



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**VARIAÇÃO POPULACIONAL DE *Alitta succinea* (LEUCKART, 1847)
COM BASE NAS PARAGNATAS E MARCADORES MOLECULARES
ISSR, AO LONGO DA COSTA BRASILEIRA**

CRISTIANA SETTE SANTOS CLÍMACO

**RECIFE
2013**

CRISTIANA SETTE SANTOS CLÍMACO

**VARIAÇÃO POPULACIONAL DE *Alitta succinea* (LEUCKART, 1847)
COM BASE NAS PARAGNATAS E MARCADORES MOLECULARES
ISSR, AO LONGO DA COSTA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Botelho de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres

**RECIFE
2013**

CRISTIANA SETTE SANTOS CLÍMACO

VARIAÇÃO POPULACIONAL DE *Alitta succinea* (LEUCKART, 1847) COM BASE NAS PARAGNATAS E MARCADORES MOLECULARES ISSR, AO LONGO DA COSTA BRASILEIRA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ulisses Pinheiro - Membro interno
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Moura Coimbra - Membro externo
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Cinthya Simone Gomes Santos- Membro externo
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. André Esteves- Membro interno (Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Paula Braga- Membro externo (Suplente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

Dedico este trabalho a todos que participaram da minha caminhada rumo ao título de mestre

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela capacitação e presença real em minha vida.

Em segundo lugar agradeço à minha família por ter estado ao meu lado todos os dias, me dando apoio e força nos momentos de estresse, em especial, minha mãe, minha melhor amiga e companheira todos esses anos.

Em especial agradeço ao meu noivo, Henrique Figueiredo, por participar ativamente não só da minha vida pessoal, mas também da minha vida profissional sendo minha fortaleza. Agradeço também à minha sogra Maria Angelina por todo apoio na fase de conclusão deste trabalho, ao meu sogro Vinícius Marcos e à Haneska Figueiredo pela amizade.

Agradeço ao meu orientador José Roberto, por participar da minha vida profissional por tantos anos, sendo mais que um orientador, e sim um amigo. Agradeço também aos integrantes do Laboratório de Comunidades Marinhas (LACMAR) pelos dias de trabalho que compartilhamos, sendo estes, muito mais agradáveis na presença de Danielle Lopes, Kyllderes Lima, Érika Cavalcante, Douglas Marques, Thayanne Lima, Amanda Virgínia, Natália Iunskoski e Janayze Suéllen.

Agradeço ao meu co-orientador, Rodrigo Torres, por ter me acolhido de forma especial em seu laboratório de pesquisa e por ter estado presente nessa minha caminhada em um novo ramo de pesquisa. E agradeço também a todos os demais integrantes do Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental (LAGEA), que me apoiaram e me ensinaram muitas coisas. Abraço para a professora Mônica Adam e para os colegas Emilly Benevides, Filipe Alberto, Débora Mattos, Flávia Andrade, Diego Mab, Caio Falcão, Allan Pierre, Tainá Ottoni, Natália Moraes, Mirella Monteiro, Anderson Rodrigues e em especial para Danielle Maia, por ter me apoiado nos momentos que mais precisei, sendo meu braço direito durante o segundo ano do curso.

Agradecimento especial para todos os pesquisadores envolvidos direta ou indiretamente na obtenção dos exemplares que usei na minha pesquisa. Obrigada, Professor José Souto e sua equipe da Universidade Federal do Pará, Professor Paulo Lana e Verônica da Universidade Federal do Paraná, Professora Cinthya Santos, Maria

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

Fernanda Lima e Patrícia Mazurek da Universidade Federal Fluminense, Professor Francisco Barros, Marcos Krull, Dante Mariano e Lara Raphaele da Universidade Federal da Bahia.

Agradeço aos integrantes dos Laboratórios do Professor Ulisses Pinheiro e Paulo Santos pela ajuda na realização de etapas deste trabalho.

Agradeço a contribuição dada pelos avaliadores deste projeto de pesquisa, Paulo Santos e Carlos Pérez. E agradeço também a todos os professores do Programa de Biologia Animal que ministraram disciplinas que cursei durante esses dois anos, contribuindo para meu conhecimento como profissional.

Agradecimento à CAPES pela concessão de bolsa durante os dois anos de curso, sendo essencial para realização desta pesquisa.

Agradeço ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ambientes Marinhos Tropicais (inctAmbTropic), CNPq/FAPESB pelo financiamento.

Agradeço aos meus colegas que entraram e agora se formam mestres junto a mim, os quais compartilharam comigo, alegrias, angústias e o prazer de conseguir o tão sonhado título.

Agradecimento mais que especial para os biólogos, amigos, irmãos que estão comigo desde 2007. Obrigada Edlley Pessoa, Kézia Santana, Isadora Coelho, Érika Correia, Marx Lima, Edvaldo Vieira, Anselmo Jiro, Antônio Campos, Humberto Medeiros, Thamyrys Souza, Rayane Santos, Gabriel Gazzoni, Cyndy Mary, Vitor Xavier, Vanessa Freire, Ágatha Maria e todos os demais.

Obrigada Glória Freitas, Paulo Henrique Bonifácio, Kamilla Rodrigues, Daniele Maciel, Mariana Holanda, Lucas Campos, Soraia Liz, Luciana Feitosa e Tita pela amizade sincera e fiel.

Em especial agradeço às minhas amigas Sara Lopes, Kássia Oliveira, Maura de Barros e Estefany Thaís pelo apoio e dedicação e principalmente por terem sempre me dado forças e se orgulharem de mim.

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

“A persistência é o menor caminho para o êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

Alitta succinea tem uma distribuição considerada cosmopolita e é comum em habitats marinhos, tropicais e temperados. É provável que seja nativa da ecorregião do Mar do Norte. Atualmente, os Estados Unidos, Austrália, Colômbia e Brasil são os únicos países que consideram *Alitta succinea* como invasora devido aos seus impactos potenciais. Meios de introdução comuns desta espécie incluem invasão através da água de lastro dos navios e também como devido à sua incrustação, em cascos das embarcações, além de também ser resultante da atividade de maricultura. Os objetivos deste estudo foram: avaliar a variação morfológica perante a análise merística das paragnatas de *Alitta succinea* das populações do Pará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e Paraná e também avaliar a diversidade genética dessas populações, perante uso de marcador molecular *ISSR*. Exemplares de *Alitta succinea* foram coletados em cinco pontos do litoral brasileiro. Houve corroboração entre grande parte dos dados obtidos pelas análises merísticas das paragnatas de *Alitta succinea* (Análise de cluster, MDS) e das análises moleculares (Topologias de Neighbor-Joining, Máxima Parcimônia e Estruturação Bayesiana) indicando a divergência entre as populações e a presença de dois grupos geográficos distintos, um composto pela população do Pará, Pernambuco e Bahia e outro composto pela população do Rio de Janeiro e Paraná. O conjunto de dados aqui obtidos sugere a direta associação dos grupos genético-evolutivos com a presença de duas grandes barreiras biogeográficas que afetam o transporte de ovos, larvas ou indivíduos de *A. succinea* no seu processo de dispersão: a Cadeia Submarina de Vitória-Trindade e o fenômeno de Ressurgência de Arraial do Cabo.

Palavras-chave: Nereididae, Genética de Populações, Biogeografia.

ABSTRACT

Alitta succinea has a cosmopolitan distribution and is considered common in marine, tropical and temperate habitats. It is probably native to North Sea ecoregion. Currently, only the United States, Australia, Colombia and Brazil are the countries that consider *Alitta succinea* as invasive due to its potential impacts. The introduction of this species occurs by ships' ballast water, due to its fouling on hulls of boats and also is the result of shellfish culture. The objectives of this study were to assess the morphological diversity through the meristic analysis of paragnaths of *Alitta succinea* populations from Pará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro and Paraná and also assess the genetic diversity of these populations using *ISSR* molecular marker. Specimens of *Alitta succinea* were collected at five points along the Brazilian coast. There was corroboration between largely of the data obtained by the paragnaths meristic analysis of *Alitta succinea* (cluster analysis, MDS) and molecular analyzes (Neighbor-Joining, Maximum Parsimony Topologies and Bayesian Structuring), indicating the divergence between populations and the presence of two geographically distinct groups, one consisting of Pará, Pernambuco and Bahia populations and another composed of the Rio de Janeiro and Paraná populations. The data set obtained here suggests a direct association of genetic-evolutionary groups with the presence of two major biogeographic barriers that affect the transport of eggs, larvae or individuals of *A. succinea* in its dispersion process: Underwater Chain of Vitória and Trindade and the resurgence phenomenon of Arraial do Cabo.

Keywords: Nereididae, Population Genetics, Biogeography.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: *Alitta succinea* (com probóscide evertida, evidenciando-se as paragnatas cônicas nos anéis oral e mandibular) coletada no estuário da Bacia do Pina/ Recife. A) Vista anterior dorsal; B) vista anterior ventral.....20
- Figura 2: Parapódios de *Alitta succinea* coletada no estuário da Bacia do Pina/ Recife. A) 6º parapódio; B) 20º parapódio; C) 45º parapódio evidenciando a lígula notopodial dorsal alongada.....20
- Figura 3: Disposição das paragnatas em áreas determinadas (I, II, III, IV, V, VI e VII-VIII) da probóscide (faringe eversível) por Kinberg, 1865. A) vista frontal. B) vista ventral. (Modificado de Bakken & Wilson, 2005).....21
- Figura 4: Diagrama do anelamento de primers *ISSR* e possível formação do padrão de bandas. A e B referem-se às regiões repetitivas de sequência entre microssatélites que são amplificadas. (→) representam os primers orientados na direção 5'-3' e (←) representam primers na fita de DNA complementar (Fonte: Wolfe et al., 1998).....23
- Figura 5: Mapa dos locais de coleta dos exemplares de *Alitta succinea* na costa brasileira.....27
- Figura 6: Análise de escalonamento multidimensional com exemplares de *Alitta succinea* do Pará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e Paraná.....33
- Figura 7: Dendrograma (média não ponderada) das paragnatas de *Alitta succinea* dos estados do Pará (PA), Pernambuco (PE), Bahia (BA), Rio de Janeiro(RJ) e Paraná(PR), evidenciando a separação entre regiões (N-NE e SE-S).Dados transformados em raiz quadrada e coeficiente de Bray-curtis.....35

Figura 8: Gráfico resultante da análise de variância (ANOVA), evidenciando a maior similaridade da média do número de paragnatas na área III da probóscide dos indivíduos dos Estados do PA, PE, BA (N-NE) contra a maior similaridade e médias entre os indivíduos dos Estados RJ, PR (SE-S). Barras verticais correspondem a dois desvios padrões.....36

Figura 9: Função discriminante das paragnatas de *Alitta succinea* de cinco regiões do Brasil, evidenciando que apenas a função canônica 1 atua na distinção entre as regiões geográficas (N-NE/SE-S).....38

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose a 1,8%. (Primer de ISSR 10) exemplificando os perfis ISSRs e o polimorfismo das bandas em *Alitta succinea* de PE. L= Ladder; Números representam os indivíduos.....40

Figura 11: Topologia de Neighbor-Joining com os exemplares de *Alitta succinea* coletados em Pernambuco (PE), Bahia (BA), Rio de Janeiro (RJ) e Paraná (PR), evidenciando a presença de dois ramos principais que separam as 4 populações em dois grupos, Nordeste/Sudeste-Sul (NE/SE-S). Os valores de Bootstrap/Jackknife encontram-se indicados nos ramos.....42

Figura 12: Topologia de Máxima Parcimônia com os exemplares de *Alitta succinea* coletados em Pernambuco (PE), Bahia (BA), Rio de Janeiro (RJ) e Paraná (PR), evidenciando a presença de dois grupos monofiléticos principais que separam as 4 populações em dois em dois clados Nordeste/Sudeste-Sul (NE/SE-S). Os valores de Bootstrap/Jackknife encontram-se indicados nos ramos.....43

Figura 13: Estruturação bayesiana mostrando a existência de três populações genéticas para *Alitta succinea*.....44

Figura 14: Gráfico mostrando os valores de ΔK e nº de populações genéticas obtidas pela análise Bayesiana de estruturação populacional de *Alitta succinea*.....44

Figura 15: Batimetria do litoral sudeste e sul do Brasil, evidenciando as duas prováveis barreiras biogeográficas que atuam na separação das populações de *A. succinea* da costa brasileira em dois grupos (N-NE / SE-S). Cadeia Submarina de Vitória-Trindade (CSBV) e Cabo Frio (☆). (Modificado de Neves, 2006).....53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Primers *ISSR* testados, suas respectivas sequências e temperaturas de anelamento. Os primers selecionados estão marcados com um asterisco.....31
- Tabela 2: Análise de SIMPER com a similaridade dentro de cada população e a contribuição da área VII-VIII para a similaridade entre as cinco populações.....34
- Tabela 3: Análise de SIMPER com a similaridade dentro dos dois grupos (N-NE e SE-S) e a contribuição da área VII-VIII para a similaridade entre eles.....34
- Tabela 4: Teste a posteriori de Tukey, evidenciando em negrito preto os altos valores de similaridades entre os indivíduos do PA, PE e BA e em negrito vermelho, o alto valor de similaridades entre os indivíduos do RJ e PR.....37
- Tabela 5: Análise Discriminante Múltipla evidenciando que o λ de wilks é significativo para as variáveis independentes das áreas III, IV, V e VII-VIII.....37
- Tabela 6: Caracterização de correspondência geográfica entre os indivíduos e os Estados onde foram coletados. 67,7% dos indivíduos representaram corretamente sua origem geográfica.....38
- Tabela 7: Primers utilizados nas reações de PCR-*ISSR* e resultados. Ta = Temperatura de anelamento.....39
- Tabela 8: Valores de distância genética (acima da diagonal) e distância geográfica (abaixo da diagonal em km) entre as populações de *Alitta succinea* ao longo da costa do Brasil.41
- Tabela 9: Resultados da análise de variância molecular para todas as populações estudadas de *Alitta succinea* ao longo da costa do Brasil. gl= graus de liberdade.....45

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

Tabela 10: Resultados da análise de variância molecular para as populações estudadas de *Alitta succinea* compondo dois grupos distintos (NE/ SE-S) ao longo da costa do Brasil. gl= graus de liberdade; n.s.= não significante.....46

Tabela 11: Valores de GST (acima da diagonal) e Nm (abaixo da diagonal) obtidos entre as amostras estudadas de *Alitta succinea*.....47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos Gerais	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 COLETAS DOS EXEMPLARES.....	25
3.2 ESTUDO DAS PARAGNATAS.....	27
3.3 ANÁLISCES MOLECULARES	29
4. RESULTADOS	33
4.1 ESTUDO DAS PARAGNATAS.....	33
4.2 ANÁLISES MOLECULARES.....	39
4.2.1 REAÇÕES PCR-/ISSR	39
4.2.2 ANÁLISES DE AGRUPAMENTO	40
5. DISCUSSÃO	47
5.1 DADOS MERÍSTICOS DAS PARAGNATAS.....	47
5.2 DADOS MOLECULARES.....	49
5.3 ABORDAGEM BIOGEOGRÁFICA	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

Os poliquetas são, em sua maioria, marinhos, com mais de 12.632 espécies marinhas e 168 de água doce conhecidas (Appeltans et al., 2012; Glasby & Timm, 2008). São encontrados em quase todos os ambientes marinhos e sua grande maioria é bentônica. Entretanto, há poliquetas pelágicos e algumas espécies que ocorrem em água doce e em ambientes terrestres úmidos (Rouse & Pleijel, 2001). Os poliquetas estão entre os invertebrados marinhos com maior diversidade morfológica, o que provavelmente está relacionada à ocupação de uma grande variedade de habitats (Pardo & Amaral, 2006).

A razão entre espécies descritas e espécies não descritas varia de acordo com o habitat e a região biogeográfica. Além disso, existe uma porcentagem da fauna de poliquetas que permanece não identificada e outra grande parcela que necessita ser corretamente identificada. Assim, não há dúvida de que os poliquetas compõem um grupo bastante diverso (Hutchings, 1998).

A família Nereididae está entre as mais diversas famílias de poliquetas, com mais de 540 espécies e 43 gêneros (Hutchings et al., 2000). Alguns destes gêneros são conjuntos heterogêneos de táxons e têm sido divididos em grupos informais baseados em caracteres morfológicos (Bakken, 2004).

Desde 1993, com o trabalho de Glasby sabe-se que Nereididae em si é um grupo monofilético, pela presença de notopódios distintos, caracterizando uma autapomorfia da família e geralmente com lóbulos achatados e notocerdas compostas falcíferas ou espiníferas. Os nereidídeos ainda são diferenciados dos demais poliquetas pelas seguintes características: faringe com um par de garras laterais, cabeça compacta e discreta, boca dorsal, antenas prostomiais inseridas anterolateralmente, cerdas capilares ausentes e apêndices pigidiais presentes (Glasby & Fauchald, 2002).

Os nereidídeos são mais comuns em águas rasas, mas ocorrem em uma ampla gama de ambientes, de locais profundos aos estuários, riachos, poças de águas pluviais temporárias e em ambientes terrestres úmidos (Wilson, 2000).

Existem em cerca de 91 espécies de nereidídeos registrados no Brasil, sendo 40 destas ocorrentes no nordeste (Amaral et al., 2012). A sua prevalência em habitats marinhos acessíveis, combinado com sua aptidão para cultura em laboratório, facilita a coleta de diversas espécies que são usadas comercialmente como isca de peixe, e também como organismos-testes dentro de pesquisas relacionadas à fisiologia, à endocrinologia e ao ambiente (Nithart, 2000).

O primeiro estudo filogenético com nereidídeos foi conduzido por Fitzhugh (1987) onde a subfamília Nereidinae foi diagnosticada por incluir táxons com paragnatas (estruturas rígidas formadas por escleroproteínas) na probóscide, e após este, vários outros investigaram acerca da monofilia da subfamília Nereidinae. A espécie *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) apresenta paragnatas e por isso está incluída nesta subfamília.

Khlebovich (1996) ressuscitou o gênero *Alitta* Kinberg, 1865, para designar um grupo de espécies próximas, *A. virens*, *A. brandti* e *A. grandis* e que supostamente formam um grupo de espécies crípticas que possuem as língulas notopodiais dos parapódios posteriores bastante alongadas, caracterizando uma sinapomorfia do grupo. Posteriormente Bakken & Wilson (2005) transferiram a espécie *Neanthes succinea* para o sinônimo sênior *Alitta succinea* (Figura 1) devido ao fato de que a presente espécie obteve maior semelhança e proximidade com o clado de *Alitta virens* a partir de uma análise cladística entre os nereidídeos com paragnatas. Tal relação se baseou na mesma sinapomorfia das demais espécies deste gênero, língula notopodial dorsal alongada nos parapódios da região posterior (Figura 2). Este caractere é homoplástico em *Cheilonereis cyclurus* e *Pseudonereis*. Mesmo sendo baixo o suporte do ramo (bootstrap de 53%) encontrado para o clado que une *Alitta virens* com *Neanthes succinea* e, devido à escassez de outros trabalhos que complementem este acima citado, a aceitação deste resultado foi grande. Porém, suspeita-se que as espécies do gênero *Alitta* formam um complexo de espécies crípticas, necessitando de estudos aprofundados com um maior número de dados.

Incertezas taxonômicas resultam predominantemente da ausência de dados adequados (Frankham et al., 2008). Além disso, a taxonomia atual de invertebrados marinhos é baseada em informações limitadas, causando a junção de espécies

morfologicamente similares, mas evolutiva e filogeneticamente diferentes, como uma única espécie (Maltagliati et al., 2001).

Espécies de nereidídeos que são referidos a gêneros diversos baseados em alguns caracteres morfológicos são constante e erroneamente classificadas e necessitam de análises mais robustas, sejam elas baseadas em caracteres morfológicos ou combinados com outras categorias de dados.

Alitta succinea é o sinônimo sênior válido para *Nereis succinea*, Leuckart 1847; *Neanthes (Nereis) succinea* Imajima 1972; *Nectoneanthes oxypoda* Imajima 1972; *Nereis alatopalpis* Wesenberg-Lund, 1949; *Nectoneanthes alatopalpis* Wu et al., 1985. Ainda hoje muitos autores se referem a essa espécie como *Neanthes succinea*, porém, neste trabalho seguimos a pesquisa de Bakken & Wilson (2005).

Alitta succinea tem uma distribuição considerada cosmopolita e é comum em habitats marinhos, tropicais e temperados (Pardo & Dauer, 2003). De acordo com o Global Invasive Species Database (GISD) esta espécie é nativa da costa Atlântica das Américas. Todavia, de acordo com registros mundiais da espécie é provável que seja nativa da ecorregião do Mar do Norte (Oceano Atlântico), situado entre as costas da Noruega e da Dinamarca ao leste, a costa das Ilhas Britânicas ao oeste e a Alemanha, Países Baixos, Bélgica e França ao sul. Sua origem é da região sul do Mar do Norte, que compreende desde o limite oeste do Canal da Mancha até os litorais da Alemanha (Villalobos-Guerrero, 2012). Segundo Bakken & Wilson (2005) a localidade tipo desta espécie é a Ilha Helgoland, pequena ilha alemã.

Anteriormente se acreditava que *A. succinea* além de ser nativa da costa Atlântica das Américas, ocorria como uma espécie introduzida ao longo das costas da Europa e África, no Mar Negro, Cáspio e Aral, Sudeste da Austrália e ao longo da costa do Pacífico dos Estados Unidos (Pardo & Dauer, 2003). Atualmente, os Estados Unidos, Austrália, Colômbia e Brasil são os únicos países que consideram *Alitta succinea* como invasora devido aos seus impactos potenciais (Villalobos-Guerrero, 2012; Neves & Rocha, 2008).

Alitta succinea pode ser encontrada em uma variedade de habitats não sedimentares, ocupando fendas entre as conchas de ostras, entre cracas, associados

com mexilhões, às massas da esponja e outros tipos de habitats epifaunais (Pettibone, 1963; Muus, 1967; Dauer, 1973; Dauer et al., 1982; Powers, 1999; Sagasti et al., 2000). É uma espécie detritívora com grande capacidade de bioacumulação, e faz a conexão entre os detritos acumulados no sedimento e os organismos de níveis tróficos superiores incluindo aves e peixes (Detwiler et al., 2002). Em ambientes contaminados, sua atividade alimentar possibilita a transferência de contaminantes do sedimento para outros níveis tróficos, podendo assimilar o metilmercúrio de duas a dez vezes mais eficientemente que o mercúrio (ISSG 2007). Há registros também de impactos econômicos causados por esta espécie. Na Califórnia, possivelmente a ostreicultura está sendo afetada pela densidade de indivíduos de *A. succinea* que vivem associados ao banco de ostras, afetando as larvas destes moluscos, tanto pela predação direta como pela liberação de substâncias químicas tóxicas (Barnes et al., 2010).

Meios de introdução comuns desta espécie incluem invasão pela água de lastro dos navios e também como devido à sua incrustação, em cascos das embarcações, além de também ser resultante da atividade de maricultura (Wilson, 1999; Hewitt et al., 2004).

No Brasil, existem registros de *Alitta succinea* para o Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e da Bahia ao litoral de Santa Catarina (Amaral et al., 2012) e Pernambuco (Sette et al. no prelo).

Alitta succinea (Figura 1) possui um corpo robusto com regiões distintas: prostômio com dois pares de olhos, um par de pequenas antenas, quatro pares de cirros tentaculares, um par de palpos; faringe eversível (probóscide) dividida em anéis oral e mandibular, ambos com presença de paragnatas cônicas, arranjadas em áreas determinadas (Figura 2) (Kinberg, 1865), e lígulas notopodiais dorsais alongadas nos parapódios posteriores (característica distintiva da espécie) (Figura 3).

A variabilidade morfológica encontrada entre indivíduos ou populações de uma espécie pode ter diversas fontes: de ordem genética, onde muitos indivíduos das populações são possuidores de genótipos distintos e estas diferenças acarretarem mudanças na sua aparência externa, comportamentais e fisiológicas e pode ser de natureza ecofenotípica. Esta última resultante de adaptações a diferenças no habitat

(salinidade, pluviosidade, temperatura) resultando na presença de distintos hábitos de vida (predadores, suspensívoros, tubícolas) (Oliveira, 2009).

O estudo das diferenças morfológicas entre organismos pode ser realizado por diversos métodos. Entre esses estão àqueles baseados em caracteres merísticos e os baseados em caracteres morfométricos. As duas categorias de caracteres fenotípicos são mais frequentemente empregados para delimitar espécies (Swain & Foot, 1999). Os caracteres merísticos são séries de estruturas contáveis (como as paragnatas) e são estabelecidos nos estágios iniciais de vida. Os caracteres morfométricos são caracteres contínuos que descrevem aspectos da forma do corpo e mostram tipicamente mudanças ontogenéticas associadas com o crescimento alométrico (Gould, 1966).

A morfometria em uma de suas definições mais clássicas designa qualquer análise quantitativa da variação morfológica dos organismos (Moraes, 2003). Variáveis merísticas (como número de paragnatas) são potencialmente úteis para complementação de estudos morfométricos. Um estudo morfométrico com a espécie *Alitta succinea* avaliando a relação entre paragnatas e comprimento total foi realizado com 34 exemplares do estuário da Baía do Pina (Recife, Pernambuco) e não revelou evidência de correlação entre as paragnatas e o comprimento total, pois desde juvenis o número de paragnatas total não sofre alteração ao longo do desenvolvimento (Sette & Souza, 2011). Este resultado foi encontrado também para a espécie de nereidídeos *Perinereis cultrifera* (Rouabah, 2009). Adicionalmente diversos trabalhos apontam as paragnatas como elementos importantes na diferenciação entre populações (Breton et al., 2004; Maltagliati et al., 2001; Scaps et al., 2000) e espécies.

A forma e disposição das paragnatas na faringe de poliquetas da família Nereididae tem sido usada há 150 anos como um sistema principal de caracteres para distinguir espécies. Recentes estudos têm mostrado que as relações filogenéticas com base unicamente em paragnatas podem originar diferentes topologias e um maior suporte de ramo do que relações inferidas a partir de outros de caracteres morfológicos (Bakken et al., 2009; Breton et al., 2004).

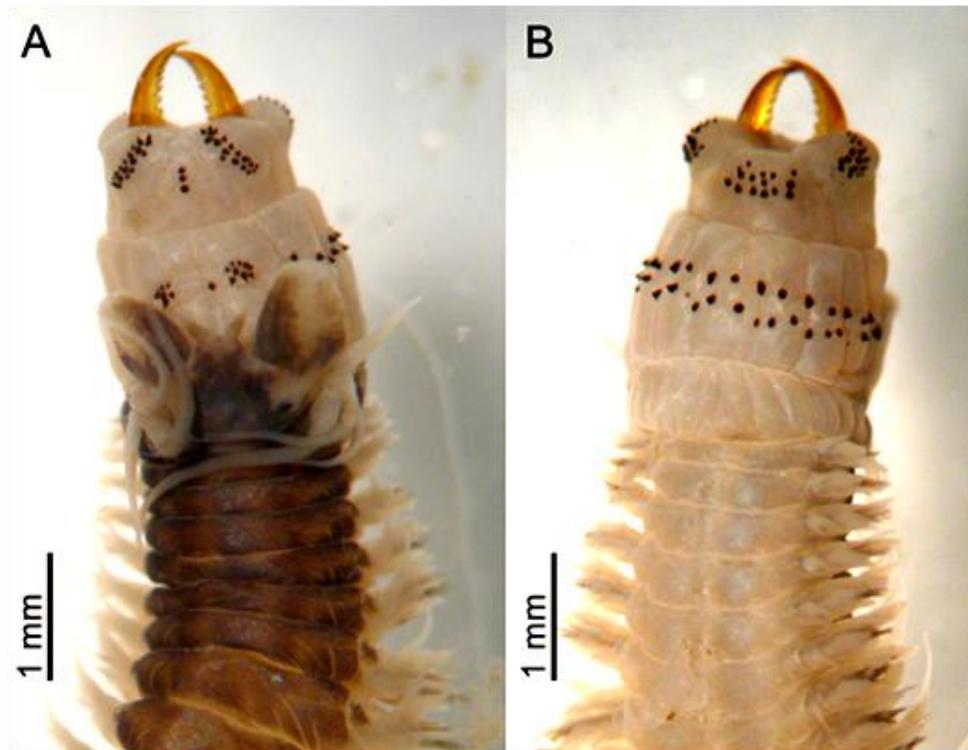


Figura 1: *Alitta succinea* (com probóscide evertida, evidenciando-se as paragnatas cônicas nos anéis oral e mandibular) coletada no estuário da Bacia do Pina/ Recife. A) Região anterior dorsal; B). Região anterior ventral.

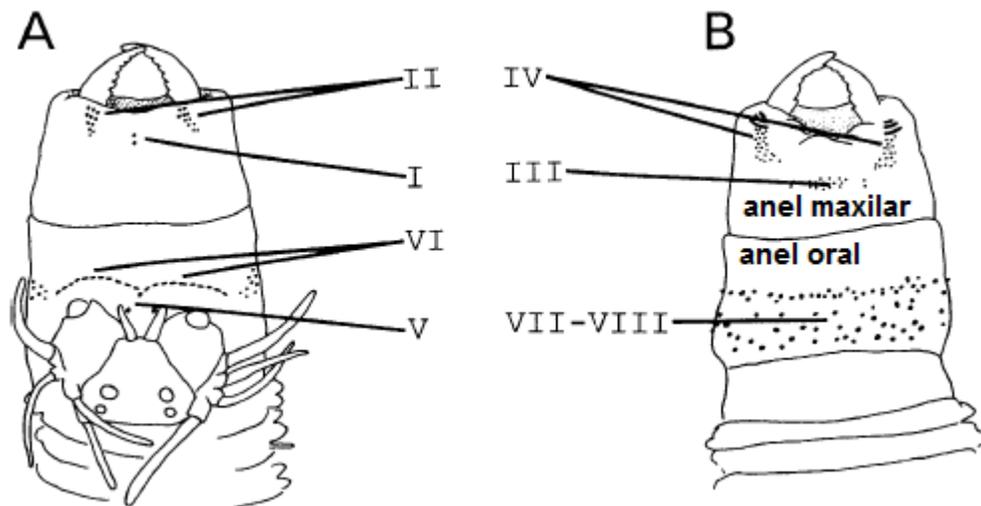


Figura 2: Disposição das paragnatas em áreas determinadas (I, II, III, IV, V, VI e VII-VIII) da probóscide (faringe eversível) por Kinberg, 1865. A) vista frontal. B) vista ventral. (Modificado de Bakken & Wilson, 2005).

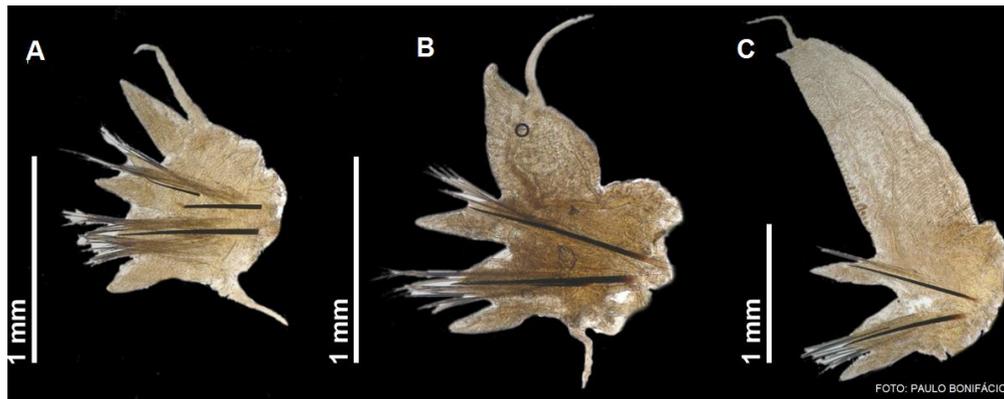


Figura 3: Parapódios de *Alitta succinea* coletada no estuário da Bacia do Pina/ Recife.

A) 6º parapódio; B) 20º parapódio; C) 45º parapódio evidenciando a lígula notopodial dorsal alongada.

Uma população é uma entidade em mudança e a densidade, a natalidade, a sobrevivência, a estrutura etária, a taxa de crescimento e outros atributos das populações geralmente flutuam na medida em que as espécies se ajustam constantemente às estações, às forças físicas e umas às outras (Odum, 1988). Conseqüentemente o estudo das populações se faz necessário para uma melhor compreensão da relação entre os vários componentes de um ecossistema e da sua relação com ecossistemas circunvizinhos. A capacidade dos organismos em reconhecer, selecionar ou procurar o ambiente adequado, permite estabelecer uma correspondência entre as propriedades do ambiente e as características das espécies. Entretanto, os fatores que determinam sua dinâmica populacional agem de formas muito diversas, sendo difícil elaborar regras simples para previsões demográficas (Margalef, 1980).

