em uma proporção de 0,8.

Tabela 12 - Composição de nucleotídeos (frequências de base,% de valores) de todas as espécies de caranguejo examinadas para o fragmento LSUrRNA.

Espécies	Nucleotídeos						Total
	T	C	A	G	A+T	C+G	
<i>Cardisoma crissum</i>	34,7	9,7	34	21,6	68,7	31,3	453
<i>Cardisoma guanhumi</i>	34,4	9,9	34	21,6	68,	31,5	453
<i>Gecarcinus quadratus</i>	34,9	10	38,9	16,2	73,8	26,2	458
<i>Heloeciis cordiformis</i>	35,	10,2	37,1	17,4	72,4	27,6	442
<i>Macrophthalmus depressus</i>	36,2	9,0	37,8	17	74	26	442
<i>Ocypode quadrata</i>	33,3	10,8	34,6	21,3	67,9	32,1	445
<i>Minuca rapax</i>	39,3	9,3	35,5	15,9	7,8	25,2	453
<i>Uca anullipes</i>	35,8	11	35,8	17,4	71,6	28,4	455
<i>Uca hesperiae</i>	34,9	10,3	35,8	18,9	70,7	29,2	455
<i>Uca inversa</i>	37,1	9,9	35,6	17,4	72,7	27,3	455
<i>Uca maracoani</i>	35,9	10,9	35,2	18	71,1	28,9	449
<i>Uca pugilator</i>	38,7	11,1	33,1	17,1	71,8	28,2	450
<i>Uca tangeri</i>	34,2	11,3	35,6	18,9	69,8	30,2	450
<i>Uca uruguayensis</i>	37,8	11,3	35,6	15,	73,4	26,6	450
<i>Ucides cordatus AL</i>	36,6	9,6	34,6	19,2	71,2	28,8	459
<i>Ucides cordatus CA</i>	36,5	9,8	34,6	19,1	71	28,9	460
<i>Ucides cordatus PA</i>	36,5	9,8	34,6	19,1	71,1	28,9	460
<i>Ucides cordatus PI</i>	36,5	9,8	34,8	18,9	71,3	28,7	460
<i>Ucides cordatus SC</i>	36,5	9,8	34,6	19,1	71,1	28,9	460
<i>Ucides cordatus SP</i>	36,5	9,8	34,6	19,1	71,1	28,9	460
<i>Ucides occidentalis ME</i>	36,7	9,5	35,1	18,7	71,8	28,2	461
<i>Ucides occidentalis EQ</i>	36,7	9,5	35,1	18,7	71,8	28,2,	461
<i>Panopeus harttii</i>	34,9	9,7	37,7	17,	72,6	27,4	453
<i>Eurytium limosum</i>	34,7	9,7	37,1	18,5	71,8	28,2	453
<i>Goniopsis cruentata</i>	35,9	11,1	35,3	17,6	71,2	28,7	459
Média ± SD	36,0 ± 1,4	10,1 ± 0,7	35,5 ± 1,3	18,4 ± 1,6	71,5 ± 1,6	28,5 ± 1,6	454

Foram obtidas sequências de COX-1 de até 645 pares de bases para espécies de famílias investigadas (Figura 9). A partir deste número de base total, 571 sitios foram utilizados para análises filogenéticas. Os alinhamentos revelaram 268 sitios constantes e 296 variáveis (Figura 9). Os representantes informativos de parcimônia representavam 67% do número total de sítios polimórficos

Figura 9 - A região parcial COX-1 para essas taxa foi 64,6% A + T rica (Tabela15). O teor de nucleotídeos foi em média 28,7% T, 15,6% C, 35,9% A e 19,9% G, com muito p. Sequências alinhadas de um gene COX-1 parcial de todas as espécies de caranguejo usadas para análises filogenéticas, em formato não intercalado.



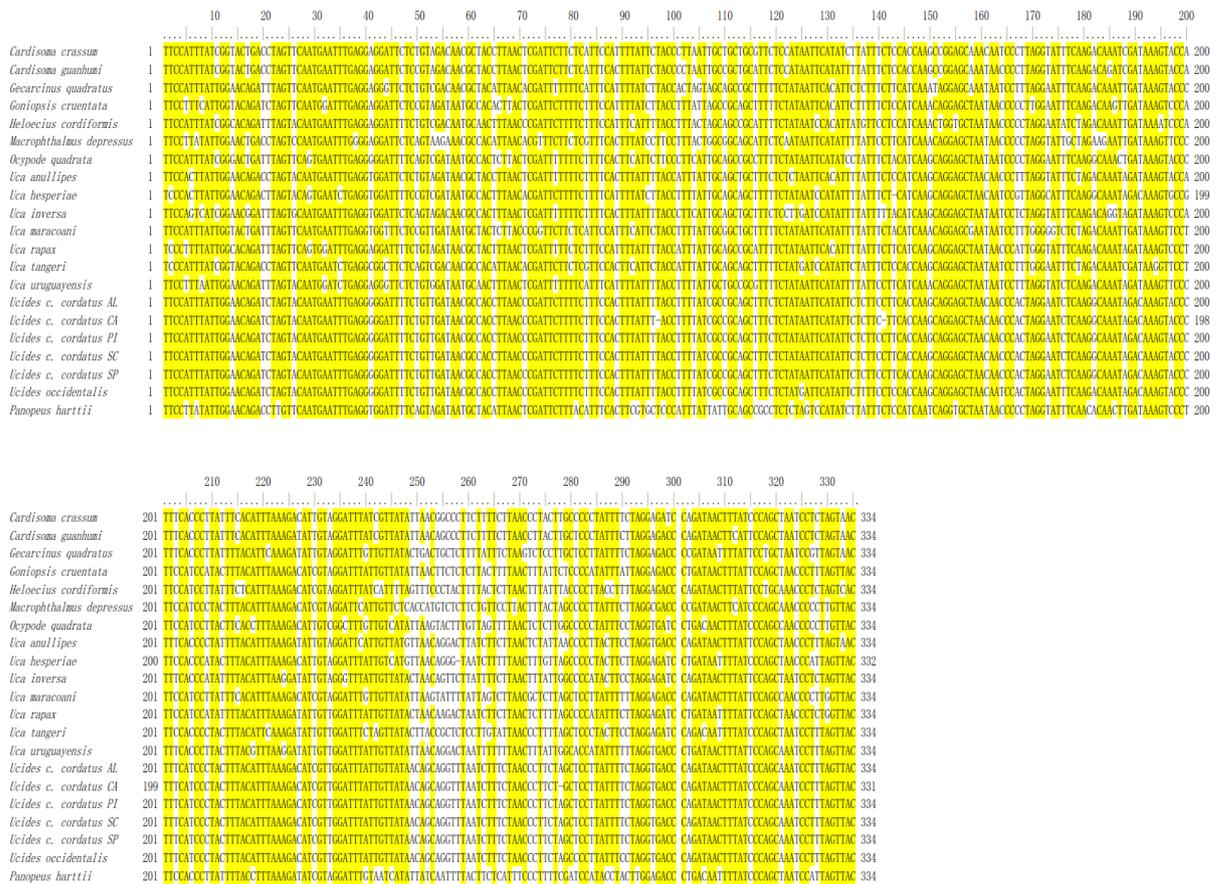
Houve desvio entre os taxa. O número total de pares de transição e transversais foi respectivamente de 58 e 47, resultando em uma proporção de 1,2.

Tabela 13.- Composição geral de nucleótidos (frequências de base,% de valores) e nas posições # 1, # 2 e # 3 de todas as espécies de caranguejo examinadas para o fragmento COX-1.

Espécies	T	C	A	G	A+T	C+G	Pos # 1				Pos # 2				Pos # 3				Total
							T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3	
<i>Cardisoma crassum</i>	28,4	15,2	35,7	20,7	64,0	35,9	31,4	11,2	36,7	20,7	23,7	10,5	43,7	22,1	30,3	23,9	26,6	19,1	566
<i>Cardisoma guanhumi</i>	27,8	18,8	30,9	23,2	58,1	42,0	29,1	14,3	30,7	25,9	23,8	16,4	36,5	23,3	30,5	25,7	23,5	20,3	565
<i>Eurytiom limosum</i>	27,9	15,7	37,5	18,9	65,4	34,6	33,0	11,7	39,9	15,4	22,6	10,5	42,1	24,7	28,2	25,0	30,3	16,5	566
<i>Gecarcinus quadratus</i>	30,9	15,5	37,5	16,1	68,4	31,6	36,2	11,7	37,8	14,4	25,3	11,1	43,7	20,0	31,4	23,	30,9	13,8	566
<i>Goniopsis cruentata</i>	26,9	16,6	38,7	17,8	65,6	34,4	26,6	14,4	42,0	17,0	23,7	11,1	44,2	21,1	30,3	24,5	29.,	15,4	566
<i>Heloecius cordiformis</i>	29,5	15,7	34,3	20,5	63,8	36,2	33,5	12,2,	35,6	18,6	24,7	11,1	41,1,	23,2	30,3	23,9	26,1	19,7	566
<i>Ocypode quadrata</i>	27,4	17,3	34,3	21,0	61,7	38,3	30,3	14,4	34,0	21,3	23,7	12,1	40,5	23,	28,2	25,5	28,2	18,1	566
<i>Uca annulipes</i>	29,0	14,8	38,9	17.,	67,9	32,1	34,6	11,2	40,4	13,8	23,2	10,5	45,8	20,5	29,3	22,9	30,3	17,6	566
<i>Uca hesperiae</i>	26,9	17,0	36,7	19,4	63,6	36,4	27,7	14,4	38,8	19,	22,1	12,1	43,2	22,6,	30,9	24,5	28,2	16,5	566
<i>Uca inversa</i>	29,9	15,5	37,,1	17,5	67,0	33,0	36,7	10,6	37,8	14,9	23,7	11,1	44,7	20,5	29,3	25,0	28,7	17,0	566
<i>Uca tangeri</i>	26,9	15,7	38,3	19,1	65,2	34,8	28,7	13,3	42,0	16,0	23,	10,0	43,7	23,2	28,7	23,9	29,3	18,1	566
<i>Ucides c. cordatus AL</i>	29,6	13,9	35,6	21,0	65,2	34,9	33,3	8,	35,4	22,8	24,2	1,0	42,1	23,7	31,2	23,,3	29,1	16,4	568
<i>Ucides c. cordatus CA</i>	29,8	14,1	35,2	21,0	65,,0	35,1	33,,	8,5	34,9	22,8	24,2	10,5	42,1	23,2,	31,2	23,3	28,6	16,9	568
<i>Ucides c. cordatus PI</i>	29,8	14,3	35,0	21,0	64,8	35,3	33,9	8,5	34,9	22,8	24,2	10,5	42,1	23,2	31,2	23,8	28,0	16,9	568
<i>Ucides c. cordatus SC</i>	29,8	14,1	35,2	21,0	65,0	35,1	33,9	8,5	34,9	22,8	24,2	10,5	42,1	23,2	31,2	23,3	28,6	16,9	568
<i>Ucides c. cordatus SP</i>	29,8	14,1	35,2	21,0	65,0	35,1	33,9	8,5,	34,9	22,8	24,	10,5	42,1	23,2	31,2	23,3	28,6	16,,9	568
<i>Ucides c. occidentalis ME</i>	27,6	16,1	35,3	21,0	62,9	37,1	31,9	11,7	34,6	21,8	21,	11,1	45,3	22,1	29,3	25,5	26,1	19,1	566
<i>Ucides c. occidentalis EQ</i>	28,,	15,5	35,0	21,2	63,3	36,7	33,0	11,2	34,0	21,8	21,6	11,,	44,7	22,6	30,3	24,5	26,1	19,1	566
Média ± SD	28,7±1,3	15,6±1,3	35,9±2,0	1,9±1,8	64,6±2,3	35,5±2,3	32,3	11,	36,6	19,7	23,6	11,2	42,8	22,6	30,2	24,2	28,2	17,5	567

Foram obtidas sequências de um gene parcial de *cyt-b* de até 390 pares de bases (**Figura 10**). A partir deste número de base total, 334 sitios foram utilizados para análises filogenéticas. Os alinhamentos revelaram 182 invariáveis e 147 locais polimórficos (**Tabela 14**). Os representantes informativos da parcimônia foram 84% do número total de sitios polimórficos.

Figura 10 - Sequências alinhadas de um gene parcial de *cyt-b* de todas as espécies de caranguejo usadas para análises filogenéticas, em formato não intercalado.



A região parcial *Cyt b* para estas taxa foi 63,8% A + T rica (**Tabela 14**). O teor de nucleotídeos foi em média 37,5% T, 23,2% C, 26,4% A e 13,0% G, com muito pouco desvio entre as taxa. O número total de pares de bases de transição e transversais foi, respectivamente, 38 e 24, resultando em uma proporção de 1,6.

Tabela 14 - Composição geral de nucleotídeos (frequências de base,% de valores) e nas posições # 1, # 2 e # 3 de todas as espécies de caranguejo examinadas para o fragmento Cyt b

Espécies	T	C	A	G	A+T	C+G	Pos # 1				Pos # 2				Pos # 3				Total
							T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3	
<i>Cardisoma crassum</i>	35,6	25,4	26,6	12,3	62,2	37,7	44,6	25,9	19,6	9,8	36,0	27,0	35,1	1,8	26,1	23,4	25,2	25,2	334
<i>Cardisoma guanhumi</i>	35,6	25,4	26,9	12,0	62,5	37,4	44,6	25,9	19,6	9,8	35,1	27,9	36,0	0,9	27,0	22,5	25,2	25,2	334
<i>Gecarcinus quadratus</i>	39,8	20,1	26,9	13,2	66,7	33,3	45,5	24,1	19,6	10,7	47,7	12,6	36,9	2,7	26,1	23,4	24,3	26,1	334
<i>Goniopsis cruentata</i>	39,5	22,8	26,3	11,4	65,8	34,2	44,6	25,	19,6	9,8	43,2	20,7	35,1	0,9	30,6	21,6	24,,	23,4	334
<i>Heloecius cordiformis</i>	37,4	24,6	27,2	10,8	64,6	35,4	44,5	25,0	19,6	9,8	36,9	26,1	36,0	0,9	29,7	22,5	26,1	21,6	334
<i>Macrophthalmus depressus</i>	34,4	26,6	25,4	13,5	59,8	40,1	43,8	25,9	18,8	11,6	34,2	29,7	30,6	5,4	25,2	24,3	27,0	23,4	334
<i>Ocypode quadrata</i>	37,7	25,,1	23,1	14,1	60,8	39,2	43,8	25,9	19,6	10,7	43,2	27,0	24,3	5,4	26,1	22,5	25,2	26,1	334
<i>Uca anullipes</i>	38,3	21,9	27,8	12,0	66,1	33,9	44,6	25,0	19,6	10,7	42,3	18,9	37,,	0,9	27,9	21,6	261	24,3	334
<i>Uca hesperiae</i>	37,0	21,,4	27,1	14,5	64,1	35,9	44,6	25,0	19,6	10,7	35,5	21,8	35,5	7,3	30,9	17,3	26,4	25,5	332
<i>Uca inversa</i>	38,9	20,7	26,0	14,4	64,9	35,	45,5	25,0	19,6	9,8	42,3	17,1	34,2	6,3	28,8	19,8	24,3	27,0	334
<i>Uca maracoani</i>	41,6	20,1	24,0	14,4	65,6	34,5	45,	24,1	19,6	10,7	49,5	17,1	27,0	6,3	29,7	18,9	25,2	26,,	334
<i>Uca rapax</i>	40,7	19,5	26,9	12,9	67,6	32,4	44,6	25,0	19,6	10,7	48,6	13,,5	34,2	3,6	28,8	19,8	27,0	24,3	334
<i>Uca tangeri</i>	35,0	26,6	25,1	13,2	60,1	39,8	44,6	25,9	19,6	9,8	35,1	29,7	31,5	3,6	2,,2	24,3	24,3	26,1	334
<i>Uca uruguayensis</i>	42,2	17,1	26,9	13,8	69,1	30,9	44,6	25,0	19,6	10,7	50,5	9,0	34,2	6,3	31,5	17,1	27,0	24,3	334
<i>Ucides c. cordatus AL</i>	35,9	24,3	26,,	12,9	62,8	37,2	43,8	25,9	19,6	10,7	38,7	24,3	35,1	1,8	25,2	22,5	26,1	26,1	334
<i>Ucides c. cordatus CA</i>	36,0	24,2	26,9	13,0	62,9	37,	43,	26,1	19,8	10,8	39,1	24,5	34,5	1,8	25,5	21,8	26,4	26,4	331
<i>Ucides c. cordatus PI</i>	35,9	24,3	26,9	12,9	62,8	37,2	43,8	25,9	19,6	10,7	38,7	24,3	35,1	1,8	25,2	22,5	26,1	26,1	334
<i>Ucides c. cordatus SC</i>	35,9	24,3	26,9	12,9	62,8	37,2	43,8	259	19,6	10,7	38,7	24,3	35,1	1,8	25,2	22,5	26,1	26,1	334
<i>Ucides c. cordatus SP</i>	35,9	24,3	26,9	12,9	62,8	37,2	43,8	25,9	19,6	10,7	38,7	24,3	35,1	1,8	25,2	22,5	26,1	26,1	334
<i>Ucides occidentalis ME</i>	35,9	24,3	26,9	12,9	62,8	37,2	43,8	25,9,	19,6	10,7	38,7	24,3	35,1	1,8	25,2	22,5	26,1	26,1	334
Mean ± SD	37,5±2,3	23,2±2,6	26,4±1,2	13,0±1,0	63,8±2,5	36,2±2,4	44,4	25,5	19,6	10,5	40,6	22,2	33,9	3,2	27,3	21,7	25,7	25,3	334

As diversidades de nucleotídeos (π) ou as distâncias entre os pares de caranguejos calculados a partir das regiões do gene citocromo oxidase I ou do citocromo b foram, respectivamente, 0,187 e 0,182 (**Tabela 11**), maior que a diversidade de nucleotídeos calculada utilizando o gene LSUrRNA (0,125) como um marcador filogenético.

As distâncias entre e dentro de cada morfótipo de *Ucides* foram estimadas pelo modelo parâmetros de Kimura dois e são retratadas nas Tabelas 15 e 16, respectivamente. O gene de codificação de proteína mais variável mostra um sinal maior para essas estimativas do que o gene codificador de ribossomas. Parece existir uma indicação de COX-1 ($d = 0.156$) que a distância entre a subespécie presumivelmente é suficiente para um estudo posterior com o objetivo de avaliar o estado da espécie desses dois morfotipos.

Tabela 15 - Distância média de nucleotídeos entre *Ucides cordatus* e *Ucides occidentalis* estimada pelo parâmetros Kimura de 2.

	[1]	[2]
[1] <i>Ucides c. cordatus</i>	-	0.016 (LSUrRNA)
[2] <i>Ucides c. occidentalis</i>	0.156 (COX-1) 0.025 (Cyt b)	-

Tabela 16 - Distância média de nucleotídeos dentro de cada morfótipo de *Ucides* estimado pelo parâmetros Kimura de 2

	LSUrRNA	COX-1
[1] <i>Ucides c. cordatus</i>	0.001	0.004
[2] <i>Ucides c. occidentalis</i>	0.000	0.009

3.8 Reconstrução de árvores filogenéticas

O alinhamento compreendeu sequências de 479, 571 e 334 pb para LSUrRNA, COX-1 e Cyt b, respectivamente. As divergências de sequência em pares com base no modelo parâmetros de Kimura dois, foram consistentemente menores nas 16S (Tabela 16) do que nas regiões COX-1 (**Tabela 18**) e Cob (**Tabela 19**). Isso corrobora com o pressuposto de que o gene LSUrRNA é mais conservado do que os invertebrados de Brachyura de genes de codificação COX-1

e Cyt b, também (SIMON et al., 1994). Os genes de RNA ribossômico (LSU e SSU) são muito distintos, codificando uma estrutura de RNA e funcional dentro do ribossomo.

Tabela 17 - Matriz de distância em partes do número de diferenças de nucleótidos entre espécies para o fragmento LSURRNA. O fragmento usado para criar essa matriz foi de 479 bases nucleotídicas.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 <i>Cardisoma crassum</i>																									
2 <i>Cardisoma guanhumi</i>	0,005																								
3 <i>Gecarcinus quadratus</i>	0,123	0,123																							
4 <i>Heloecius cordiformis</i>	0,209	0,209	0,181																						
5 <i>Macrophthalmus depressus</i>	0,141	0,147	0,120	0,212																					
6 <i>Ocypode quadrata</i>	0,165	0,171	0,150	0,216	0,190																				
7 <i>Minuca rapax</i>	0,152	0,52	0,103	0,174	0,140	0,144																			
8 <i>Uca anullipes</i>	0,180	0,173	0,143	0,209	0,186	0,168	0,097																		
9 <i>Uca hesperiae</i>	0,180	0,187	0,150	0,203	0,171	0,150	0,109	0,115																	
10 <i>Uca inversa</i>	0,180	0,180	0,137	0,193	0,170	0,153	0,075	0,065	0,110																
11 <i>Uca maracoani</i>	0,181	0,187	0,126	0,209	0,168	0,142	0,109	0,147	0,157	0,129															
12 <i>Uca pugilator</i>	0,184	0,184	0,150	0,206	0,199	0,163	0,067	0,112	0,151	0,097	0,129														
13 <i>Uca tangeri</i>	0,194	0,201	0,156	0,244	0,180	0,158	0,147	0,178	0,182	0,181	0,136	0,173													
14 <i>Uca uruguayensis</i>	0,180	0,180	0,131	0,152	0,180	0,159	0,075	0,106	0,132	0,089	0,111	0,081	0,160												
15 <i>Ucides cordatus AL</i>	0,140	0,140	0,114	0,177	0,158	0,129	0,103	0,123	0,129	0,108	0,129	0,129	0,141	0,117											
16 <i>Ucides cordatus CA</i>	0,140	0,140	0,114	0,177	0,158	0,129	0,103	0,123	0,129	0,108	0,129	0,129	0,141	0,117	0,000										
17 <i>Ucides cordatus PA</i>	0,140	0,140	0,114	0,177	0,158	0,129	0,103	0,123	0,129	0,108	0,129	0,129	0,141	0,117	0,000	0,000									
18 <i>Ucides cordatus PI</i>	0,140	0,140	0,111	0,174	0,158	0,132	0,105	0,120	0,126	0,106	0,132	0,132	0,138	0,114	0,002	0,002	0,002								
19 <i>Ucides cordatus SC</i>	0,140	0,140	0,114	0,177	0,158	0,129	0,103	0,123	0,129	0,108	0,129	0,129	0,141	0,117	0,000	0,000	0,000	0,002							
20 <i>Ucides cordatus SP</i>	0,140	0,140	0,114	0,177	0,158	0,129	0,103	0,123	0,129	0,108	0,129	0,129	0,141	0,117	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000						
21 <i>Ucides occidentalis ME</i>	0,137	0,137	0,117	0,180	0,155	0,129	0,105	0,120	0,123	0,108	0,138	0,132	0,141	0,120	0,018	0,018	0,018	0,018	0,020	0,018	0,018				
22 <i>Ucides occidentalis EQ</i>	0,137	0,137	0,117	0,180	0,155	0,129	0,105	0,120	0,123	0,108	0,138	0,132	0,141	0,120	0,018	0,018	0,018	0,018	0,020	0,018	0,018	0,000			
23 <i>Panopeus harttii</i>	0,190	0,190	0,192	0,209	0,189	0,222	0,186	0,209	0,212	0,206	0,205	0,236	0,215	0,208	0,189	0,189	0,189	0,189	0,189	0,189	0,189	0,183	0,183		
24 <i>Eurytium limosum</i>	0,193	0,193	0,205	0,239	0,199	0,236	0,183	0,212	0,212	0,212	0,215	0,243	0,219	0,221	0,192	0,192	0,192	0,192	0,192	0,192	0,192	0,186	0,186	0,041	
25 <i>Goniopsis cruentata</i>	0,146	0,152	0,137	0,202	0,149	0,174	0,149	0,177	0,153	0,162	0,158	0,181	0,162	0,149	0,158	0,158	0,158	0,155	0,158	0,158	0,152	0,152	0,192	0,199	

Tabela 18 - Matriz de distância em pares do número de diferenças de nucleótidos entre espécies para o fragmento COX-1. O fragmento usado para criar essa matriz foi de 571 bases nucleotídicas.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1 <i>Cardisoma crassum</i>																			
2 <i>Cardisoma guanhumi</i>	0,239																		
3 <i>Eurytiom limosum</i>	0,223	0,366																	
4 <i>Gecarcinus quadratus</i>	0,186	0,348	0,235																
5 <i>Goniopsis cruentata</i>	0,189	0,345	0,217	0,202															
6 <i>Heloecius cordiformis</i>	0,178	0,321	0,246	0,204	0,207														
7 <i>Ocypode quadrata</i>	0,245	0,349	0,253	0,231	0,245	0,257													
8 <i>Uca annulipes</i>	0,238	0,350	0,264	0,242	0,252	0,266	0,276												
9 <i>Uca hesperiae</i>	0,188	0,306	0,247	0,221	0,194	0,229	0,208	0,202											
10 <i>Uca inversa</i>	0,180	0,340	0,239	0,208	0,198	0,218	0,233	0,138	0,181										
11 <i>Uca tangeri</i>	0,213	0,367	0,227	0,227	0,212	0,244	0,250	0,256	0,245	0,231									
12 <i>Ucides c. cordatus AL</i>	0,208	0,387	0,251	0,257	0,221	0,246	0,291	0,264	0,227	0,196	0,263								
13 <i>Ucides c. cordatus CA</i>	0,208	0,384	0,248	0,262	0,220	0,241	0,293	0,259	0,224	0,196	0,265	0,007							
14 <i>Ucides c. cordatus PI</i>	0,210	0,383	0,248	0,262	0,220	0,241	0,293	0,258	0,224	0,199	0,265	0,009	0,002						
15 <i>Ucides c. cordatus SC</i>	0,208	0,384	0,248	0,262	0,220	0,241	0,293	0,259	0,224	0,196	0,265	0,007	0,000	0,002					
16 <i>Ucides c. cordatus SP</i>	0,208	0,384	0,248	0,262	0,220	0,241	0,293	0,259	0,224	0,196	0,265	0,007	0,000	0,002	0,000				
17 <i>Ucides c. occidentalis ME</i>	0,187	0,334	0,213	0,239	0,187	0,221	0,253	0,231	0,200	0,192	0,232	0,155	0,162	0,162	0,162	0,162			
18 <i>Ucides c. occidentalis EQ</i>	0,187	0,339	0,209	0,239	0,187	0,216	0,250	0,228	0,193	0,185	0,226	0,148	0,155	0,155	0,155	0,155	0,009		

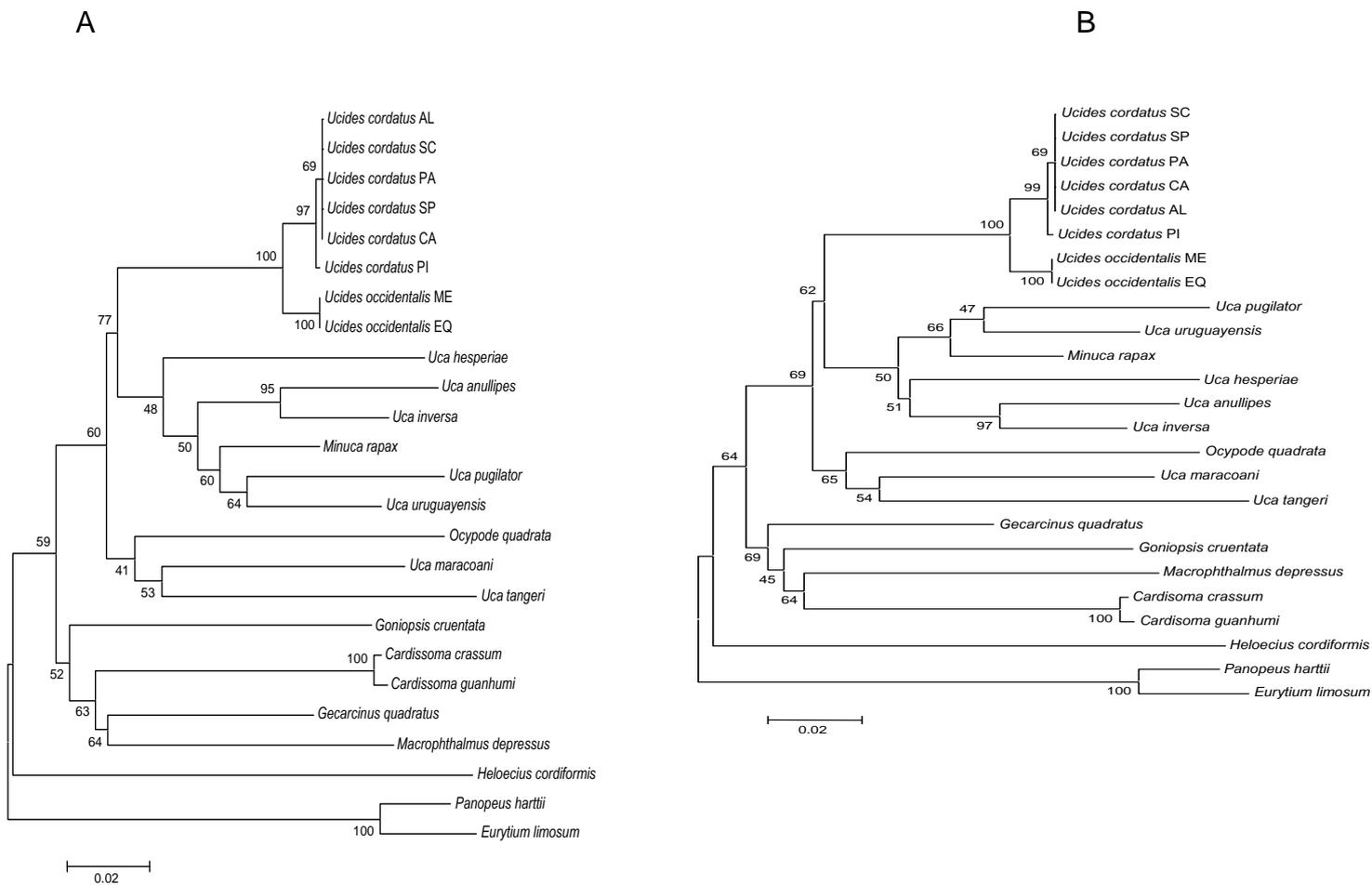
A árvore filogenética construída usando o mesmo modelo evolutivo com distâncias de sequência em pares do gene LSUrRNA por Neighbor-joining (NJ) e Maximum evolution (ME) são mostradas na **Figura 11**, respectivamente.

As topologias de árvores muito semelhantes resultaram da reconstrução de árvores filogenéticas utilizando esses métodos. *Ucides* agrupados com outras espécies de Ocypodidae, todos da mesma subfamília, Ocypodinae, Gecarcinidae espécies agrupadas em uma linhagem separada com todas as suas espécies examinadas, com exceção de *Goniopsis cruentata* (Grapsidae) e *Macrophthalmus depressus* (Ocypodidae).

A espécie *Heloecius cordiformis*, que se acreditava ocupar a mesma posição taxonômica do que *Ucides* era muito diferente das espécies de Ocypodinae, embora não houvesse um suporte muito robusto para esta observação. Portanto, os dados sobre 16S rRNA apresentados aqui sugerem que *H. cordiformis* é apenas distantemente relacionado a *Ucides*.

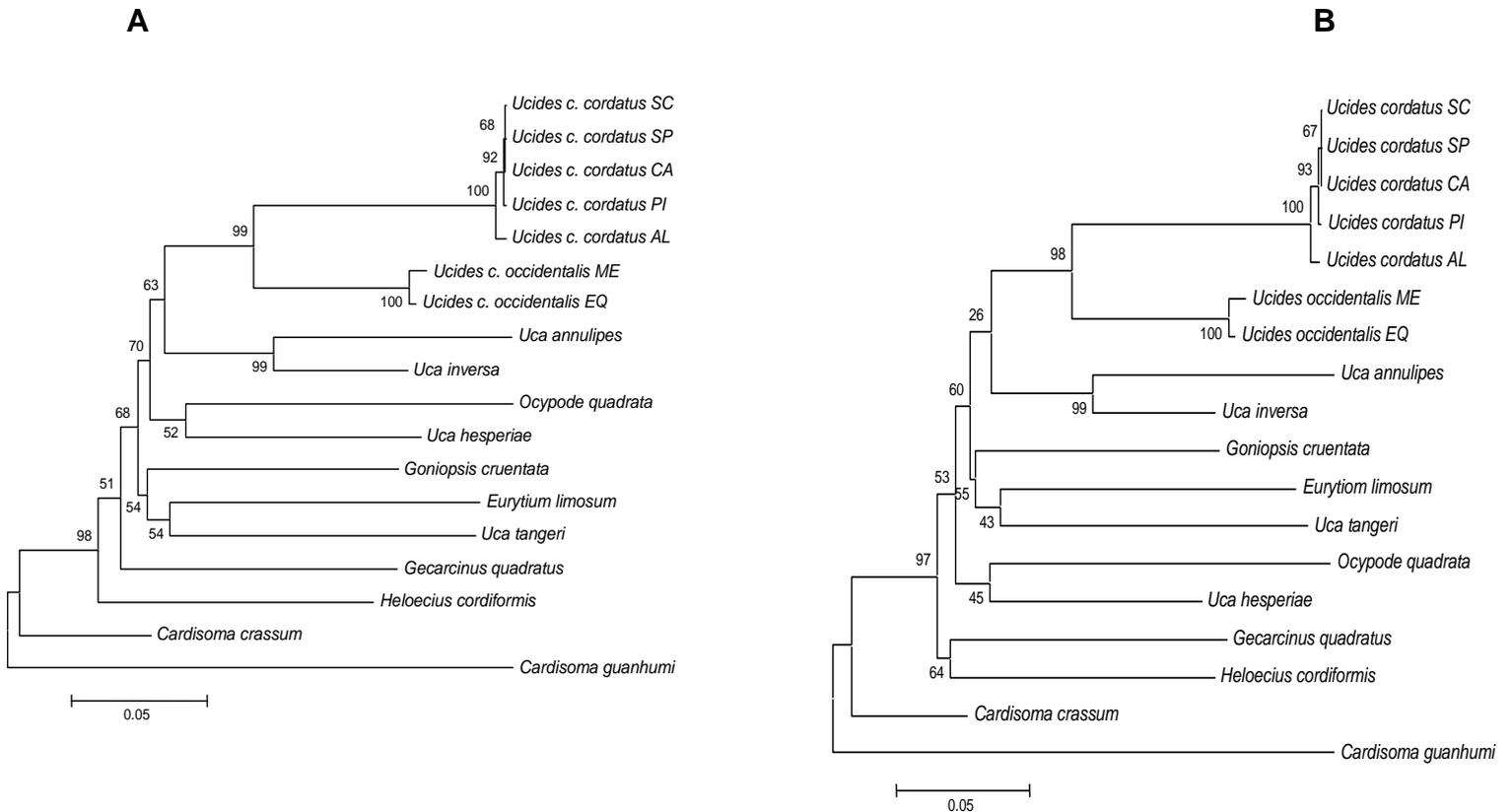
. Com os métodos de NJ e MP, as análises de bootstrapping, um método para avaliar a confiança em uma topologia de árvore, mostram os aglomerados do Atlântico e do Pacífico em dois clados diferentes, com níveis muito elevados de confiança. No entanto, o gene 16S parece ser muito conservado para avaliar com precisão as relações entre essas subespécies.

Figura 11. (A) Árvore Neighbors-joining para o fragmento LSURRNA. (B) Árvore Minimum evolution (ME) para o fragmento LSURRNA. O modelo parametro de Kimura 2 foi utilizado com um valor gama de 0,44. Os números são valores de bootstrap para 1000 repetições.



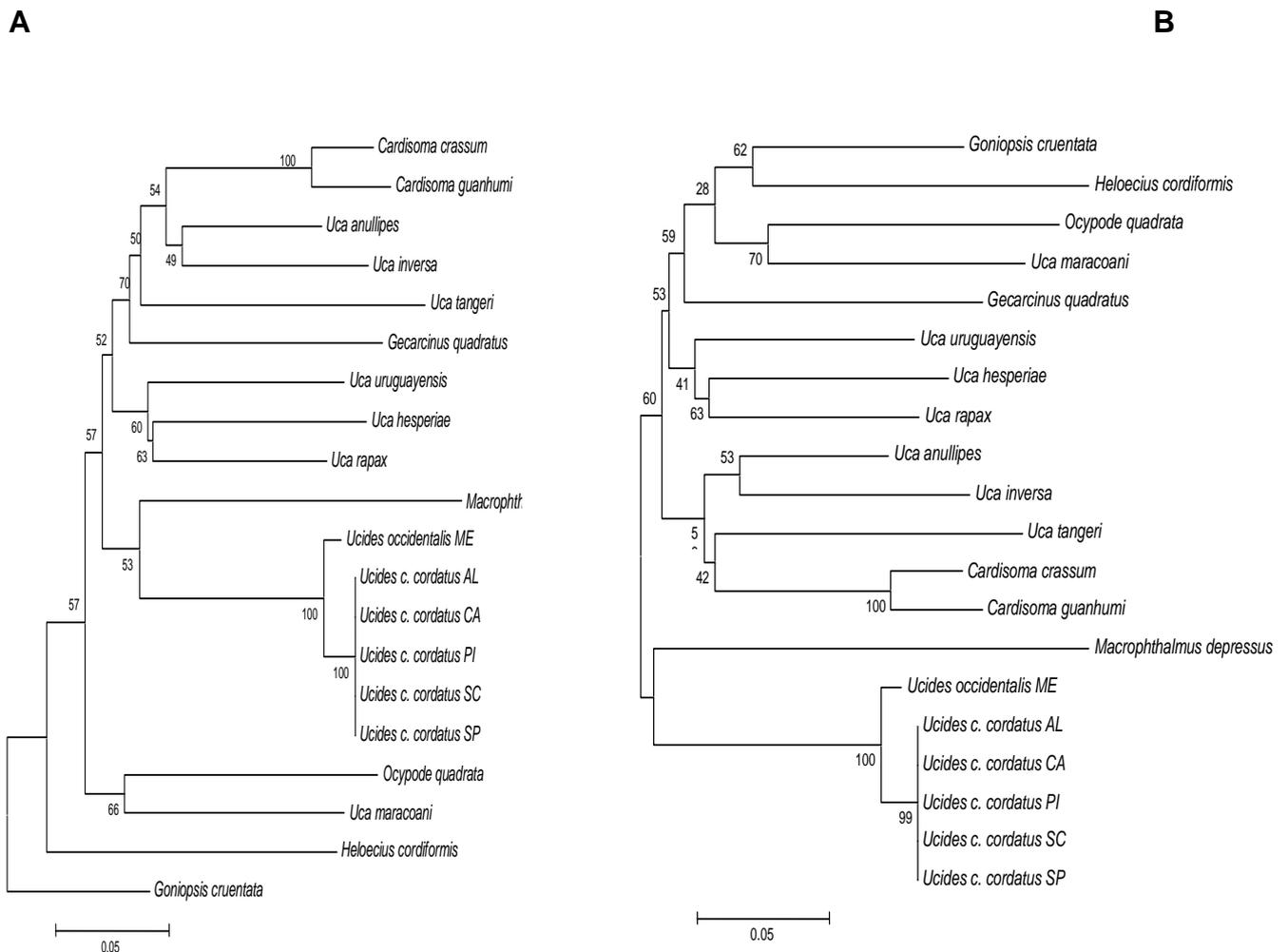
A filogenia da citocromo oxidase I (Figura 12 A e 12 B) revelou observações semelhantes quando comparadas às da árvore LSURRNA. O gênero *Ucides* está mais relacionado às espécies de Ocypodinae, como o complexo *Uca* aqui representado por *U. annullipes*, *U. inversa*, *U. hesperiae* e *U. tangeri*, e também a *Ocypode quadrata*. Mais uma vez, as árvores COX-1 mostram que *Heloecius cordiformis* é apenas distantemente relacionado à *Ucides*. Foram detectadas topologias de árvores muito semelhantes ao usar modelos evolutivos. (Figura 12 B)

Figura 12. (A) Árvore Neighbors-joining para o fragmento COX-1. (B) Árvore Minimum evolution para o fragmento COX-1. O modelo paramentro de Kimura 2 foi utilizado com um valor gama de 0,44. Os números são valores de bootstrap para 1000 repetições.



As árvores reconstruídas das sequências do gene Cyt b (Figura 13) corroboram com os resultados dos outros dois genes mitocondriais, exceto que para alguns níveis de confiança mais fracos de clade detectados por valores de bootstrap mais baixos. Uma diferença razoável entre NJ e ME árvores foi notável.

Figura 13. (A) Árvore Neighbors-joining para fragmento de Cyt-b. (B) Árvore Minimum evolution para fragmento Cyt-b. O modelo parametro de Kimura dois-Parameter foi utilizado com um valor gama de 0,44. Os números são valores de bootstrap para 1000 repetições.



A colocação da espécie de caranguejo *Ucides*, para ambos os morfotipos, na subfamília Heloeciinae deve ser desconsiderada. De fato, de todas as árvores filogenéticas reconstruídas com base nesses três genes mitocondriais diferentes, o gênero *Ucides* deve ser colocado na subfamília de Ocypodinae, como sugerido pela morfologia de traços de larvas (RODRIGUES, HEBLING, 1989). Os valores elevados do bootstrap suportaram esse achado.

O conjunto de dados moleculares (LSUrRNA, COX-1 e Cyt b) utilizado neste suporte permitiu que genes de mtDNA (ou genes parciais) possam oferecer informações adequadas para investigar os taxa dentro da ordem de Brachyura. Alguns genes (genes codificadores de proteínas) foram mais de substituições na terceira posição de codão em genes codificadores de proteínas, o que é provável que eles estejam quase saturados para uma

comparação mais profunda, eles mostraram suporte para clados em diferentes níveis sistemáticos. Outras análises filogenéticas propensos a revelar variações intraespecíficas do que outras nestes manguezais. Como o citocromo b ainda é frequentemente usado em estudos genéticos populacionais para espécies de peixes, esperá-se que este gene revelasse mais divergência intraespecífica do que a citocromo oxidase I, no entanto, isso provou ser errado. Embora a maioria dos sinais filogenéticos tenha vindo utilizando métodos máximos de parcimônia e máxima verossimilhança devem ser implementadas no conjunto de dados originais para ter uma inferência filogenética mais realista, a melhor árvore.

