

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL**

**GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Aegla longirostri*
(CRUSTACEA, DECAPODA, ANOMURA) DA REGIÃO
CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Darine Buchmann

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Aegla longirostri*
(CRUSTACEA, DECAPODA, ANOMURA) DA REGIÃO
CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Por

Darine Buchmann

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biodiversidade Animal.**

Orientador: Prof^a. Dr^a Marlise L. Bartholomei-Santos

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Aegla longirostri* (CRUSTACEA,
DECAPODA, ANOMURA) DA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE
DO SUL**

elaborada por
Darine Buchmann

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Biodiversidade Animal

COMISSÃO EXAMINADORA:


Prof^a. Dr^a Marlise L. Bartholomei-Santos
(Presidente/Orientador)


Cláudia Paiva Nunes, Dr. (PUC-RS)


Larissa Schemes Heinzemann, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 31 de março de 2009.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Prof^a. Marlise, por ter me aceito no DIVERGE desde a iniciação científica e dado a oportunidade de realizar meu sonho em trabalhar com genética. Pela sua dedicação como orientadora e ao mesmo tempo como amiga e psicóloga. Ao meu co-orientador Prof. Sandro e seus orientados do LACRUST pelos conhecimentos compartilhados e pela coleta e fornecimento dos eglídeos. Marlise e Sandro, obrigada pela oportunidade de realizar este trabalho, pelos ensinamentos, paciência e confiança durante todos esses anos.

Aos colegas e amigos do DIVERGE: Paula Angélica, João Vitor, Alice, Stela, João Henrique, Thaís, Lucivani, Vanessa e Carol, pela ajuda, companhia, amizade e alegria no laboratório. À eterna divergiana Paula Angélica pela confiança que depositou em mim para que eu desse continuidade à caracterização dos microssatélites, por estar sempre presente e disposta a ajudar mesmo estando longe. Ao João Vitor, pelas sugestões e revisão da dissertação, além da amizade e parceria na dança de salão.

Aos professores Élgion Loreto e Lenira Sepel por terem disponibilizado os equipamentos do laboratório, indispensável para a realização deste trabalho.

Às componentes da banca examinadora, Cláudia Paiva Nunes e Larissa Schemes Heinzelmann, pelas sugestões, compreensão e descontração durante a defesa. Foi um prazer conhecê-las.

À minha amiga Nicéia pelas nossas longas conversas, por compartilhar as dificuldades e principalmente por ser uma das poucas pessoas que me compreende. Ao seu companheiro Marcelo e à sua família, Nice, Deonildo e Julian pela amizade, carinho, ajuda e confiança que me dedicaram durante os seis anos que permaneci em Santa Maria.

À Vó Mosa, