

**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Genética**

**Danielle de Jesus Gama Maia**

**Variação genética e a Conservação do guaiamum  
(*Cardisoma guanhumi*, Decapoda: Gecarcinidae) em  
estuários do litoral de Pernambuco**

**Recife  
2014**

**Danielle de Jesus Gama Maia**

**Variação genética e a Conservação do guaiamum  
(*Cardisoma guanhumi*, Decapoda: Gecarcinidae) em  
estuários do litoral de Pernambuco**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

**Orientador:** Dr. Rodrigo Augusto Torres

**Coorientador:** Dra. Mônica Lúcia Adam

**Recife**

**2014**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Maia, Danielle de Jesus Gama**

**Variação genética e a conservação do guaiamum (*Cardisoma guanhumi*,  
Decapoda: Gecarcinidae) em estuários do litoral de Pernambuco/ Recife: O  
Autor, 2014.**

**62 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Rodrigo Augusto Torres**

**Coorientadora: Mônica Lúcia Adam**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,  
Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2014.**

**Inclui bibliografia e anexos**

- 1. Genética de populações 2. Caranguejo 3. Estuários I. Torres,  
Rodrigo Augusto (orientador) II. Adam, Mônica Lúcia  
(coorientadora) III. Título**

**576.58**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2014- 199**

**Danielle de Jesus Gama Maia**

**Variação genética e a Conservação do guaíamum (*Cardisoma guanhumi*, Decapoda: Gecarcinidae) em estuários do litoral de Pernambuco**

**Aprovado em 27/ 02 / 2014**

**Banca Examinadora:**

---

**Dr. Rodrigo Augusto Torres**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr. Ralf Schwamborn**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dra . Rita de Cássia de Moura**  
**Universidade de Pernambuco**

---

**Dr. Marcelo Nazareno Vallinoto de Souza**  
**Universidade Federal do Pará**

**Recife**  
**2014**

Aos meus amados.

## **Agradecimentos**

Mais uma vitória! Como posso não dizer que Deus me ama demais? Sinto ao abrir meus olhos pela manhã e ao fechá-los pela noite. Pelo alimento que sustenta minha matéria, pela sabedoria que sustenta meu espírito, por cada som manifestado pela sua criação, pelas coisas que tem me ensinado, por me dar perseverança, coragem e amor, por sempre escolher os melhores caminhos para mim – uma vez que a minha escolha foi entregar-lhe meus caminhos-, pelas conversas de madrugada, pelas dúvidas dissipadas, pelos anjos que ordenou protegerem a mim e a todos que eu amo, por me escutar no dia da angústia e por ser tão amável, colocando verdadeiros anjos na minha vida, eu te agradeço Paizinho querido!

Todas essas vitórias alcançadas (e posso dizer que foram muitas!), não fariam sentido sem a família maravilhosa que Papai destinou a mim, e também à família que ele deixou que eu escolhesse. Dessa forma, venho humildemente agradecer aos meus amados por todos os conselhos, carinhos, abraços e esforços para que eu escrevesse essa etapa do livro da minha vida!

Agradeço com amor à minha mãe amada, por sempre se doar tanto por mim e pelos conselhos, que sempre chegam quando eu mais preciso. Agradeço a Deus por ter dado a missão de cuidar de mim a uma criatura tão pura, forte, divertida, sábia, adorável e batalhadora como a Sra!

Agradeço com muito carinho a D. Veronika e Paulo, que me adotaram verdadeiramente como uma filha, sempre me apoiando nos momentos mais difíceis. Vocês contribuíram significativamente para a conclusão desta etapa da minha vida.

Agradeço com carinho ao meu orientador, Dr. Rodrigo Torres, pelo acolhimento, confiança, incentivo, preocupação, conselhos e por permitir que eu caminhasse junto com ele.

A Dra. Mônica, por permitir que eu fizesse parte do seu projeto.

Agradeço a Di, Fernando e Fernandinho pelo apoio e compreensão devido à minha ausência.

Agradeço a Paulo Ramos, obrigada pela força todos esses anos, que Deus te proteja, o Sr. fez o que um pai faria por sua filha! Uitan, um beijo da irmãzinha!

Agradeço com carinho a Willy, por toda ajuda com o mestrado e monografia, e por sempre me incentivar a fazer mais e melhor.

Agradeço a Danilo, Joanne e Gabi, que mesmo longe, torcem por mim sempre.

Aos amigos de laboratório, pela aprendizagem, dicas e discussões (científicas, claro!) que permitiram que eu desenvolvesse meu trabalho.

A Cris, Taci e Emilly, que sempre estiveram junto comigo nesta jornada, me ajudando e apoiando.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida.

Também quero muito agradecer a Maria e Wilson, não poderia esquecer-me de vocês!

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Obrigada!

*“O homem, com suas nobres qualidades, ainda  
carrega no corpo a marca indelével de sua origem  
modesta.”*

*(Charles Darwin)*



## Resumo

*Cardisoma guanhumi* é um caranguejo terrestre intensamente explorado como alimento e considerado um importante recurso econômico no Brasil. A espécie tem experimentado um acentuado declínio populacional, influenciado pela sobrepesca aliada à perda e/ou degradação do habitat natural. A definição de “stocks” ou unidades de manejo são essenciais para a conservação destes recursos. Objetivou-se investigar a variação genética e a conectividade de *C. guanhumi* a partir de 154 exemplares amostrados em cinco estuários com diferentes níveis de conservação. Nove primers ISSRs foram utilizados para acessar a constituição genética da espécie. A diversidade genética observada em *C. guanhumi* foi alta, corroborando a condição de resiliente designado para a espécie, e atestam para um bom estado de conservação deste recurso no litoral de Pernambuco. A hipótese de panmixia foi rejeitada em favor de uma distribuição heterogênea dos genótipos ao longo da região estudada ( $\Phi_{ST}=0,19$ ) apesar do alto fluxo gênico observado. Tal diferenciação é atribuída a loci candidatos a estarem sob seleção positiva e distribuídos diferencialmente entre as regiões geográficas, evidenciando uma estruturação genética em fina escala geográfica, compatível com padrões de clina geográfica mediada por seleção. Análises de agrupamento e loci candidatos a estarem sob seleção positiva apontam que as populações de *C. guanhumi* do litoral Norte e Sul de Pernambuco comportam-se como diferentes Unidades de Manejo, e devem ser gerenciadas de forma independente, uma vez que, a sua pesca é totalmente dependente dos estoques naturais, que se exauridos, implicarão em graves impactos ecológicos e socioculturais.

**Palavras-chave:** espécies sobreexploradas; estruturação genética em fina escala geográfica; *ISSR*; genética da conservação.

## Abstract

*Cardisoma guanhumi* is a land crab intensively exploited as food and considered an important economic resource in Brazil. In recent decades the species has experienced a sharp population decline, overfishing ally influenced by the loss and / or degradation of the natural habitat. In overexploited species, the definition of "stocks" or units of management are essential for the conservation of these resources. This study aimed to investigate the genetic variation and connectivity *C. guanhumi* from 154 specimens sampled in five estuaries with different levels of preservation. ISSRs nine primers were used to assess the genetic constitution of the species. The genetic diversity observed in *C. guanhumi* was high, confirming the condition of resilient designated for the species, and attest to a good state of conservation of this resource in the state of Pernambuco. The hypothesis of panmixia was rejected in favor of a heterogeneous distribution of genotypes throughout the study ( $\Phi_{ST} = 0.19$ ) despite high gene flow observed region. Such differentiation is attributed to a candidate loci under positive selection and are differentially distributed across geographic areas, indicating a genetic structuring in fine geographic scale, standards compliant geographic cline mediated selection. Cluster analysis and candidate loci to be under positive selection indicate that populations of *C. guanhumi* North and South coast of Pernambuco behave as different Management Units, and should be managed independently, since their fishing is totally dependent on natural stocks, which are depleted, will lead to serious ecological and socio-cultural impacts.

**Keywords:** overexploited species, fine scale genetic structure, ISSR, conservaion genetics.

## Lista de Ilustrações

- Figura 1:** Diagrama do anelamento de *primers ISSR* e a possível formação do padrão de bandas. Um primer de fita única que ancora na região 3' (setas claras) e 5' (setas escuras) da sequência de microssatélite (neste caso, uma repetição de dinucleotídeos- CA) é utilizado para amplificar a sequência genômica presente entre as regiões de microssatélite. Adaptado de Zietkiewicz et al., (1994).....5
- Figura 2:** Exemplar de *Cardisoma guanhumi*.....7
- Figura 3.** Mapa do Brasil, evidenciando o litoral Pernambucano e os cinco sítios amostrais. Os campos hachurados indicam os estuários localizados em Áreas de Proteção Ambiental- APAs.....15
- Figura 4.** Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,8% do iniciador EMBR01, exemplificando os polimorfismos presentes entre espécimes de *C. guanhumi*. L= marcador DNA Ladder 1 Kb; CA= Estuário do rio Capibaribe ; GO= Estuário do rio Goiana; JA= Estuário do rio Jaguaribe; SH= Estuário do rio Sirinhaém; RF= Estuário do Rio formoso.....23
- Figura 5.** Gráfico mostrando os marcadores com  $F_{ST}$  para seleção positiva identificados através das comparações entre os *C. guanhumi* estudados. A área em vermelho representa os marcadores sobre seleção positiva, a área em cinza aqueles sob seleção neutra e a área em amarelo para seleção balanceadora...24

**Figura 6.** Estruturação bayesiana mostrando a existência de duas populações genéticas (K=2) geograficamente estruturadas para *C. guanhumi* ao longo dos estuários estudados. Cada barra vertical representa um dos 154 indivíduos analisados. Grupo 1 (regiões Norte/Central) é representado na cor vermelha, e Grupo 2 (região Sul) é mostrado na cor verde. O comprimento da barra corresponde à proporção do perfil genético de cada indivíduo que é atribuído a cada uma das populações.....28

**Figura 7.** Análise de escalonamento multidimensional (2 dimensões) com exemplares de *C. guanhumi* dos estuários estudados. a) demonstrando a existência de dois grupos (Litoral Norte-Central/ Litoral Sul) com certa sobreposição, e; b) relação de similaridade entre os *C. guanhumi* de cada um dos estuários. As cores na legenda indicam a região e estuário de origem dos espécimes.....29

**Figura 8.** Rede de perfis genéticos para *C. guanhumi* ao longo dos estuários estudados. As cores identificam os perfis genéticos observados em cada estuário. As cores na legenda na porção superior esquerda da figura indicam o estuário de origem de cada um dos perfis genéticos.....29

**Figura 9.** Regressão linear entre o índice de fixação da variação genética intraespecífica ( $\Phi_{ST}$ ) e distâncias geográficas (Km) para *C. guanhumi* nos estuários estudados.....31

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Número (N) de *C. guanhumi* obtidos em cada estuário ao longo do litoral de Pernambuco. Coordenadas geográficas e região à qual pertencem são mostrados.....15

**Tabela 2.** Iniciadores ISSR testados, suas respectivas sequências e bibliografia a partir da qual foram selecionados. Os iniciadores escolhidos para o presente estudo estão destacados em negrito.....18

**Tabela 3.** Diversidade genética observada em *C. guanhumi* em cada um dos estuários estudados.  $n$ = total de loci amplificados;  $k$ = total de loci polimórficos;  $P$ = percentual de loci polimórficos;  $h$ = diversidade genética de Nei.....24

**Tabela 4.** Frequências dos marcadores sob seleção (representadas pela presença da banda no gel de agarose) e  $\Phi_{ST}$  para cada um dos loci *outliers* detectados a partir das populações de *C. guanhumi* estudadas. Os valores mais elevados das frequências alélicas para cada loci são destacadas em negrito.....25

**Tabela 5.** Análise da variância molecular para *C. guanhumi* nos estuários estudados.  $\Phi_{ST}$  indica a variação entre os estuários estudados.....26

**Tabela 6.** Medidas de diferenciação populacional de *C. guanhumi* baseadas na análise de variância molecular para os dois grupos assumidos (litoral Norte/ Litoral Sul) de *C. guanhumi* ao longo do estado de Pernambuco.  $\Phi_{CT}$ : Índice de fixação da variação genética entre grupos/ regiões (Norte-Central/Sul)  $\Phi_{SC}$ : Índice de fixação da variação genética entre os estuários do mesmo grupo  $\Phi_{ST}$ : Índice de fixação da variação genética dentro dos estuários.....26

**Tabela 7.** Valores de  $\Phi_{ST}$  pareados para *C. guanhumi* nos estuários estudados. ( $p < 0,001$ ). .....27

**Tabela 8.** Valores de  $G_{ST}$  (acima da diagonal) e  $N_m$  (abaixo da diagonal) entre as amostras de *C. guanhumi* estudadas. ....27

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

|                       |                                                                           |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>AFLP</b>           | Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados                    |
| <b>AMOVA</b>          | Análise de variância molecular                                            |
| <b>ANOVA</b>          | Análise de variância                                                      |
| <b>APA</b>            | Área de Proteção Ambiental                                                |
| <b>CA</b>             | Capibaribe                                                                |
| <b>DNA</b>            | Ácido desoxirribonucleico                                                 |
| <b>dNTP</b>           | Desoxirribonucleotídeo trifosfato                                         |
| <b>F<sub>CT</sub></b> | Índice de fixação da variação genética entre grupos/regiões               |
| <b>F<sub>SC</sub></b> | Índice de fixação da variação genética entre populações de um mesmo grupo |
| <b>F<sub>ST</sub></b> | Índice de fixação da variação genética entre subpopulações                |
| <b>GO</b>             | Goiana                                                                    |
| <b>G<sub>ST</sub></b> | Índice de diferenciação genética                                          |
| <b><i>h</i></b>       | Diversidade genética de Nei                                               |
| <b>IBD</b>            | Isolamento por distância                                                  |
| <b>ID</b>             | Identificação                                                             |
| <b>ISSR</b>           | Sequências Entre Repetições Simples                                       |
| <b>JÁ</b>             | Jaguaribe                                                                 |
| <b><i>k</i></b>       | Total de loci amplificados                                                |
| <b>K</b>              | Número de populações genéticas                                            |
| <b>Kb</b>             | Quiilobases                                                               |
| <b>MDS</b>            | Análise de Escalonamento Multidimensional                                 |
| <b>mtDNA</b>          | DNA mitocondrial                                                          |
| <b>μL</b>             | Microlitros                                                               |
| <b>μM</b>             | Micromolar                                                                |
| <b>mM</b>             | Milimolar                                                                 |
| <b><i>n</i></b>       | número total de loci amplificados                                         |
| <b><i>n'</i></b>      | número total de loci amplificados em cada estuário                        |
| <b>N</b>              | Norte                                                                     |
| <b>ng</b>             | Nanogramas                                                                |
| <b>NJ</b>             | Neighbor-Joining                                                          |
| <b>Nm</b>             | Número de migrantes por geração                                           |
| <b>OTUs</b>           | Unidades taxonômicas Operacionais                                         |
| <b><i>P</i></b>       | Total de loci polimórficos                                                |
| <b><i>P'</i></b>      | em relação ao conjunto total de loci detectados em cada estuário estudado |
| <b>pb</b>             | Pares de bases                                                            |
| <b>PCR</b>            | Reação em Cadeia da Polimerase                                            |



|                      |                                                 |
|----------------------|-------------------------------------------------|
| <b>R<sup>2</sup></b> | Coeficiente de determinação                     |
| <b><i>RAPD</i></b>   | Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso        |
| <b>RF</b>            | Rio Formoso                                     |
| <b>S</b>             | Sul                                             |
| <b>SGS</b>           | Estruturação genética em fina escala geográfica |
| <b>SH</b>            | Sirinhaém                                       |
| <b>SSR</b>           | Sequências de Repetição Simples                 |
| <b>Ta</b>            | Temperatura de anelamento                       |
| <b>TBE</b>           | Tampão Tris-Borato                              |
| <b>TF</b>            | Tamanho do fragmento amplificado                |

## Sumário

Resumo

Abstract

Lista de ilustrações

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução                                                                                   | 1  |
| 2. Revisão da Literatura                                                                        | 2  |
| 3. Objetivos                                                                                    | 13 |
| 3.1. Objetivo geral                                                                             | 13 |
| 3.2. Objetivos específicos                                                                      | 14 |
| 4. Material e Métodos                                                                           | 14 |
| <u>4.1. Área de estudo e amostragem</u>                                                         | 14 |
| <u>4.2. Análises moleculares</u>                                                                | 17 |
| <u>4.3. Análise estatística dos dados</u>                                                       | 19 |
| 5. Resultados                                                                                   | 23 |
| <u>5.1. Diversidade genética</u>                                                                | 23 |
| <u>5.2. Teste de neutralidade de seleção para marcadores dominantes</u>                         | 2  |
| <u>5.4. Análise de variância molecular (AMOVA) e outros parâmetros de genética populacional</u> | 25 |
| 5.4.1. <u>Análises de agrupamento</u>                                                           | 27 |
| 5.4.2. Simulação Bayesiana (STRUCTURE)                                                          | 28 |
| 5.4.3. Análise de escalonamento multidimensional (MDS)                                          | 29 |
| 5.3.4. Rede de Perfis genéticos                                                                 | 30 |

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| <b><u>5.6 Isolamento por distância (IBD)</u></b> | 31 |
| <b>6. Discussão</b>                              | 31 |
| <b>7. Conclusões</b>                             | 37 |
| <b>8. Referências Bibliográficas</b>             | 38 |
| <b>9. Anexos</b>                                 | 51 |
| <b>10. Curriculum vitae (Lattes)</b>             | 59 |

## 1. Introdução

O ambiente físico e biológico do planeta tem sofrido de forma rápida, crescente e sistemática uma dramática alteração, como resultado da atividade antropogênica, que tem levado a um enorme impacto na saúde humana e na sustentabilidade dos ecossistemas. Muitas vezes, as necessidades humanas se chocam com os esforços e medidas de preservação da biodiversidade. A solução para esse confronto reside no desenvolvimento de um uso sustentável dos recursos biológicos e de uma vida cotidiana igualmente sustentável, uma vez que é irremediável o desenvolvimento econômico que satisfaça as necessidades humanas de recursos e empregos, tanto das atuais quanto das futuras gerações.

A compreensão dos mecanismos que vêm governando a estrutura genética das espécies é de fundamental importância para auxiliar decisões referentes à perpetuação das espécies e da dinâmica ecológica dos ambientes. *Cardisoma guanhumi* tem experimentado reduções populacionais devido à sobrepesca e perda de habitat e possui um forte apelo de investigação científica objetivando a sua conservação, visto que é um importante recurso econômico, sendo explorado como alimento, e está incluído na Lista Nacional das Espécies sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração, elaborada pelo ministério do meio ambiente. Além disso, estudos recentes relativos à variação genética (Região controle do DNA mitocondrial) da espécie têm revelado a falta de estruturação genética na espécie e uma satisfatória variação genética, envolvendo amostras pontuais dos estados de Rio Grande do Norte, Pernambuco, Sergipe, Rio de Janeiro e Santa Catarina. Deste modo, testar a hipótese da ausência de estruturação genética, bem como o patamar de variação genética da espécie em uma escala geográfica menor, torna-se importante para o diagnóstico da sustentabilidade da exploração,

sugerir caminhos de conservação da espécie e subsidiar o desenvolvimento de planos de gestão desse recurso no estado.

## **2. Revisão da literatura**

A diversidade genética é definida como toda a diversidade biológica herdável e constitui a matéria prima na qual a evolução atua (Hughes et al., 2008; Frankham et al., 2004; Allendorf et al., 2007). Polimorfismos nas sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA) de indivíduos, populações, espécies, gêneros, etc., introduzidos através de processos evolutivos de mutação e fluxo gênico (Pierce, 2004; Snustad & Simmons, 2008), podem ser expressos em fenótipos que respondam de forma diferenciada às pressões seletivas do ambiente (Frankham et al., 2004; Whitham et al., 2006; Allendorf & Luikart, 2009). Assim, a diversidade genética produz efeitos significativos na viabilidade de populações, comunidades e ecossistemas por favorecê-los em processos ecológicos (Whitham et al., 2006; Hughes et al., 2008) como produtividade primária (Dudley & File 2007; Mattila & Seeley 2007), recuperação da população após uma perturbação (Peacock et al., 2001; Boles et al., 2004; Pearman & Garner 2005), competição intraespecífica (Gamfeldt et al., 2005) e estrutura da comunidade e fluxo de energia e nutrientes (Hughes & Stachowicz 2004; Schweitzer et al. 2005; Madritch et al. 2006).

As consequências benéficas da variabilidade genética são de interesse particular em biologia da conservação, uma vez que populações ameaçadas geralmente apresentam potencial evolutivo reduzido devido ao decréscimo populacional (Frankham et al., 2004; Allendorf et al., 2007). Formas raras de um gene (alelos) ou combinações de alelos podem não conferir qualquer vantagem

imediate, mas podem vir a ser bem adaptadas a novas condições ambientais no futuro (Matson et al, 2006; Silva, 2009). Portanto, preservar a diversidade genética é importante para a manutenção do potencial evolutivo de longo prazo para as espécies (Allendorf et al., 2007).

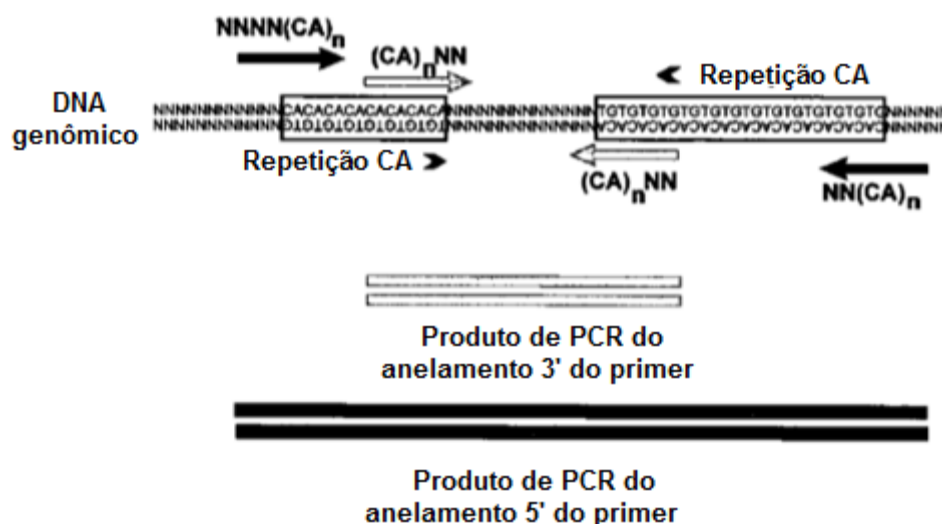
A distribuição espaço-temporal da variabilidade genética é resultante da ação conjunta de processos evolutivos, tais como deriva gênica, mutação, seleção e fluxo gênico (Halt & Clark, 2010). Populações naturais podem apresentar diferenças na distribuição da variação genética (ou frequências alélicas) e tornar-se subdividas ou geneticamente estruturadas (Frankham et al., 2004; Brooker et al., 2000; Weetman et al 2007; Lo Brutto et al., 2013; Xu et al., 2001; Grant et al 2011; De Croos & Pálsson, 2012).

Populações que se diferenciaram geneticamente como resultado da adaptação a diferentes habitats podem experimentar um processo de depressão exogâmica quando cruzadas (Gharrett et al., 1999; Edmands, 2007; Wang et al., 2007; Miller et al., 2012), ou seja, uma redução valor adaptativo, uma vez que os híbridos podem não ser adaptados a nenhum dos ambientes (Frankham et al., 2004; Allendorf et al., 2007). Por outro lado, populações que enfrentam depressão endogâmica, ou seja, perda do potencial evolutivo devido à redução populacional e endogamia (Hedrick & Kalinowski 2000; Keller & Waller 2002) podem beneficiar-se do fluxo gênico a partir de translocações de indivíduos de populações geneticamente similares (*genetic rescue*- resgate genético, Ingvarsson, 2001; Bouzat et al., 2009; Bijlsma et al., 2010; Hedrick & Fredrickson, 2010). Deste modo, a quantificação da diversidade genética bem como a compreensão dos padrões e da extensão da estrutura genética de populações ameaçadas é crucial para a elaboração de estratégias efetivas de manejo (Moritz et al., 2002; Tallmon

et al., 2004; Laikre et al., 2005; Palsbøll et al., 2006; Allendorf et al., 2007; Schwartz et al., 2007; Ovender et al., 2013).

A análise genética através de marcadores moleculares altamente variáveis pode fornecer informações importantes sobre a estrutura genética de populações, especialmente quando combinada a abordagens estatísticas robustas (Casu et al., 2005; Palsbøll et al., 2006; Allendorf et al., 2007). Porém, quanto à escolha de um marcador molecular específico, deve-se considerar não apenas o objetivo do estudo, mas também outros aspectos importantes relacionados com a acessibilidade e viabilidade das técnicas (Britto et al., 2011). Neste contexto, marcadores moleculares dominantes como as Sequências Entre Repetições Simples- *Inter Simple Sequences Repeats* – (*ISSR*) têm se mostrado úteis para lidar com uma série de problemas genéticos com rapidez e baixo custo, uma vez que, não requerem informações prévias de sequências de DNA da espécie-alvo, produzem fragmentos hipervariáveis com grande reprodutibilidade, requerem um aparato mínimo de equipamentos e são de fácil uso (Yang et al., 1996; Wolfe et al., 1998; Fernández et al., 2011).

A técnica de *ISSR* consiste na amplificação das regiões entre sítios microssatélites (regiões do genoma com repetições em tandem de 1 a 4 nucleotídeos ou Sequências de Repetição Simples-*Simple Sequences Repeat-SSR*) orientados inversamente, por meio de um único iniciador composto de uma sequência de microssatélites (normalmente 18-20 pares de bases) (figura 1). A visualização das amplificações consiste em um padrão de bandas multiloci altamente polimórfico, geralmente referido como impressões digitais genômicas (*genomic fingerprinting*).



**Figura 1.** Diagrama do anelamento de *primers ISSR* e a possível formação do padrão de bandas. Um primer de fita única que ancora na região 3' (setas claras) e 5' (setas escuras) da sequência de microsatélite (neste caso, uma repetição de dinucleotídeos- CA) é utilizado para amplificar a sequência genômica presente entre as regiões de microsatélite. Adaptado de Zietkiewicz et al. (1994).

Marcadores *ISSR* foram introduzidos por Gupta et al. (1994) e Zietkiewicz et al. (1994) em estudos com plantas cultivadas, contudo, têm sido utilizados em estudos de conectividade genética e história natural de grupos de vertebrados (Kostia et al., 2000; Borner & Branchard, 2001; Haig et al., 2003; Hassan et al., 2003; Maltagliati et al., 2006) e invertebrados terrestres (Abbot, 2001; Luque et al., 2002; Chatterjee & Mohandas, 2003; Manrique-Poyato et al., 2013). Todavia, em invertebrados marinhos e crustáceos explorados comercialmente, destaca-se o poder de resolução deste marcador molecular em investigações a cerca da diversidade genética (Schulz et al., 2004; Casu et al., 2008; Pannacciulli et al., 2009; Ungherese et al., 2010; Britto et al., 2011; Donrung et al., 2011; Fernández et al., 2011) e detecção de estruturação genética (Schulz et al., 2004;



Maltagliati et al., 2005; Casu et al., 2006; de Aranzamendi et al., 2008; Donrunga et al., 2011), especialmente em fina escala geográfica (Casu et al., 2005; Ungherese et al., 2010; Barbosa et al., 2013; Eimanifar & Wink 2013).

Padrões de estruturação genética em fina escala geográfica (fine-scale spatial genetic structure-SGS; Dick, 2008; Smouse et al., 2008) são caracterizados pela presença de heterogeneidade genética entre populações separadas por poucos quilômetros (Beaumont & Pether, 1996; Bolch et al., 1999; Pierce et al., 2000; Webber & Levi, 2000; Xu et al., 2001) ou metros (Bistrow & Vadas, 1991; Schnabel et al., 2000; Casu et al., 2005; Yund & O'Neil, 2000; Barbosa et al., 2013). Em organismos estuarinos, sistemas de acasalamento e período reprodutivo (De Croos & Pálsson, 2012), seleção e adaptação local (Hateley et al., 1992; Abbiati & Maltagliati, 1996; Schmidt & Rand, 2001), dispersão limitada devido à retenção larval (Di Bacco & Levin 2000; Bilton et al., 2002; Marta-Almeida et al. 2006; Queiroga et al. 2007), bem como fatores ecológicos, podem variar em uma escala microgeográfica e afetar os padrões de estrutura genética entre populações de espécies estuarinas (Bilton et al., 2002).

Popularmente conhecido como guaiamum, goiamum, caranguejo grande ou caranguejo azul, *Cardisoma guanhumi* (figura 2) é um caranguejo terrestre pertencente à família Gecarcinidae (Decapoda), com distribuição geográfica ao longo da Costa Atlântica Americana desde o estado da Flórida, nos Estados Unidos, até Santa Catarina no Sul do Brasil (Melo, 1996; Ferreira et al., 2009). Habita as porções mais altas do ecossistema manguezal (ou "apicum"), campos abertos com gramas altas e florestas costeiras continentais. Todavia, não mais é encontrado em distâncias maiores que 5 Km a partir da linha costeira (Gifford, 1962; Wolcott & Wolcott, 1987; Pinder & Smits, 1993).



**Figura 1.** Exemplar de *Cardisoma guanhumi*

*Cardisoma guanhumi* vive em tocas e exibe um forte comportamento de sítio-fidelidade, no qual raramente constrói ou ocupa novas tocas (Forsee & Albrecht, 2012). Parâmetros como profundidade e formato interior da toca dependem do nível da água subterrânea e do tipo de solo (Forsee & Albrecht, 2012; Herreid & Gifford, 1963; Pinder & Smits, 1993). Na porção interna da toca, pode ser encontrada água doce ou salobra, restos de alimentos e fauna associada (e.g., *Culex carcinoxenus*) (Herreid & Gifford, 1963; Oliveira, 1946). De hábito semioturno, a espécie alimenta-se principalmente de folhas, frutos, sementes, pequenos insetos e/ou material em decomposição, que são arrastados para o interior da toca (Shimasaki et al., 2009).

A coloração azulada é uma característica marcante da espécie. Contudo, pode variar entre tons de amarelo, roxo e até mesmo branco, com vistas ao período reprodutivo (Gifford, 1962, Silva e Oshiro, 2002). A ocorrência de dimorfismo sexual nesta espécie é caracterizada pelo formato do abdome mais largo nas fêmeas, que aperfeiçoa a capacidade de transporte de ovos, e pelo

maior comprimento da quela nos machos, devido a sua importância como ornamento sexual e em disputas intraespecíficas (Gifford, 1962).

Usualmente, o tamanho da carapaça é utilizado para referir-se ao tamanho corporal de *C. guanhumi* e varia de acordo as pressões seletivas impostas às populações de cada área (Botelho et al. 2001; Shinozaki-Mendes et al., 2013). A primeira maturação sexual acontece quando alcançam entre 3,5 e 7 cm de carapaça. Na época reprodutiva desta espécie e depois de atingida, [no verão ou no início do outono, entre os meses de Novembro a março (Gifford, 1962; Botelho et al., 2001; Silva e Oshiro, 2002; IBAMA 2003; 2006; Shinozaki-Mendes et al., 2013)], vários espécimes de *C. guanhumi* saem das suas tocas em busca de parceiros para cópula e, este fenômeno é conhecido como “andada” (Oliveira 1946; Gifford, 1962; Firmo et al., 2012; Oliveira 1946), com ocorrência geralmente no verão ou no início do outono, entre os meses de Novembro a março (Gifford, 1962; Botelho et al., 2001; Silva e Oshiro, 2002; IBAMA 2003; 2006; Shinozaki-Mendes et al., 2013). Após o período de acasalamento, as fêmeas carregadas com 103.000 a 1.200.000 ovos iniciam um deslocamento até a água salgada/salobra para a desova. Tal movimento migratório é denominado “andada das fêmeas” e ocorre no período chuvoso (abril e maio), como estratégia adaptativa para evitar o ressecamento dos ovos (Sankarankutty et al., 1995; Silva- Falcão et al., 2007; Shinozaki-Mendes et al., 2013).

Após a eclosão dos ovos no ambiente aquático, *C. guanhumi* passa por cinco estágios larvais, que duram em média de 23 a 47 dias, dependendo das condições de salinidade e temperatura do ambiente, quando alcançam o estágio de megalopa (estágio de assentamento). Após alcançarem o estágio de 3º juvenil,

abandonam o ambiente aquático e iniciam a construção de tocas (Costlow Jr & Bookhout, 1968a; Costlow Jr & Bookhout, 1968b; Abrunhosa et al 2000).

Caranguejos terrestres como *C. guanhumi* são considerados espécies-chave para ecossistemas costeiros (Lindquist et al 2009). O comportamento de forrageio deste grupo afeta significativamente a composição e a estrutura da vegetação de manguezais e florestas costeiras continentais, uma vez que, limitam o recrutamento e o estabelecimento de árvores (Green et al 2008; Lindquist & Carroll, 2004). Do mesmo modo, a utilização de serapilheira como alimento e a remoção desta para suas tocas auxilia a ciclagem e retenção de nutrientes dos seus habitats (Lindquist et al 2009). Modelos ecológicos demonstram que a retenção de nutrientes aumenta a produtividade desses habitats, que por sua vez fornecem um feed-back positivo para a biomassa do caranguejo (Green et al 2008; Lindquist & Carroll, 2004). Além disso, o comportamento de escavar tocas e criar montantes de terra melhora a aeração do solo, que favorece o crescimento da floresta (Lindquist et al 2009).

*Cardisoma guanhumi* é intensamente explorado como alimento e considerado um importante recurso econômico, vendido livremente em feiras, restaurantes e beiras de estrada. Em comunidades pesqueiras, a atividade de coleta do guaiamum possui um forte apelo sociocultural através da geração de empregos e renda (Barboza et al 2008; Firmo et al., 2012). Nas últimas décadas a espécie tem experimentado um acentuado declínio populacional (Amaral & Jablonski, 2005; Rodríguez-Fourquet & Sabat, 2009). Tal condição impulsionou o desenvolvimento de mecanismos para a proteção da espécie, como o período de defeso. No Brasil, a espécie foi incluída na Lista Nacional das Espécies sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração (MMA, 2004).

Uma das estratégias de conservação deste e de outros recursos vivos marinhos/estuarinos é o estabelecimento do período de defeso. Este consiste na proibição da captura, da manutenção em cativeiro, do transporte, do beneficiamento, da industrialização, do armazenamento e da comercialização da espécie. Nas regiões Sul e Sudeste, o período de defeso vigora entre os meses de outubro a março, com proibição permanente da caça de espécimes menores que 8 cm, fêmeas ovadas e partes individuais (quelas) (IBAMA, 2003). Já no Nordeste, o defeso proíbe a pesca da espécie entre os meses de dezembro a março, com proibição permanente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Sergipe de espécimes menores que 6 cm. Já no estado da Bahia, os espécimes abaixo de 7 cm são aqueles com proibição permanente (IBAMA, 2006).

Segundo Shinozaki-Mendes et al. (2013) as diretrizes apontadas nos documentos que regularizam os defesos, evidenciam uma grande desarmonia entre a informação científica e os gestores. Por exemplo, no Ceará *C. guanhumi* machos atingem a maturidade reprodutiva com 6.9 cm e as fêmeas com 6.1 cm. Neste caso, o tamanho mínimo permitido para coleta deveria ser 7 cm para machos e 6,2 cm para fêmeas (ou 7 cm para ambos) e não 6 cm como o estabelecido no período de defeso para a região. No Rio de Janeiro, o período de defeso acaba justamente nos meses de maior ocorrência de fêmeas ovadas (março a maio), onde a coleta dos espécimes neste estado pode reduzir a proporção de *C. guanhumi* para a próxima geração e contribuir para a redução da população da espécie (Silva e Oshiro, 2002).

A principal ameaça às populações de *C. guanhumi* é a sobrepesca. Dados de estatística pesqueira revelam uma informação alarmante: a pesca do

crustáceo no Brasil aumentou em 514% na última década (CEPENE, 2001; Ministério da pesca e aquicultura, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011). Deve-se considerar que tais dados estão disponíveis apenas para o estado de Sergipe, e, quando são incorporados ao Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, elaborado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura, levam a uma interpretação equivocada e subestimada do patamar de exploração deste recurso pesqueiro no Brasil, uma vez que, presumem que os dados são provenientes da pesca para todo o Brasil (CEPENE, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006).

A sobrepesca aliada à perda e/ou degradação do habitat natural têm influenciado de forma significativa a abundância e a estrutura populacional de *C. guanhumi*. Rodríguez-Fourquet & Sabat (2009) observaram que abundância e tamanho dos espécimes são maiores em áreas protegidas e com menor esforço pesqueiro. Em outro estudo, Govender et al. (2008) encontraram uma relação negativa entre temperatura do solo e abundância de *C. guanhumi*. Além disso, a transformação de áreas para a agricultura pode ter influenciado o aumento da temperatura do solo, que por sua vez pode ter conduzido a redução da população em tais áreas. Em áreas que a pesca é permitida, muitas populações da espécie têm sido classificadas como juvenis ou adultos jovens, ou seja, a taxa de sobrevivência em tais populações é baixa (Botelho et al., 2001; Govender et al., 2008; Shinozaki-Mendes et al. 2013).

As alterações na qualidade da água decorrentes do despejo de efluentes domésticos, industriais ou da agricultura e aquicultura, podem também causar sérios danos às formas mais jovens de *C. guanhumi* e contribuir para a redução da população da espécie. Galli et al. (2012) observaram que baixos índices de pH e Oxigênio dissolvido causam mortalidade das formas mais jovens do guaiaumum,

como zoea I, megalopa e juvenil I (estes últimos em maior intensidade) e podem contribuir para a redução da população da espécie.

Espécies exploradas comercialmente geralmente experimentam declínios populacionais acentuados em função da sobrepesca e/ou degradação do seu habitat natural, tornando-se mais sensíveis às mudanças estocásticas demográficas (e.g. razão sexual), ambientais (e.g. secas), e genéticas (e.g. deriva genética, endogamia), devido à redução do potencial evolutivo em consequência da perda de diversidade genética. (Allendorf et al., 2007; Frankhan et al. 2004; Markert et al., 2010; Pinsk et al., 2014). Além disso, o tamanho populacional reduzido pode limitar as taxas de migração e conduzir à diferenciação genética em subpopulações (Allendorf et al., 2008).

A aplicação de princípios e métodos genéticos para a biologia e gestão da pesca (genética pesqueira) pode auxiliar na compreensão mecanismos que moldam a abundância e a distribuição das espécies exploradas, bem como a identificação de fatores que sustentam a dinâmica e a capacidade de resistência em tais espécies (Ward, 2000; Hauser & carvalho, 2008; Ovender et al., 2013). Investigações a cerca da conectividade entre populações (Cowen et al., 2006; Treml et al., 2008), escala espacial e temporal da diferenciação populacional (Jørgensen et al., 2005; Ruzzante et al., 2006), tamanho efetivo da população (Hauser et al., 2002; Waples & Yokota 2007), evolução induzida pela pesca (Kuparinen & Merilä 2007; Marshall & Browman 2007) e análise da variação adaptativa em populações selvagens (Conover et al 2006; Allendorf et al., 2008) têm contribuído substancialmente para a identificação de populações diferenciadas (*i.e.*, unidades de manejo) e os limites espaciais de estoques pesqueiros (Ward, 2000; Hauser & carvalho, 2008; Ovender et al., 2013).

Apesar da sua importância ecológica (Lindquist & Carroll, 2004; Green et al 2008; Lindquist et al 2009), econômica e sociocultural (Barboza et al 2008; Firmo et al., 2012), além dos declínios populacionais devido à sobrepesca e perda de habitat (Amaral & Jablonski, 2005; Rodríguez-Fourquet & Sabat, 2009), estudos genéticos em *C. guanhumi* são escassos (Oliveira-Neto et al., 2008). Assim, *C. guanhumi* possui um forte apelo de investigação científica objetivando a sua conservação, visto que é um importante recurso econômico, sendo explorado como alimento, e está incluída na Lista Nacional das Espécies sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração (MMA, 2004). Além disso, estudos recentes relativos à variação genética (Região controle do mtDNA) da espécie tem revelado a falta de estruturação genética na espécie e uma satisfatória variação genética, envolvendo amostras pontuais dos estados de Rio Grande do Norte, Pernambuco, Sergipe, Rio de Janeiro e Santa Catarina (Oliveira-Neto et al., 2008). Deste modo, testar a hipótese da ausência de estruturação genética, bem como o patamar de variação genética da espécie em uma escala geográfica menor, torna-se importante para o diagnóstico da sustentabilidade da exploração, sugerir caminhos de conservação da espécie e subsidiar o desenvolvimento de planos de gestão desse recurso no estado.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Inspecionar a variação genética de *C. guanhumi* em cinco estuários do estado de Pernambuco, por meio do uso dos marcadores moleculares de DNA do tipo *ISSRs*.



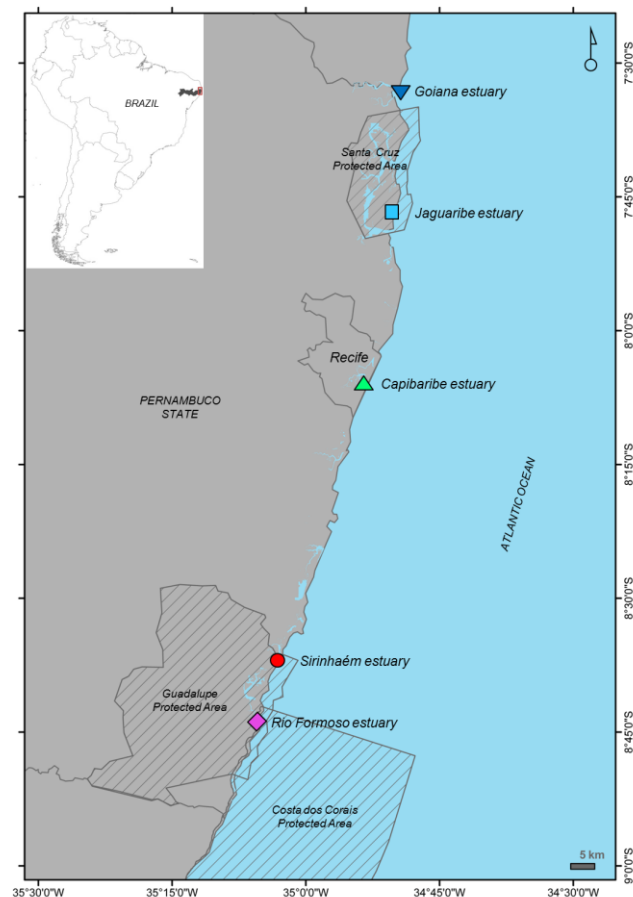
### **3.2. Objetivos específicos**

1. Determinar o patamar de variabilidade genética da espécie na região estudada;
2. Localizar as regiões que retém mais variabilidade genética;
3. Identificar o nível de fluxo genético que *C. guanhumi* apresenta ao longo dos estuários estudados e observar se existe algum padrão demográfico de fluxo larval.

## **4. Material e métodos**

### *4.1. Área de estudo e amostragem*

Um total de 154 exemplares adultos de *C. guanhumi* provenientes de cinco estuários do litoral de Pernambuco foram coletados junto às comunidades de catadores locais, seguindo a maior proximidade possível de linha da costa, durante o mês de julho de 2012 (tabela 1, figura 3). Os estuários amostrados possuem distância mínima de 10 Km e máxima de 150 Km e foram selecionados de forma a representar as diferentes constituições ambientais nas porções do litoral Norte (estuário do rio goiana e estuário do rio Jaguaribe), Central (estuário do rio Capibaribe) e Sul (estuário do rio Sirinhaém e estuário do rio Formoso) do estado de Pernambuco (tabela 1, figura 3). Além disso, foram considerados os diferentes níveis de conservação dos estuários descritos pela Agência Estadual de Meio Ambiente de Pernambuco- CPRH/PE.



**Figura 3.** Mapa do Brasil, evidenciando o litoral Pernambucano e os cinco sítios amostrais. Os campos hachurados indicam os estuários localizados em Áreas de Proteção Ambiental- APAs.

**Tabela 1.** Número (N) de *C. guanhumi* obtidos em cada estuário ao longo do litoral de Pernambuco. Coordenadas geográficas e região à qual pertencem são mostrados.

| Região          | Estuário    | N  | Latitude     | Longitude     |
|-----------------|-------------|----|--------------|---------------|
| Litoral Norte   | Goiana      | 31 | 7°32'28.66"S | 34°51'20.61"O |
|                 | Jaguaribe   | 30 | 7°43'45.07"S | 34°50'15.98"O |
| Litoral Central | Capibaribe  | 30 | 8° 5'19.09"S | 34°55'3.67"O  |
| Litoral Sul     | Sirinhaém   | 30 | 8°35'21.56"S | 35° 3'57.49"O |
|                 | Rio Formoso | 33 | 8°41'1.04"S  | 35° 6'13.83"O |

### *Litoral Norte*

Os estuários do rio Goiana e do rio Jaguaribe possuem cerca de 4.776 e 212 hectares, respectivamente. Nas últimas três décadas, atividades antrópicas como agricultura, expansão urbana e turismo foram responsáveis por uma redução de cerca de 43,3% nas áreas de manguezais destes estuários. Em especial, aproximadamente 9,6% deste território foi perdido devido à implantação de empreendimentos de carcinicultura, com maior intensidade no estuário do rio goiana (Agência Estadual de Meio Ambiente do Estado de Pernambuco-CPRH/PE, 2012; Guimarães et al., 2010; Barletta & Costa 2009). Apesar dos impactos causados pela ação antrópica, o estuário do rio Jaguaribe é considerado um estuário conservado e recentemente foi inserido na Área de Proteção Ambiental-APA de Santa cruz (Agência Estadual de Meio Ambiente do Estado de Pernambuco-CPRH/PE, 2012).

### *Litoral central*

O estuário do rio Capibaribe está localizado na região metropolitana da capital do estado de Pernambuco- Recife, e tem experimentado constantes desmatamentos, deposição de resíduos sólidos e emissão de efluentes domésticos e/ou industriais (Agência Estadual de Meio Ambiente do Estado de Pernambuco-CPRH/PE, 2012, 2010). As áreas antes ocupadas por extensos manguezais hoje estão completamente urbanizadas, restando apenas poucas manchas de vegetação (Agência Estadual de Meio Ambiente do Estado de Pernambuco-CPRH/PE, 2012, 2010).

### *Litoral Sul*

Inseridos na Área de Proteção Ambiental-APA de Guadalupe, o estuário do rio Sirinhaém e o estuário do rio Formoso possuem cerca de 3.335 e 2.724 hectares de manguezal bem conservado, respectivamente. As espécies de peixes e crustáceos representam a fonte de renda para a maioria da população local, sendo a pesca predatória e a especulação imobiliária as principais ameaças à biodiversidade nesta área (Agência Estadual de Meio Ambiente do Estado de Pernambuco-CPRH/PE, 2012, 2010). A área estuarina do Rio Formoso possui nas proximidades da linha da costa uma barreira de arrecifes que garantem a baixa amplitude entre as marés, favorecendo condições diferenciadas para o desenvolvimento da vegetação e da fauna. Por esta razão, também encontra-se inserida na Área de Proteção Ambiental-APA da Costa dos Corais (Ferreira & Maida, 2006).

#### 4.2. Análises moleculares

A partir da coleta dos exemplares, foram retiradas amostras (cerca de 2cm<sup>3</sup>) do tecido muscular a partir do último pereópode, de forma não letal, como fonte de material genético para as extrações de DNA. O DNA total foi extraído através do método fenol-clorofórmio, conforme descrito por Sambrook e Russel (2001) e modificado por Almeida et al. (2001). A integridade do DNA extraído foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose e a concentração do DNA estimada através da comparação visual das bandas do DNA do fago Lambda.

Quinze iniciadores do tipo ISSR foram escolhidos a princípio (tabela 2) através de pesquisa bibliográfica direcionada a trabalhos que os utilizaram para investigar a diversidade genética em crustáceos. O conjunto de iniciadores foi testado, via (PCR) Polimerase Chain Reaction, em três espécimes de cada população selecionados aleatoriamente. Tal estratégia visou identificar o potencial de

amplificação e reprodutibilidade, além de identificar os iniciadores mais polimórficos e que apresentassem um padrão nítido de fragmentos, com pelo menos 60 loci polimórficos, como recomendado por Telles et al. (2001) e Nelson & Anderson (2013). A triagem preliminar permitiu a identificação de nove iniciadores informativos e confiáveis, que foram selecionados e amplificados nas amostras remanescentes.

**Tabela 2.** Iniciadores ISSR testados, suas respectivas sequências e bibliografia a partir da qual foram selecionados. Os iniciadores escolhidos para o presente estudo estão destacados em negrito.

| <b>Primer</b>  | <b>Sequência 5' - 3'</b> | <b>Temperatura de<br/>anelamento °C</b> | <b>Referência</b>           |
|----------------|--------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------|
| <b>EMBR01</b>  | (GACA)8GT                | 55                                      | Britto et al. 2011          |
| IT 1           | (CA)8GT                  | 60                                      | Fernández et al<br>2011     |
| <b>IT 2</b>    | (CA)8AC                  | 53                                      | Fernández et al<br>2011     |
| <b>IT 3</b>    | (CA)8AG                  | 54                                      | Fernández et al<br>2011     |
| <b>SAS 1</b>   | (GTG)4GC                 | 55                                      | Pannacciulli et al.<br>2009 |
| <b>SAS 2</b>   | (CTC)4GC                 | 51                                      | Fernández et al<br>2011     |
| <b>SAS 3</b>   | (GAG)4GC                 | 55                                      | Fernández et al<br>2011     |
| SAS 5          | (GT)8C                   | 50.3                                    | Pannacciulli et al.<br>2009 |
| <b>UCB-808</b> | (AG)8C                   | 54                                      | Schulz et al. 2004          |
| UCB-809        | (AG)8G                   | 52-60                                   | Schulz et al. 2004          |
| <b>UCB-811</b> | (GA)8C                   | 53                                      | Pannacciulli et al.<br>2009 |
| UBC-815        | (CT)8G                   | 52-60                                   | Schulz et al. 2004          |
| UCB-827        | (AC)8G                   | 54.9                                    | Pannacciulli et al.<br>2009 |
| <b>UCB-841</b> | (GA)8TC                  | 54                                      | Schulz et al. 2004          |
| UCB-842        | (GA)8 CG                 | 54                                      | Schulz et al. 2004          |

As reações de PCRs foram realizadas com volume total de 20 µl contendo 0,2 unidades de Taq Dna Polimerase (New England/ Biolabs), 10x Tampão (contendo MgCl<sub>2</sub>), 50 µM de primer, 0,2 µM de dNTP e 30 ng de DNA genômico em termociclador Modelo Veriti 96 (Applied biosystems ®). Tais reações se deram por um passo inicial de 4 minutos a 94 °C, 39 ciclos de 40s a 94 °C, 40s na temperatura de anelamento de cada primer (Tabela 1), além de um passo de 120s a 72 °C, com uma extensão final de 420s nesta mesma temperatura. As reações foram acompanhadas por um controle negativo caracterizado pela presença de todos os componentes da reação, exceto DNA.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,8 % em cubas horizontais e o tamanho dos fragmentos obtidos com as amplificações foi estimado por comparação com marcador DNA Ladder 1 Kb (Amresco ®). As amostras de cada localidade foram dispostas no gel de forma a serem visualizadas lado-a-lado e assim reduzir o erro padrão devido a atrasos na migração dos fragmentos durante a eletroforese. Em seguida, os géis foram visualizados em transluminador sobre fonte de luz ultravioleta e fotodocumentados.

#### 4.3. Análise estatística dos dados

ISSRs são interpretados como marcadores dialélicos dominantes, com herança biparental, onde o alelo dominante é caracterizado pela presença da banda. Assim, homozigotos dominantes e heterozigotos produzem presença de banda, enquanto a ausência de banda é indicativo de homozigotos recessivos. Os padrões de ISSR visualizados foram convertidos em uma matriz de similaridade binária (0 caracteriza ausência e 1 presença de fragmentos), onde só os

fragmentos que apresentavam-se bem resolvidos e bem delineados foram contabilizados.

A diversidade genética de *C. guanhumi* em escala global e para cada estuário amostrado foi estimada através da diversidade genética de Nei (h) (Nei, 1978) utilizando o software POPGENE (Yeh, et al., 1999) e por meio do cálculo do percentual de loci polimórficos (P) a partir da seguinte fórmula:

$$P = k/n \cdot 100$$

Onde:

k= número de loci polimórficos, e;

n= número total de loci investigados.

O software STATISTICA v.7.0 (STATSOFT, 2004) foi utilizado a fim de testar se os índices de diversidade genética diferiam significativamente entre os *C. guanhumi* dos cinco estuários estudados. Para os índices de diversidade genética de Nei (h) foi utilizada uma Análise de Variância (ANOVA) e todos os pressupostos estatísticos de normalidade e homocedasticidade dos dados foram testados. Para o percentual de loci polimórficos (P), um teste g foi utilizado.

Foram realizados testes de neutralidade a partir método do FST outlier implementado pelo software MCHEZA, que permite identificar efeitos locus-específicos gerados por seleção natural ou deriva genética (Antao & Beaumont, 2011). Cabe destacar que os parâmetros de genética populacional do tipo FST (ou seu análogo,  $\Phi$ ST) assumem a neutralidade dos loci analisados, e caso algum desses loci esteja experimentando seleção, as estimativas geradas por tais parâmetros potencializam as diferenças interpopulacionais (Luikart et al., 2003). Deste modo, objetivou-se testar (i) a existência de loci sob seleção positiva, e; (ii) o efeito dos eventuais loci sob seleção positiva nas relações genético-evolutivas

entre as populações de *C. ganhum* nos estuários estudados. Para tal, parâmetros de genética populacional e análises de agrupamento foram conduzidas utilizando todo o conjunto de dados, bem como utilizando apenas o conjunto de dados neutro (sem os loci outliers), a fim de testar se a diferenciação observada deve-se à seleção positiva em termos locus-específicos, ou se representam diferenças no genoma como um todo. As frequências alélicas dos loci candidatos a estarem sob seleção positiva foram obtidas através do Software ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier et al., 2010). A identificação de loci sob seleção positiva é útil para fins conservacionistas especialmente na definição das unidades manejo (para detalhes consulte a págs. 118 e 119 de Frankham et al., 2004).

Uma rede de perfis genéticos foi construída utilizando Haploviewer (disponível em: <http://www.cibiv.at/greg/haploviewer>) com a finalidade de melhor entender as relações entre os *C. ganhum* dos estuários estudados. A rede foi construída utilizando máxima verossimilhança a partir do software PHYLIP. O resultado é expresso em uma rede que apresenta as vias evolutivas entre as populações em termos genealógicos.

Uma simulação Bayesiana foi realizada para inferir o padrão de estruturação populacional, inferindo o possível número de K-populações genéticas por meio do software STRUCTURE 2.3.3 (Falush et al., 2003, 2007; Hubisz et al., 2009; Pritchard et al., 2003). Para cada valor de “K” (1 a 10) assumido a priori, foi executado um burn-in de 100.000 interações, seguidas de 1.000.000 simulações de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) e 10 runs para cada valor de “K”. O “K” com maior valor de DeltaK foi escolhido como sendo o mais verossímil para o conjunto de dados analisados. Cabe mencionar que um K= 2 é sempre a hipótese nula deste método de estimativa de estruturação populacional, onde se



pode observar  $K_s=2$  com estrutura genética ou não, a depender do grau de miscigenação genética entre as populações avaliadas (Falush et al., 2003, 2007; Hubisz et al., 2009; Pritchard et al., 2000).

Uma Análise de Escalonamento Multidimensional (MDS) foi utilizada para entender a estrutura dos dados em função da sua distribuição espacial em duas dimensões. O software PRIMER v.6 (Clarke & Gorley 2006) foi utilizado para agrupar as amostras de acordo com os estuários de origem e região de origem (litoral Norte/litoral Central/ litoral Sul) a partir de uma matriz de distância euclidiana.

Parâmetros de genética populacional do tipo número de migrantes por geração ( $N_m$ ) e o índice de diferenciação genética ( $G_{ST}$ ) foram obtidos através do software POPGENE (Yeh, et al., 1999) e utilizados para estimar o fluxo gênico global e entre os *C. guanhumi* de cada um dos estuários estudados. Padrões hierárquicos de estrutura populacional foram explorados através de uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) implementada através do software ARLEQUIN .3.5.1.2 (Excoffier et al., 2010). Um total de três índices de fixação foram calculados [o índice intra-específico de fixação de variância genética ( $\Phi_{ST}$ ), e os índices de fixação entre os grupos ( $\Phi_{CT}$ ) e dentro dos grupos ( $\Phi_{SC}$ )]. Para esta análise, as populações foram agrupadas em duas formas: (i) todas as amostras, e ; (ii) conjunto de dados particionado em duas regiões definidas geograficamente: Litoral Norte-Central e litoral Sul.

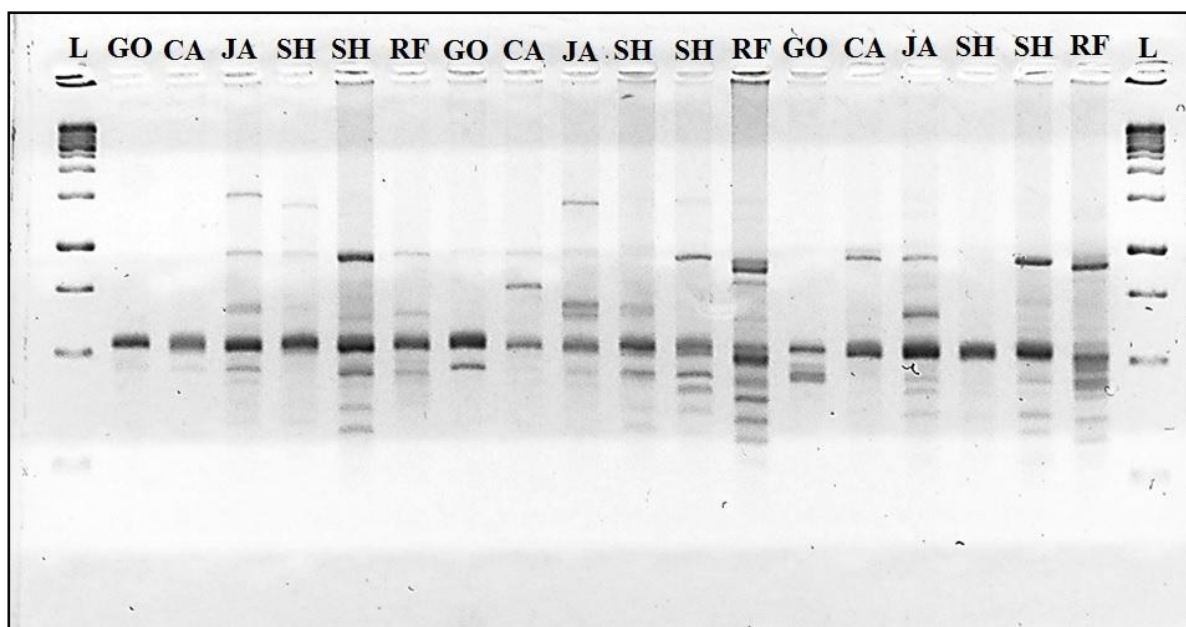
Análises de regressão linear entre os parâmetros populacionais descritos acima e distâncias geográficas foram realizadas por meio do software BioEstat 5.0, (Ayres et al., 2007) com a finalidade de testar a hipótese de isolamento genético-evolutivo por distância. As distâncias geográficas entre os estuários foram

estimadas a partir do contorno do litoral de Pernambuco pelo uso da plataforma Google Earth (Google Inc., 2013). Para todas as análises estatísticas foi adotado um nível de significância de 5%.

## 5. Resultados

### *Diversidade genética*

Nove *primers* selecionados a partir dos dezenove iniciadores *ISSRs* testados *a priori* amplificaram um total de 106 loci, com fragmentos entre 300- 2000pb (pares de bases) como exemplificado na Figura 4. Destes loci, 99 foram polimórficos e 7 monomórficos, indicando um polimorfismo (*P*) de 93,4% e um índice de diversidade genética de Nei (*h*) de 0,2587 para *C. guanhumi* no litoral de Pernambuco (tabela 3). Apesar da variação observada nos valores absolutos de *P* e *h* para a espécie nos diferentes estuários (tabela 3), as diferenças encontradas não foram significativas ( $p= 0.967$  e  $p= 0.927$ , respectivamente).



**Figura 4.** Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,8% do iniciador EMBR01, exemplificando os polimorfismos presentes entre espécimes de *C. guanhumi*. L=

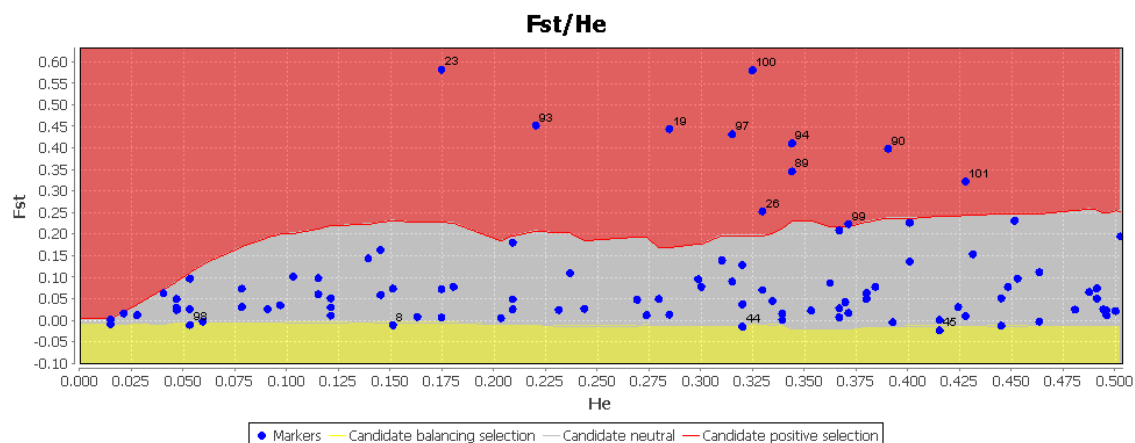
marcador DNA Ladder 1 Kb; CA= Estuário do rio Capibaribe ; GO= Estuário do rio Goiana; JA= Estuário do rio Jaguaribe; SH= Estuário do rio Sirinhaém; RF= Estuário do Rio formoso.

**Tabela 3.** Diversidade genética observada em *C. guanhumi* em cada um dos estuários estudados.  $n$ = total de loci amplificados;  $k$ = total de loci polimórficos;  $P$ = percentual de loci polimórficos;  $h$ = diversidade genética de Nei.

| ESTUÁRIO    | $N$ | $k$ | $P$  | $H$    |
|-------------|-----|-----|------|--------|
| Goiana      | 82  | 72  | 87,8 | 0,2234 |
| Jaguaribe   | 90  | 79  | 90,4 | 0,2218 |
| Capibaribe  | 83  | 75  | 87,8 | 0,2252 |
| Sirinhaém   | 91  | 81  | 89   | 0,2317 |
| Rio Formoso | 101 | 90  | 89,1 | 0,2381 |
| Global      | 106 | 99  | 93,4 | 0,2587 |

#### Teste de neutralidade de seleção para marcadores dominantes

Foram detectados 11 loci candidatos à seleção positiva ou ligados a genes sob seleção, que apresentaram frequências alélicas distribuídas diferencialmente entre as regiões Norte (loci 94, 99 e 101), Central (loci 93,99 e 101) e Sul (loci 23, 26, 89, 90, 97, 100) figura 5, tabela 4).



**Figura 5.** Gráfico mostrando os marcadores com  $F_{ST}$  para seleção positiva identificados através das comparações entre os *C. guanhumi* estudados. A área em vermelho representa os marcadores sobre seleção positiva, a área em cinza aqueles sob seleção neutra e a área em amarelo para seleção balanceadora.

**Tabela 4.** Frequências dos marcadores sob seleção (representadas pela presença da banda no gel de agarose) e  $\Phi_{ST}$  para cada um dos loci *outliers* detectados a partir das populações de *C. guanhumi* estudadas. Os valores mais elevados das frequências alélicas para cada loci são destacadas em negrito.

| Estuário    | Região | 19          | 23          | 26          | 89          | 90          | 93          | 94          | 97         | 99          | 100         | 101         |
|-------------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Goiana      | Norte  | 0           | 0           | 0.41        | 0.03        | 0.12        | 0.03        | <b>0.87</b> | 0.03       | <b>0.73</b> | 0           | <b>0.87</b> |
| Jaguaribe   |        | <b>0.86</b> | 0           | 0.16        | 0.16        | 0.30        | 0.13        | <b>0.80</b> | 0.03       | <b>0.53</b> | 0           | <b>0.73</b> |
| Capibaribe  | Centro | 0           | 0           | 0.23        | 0.16        | 0.23        | <b>0.86</b> | 0           | 0.03       | <b>0.73</b> | 0           | <b>0.83</b> |
| Sirinhaém   |        | 0.03        | 0           | 0.13        | <b>0.66</b> | <b>0.63</b> | 0.16        | 0.06        | <b>0.8</b> | 0.03        | <b>0.86</b> | 0.1         |
| Rio Formoso | Sul    | <b>0.63</b> | <b>0.84</b> | <b>0.84</b> | <b>0.87</b> | <b>0.96</b> | 0           | 0.21        | <b>0.8</b> | 0.12        | <b>0.90</b> | 0.09        |
| $\Phi_{ST}$ |        | 0,67        | 0,84        | 0,33        | 0,5         | 0,43        | 0,6         | 0,61        | 0,67       | 0,4         | 0,8         | 0,54        |

#### *Parâmetros de genética populacional*

A análise de variância molecular global revelou que a maior porcentagem da variação foi encontrada dentro das populações estudadas (80,95%) e apenas 19,05 % foi referente à variação entre as populações, com um índice de fixação da variação genética intraespecífica ( $\Phi_{ST}$ ) igual a 0,19 ,  $p < 0,000$  (Tabela 5). Um valor menor, porém significativo, foi obtido ao simular o  $\Phi_{ST}$  para os loci “neutros” ( $\Phi_{ST} = 0,11$ ) (Anexo V).

**Tabela 5.** Análise da variância molecular para *C. guanhumi* nos estuários estudados.  $\Phi_{ST}$  indica a variação entre os estuários estudados.

| Fonte de variação                                               | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Componentes da variância | Porcentagem da variação |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Entre os estuários                                              | 4                  | 440,763            | 3,14490 Va               | 19,05                   |
| Dentro dos estuários                                            | 149                | 1,991,022          | 13,36257 Vb              | 80,95                   |
| <b>Total</b>                                                    | <b>153</b>         | <b>2,431,786</b>   | <b>1,650,747</b>         | <b>100</b>              |
| <b>Índice de fixação:</b><br>$\Phi_{ST} = 0,19$ ( $p < 0,001$ ) |                    |                    |                          |                         |

A AMOVA assumindo os dois grupos geográficos (litoral Norte-Central/ litoral Sul) não indicou diferenças significativas entre os dois grupos ( $\Phi_{CT} = 0,12$ ;  $p = 0,1$ ) (tabela 6).

**Tabela 6.** Medidas de diferenciação populacional de *C. guanhumi* baseadas na análise de variância molecular para os dois grupos assumidos (litoral Norte/ Litoral Sul) de *C. guanhumi* ao longo do estado de Pernambuco.  $\Phi_{CT}$ : Índice de fixação da variação genética entre grupos/ regiões (Norte-Central/Sul)  $\Phi_{SC}$ : Índice de fixação da variação genética entre os estuários do mesmo grupo  $\Phi_{ST}$ : Índice de fixação da variação genética dentro dos estuários.

| Fonte de variação                 | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Componentes da variância | Porcentagem da variação |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Entre os grupos (Norte/Sul)       | 1                  | 229,510            | 2,12748 Va               | 12,26                   |
| Entre os estuários do mesmo grupo | 3                  | 211,253            | 1,85872 Vb               | 10,71                   |
| Dentro do estuários               | 149                | 1,991,022          | 13,36257 Vc              | 77,02                   |
| <b>Total</b>                      | <b>153</b>         | <b>2,431,786</b>   | <b>1,650,747</b>         | <b>100</b>              |
| <b>Índices de</b>                 |                    |                    |                          |                         |

**fixação:**

$$\Phi_{CT} = 0,12263 \quad (p = 0,1)$$

$$\Phi_{SC} = 0,12211 \quad (p < 0,001)$$

$$\Phi_{ST} = 0,22977 \quad (p < 0,001)$$

A espécie apresentou um alto fluxo gênico ao longo da região estudada ( $N_m = 3,8$ ) e um índice de diferenciação genética ( $G_{ST}$ ) global de 0,11.

Em comparações pareadas dos valores de  $\Phi_{ST}$ ,  $G_{ST}$  e  $N_m$  (Tabelas 7 e 8) entre os espécimes dos diferentes estuários percebe-se um aumento gradual da diferenciação genética de Norte para Sul do litoral.

**Tabela 7.** Valores de  $\Phi_{ST}$  pareados para *C. guanhumi* nos estuários estudados. ( $p < 0,001$ ).

|                    | Goiana  | Jaguaribe | Capibaribe | Sirinhaém | Rio Formoso |
|--------------------|---------|-----------|------------|-----------|-------------|
| <b>Goiana</b>      | -       |           |            |           |             |
| <b>Jaguaribe</b>   | 0,09818 | -         |            |           |             |
| <b>Capibaribe</b>  | 0,09100 | 0,15404   | -          |           |             |
| <b>Sirinhaém</b>   | 0,19772 | 0,16154   | 0,18748    | -         |             |
| <b>Rio Formoso</b> | 0,27359 | 0,23730   | 0,29187    | 0,13646   | -           |

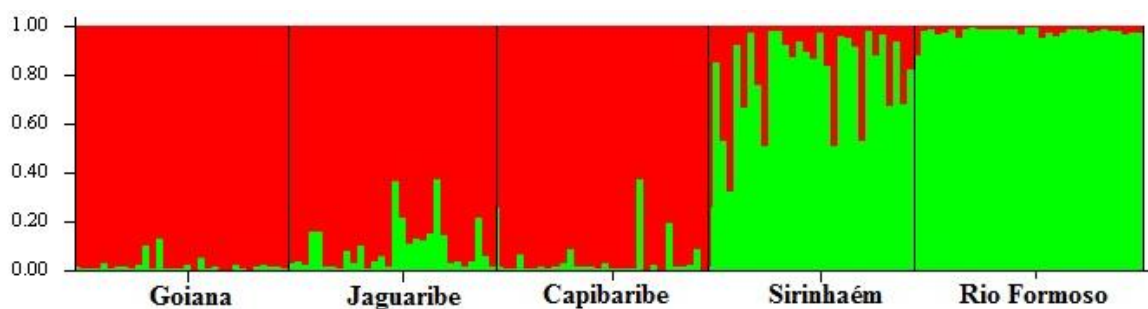
**Tabela 8.** Valores de  $G_{ST}$  (acima da diagonal) e  $N_m$  (abaixo da diagonal) entre as amostras de *C. guanhumi* estudadas.

|                    | Goiana  | Jaguaribe | Capibaribe | Sirinhaém | Rio Formoso |
|--------------------|---------|-----------|------------|-----------|-------------|
| <b>Goiana</b>      | -       | 0,0411    | 0,0456     | 0,0719    | 0,1105      |
| <b>Jaguaribe</b>   | 11,6773 | -         | 0,0668     | 0,062     | 0,1004      |
| <b>Capibaribe</b>  | 10,4752 | 6,9845    | -          | 0,0747    | 0,1187      |
| <b>Sirinhaém</b>   | 6,458   | 7,563     | 6,1909     | -         | 0,059       |
| <b>Rio Formoso</b> | 4,0256  | 4,4782    | 3,7112     | 7,9788    | -           |

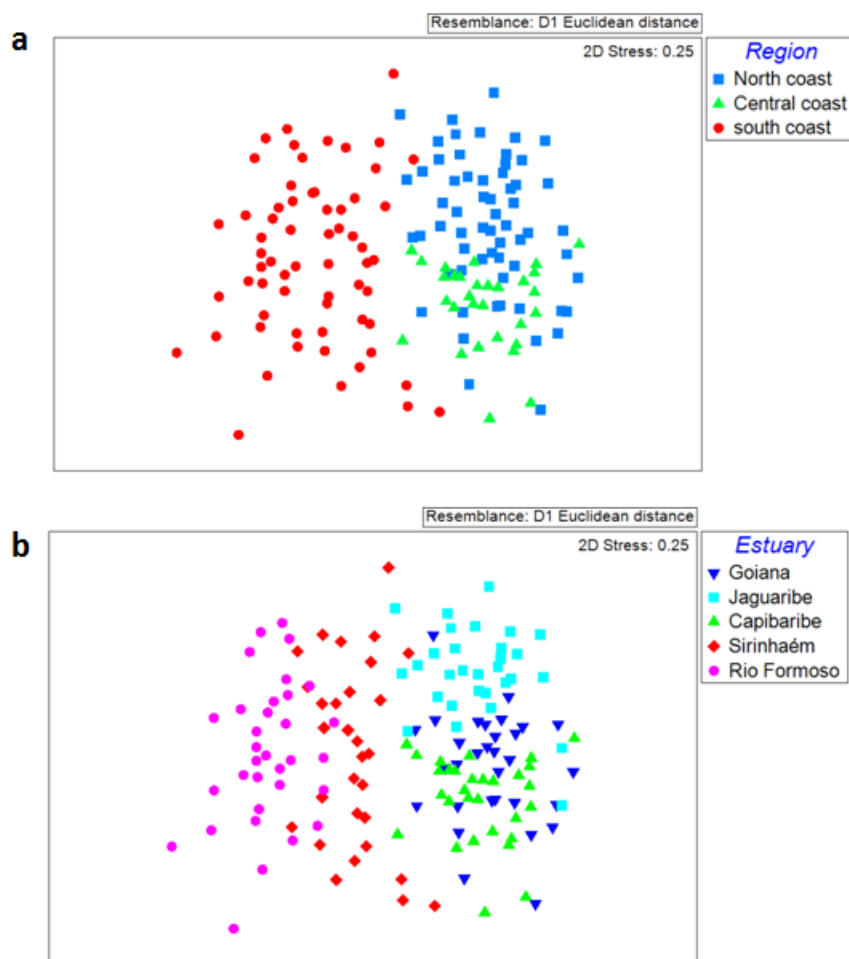
### Análises de agrupamento

O teste de estruturação populacional através da simulação bayesiana revelou K=2 populações genéticas. A primeira população constituída principalmente pelos *C. guanhumi* do litoral norte e central (Goiana, Jaguaribe e Capibaribe) e uma segunda população composta principalmente pelos espécimes procedentes dos estuários do litoral Sul (Sirinhaém e Rio Formoso) (figura 6).

Além disso, é observada uma estruturação populacional clinal onde os estuários mais próximos mostram-se mais geneticamente similares e a proporção da participação dos indivíduos para a composição destes dois clusters aumenta e diminui de Norte para Sul e vice-versa. Este padrão também foi recuperado pela análise de escalonamento multidimensional (figura 7 a e b) (*stress*= 0,25) e pela rede de perfis genéticos (Figura 8). Adicionalmente, esta última análise demonstra que o marcador genético utilizado gerou uma impressão digital genômica (DNA *Fingerprint*) única para cada exemplar estudado.

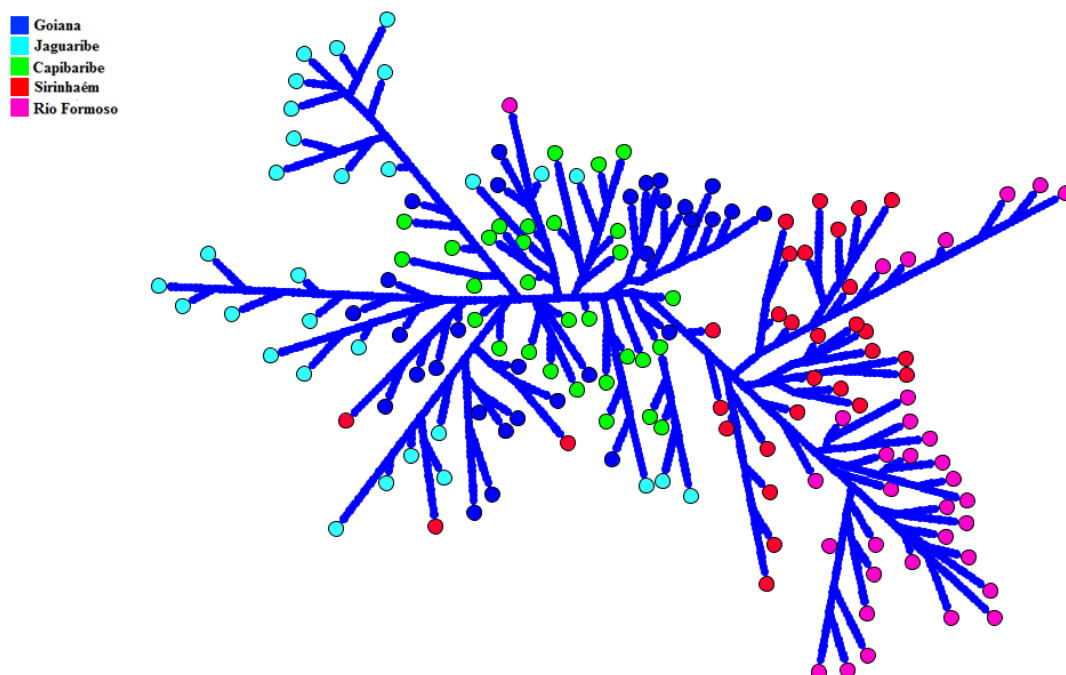


**Figura 6.** Estruturação bayesiana mostrando a existência de duas populações genéticas (K=2) geograficamente estruturadas para *C. guanhumi* ao longo dos estuários estudados. Cada barra vertical representa um dos 154 indivíduos analisados. Grupo 1 (regiões Norte/Central) é representado na cor vermelha, e Grupo 2 (região Sul) é mostrado na cor verde. O comprimento da barra corresponde à proporção do perfil genético de cada indivíduo que é atribuído a cada uma das populações.



**Figura 7.** Análise de escalonamento multidimensional (2 dimensões) com exemplares de *C. guanhumi* dos estuários estudados. a) demonstrando a existência de dois grupos (Litoral Norte-Central/ Litoral Sul) com certa sobreposição, e; b) relação de similaridade entre os *C. guanhumi* de cada um dos estuários. As cores na legenda indicam a região e estuário de origem dos espécimes.

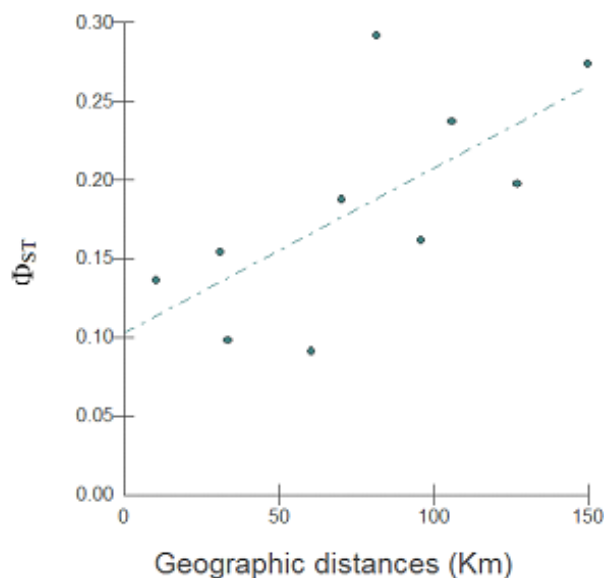




**Figura 8.** Rede de perfis genéticos para *C. guanhumi* ao longo dos estuários estudados. As cores identificam os perfis genéticos observados em cada estuário. As cores na legenda na porção superior esquerda da figura indicam o estuário de origem de cada um dos perfis genéticos.

#### *Isolamento por distância (IBD)*

Análises de regressão linear realizadas entre as médias de  $G_{ST}$  e distância geográfica (Km) ( $p=0,0563$ ;  $R^2= 0,37$ ) não foram significativas. Contudo, parece haver um efeito da distância geográfica (Km) sobre a diferenciação genética ( $\Phi_{ST}$ ) ( $p= 0,02$ ;  $R^2= 0,4629$ ) (figura 9).



**Figura 9.** Regressão linear entre o índice de fixação da variação genética intraespecífica ( $\Phi_{ST}$ ) e distâncias geográficas (Km) para *C. guanhumi* nos estuários estudados

#### *Conjunto de dados “neutro”*

Ao comparar os resultados obtidos ao empregar todos os loci com aqueles aferidos apenas com os loci considerados neutros, observou-se o mesmo padrão geral em ambos os conjuntos de dados, exceto pela redução na diferenciação genética observada entre os estuários e regiões ao retirar os loci sob seleção (Anexos I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII). Além disso, não foram identificados efeitos da distância geográfica sob a variação genética neutra.

## **6. Discussão**

### *Variabilidade genética de Cardisoma guanhumi no litoral de Pernambuco*

A diversidade genética global observada pelos marcadores ISSR em *C. guanhumi* no litoral de Pernambuco foi considerada alta (Tabela 3). Tal patamar é condizente com aquele verificado ao longo da costa brasileira, utilizando um fragmento parcial da região controle e do gene 12S (mtDNA) (Oliveira-Neto et al.

2008). O percentual de loci polimórficos aqui observados em *C. guanhumi* (P= 93,4%) foi notavelmente mais elevado do que aqueles relatados para outras espécies a partir de marcadores moleculares dominantes, como *Ucides cordatus* (Ocypodidae) (ISSR: P=80% - Brito et al. (2011); RAPD: P=72,5% - Oliveira-Neto et al. (2007), *Artemia urmiana* (Artemiidae) no lago Urmia, Irã (ISSR: P=65,8% - Eimanifar & Wink, 2013), *Cancer setosus* (Cancridae) ao longo da costa Chilena (AFLP: P=52% - Gomez-Uchida et al., 2003) e em amostras globais de *Caprella penantis* (Caprellidae) (RAPD: P=85% - Cabezas et al., 2010).

Similarmente, o índice de diversidade genética de Nei para *C. guanhumi* foi considerado alto (tabela 3,  $h = 0,2587$ ) quando comparado à média de diversidade genética observada em 19 espécies de outros crustáceos ( $h = 0,088$  - Ward et al., 1992), além de outras espécies de crustáceos explorados comercialmente [*Aristaeomorpha foliacea*- ISSR:  $h = 0,1$  (Fernández et al., 2011); *Tesseropora atlântica* e *Chthamalus stellatus*- ISSR:  $h = 0,12$  (Pannacciulli et al., 2009); *Crangon crangon*- AFLP:  $h = 0,18$  (Weetman et al., 2007)]. Contudo, inferior aos valores aferidos no caranguejo explorado comercialmente *Ucides cordatus* na costa do Brasil (ISSR:  $h = 0,30$  - Brito et al., 2011).

Apesar das evidências de que *Cardisoma guanhumi* tem experimentado reduções populacionais devido à sobrepesca e perda de habitat (MMA, 2004; Amaral & Jablonski, 2005; Rodríguez-Fourquet & Sabat 2009; Govender et al., 2008), a elevada diversidade genética observada nesta espécie parece refutar a hipótese da direta relação entre rápidas transformações dos ecossistemas, sobrepesca e diminuição do repertório genético, uma vez que, não foram encontradas diferenças significativas entre os índices de diversidade genética da espécie em cada um dos estuários amostrados, apesar dos diferentes níveis de

conservação observados nestas áreas. Esta espécie já foi diagnosticada como “resiliente” perante dados de abundância relacionados às transformações do seu habitat natural (Govender et al., 2008). Assim, os resultados obtidos corroboram o status de resiliente de *C. guanhumi* e atestam para um bom estado de conservação da espécie no litoral de Pernambuco.

#### *Estruturação genética de Cardisoma guanhumi no litoral de Pernambuco.*

O marcador molecular utilizado rejeitou a hipótese nula de panmixia em favor de uma distribuição heterogênea dos genótipos de *C. guanhumi* ao longo da região estudada, sugerindo um padrão de estruturação genética em fina escala geográfica. A estimativa do  $\Phi_{ST}$  global ( $\Phi_{ST} = 0,19$ ; tabela 5) é indicativa de uma alta diferenciação genética, uma vez que os valores de referência para alta diferenciação estão entre 0,15 e 0,25 (Hartl & Clark, 2010). Os valores pareados de  $\Phi_{ST}$  (Tabela 7),  $G_{ST}$  (Tabela 8), e fluxo gênico histórico ( $N_m$ ; Tabela 8) atribuem uma variação genética significativa e gradual entre *C. guanhumi* nos habitats dos estuários do litoral Norte, Central e Sul de Pernambuco, onde os *C. guanhumi* do litoral Central possuem uma estreita relação com aqueles coletados nos estuários do litoral Norte. Este padrão foi recuperado pelas análises de agrupamento aqui desenvolvidas (Figuras 6,7 e 8) e sugerem isolamento populacional por distância (IBD), corroborado pela correlação positiva entre  $\Phi_{ST}$  e distância geográfica (Figura 9) .

Em geral, IBD vem sendo categorizado como o modelo de isolamento menos frequente entre as populações de diversas espécies e é determinado por um aumento na diferenciação genética entre populações com o aumento da distância geográfica e consequente limitação na dispersão, afetando

principalmente a variação genética neutra (Wright 1943; Nosil et al., 2009; Sexton et al. 2014). Contudo o aparente padrão de IBD não é consistente, uma vez que a espécie apresentou um alto fluxo gênico ao longo das regiões estudadas (tabela 8). Além disso, não houve correlação entre  $\Phi_{ST}$  e distância geográfica ao analisar apenas o conjunto de dados neutro, indicando que outras forças além da distância geográfica têm contribuído para a diferenciação genética encontrada.

A seleção natural pode agir em direções opostas nas extremidades de uma área geográfica e gerar um padrão de clina geográfica, que se assemelha ao IBD. A detecção e a distribuição dos loci sob seleção (figura 5, tabela 4), assim como a correlação entre  $\Phi_{ST}$  e distância geográfica para as análises considerando todos os loci (figura 9) sugerem um padrão de Clina geográfica mediada por seleção para *C. guanhumi* ao longo do litoral de Pernambuco (Hellberg et al., 2002). Além disso, os diferentes marcadores sob seleção positiva observados para *C. guanhumi* dos estuários do litoral Norte- Central (marcadores 93, 94, 99 e 101, Tabela 4) e Sul (marcadores 23, 26, 89, 90, 97 e 100, Tabela 4) e a clara estruturação genética Norte-Central/Sul, revelada pela simulação Bayesiana (Figura 6), reforçam a ideia de que as populações podem estar experimentando diferentes pressões seletivas. Estudos têm demonstrado que loci de microssatélite (onde os marcadores ISSRs ancoram) podem se fixar sob seleção positiva (Vasemägi et al., 2005; Pampoulie et al 2006; Hemmer-Hansen et al., 2007), perante pressões seletivas díspares (Case et al., 2005).

Em suma, os dados discutidos nesta seção indicam que as populações de *Cardisoma guanhumi* do litoral de Pernambuco estão estruturadas geneticamente e se comportam com unidades de manejo diferentes, especialmente entre o

Norte-Centro e o Sul do litoral, apresentando um padrão de estruturação em fina escala geográfica, compatível com cenários de clina geográfica mediada por seleção. O padrão aqui observado difere daquele descrito para a espécie a partir de amostras pontuais ao longo da Costa do Brasil, utilizando um fragmento parcial da região controle e do gene 12S (mtDNA), onde não foram observadas diferenças genéticas significativas entre as amostras estudadas (Oliveira-Neto et al., 2008). Em termos globais, a natureza dos marcadores utilizados (DNA nuclear [ISSRs] e mtDNA), as características inerentes aos ambientes estuarinos estudados, além falta de evidências de seleção positiva nas diferentes áreas estudadas previamente, podem sustentar os diferentes padrões de estruturação populacional de *C. guanhumi*.

*Seleção natural e unidades de manejo: perspectivas na exploração/conservação de Cardisoma guanhumi no litoral de Pernambuco*

O conhecimento da estrutura genética de estoques pesqueiros é crucial para desenvolver e implementar estratégias de manejo efetivas que auxiliem na conservação e uso sustentável dos recursos pesqueiros visando a manutenção em longo prazo das espécies-alvo (Laikre et al., 2005; Allendorf et al., 2008). Todavia, estudos genéticos em populações de invertebrados explorados geralmente têm falhado em detectar estruturação genética entre populações aparentemente isoladas ou provenientes de diferentes ambientes (Oliveira-Neto et al., 2008; Oliveira –Neto et al 2007). Estudos têm descoberto regiões do genoma que podem estar influenciadas pela seleção natural e que podem resultar em uma grande diferenciação genética entre estoques pesqueiros, mesmo que a variação genética neutra indique ausência de diferenciação genética (Vasemägi et al., 2005; Pampoulie et al 2006; Hemmer-Hansen et al., 2007). Desta forma, estes

genes adaptativos podem ser utilizados para descrever a estrutura genética de populações em que os marcadores genéticos neutros não têm sido informativos (Allendorf et al., 2008). Tal diferenciação deve ser ponderada, uma vez que populações diferenciadas como resultado da adaptação a diferentes habitats podem mostrar um valor adaptativo reduzido quando cruzadas, uma vez que, os híbridos podem não ser adaptados a nenhum dos ambientes (Frankham et al., 2004).

Para as parcelas das espécies que se diferenciam de outras por apresentarem setores genômicos que estão sob efeito da seleção, se denominam de Unidades de Manejo (Moritz 1994). Nesse sentido, perante os as evidências aqui obtidas, as populações de *C. guanhumi* do litoral Norte-Central (Goiana, Jaguaribe e Capibaribe) e Sul (Sirinhaém e Rio Formoso) de Pernambuco comportam-se como diferentes unidades de manejo (figuras 6, 7 e 8) e devem ser gerenciadas de forma independente. Tal sugestão é sustentada pelos loci candidatos a estarem sob seleção positiva (tabela 4). As evidências sobre a diferenciação significativa entre *C. guanhumi* ao longo do litoral de Pernambuco invocam a necessidade de outros estudos populacionais, genético-evolutivos (e.g., de expressão gênica) e ecológicos a fim de testar as hipóteses aqui defendidas e identificar um cenário mais completo de diferenciação biológica e adaptação local (Waples, 1998; Wilding et al., 2001; Cooke et al., 2012ab), posto que, diferenças morfológicas (Duarte et al., 2008) e reprodutivas (Botelho et al., 2001; Silva e Oshiro, 2002; Shinozaki-Mendes et al. 2013) já foram descritas para a espécie em diferentes localidades. Informações sobre a estrutura genética aliadas a estudos sobre o tamanho efetivo da população, taxa de sobrevivência, idade da primeira maturação e exploração diferencial pela pesca entre as

populações podem auxiliar o desenvolvimento de estratégias para a conservação da espécie em longo prazo, como a proibição da pesca em estuários que exportam colonizadores para as demais áreas (áreas de exclusão de pesca, no-take zones) ou para ações de reintroduções e translocações (Allendorf et al., 2008; Ovenden et al., 2013; Pinsky et al., 2014). Tais estratégias são de suma importância uma vez que a pesca da espécie é totalmente dependente dos estoques naturais, que se exauridos, implicarão em graves impactos ecológicos e socioculturais.

## 7. Conclusões

Os resultados obtidos corroboram o status de resiliente de *C. guanhumi* e atestam para um bom estado de conservação da espécie no litoral de Pernambuco.

A hipótese nula de panmixia foi rejeitada em favor de uma distribuição heterogênea dos genótipos de *C. guanhumi* ao longo da região estudada, evidenciando um padrão de estruturação genética em fina escala geográfica, compatível um padrão de clina geográfica mediada por seleção para a espécie ao longo do litoral de Pernambuco.

As análises de agrupamento e os loci candidatos a estarem sob seleção positiva apontam que as populações de *C. guanhumi* do litoral Norte (Goiana, Jaguaribe e Capibaribe) e Sul (Sirinhaém e Rio Formoso) de Pernambuco comportam-se como diferentes Unidades Evolutivamente disjuntas e devem ser manejadas independentemente. Este resultado sugere a premente necessidade de estudos em *C. guanhumi* e nas áreas de manguezal em Pernambuco a fim de identificar se as diferenças genéticas entre as populações refletem um cenário de diferenciação biológica e adaptação local, uma vez que a pesca da espécie é



totalmente dependente dos estoques naturais, que se exauridos, implicarão em graves impactos ecológicos e socioculturais.

## 8. Referências

- Abbiati M & Maltagliati F (1996) Allozyme evidence of genetic differentiation between populations of *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae) from the western Mediterranean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 76(03), 637-647.
- Abbot P (2001) Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). *J. Insect Sci.* Disponível em: <http://www.insectscience.org/1.8>.
- Abrunhosa FA, do Nascimento Mendes L, de Brito LT, de Oliveira YS, Ogawa C Y, Ogawa M (2000) Cultivo do Caranguejo Terrestre *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825) do Ovo ao Estágio Juvenil. *Revista Científica de Produção Animal*, 2(2).
- Agência Estadual de Meio Ambiente do Estado de Pernambuco (CPRH/PE) (2010) Monitoramento de Bacias Hidrográficas. [http://www.cprh.pe.gov.br/monitoramento/bacias\\_hidrograficas/39709%3B52052%3B1702%3B0%3B0.asp](http://www.cprh.pe.gov.br/monitoramento/bacias_hidrograficas/39709%3B52052%3B1702%3B0%3B0.asp) (02 de fevereiro, 2013)
- Agência Estadual de Meio Ambiente do Estado de Pernambuco (CPRH/PE) (2012) Proteção das Áreas Estuarinas- FIDEM – 1996. [http://www.cprh.pe.gov.br/perfis\\_ambientais/areas\\_estuarinas/39751%3B33012%3B1802%3B0%3B0.asp](http://www.cprh.pe.gov.br/perfis_ambientais/areas_estuarinas/39751%3B33012%3B1802%3B0%3B0.asp) (02 de fevereiro, 2013).
- Allendorf FW (1986) Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo biology*, 5(2), 181-190.
- Allendorf FW, England PR, Luikart G, Ritchie PA, Ryman N (2008) Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(6), 327-337.
- Allendorf FW, Luikart GH, Aitken SN (2007) Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing.
- Almeida FS, Fungaro MHP, Sodr  LMK (2001) RAPD and isozyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. *J. Zool.* v. 253, no. 1, p. 113-120
- Amaral ACZ & Jablonski S (2005) Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. *Megadiversidade*, 1 (1), 43-51.
- Antao T & Beaumont MA (2011) Mcheza: a workbench to detect selection using dominant markers. *Bioinformatics*, 27(12), 1717-1718.
- Ayres M, Ayres-Júnior M, Ayres DL, Santos AA (2007) BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Ong Mamiraua. Belém, PA.
- Barbosa SS, Klanten SO, Puritz JB, Toonen RJ, Byrne M (2013) Very fine-scale population genetic structure of sympatric asterinid sea stars with benthic and pelagic larvae: influence of mating system and dispersal potential. *Biological Journal of the Linnean Society*, 108, 821–833.
- Barboza RSL, Neumann-Leitão S, Barboza MSL, Batista-Leite LDMA (2008) “Fui no mangue catar lixo, pegar caranguejo, conversar com o urubu”: Estudo socioeconômico dos catadores de caranguejo no litoral norte de Pernambuco. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 3(2), 117-134.

- Barletta M & Costa M F (2009) Living and non-living resources exploitation in a tropical semi-arid estuary. *Journal of Coastal Research*, 371-375.
- Bandelt, HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Benevides EA, Vallinoto MNS, Fetter Filho AFH, de Souza JRB, Silva-Oliveira G, Freitas MO, FerreiraBP, Hostim-Silva M, Bertoni A.A, Blanchardi F, Torres R A (2014). When physical oceanography meets population genetics: The case study of the genetic/evolutionary discontinuity in the endangered goliath grouper (*Epinephelus itajara*; Perciformes: Epinephelidae) with comments on the conservation of the species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 255-266.
- Bijlsma R, Westerhof MDD, Roekx LP, Pen I (2010) Dynamics of genetic rescue in inbred *Drosophila melanogaster* populations. *Conservation Genetics*, 11(2), 449-462.
- Bilton DT, Paula J, Bishop JDD (2002) Dispersal, genetic differentiation and speciation in estuarine organisms. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55(6), 937-952.
- Bolch CJ, Blackburn SI, Hallegraeff GM, Vaillancourt RE (1999) Genetic variation among strains of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Journal of phycology*, 35(2), 356-367.
- Boles BR, Thoendel M, Singh PK (2004) Self-generated diversity produces insurance effects in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 16630–16635.
- Bornet B, Branchard M, (2001) Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers; reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16, 139– 146.
- Botelho ERO, Santos MF, Souza JRB (2001) Aspectos populacionais do guaiaum, *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825, do estuário do Rio Una (Pernambuco Brasil). *Boletim Técnico Científico, CEPENE*, 9(1), 123-146.
- Bouzat JL, Johnson JA, Toepfer JE, Simpson SA, Esker TL, Westemeier RL (2009) Beyond the beneficial effects of translocations as an effective tool for the genetic restoration of isolated populations. *Conservation Genetics*, 10(1), 191-201.
- Bristow GA & Vadas SRL (1991) Genetic variability in bloodworm (*Glycera dibranchiata*) populations in the Gulf of Maine. *Marine Biology*, 109(2), 311-319.
- Britto FB, Mendes DSF, Ogawa M, Cintra IHA, Diniz FM (2011) Single primer-based DNA amplification as a suitable and low-cost tool for assessing genetic diversity in mangrove crabs. *Genetics and molecular research* 10 (4): 4084-4092.
- Brooker AL, Benzie JAH, Blair D, Versini JJ (2000) Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers. *Marine Biology*, 136(1), 149-157.
- Cabezas MP, Guerra-García JM, Baeza-Rojano E, Redondo-Gómez S, Figueroa M E, Luque T, García-Gómez, J C (2010) Exploring molecular variation in the cosmopolitan *Caprella penantis* (Crustacea: Amphipoda): results from RAPD analysis. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90(03), 617-622.
- Calendini F & Martin JF (2005) PaupUP v1. 0.3. 1 A free graphical frontend for Paup\* Dos software. URL: <http://www.agro-montpellier.fr/sppe/Recherche/JFM/PaupUp/main>.

- Case RAJ, Hutchinson WF, Hauser L, Van Oosterhout C, Carvalho GR (2005) Macro-and micro-geographic variation in pantophysin (Pan I) allele frequencies in NE Atlantic cod *Gadus morhua*. Marine Ecology Progress Series, 301, 267-278.
- Casu M, Casu D, Lai T, Cossu P, Curini-Galletti M (2008) A molecular tool for genetic surveys in the red coral (*Corallium rubrum*): An Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs) perspective. Biochemical Systematics and Ecology, 36(2), 77-83.
- Casu M, Maltagliati F, Cossu P, Lai T, Curini Galletti M, Castelli A, Commito JA (2005) Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve (*Gemma gemma*) from Maine and Virginia (USA), as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat markers. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 325(1), 46-54.
- CEPENE (2001) Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste. Boletim Estatístico da Pesca Marítima e Estuarina do Nordeste do Brasil. Disponível em: <http://www4.icmbio.gov.br/cepene/>
- CEPENE (2002) Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste. Boletim Estatístico da Pesca Marítima e Estuarina do Nordeste do Brasil. Disponível em: <http://www4.icmbio.gov.br/cepene/>
- CEPENE (2003) Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste. Boletim Estatístico da Pesca Marítima e Estuarina do Nordeste do Brasil. Disponível em: <http://www4.icmbio.gov.br/cepene/>
- CEPENE (2004) Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste. Boletim Estatístico da Pesca Marítima e Estuarina do Nordeste do Brasil. Disponível em: <http://www4.icmbio.gov.br/cepene/>
- CEPENE (2005) Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste. Boletim Estatístico da Pesca Marítima e Estuarina do Nordeste do Brasil. Disponível em: <http://www4.icmbio.gov.br/cepene/>
- CEPENE (2006) Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste. Boletim Estatístico da Pesca Marítima e Estuarina do Nordeste do Brasil. Disponível em: <http://www4.icmbio.gov.br/cepene/>
- Chatterjee SN & Mohandas TP (2003) Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori* L. Genome 46, 438– 447.
- Clarke KR, Gorley RN (2006) Primer v6: user manual/tutorial. PRIMER-E, Plymouth.
- Conover DO, Clarke LM, Munch SB, Wagner GN (2006) Spatial and temporal scales of adaptive divergence in marine fishes and the implications for conservation. Journal of Fish Biology 69, 21–47.
- Cooke GM, Chao NL, Beheregaray LB (2012a) Natural selection in the water: freshwater invasion and adaptation by water colour in the Amazonian pufferfish. Journal of Evolutionary Biology, 25(7), 1305-1320.
- Cooke GM, ChaoNL, Beheregaray LB (2012b) Divergent natural selection with gene flow along major environmental gradients in Amazonia: insights from genome scans, population genetics and phylogeography of the characin fish *Triportheus albus*. Mol. Ecol. 21:2410– 2427.
- Costlow Jr JD, Bookhout CG (1968a) The complete larval development of the land-crab, *Cardisoma guanhumi* Latreille in the laboratory (Brachyura, Gecarcinidae). Crustaceana. Supplement, 259-270.
- Costlow Jr JD, Bookhout CG (1968b) The Effect of Environmental Factors on Development of the Land-Grab, *Cardisoma guanhumi* Latreille. American Zoologist, 8(3), 399-410.

- Cowen RK, Paris CB, Srinivasan A (2006) Scaling of connectivity in marine populations. *Science* 311, 522–527.
- Cronin TW (1982) Estuarine retention of larvae of crab *Rhithropanopeus harrisi*. *Estuar Coast Shelf Sci*, 15 (2), 207-220.
- De Aranzamendi MC, Sahade R, Tatián M, Chiappero MB (2008) Genetic differentiation between morphotypes in the Antarctic limpet *Nacella concinna* as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *Marine Biology*, 154(5), 875-885.
- De Croos MDST & Pálsson S (2012) Population biology and genetic diversity of two adjacent shrimp (*Parapenaeopsis coromandolica*) populations exploited under different fishing pressures in the coastal waters of Sri Lanka. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(04), 819-829.
- DiBacco C, Levin LA (2000) Development and application of elemental fingerprinting to track the dispersal of marine invertebrate larvae. *Limnol Oceanogr* 45:871–880.
- Dick CW (2008) New interpretations of fine-scale spatial genetic structure. *Molecular ecology*, 17(8), 1873-1874.
- Donrung P, Tunkijjanukij S, Jarayabhand P, Poompuang S (2011) Spatial genetic structure of the surf clam *Paphia undulata* in Thailand waters. *Zoological Studies*, 50(2), 211-219.
- Dudley SA & File AL (2007) Kin recognition in an annual plant. *Biol. Lett.*, 3, 435–438.
- Duarte MS, Maia-lima FA, Molina WF (2008) Interpopulational morphological analyses and fluctuating asymmetry in the brackish crab *Cardisoma guanhumi* Latreille (Decapoda, Gecarcinidae), on the Brazilian Northeast coastline. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3(3), 294-303.
- Edmands S (2007) Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology*, 16(3), 463-475.
- Eimanifar A & Wink M (2013) Fine-scale population genetic structure in *Artemia urmiana* (Günther, 1890) based on mtDNA sequences and ISSR genomic fingerprinting. *Organisms Diversity & Evolution*, 1-13.
- Excoffier L, Smouse P and Quattro J. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131,479-491
- Excoffier L & Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567-1587.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 574-578.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
- Fernández MV, Maltagliati F, Pannacciulli FG, Roldán MI (2011) Analysis of genetic variability in *Aristaeomorpha foliacea* (crustacea, aristeidae) using DNA-ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) markers. *Comptes Rendus biologies* 334: 705-712.

- Ferreira BP & Maida M (2006) Monitoramento dos recifes de coral do Brasil: situação atual e perspectivas. MMA/SBF.
- Ferreira EM, Mourão JS, Rocha PD, Nascimento DM, Bezerra DMMSQ (2009) Folk classification of the crabs and swimming crabs (Crustacea –Brachyura) of the Mamanguape river estuary, Northeastern – Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 5:22.
- Firmo AM, Tognella MM, Silva SR, Barboza RR, Alves RR (2012) Capture and commercialization of blue land crabs. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 8(1), 12.
- Forsee RA & Albrecht M (2012) Population estimation and site fidelity of the land crab *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Brachyura: Gecarcinidae) on Vieques Island, Puerto Rico. *Journal of Crustacean Biology*, 32(3), 435-442.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2004) *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto, SP: SBG (Sociedade Brasileira de Genética), 262p.
- Fuller RA, McDonald-Madden E, Wilson KA, Carwardine J, Grantham HS, Watson JE, Possingham HP(2010) Replacing underperforming protected areas achieves better conservation outcomes. *Nature*, 466(7304), 365-367.
- Galli OB, Fujimoto RY, Abrunhosa FA (2012) Acute toxicity of sodium metabisulphite in larvae and post-Larvae of the land crab, *Cardisoma guanhumi*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 89(2), 274-280.
- Gamfeldtn L & Kallstrom B (2007) Increasing intraspecific diversity increases predictability in population survival in the face of perturbations. *Oikos*, 116, 700–705.
- Gifford CA (1962) Some observations on the general biology of the land crab, *Cardisoma guanhumi* (Latreille), in south Florida. *Biological Bulletin* 123 (1) 207-223.
- Gharrett AJ, Smoker WW, Reisenbichler RR, Taylor SG (1999) Outbreeding depression in hybrids between odd-and even-broodyear pink salmon. *Aquaculture*, 173(1), 117-129.
- Gomez-Uchida D, Weetman D, Hauser L, Galleguillos R, Retamal M (2003) Allozyme and AFLP analyses of genetic population structure in the hairy edible crab *Cancer setosus* from the Chilean coast. *Journal of Crustacean Biology*, 23(2), 486-494.
- Google Inc. (2013) Google Earth. Mountain View, CA
- Gopurenko D & Hughes J M (2002) Regional patterns of genetic structure among Australian populations of the mud crab, *Scylla serrata* (Crustacea: Decapoda): evidence from mitochondrial DNA. *Marine and Freshwater Research*, 53(5), 849-857.
- Govender Y, Sabat AM, Cuevas E (2008) Effects of land-use/land-cover changes on land crab, *Cardisoma guanhumi*, abundance in Puerto Rico. *Journal of Tropical Ecology*, 24(04), 417-423.
- Grant WS, Merkouris SE, Kruse GH, Seeb LW (2011) Low allozyme heterozygosity in North Pacific and Bering Sea populations of red king crab (*Paralithodes camtschaticus*): adaptive specialization, population bottleneck, or metapopulation structure?. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 68(3), 499-506.

- Green PT, O'Dowd DJ, Lake PS (2008) Recruitment dynamics in a rainforest seedling community: context-independent impact of a keystone consumer. *Oecologia*, 156(2), 373-385.
- Guimarães AS, Travassos P, Souza Filho PWM E, Gonçalves FD, Costa F (2010) Impact of aquaculture on mangrove areas in the northern Pernambuco Coast (Brazil) using remote sensing and geographic information system. *Aquaculture Research*, 41(6), 828-838.
- Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J, Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoret. Applied Genet.* 89, 998–1006.
- Haig SM, Mace TR, Mullins D (2003) Parentage and relatedness in polyandrous comb-crested jacanas using ISSR. *J. Heredity* 94, 302– 309.
- Hartl DL, Clark AG (2010) *Princípios de genética de populações*. 4.ed. São Paulo: Artmed. 659p.
- Hassan M, Harmelin-Vivien M, Bonhomme F (2003) Lessepsian invasion without bottleneck: example of two rabbitfish species (*Siganus rivulatus* and *Siganus luridus*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 291, 219–232.
- Hateley JG, Grant A, Taylor SM, Jones NV (1992) Morphological and other evidence on the degree of genetic differentiation between populations of *Nereis diversicolor*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 72(02), 365-381.
- Hauser L, Adcock G, Smith PJ, Ramirez JHB, Carvalho GR (2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11742–11747.
- Hauser L & Carvalho GR (2008) Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries*, 9(4), 333-362.
- Hedrick PW, Kalinowski S (2000) Inbreeding depression and conservation biology. *Ann Rev Ecol Syst* 31:139–162
- Hedrick PW & Fredrickson R (2010) Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves and Florida panthers. *Conservation Genetics*, 11(2), 615-626.
- Hellberg ME, Burton RS, Neigel JE, Palumbi SR (2002) Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*, 70(Supplement 1), 273-290.
- Hemmer-Hansen J, Nielsen EE, Frydenberg J, Loeschcke V (2007) Adaptive divergence in a high gene flow environment: Hsc70 variation in the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Heredity*, 99(6), 592-600.
- Herreid CF, Gifford CA (1963) The burrow habitat of the land crab, *Cardisoma guanhumi* (Latreille). *Ecology*, 44(4), 773-775.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard J K (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources*, 9(5), 1322-1332.
- Hughes AR, Inouye BD, Johnson MT, Underwood N, Vellend M (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11(6), 609-623.
- Hughes AR & Stachowicz, JJ (2004) Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 8998–9002.
- IBAMA (2003) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. Portaria nº 53 de 30 de setembro de 2003. Disponível em: [www.ibama.gov.br/](http://www.ibama.gov.br/)

- IBAMA (2006) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. Instrução Normativa nº 90 de 02 de fevereiro de 2006. Disponível em: [www.ibama.gov.br/](http://www.ibama.gov.br/)
- Ingvarsson PK (2001) Restoration of genetic variation lost—the genetic rescue hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(2), 62-63.
- Jørgensen HBH, Hansen MM, Bekkevold D, Ruzzante DE, Loeschcke V (2005) Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology* 14, 3219–3234.
- Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol Evol* 17:230–241
- Kostia S, Ruohonen-Letho M, Vainola R, Varvio SL, (2000) Phylogenetic information in inter-SINE and inter-SSR fingerprints of the Arctiodactyla and evolution of the Bov-tA SINE. *Heredity* 84, 37– 45.
- Kuparinen A & Merilä J (2007) Detecting and managing fisheries-induced evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(12), 652-659.
- Laikre L, Palm S, Ryman N (2005) Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 34(2), 111-119.
- Lindquist ES, Carroll CR (2004) Differential seed and seedling predation by crabs: impacts on tropical coastal forest composition. *Oecologia*, 141(4), 661-671.
- Lindquist ES, Kraus KW, Green PT, O'Dow DJ, Sherman PM, & Smith TJ (2009) Land crabs as key drivers in tropical coastal forest recruitment. *Biological Reviews*, 84(2), 203-223.
- Lira L, Wor C, Hazin FHV, Braga-Júnior HAC, Santos JCP (2010) estudo de correntes marinhas por meio do lançamento de cartões de deriva no litoral do estado de Pernambuco, Brasil. *Arq. Ciên. Mar, Fortaleza*, 43(1): 30 - 37
- Lo Brutto S, Maggio T, Arculeo M (2013) Isolation By Distance (IBD) signals in the deep-water rose shrimp *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846)(Decapoda, Penaeidae) in the Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research*, 90, 1-8.
- Luikart G & Cornuet JM (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12(1), 228-237.
- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet, P (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*, 4(12), 981-994.
- Luque C, Legal L, Staudter H, Gers C, Wink M, (2002) ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas* 136, 251– 253.
- Madritch M, Donaldson JR, Lindroth RL (2006) Genetic identity of *Populus tremuloides* litter influences decomposition and nutrient release in a mixed forest stand. *Ecosystems*, 9, 528–537.
- Maltagliati F, Casu M, Lai T, Sareri DI, Casu D, Galletti M C, Cantone G, Castelli A (2005) Taxonomic distinction of *Ophelia barquii* and *O. bicornis* (Annelida: Polychaeta) in the Mediterranean as revealed by ISSR markers and the number of nephridiopores. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85(04), 835-841.
- Maltagliati F, Lai T, Casu M, Valdesalici S, Castelli, A (2006) Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-

- simple sequence repeats (ISSRs). *Biochemical systematics and ecology*, 34(8), 626-634.
- Mandal A, Rao D, Karuppaiah D, Gopalakrishna A, Pozhoth J, Thampi Samraj YC, Doyle R W (2012) Population genetic structure of (*Penaeus monodon*), in relation to monsoon current patterns in Southwest, East and Andaman coastal waters of India. *Gene*, 491(2), 149-157.
- Manrique-Poyato MI, López-León MD, Gómez R, Perfectti F, Camacho JPM (2013) Population Genetic Structure of the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in the South and East of the Iberian Peninsula. *PloS one*, 8(3), e59041.
- Markert JA, Champlin DM, Gutjahr-Gobell R, Grear JS, Kuhn A, McGreevy, TJ, Nacci DE (2010) Population genetic diversity and fitness in multiple environments. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 205.
- Marshall CT, Browman HI (2007) Disentangling the causes of maturation trends in exploited fish populations. *Marine Ecology Progress Series* 335, 249– 251.
- Marta-Almeida M, Dubert J, Peliz A, Queiroga H (2006) Influence of vertical migration pattern on retention of crab larvae in a seasonal upwelling system. *Mar Ecol Prog Ser* 307:1–19.
- Matson CW, Lambert MM, McDonald TJ, Autenrieth RL, Donnelly KC, Islamzadeh A, Politov DI, Bickham JW.(2006). *Evolutionary Toxicology: Population-Level Effects of Chronic Contaminant Exposure on the Marsh Frogs (Rana ridibunda) of Azerbaijan*. *Environ Health Perspect* 114:547–552.
- Mattila HR & Seeley TD (2007) Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science*, 317, 362–364
- Melo GAS (1996) Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. Editora Plêiade, São Paulo, 603pp.
- Miller JM, Poissant J, Hogg JT, Coltman D W (2012) Genomic consequences of genetic rescue in an insular population of bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *Molecular ecology*, 21(7), 1583-1596.
- Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatística da Pesca e aquicultura (2007). Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/>
- Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatística da Pesca e aquicultura (2008, 2009). Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/>
- Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatística da Pesca e aquicultura (2010). Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/>
- Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatística da Pesca e aquicultura (2011). Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/>
- MMA (2004) Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional das Espécies sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração. In: Lista Nacional de Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçados de Extinção. Instrução Normativa nº 5, de 21 de maio de 2004. Ministério do Meio Ambiente. Brasília. Diário Oficial da União nº 102, de 28 de maio de 2003, Seção 1, páginas 136-142.
- Mora C & Sale PF (2011) Ongoing global biodiversity loss and the need to move beyond protected areas: a review of the technical and practical shortcomings of protected areas on land and sea. *Marine Ecology Progress Series*, 434, 251-266.
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic biology*, 51(2), 238-254.
- Moritz C (1994) Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. *Trends Ecol. Evol.* 9:373–375



- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Nelson, M. F., & Anderson, N. O. (2013). How many marker loci are necessary? Analysis of dominant marker data sets using two popular population genetic algorithms. *Ecology and evolution*, 3(10), 3455-3470.
- Nosil P, Funk DJ, Ortiz-Barrientos D (2009) Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology*, 18(3), 375-402.
- Oliveira LPD (1946) Estudos ecológicos dos crustáceos comestíveis Uça e Guaiaimú, *Cardisoma guanhumi* Latreille e *Ucides cordatus* (L). Gecarcinidae, Brachyura. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 44(2), 295-322.
- Oliveira-Neto JF, Boeger WA, Pie MR, Ostrensky A (2007). Genetic structure of populations of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) at local and regional scales. *Hydrobiologia* 583: 69-76.
- Oliveira-Neto JF, Pie MR, Chammas MA, Ostrensky A, Boeger WA (2008). Phylogeography of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) along the Brazilian coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88: 1417-1423.
- Ovenden JR, Peel D, Street R, Courtney AJ, Hoyle SD, Peel SL, Podlich H (2007) The genetic effective and adult census size of an Australian population of *tiger prawns* (*Penaeus esculentus*). *Molecular Ecology*, 16(1), 127-138.
- Ovenden JR, Berry O, Welch, DJ, Buckworth, RC, Dichmont CM (2013) Ocean's eleven: a critical evaluation of the role of population, evolutionary and molecular genetics in the management of wild fisheries. *Fish and Fisheries*.
- Palero F, Abello P, Macpherson E, Beaumont M, Pascual, M (2011) Effect of oceanographic barriers and overfishing on the population genetic structure of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 104(2), 407-418.
- Palsbøll PJ, Berube M, Allendorf FW (2007) Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(1), 11-16.
- Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological applications*, 13(sp1), 146-158.
- Pampoulie C, Ruzzante DE, Chosson V, Jörundsdóttir TD, Taylor L, Thorsteinsson V, Marteinsdóttir G (2006) The genetic structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) around Iceland: insight from microsatellites, the Pan I locus, and tagging experiments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63(12), 2660-2674.
- Pannacciulli FG, Manetti G, Maltagliati F (2009) Genetic diversity in two barnacle species, *Chthamalus stellatus* and *Tessieropora atlantica* (Crustacea, Cirripedia), with different larval dispersal modes in the archipelago of the Azores. *Mar Biol* 156:2441–2450
- Pearman PB & Garner TWJ (2005) Susceptibility of Italian agile frog populations to an emerging strain of Ranavirus parallels population genetic diversity. *Ecol. Lett.*, 8, 401–408.
- Peacock L, Hunter T, Turner H, Brain P (2001) Does host genotype diversity affect the distribution of insect and disease damage in willow cropping systems? *J. Appl. Ecol.*, 38, 1070– 1081.
- Pierce BA (2011) *Genética: um enfoque conceitual*. 3 ed, Guanabara Koogan, 774 p.

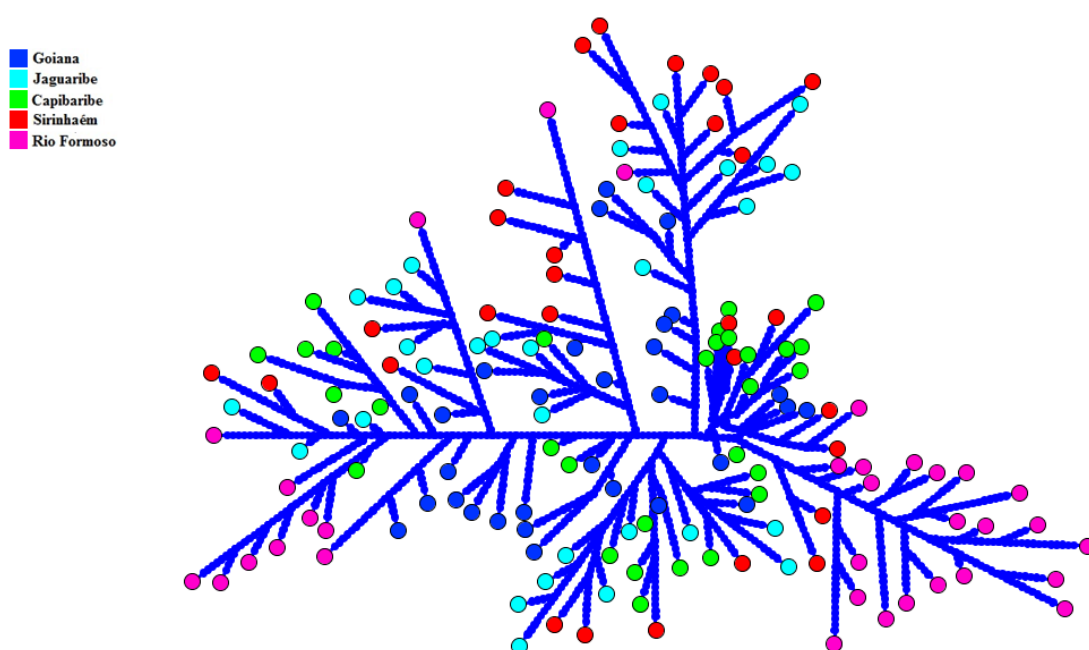
- Pierce J, Tan G, Gaffney P (2000) Delaware Bay and Chesapeake Bay populations of the horseshoe crab *Limulus polyphemus* are genetically distinct. *Estuaries*, 23, 690–698.
- Pinder AW & Smits AW (1993) The burrow microhabitat of the land crab *Cardisoma guanhumi*: respiratory/ionic conditions and physiological responses of crabs to hypercapnia. *Physiological Zoology* 66: 216- 236.
- Pinsky ML & Palumbi, SR (2014) Meta analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. *Molecular ecology*, 23(1), 29-39.
- Pritchard JK, Wen W, Falush D (2003) Documentation for STRUCTURE software: version 2.
- Pujolar JM, Schiavina M, Di Franco A, Melià P, Guidetti P, Gatto M, Zane L. (2013) Understanding the effectiveness of marine protected areas using genetic connectivity patterns and Lagrangian simulations. *Diversity and Distributions*, 19(12), 1531-1542.
- Queiroga H, Cruz T, dos Santos A, Dubert J, Gonzalez-Gordillo JI, Paula J, Peliz A, Santos AMP (2007) Oceanographic and behavioural processes affecting invertebrate larval dispersal and supply in the western Iberia upwelling ecosystem. *Prog Oceanogr* 74:174–191.
- Reed DH & Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv. Biol.*, 17(1), 230-237.
- Robainas-Barcia A & García-Machado E (2012) Genetic diversity and demographic variation in *Farfantepenaeus notialis* (Pérez-Farfante, 1969) from southern Cuban platforms. *Rev. Invest. Mar*, 32(1), 74-84.
- Rodríguez-Fourquet C, Sabat AM (2009) Effect of harvesting, vegetation structure and composition on the abundance and demography of the land crab *Cardisoma guanhumi* in Puerto Rico. *Wetlands Ecology and Management*, 17(6), 627-640.
- Ruzzante DE, Mariani S, Bekkevold D (2006) Biocomplexity in a highly migratory pelagic marine fish, Atlantic herring. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 273, 1459–1464.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sankarankutty C, Oliveira JE, Cunha KMF, Silva ACC, Barroca EVG (1995) Further observations on Zooplankton of the Potengi Estuary (Natal, Rio Grande do Norte, Brazil) with special reference to the larvae of Brachyura (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de Zoologia*, 12(2), 273-301.
- Schmidt PS & Rand DM (2001) Adaptive maintenance of genetic polymorphism in an intertidal barnacle: habitat and life stage specific survivorship of mpi genotypes. *Evolution*, 55(7), 1336-1344.
- Schnabel KE, Hogg ID, Chapman MA (2000) Population genetic structures of two New Zealand corophiid amphipods and the presence of morphologically cryptic species: implications for the conservation of diversity. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 34(4), 637-644.
- Schulz HK, Smietana P, Schulz R (2004). Assessment of DNA variations of the Noble Crayfish (*Astacus astacus* L.) in Germany and Poland using Inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Bull. Fr. Pêche Piscic* 372- 373- 387-399.
- Schwartz MK, Luikart G, Waples RS (2007) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(1), 25-33.

- Schweitzer JA, Bailey JK, Hart SC, Whitham TG (2005) Nonadditive effects of mixing cottonwood genotypes on litter decomposition and nutrient dynamics. *Ecology*, 86, 2834–2840.
- Sexton JP, Hangartner SB, Hoffmann AA (2014) Genetic isolation by environment or distance: which pattern of gene flow is most common?. *Evolution*, 68(1), 1-15.
- Shimasaki L, Kitagawa K, Hernandez M, Blumstein DT (2012) Are blue land crabs (*Cardisoma guanhumi*) attracted to falling fruit?. *acta ethologica*, 15(1), 159-164.
- Shinozaki-Mendes RA, Silva JRF, Santander-Neto J, Hazin FHV(2013) Reproductive biology of the land crab *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) in north-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93, pp 761-768.
- Shiozawa DK, Kudo J, Evans RP, Woodward SR, Williams R N (1992) DNA Extraction from preserved trout tissue. *Great Basin Nat.* v. 52, p. 29-34.
- Silva-Falcão EC, Severi W, Rocha AAD (2007) Dinâmica espacial e temporal de zoeas de Brachyura (Crustacea, Decapoda) no estuário do Rio Jaguaribe, Itamaracá, Pernambuco, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 97(4), 434-440.
- Silva EP (2009) Genética marinha. pp. 49-67. In: *Biologia marinha*. Pereira RC; Soares-Gomes A. 2. Ed. Rio de Janeiro: Interciência.
- Silva R, Oshiro LMY (2002) Aspectos da reprodução do caranguejo guaiamum, *Cardisoma guanhumi* Latreille (Crustacea, Decapoda, Gecarcinidae) da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, (1): 71-78.
- Smouse PE, Peakall R, Gonzales E (2008) A heterogeneity test for fine-scale genetic structure. *Molecular Ecology*, 17(14), 3389-3400.
- Snustad DP, Simmons MJ (2010) *Fundamentos de Genética*. 4 ed, Guanabara Koogan, 903 p.
- STATSOFT, INC (2004) Programa computacional Statistica 7.0. E.A.U.
- Swofford DL (2000) PAUP - Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods) V.4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tallmon DA, Luikart G, Waples RS (2004) The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(9), 489-496
- Telles MPC, Monteiro MSR, Rodrigues FM, Soares TN, Resende LV, Amaral AG, Marra PR (2001) Marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a estabilidade da divergência estimada. *Ciência Animal Brasileira* 2(2): 87-95.
- Treml EA, Halpin PN, Urban DL, Pratson LF (2008) Modeling population connectivity by ocean currents, a graph-theoretic approach for marine conservation. *Landscape Ecology* 23, 19–36.
- Tukey JW (1958) Bias and confidence in not quite large samples. *Annals of Mathematical Statistics*, 29(2), 614.
- Unidade Executora Estadual do Prodetur – UEE/PE (2011) Área de Proteção Ambiental de Guadalupe: 6ª Etapa, Zoneamento. Documento síntese. [http://www.cprh.pe.gov.br/unidades\\_conservacao/Uso\\_Sustentavel/APA\\_Guadalupe/40042%3B40643%3B223901%3B0%3B0.asp](http://www.cprh.pe.gov.br/unidades_conservacao/Uso_Sustentavel/APA_Guadalupe/40042%3B40643%3B223901%3B0%3B0.asp). (02 de fevereiro, 2013)
- Ungherese G, Mengoni A, Somigli S, Baroni D, Focardi S, Ugolini A (2010) Relationship between heavy metals pollution and genetic diversity in Mediterranean populations of the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda). *Environmental pollution* 158: 1638-1643.

- Vasemägi A, Nilsson J, Primmer CR (2005) Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Biology and Evolution*, 22(4), 1067-1076.
- Wang IA, Gilk SE, Smoker WW, Gharrett A J(2007) Outbreeding effect on embryo development in hybrids of allopatric pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) populations, a potential consequence of stock translocation. *Aquaculture*, 272, S152-S160.
- Waples RS (1998) Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*, 89(5), 438-450.
- Waples RS & Yokota M (2007) Temporal estimates of effective population size in species with overlapping generations. *Genetics* 175, 219–233.
- Ward RD (2000) Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia*, 420(1), 191-201.
- Ward RD, Skibinski DO, Woodward M (1992) Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. In *Evolutionary biology* (pp. 73-159). Springer US
- Weber LI & Levy JA (2000) Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. In *Marine Genetics* (pp. 203-210). Springer Netherlands.
- Weeks R, Russ GR, Alcala AC, White AT(2010) Effectiveness of marine protected areas in the Philippines for biodiversity conservation. *Conservation Biology*, 24(2), 531-540.
- Weetman D, Ruggiero A, Mariani S, Shaw PW, Lawler AR, Hauser L (2007) Hierarchical population genetic structure in the commercially exploited shrimp *Crangon crangon* identified by AFLP analysis. *Marine Biology*, 151(2), 565-575.
- Whitham TG, Bailey JK, Schweitzer JA, Shuster SM, Bangert RK, LeRoy, CJ, Lonsdorf EC, Allan GJ, DiFazio SP, Potts BM, Fischer DG, Gehring CA, Lindroth RL, Marks JC, Hart SC, Wimp GM, Wooley SC (2006) A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems. *Nature Reviews Genetics*, 7(7), 510-523.
- Wilding CS, Butlin RK, Grahame J (2001) Differential gene exchange between parapatric morphs of *Littorina saxatilis* detected using AFLP markers. *J. Evol. Biol.* 14, 611–619.
- Wolcott DL & Wolcott TG (1987) Nitrogen limitation in the herbivorous land crab *Cardisoma guanhumi*. *Physiological Zoology* 60: 262- 268.
- Wolfe AD, Xiang Q Y, Kephart SR (1998). Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Mol. Ecol.* 7, 1107–1125.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, 28(2), 114.
- Xu Z, Primavera JH, de la Pena LD, Pettit P, Belak J, Alcivar-Warren A (2001) Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture*, 199(1), 13-40.
- Yang W, de Oliveira AC, Godwin I, Schertz K, Bennetzen JL (1996) Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: Variability in Chinese sorghums. *Crop Sci.* 36, 1669–1676.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999) PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 11-23.

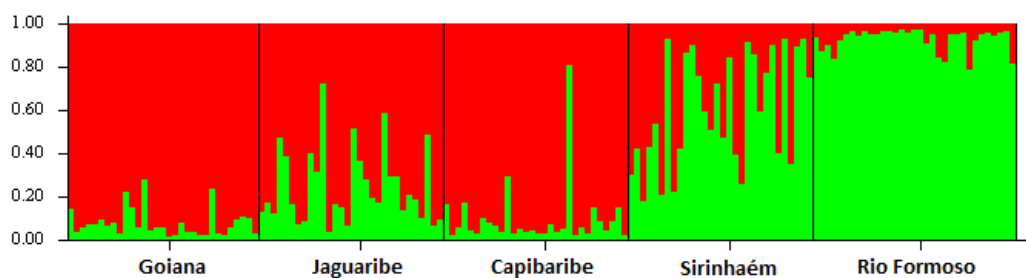
- Yund PO & O'Neil PG (2000) Microgeographic genetic differentiation in a colonial ascidian (*Botryllus schlosseri*) population. *Marine Biology*, 137(4), 583-588.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176–183.

## ANEXO I



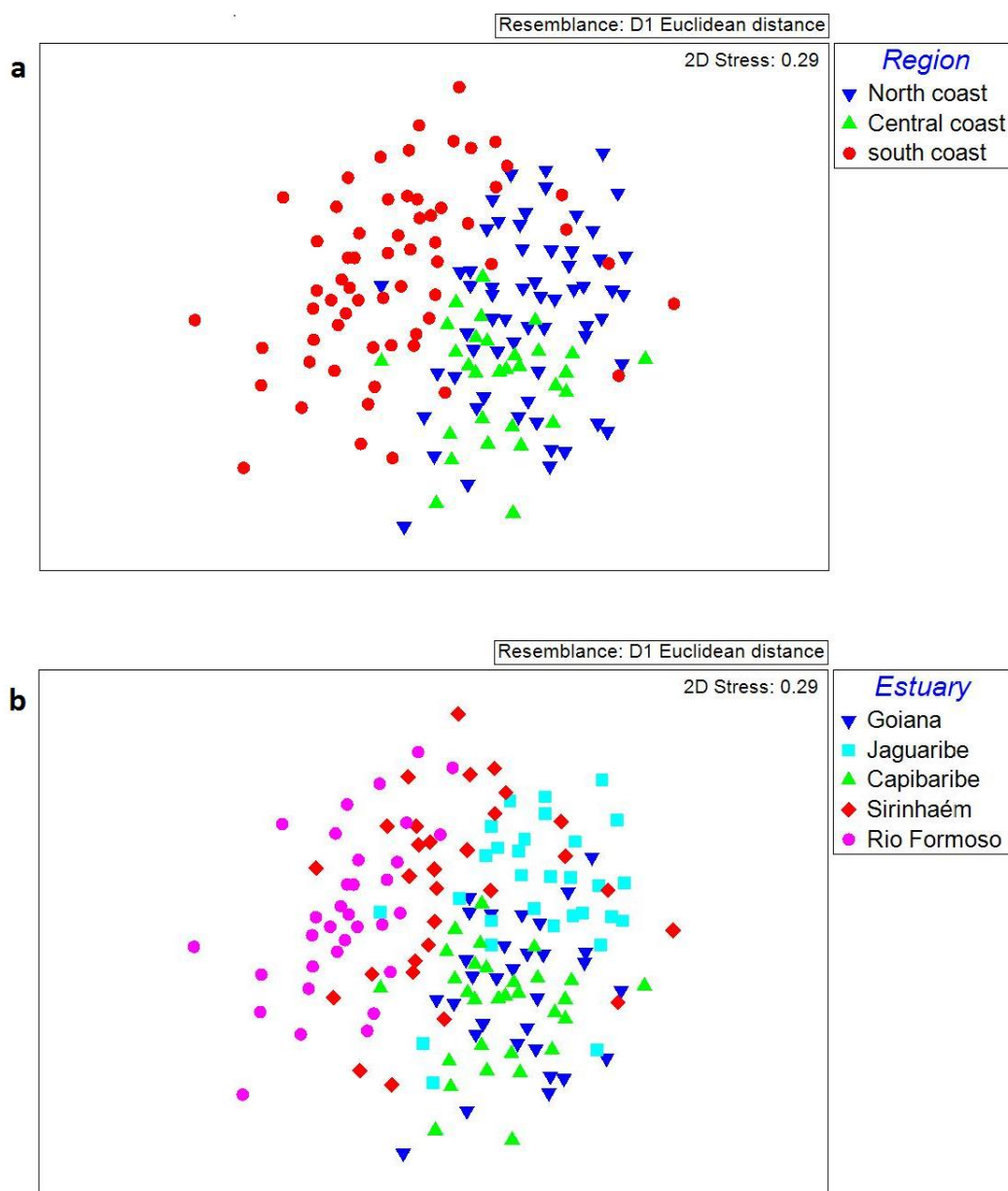
Rede de perfis genéticos para *C. guanhumi* ao longo dos estuários estudados, com base no conjunto de dados neutro. As cores identificam os perfis genéticos observados em cada estuário. As cores na legenda na porção superior esquerda da figura indicam o estuário de origem de cada um dos perfis genéticos.

## ANEXO II



Estruturação bayesiana mostrando a existência de duas populações genéticas ( $K=2$ ) geograficamente estruturadas para *C. guanhumi* ao longo dos estuários estudados com base no conjunto de dados neutro. Cada barra vertical representa um dos 154 indivíduos analisados. Grupo 1 (regiões Norte/Central) é representado na cor vermelha, e Grupo 2 (região Sul) é mostrado na cor verde. O comprimento da barra corresponde à proporção do perfil genético de cada indivíduo que é atribuído a cada uma das populações.

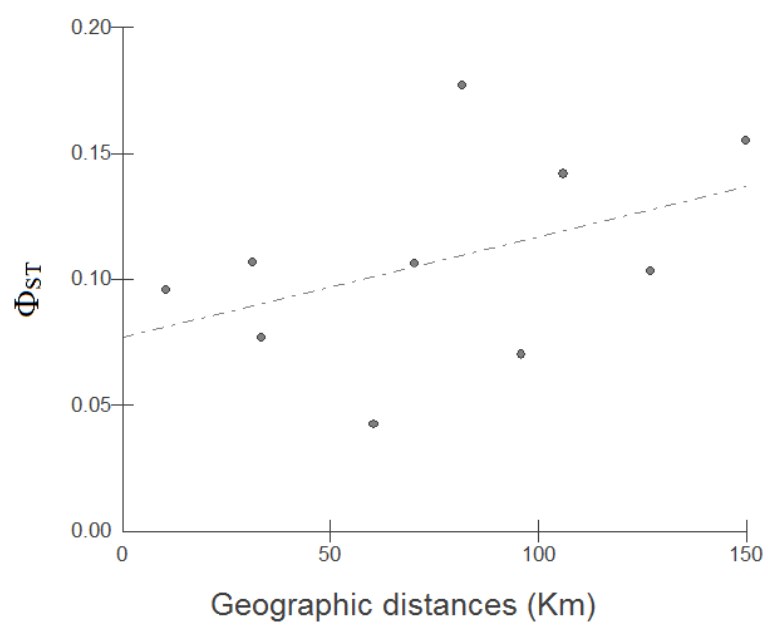
### ANEXO III



Análise de escalonamento multidimensional (2 dimensões) com exemplares de *C. guanhum* dos estuários estudados. a) demonstrando a existência de dois grupos (Litoral Norte-Central/ Litoral Sul) com certa sobreposição, e ; b) relação de similaridade entre os *C. guanhum* de cada um dos estuários. As cores na legenda indicam a região e estuário de origem dos espécimes.



## ANEXO IV



Regressão linear entre o índice de fixação da variação genética intraespecífica ( $\Phi_{ST}$ ) e distâncias geográficas (Km) para *C. guanhumi* nos estuários estudados ( $p=0.2$ ).

## ANEXO V

Análise da variância molecular para *C. guanhumi* nos estuários estudados.  $\Phi_{ST}$  indica a variação entre os estuários estudados.

| Fonte de variação                                               | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Componentes da variância | Porcentagem da variação |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Entre os estuários                                              | 4                  | 235.863            | 1.51885 Va               | 11.07                   |
| Dentro dos estuários                                            | 149                | 1818.117           | 12.20213 Vb              | 88.93                   |
| <b>Total</b>                                                    | 153                | 2053.981           | 13.72098                 | 100                     |
| <b>Índice de fixação:</b><br>$\Phi_{ST} = 0.11$ ( $p < 0,001$ ) |                    |                    |                          |                         |

## ANEXO VI

Valores de  $\Phi_{ST}$  pareados para *C. guanhumi* nos estuários estudados. ( $p < 0,001$ ).

|                    | <b>Goiana</b> | <b>Jaguaribe</b> | <b>Capibaribe</b> | <b>Sirinhaém</b> | <b>Rio Formoso</b> |
|--------------------|---------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| <b>Goiana</b>      | -             |                  |                   |                  |                    |
| <b>Jaguaribe</b>   | 0.07694       | -                |                   |                  |                    |
| <b>Capibaribe</b>  | 0.04256       | 0.10685          | -                 |                  |                    |
| <b>Sirinhaém</b>   | 0.10318       | 0.07012          | 0.10644           | -                |                    |
| <b>Rio Formoso</b> | 0.15511       | 0.1419           | 0.17694           | 0.09589          | -                  |

## ANEXO VII

Medidas de diferenciação populacional de *C. guanhumi* baseadas na análise de variância molecular para os dois grupos assumidos (litoral Norte- Central/ Litoral Sul) para *C. guanhumi* ao longo do estado de Pernambuco.  $\Phi_{CT}$ : Índice de fixação da variação genética entre grupos/ regiões (Norte-Central/Sul)  $\Phi_{SC}$ : Índice de fixação da variação genética entre os estuários do mesmo grupo  $\Phi_{ST}$ : Índice de fixação da variação genética dentro dos estuários.

| Fonte de variação                           | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Componentes da variância | Porcentagem da variação |
|---------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>Entre as regiões (Norte-Central/Sul)</b> | 1                  | 97.883             | 0.69143 Va               | 4.94                    |
| <b>Entre os estuários do mesmo grupo</b>    | 3                  | 137.981            | 1.10084 Vb               | 7.87                    |
| <b>Dentro do estuários</b>                  | 149                | 1818.117           | 12.20213 Vc              | 87.19                   |
| <b>Total</b>                                | 153                | 2053.981           | 13.9944                  | 100                     |
| <b>Índices de fixação:</b>                  |                    |                    |                          |                         |
| $\Phi_{CT}$ :                               | 0.04941            | (p= 0,1)           |                          |                         |
| $\Phi_{SC}$ :                               | 0.08275            | (p< 0,001)         |                          |                         |
| $\Phi_{ST}$ :                               | 0.12807            | (p< 0,001)         |                          |                         |

## ANEXO VIII

Valores de  $G_{ST}$  (acima da diagonal) e  $N_m$  (abaixo da diagonal) entre as amostras de *C. guanhumi* estudadas.

|                    | <b>Goiana</b> | <b>Jaguaribe</b> | <b>Capibaribe</b> | <b>Sirinhaém</b> | <b>Rio Formoso</b> |
|--------------------|---------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| <b>Goiana</b>      | -             | 0.0344           | 0.0324            | 0.0395           | 0.061              |
| <b>Jaguaribe</b>   | 14.0336       | -                | 0.0516            | 0.0314           | 0.0602             |
| <b>Capibaribe</b>  | 14.9407       | 9.1901           | -                 | 0.0481           | 0.0714             |
| <b>Sirinhaém</b>   | 12.1556       | 15.4217          | 9.885             | -                | 0.0447             |
| <b>Rio Formoso</b> | 7.7019        | 7.8059           | 6.4992            | 10.6966          | -                  |
| <b>GST global</b>  | 6.2465        |                  |                   |                  |                    |
| <b>Nm global</b>   | 0.0741        |                  |                   |                  |                    |



## Danielle de Jesus Gama Maia

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5177232534748110> Última atualização do currículo em 27/08/2014

Graduada em ciências biológicas pela Universidade Tiradentes (2012), é mestre em Genética e Evolução pela Universidade Federal de Pernambuco (2014). Tem experiência na área de genética de populações com interesse especial em genética aplicada à conservação, e ecologia de ambientes aquáticos. **(Texto informado pelo autor)**

## Identificação

**Nome** Danielle de Jesus Gama Maia   
**Nome em citações bibliográficas** MAIA, D. J. G.

## Endereço

## Formação acadêmica/titulação

**2012 - 2014** Mestrado em Genética (Conceito CAPES 3).  
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.  
 Título: Variação genética e a conservação do Guaiamum (Cardisoma guanhumi, Decapoda: Gecarcinidae) em estuários do litoral de Pernambuco, Ano de Obtenção: 2014.  
 Orientador:  Rodrigo Augusto Torres.  
 Co-orientador: Mônica Lúcia Adam.  
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.  
 Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética de Populações.  
 Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Animal.  
 Setores de atividade: Pesca e Aqüicultura.

**2008 - 2012** Graduação em ciências Biológicas.  
 Universidade Tiradentes, UNIT, Brasil.  
 Título: Avaliação da estrutura da comunidade de macrófitas aquáticas da Lagoa Azul, litoral sul de Sergipe.  
 Orientador: Wilson treger zydowicz sousa.  
 Bolsista do(a): MEC.

## Formação Complementar

**2011 - 2011** Genética aplicada a conservação de recursos pesq.. (Carga horária: 40h).  
 Universidade Federal de Sergipe.

**2008 - 2008** Extensão universitária em Preservação do meio ambiente como prática cotidiana. (Carga horária: 18h).  
 Universidade Tiradentes, UNIT, Brasil.

**2008 - 2008** Produção de Sabão em Barra e Pasta com óleo de coz. (Carga horária: 4h).  
 Universidade Tiradentes, UNIT, Brasil.

## Atuação Profissional

---

### Universidade Federal de Pernambuco, UFPE,

#### Brasil. Vínculo institucional

|                              |                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>2014 - Atual</b>          | Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Pesquisador, Carga horária: 10                                                                                                                                                       |
| <b>Outras informações</b>    | Laboratório de genômica evolutiva e ambiental- LAGEA. Rotina laboratorial em genética e biologia molecular: extração, amplificação e sequenciamento de DNA genômico, eletroforese em gel de agarose e análise de dados moleculares. |
| <b>Vínculo institucional</b> |                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>2012 - 2014</b>           | Vínculo: Bolsista de mestrado, Enquadramento Funcional: Bolsista de mestrado                                                                                                                                                        |
| <b>Outras informações</b>    | LABORATÓRIO DE GENÔMICA EVOLUTIVA E AMBIENTAL- LAGEA                                                                                                                                                                                |

### Faculdades Integradas de Patos, FIP, Brasil.

#### Vínculo institucional

|                          |                                                                                       |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>2014 - Atual</b>      | Vínculo: Professor convidado, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 15   |
| <b>Atividades</b>        |                                                                                       |
| <b>05/2014 - 05/2014</b> | Ensino, Nutrição clínica, Nível: Especialização Disciplinas ministradas Nutrigenômica |

### Instituto de Tecnologia e Pesquisa, ITP, Brasil.

#### Vínculo institucional

|                              |                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>2010 - 2012</b>           | Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 10                                                                                                                     |
| <b>Outras informações</b>    | LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBM Diagnóstico molecular de parasitas e diversidade genética dos recursos pesqueiros de Sergipe.                                                        |
| <b>Vínculo institucional</b> |                                                                                                                                                                                              |
| <b>2010 - 2011</b>           | Vínculo: estágio, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 10                                                                                                                     |
| <b>Outras informações</b>    | LABORATÓRIO DE BIOLOGIA TROPICAL- LBT Ecologia de ambientes aquáticos - Estuários e Lagoas costeiras                                                                                         |
| <b>Vínculo institucional</b> |                                                                                                                                                                                              |
| <b>2010 - 2011</b>           | Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 10                                                                                                                     |
| <b>Outras informações</b>    | LABORATÓRIO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS- LDIP Coleta, manejo e processamento de dados (SIG) do vetor da esquistossomose, Biomphalaria glabrata.                                    |
| <b>Atividades</b>            |                                                                                                                                                                                              |
| <b>01/2011 - 02/2012</b>     | Pesquisa e desenvolvimento , Laboratório de Biologia molecular, .<br>Linhas de pesquisa<br>Projeto de Pesquisa: Aquicultura, Sanidade e Meio Ambiente no Estado de Sergipe/ Bolsista IC CNPq |

### Universidade Tiradentes, UNIT, Brasil.

#### Vínculo institucional

|                           |                                                                       |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>2010 - 2011</b>        | Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 20 |
| <b>Outras informações</b> | Laboratórios de Biologia e da Saúde Disciplina: Biologia Celular      |

### Prefeitura Municipal de Aracaju, PrefAju, Brasil.

#### Vínculo institucional

|                    |                                                                         |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>2010 - 2011</b> | Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 20 |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------|

## Linhas de pesquisa

1. Projeto de Pesquisa: Aquicultura, Sanidade e Meio Ambiente no Estado de Sergipe/ Bolsista IC CNPq  
Objetivo: Tem como objetivo principal conhecer a biodiversidade de pescados coletados nos locais de produção, desembarque em áreas estuarinas, comunidades ribeirinhas e reservatórios do estado de Sergipe, avaliando a diversidade genética dos peixes e sua relação com aspectos parasitários..  
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia.  
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Biologia Molecular.  
Setores de atividade: Pesca e Aquicultura.

## Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Biologia
2. Molecular. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética.
3. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Ecologia / Subárea: Ecologia de ecossistemas aquáticos.

## Idiomas

**Inglês** Lê Bem, Escreve Pouco.

## Prêmios e títulos

**2012** Ganador en el concurso de posters, III Congresso Internacional de Parasitologia Neotropical.

## Produções

### Produção bibliográfica

### Resumos publicados em anais de congressos

1. ★ **MAIA, D. J. G.** ; ABREU, E. A. B. . Eficácia da tecnologia barcode para estudos filogeográficos com espécies do gênero *Abudefduf* (Peciformes; Pomacentridae). In: XX Encontro Brasileiro de Ictiologia, 2013, Maringá, PR. Resumos do XX Encontro Brasileiro de Ictiologia, 2013.
2. ★ VASCONCELOS, A. C. P. ; MACIEL, D. B. ; **MAIA, D. J. G.** ; ALMEIDA, C. P. ; SILVA, A. H. G. ; JERALDO, V.L.S. ; MELO, C. M. ; MADI, R.R. . Fauna Parasitária e variabilidade genética de *Prochilodus argenteus* (Spix & agassiz, 1829) cultivados no Rio São Francisco, Sergipe, Brasil. In: III Congresso Internacional de Parasitología Neotropical, 2012, Lima, Peru. Abstract book del III Congresso Internacional de Parasitología Neotropical, 2012.
3. ★ **MAIA, D. J. G.** ; MACIEL, D. B. ; LOPES, A. C. M. ; SILVA, A. H. G. ; JERALDO, V.L.S. ; MELO, C. M. ; MADI, R.R. . Fauna Parasitária e variabilidade genética de *Prochilodus argenteus* (Spix & agassiz, 1829) em estação de Alevinagem no Nordeste do Brasil. In: XX Congresso Latinoamericano de Parasitología y XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical, 2011, Bogotá. Biomédica (Bogotá). Bogotá: D.C., Colômbia S.A., 2011. v. 31. p. 334-335.
4. FÉLIX, P.N. ; **MAIA, D. J. G.** ; MACIEL, D. B. ; LOPES, A. C. M. ; MELO, C. M. ; JERALDO, V.L.S. ; MADI, R.R. ; SILVA, A. H. G. . Avaliação da diversidade genética de pescados coletados em Sergipe. In: Sempesq, 2011, Aracaju. Seminários de iniciação científica, 2011.



5. BATISTA, J.D.S. ; **MAIA, D. J. G.** ; LOPES, A. C. M. ; MONTEIRO. L. ; MELO, C. M. ; MADI, R.R . Diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina em área endêmica de Sergipe. In: Sempesq, 2011, Aracaju. Seminários de iniciação científica, 2011.
6. **MAIA, D. J. G.** ; BATISTA, J.D.S. ; LOPES, A. C. M. ; SILVA, A. H. G. ; MELO, C. M. ; JERALDO, V.L.S. ; MADI, R.R . Fauna Parasitária e variabilidade genética de *Prochilodus argenteus* (Spix & agassiz, 1829) em duas pisciculturas do Baixo São Francisco. In: Sempesq, 2011, Aracaju. Seminários de iniciação científica, 2011.
7. MIRANDA, J.V.A ; **MAIA, D. J. G.** ; NASCIMENTO, S.A. ; SOUSA, W.T.Z. . Caracterização ecológica preliminar da comunidade de macrófitas submersas do estuário do Rio Vaza Barris. In: Sempesq, 2011, Aracaju. Seminários de iniciação científica, 2011.
8. ★ **MAIA, D. J. G.** ; MIRANDA, J.V.A ; NASCIMENTO, S.A. ; SOUSA, W.T.Z. . Levantamento preliminar das espécies de mangue do estuário do Rio Vaza Barris. In: Sempesq, 2011, Aracaju. Seminários de iniciação científica, 2011.

## Apresentações de Trabalho

1. ABREU, E. A. B. ; **MAIA, D. J. G.** . Eficácia da tecnologia barcode para estudos filogeográficos com espécies do gênero *Abudefduf* (Peciformes; Pomacentridae). 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
2. MIRANDA, J.V.A ; **MAIA, D. J. G.** ; NASCIMENTO, S.A. ; SOUSA, W.T.Z. . Caracterização ecológica preliminar da comunidade de macrófitas submersas do estuário do Rio Vaza Barris. 2011. (Apresentação de Trabalho/Outra).

## Eventos

---

### Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. XX Encontro Brasileiro de Ictiologia. Eficácia da tecnologia barcode para estudos filogeográficos com espécies do gênero *Abudefduf* (Peciformes; Pomacentridae). 2013. (Encontro).
2. Seminario Genética molecular aplicada a conservação de recursos pesqueiros. 2011. (Seminário).
3. 2ª SemEx-Semana de Extensão da UNIT. 2008. (Seminário).
4. 6 Encontro de Biologia. 2008. (Encontro).

### Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **MAIA, D. J. G.** . Feira Literária Internacional de Pernambuco- FLI PORTO. 2013. .
2. **MAIA, D. J. G.** . Feira Literária Internacional de Pernambuco- FLI PORTO. 2012. .