A diferenciação geográfica de populações resultando em uma estruturação genética depende da capacidade de dispersão de larvas e adultos na manutenção do fluxo gênico entre as mesmas (Breton et al., 2003; Pannacciulli et al., 2009; Fernández et al., 2011). Porém, em alguns casos, populações de invertebrados aquáticos com fase dispersiva larval planctônica possuem grande estruturação genética local, pois o fluxo gênico entre populações distintas é impedido por barreiras como a salinidade, temperatura, disponibilidade de espaço, predação e também devido à seleção pós-

assentamento, além da existência das barreiras biogeográficas (Silva, 2009; Doonan et al., 2011; Fadhlaoui-Zid et al., 2012).

Os estuários são ecossistemas onde encontramos grande número de larvas de invertebrados e de muitos peixes que vivem toda a sua vida ou apenas parte dela (geralmente o ciclo reprodutivo) nestes locais. Assim, avaliar os efeitos da dispersão destes animais é fundamental para a compreensão da biologia e evolução das populações desses organismos em sistemas naturais. O conhecimento da conectividade populacional destas espécies requer a compreensão da origem e trajetórias de dispersão de ovos e larvas entre as populações (Pineda et al., 2007).

A espécie *Alitta succinea* sofre uma metamorfose pré-reprodução, chamada de epitoquia. Os indivíduos epítocos possuem alterações que os possibilitam viver no meio pelágico, como cerdas adaptadas para o nado e neste meio ocorre a liberação dos gametas, fecundação e eclosão dos ovos (Hardege et al., 2004). Seu desenvolvimento larval no ambiente pelágico dura cerca de 15 dias e após este período ocorre o assentamento das suas larvas no meio bentônico (Villalobos-Guerrero, 2012).

Acerca das espécies estuarinas postulou-se a hipótese de que as populações de estuários distantes entre si vivem em isolamento geográfico e reprodutivo (Palumbi, 1994). Tais condições de isolamento são reconhecidas como precursoras de divergência genética entre populações e de especiação (Nei, 1975).

A genética de populações apresenta ferramentas úteis para testar hipóteses de isolamento, por meio da investigação da variabilidade genética, do fluxo genético, permitindo uma percepção da história demográfica das populações, pressões seletivas agindo na variação genética e processos mutacionais que geram diversidade (Freeland, 2005; Conrad & Hurler, 2007).

Nos últimos anos uma série de estudos moleculares em poliquetas tem contribuído muito para a avaliação da biodiversidade local através da resolução da taxonomia de espécies crípticas formando complexos de espécies (Kruse et al., 2003; Maltaglianti et al., 2005; Barroso et al., 2010; Nygren & Pleijel 2011; Arias et al., 2011; Nygren et al., 2011). A genética de populações pode, ainda, ser considerada como uma ferramenta necessária em programas de conservação da biodiversidade, tendo em

vista que a diversidade biológica envolve não somente a riqueza de espécies, mas a variação genética intraespecífica (Taberlet, 1998; Frankham et al., 2008).

Um marcador molecular de DNA, em sua essência, detecta variação nas sequências de nucleotídeos num determinado local do genoma e pode gerar impressões digitais, que são padrões distintos de fragmentos de DNA separados por eletroforese em gel de agarose e detectados por coloração (Bakkappa et al., 2011).

O uso de marcadores moleculares em estudos de genética populacional provou ser determinante para lançar luz sobre diversos aspectos relacionados com a biologia, ecologia e evolução de muitos organismos. No entanto, 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).

Os marcadores moleculares podem ser utilizados como ferramenta para estudos de diversidade genética entre indivíduos, dentro e entre populações ou espécies relacionadas (Souza et al., 2008). Os marcadores *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSRs) de sequências repetidas de di ou trinucleotídeos não requerem informações prévias de sequências de DNA da espécie-alvo. Produzem fragmentos com grande reprodutibilidade (Wolfe & Liston, 1998), onde sua técnica envolve a utilização de sequências de setores de microssatélites (genoma nuclear) como ancoradouros (Figura 4) para os seus *primers*, a fim de gerarem marcadores multiloci (Reddy et al., 2002).

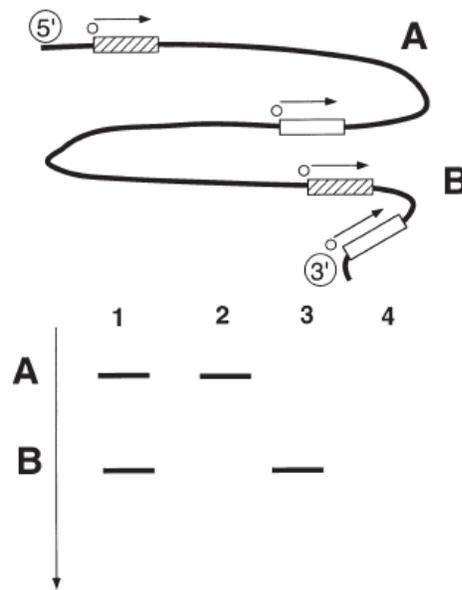


Figura 4: Diagrama do anelamento de primers ISSR e possível formação do padrão de bandas. A e B referem-se às regiões repetitivas de sequência entre microssatélites que são amplificadas. (5' e 3') representam os primers orientados na direção 5'-3' e (← e →) representam primers na fita de DNA complementar (Fonte: Wolfe et al., 1998).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais:

- Avaliar a diversidade morfológica perante a análise merística das paragnatas de *Alitta succinea* das populações do Pará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e Paraná.
- Avaliar a diversidade genética, perante uso de marcador molecular ISSR, das populações do Pará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e Paraná.

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a variação intra e interpopulacional das populações de *Alitta succinea* do Pará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e Paraná.

- Detectar a importância de cada área da probóscide e qual a mais conservada (possui menos variação) na distinção interpopulacional entre as populações de *Alitta succinea* do Pará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e Paraná.
- Detectar possíveis barreiras biogeográficas que estejam separando as populações de *Alitta succinea*.
- Determinar padrões de conectividade interpopulacional de *Alitta succinea* entre os locais amostrados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETAS DOS EXEMPLARES

Exemplares de *Alitta succinea* foram coletados em cinco pontos do litoral brasileiro: na região Norte (Praia da Beira/PA), na região Nordeste (Bacia do Pina/PE; Jaguaripe/BA), na região Sudeste (Rio Caceribu/RJ) e na região Sul (Rio Pinheiros/PR) (Figura 5).

No Pará, 21 exemplares foram coletados na Praia da Beira (00°36' S / 047°33' W) que se localiza na Ilha oceânica do Algodal. Seu nome é Ilha de Maiandeuá, conhecida por Ilha de Algodal. A distribuição das chuvas neste local define dois períodos distintos: um mais chuvoso (dezembro a maio), onde as precipitações são muito intensas, principalmente no trimestre fevereiro, março e abril, e o outro menos chuvoso (período de estiagem) que atinge os demais meses do ano, quando ocorre pronunciado déficit hídrico. A temperatura média anual situa-se em torno de 27°C com amplitude inferior a 5°C (Girard, 2009).

Em Pernambuco, 30 exemplares foram coletados no Cais José Estelita (08°03'S e 034°51'W) próximo ao forte das Cinco Pontas no estuário do Pina que é formado pela confluência dos rios Tejió, Jiquiá, Jordão, Pina e braço sul do Capibaribe e está situado próximo ao porto do Recife (08°04'S e 34° 52'W), sendo separado do oceano através de um dique natural de arenito. Esta região se caracteriza por possuir períodos distintos de regime pluviométrico: uma estação seca ou de estiagem, que vai de

setembro a fevereiro e uma estação chuvosa, de março a agosto, possuindo uma extensão de 3,6 km e largura variável, sendo a mínima de 0,26 Km e a máxima de 0,86 Km, perfazendo uma área total de, aproximadamente 2,02 Km² (Santos et al., 2009).

Na Bahia, 25 exemplares foram coletados no Rio Jaguaripe (13°06'S / 038°54'W) que é localizado na Baía de Todos os Santos e possui 2200 km² de extensão. A circulação no interior da baía é predominantemente forçada pelas marés. Durante o verão, as águas dentro da baía têm características oceânicas, enquanto que durante o Inverno, há um aumento significativo de fluxo de água doce (Hatje & Barros, 2012).

Os 15 exemplares do Rio de Janeiro foram coletados no rio Caceribu (22°44' S / 043°03' W) que nasce no município de Rio Bonito, na Serra do Sambê e possui a foz com condições de um estuário relativamente preservado, com a manutenção de manguezais em grande parte da baixada. O clima desta região é caracterizado com um inverno seco, enquanto o verão se caracteriza como úmido e com chuvas torrenciais (Silva et al., 2011).

Os 11 exemplares do Paraná foram coletados no Rio Pinheiros, na Fazenda Projeto, em Cabaraquara na baía de Guaratuba (25°33' S / 048°23' W). A baía de Guaratuba abriga um estuário margeado por vegetação rasteira e florestas de mangue, englobando uma área total de 48,57 km². As principais influências de águas continentais no estuário são decorrentes dos rios Cubatão e São João, com um aporte médio de 80 m³/s de água doce (Marone et al., 2006 *apud* Castilho-Westphal, 2012).

Todos os cinco pontos se caracterizam por serem estuarinos com salinidade inferior a 30 ‰, sendo os pontos localizados nas regiões Sudeste e Sul os que possuem maior amplitude, no Rio Caceribu /RJ, por exemplo, as salinidades encontradas variaram de 4 a 22 ‰. Uma maior amplitude também é encontrada para a temperatura da água para estes pontos localizados mais ao sul do Brasil.

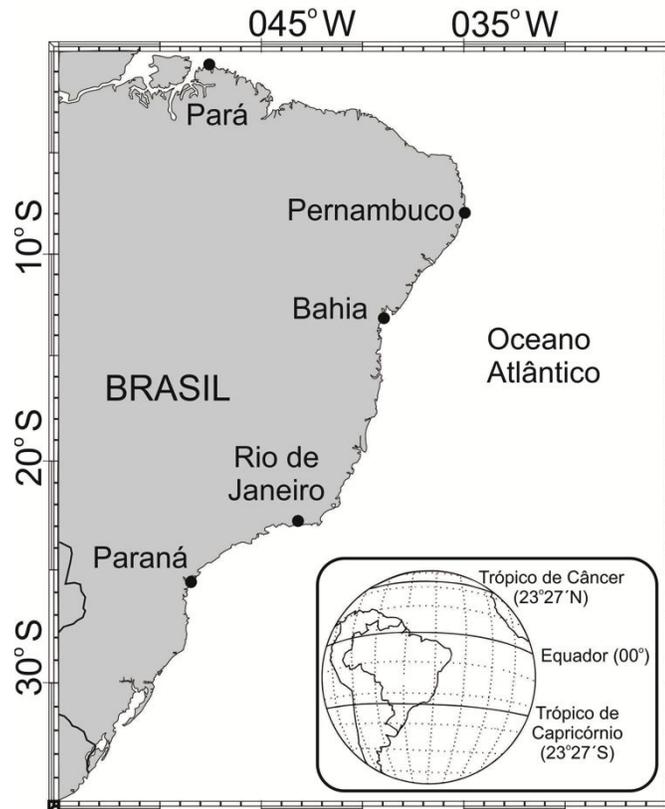


Figura 5: Mapa dos locais de coleta dos exemplares de *Alitta succinea* na costa brasileira.

3.2 ESTUDO DAS PARAGNATAS

As análises merísticas foram realizadas a partir de exemplares das populações do Pará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e Paraná, totalizando 127 exemplares. As paragnatas foram visualizadas e contadas com auxílio de microscópio estereoscópico.

Para realização das análises estatísticas, não retiramos o efeito do tamanho, pois num estudo preliminar com 34 exemplares da população de Pernambuco a partir de uma matriz de correlação múltipla entre todos os parâmetros: áreas da probóscide I, IIA, IIB, III, IVA, IVB, V, VIA, VIB, VII-VIII, número de segmentos e o comprimento total para verificar a presença de parâmetros com fortes correlações entre pares foi verificada a ausência de relação direta entre o número de paragnatas e o comprimento total do animal, sendo esse parâmetro morfométrico mais conservado e, portanto sem

covariância com o comprimento, o único parâmetro que obteve alta correlação o comprimento total foi o número de segmentos, previamente registrada para a espécie e comum entre os poliquetas (Sette & Souza, 2011).

As análises de agrupamentos (análise de Cluster por ligação média não ponderada), escalonamento multidimensional não-métrico (n-MDS) e a análise de similaridade (ANOSIM) foram realizadas com auxílio do software Primer v.6, utilizando-se os dados transformados por raiz quadrada e o coeficiente de associação Bray Curtis.

O n-MDS é utilizado para o melhor entendimento das relações entre as populações, por meio da sua maior ou menor “proximidade” espacial em duas ou mais dimensões. Além disso, também constrói mapas ou configurações dos objetos a partir dos caracteres analisados (Clarke & Warwick 1994 *apud* Garrafoli, 2006). A análise de agrupamentos tem como objetivo reconhecer grupos discretos nas amostras analisadas classificando seus valores a partir do maior ou menor compartilhamento de atributos específicos.

O teste de permutação ANOSIM foi empregado a fim de avaliar a significância das diferenças entre os grupos pré-definidos a partir da análise de agrupamento representadas no método de ordenamento n-MDS. Este teste produz um valor de R que varia em uma amplitude de -1 a +1. Valores R iguais a +1 são obtidos apenas quando todos os indivíduos dentro de uma população são mais similares entre si do que com qualquer indivíduo de outra população (Masi & Zalmon, 2008).

A rotina SIMPER (percentagens de similaridade – Clarke 1993) foi realizada no software Primer v.6 com intuito de encontrar as áreas da probóscide que mais contribuíram para a similaridade dos grupos formados e para a dissimilaridade entre eles.

O número das paragnatas de cada área da probóscide foi logaritimizado, após testar a homocedasticidade dos mesmos com o teste de Bartlett, para a realização, no software Statistica, da análise de variância (ANOVA) e posteriormente o teste de Tukey com o objetivo de se comparar a diferença no número de paragnatas em cada área da probóscide em relação às cinco populações estudadas.

A Análise Discriminante Múltipla foi realizada com auxílio do software Statistica, sendo esta análise uma “ferramenta” estatística utilizada para classificar um

determinado elemento (população) num determinado grupo de variáveis (paragnatas) (Kasznar & Gonçalves, 2012), ou seja, objetiva detectar e descrever padrões estruturais, espaciais e temporais que são úteis na ordenação dos dados.

3.3 ANÁLISES MOLECULARES

Primeiramente foram separadas as regiões posteriores de todos os exemplares coletados para uso do tecido muscular como fonte de material genético para as extrações de DNA das localidades PA, PE, BA, RJ e PR. Posteriormente, tais amostras foram imersas e mantidas em Etanol 96% e depositadas em freezer a -20° C. A extração de DNA foi conduzida por meio dos protocolos propostos por Sambrook & Russel (2001; Fenol associada).

Após a extração, os DNAs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, para verificar a integridade do material genético extraído. Para tal, em cada poço do gel foram colocados 3 µL de DNA, 1 µL de gel loading dye blue (6x) (tampão de carregamento) e 1 µL de Gel Green (0,5ml 10.000X em H₂O) (corante de visualização do DNA), sempre acompanhados de uma série de concentrações conhecidas de DNA fago lambda (10, 25, 50 e 100 ng). Após eletroforese, a concentração de DNA foi estimada através da comparação visual das bandas do DNA do fago Lambda. Os géis foram fotodocumentados e arquivados.

As reações de amplificação (PCRs) foram executadas segundo o protocolo de Almeida et al., (2003) que compreendeu a solução de PCR com 20 µl volume total que consistia em 0,2 unidades de Taq Dna Polimerase (New England/ Biolabs), 10x Tampão, 50mM MgCl₂, 50 µM de primer, 0,2 µM de dNTP e 20 ng de DNA genômico. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Biocycler e eram compostas por 1 ciclo de 4 minutos a 94 °C; 39 ciclos de 40s a 94 °C, 40s a °C (*primers* específico) e 120s a 72 °C, com alongamento final de 420s. As reações foram acompanhadas por controle negativo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA genômico.