Apesar do fato de ter sido observada uma alta divergência genética das formas do *Ucides* do Atlântico e do Pacífico, sugere-se a inclusão de um gene mais variável neste estudo. Uma vez que a divergência foi examinada usando três genes mitocondriais diferentes, recomenda-se empregar um fragmento nuclear altamente variável para detectar de forma mais expressa às diferenças genéticas entre as duas formas de *Ucides*. Além disso, se as análises morfológicas podem ser adicionadas a este estudo, isso confirmaria o que tem sido evidente a partir dos traços genéticos.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA-FILHO, P Contribuicao ao estudo da biologia e ecologia do caranguejo-ucá, *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Brachyura), no manguezal do Rio Ceará (Brasil). **Arq. Cien. Mar** 18(1/2):1-41. 1978.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215:403-410. 1990.
- AMOS, B.; HOLZEL, A. R..Long term preservation of whale skin for DNA analysis. Rept. Intl. Whaling Commission. Special Issue No. 13:99-103. 1991.
- AVISE, J.C.; BALL, R.M., JR. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. Oxford Surveys in **Evolution Biol.** 7: 45-67. 1990.
- AVISE, JC Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman
- CABRERA PENA, J., VIVES JIMENEZ, F., SOLANO LOPEZ, Y. Size and sex ratio of *Ucides occidentalis* (Crustacea: Gecarcinidae) in a mangrove of Costa Rica. **Heredia Uniciencia**, 11(1-2):97-99. 1994. 1994
- CHACE JR., FA.;HOBBS, H.H. The freshwater and terrestrial decapod crustaceans of the West-indies, with special reference to Dominica. **Bull. U.S. Natn. Mus.**, 292:1-258. 1969
- COELHO, PA. Sinopse dos crustáceos decápodos brasileiros (Família Ocypodidae). **Trab. Oceanog. Univ. Fed. PE**, 23: 135-142. 1995.
- DAWSON, M. N., K. A. RASKOFF, AND D. K. JACOBS (1998). Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses. **Molecular Marine Biology and Biotechnology** 7(2): 145-152.
- DIELE, K. Life history and population structure of the exploited mangrove crab *Ucides cordatus cordatus* (L.) (Decapoda: Brachyura) in the Caeté estuary, North Brazil. **Zentrum für Marine Tropenökologie (ZMT) Contribution** 9. 103p. 2000:
- ENDLER, JA .Conceptual and other problems in speciation. In Otte D, ENDLER JA, eds. **Speciation and its consequences**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- FIELDER, D.R., GREENWOOD, J.G. The systematic position of *Heloecius cordiformis* (H. Milne Edwards, 1837) (Decapoda, Ocypodidae) as revealed by larval morphology. **Crustaceana**, 48(3):244-248. 1985.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98. 1999.

HILLIS, DM; MORITZ, C; MABLE, B. **Molecular Systematics**, 2nd. Edition. Sinauer, Sunderland, MA. 1996.

KIMURA, MA simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.** 16:111-120. . 1980.

KOCHER TD, THOMAS WK, MEYER A, EDWARDS SV, PAABO S, VILLABLANCA F.X.; WILSON, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proc Natl Acad Sci USA.** **86**: 6196-200. 1989.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B. AND NEI, N. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. **Bioinformatics**, 17: 1244-1245.(2001

LEVINTON JS, C STURMBAUER, J CHRISTY.. Molecular data and biogeography: resolution of a controversy over evolutionary history of a pan-tropical group of invertebrates. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 203: 117-131. 1996

LUNT, D.H.; ZHANG, D.X.;SZYMURA. J.M.;HEWITT, G.M. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. **Insect Mol. Biol.** 5:153-165. 1996

MADDISON, W.P., DONOGHUE, M.J., MADDISON, D.R. Outgroup Analysis and Parsimony, **Systematic Zoology**, Vol. 33, No. 1pp. 83-103. 1984

MAGGIONI R, ROGERS AD, MACLEAN N, D'INCAO F Molecular phylogeny of western Atlantic Farfantepenaeus and Litopenaeus shrimp based on mitochondrial 16S partial sequences. **Mol Phylogenet Evol** 18 (1): 66-73. 2001.

MANNING, RB ;HOLTHUIS, L.B. West African brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda). **Smithson. Contrib. Zool.**, 306:1-379. 1981.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos brachyura (Caranguejos e Siris) do litoral brasileiro**. São Paulo, Ed. Plêiade/FAPESP, 604 p. 1996

MERRITT, T.J.S., SHI, L., CHASE, M.C., REX, M.A., ETTER, R.J., QUATTRO, J.M. Universal cytochrome b primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.**, 7(1):7-11. 1998. 1996

OVENDEN, JR.; BOOTH, JD.; SMOLENSKI, A.J. Mitochondrial DNA phylogeny of red and green rock lobsters (genus *Jasus*). **Mar. Freshwat. Res.**, 48 (8): 1131-1136. 1997.

PAGE, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Comput. Appl. Biosci.** 12: 357–358. 1996.

PALUMBI, S. R. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In “**Molecular Systematics**” (D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable, Eds.), 2nd ed., pp. 205–247, Sinauer, Sunderland, MA. 1996

PALUMBI, SR AND BENZIE, J (1991). Large mitochondrial differences between morphologically similar penaeid shrimp. **Mol. Mar. Biol. Biotech.**, 1: 27-34. 1991

RICE P, LONGDEN I, BLEASBY A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends Genet** Jun;16(6):276-7. 2000.

RODRIGUES, M.D.; HEBLING, N.J. *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda). Complete larval development under laboratory conditions and its systematic position. **Rev. Bras. Zool.**, 6(1): 147-166. 1989.

ROZAS, J, ROZAS, R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. **Bioinformatics** 15: 174-175. 1999.

RZHETSKY, A.; NEI, M.. Statistical Properties Of The Ordinary Least-Squares, Generalized Least-Squares, And Minimum-Evolution Methods Of Phylogenetic Inference. **J. Mol. Evol.**, 35 (4): 367-375. 1992.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4:406-425. 1987.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.; HRSG. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York. . 1989.

SCHUBART CD.; CUESTA JA.; RODRIGUEZ, A. MOLECULAR PHYLOGENY OF THE CRAB genus *Brachynotus* (*Brachyura* : *Varunidae*) based on the 16S rRNA gene. **Hydrobiologia**, 449 (1-3): 41-46. 2001.

SIMON, C., F.; FRATI, A.T.; BECKENBACH, B. CRESPI, H. LIU, P. FLOOK. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America** 87:651-701. 1994.

SWOFFORD, D. L.. *PAUP** **Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)**. Version 4.

TAM, YK AND KORNFIELD, I Phylogenetic relationships of clawed lobster genera (Decapoda : Nephropidae) based on mitochondrial 16S rRNA gene sequences. **J. Crustacean Biol.** **18** (1): 138-146. 1998.

TAVARES, M.S. (1990). Considerations sur la position systematique du genre *Ucides* Rathbun, 1897 (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae). **Bol. Mus. Nac.** 342:1-8.

TÜRKAY, M. Die Gecarcinidae Amerikas mit einem anhang über *Ucides* Rathbun. **Senckenberg. Biol.**, **51**(5/6): 333-354. 1970.

TÜRKAY, M.). The systematic position of an Australian mangrove crab *Heloecius cordiformis* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). **Mem. Austral. Mus.**, 18:107-111. 1983.

YANG, Z. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. **TREE** 11:367-372. 1996..

CAPÍTULO IV

Conectividade populacional e dispersão larval do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* explorado ao longo da costa brasileira*

*Artigo publicado na revista internacional PeerJ; Impact fator = 2,993; Qualis (Biotecnologia) = B1

Resumo:

Introdução: o caranguejo de mangue *Ucides cordatus* é considerado uma espécie chave para o equilíbrio ecológico das florestas de manguezais e uma importante fonte de emprego e renda para os catadores tradicionais de caranguejo no Brasil. Vários estudos evidenciaram fraca variação genética entre as populações devido a um eficiente transporte larval. No entanto, os padrões de fluxo de genes da espécie é mal compreendida, sem informações sobre as taxas de migração. A influência das duas principais correntes brasileiras na dispersão larvária também não é clara. Para fornecer informações de base para conservação, planejamento e gerenciamento deste importante recurso pesqueiro, o presente estudo teve como objetivo estimar e avaliar a distribuição espacial da diversidade genética, taxas de migração e fluxo genico e diretividade entre populações de *U. cordatus* no Brasil. **Métodos.** Foram utilizados nove microsátélites para estudar a genética populacional de 319 caranguejos coletados em seis locais localizados de regiões Norte a Sul da costa brasileira. Após a determinação das estimativas da diversidade genética, as análises da estrutura populacional foram realizadas utilizando F'statistics, distância D de Jost, AMOVA, análise DAPC e abordagens bayesianas implementadas no software STRUCTURE. Os modelos de genes e o número efetivo de migrantes foram avaliados com MIGRATE. **Resultados.** Loci foram altamente polimórficos, com média de 12,4 alelos por locus. Apesar da alta variabilidade genética, observou-se baixa diferenciação entre as localidades de acordo com os valores de FST e D Jost's (média = 0,013 e 0,034, respectivamente), porém observaram-se diferenças estatisticamente significativas. STRUCTURE evidenciou um único grupo genético entre as amostras, enquanto a AMOVA detectou quatro grupos, apesar do baixo nível de diferenciação (FCT = 0,037; P = 0,023). O modelo de genes que descreveu a conectividade da população foi o modelo da ilha, com ≈ 24 caranguejos sendo trocados entre as localidades por geração. **Discussão** A alta taxa de migração encontradas entre as localidades parecem ser a principal força que atua para sustentar a distribuição de da diversidade genética de *U. cordatus*. Apesar do alto fluxo de genes e da fraca estrutura de população entre as amostras, as diferenças genéticas significativas encontradas sugerem que o fluxo de genes sozinho não ignora os efeitos da deriva genética, seleção natural e / ou exploração humana. Essas descobertas são vitais para o estabelecimento de um banco de dados a ser usado no desenvolvimento de programas de conservação

Palavras-chave: Estrutura populacional; Fluxo gênico; Microsatélites; conservação; Taxa de migração

ABSTRACT

Background. The mangrove crab *Ucides cordatus* is considered a key species for the ecological balance of mangrove forests and a major source of employment and income for traditional crab collectors in Brazil. Several studies evidenced weak genetic variation among populations due to an efficient larval transport. However, gene flow patterns of the species is poorly understood, with no information about migration rates. The influence of the two main Brazilian currents in larval dispersion is also not clear. In order to provide baseline information for conservation, planning and management of this important fishery resource, the present study aimed to estimate and evaluate spatial distribution of genetic diversity, migration rates and gene flow directivity among populations of *U. cordatus* in Brazil. **Methods.** Nine microsatellites were used to resolve population structure of 319 crabs collected from six sites located along the Brazilian coast. The degree of geographical differentiation included estimates of genetic diversity, population structure and gene flow models, with spatial analysis of shared alleles, isolation by distance tests, AMOVA, Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) and Bayesian clustering. We estimated the amount of ongoing gene flow between clusters using the coalescent-based method implemented in Migrate-N. **Results.** Loci were highly polymorphic (average of 12.4 alleles per locus) evidencing high genetic variability. There was significant differentiation among localities, despite of the low value of F_{ST} ($=0.019$; $P < 0.001$). F_{ST} and Jost's D indexes were also estimated in pairwise comparisons and showed significant differences between most of the surveyed site pairs ($P < 0.05$). Structure evidenced a single genetic group among samples, however spatial analysis of shared alleles pointed to a non-panmictic condition ($P=0.011$). AMOVA detected four statistical significant clusters with low level of differentiation ($F_{CT}=0.037$; $P = 0.023$). The gene flow model that best described the population connectivity was the island model, with ~24 crabs being exchanged among localities per generation. **Discussion.** The high migration rates found among localities seem to be the main force acting to sustain the distribution of the genetic diversity of *U. cordatus*. Despite of the high gene flow and the weak population structure among samples, the significant genetic differences found suggest that gene flow alone does not bypass the effects of genetic drift, natural selection and/or human exploitation. These findings are vital for the establishment of a database to be used in the development of conservation programs.

Keywords: population structure; gene flow; microsatellites; conservation; migration rate

1 INTRODUÇÃO

O caranguejo *Ucides cordatus* é um dos habitantes mais típicos dos ecossistemas de mangue América Central e do Sul (MELO 1996). É abundante ao longo da costa brasileira, onde a pesca de caranguejo é uma das atividades mais importantes em vários estuários, e uma fonte de emprego e renda para muitos catadores tradicionais de caranguejo (DIELE et al., 2005).

Este crustáceo decápode também é considerado uma espécie-chave para o equilíbrio ecológico nas comunidades bentônicas de manguezais e tem a maior biomassa entre os invertebrados de mangue (WOLFF, 2000).

A espécie tem um forte impacto na rotatividade do material orgânico no mangue, ciclos de nutrientes, aeração do solo e produtividade no manguezal (PULMANNNS et al., 2014, 2016). Apesar de sua importância para o ecossistema e abundância ao longo do ano, a espécie *U. cordatus* está atualmente na lista de espécies ameaçadas pela sobrepesca no Brasil (PINHEIRO, RODRIGUES, 2011). Além da exploração e destruição do habitat, uma doença fungosa afetou populações de caranguejo em vários locais (SCHMIDT et al., 2008; VICENTE et al., 2012). Juntos, esses eventos podem reduzir a diversidade genética e eliminar estoques bem adaptados, o que causaria a diminuição dos estoques pesqueiros (AVISE, HAMRICK, 1996).

Este caranguejo pertence à infra-ordem Brachyura, família Ucididae (Crustacea: Decapoda) e tem sido estudado extensivamente no Brasil. Sua alta fecundidade provavelmente pode causar um impacto direto na ecologia da espécie e sua conservação. Os valores registados de fecundidade por fêmea variam de 36.081 a 250.566 ovos (PINHEIRO et al., 2003), enquanto a fertilidade variou de 71.200 a 220.800 larvas (HATTORI, PINHEIRO, 2003). Também uma dispersão larval eficiente é importante para manter altos níveis de diversidade genética. O processo começa com caranguejos realizando movimentos de acasalamento sincronizados que permitem a emissão de larvas especificamente na mais forte maré do mês (em torno da lua nova ou da lua cheia), seguindo a "Maré de Syzygy do ciclo de desigualdade", que fornece transporte larval eficiente para as águas oceânicas (SCHMIDT et al., 2012). As larvas planctônicas euryhalinas *U. cordatus* zoea I e II são capazes de

tolerar uma ampla gama de salinidades e, portanto, sobrevivem em refúgios temporários. No entanto, após essas primeiras fases larvais, que levam cerca de 6 dias, os estádios de desenvolvimento final não toleram salinidades baixas e são exportados para o mar aberto (SIMITH, DIELE, 2008). Estudos também mostraram que o desenvolvimento até megalopal dura 20-69 dias, dependendo das condições de temperatura e salinidade (RODRIGUES, HEBLING, 1989; ABRUNHOSA et al., 2003; DIELE, SMITH, 2006), tempo suficiente para a dispersão de longo alcance. A transição do plâncton para o bentônico começa com a reinvasão do estuário pelo último estágio larval, megalopa. O assentamento do megalopa e a metamorfose ocorrem principalmente em tocas (SCHMIDT, DIELE, 2009), desencadeada por odores emanados por juvenis e adultos (SIMITH et al., 2013). Adultos atingem o tamanho mínimo legal de captura após 6,13 anos em machos e 7,38 anos em fêmeas (DIELE, KOCH, 2010).

Vários estudos relataram alta diversidade genética para o *U. cordatus* usando marcadores moleculares como RAPD, PCR-RFLP (OLIVEIRA-NETO et al., 2007a), sequências de *mtDNA* da região de controle (OLIVEIRA-NETO et al., 2007b; PIE et al., 2008) e ISSR (BRITTO et al., 2011).

Esses estudos também não forneceram nenhuma evidência da estrutura da população entre os sítios pesquisados. No entanto, em espécies de ampla distribuição, marcadores de microsátélites apresentam melhor resolução para detectar qualquer vestígio de diferenciação genética entre populações que vivem separadas, e podem estar sob forças desiguais de seleção natural. Normalmente, esses marcadores têm um grau excepcional de polimorfismo e informação para estudos evolutivos e ecológicos (ABDUL-MUNEER, 2014). Oliveira-Neto e colaboradores (2014) usando marcadores microssatélites em *U. cordatus* evidenciaram diferenças genéticas fracas, mas significativas entre as populações ($F_{ST} = 0,03$, $p < 0,0014$). Mesmo assim, nenhuma informação quantitativa sobre a magnitude do fluxo genético ou sua possível direção foi avaliada .. A análise bayesiana com métodos de Monte Carlo da Cadeia de Markov (MCMC) pode ser usado para fornecer estimativas de fluxo de genes sem a hipótese irreal de simetria de taxas de migração ou tamanhos de população iguais (FAUBERT et al., 2007). Um método proposto por Beerli e Felsenstein (2001) usa dados moleculares para determinar a genealogia da amostra e fornecer uma estimativa da migração mesmo nos casos em que a diferenciação entre

as populações é assumida como insignificante. Além disso, diferentes modelos em relação à direção da migração podem ser testados para detectar possíveis rotas de dispersão larval ao longo do oceano.

Devido ao alto valor ecológico e social desta espécie, uma cobertura mais ampla também deve ser realizada, particularmente em estuários sob a possível influência da Corrente do Norte do Brasil (**Figura 1**). Oliveira-Neto et al. (2014) concentraram a maior parte de sua amostra (77%) ao longo de uma pequena porção de a costa brasileira do Nordeste (mais de aproximadamente 370 km), com apenas dois locais de coleta localizados em sua parte inferior e limites de distribuição superiores. Neste artigo, cobrimos outras localidades de amostragem e usamos outro conjunto de marcadores de microsátélites com o objetivo de: (i) avaliar a distribuição espacial da diversidade genética de *Ucides cordatus* ao longo do litoral brasileiro, incluindo estuários sob a influência da Corrente do Norte do Brasil (NBC) Corrente do Brasil (BC), dois sistemas principais de circulação oceânica que circulam em direções opostas, longe de um ao outro; (ii) testar diferentes modelos de migração para estimar a direção da dispersão larval; e (iii) estimativa as taxas de migração entre as localidades. Um novo *locus* de microsatélite de tetranucleótidos perfeito também é relatado para a avaliação da variabilidade genética entre as populações de *U. cordatus*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras de caranguejo

De 2006 a 2008, um total de 319 caranguejos foi coletado de seis estuários diferentes, conforme descrito na **Figura 1**. Em cada estuário, todos os caranguejos foram coletados no mesmo local e no mesmo dia. Amostras de tecido de um segmento do último pereiópodes foram removidos usando um método não-letal e imediatamente preservados em 95 a 100% de etanol em 2,0 mL de crioviais. Todas as amostras foram então levadas ao laboratório e armazenadas a -20 ° C até à sua utilização.

Figura 1. Localidades de amostragem de populações de *Ucides cordatus* pesquisadas ao longo da costa brasileira. FLO, Florianópolis - SC (n = 11); CAN, Cananéia - SP (n = 100); CAR, Caravelas - BA (n = 80); FOR, Fortim - CE (n = 54); GOI, Goiabeiras - CE (n = 23); CAU, Caucaia - CE (n = 48); PAR, Parnaíba - PI (n = 26); CUR, Curuçá - PA (n = 50); E SOU, Soure - PA (n = 50). As direções da Corrente Norte do Brasil (NBC) e da Corrente do Brasil (BC) também são mostradas.



Fonte: <https://freevectormaps.com/> modificado. Farias, A.M.

2.2 Extração de DNA e genotipagem de microssatélites.

O DNA genômico total foi extraído do tecido muscular utilizando uma extração de álcool / fenol / clorofórmio-álcool isoamílico (25: 24: 1, v: v: v) de tecido digerido por SDS / protease-K de cada indivíduo (SAMBROOK et al., 1989). O DNA de elevado peso molecular foi isolado por precipitação com etanol e visualizado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando a coloração SyberSAFE (Invitrogen).

Os pares de Primer UcSSR-01 a UcSSR-08 (BRITTO et al., 2009) foram utilizados para acessar oito loci de microssatélites. As PCR foram realizadas de acordo com a referência acima em reações de 10 μ L. Um marcador extra-tetranucleotídico de repetição de microssatélites foi incluído na análise como um marcador adicional, UcSSR-09 (Primer forward: 5'-TTTCCTATCTCCATCTCCTTC-3', Primer inverso: 5'-ACATCATCGCAAATTCAGAG-3'). Este locus foi isolado sob as mesmas condições descritas por Britto et al. (2009), e neste estudo, seguiu as

mesmas condições de PCR utilizadas para os outros Primer, no entanto usando 56 C° como a temperatura de anelamento. Os produtos de PCR foram realizados em géis de poliacrilamida desnaturantes a 6% e visualizados usando coloração de prata seguindo o protocolo modificado descrito para Benbouza et al. (2006). Os tamanhos de produto foram determinados por comparação com uma escada de DNA de 10 pb (Invitrogen) e marcados manualmente. Os indivíduos foram genotipados para obter informação de frequência de alelo de linha de base.

2.3 Análise dos dados

2.3.1. Controle de qualidade dos dados

Após a genotipagem, o conjunto de dados foi analisado em MICRO-CHECKER 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., (2004). Para estimar: (a) alelos fora do intervalo esperado (mudanças no tamanho do alelo); (B) valores com módulo inconsistente (isto é, três variações de base para microsatélites de tetranucleótidos); (C) presença de alelos nulos dentro de cada locus seguindo o parâmetro Brookfield-1996.

A probabilidade de desequilíbrio de ligação entre pares de loci foi determinada usando o teste exato de Fisher em GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995) com 1.000 etapas de dememoração, 100 lotes e 1.000 iterações por lote.

2.3.2. Polimorfismo dos loci

Todos os nove loci de microsatélites foram primeiramente caracterizados usando todos os 319 indivíduos coletados ao longo da costa brasileira. O número total de alelos (A) foi estimado pelo FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 1995). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) também foi determinado utilizando CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al.,2007). Foram realizadas heterozigotas observadas e esperadas (HO e HE) e testes exatos para a partida das expectativas de Hardy-Weinberg (pHWE) utilizando GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995)]. O pHWE foi calculado de acordo com o teste de probabilidade utilizando 1.000 passos de dememoração, 100 lotes e 1.000 iterações por lote.

2.3.3. Diversidade genética e estrutura populacional entre os locais:

A diversidade genética para cada locus foi avaliada pelo FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 1995), que determinou os valores de F (F_{IT}), q (F_{ST}) e f (F_{IS}) de acordo com estimativas de Weir e Cockerham (1984) para todo o conjunto de amostras. GENALEX 6,503 (PEAKALL, SMOUSE, 2006) foi utilizado para determinar a influência da distância geográfica em diferenciação genética, calculando a significância das correlações entre “ F_{ST} linearizado a par a par (pairwise) $F_{ST} [F_{ST} / (1 - F_{ST})]$ ” e distâncias geográficas costeiras (de acordo com o modelo unidimensional; distâncias em Km podem ser encontradas em arquivo suplementar, “Coastline Distance”, usando o teste de Mantel com 1.000 permutações.

O mesmo procedimento também foi realizado usando as distâncias de D Jost (Jost, 2008) entre cada par de localidades. Os valores de probabilidade de comparações pareadas foram corrigidos para controlar a taxa de erro Tipo I usando a correção de Bonferroni, conforme implementado na função “p. adjust” do software R (R Core Team, 2017), com valor de significância de 0,05.

Os padrões de estrutura populacional foram primeiramente testados por AMOVA, usando ARLEQUIN 3.5 (Excoffier et al., 2005), com 1.000 permutações. Amostras de diferentes localidades foram organizadas de acordo com posição geográfica nos grupos BC (Brazil Current) e NBC (North Brazil Current). Grupo BC foi representado por amostras de “CAN e CAR”, enquanto o grupo NBC foi constituído por amostras de “FOR, CAU, CUR e SOU” (ver Figura 1). Assim, o valor da F_{CT} foi estimado considerando os grupos BC vs NBC. Além disso, outra configuração a priori foi testada, organizando amostras em três grupos: BC vs NBC-1 (FOR e CAU) vs NBC-2 (CUR e SOU)

Os mesmos dados também foram processados no software SAMOVA 2.0 (Dupanloup et al., 2002), que implementa uma abordagem para definir grupos de populações que são diferenciadas ao máximo entre si enquanto executam a análise AMOVA. O software foi configurado para organizar amostras em várias configurações, começando com dois grupos até cinco grupos. Os testes foram realizados com e sem informações de posição geográfica de cada localidade.

A ocorrência de estrutura genética entre as amostras também foi investigada pela STRUCTURE 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000), que implementa um algoritmo de agrupamento bayesiano onde as informações a priori sobre a origem das amostras não foram utilizados. As análises foram realizadas de acordo com o modelo de mistura considerando que não houve desequilíbrio de ligação entre os marcadores. Dez corridas com um burn-in de 200.000 e um comprimento de corrida de 700.000 iterações foram realizadas para um número de clusters variando de $K = 1$ a $K = 8$. O número mais provável de populações foi estimado de acordo com as probabilidades posteriores de cada K testado como descrito por (PRITCHARD et al. (2000).

O pacote R ADEGENET (Jombart, 2008) foi empregado para executar a Análise Discriminante do Principal Componentes (DAPC). Este método destina-se a identificar e descrever a otimização de clusters genéticos variações entre os clusters e minimizar a variação dentro deles. Inicialmente a função “find. clusters” foi aplicado para detectar o número de clusters que melhor representa os dados que começam com os análise de componentes principais (PCA). O número ideal de clusters (k -média) foi estimado usando diferentes agrupamentos soluções que foram comparadas usando o critério de informação bayesiana.

Os grupos formados com amostras dos diferentes locais foram então plotados em um gráfico onde as linhas correspondem aos grupos reais (locais de amostra”), enquanto as colunas correspondem a grupos inferidos. Depois a função “dapc” foi usado e um novo PCA foi realizado. Neste momento, o número de componentes representando pelo menos 85% da variância total dos dados foram escolhidos e o número de autovalores a serem seguidos no funções discriminantes foram definidas. Os resultados foram mostrados graficamente em um gráfico de dispersão com cada ponto correspondente a uma amostra.

Evidências de panmixia na área de amostragem coberta também foram testadas com o algoritmo implementado por SASHA (Análise Espacial de Alelos Compartilhados) (Kelly et al., 2010). A distribuição dos alelos observada e esperada foi estimada usando coordenadas geográficas dos locais de amostragem em uma corrida com 1.000 permutações.

Modelos de fluxo gênico: MIGRATE 4.2.14 (Beerli e Felsenstein, 2001) foi usado para estimar o fluxo gênico entre os locais de amostra e a diretividade dos eventos de migração de acordo com os diferentes modelos. Estas análises foram realizados considerando os resultados da F_{CT} (ver AMOVA acima), onde as localidades pertencentes grupo ($F_{CT} < 0,05$) foram agrupados e analisados como uma única população. Depois, o seguinte modelos de migração com seus respectivos pressupostos foram testados:

Migração Direcional 1: o fluxo gênico segue preferencialmente de norte a sul da costa brasileira;

Migração direcional 2: o fluxo gênico segue preferencialmente do litoral sul para o norte do Brasil;

Migração direcional 3: o fluxo gênico segue a direção BC (para sul) e NBC (para norte) a partir da bifurcação dessas correntes principais;

Modelo de Stepping Stone: há migração simétrica entre vizinhos e nenhuma migração direta entre localidades não vizinhas;

Modelo da ilha: há um fluxo gênico constante entre cada local da amostra;

Panmixia: existe uma população única e enorme com mate aleatório.

Os replicados foram executados usando um modelo de microssatélite em um método de etapa única com mutação constante taxa e parâmetros de partida com base nos cálculos FST. A distribuição prévia foi ajustada para ser uniforme para o tamanho efetivo de população com escala de mutação $Q (= 4 N_e)$ e taxas de migração com escala de mutação $M (= m / \mu)$.

As corridas foram replicadas com diferentes sementes aleatórias quatro vezes para garantir a convergência. O número efetivo de migrantes (N_m) foi estimado pela relação $N_m = (Q \times M) / 4$. O cálculo foi realizado com um burn-in de 10.000 iterações para cada cadeia e uma cadeia longa com 100 incrementos e 10.000 gravados passos em cada cadeia.

A integração termodinâmica (usada para descobrir as Probabilidades marginais) foi determinada com Bezier pontuação aproximada após definir um esquema de aquecimento estático com 4 cadeias com temperaturas de 1,00, 1,50, 3,00 e 500,000.00. Uma matriz com a distância linear de pares (em Km) entre cada local de amostra foi usado na análise, permitindo que as taxas de migração fossem escalonadas para a taxa de mutação e por essas distâncias. Cada modelo proposto

foi executado dez vezes para verificar os desvios padrão da probabilidade marginal (mL) e garantir a confiabilidade das estimativas.

O fator de Bayes foi calculado com os fatores log bayes naturais (LBF) onde

$$LBF = 2[\ln(mL_{model1}) - \ln(mL_{model2})].$$

Probabilidades marginais também foram usadas para encontrar o modelo com o melhor suporte estatístico (maior probabilidade), onde

$$Prob(model_i) = \frac{mL_{model_i}}{\sum_j^n mL_{model_j}}.$$

3 RESULTADOS

3.1 Diversidade de microssatélites

Todos os loci de microssatélites foram polimórficos em todas as seis localidades amostradas. As análises de 319 indivíduos coletados ao longo da costa brasileira mostraram que o número total de alelos variou de 5, para locus UcSSR-05, para 27, para locus UcSSR-06, com uma média de 12,4 (s.d. = 7,6) alelos por locus (Tabela 1). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi estimado para avaliar o nível de polimorfismo de cada locus e variaram de 0,453 a 0,939 (média de 0,660; s.d. = 0,164).

Heterozigosidade observada as estimativas para *U. cordatus* variaram de 0,349 (locus UcSSR-04) a 0,946 (locus UcSSR-06), enquanto que heterozigosidade esperada variou de 0,440 (locus UcSSR-01) a 0,930 (locus UcSSR-06).

Meio geral heterozigosidade observada para os nove loci (0,660) foi menor que a heterozigosidade esperada média (0,679). Com exceção do locus UcSSR-04, todos os microssatélites se conformaram às expectativas de equilíbrio Hardy-Weinberg.

O desvio significativo de HWE ($p_{HWE} < 0,001$) foi interpretado como uma indicação de alelos nulos com uma probabilidade de ocorrência de 20,1% para esse locus (Tabela 1). Quando este marcador foi excluído de análise, a diferença entre as estimativas de HO e HE foi considerada insignificante, com valores médios de 0,698 e 0,694, respectivamente.

A estimativa de Multilocus para q (análogo ao F_{ST} de Wright) em todos os nove loci variou pouco com ou sem UcSSR-04 (0,015 e 0,016, respectivamente),

apresentando baixo nível de diferenciação entre as localidades. As amostras gerais de endogamia (F) e as localidades (f) foram menores quando este locus foi excluído a partir da análise (Tabela 1), no entanto, em ambas as situações as estimativas foram próximas de zero (0,032 e 0,003 para F; 0,0166 e -0,014) para f.

Tabela 1. Caracterização de loci microsátélites para *Ucides cordatus*, ampliada de 319 indivíduos de seis localidades. A = número total de alelos; NA = probabilidade de ocorrência de Allele Nulo; PIC = conteúdo de informação polimórfica; HO = heterozigosidade observada; HE = "dentro da amostra" heterozigosidade esperada; F = estimativa do FIT de Wright; q = estimativa do FST de Wright; f = estimativa do FIS de Wright; pHWE = nível de diferença de significância do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Locus	GenBank Accession no.	Repeat motif	Size Range (bp)	A	NA	PIC	HO	HE	F	θ	f	pHWE
UcSSR-01	FJ483820	CTCGn	115-143	8	0.018	0.447	0.383	0.425	0.168	0.011	0.044	1.000
UcSSR-02	FJ483821	CTGTn	131-171	11	0.009	0.735	0.702	0.750	0.172	0.016	0.005	0.989
UcSSR-03	FJ483822	ACAGn	111-163	10	0.011	0.715	0.709	0.714	0.155	0.010	0.021	0.974
UcSSR-04	FJ483823	TCTAn	156-176	6	0.142*	0.562	0.306	0.551	0.685	0.015	0.378	<0.001
UcSSR-05	FJ483824	TGTAn	161-177	5	0.014	0.495	0.463	0.506	0.102	0.000	0.042	0.605
UcSSR-06	FJ483825	ATAGn(N)11GATAn	173-273	26	0.001	0.939	0.928	0.936	0.048	0.010	-0.007	0.999
UcSSR-07	FJ483826	CATAn/ACAGn	175-215	11	-0.016	0.682	0.675	0.679	0.069	0.006	-0.055	0.977
UcSSR-08	FJ483827	ACTn (N)21CTAn	260-329	22	-0.009	0.675	0.691	0.699	0.141	0.008	-0.031	1.000
UcSSR-09	-	CTATn	294-358	17	-0.012	0.903	0.945	0.854	0.278	0.063	0.074	1.000
<i>Mean/Multilocus estimate</i>				12		0.684	0.645	0.668	0.041	0.017	0.025	
2.5% lower bound confidence interval				(± 7.3)		(± 0.167)						
				(for all 9 loci)					-0.006	0.008	0.015	
97.5% upper bound confidence interval									0.129	0.030	0.059	
<i>Mean/Multilocus estimate</i>						0.669	0.687	0.684	0.007	0.017-0.011		
2.5% lower bound confidence interval						(± 0.172)						
				(for all 8 loci in HWE)					-0.012	0.007-0.037		
97.5% upper bound confidence interval									0.028	0.032	0.018	

Considerando a diversidade por localidade, o número médio de alelos por locus e riqueza de alelos variou pouco entre os sitios (Tabela 2). Os valores médios mínimos e máximos de HO encontrados por localidade foram de 0,61 e 0,73, enquanto que para os valores de HE variou entre 0,64 a 0,70 (Tabela 2). Uma vez

que UcSSR-04 mostrou presença significativa de alelos nulos, foi removido da estrutura populacional e análises de fluxo de genes.

A qualidade dos dados também foi observada considerando a independência destes marcadores e, todos os testes em pares do desequilíbrio de ligação não foram significativos ao comparar todos os loci em cada população, bem como em todas as populações com o nível de significância de 0,05.

Estruturação populacional

As distâncias *FST* e Jost's *D* evidenciaram baixas diferenças genéticas entre as localidades (*FST* médio = 0,013; SD. = 0,004 / médio Jost's *D* = 0,034; SD. = 0,021) (Tabela 3). Teste de Mantel realizado com distâncias genética e distâncias de litoral geográfico linear (arquivo suplementar, "Distância do litoral") não mostraram correlação significativa (Mantel *FST*: $R^2 = 0,04$, $P = 0,220$; Mantel Jost's *D*: $R^2 = 0,10$, $P = 0,140$). O agrupamento bayesiano usando STRUCTURE também sugeriu falta de diferenciação genética entre as amostras brasileiras. Com um único grupo genético sugerido (probabilidades posteriores $\approx 100\%$ para $K = 1$). Independentemente destes achados, as comparações em pares das distâncias genéticas mostraram significância estatística não há diferenças entre várias localidades. A amostra mais ao sul (CAN) mostrou significância genética diferenças de todas as outras localidades. Além disso, amostras de FOR foram estatisticamente diferentes da maioria.

Tabela 2 - Informações gerais da amostra e índices de diversidade média por locus para cada localidade. A = média número de alelos por locus; AR = riqueza alélica média por locus; HO = heterozigosidade observada média por locus; HE = heterozigosidade esperada média por locus. Todas as estimativas são seguidas pelos respectivos desvios padrão entre parênteses

Localidade	Tamanho / amostra	Longitude	Latitude	Data de coleta	A (•) s.d.)	AR (•) s.d.)	HO (•) s.d.)	HE (•) s.d.)
CAN	91	47°59'03"W	25° 04'31"S	2008/jan	11.3 (5.6)	10.1 (5.0)	0.73 (0.05)	0.70 (0.05)
CAR	51	39°26'55"W	18° 01'57 S	2008/mar	10.0 (6.4)	09.5 (6.1)	0.71 (0.07)	0.69 (0.05)
FOR	49	37°46'16"W	04° 31'52"S	2006/nov	08.0 (4.6)	07.8 (4.5)	0.64 (0.07)	0.64 (0.06)
CAU	44	38°46'30"W	03° 35'11"S	2006/nov	09.0 (5.5)	08.9 (5.5)	0.64 (0.08)	0.67 (0.06)
CUR	42	47°50'36"W	00° 39'23"S	2007/dez	09.5 (5.9)	09.5 (5.9)	0.63 (0.07)	0.68 (0.06)
SOU	42	48°33'11"W	00° 42'30"S	2007/dez	09.4 (5.9)	09.4 (5.9)	0.61 (0.07)	0.65 (0.05)
Média / localidade	53.2 (s.d. = 18.9)			9, 5	9,2	0,66	0,67	

Outras localidades, com exceção da sua vizinha CAU. As localidades vizinhas CUR e SOU também têm não apresentaram diferenças significativas (Tabela 3).

Amostras de CAR, que estavam sob a influência do Brasil Correntes, não apresentaram diferenças significativas de CAU e CUR (amostras sob a Corrente do Norte do Brasil influência; ver Figura 1), no entanto, diferenças significativas foram encontradas quando comparadas a outras amostras. Apesar das diferenças significativas entre as localidades mais distantes e a ausência de diferenças entre os mais próximos, nenhum padrão de diferenciação pode ser observado em geral. desvios padrão entre parênteses.

Tabela 3.- Matrizes de distância triangular (usadas para o cálculo do teste Mantel com 1000 permutações) entre as localidades de amostra de *Ucides Cordatus*. Acima da diagonal estão linearizados em par de FST. Abaixo da diagonal é linearizada em paralelo à distância D de Jost. Os valores em negrito representam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre localidades

	CAN	CAR	FOR	CAU	CUR	SOU
CAN	—	0.009	0.022	0.012	0.011	0.012
CAR	0.029	—	0.020	0.011	0.009	0.014
FOR	0.082	0.069	—	0.010	0.016	0.018
CAU	0.038	0.026	0.019	—	0.010	0.011
CUR	0.030	0.018	0.044	0.019	—	0.005
SOU	0.034	0.037	0.053	0.021	-0.004	—

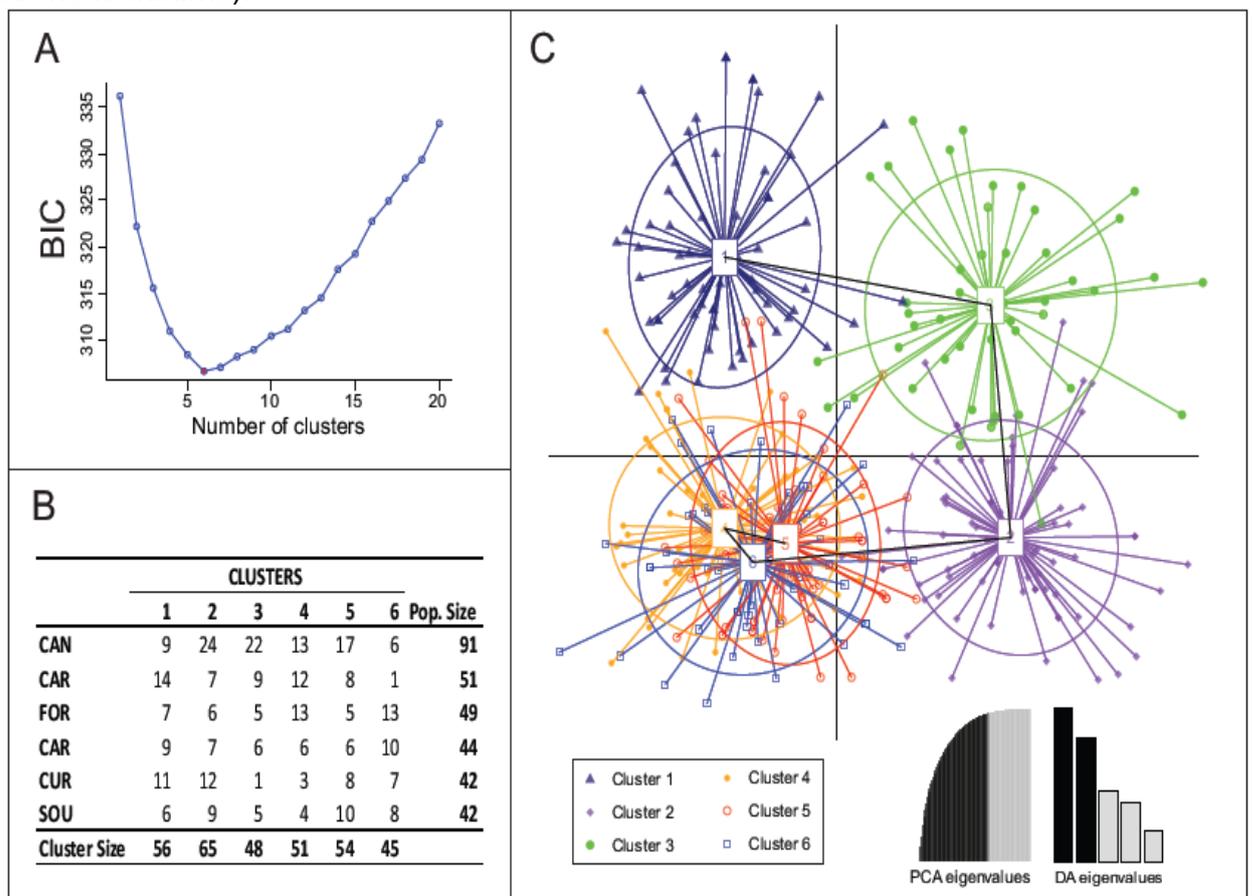
FLO, Florianópolis - SC; CAN, Cananéia - SP; CAR, Caravelas - BA; FOR, Fortim - CE; GOI, Goiabeiras - CE; CAU, Caucaia - CE; PAR, Parnaíba - PI; CUR, Curuçá - PA; SOU, Soure - PA.

A AMOVA mostrou que apenas 0,71% da variância genética total é explicada pelas diferenças entre sites de amostra, embora essas variações tenham sido significativas ($F_{ST} = 0,019$; $P < 0,001$). Considerando o variação entre grupos BC e NBC, não foram encontradas diferenças ($F_{CT} = 0,007$; $P = 0,141$), bem como para comparações entre BC vs NBC-1 versus NBC-2 ($F_{CT} = 0,011$; $P = 0,069$). No entanto, os resultados da SAMOVA sugeriu um arranjo de agrupamento alternativo com diferenciação significativa para amostras organizadas em quatro grupos, denominados a seguir: BC-1 ["CAN"]; BC-2 ["CAR"]; NBC-1 ["FOR e CAU"]; NBC-2 ["CUR e SOU"]. Na sequência desta sugestão, o valor F_{CT} manteve-se baixo, mas foi significativo ($F_{CT} = 0,037$; $P = 0,023$). Outra solução de agrupamento foi sugerida pela análise DAPC, que estimou a ocorrência de seis grupos genéticos (Figura 2). Nenhum deles estava completamente isolado, com os clusters 4, 5 e 6 sendo totalmente sobrepostas; sua conectividade também foi suportada por uma árvore de extensão mínima (Figura 2c), que clusters conectados na seguinte ordem: 5 - 4 - 6 - 2

- 3 - 1. Os agrupamentos 1, 2 e 3 foram os mais divergentes com amostras mais isoladas (Figura 2c). Nenhum dos clusters foi representado exclusivamente por um único localidade (Figura 2b) e nenhum padrão de estrutura genética devido à posição geográfica foi observado.

A assunção de eventos de panmixia também foi descartada estatisticamente após o funcionamento da SASHA, que tem mostrou uma condição não panmictica ($P = 0,011$), embora com uma pequena diferença entre a média observada distribuição de distância dos alelos (2055,0 km) quando comparada com a distribuição média esperada da distância (2079,7 km).

Figura 2 - (a) número ótimo de clusters (= 6) definido pelo menor valor de bic (bayesian conteúdo da informação). (b) matriz de grupos reais e clusters inferidos. (c) distribuição da amostra de acordo com análise discriminante de componentes principais (as linhas negras que ligam os números 1 a 6 representam uma árvore de extensão mínima).



3.2 Inferências de fluxo de genes

Com os resultados da FCT estabelecidos, os espécimes foram dispostos em quatro grupos (BC-1, BC-2, NBC-1 e NBC-2) para inferências de fluxo de genes. Depois de testar diferentes modelos de migração entre esses clusters, o mais provável um foi definido como o modelo da ilha, com $\approx 100\%$ de probabilidade (Tabela 4). Outros modelos testados não foram estatisticamente suportado com probabilidades chegando perto de zero. Estes incluíram Panmixia e a hipótese de dispersão de larvas seguindo as principais correntes (BC e NBC), que foram consideradas menos prováveis modelos. Os modelos de escalonamento e migração direcional também foram descartados após a análise. A estimativa média de Q após dez corridas foi de 0,098 (s.d. = $2,75 \times 10^{-5}$) e histórico de mutação as taxas de migração (M) foram 975,59 (s.d. = 0,974). Considerando o modelo da ilha, que assume um sym taxa de migração métrica, os índices estimados (Q e M) devem ser considerados os mesmos para todos os pares de população comparada. Assim, foi definido um único valor do número efetivo de migrantes trocados por localidade (23,94 caranguejos por geração)

4 DISCUSSÃO

A informação loci acessada nesta pesquisa foi altamente polimórfica de acordo com as estimativas de PIC e heterozigações. Botstein et al. (1980) relataram que os marcadores com valores PIC superiores a 0,5 são muito informativo, e aqui, apenas o locus UcSSR-01 apresentou menor valor (0,453). Locus UcSSR-04 foi o único marcador que não passou no teste Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). Supôs-se que este resultado estava relacionado à ocorrência de alelos nulos neste locus e, portanto, indivíduos heterocigóticos teriam sido classificados como homozigotos causando desvios HWE (CALLEN et al., 1993).

Mesmo assim, dados globais de genotipagem revelaram alta qualidade desses microsátélites e todos os outros marcadores passaram em controle de qualidade. Excluindo o locus UcSSR-04, as diferenças entre as estimativas de H_O e H_E foram pequenas, indicando altos níveis de diversidade genética. Oliveira-Neto et al. (2014) apresentaram valores similares para amostras de *U cordatus* de outros estuários com valores médios de 0,74 e 0,73. para H_O e H_E , respectivamente.

Tabela 4 - Comparação de diferentes modelos de migração para locais de amostra de *Ucides cordatus* agrupados de acordo com os resultados da FCT. Integração termodinâmica (T.I.) e log Fator Bayes (LBF) foram usados para estimar as probabilidades do modelo.

	Tested models	T.I.	St. dev.	LBF	Model Probability
1	North to South	-7539.2	38.7	-1060.5	0.56×10^{-230}
2	South to North	-7550.8	18.4	-1083.6	0.49×10^{-235}
3	Following BC or NBC	-14702.7	789.9	-15387.5	0.00
4	Stepping stone	-7566.7	8.7	-1115.5	0.59×10^{-243}
5	Island	-7009.0	33.9	0.0	≈ 1.00
6	Panmixia	-15717.8	32.4	-17417.7	0.00

As estimativas de Multilocus para o Q de Weir e Cockerham variaram apenas ligeiramente quando foram utilizados os nove loci, e quando o locus UcSSR-04 foi excluído. Em ambas as situações, as estimativas apresentaram baixos níveis de diferenciação entre localidades e nenhuma evidência de estruturação populacional. Baixos níveis de endogamia na espécie foram detectados após cálculos F e f. Linearizados por pairwise FST e Jost's D também evidenciaram uma fraca diferenciação genética entre as localidades, de acordo com as estimativas de q e com as primeiras pesquisas sobre a estrutura genética de *U. cordatus* detectadas com marcadores moleculares (OLIVEIRA-NETO et al., 2007a, b; BRITTO et al., 2011).

Além disso, foram obtidos resultados não significativos do teste de Mantel, apoiando a hipótese de fluxo genético extensivo promovendo a fraca variação genética entre as populações, uma consequência possível de uma estratégia eficiente de dispersão de larvas da espécie. Na verdade, o agrupamento bayesiano usando STRUCTURE também sugeriu nenhuma estrutura genética ao longo do litoral brasileiro. Também corrobora com achados prévios, onde somente a análise de AMOVA foi realizada (OLIVEIRA-NETO et al., 2014). Com todas as informações recolhidas até agora, as referências citadas acima concordaram que o principal motivo para este cenário é o alto fluxo de genes entre estuários devido à estratégia de exportação larval pelágico das espécies. Dentro numerosas espécies de caranguejo com larvas de estratégias de dispersão similares são pensadas para serem transportadas até 100 km do mar desde o seu local de desova (DIELE, 2000; EPIFANIO ; GARVINE, 2001).

No entanto, várias diferenças estatísticas significativas foram encontradas entre localidades quando microsátélites Os marcadores foram usados nas pesquisas de U.

Cordatus. Neste estudo e o de Oliveira-Neto et al. (2014) encontrado diferenças estatísticas quando as amostras mais austrais foram comparadas com outras do Nordeste brasileiro e Estuários do norte. As amostras de CAN (relatadas aqui) pertencem ao estado de São Paulo, que está localizado no Sudeste Brasil, enquanto amostras mais ao sul de Oliveira-Neto et al. (2014) pertence ao estado do Paraná, que é localizado na região sul do Brasil.

Apesar dos baixos valores de diferenças genéticas encontrados, ambas as pesquisas apontaram que as amostras mais ao sul eram significativamente diferentes de outras localidades, sugerindo que independentemente da ausência de um padrão claro de estruturação da população, a diversidade genética entre os brasileiros os estuários não são completamente distribuídos aleatoriamente. SAMOVA mostrou diferenças significativas entre os grupos ($P = 0,023$) quando as localidades foram organizadas como BC-1, BC-2, NBC-1 e NBC-2, apesar da baixa FCT (0,037). Os resultados da SASHA também apontaram para uma situação não panmítica para os caranguejos *U. Cordatus*, embora com um pequeno diferença entre a distribuição da distância média observada dos alelos (2055,0 km) ea média esperada Distribuição à distância (2079,7 km).

Os modelos de fluxo de genes executados no MIGRATE também não sugeriram um cenário completamente livre troca de alelos entre todas as localidades de amostragem, e o modelo de panmixia também foi descartado. Da mesma forma, nenhum dos modelos direcionais de dispersão larval foi substancialmente aceito após distribuição posterior.

O modelo que melhor descreveu os padrões de migração *U. cordatus* foi o modelo da ilha. Apesar da abordagem bayesiana de MIGRATE permite a estimativa do fluxo de genes sem a hipótese de taxa de migração simétricas ou tamanhos de população iguais (BEERLI E FELSENSTEIN, 2001), este estudo mostrou que os eventos migratório são provavelmente simétricos para a espécie.

Nenhuma população foi considerada uma fonte particular de material genético, uma vez que nenhuma população era exclusivamente receptora de alelos. Os resultados mostraram que cerca de 24 caranguejos foram trocados por geração entre cada localidade considerando o número efetivo (N_e) em vez de tamanho absoluto da amostra. Também é importante mencionar que *U. cordatus* tem sobreposição gerações, e uma vida útil de um único indivíduo não deve ser considerada para

interpretar os resultados desde novas gerações surgem ao longo de cada ano (ALCANTARA-FILHO, 1978; SCHMIDT; DIELE, 2009).

A dispersão das larvas de *U. cordatus* ainda é pouco estudada no ambiente natural. Mais distantes estudos sobre processos de transporte oceanográfico e padrões de dispersão devem elucidar o que acontece com as larvas planktotróficas quando exportadas através da pluma estuarina.

Se as larvas são transportadas apenas por correntes de superfície do oceano, seria de esperar uma dispersão predominantemente ao sul ao longo da corrente brasileira e dispersão para o norte ao longo da corrente norte-brasileira. Outra possível explicação é que as larvas são transportadas por correntes subterrâneas em águas mais profundas, que podem fluir na direção oposta para a corrente superficial (SCHOTT et al., 1998). Esta hipótese sugere uma migração activa de larvas sob correntes de água mais profundas.

De fato, as larvas de *U. cordatus* realizam migração para baixo, mas somente durante a última estágios de desenvolvimento, quando a transição pelágica-bentônica é completada com sucesso e as larvas mergulham para o sedimento do fundo (SILVA, 2007). Portanto, durante os primeiros estágios zoológicos, *U. cordatus* larval A dispersão de 368 ainda depende das correntes de superfície. Por outro lado, as correntes locais conduzidas pelo vento também podem explicar a conectividade larval (ROMAN ;BOICOURT, 1999). Embora esta hipótese pareça mais plausível para os regimes de micro e meso-marés, nos quais as plumas estuarinas são mais suscetíveis às rotas locais correntes, é menos provável que os regimes macro-marés em que as plumas estuarinas possam chegar a distâncias longas de a costa. As possíveis possíveis explicações não se excluem e podem ocorrer simultaneamente para sustentar altos níveis de transporte de larvas multidirecional que podem explicar a conectividade genética observada neste estudo.

Uma questão que decorre dos nossos dados é se essa alta taxa de migração seria suficiente para manter apenas diferenças fracas entre as amostras de *U. Cordatus* de diferentes locais. De acordo com Wright (1931) declaração, apenas um migrante por geração (a regra de um migrante por geração - OMPG) seria suficiente, em determinadas circunstâncias, para garantir um baixo nível de diferenças genéticas entre as populações.

Esta regra pode ser aplicada para muitos fins de conservação e gerenciamento, no entanto, esse conceito não implicam diretamente na panmixia entre indivíduos de diferentes subpopulações. OMPG deve ser interpretado como uma avaliação qualitativa de compensações entre perdas de diversidade genética em populações versus homogeneização entre populações.

A regra resulta de um modelo simples de estrutura da população com base sobre uma série de pressupostos irrealistas, que poderiam ser melhor aplicados considerando 1 a 10 migrantes por geração e número efetivo (N_e) em vez de tamanho da amostra (N) (WANG; WHITLOCK, 2003). É difícil fornecer um número real universalmente apropriado de migrantes por geração para gerenciamento genético. Além disso, pouca informação está disponível na seleção natural de *U. cordatus* e seu impacto na diversidade genética das espécies.

Uma questão que decorre dos nossos dados é se essa alta taxa de migração seria suficiente para manter apenas diferenças fracas entre as amostras de *U. Cordatus* de diferentes locais.

De acordo com Wright (1931) declaração, apenas um migrante por geração (a regra de um migrante por geração - OMPG) seria suficiente, em determinadas circunstâncias, para garantir um baixo nível de diferenças genéticas entre as populações. Esta regra pode ser aplicada para muitos fins de conservação e gerenciamento, no entanto, esse conceito não implicam diretamente na panmixia entre indivíduos de diferentes subpopulações. OMPG deve ser interpretado como uma avaliação qualitativa de compensações entre perdas de diversidade genética em populações versus homogeneização entre populações.

A regra resulta de um modelo simples de estrutura da população com base sobre uma série de pressupostos irrealistas, que poderiam ser melhor aplicados considerando 1 a 10 migrantes por geração (MILLS E ALLENDORF, 1996) e número efetivo (N_e) em vez de tamanho da amostra (N) (Wang e Whitlock, 2003). É difícil fornecer um número real universalmente apropriado de migrantes por geração para gerenciamento genético. Além disso, pouca informação está disponível na seleção natural de *U. cordatus* e seu impacto na diversidade genética das espécies.

Além disso, de se a exploração de estoques de caranguejo no Brasil é uma atividade pesqueira sustentável, a divergência de traços adultos podem ocorrer devido à pressão diferencial induzida por fortes esforços de pesca.

Em várias espécies, exploração concentrada em indivíduos maiores, demonstrou que resulta em redução constante em idade e duração da maturidade (HAUGEN ;VØLLESTAD, 2001; SINCLAIR et al., 2002). Populações *U. Cordatus* no Brasil, sob pressão de pesca descontrolada, já estão assumindo um perfil de tamanho diferente, no qual o tamanho médio do caranguejo foi reduzido consideravelmente (JANKOWSKY et al., 2006). Por exemplo, uma pesquisa da padrões morfológicos de caranguejos de Esp'írito Santo (Brasil) revelaram que a média da população largura da carapaça é 403 era de 4,89 cm, abaixo do tamanho legal mínimo de colheita (6,13 cm) (CONTI ; NALESSO, 2010).

Este tipo de variação não pôde ser avaliado com os atuais marcadores moleculares. Além disso, captura comercial é permitida apenas para a coleta de indivíduos do sexo masculino, predominância de fêmeas sobre os machos em alguns locais (especialmente perto das aldeias) trouxe o nível avançado de sobrepesca deste população e destacou a necessidade urgente de ações de gestão (GOES et al., 2010)

Assim, mesmo com populações de caranguejo apresentando distribuição genética homogênea ao longo da costa brasileira e com altas taxas de migração, as diferenças significativas encontradas em algumas localidades não podem ser rejeitadas. As populações de *U. cordatus* não são panmícticas e, apesar da fraca estrutura populacional, parece que o fluxo gênico não ultrapassa completamente os efeitos da deriva, seleção natural (por exemplo, doença do caranguejo letárgico) ou exploração humana, que é excessiva e deve ser levada em consideração para projetar a conservação de espécies programas. Os modelos estatísticos sugerem que os eventos de migração ocorrem seguindo o modelo da ilha, com simetria; taxas de migração entre locais. Assim, a conectividade observada entre populações de caranguejo evidenciou a importância de um trabalho cooperativo em uma ampla faixa geográfica visando a conservação e gestão deste recurso pesqueiro.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-MUNEER, P. M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: Recent advances in population structure analysis and conservation strategies. **Genetics Research International**, ID691759:1–11.2014.
- ABRUNHOSA, F. A.; MELO, M. A.; ABRUNHOSA, J. P. Development and functional morphology of the foregut of larvae and postlarva of *Ucides cordatus* (Decapoda - Ocypodidae). **Nauplius**, 11(1):1–7. 2003.
- ALCANTARA-FILHO, P. Contribuição para o conhecimento da biologia e ecologia do caranguejo-ucará - *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) Crustacea - Decapoda - Brachyura, no manguezal do rio ceará (brasil). **ARQUIVOS DE CIÊNCIAS DO MAR**, 20:1–74. 1978.
- ARNAULT, S., BOURLES, B., GOURIOU, Y., AND CHUCHLA, R. Intercomparison of upper layer circulation. of the western equatorial Atlantic Ocean: In situ and satellite data. *Journal of Geophysical Research*, 104:171–194. 1999).
- AVISE, J.;HAMRICK, J.. **Conservation Genetics: Case histories from nature**. Chapman and Hall: New York, USA. 1996.
- BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum like lihood estimation of a migration matrix and effective.. population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98:4563–4568. 2001.
- BENBOUZA,H.;JACQUEMIN, J. M.; BAUDOIN,J. P.;MERGEAI,G. Optimization of reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gel. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, 10:77–81. 2006.
- BOEGER, W. A.; PIE, M. R.;OSTRENSKY, A.; PATELLA, L.. Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100:161–167. 2005.
- BOEGER, W. A.; PIE, M. R.;VICENTE, V.; OSTRENSKY, A.; HUNGRIA, D.;G., C. G..Histopathology of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) affected by lethargic crab disease. **Diseases of Aquatic Organisms**, 78(1):73–81.2007.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, 45:314–331. 1980.

BRITTO, F. B.; DINIZ, F. M.; PATERSON, I.; BENTZEN, P. (2009). Polymorphic microsatellite dna markers in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). **Molecular Ecology Resources**, 9:1249–1252. 2009.