Após as PCRs, foram realizadas eletroforeses em gel de agarose a 1,8%, em cuba horizontal. Tais reações continham tampão TBE 0,5x diluído de uma solução original de 10x (Tris 0,89M, Ácido Bórico 0,89M e EDTA 0,01M, pH= 8,3). Foram ainda

mantidas por tempo variável dependendo do tamanho da cuba, a 60 volts, onde em cada poço do gel era inserida uma solução contendo 10 µL da reação de PCR, 1,5 µL de gel loading dye blue (6x) e 1,5 µL de gel green (0,5ml 10.000X em H₂O). Para auxiliar a análise das bandas, foram utilizados, em um dos poços do gel, 2 µL do marcador DNA Ladder 1 Kb (Amresco) com 1,5 µL de gel loading dye blue (6x) e 1,5 µL de gel green (corante fluorescente). Em seguida, os géis foram fotodocumentados em transluminador sob fonte de luz ultravioleta.

Inicialmente, 17 primers diferentes de sequências repetidas de di ou trinucleotídeos (específicas para sequências de microssatélites) foram testados, utilizando para tal, três indivíduos de cada população (Tabela 1). Os 7 primers que apresentaram a maior proporção de loci variantes em função do número de loci gerados (os mais polimórficos) foram então escolhidos para amplificação do DNA de todos os indivíduos. Seguiu-se a orientação de Telles et al., (2001), que indica a estabilidade do desvio padrão sobre a variância, com base no uso de um número mínimo em torno de 60 loci polimórficos com pelo menos 6 primers. Após a fotodocumentação, os géis foram transformados em uma matriz binária de presença e ausência de bandas de DNA (0 para ausência, 1 para presença). Tais bandas foram selecionadas quando na fotografia se apresentavam bastante nítidas e robustas, não sendo contabilizadas aquelas que eram visualizadas como manchas nos géis.

Tabela 1: Primers ISSR testados, suas respectivas sequências e temperaturas de anelamento. Os primers selecionados estão marcados com um asterisco.

<i>Primer</i>	<i>Sequência 5' – 3'</i>	<i>Temperatura de anelamento em °C</i>
<i>ISSR 1</i>	(AG)8T	50
<i>ISSR 2*</i>	(AG)8C	53
<i>ISSR 3</i>	(GA)8T	50
<i>ISSR 4*</i>	(GA)8C	53
<i>ISSR 5</i>	(CT)8G	52
<i>ISSR 6</i>	(AG)8YC	53
<i>ISSR 7*</i>	(AG)8YA	54

ISSR 8	(GA)8YT	53
ISSR 9*	(GA)8YC	53
ISSR 10*	(GA)8YG	54
ISSR 11	(CT)8RA	50
ISSR 12	(AC)8YG	54
ISSR 13*	(GGAC)3A	51
ISSR 14*	(GGAC)3C	51
ISSR 15	(GGAC)3T	51
ISSR 16	(AACC)4	51
ISSR 17	(GGAC)4	51

De posse dessa matriz binária, foram desenvolvidas análises de agrupamento, em que os dados foram analisados através de três algoritmos: Neighbor-joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP) e simulação Bayesiana. As espécies *Pseudonereis palpata* (Treadwell, 1923) e *Perinereis ponteni* Kinberg, 1866 foram utilizadas como grupos externos para as análises de NJ e MP. Tais análises foram desenvolvidas por meio do programa PAUP v.4.0b10* (Swofford, 2000), pela sua interface gráfica PaupUp v.1.0.3.1 (Calendini & Martin, 2005). A simulação Bayesiana foi realizada para estimar a 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., 2000).

A Análise de Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) é um método de similaridade baseado em distância e no princípio da evolução mínima. Apesar de não analisar todas as topologias possíveis, procura encontrar sequencialmente vizinhos que minimizem o comprimento total da árvore (Miyaki et al., 2001). Para a análise de Máxima Parcimônia, todos os caracteres foram considerados como não-ordenados e com pesos iguais, pelas otimizações *Acctran* (Transformação acelerada) e *Deltran* (Transformação atrasada). Foi estabelecido um número máximo de 100.000 árvores com 5.000 replicações aleatórias, e as topologias foram selecionadas por meio do consenso de maioria. Tanto para a análise de distância quanto para a de parcimônia, a robustez dos

ramos foi testada pelos índices de suporte de Bootstrap e Jackknife, seguindo a regra de consistência dos ramos igual ou maior a 50%, a partir de 1000 pseudo-réplicas.

A análise de Máxima Parcimônia (Fitch, 1971) utiliza a homologia como princípio e assume que o critério de parcimônia leva ao maior número total de acertos da árvore verdadeira, quando se minimiza o número de passos evolutivos na topologia (Miyaki et al, 2001). Este método ainda procura selecionar com maior acuidade a topologia que, de fato, representa a filogenia do grupo e, para isso, pressupõe que a árvore com o menor número de mudanças para explicar a variação observada na matriz de caracteres, é provavelmente a mais próxima de refletir a real evolução do grupo (Swofford & Berlocher, 1987).

Foi ainda realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA) para testar os desvios estatísticos da hipótese de uma população panmítica, a fim de avaliar a existência de estruturação genética nas populações estudadas (Excoffier et al., 1992). Esse método permite ainda calcular o índice de fixação intraespecífica da variação genética (F_{ST}), além de F_{CT} e F_{SC} , que indicam quanto da variação pode ser atribuída a diferenças entre os grupos e às diferenças entre as populações dentro dos grupos, respectivamente. Para tal metodologia, foi utilizado o software ARLEQUIN .3.5.1.2 (Excoffier et al., 2010).

Com os dados de distância genética par-a-par entre os indivíduos, fornecidos pelo NJ, foi construída uma matriz das médias das distâncias genéticas entre todos os indivíduos para as localidades estudadas. As distâncias geográficas foram estimadas de forma linear pelo uso da plataforma Google Earth (Google Inc., 2013). A partir destas informações e por meio do software BioEstat 5.0, foi realizada uma regressão linear das variáveis distância genética e distância geográfica afim de testar a hipótese de isolamento genético-evolutivo por distância.

Os parâmetros de genética populacional do tipo fluxo gênico (Nm =Número de migrantes por geração) e diferenciação genético-evolutiva interespecífica (G_{ST}) globais e pareadas foram obtidos por meio do uso do software Popgene 1.32 (Yeh et al, 1999).

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDO DAS PARAGNATAS

O n-MDS realizado com os dados do número de paragnatas em cada área da probóscide de todos os exemplares de *Alitta succinea* dos cinco locais amostrados (Pará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e Paraná) distinguiu dois grupos de acordo com a região geográfica (Figura 6), com separação das regiões Norte-Nordeste (Pará, Pernambuco e Bahia) das regiões Sudeste-Sul (Rio de Janeiro, Paraná). O teste de permutação ANOSIM ($R=0,297$; $p=0,001$) mostrou que a separação entre as duas regiões detectadas pelo n-MDS é significativa apesar do R baixo.

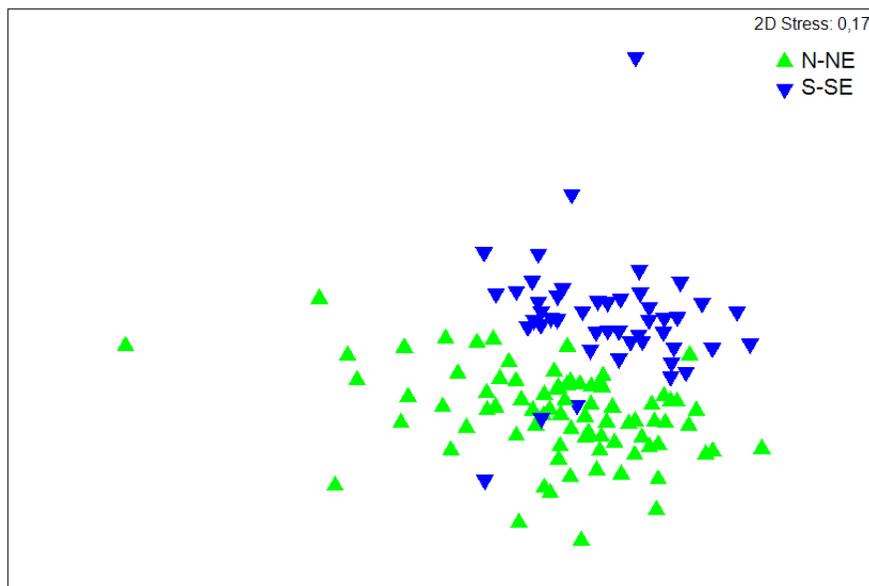


Figura 6: Análise de escalonamento multidimensional com exemplares de *Alitta succinea* do Pará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e Paraná.

A análise de cluster (Figura 7) apresenta um grupo com similaridade próxima a 95 % entre os estados do Paraná e Rio de Janeiro (SE-S), com as populações do grupo N-NE apresentando grande número de clados formados por encadeamento. Além disso, por essa análise não foi possível a detecção das cinco populações (PA, PE, BA, RJ, PR) de forma individual, sendo possível apenas a detecção dos dois grupos geográficos (N-NE/ SE-S).

Ao realizar a análise de SIMPER verificamos que a área VII-VIII foi o caractere que mais contribuiu para a similaridade das populações dos cinco diferentes Estados quanto para a similaridade dos grupos N-NE e SE-S (Tabelas 2 e 3), sendo esta considerada a mais conservada. Por outro lado, encontramos o valor de dissimilaridade de 3,91 entre estes dois grupos (N-NE / SE-S), sendo a área III a que mais contribuiu para esta dissimilaridade (23,46 %).

Tabela 2: Análise de SIMPER com a similaridade dentro de cada população e a contribuição da área VII-VIII para a similaridade entre as cinco populações.

<i>População</i>	<i>Similaridade</i>	<i>Contribuição da área VII-VIII</i>
PA	96,95	14,03 %
PE	96,48	14,34 %
BA	94,99	14,32 %
RJ	96,88	13,65 %
PR	97,47	14,05 %

Tabela 3: Análise de SIMPER com a similaridade dentro dos dois grupos (N-NE e SE-S) e a contribuição da área VII-VIII para a similaridade entre eles.

<i>Grupo</i>	<i>Similaridade</i>	<i>Contribuição da área VII-VIII</i>
N-NE	96,43	14,23 %
SE-S	97,05	13,79 %

O resultado obtido na análise de variância (ANOVA) (Figura 8) e teste *a posteriori* de Tukey (Tabela 4) evidencia a área III da probóscide como sendo possuidora da maior variação no número de paragnatas, sendo esta variação responsável pela divisão das cinco populações estudadas nos dois grupos anteriormente descritos pelas análises acima, N-NE/ SE-S, e com significância estatística ($F_{(4,122)} = 42,799$; $p < 0,00001$).

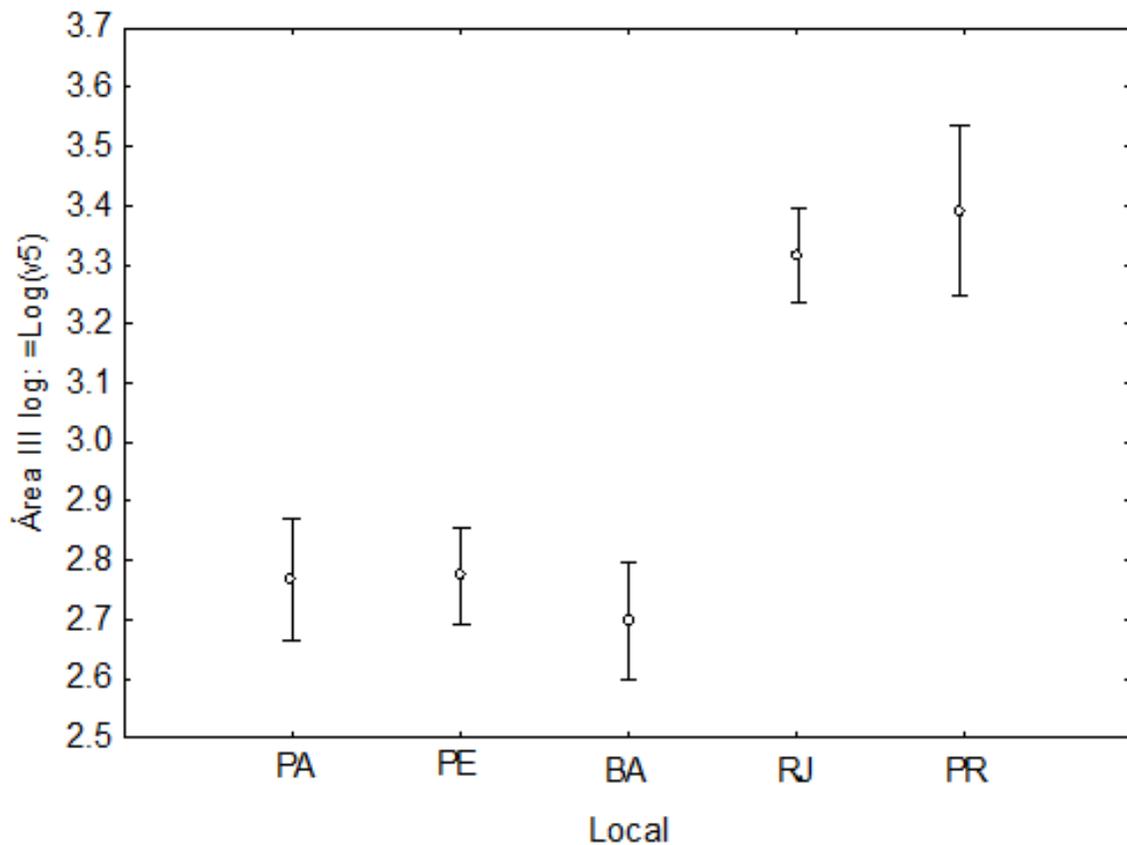


Figura 8: Análise de variância (ANOVA), evidenciando a maior similaridade da média do número de paragnatas na área III da probóscide dos indivíduos dos Estados do PA, PE, BA (N-NE) contra a maior similaridade e médias entre os indivíduos dos Estados RJ, PR (SE-S). Barras verticais correspondem a dois desvios padrões.

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

Tabela 4: Teste *a posteriori* de Tukey, evidenciando em negrito preto os altos valores de similaridades entre os indivíduos do PA, PE e BA e em negrito vermelho, o alto valor de similaridades entre os indivíduos do RJ e PR.

	PE	PR	BA	PA	RJ
PE	1	0.000017	0.768666	0.999644	0.000017
PR		1	0.000017	0.000017	0.868558
BA			1	0.907498	0.000017
PA				1	0.000017
RJ					1

A Análise Discriminante Múltipla evidencia que o Wilks' lambda (parâmetro básico usado para indicar a significância estatística da força discriminatória do corrente modelo) é significativo para as variáveis independentes das áreas III, IV, V e VII-VIII ao nível de significância 95% (tabela 5) também detectou que 67,7% dos indivíduos representaram corretamente sua origem geográfica (tabela 6). O Rio de Janeiro teve a menor variação intrapopulacional, visto que dos exemplares coletados neste Estado, por análise das diferenças entre os mesmos possui 86% de seus indivíduos discriminados como representantes originais do Rio de Janeiro e o Paraná, possui a maior parte de seus exemplares referidos como pertencentes ao Estado do Rio de Janeiro, evidenciando a grande similaridade entre as populações do RJ e PR e os indivíduos coletados no N-NE foram referidos como pertencentes a esse grupo, com apenas um indivíduo referido como pertencente ao grupo SE-S.

Tabela 5: Análise Discriminante Múltipla evidenciando que o λ de wilks é significativo para as variáveis independentes das áreas III, IV, V e VII-VIII.

Variável	Wilk's Lambda	F	P
ÁREA I	0,928	2,349	0,058
ÁREA II	0,947	1,719	0,150
ÁREA III	0,364	53,312	<0,0001
ÁREA IV	0,865	4,747	0,001
ÁREA V	0,820	6,674	0,00007
AREA VI	0,945	1,773	0,139
ÁREA VII-VIII	0,904	3,247	0,0143

Tabela 6: Caracterização de correspondência geográfica entre os indivíduos e os Estados onde foram coletados. 67,7% dos indivíduos representaram corretamente sua origem geográfica.

	% Corrigida	PE	PR	BA	PA	RJ
PE	76,47	26	0	4	3	1
PR	27,27	0	3	0	1	7
BA	50,00	7	0	12	5	0
PA	63,64	4	0	4	14	0
RJ	86,11	1	2	2	0	31
TOTAL	67,72	38	5	22	23	39

Analisando as principais funções canônicas resultantes da análise discriminante múltipla, conclui-se que apenas a primeira delas (Figura 9) atua na distinção entre as duas regiões geográficas (N-NE/ SE-S) e a área da probóscide que mais contribui para composição desta função canônica foi a área III.

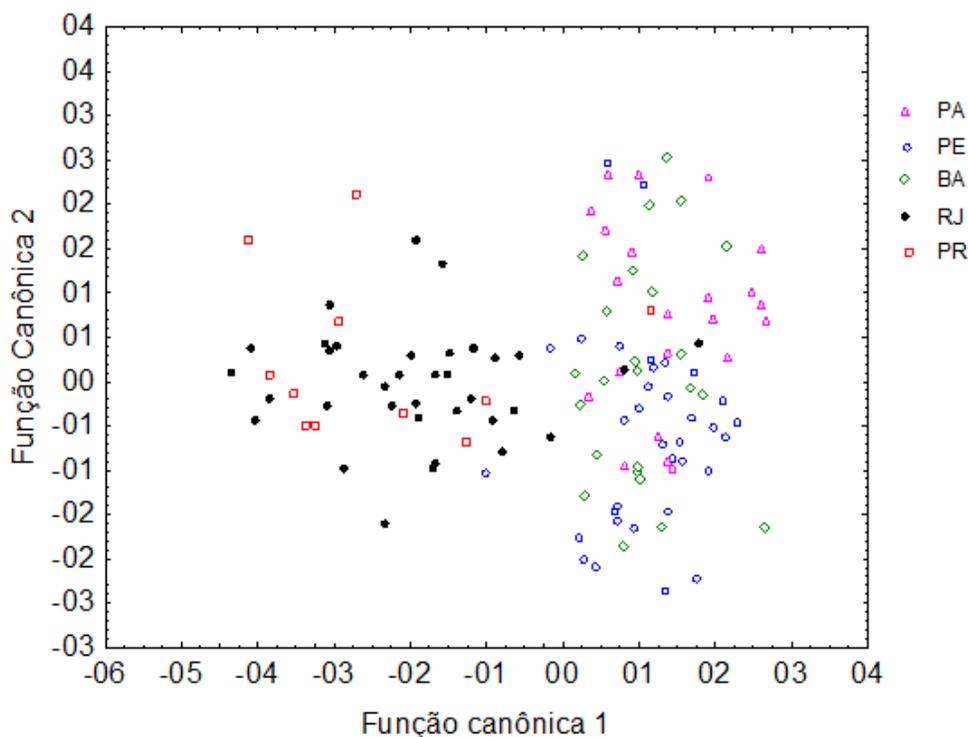


Figura 9: Função discriminante das paragnatas de *Alitta succinea* de cinco regiões do Brasil, evidenciando que apenas a função canônica 1 atua na distinção entre as regiões geográficas (N-NE/SE-S).

4.2 ANÁLISES MOLECULARES

4.2.1 REAÇÕES PCR-ISSR

Os exemplares do Pará não obtiveram sucesso nas reações de PCR, provavelmente devido a excesso de fenol impregnado no DNA extraído, o que dificulta a amplificação do mesmo, com a inibição da enzima Taq polimerase. Devido a isto não puderam ser analisados juntamente com os dados dos demais Estados no que se refere às análises moleculares a partir de marcadores *ISSR*.

Os dados obtidos a partir das amplificações de DNA (Tabela 7, Figura 10) com os primers *ISSRs* selecionados, resultaram em um total de 114 loci que variaram de 150bp (pares de base) a 1800bp, sendo todos polimórficos, o que revela uma diversidade genética de 100% para a espécie estudada na região amostrada.

Tabela 7: Primers utilizados nas reações de PCR-ISSR e resultados.

Ta = Temperatura de anelamento.

Primer	Sequência 5'-3'	Ta °C	Faixa de tamanho das bandas	Nº de loci
2	(AG)8C	53	1400-225	17
4	(GA)8C	53	900-300	11
7	(AG)8YA	54	1000-250	14
9	(GA)8YC	53	1500-150	16
10	(GA)8YG	54	1400-200	17
13	(GGAC)3A	51	1800-150	21
14	(GGAC)3C	51	1500-250	18

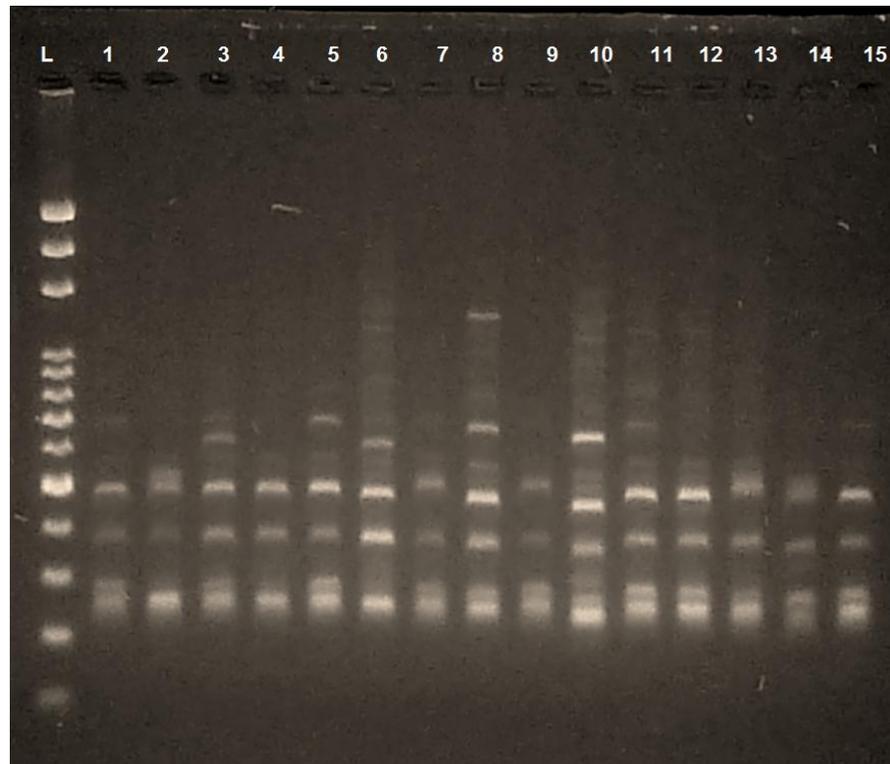


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose a 1,8%. (Primer de ISSR 10) exemplificando os perfis ISSRs e o polimorfismo das bandas em *Alitta succinea* de PE. L= Ladder; Números representam os indivíduos.

4.2.2 ANÁLISES DE AGRUPAMENTO

NEIGHBOR JOINING (NJ)

A análise de NJ (Figura 11) revelou a diferenciação de dois grupos genéticos, um composto pelos exemplares de Pernambuco (PE) e Bahia (BA) e o outro composto pelos exemplares do Rio de Janeiro (RJ) e Paraná (PR). Os valores de suporte de ramo de bootstrap/jackknife apresentaram-se medianamente satisfatórios (maior que 50 e menor que 70) em sua maioria, porém o clado que une os indivíduos do RJ não obteve suporte de ramo estatisticamente robusto, indicando que há uma maior variação genética entre estes. O ramo que reuniu os exemplares da BA foi o que obteve maior valor de suporte (89/84).

A relação entre as distâncias genéticas e geográficas (tabela 8) não foi significativa ($r_{(1,4;0,05)} = 0,244$; $p=0,64$) pois a distância geográfica explicou apenas 6% da distância genética.

Tabela 8: Valores de distância genética (acima da diagonal) e distância geográfica (abaixo da diagonal em km) entre as populações de *Alitta succinea* ao longo da costa do Brasil.

	<i>PE</i>	<i>BA</i>	<i>RJ</i>	<i>PR</i>
<i>PE</i>	-	0,282632	0,303403	0,339883
<i>BA</i>	784	-	0,314514	0,347544
<i>RJ</i>	2068	1406	-	0,325132
<i>PR</i>	2661	2092	608	-

MÁXIMA PARCIMÔNIA (MP)

A análise de máxima parcimônia revelou que dos 114 caracteres obtidos, apenas 8 deles foram constantes e 106 variáveis (parcimoniosamente informativos). A análise de consenso (Consenso maioria) gerou uma topologia (Figura 12) com L (número de passos) = 594, índice de consistência (Ci)=19 e índice de retenção (Ri)= 64.

A topologia obtida revelou existência de dois grupos monofiléticos principais, um compreendendo as populações de Pernambuco e Bahia (NE) e outro as populações do Rio de Janeiro e Paraná (SE/S). O grupo NE recebeu um bom suporte de ramo (85/83) no clado que reuniu a população de *A. succinea* da Bahia. De maneira geral, os suportes de ramo de bootstrap/jacknife quando acima de 50%, foram de baixos a altos (54-85/53-83). No grupo SE/S o clado que reuniu a população do Paraná apresentou um suporte de ramo baixo.

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

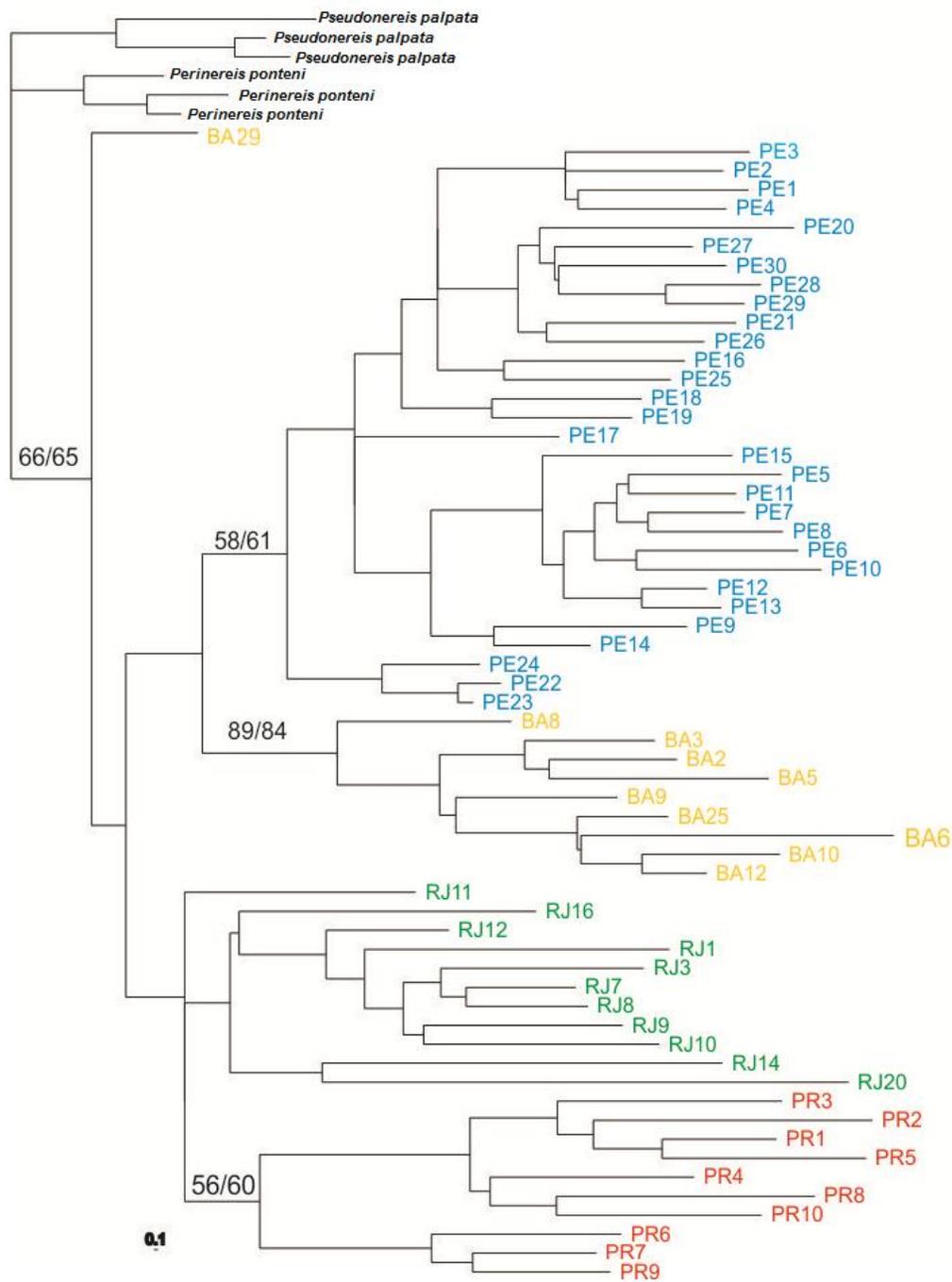


Figura 11: Topologia de Neighbor-Joining com os exemplares de *Alitta succinea* coletados em Pernambuco (PE), Bahia (BA), Rio de Janeiro (RJ) e Paraná (PR), evidenciando a presença de dois ramos principais que separam as 4 populações em dois grupos, Nordeste/Sudeste-Sul (NE/SE-S). Os valores de Bootstrap/Jackknife encontram-se indicados nos ramos.

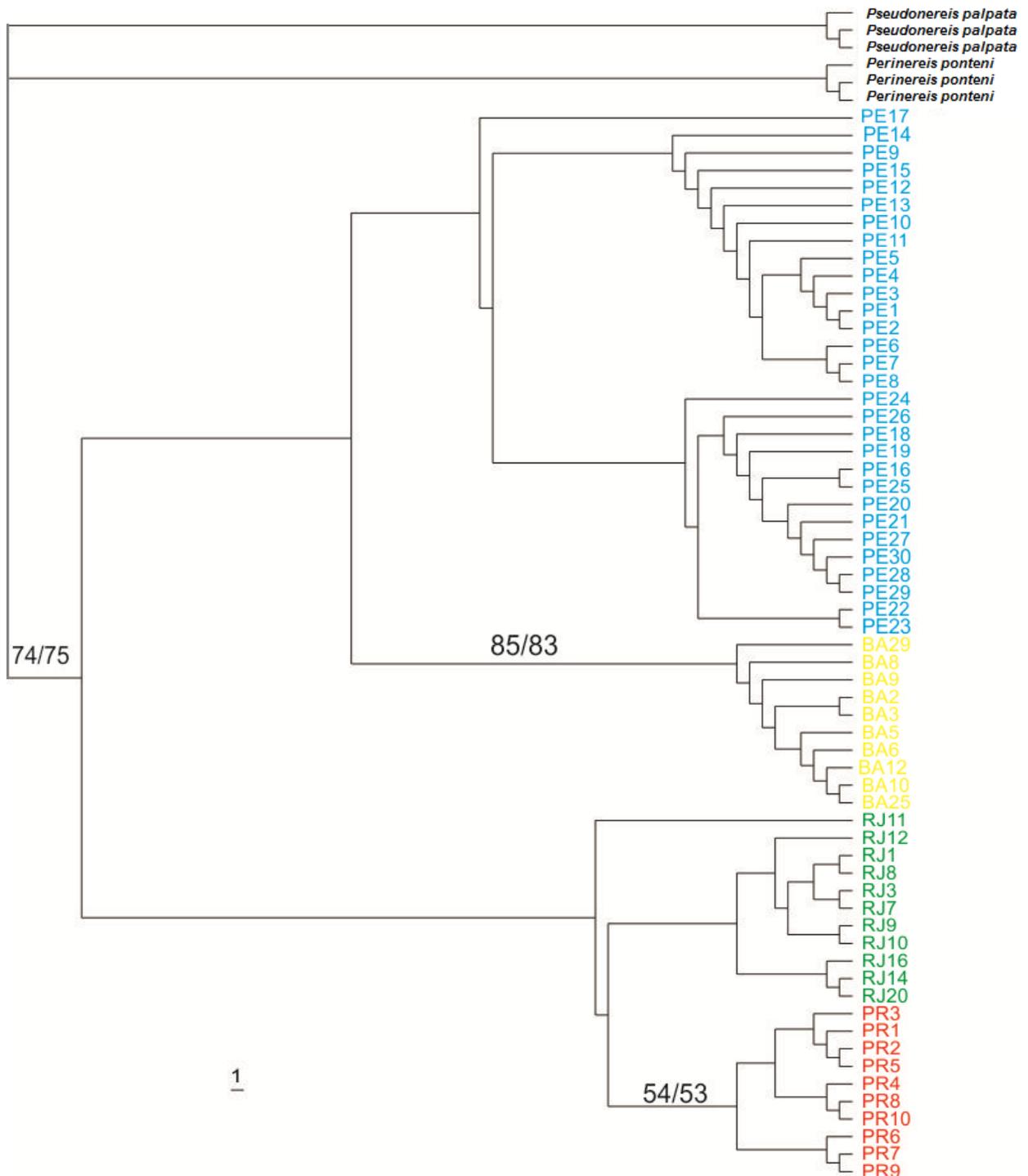


Figura 12: Topologia de Máxima Parcimônia com os exemplares de *Alitta succinea* coletados em Pernambuco (PE), Bahia (BA), Rio de Janeiro (RJ) e Paraná (PR), evidenciando a presença de dois grupos monofiléticos principais que separam as 4 populações em dois em dois clados Nordeste/Sudeste-Sul (NE/SE-S). Os valores de Bootstrap/Jackknife encontram-se indicados nos ramos.

SIMULAÇÃO BAYESIANA (STRUCTURE)

Os resultados relativos ao teste de estruturação populacional (Figura 13 e 14) pela análise Bayesiana revelaram a existência de $K=2$ populações genéticas pelos dados de verossimilhança. Porém, não houve diferença estatística ($X^2=0,067$; $p=0,79$) entre os valores de ΔK para $K=2$ e $K=3$. Assim, assume-se que a estruturação populacional pela análise Bayesiana revelou a existência de três populações genético-evolutivas em *A. succinea* local/regionalmente localizadas evidenciando a população da Bahia como intermediária entre a população de PE e as populações mais ao sul (RJ e PR).

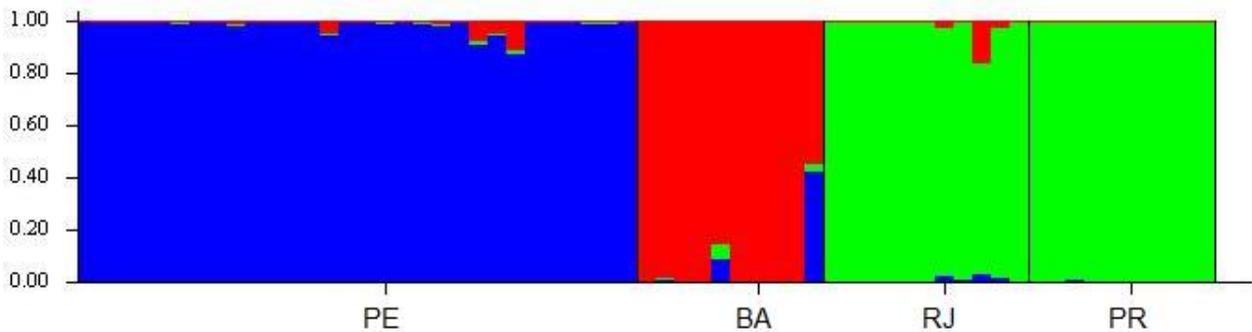


Figura 13: Estruturação bayesiana mostrando a existência de três populações genéticas para *Alitta succinea*.

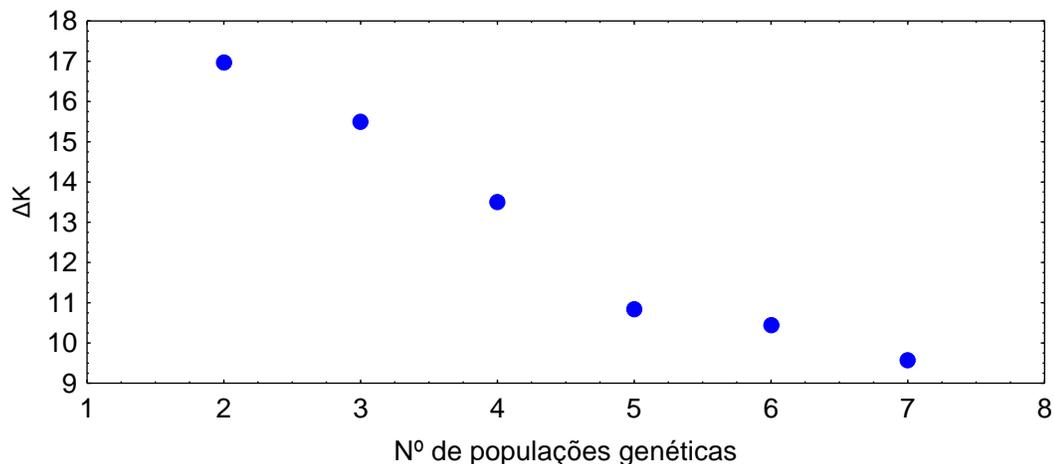


Figura 14: Gráfico mostrando os valores de ΔK e nº de populações genéticas obtidas pela análise Bayesiana de estruturação populacional de *Alitta succinea*.

AMOVA

A análise de variância molecular (AMOVA) global evidenciou que 59,86% da variação total é encontrada dentro das populações estudadas e 40,14% entre as populações, com índice com índice F_{ST} global igual a 0,401 (Tabela 9). No que diz respeito ao índice F_{ST} , valores entre 0 e 0,05 indicam falta de estruturação genética, entre 0,05 e 0,15 indicam pouca estruturação, entre 0,15 e 0,25 média estruturação, entre 0,25 e 1 grande grau de estruturação e superior a 1 indica altíssima diferenciação (Wright, 1978), caracterizando uma espécie diferente. Nosso resultado indica uma alta diferenciação entre as populações, mas todas elas pertencentes a uma única espécie, não caracterizando um complexo de espécies crípticas como anteriormente se suspeitava.

A AMOVA foi realizada também para os dois grupos (NE/SE-S), baseado nas topologias obtidas (Tabela 10). Este segundo teste de estruturação evidenciou que 58,16% da variação genética se encontra dentro das populações, 33,18 % entre as populações dentro dos grupos e 8,66% entre os grupos. Tal resultado foi corroborado com os índices de fixação, sendo o maior componente da variância corresponde àquela encontrada dentro das populações ($F_{ST} = 0,418$) e em segundo lugar se encontra a variância entre as populações, dentro dos grupos ($F_{SC} = 0,363$) e a variância entre os grupos (F_{CT}) não teve significância estatística.

Tabela 9: Resultados da análise de variância molecular para todas as populações estudadas de *Alitta succinea* ao longo da costa do Brasil. gl= graus de liberdade.

<i>Fonte de variação</i>	<i>gl</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Componentes da variância</i>	<i>Percentual de variação</i>
Entre populações	3	322.636	7.09748 Va	40.14
Dentro das populações	57	603.364	10.58533 Vb	59.86
Total	60	926.000	17.68281	

$F_{ST} = 0.40138$

Tabela 10: Resultados da análise de variância molecular para as populações estudadas de *Alitta succinea* compondo dois grupos distintos (NE/ SE-S) ao longo da costa do Brasil. gl= graus de liberdade; n.s.= não significante.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Gl</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Componentes da variância</i>	<i>Percentual de variação</i>
Entre grupos	1	147.619	1.57536 Va	8.66
Entre as populações, dentro dos grupos (NE/ SE-S)	2	175.017	6.03884 Vb	33.18
Dentro das populações	57	603.364	10.58533 Vc	58.16
Total	60	926.000	17.68281	60

Índices de fixação $F_{CT} = 0.08656$ (n.s)
 $F_{SC} = 0.36326$ ($p < 0,01$)
 $F_{ST} = 0.41837$ ($p < 0,01$)

PARÂMETROS DE GENÉTICA POPULACIONAL

Os parâmetros de genética populacional apresentaram valores globais para $G_{ST} = 0,298$ e $N_m = 1,17$. A análise pareada revelou que 83,33% das comparações tiveram um G_{ST} maior do que 0,15, porém menor do que 0,25 e 16,67% um G_{ST} maior do que 0,25. Além disso, observa-se um alto valor de número de migrantes, sendo acima de 1 para todas as relações pareadas. Tais resultados estão sumarizados na tabela 11.

Segundo Nei (1987) e Meirmans & Hedrick (2011) para uma diferenciação genética moderadamente grande, o G_{ST} varia de 0,15 até 0,25, e uma forte diferenciação genética possui $G_{ST} \geq 0.25$.

Tabela 11: Valores de GST (acima da diagonal) e Nm (abaixo da diagonal) obtidos entre as amostras estudadas de *Alitta succinea*.

	<i>PE</i>	<i>BA</i>	<i>RJ</i>	<i>PR</i>
<i>PE</i>	-	0,2	0,18	0,23
<i>BA</i>	1,92	-	0,22	0,27
<i>RJ</i>	2,19	1,7	-	0,17
<i>PR</i>	1,6	1,3	2,28	-

5. DISCUSSÃO

5.1 DADOS MERÍSTICOS DAS PARAGNATAS

A forma, distribuição e número das paragnatas na probóscide de poliquetas parecem ser relacionados com os mecanismos de escavação e alimentação (Dales, 1950), ou ao tipo de sedimento em que vivem (Garcia-Arberas & Rallo, 2000). As populações de *Alitta succinea* apresentaram diferenças no número de paragnatas, com as populações do SE-S apresentando maior número. Todos os indivíduos estudados foram capturados em ambientes estuarinos, vivendo em associação aos bancos de bivalves (ostras e mariscos) incrustados em boias, píers, costões rochosos ou nas raízes de mangues, compondo a epifauna, com bastante material em suspensão, independentemente das variações regionais. Os nereidídeos possuem estruturas especializadas para a macrofagia (predação), com mandíbulas desenvolvidas, paragnatas e faringe eversível (Fauchald & Jumars, 1979). Entretanto, muitas populações também apresentam hábitos micrófagos (sedimentívoria, suspensívoria), mesmo com estas estruturas (Costa et al, 2006; Pardo & Dauer, 2003).

Com base nas diferenças encontradas no número total de paragnatas para as populações de *Alitta succinea* do PA, PE, BA (maior quantidade de paragnatas) RJ e PR (menor número de paragnatas) e sabendo-se que pode haver variação na dieta e dominância de um modo de alimentação (macrofagia ou microfagia), entre populações diferentes de uma mesma espécie de nereidídeo (Pardo & Dauer, 2003; Rouabah et al.,

2009), sugere-se ser possível que esta variação ocorra entre as populações de *Alitta succinea* estudadas, e que a preferência alimentar possa afetar no número total de paragnatas. Porém, uma investigação acerca da sedimentação local resultante do efeito físico causado pelo banco de bivalves (Dame, 1996) deve ser realizada, pois uma maior sedimentação local acarreta a preferência pela microfagia (hábito comedor de depósito) por parte dos nereidídeos.

Um estudo realizado por Garcia-Arberas & Rallo (2000) com a espécie *Hediste diversicolor* (O.F. Muller, 1776), em estuários da costa de Basque (França) evidenciou que as maiores diferenças encontradas por meio do teste ANOVA foram para as regiões da probóscide I, III e VII-VIII. Estas áreas foram as que mais contribuíram para a variação interpopulacional. Já os resultados do presente estudo, que abrange uma extensão de costa bem maior (> 5000 km), mostram que algumas das mesmas áreas da probóscide acima também apresentaram diferenças significativas entre os locais, sendo a área I apenas marginalmente significativa ($p=0,058$). As áreas IV e V também contribuíram para a diferenciação das populações, pois a Análise Discriminante Múltipla evidencia que as áreas III, IV, V e VII-VIII são as áreas que possuem força discriminatória significativa atuando na separação das populações nos dois grupos geográficos.

Dentre as áreas que contribuíram para a diferenciação entre as populações estudadas de *A. succinea* (III, IV, V e VII-VIII), a única área que obteve um baixíssimo valor de Wilks' lambda (maior força discriminatória) e maior F estatístico foi a área III, sendo as demais possuidoras de valores próximos a 1 para Wilks' lambda (menor força discriminatória) (Tabela 5). Na figura 9 visualiza-se que apenas uma função canônica atua na distinção entre os dois grupos geográficos, e seu principal componente é a área III. Ou seja, para as populações de *Alitta succinea* ocorrentes ao longo da costa brasileira, aqui estudada, a área III pode ser usada sozinha na diferenciação das populações entre os grupos N-NE / SE-S (ver figura 9).

Comparando resultados de outros trabalhos de estudo da variação no número de paragnatas semelhantes a este (Scaps et al., 2000; Maltagliati et al., 2001; Bretton et al., 2004 e Rouabah et al., 2009) detecta-se a área III da probóscide como sendo a área mais importante para a diferenciação entre populações de nereidídeos de forma global

sendo as demais áreas com importância apenas local para a diferenciação de populações.

Pela análise de SIMPER, os dados aqui obtidos foram validados, visto que mais uma vez a área III foi detectada como sendo a área mais variável dentre todas as áreas da probóscide de *A. succinea*. Além disso, foi evidenciado que as áreas VII-VIII foram mais conservadas no conjunto de dados analisados. Tais evidências sugerem que a área VII-VIII não é recomendada para a distinção populacional de *Alitta succinea* para a costa do Brasil.

Analisando o modo como ocorre a variação do número de paragnatas total da probóscide de *Alitta succinea* das populações do PA, PE, BA, RJ e PR, detectou-se uma mudança gradual da quantidade de paragnatas ao longo de uma orientação geográfica, de menor (PA) à maior (PR), no sentido norte-sul. Tal evidência sugere, de acordo com a descrição de Futuyma (1998) a ocorrência de um cline, para tal caráter em *A. succinea*.

5.2 DADOS MOLECULARES

Os resultados obtidos pelos marcadores *ISSR* acerca da análise de variação intra e interpopulacional em *Alitta succinea* indicou uma alta variação genética. Estudos de variabilidade genética de espécies invasoras têm revelado que baixa variabilidade indica uma única invasão devido a um número pequeno de indivíduos constituintes da população invasora (princípio do fundador) (Tsutsui et al., 1999; Grapputo et al., 2005; May & Marsden, 2011). Assim, os dados aqui obtidos sugerem mais de uma invasão de *A. succinea* na costa brasileira. Este resultado é sustentado pela forma de introdução ou invasão desta espécie em vários locais do mundo, por água de lastro e/ou incrustados nas embarcações (Wilson, 1999; Hewitt et al., 2004), pois são formas fáceis de introdução e que facilitam a ocorrência de invasões múltiplas. Sendo o Brasil, um país com grande recebimento de navios internacionais, os grandes portos brasileiros, foram possivelmente os primeiros locais a serem colonizados por esta espécie.

As análises de Neighbor-Joining (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) evidenciaram a formação de agrupamentos que se apoiam mutuamente, sugerindo a ocorrência de dois agrupamentos genético-evolutivos distintos (Nordeste/Sudeste-Sul).

A topologia de NJ sugere que a população do RJ possui a maior variação intraespecífica, visto que não obteve suporte estatístico de ramo minimamente satisfatório (75%). Diferente do que foi obtido na análise das paragnatas, uma vez que a amostra do RJ se caracterizou pela menor variação intrapopulacional. Tal diferença exige que mais dados sejam obtidos a fim de elucidar estes resultados.

A topologia de MP detectou a existência de dois grupos monofiléticos (NE/ SE-S). Tal evidência reforça a hipótese de mais de uma invasão de *A. succinea* previamente sugerida e embasada no alto patamar de variação genética da espécie. Além disso, a mesma topologia argumenta em favor de uma orientação geográfico-cronológica do tipo SE-S/NE da invasão de *A. succinea*, tendo em vista a posição basal do clado Sudeste/Sul (Figura 12).

As análises de variância molecular (AMOVA) globais (Tabelas 9 e 10) indicam que as maiores variações se encontram dentro das populações estudadas. Em geral, espécies de invertebrados marinhos e estuarinos apresentam um padrão de alta diversidade genética dentro da população, devido às características da história de vida dos mesmos (grande poder dispersivo das larvas e/ou gametas, alto nível de fecundidade, grande tamanho populacional) (Breton et al., 2003; Pannacciulli et al., 2009; Fernández et al., 2011; Kesaniemi et al., 2012; Fadhlouli-Zid et al., 2012). Portanto, os dados aqui obtidos reforçam tal hipótese, tendo em vista o padrão de estratificação da variância molecular observado para *A. succinea*. As AMOVAs também mostraram um alto valor do índice de fixação intraespecífica da variação genética (F_{ST} globais) da ordem de 0,401 e 0,418. Estes patamares de F_{ST} argumentam em favor de uma acentuada distinção genético-evolutiva das populações de *A. succinea*, uma vez que $F_{ST} \geq 0,25$ indica alta estruturação (Hartl & Clarck, 2010).

Os dados globais de diferenciação genética (G_{ST}) e fluxo gênico indicaram forte distinção genético-evolutiva ($G_{ST} = 0,29$), seguida de um fluxo gênico histórico suficiente para a homogeneização das populações de *A. succinea*. Tal circunstância sugere uma condição biológica contrastante: diferenciação com fluxo gênico. Assim, o fenômeno

aqui detectado reforça a possibilidade de descontinuidade populacional com fluxo gênico, o que poderia ser explicado pela possível recente invasão desta espécie no Atlântico. A comparação par-à-par do índice de fixação G_{ST} reforça tal hipótese tendo em vista que todos os valores observados denotam grande diferenciação genética (Tabela 11). Tal diferenciação ainda parece ser independente da distância geográfica, dado que o teste de correlação de Spearman não sugere forte relação entre as variáveis de distância genética e distância geográfica. Assim, a intensa diferenciação populacional observada entre as populações de *A. succinea* parece ser melhor explicada pelo efeito de recrutamento autóctone das migrações verticais da espécie em termos reprodutivos (epitoquia), intensificando o isolamento genético-evolutivo.

5.3 ABORDAGEM BIOGEOGRÁFICA

No presente trabalho, a corroboração entre grande parte dos dados obtidos pelas análises merísticas do número das paragnatas na probóscide de *Alitta succinea* (Análise de cluster, MDS) e das análises moleculares (Topologias de NJ, MP e Estruturação Bayesiana) indicam a divergência entre as populações. Segundo a análise de estruturação Bayesiana, a população que representa o elo entre as populações estudadas parece ser a Bahia, visto que apresenta um perfil genético particular, mas também componentes das outras populações genéticas das outras localidades estudadas (Figura 13).

Pelas análises de MDS e de Cluster (Figuras 6 e 7) foi possível visualizar grande conectividade entre os exemplares dos dois grupos geográficos (N-NE/ SE-S), mas não foi possível a visualização das cinco populações separadamente (Figura 7). As topologias de NJ e MP (Figuras 11 e 12) não apoiaram a evidência de grande conectividade entre os dois grupos geográficos e, associado aos dados de genética populacional (Tabela 11), evidenciaram populações isoladas. Esta incongruência pode ser explicada pelo fato que espécies invasoras normalmente apresentam grande plasticidade adaptativa a ambientes exóticos. Além disso, também é sabido que a seleção natural atua originalmente sobre os fenótipos (Futuyma, 1998). Portanto, homogeneidade morfológica entre indivíduos e/ou populações com variação genética e

isolamento evolutivo pode ser um fenômeno esperado em espécies invasoras como *A. succinea*.

Os dados obtidos pela análise discriminante múltipla (Tabela 6) mostraram que 67,7% dos indivíduos analisados representaram corretamente a sua origem geográfica. Já os demais (32,3%) foram agrupados em outras populações, porém pertenceram ao mesmo grupo geográfico. Esta evidência sugere que os dados merísticos acessados foram resolutivos na detecção dos dois grupos geográficos, o que corroborou as análises genético-evolutivas. Tal evidência reforça, sobretudo, a estruturação geográfica de duas unidades evolutivas, uma na costa Nordeste e outra da costa Sudeste-Sul do Brasil (Figuras 11 e 12).

Conectividade entre as populações geográficas de uma espécie é necessária para manter a integridade do material genético ao longo de sua distribuição. Barreiras para o fluxo de genes entre os indivíduos com vida pelágica durante toda, ou apenas uma parte da vida como no ciclo reprodutivo de *A. succinea*, muitas vezes não são tão evidentes e diferem dependendo da distribuição espacial desta espécie (Blanco et al., 2011). A separação das populações de *A. succinea* em dois grupos (N-NE / SE-S) parece ser resultado de um conjunto de fatores. O conjunto de dados aqui obtidos sugere a direta associação dos grupos genético-evolutivos com a presença de duas grandes barreiras biogeográficas que afetam o transporte de ovos, larvas ou indivíduos de *A. succinea* no seu processo de dispersão: a Cadeia Submarina de Vitória-Trindade (CSVT) e o fenômeno de Ressurgência de Arraial do Cabo (RAC).

No litoral brasileiro encontramos várias correntes atuando. Entre elas, a corrente Sul-Equatorial do oceano Atlântico, movimentando-se no sentido leste-oeste que sofre uma bifurcação ao alcançar a costa nordestina brasileira (Campos, 1995). A corrente que se desvia para o norte é denominada corrente Norte do Brasil. Este padrão parece ajustar-se à estreita conexão merística das paragnatas entre a população de *A. succinea* de PE com aquela do PA, visto que elas possuem altíssimo valor de similaridade (0,999) (Tabela 4).

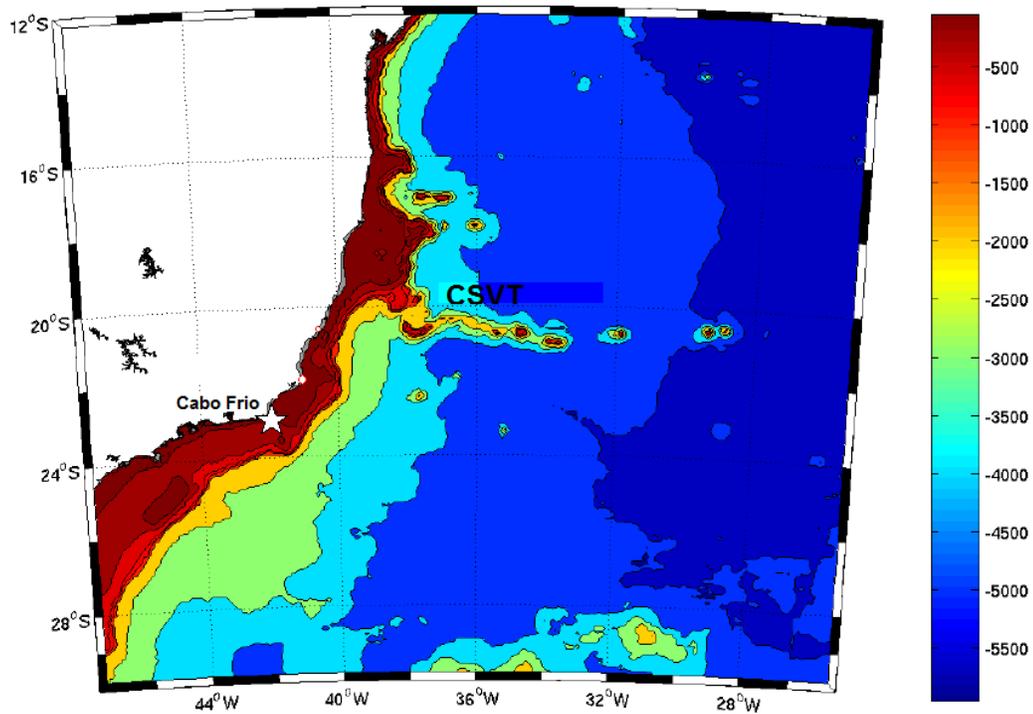


Figura 15: Batimetria do litoral sudeste e sul do Brasil, evidenciando as duas prováveis barreiras biogeográficas que atuam na separação das populações de *A. succinea* da costa brasileira em dois grupos (N-NE / SE-S). Cadeia Submarina de Vitória-Trindade (CSBV) e Cabo Frio (☆). (Modificado de Neves, 2006).

A corrente que se volta para o sul é a corrente do Brasil, que corre superficialmente e caminha sobre a plataforma, sendo a principal responsável pela conexão entre as populações de PE, BA, RJ e PR (Campos, 1995; Signorini, 1976). Por volta de 20,5° S (sete graus de latitude abaixo do ponto de coleta da BA e dois graus acima do ponto de coleta do RJ), a Corrente do Brasil encontra a CSVT (Figura 15), a qual atua como uma barreira para a circulação oceânica, conseqüentemente, atua como barreira para a dispersão das larvas planctônicas de *Alitta succinea*.

A CSVT apresenta orientação predominante leste-oeste e se estende da quebra da plataforma continental até 28,5° W, atingindo a superfície em dois pontos: Ilha da Trindade (20,5°S; 29,3° W) e Ilha de Martin Vaz (20,5° S; 28,8° W). A corrente do Brasil utiliza dois canais profundos na porção oeste da CSVT. O maior transporte da água ocorre no canal mais próximo à costa (Caspel, 2009). Este fenômeno explica a conexão

histórica entre as populações localizadas acima (PA, PE e BA) da CSVT com aquelas localizadas abaixo dela (RJ e PR), observada pelo número de migrantes (Tabela 11).

Ao sul da CSVT na latitude de Cabo Frio (23°S) (Figura 15) a orientação da costa sofre uma brusca modificação passando de norte-sul para leste-oeste. Essa mudança de orientação da linha de costa, associada a ventos de nordeste que ocorrem na primavera e no verão, geram uma forte ressurgência de água profunda e fria sobre a plataforma continental (Rodrigues & Lorenzetti, 2001; Silveira et al., 2000). Este fenômeno hidrológico particular associa-se com o limite geográfico de muitas espécies (Yoneshigue, 1985; Guimarães & Coutinho, 1995) e, provavelmente, pela divisão populacional observada em *Alitta succinea*, entre Sudeste-Sul e Nordeste, como também pela maior conectividade genético-evolutiva e morfológica das populações locais do RJ e PR.

Em suma, a corroboração dos dados merísticos e moleculares se fez essencial para lançar luz acerca dos fenômenos que regem a remanescente conexão e crescente diferenciação entre as populações estudadas de *Alitta succinea* da costa brasileira, evidenciando o grande poder dispersivo de suas larvas e a ação de barreiras biogeográficas no transporte das mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. S.; SODRE, L. M. K.; CONTEL, E. P. B. 2003. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiete and Paranapanema River (Brazil). *Genet. Mol. Biol.*, 26 (3): 301-305.

AMARAL, A. C. Z.; RIZZO, A. & ARRUDA, E. P. 2005. Manual de identificação dos invertebrados marinhos da região sudeste-sul do Brasil: vol 1. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 26, 288p.

AMARAL, A.C.Z.; NALLIN, S.A.H.; STEINER, T.M.; FORRONI, T.O. & GOMES FILHO, D. (2006-2012) Catálogo das espécies de Annelida Polychaeta do Brasil. http://www.ib.unicamp.br/museuzoologia/files/lab_museu_zoologia/Catalogo_Polychaeta_Amaral_et_al_2012.pdf (Consultado em 20/III/2012).

APPELTANS, W. et al. 2012. The Magnitude of Global Marine Species Diversity. *Current Biology* 22, 2189–2202.

ARIAS, A.; FERNÁNDEZ-MORENO, M.; FERNÁNDEZ-TAJES, J.; GASPAR, M. B. & MÉNDEZ J. 2011. Strong genetic differentiation among east Atlantic populations of the sword razor shell (*Ensis siliqua*) assessed with mtDNA and RAPD markers. *Helgol Mar Res*, 65:81–89.

BAKKAPPA, S.; TALEBI, E. & SUBRAMANIA, G. 2011. Role of molecular markers (RAPD & ISSR) in silkworm conservation. *International Journal of Advanced Biological Research*, 1, 01-07.

BAKKEN, T. & WILSON, R. S. 2005. Phylogeny of nereidids (Polychaeta, Nereididae) with paragnaths. *The Norwegian Academy of Science and Letters. Zoologica Scripta*, 34, 5.

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

BAKKEN, T. & WILSON, R. S. 2005. Phylogeny of nereidids (Polychaeta, Nereididae) with paragnaths. *Zoologica Scripta*. 34(5): 507–547.

BAKKEN, T. 2004. A revision of Nereidinae (Polychaeta, Nereididae). 196 p. Tese (Doutorado em Natural History)- Norwegian University of Science and Technology.

BAKKEN, T.; GLASBY, C.J.; WILSON, R.S. 2009. A review of paragnath morphology in Nereididae (Polychaeta). *Zoosymposia* 2: 305-316.

BARNES, B. B., LUCKENBACH, M. W. & KINGSLEY-SMITH, P. R. (2010). Oyster reef community interactions: The effect of resident fauna on oyster (*Crassostrea* spp.) larval recruitment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 391: 169–177.

BARROSO, R.; KLAUTAU, M.; SOLÉ-CAVA, A. M. & PAIVA, P. C. 2010. *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae), the 'cosmopolitan' fireworm, consists of at least three cryptic species. *Marine Biology*, 157, 69-80.

BLANCO-BERCIAL, L.; ALVARÉZ-MARQUÉS, F. & BUCKLIN, A. 2011. Comparative phylogeography and connectivity of sibling species of the marine copepod *Clausocalanus* (Calanoida). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 404, 108–115.

BRETON, S.; DUFRESNE, F.; DESROSIERS, G. & BLIER, P. 2004. Morphological variation in *Nereis (Neanthes) virens* (Polychaeta: Nereididae) populations. *Journal of Marine Biological Association U.K.*, 84, 983-985.

BRETON, S.; DUFRESNE, F.; DESROSIERS, G. & BLIER, U. 2003. Population structure of two northern hemisphere polychaetes, *Neanthes virens* and *Hediste diversicolor* (Nereididae), with different life-history traits. *Marine Biology*, 142: 707–715.

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

BRITTO F. B. et al. 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.

CALENDINI, F. & MARTIN, J. F. 2005. PaupUP v1.0.3.1 A free graphical frontend for Paup* Dos software.

CAMPBELL, M. L., THRESHER, R. E. & MARTIN, R. B. (Eds.). Marine biological invasions of Port Phillip Bay, Victoria. Centre for Research on Introduced Marine Pests. CSIRO Marine Research: Hobart. CRIMP Technical Report, 20. Victoria, Australia. 108–128 p.

CAMPOS, E. J. D. 1995. Estudos da circulação oceânica no Atlântico tropical e região oeste do Atlântico Subtropical Sul. Tese de livre docência. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico.

CASPEL, M. R. 2009. Sobre a variabilidade temporal do transporte de volume da Corrente do Brasil nas imediações da Cadeia Submarina Vitória-Trindade. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica). Universidade Federal do Rio Grande.

CASTILHO-WESTPHAL, G. G. 2012. Ecologia da ostra do mangue *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) em manguezais da Baía de Guaratuba-PR. 118p. Tese (Doutorado em Zoologia)- Universidade Federal do Paraná.

CASTILHO-WESTPHAL, G. G. 2012. Ecologia da ostra do mangue *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) em manguezais da baía de Guaratuba-PR. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Zoologia). Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

CLARKE, K.R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

structure. Australian Journal of Ecology, 18, 117–143.

CONRAD, D.F. & HURLES, M.E. 2007. The population genetics of structural variation. Nature Genetics Supplement, 39: 30-36.

COSTA, P. F.; OLIVEIRA, R. F & FONSECA, L. C. 2006. Feeding Ecology of *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) (Annelida, Polychaeta) on Estuarine and Lagoon Environments in the Southwest Coast of Portugal. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 1 (2): 114-126.

DAME, R. F., 1996. Ecology of Marine Bivalves: an Ecosystem Approach. CRC Press, Boca Raton, Fla. U.S.A.: 272 pp.

DAUER, D. M. 1973. Polychaete fauna associated with Gulf of Mexico sponges. Florida Sci. 36: 192–195.

DAUER, D. M., G. H. TOURTELLOTTE & R. M. EWING. 1982. Oyster shells and artificial worm tubes: the role of refuges in structuring benthic infaunal communities. Int. Rev. Ges. Hydrobiol. 67:661–677.

DETWILER, P. M., COE, M. F. & DEXTER, D. M. 2002. The benthic invertebrates of the Salton Sea: distribution and seasonal dynamics. Hydrobiologia 473: 139-160.

DOONAN, J.; BEATTY, G. E.; SIGWART, J. D. & PROVAN, J. 2011. Extensive local-scale gene flow and long-term population stability in the intertidal mollusc *Katharina tunicata* (Mollusca: Polyplacophora). Biological Journal of the Linnean Society, ••, ••–••.

EXCOFFIER, L. & LISCHER H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. 10: 564-567.

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

FADHLAOUI-ZID, K. et al. 2012. Genetic structure of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda, Octopodidae) in the central Mediterranean Sea inferred from the mitochondrial COIII gene. *Comptes Rendus Biologies*, 335, 625-636.

FALUSH, D.; PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked Loci and correlated allele frequencies. *Genetics*; 164: 1567–1587.