BRITTO, F. B.; MENDES, D. S. F.; OGAWA, M.; CINTRA, I. H. A.; DINIZ, F. M. Single primer-based DNA amplification as a suitable and low-cost tool for assessing genetic diversity in mangrove crabs. **Genetics and Molecular Research**, 10:4084–4092. 2011.

CALLEN, D. F.; THOMPSON, A. D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H. A.; RICHARDS, R. I.; MULLEY, J. C.; SUTHERLAND, G. R. Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, 52:922–927. 1993.

CONTI, R. C.; NALESSO, R. Status of the population structure of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) on the Piraque River Estuary, Espírito Santo, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 58:81–92. 2010.

DIELE, K. *Life history and population structure of the exploited mangrove crab Ucides cordatus (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Brachyura) in the Caete Estuary, North Brazil*. Phd thesis, University of Bremen, Germany. 2000.

DIELE, K.; KOCH, V. Growth and mortality of the exploited mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) in Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 395(1-2):171–180. 2010.

Diele, K., Koch, V., and Saint-Paul, U. (2005). Population structure, catch composition and CPUE of the artisanally harvested mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) in the Caete estuary, North Brazil: Indication for overfishing. **Aquatic Living Resources**, 18:169–178. 2005.

DIELE, K.; SMITH, D. J. B. Salinity tolerance of northern Brazilian mangrove crab larvae, *Ucides cordatus* (Ocypodidae): Necessity for larval export? **Estuarine and Coastal Shelf Sciences**, 68:600–608. 2006.

DUARTE, L. F. A.; DURAN, R. S.; MENDONÇA, J. T.; PINHEIRO, M. A. A. Fishery of the mangrove crab *Ucides Cordatus* (Linnaeus, 1763) in a mangrove area in Cananéia, State of São Paulo, Brazil: Fishery performance, exploitation patterns and factors affecting the catches. **Brazilian Journal of Oceanography**, 62(3):187–199. 2014.

DUPANLOUP, I.;SCHNEIDER, S.;EXCOFFIER, L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. **Molecular Ecology**, 11:2571–2581.2002.

EPIFANIO, C. E.;GARVINE, R. W. (2001). Larval transport on the Atlantic continental shelf of North America: a review. **Estuarine and Coastal Shelf Sciences**, 52:51–77.2001.

EPIFANIO, C. E.;MASSE, A. K.; GARVINE, R. W. Transport of blue crab larvae by surface currents off Delaware Bay. **Marine Ecology Progress Series**, 54:35–41. 1989.

EVANS, D. L.; SIGNORINI, S. S.;MIRANDA, L. A note on the transport of the Brazil Current. **Journal of Physical Oceanography**, 13:1732–1738. 1983.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G., AND SCHNEIDER, S. ARLEQUIN VERSION 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, 1:47–50. 2005.

FAUBERT, P; WAPLES, R. S., GAGGLIOTTI, O. Evaluating the performance of a multilocus Bayesian. method for an estimation of migration rates. **Molecular Ecology**, 16:1149–1166. 2007.

GOÊS,P.;BRANCO,J.O.;PINHEIRO,M.A.A.;BARBIERI,E.;COSTA,D.;FERNANDES, L. L. Bioecology of the uc,a´ crab, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) in Vito´ ria Bay, Esp´irito Santo State, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 58:153–163. 2010.

GOUDET, J. (FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**,498 86:485–486, 1995.

HATTORI, G. Y. AND PINHEIRO, M. A. A. Fertilidade do caranguejo de mangue *Ucides cordatus*0 (Linnaeus) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), em Iguape (Saõ Paulo, Brasil). **Rev. Brasileira de Zoologia**, 20(2):309–313. 2003.

BOEGER, 447 W. A., PIE, M. R., OSTRENSKY, A., AND PATELLA, L. . Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. **Memo´rias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100:161–167. 2005.

Boeger, W. A., Pie, M. R., Vicente, V., Ostrensky, A., Hungria, D., and G., C. G. Histopathology of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) affected by lethargic crab disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 78(1):73–81, 2007.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, 45:314–331. 1980.

BRITTO, F. B.; DINIZ, F. M.; PATERSON, I.; BENTZEN, P. Polymorphic microsatellite dna markers in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). **Molecular Ecology Resources**, 9:1249–1252. 2009.

BRITTO, F. B.; MENDES, D. S. F.; OGAWA, M.; CINTRA, I. H. A.; DINIZ, F. M. Single primer-based DNA amplification as a suitable and low-cost tool for assessing genetic diversity in mangrove crabs. **Genetics and Molecular Research**, 10:4084–4092. 2011.

CALLEN, D. F., THOMPSON, A. D., SHEN, Y., PHILLIPS, H. A., RICHARDS, R. I., MULLEY, J. C., AND SUTHERLAND, G. R. Incidence and origin of ‘null’ alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, 52:922–927. 1993.

CONTI, R.C. NALESSO, R. Status of the population structure of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) on the Piraque River Estuary, Espirito Santo, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 58:81–92, 2010.

DIELE, K. ***Life history and population structure of the exploited mangrove crab *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Brachyura) in the Caete Estuary, North Brazil.*** Phd thesis, University of Bremen, Germany. 2000.

DIELE, K.; KOCH, V. growth and mortality of the exploited mangrove crab *ucides cordatus* (Ocypodidae) in Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 395(1-2):171–180. 2010.

DIELE, K.; KOCH, V.; SAINT-PAUL, U. Population structure, catch composition and CPUE of the artisanally harvested mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) in the Caete estuary, North Brazil: Indication for overfishing. **Aquatic Living Resources**, 18:169–178. 2005.

DIELE, K.; SMITH, D. J. B.. Salinity tolerance of northern Brazilian mangrove crab larvae, *Ucides cordatus* (Ocypodidae): Necessity for larval export? **Estuarine and Coastal Shelf Sciences**, 68:600–608. 2006.

DUARTE, L. F. A.; DURAN, R. S.; MENDONÇA, J. T.; PINHEIRO, M. A. A. Fishery of the ucá crab *Ucides Cordatus* (Linnaeus, 1763) in a mangrove area in Cananéia, State of São Paulo, Brazil: 2014.

Fishery performance, exploitation patterns and factors affecting the catches. **Brazilian Journal of Oceanography**, 62(3):187–199, 2014.

DUPANLOUP, I.; SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. A. simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. **Molecular Ecology**, 11:2571–2581. 2002

EPIFANIO, C. E.; GARVINE, R. W. Larval transport on the Atlantic continental shelf of North. America: a review. **Estuarine and Coastal Shelf Sciences**, 52:51–77. 2001.

EPIFANIO, C. E., MASSE, A. K., AND GARVINE, R. W. Transport of blue crab larvae by surface currents off Delaware Bay. **Marine Ecology Progress Series**, 54:35–41. (1989).

EVANS, D. L., SIGNORINI, S. S., AND MIRANDA, L. A note on the transport of the Brazil Current. **Journal of Physical Oceanography**, 13:1732–1738. 1983.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN VERSION 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **EVOLUTIONARY BIOINFORMATICS**, 1:47–50. 2005.

FAUBERT, P.; WAPLES, R. S.; GAGLIOTTI, O. Evaluating the performance of a multilocus Bayesian method for an estimation of migration rates. **molecular ecology**, 16:1149–1166. 2007.

GOÊS, P., BRANCO, J. O., PINHEIRO, M. A. A., BARBIERI, E., COSTA, D., AND FERNANDES, L. L. Bioecology of the ucá crab, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) in Vitória Bay, Espírito Santo State, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 58:153–163. 2010.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, 86:485–486. 1995.

HATTORI, G. Y.; PINHEIRO, M. A. A. Fertilidade do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), em Iguape (São Paulo, Brasil). **Rev. Brasileira de Zoologia**, 20(2):309–313. 2003.

HAUGEN, T. O.; VØLLESTAD, L.. A century of life-history evolution in grayling. **Genetica**, 59:361–371. 2001

JANES, J. K., MILLER, J. M., DUPUIS, J. R., M. R. M., GORREL, J. C., I., C. C., AND ANDREW, R. L.. The $k = 2$ conundrum. **Molecular Ecology**, 26:3594–3602. 2017

JANKOWSKY, M.; PIRES, J. S. R.; NORDI, N. Contribuição ao manejo participativo do caranguejo uca, *Ucides cordatus* (L., 1763), em Cananéia - SP. **Boletim do Instituto de Pesca**, 32:221–228. 2006.

JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, 24:1403–1405. 2008.

JOMBART, T.; COLLINS, C. **A tutorial for discriminant analysis of principle components (dapc) using adegenet 2.0.0.** <http://adegenet.r-forge.net/project.org/files/tutorial-dapc-pdf.2015>.

JOST, L.. gST and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, 17:4015–4026. 2008.

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

KELLY, R. P.; OLIVER, T. A.; SIVASUNDAR, A.; PALUMBI, S. R. A method for detecting population genetic structure in diverse, high gene-flow species. **Journal of Heredity**, pages 1–14. 2010.

Melo, G. A. S.. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro.** Pleiade: FAPESP. 1996.

MILLS, L. S.; ALLENDORF, F. W.. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. **Conservation Biology**, 10(6):1509–1518. 1996.

OLIVEIRA-NETO, J. F., BAGGIO, R. A., OSTRENSKY, A., CHAMMAS, M. A., AND BOEGER, W.. Assessing the genetic diversity and gene flow of populations of the crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) on the Brazilian coast using microsatellite markers. **Journal of Crustacean Biology**, 34:70–75. 2014.

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

OLIVEIRA-NETO, J. F., PIE, M. R., BOEGER, W. A., AND BAGGIO, R. A.). Population genetics and evolutionary demography of *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). **Marine Ecology**, 28:460–469. 2007^b.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in excel. population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6:288–295. 2006.

PIE, M. R., OLIVEIRA-NETO, J. F., BOEGER, W. A., OSTRENSKY, A., AND BAGGIO, R. A. R. The organization of the mitochondrial control region in 2 brachyuran crustaceans: *Ucides cordatus* (Ocypodidae) and *Cardisoma guanhumi* (Gecarcinidae). **Journal of Heredity**, 99:432–437. 2008.

PINHEIRO, M. A. A.; BAVELONI, M. D. B.; LEME-TERCEIRO, O. S. Fecundity of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae). *Invertebrate Reproduction and Development*, 43(1):19–26. 2003.

PINHEIRO, M. A. A.; RODRIGUES, A. M. T.. Crustáceos sobre-explotados e o plano nacional de gestão dos caranguejos ucia (*Ucides cordatus*), guaiamum (*Cardisoma guanhumi*) e do siri-azul (*Callinectes sapidus*): uma estratégia para evitar que passem ao “status” de ameaçados de extinção *Revista CEPSUL Biodiversidade e Conservação Marinha*, 2(50-57). . 2011.

PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., ROSENBERG, N. A., AND DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945–959. 2000.

PULMANN, N.; DIELE, K., MEHLIG, U.; NORDHAUS, I.; BURROWS of the semi-terrestrial crab *Ucides cordatus* enhance CO₂ release in a north brazilian mangrove forest. *PLoS One*, 9(10):1–13. 2014.

Pulmann, N., Mehlig, U., Nordhaus, I., Saint-Paul, U., and Diele, K. Mangrove crab *Ucides cordatus* removal does not affect sediment parameters and stipule production in a one year experiment in Northern Brazil. *PLoS One*, 11(12):1–19. .2016.

R CORE TEAM *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017

RAYMOND, M. ROUSSET, F.. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49:1280–552 1283. 1995.

RODRIGUES, M. D. AND HEBLING, N. J.. *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda). Complete larval development under laboratory conditions and its systematic position. *Revista Brasileira de Zoologia*, 6:147–166. 1989.

ROMAN, M. R. AND BOICOURT, W. C. Dispersion and recruitment of crab larvae in the Chesapeake Bay plume: physical and biological controls. *Estuaries*, 22:563–574.1999.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., AND MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York .1989.

SCHMIDT, A., THEIL, C.;GALLI, O. Estudos preliminares sobre efeitos de uma mortalidade em massa. **Boletim Técnico Científico do CEPENE**, 16:51–57.. 2008

SCHMIDT, A. J.; BEMVENUTI, C. E.;DIELE, K. Effects of geophysical cycles on the rhythm of mass mate searching of a harvested mangrove crab. **Animal Behaviour**, 84:333–340. 2012.

SCHMIDT, A. J.; DIELE, K. First field record of mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Ucididae) recruits co-inhabiting burrows of conspecific crabs. **Zoologia**, 26(4):792–794. 2009.

SCHOTT, F. A., JUERGEN, F.; LOTHAR, S. (1998). Transports and pathways of the upper-layer circulation in the western tropical Atlantic. **Journal of Physical Oceanography**, 28:1904–1928.

SILVA, U. A. *Recuperação populacional do caranguejo-ucã, Ucides cordatus (Linnaeus, 1763), através da liberação de formas imaturas em áreas antropicamente pressionadas*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná.2007.

SIMITH, D. J. B., ABRUNHOSA, F. A., AND DIELE, K. Chemical induction in mangrove crab megalopae, *Ucides cordatus* (Ucididae): Do young recruits emit metamorphosis-triggering odours as do conspecific adults? *Estuarine and Coastal Shelf Sciences*, 131:264–270. 2013

SIMITH, D. J. B.; DIELE, K efeito da salinidade no desenvolvimento larval do caranguejo-uc, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Ocypodidae) no Norte do Brasil. *Acta Amazonica*, 38(2):345–350. ..2008.

SINCLAIR, A. F., SWAIN, D. P., AND HANSON, J. M. Measuring changes in the direction and magnitude of size-selective mortality in a commercial fish population. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 59:361–371. 2002.

THORPE, J. P., SOLE´-CAVA, A. M.; WATTS, P. C. Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia*, 420:165–18. 2000..

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHISON, W. F.; SHIPLEY, P.; WILLS, P. M. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology**, 4:535–538. 2004.

VICENTE,,V., R..O.-R.;NAJAFZADEH, M. J.;SUNF, J.;GERRA,R. S.; MIESCH, S.; OSTRENSKY, A.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H.;HOOG, G. S.). Black yeast-like fungi associated with lethargic crab disease (lcd) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). *Veterinary Microbiology*, 158(1-2):109–122. 2012.

WANG, J. AND WHITLOCK, M. C.. Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. *GENETICS*, 163:429–446. 2003.

Weir, B. and Cockerham, C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, 38:1358–1370. . 1984..

WOLFF, M.; KOCHA, V. I. V.. A trophic flow model of the Caete´ Mangrove Estuary (North Brazil) . with considerations for the sustainable use of its resources. *Estuarine and Coastal Shelf Sciences*, 59:789–803. 2000.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, 16:97–259. 1931.

ANEXO