FAUCHALD, C. & JUMARS, P. 1979. The diet of worms: a study of polychaete feeding guilds. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 17, 193-284.

FERNÁNDEZ, M. V.; MALTAGLIATI, F.; PANNACCIULLI, F. G. & ROLDÁN, M. I. 2011. Analysis of genetic variability in *Aristaeomorpha foliacea* (Crustacea, Aristeidae) using DNA-*ISSR* (Inter Simple Sequence Repeats) markers. *Comptes Rendus Biologies*, 334, 705–712.

FITCH, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. *Systematic Zoology* 20 (4): 406-416.

FITCH, W. M. 1971. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, 20: 406-416.

FITZHUGH, K., 1987. Phylogenetic relationships within the Nereididae (Polychaeta): Implications at the subfamily level. *Bulletin of the Biological Society of Washington*, 7, 174-183.

FRANKHAM R; BALLOU J. D. & BRISCOE D. A. 2008. Fundamentos de genética da

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 280p

FREELAND, J.R. 2005. Molecular Ecology. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 388p.

FUTUYMA, D. J. 2008. Biologia Evolutiva. 3ª Ed. Editora FUNPEC. 830p.

GARCIA-ARBERAS, L. & RALLO, A. 2000. Variations in paragnath number of Hediste diversicolor from the Basque coast in relation of habitats conditions. Journal of Marine Biological Association U.K, 80,733-734.

GARRAFONI, A. R. S. 2006. Morfologia da região cefálica e dos uncini parapodiais, análise cladística e biogeografia da família Terebellidae (Annelida: Polychaeta). Tese (Doutorado em Ciências). Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

GIRARD, T. C. 2009. Dinâmica populacional de *Lepidophthalmus siriboia* Felder & Rodrigues, 1993 (Decapoda: Callinassidae) da ilha de Maiandeuá-PA. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca), Universidade Federal do Pará.

GISD (Global Invasive Species Database). 2007. *Alitta succinea*. <http://www.issg.org/database/species/ecology> (Consultado em 20/XII/2012).

GLASBY, C. J. & FAUCHALD, K. 2002. POLiKEY. An information system for polychaete families and higher taxa, version 2. <http://www.environment.gov.au/biodiversity/abrs/online-resources/polikey/index.html>. (Consultado em 26/XII/2012).

GLASBY, C. J. & TIMM, T. 2008. Global diversity of polychaetes (Polychaeta; Annelida) in freshwater. Hydrobiologia. 595: 107–115.

GLASBY, C. J. & TIMM, T. 2008. Global diversity of polychaetes (Polychaeta: Annelida) in freshwater. Hydrobiologia, 595: 107-115

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

GLASBY, C. J. 1993. Family revision and cladistic analysis of the Nereidoidae (Polychaeta: Phyllodocida). *Invertebrate Taxonomy*, 7, 1551-1573.

GOULD, S. J. 1966. Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biol. Rev.* 41, p. 587-640.

GRAPPUTO, A.; BOMAN, S.; LINDSTROM, L.; LYTTINUS, A.; MAPPES, J. 2005. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular Ecology* 14, 4207–4219.

GUIMARAENS, M. A. & COUTINHO, R. 1996. Spatial and temporal variation of benthic marine algae at the Cabo Frio upwelling region, Rio de Janeiro, Brazil. *Aquatic Botany* 52, 283-299.

Hardege, J. D. 1999. Nereid polychaetes as model organism for marine chemical ecology: A review. *Hydrobiologia*. 402: 145–161.

HATJE, V. & BARROS, F. 2012. Overview of the 20th century impact of trace metal contamination in the estuaries of Todos os Santos Bay: Past, present and future scenarios. *Marine Pollution Bulletin* 64, 2603–2614.

HEWITT, C. L et al. 2004. Introduced and cryptogenic species in Port Phillip Bay, Victoria, Australia. *Marine Biology*. 144: 183–202.

HUBISZ; M. J.; FALUSH; D.; STEPHENS; M.; PRITCHARD; J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1322-1332.

HUTCHINGS P. A. 1998. Biodiversity and functioning of polychaetes in benthic sediments. *Biodiversity and Conservation* 7, 1133-145.

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

HUTCHINGS, P. A. et al. 2000. Appendix 1. In: BEESLEY, P. L.; ROSS G. J. B. & GLASBY C. J. Polychaetes and Allies: the Southern Synthesis (pp. 242–243). Melbourne: CSIRO Publishing.

INVASIVE SPECIES SPECIALIST GROUP (ISSG). 2007. Ecology of *Alitta succinea*. <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=1068&fr=1&sts=&lang=EN>. (Consultado em 25/II/2013).

IPUCHA, M. C. 2006. Caracterização citogenética de Nereididae (Annelida: Polychaeta), como auxílio nas relações filogenéticas das espécies ocorrentes no Paraná. 62p. Dissertação (Mestrado em Genética). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

KASZNAR, I. K. 2012. Análise Discriminante Múltipla: O que é, para que serve e como se faz. IBCI – Institutional Business Consultoria Internacional. www.ibci.com.br. (Consultado em 20/XII/2012).

KESANIEMI, J. E.; RAWSON, P.D.; LINDSAY, S.M. & KNOTT, K.E. 2012. Phylogenetic analysis of cryptic speciation in the polychaete *Pygospio elegans*. *Ecology and Evolution*, 2(5):994–1007.

KINBERG, J. G. H. 1865. Annulata nova. Nereidum dispositio nova. Öfversikt af Kongliga Svenska Vetenskaps Akademiens Förhandlingar, 22, 167–179.

Khlebovich V. V. 1996. Polychaetes of the family Nereididae of the Russian seas and the adjacent area. Fauna of Russia and neighbouring countries. Polychaetous Annelids. 3, "Nauka" Publishing House, St. Petersburg.

KRUSE, I.; REUSCH T.B.H. & SCHNEIDER, M.V. 2003. Sibling species or poecilogony in the polychaete *Scoloplos armiger*? *Marine Biology*, 142: 937–947.

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

LOWE, W. H. & ALLENDORF, F. W. 2010. What can genetics tell us about population connectivity? *Molecular Ecology* 19, 3038–3051.

MALTAGLIATI, F. et al. 2005. Taxonomic distinction of *Ophelia barquii* and *O. bicornis* (Annelida: Polychaeta) in the Mediterranean as revealed by ISSR markers and the number of nephridiopores. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 85, 835-841.

MALTAGLIATI, F.; CAMILLI, L.; LARDICCI, C. & CASTELLI, A. 2001). Evidence for morphological and genetic divergence in *Perinereis cultrifera* (Polychaeta: Nereididae) from two habitat types at Elba Island. *Journal of Marine Biological Association U.K.* 81, 411-414.

MARGALEF, R. 1980. *Ecologia*. Ed. Omega, Barcelona: 951 p.

MASI, B. P. & ZALMON, I. R. 2008. Zonação da comunidade bêntica do entremarés em molhes sob diferente hidrodinamismo na costa norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25, 662-673.

MAY, B & MARSDEN, E. 2011. Genetic Identification and Implications of Another Invasive Species of Dreissenid Mussel in the Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49, 1501-1506.

MEIRMANS, P. G. & HEDRICK, P. W. 2011. Assessing population structure: FST and related measures. *Molecular Ecology Resources*, 11: 5–18.

MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. M.; PEREIRA, S. L. 2001. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: *Biologia Molecular e Evolução*. MATIOLI, S. R. Editora Holos, Riberão Preto-SP, 97-107.

MORAES, D. A. 2003. A Morfometria Geométrica e a sua “Revolução na Morfometria”: localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. *Bioletim*, ano III, nº3.

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

MUUS, B. J. 1967. The fauna of Danish estuaries and lagoons. Med Danmarks Fiskeri Havund. 5: 1–316.

NEI, M. 1975. Molecular population genetics and evolution. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 288p.

NEVES, A. A. S. 2006. Análise da viabilidade de um programa operacional de oceanografia baseado em altimetria por satélites para a bacia de Campos-RJ. 46p. Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

NEVES, C. S. & ROCHA, R. M. 2008. Introduced and cryptogenic species and their management in Paranaguá Bay, Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology. 51(3): 623–633.

NITHART, M. 2000. Comparison of stable carbon and nitrogen isotope signatures of the polychaete *Nereis diversicolor* from different estuarine sites. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 80:763-765.

NYGREN, A. & PLEIJEL, F. 2011. From one to ten in a single stroke – resolving the European *Eumida sanguinea* (Phyllodoceidae, Annelida) species complex. Molecular Phylogenetics and Evolution 58, 132–141.

NYGREN, A.; NORLINDER, E.; PANOVA, M. & PLEIJEL, F. 2011. Colour polymorphism in the polychaete *Harmothoe imbricata* (Linnaeus, 1767). Marine Biology Research, 7: 54-62.

ODUM, E. P. 1988. Ecologia. Editora Guanabara Koogan S.A. 434 p.

OLIVEIRA, V. M. 2009. Variabilidade morfológica de *Laeonereis* (Hartman, 1945) (Polychaeta: Nereididae) ao longo do Atlântico Ocidental. 66p. Dissertação (Mestrado

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

em Ciências Biológicas). Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

PALUMBI, S. R. 1994. Genetic Divergence, Reproductive Isolation, and Marine Speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 547-572.

PANNACCIULLI, F. G.; MANETTI, G. & MALTAGLIATI, F. 2009. Genetic diversity in two barnacle species, *Chthamalus stellatus* and *Tesseropora atlantica* (Crustacea, Cirripedia), with different larval dispersal modes in the archipelago of the Azores. *Marine Biology*, 156, 2441–2450.

PARDO E. V. & AMARAL, A .C. Z. 2006 Foraging and mobility in three species of aciculata (Annelida: Polychaeta). *Brazilian Journal of Biology* 66(4), 1065-1072.

PARDO, E. V. & DAUER, D. M. 2003. Particle size selection in individuals from epifaunal versus infaunal populations of the nereidid polychaete *Neanthes succinea* (Polychaeta: Nereididae). *Hydrobiologia*, 496, 355–360.

PETTIBONE, M. H. 1963. Marine polychaete worms of the New England region 1. Aphroditidae through Trochochaetidae. *U. S. Natl. Mus.* 227: 1-36.

PINEDA, J. et al. 2007. Transport and Dispersal in the Coastal Ocean and Consequences for Population Connectivity. *Oceanography*. Vol. 20, Nº. 3.

POWERS, S. P. 1999. Supply-settlement relationships in an estuarine fouling community. *Gulf Res. Rep.* 10: 79.

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

REDDY, M. P.; SARLA, N. & SIDDIQ, E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR)

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 9-17.

RODRIGUES, R.R. & LORENZZETTI, J.A. 2001. A Numerical study of the effects of bottom topography and coastline geometry on the Southeast Brazilian coastal upwelling. *Cont. Shelf Res.* 21(4): 371-394.

ROUSE, G.W. & PLEIJEL, F. 2001. *Polychaetes*. Oxford University Press, Oxford.

ROUABAH, A.; ROUABAH, L.; TAHAR, A. & SCAPS, P. 2009. Variations in Paragnath Number of the Different Morphs of the Polychaete *Perinereis* cf. *Cultrifera* in Relation to Geographical Location and Type of Reproduction. *American Journal of Scientific Research*. ISSN 1450-223X Issue 1, pp12.-22.

SAGASTI, A., L. C. SCHAFFNER & J. E. DUFFY. 2000. Epifaunal communities thrive in an estuary with hypoxic episodes. *Estuaries* 23: 474–487.

SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.

SAMBROOK J., RUSSELL D. W. 2001. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SANTOS, G. T.; BEZERRA-JUNIOR, J.L.; COSTA, K.M.P.; FEITOSA, F.A.N. 2009. Dinâmica da biomassa fitoplanctônica e variáveis ambientais em um estuário tropical (Bacia Do Pina, Recife, PE). *Rev. Bras. Enga. Pesca* 4(1), ISSN 1980-597X.

SCAPS, P.; ROUABAH, A. & LEPRÊTRE, A. 2000. Morphological and biochemical evidence that *Perinereis cultrifera* (Polychaeta: Nereididae) is a complex of species. *Journal of Marine Biological Association U.K.* 80, 735-736.

SETTE, C. S. C. & SOUZA, J. R. B. 2011. Variação Intrapopulacional em *Alitta succinea*

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

(Leuckart, 1847) (Polychaeta: Nereididae), 1. Relação entre paragnatas e comprimento total. In: Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar, XIV, 2011, Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil.

SETTE, C. S. C.; SHINOZAKI-MENDES, R. A.; LIMA, T. B. & SOUZA, J. R. B. (No prelo). Age and growth of *Alitta succinea* (Polychaeta; Nereididae) in a tropical estuary of Brazil.

SIGNORINI, S. R.; MIRANDA, L. B.; EVANS, D. L.; STEVENSON M. R. & INOSTROZA, H. M.. 1989. Corrente do Brasil: estrutura térmica entre 19° e 25°S e circulação geostrófica. Bolm Inst. Oceanog., 37(1): 33-49.

SILVA E. P. 2009. Genética marinha. In: PEREIRA R. C. & SOARES-GOMES A. Biologia Marinha. Ed. Interciência. p. 49-69.

SILVA, E. P. 2009. Genética marinha. In: PEREIRA R. C. & SOARES-GOMES A. Biologia Marinha. Ed. Interciência. p. 49-69.

SILVA, F. T. et al. 2011. Distribuição granulométrica ao longo do rio Caceribu, Itaboraí/RJ. In: Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário Abequa, XIII, Rio de Janeiro.

SILVEIRA, I.C.A.; A.C.K. SCHMIDT; E.J.D. CAMPOS; S.S. GODOI & Y. IKEDA. 2000. A Corrente do Brasil ao largo da Costa Leste Brasileira. Rev. Bras. Oceanogr. 48(2), 171–183.

SOUZA, G. A. et al. 2008. Diversidade genética estimada com marcadores *ISSR* em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.43, n.7, p.843-849.

SWAIN, D. P. & FOOTE, C. J. 1999. Stocks and chameleons: the use of phenotypic

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

variation in stock identification. Fish. 43. p.113-128.

SWOFFORD D. L. 2000. PAUP - Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods) V.4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

SWOFFORD, D. L. & BERLOCHER, S. H. 1987. Inferring evolutionary trees from gene frequency data under the principle of maximum parsimony. Syst. Zool. 36: 293-325.

TABERLET, P. 1998. Biodiversity at the intraspecific level: the comparative phylogeographic approach. Journal of Biotechnology, 64: 91-100.

TELLES, M. P. C.; MONTEIRO, M. S. R.; RODRIGUES, F. M.; SOARES, T. N.; RESENDE, L. V.; AMARAL, A. G.; MARRA, P. R. 2001. Marcadores RAPD na análise de divergência genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a estabilidade da divergência estimada. Ciência Animal Brasileira, Goiânia, 2(2): 87-95.

TSUTSUI, N. D.; SUAREZ, A. V.; HOLWAY, D. A. & CASE, T. J. 1999. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 5948-5953.

VILLALOBOS-GUERRERO, T. F. 2012. Capítulo VIII. Ficha técnica y análisis de riesgo de *Alitta succinea* (Leuckart in Frey & Leuckart, 1847) (Polychaeta: Nereididae). In: LOW PFENG, A. M. & PETERS RECAGNO, E. M. (Eds.). Invertebrados marinos exóticos en el Pacífico mexicano.

WILSON, R. S. 1999. Annelida: Polychaeta of Port Phillip Bay. In: HEWITT, C. L., WILSON, R. S. 2000. Family Nereididae. In P. L. BEESLEY & G. J. B. ROSS & C. J. GLASBY (Eds) Polychaetes and Allies: The Southern Synthesis (pp. 138–141). Melbourne: CSIRO Publishing.

WOLFE, A.D. & LISTON, A. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant

Cristiana Sette, S.C. Variação Populacional de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) com base nas Paragnatas e Marcadores Moleculares ISSR, ao longo da Costa Brasileira.

systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (Ed.). Molecular systematics of plants II: DNA sequencing. Boston: Kluwer, p.43-86.

YEH, F. C.; BOYLE, T. Y. Z.; XIYAN, J. M. 1999. Popgene version 131: microsoft window based freeware for population genetic analysis. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 29p.

YONESHIGUE, Y., 1985. Taxonomie et écologie des algues marines dans la region de Cabo Frio-Rio de Janeiro, Brésil. Tese. Université d' Aix Marseille II Faculté de Sciences de Luminy.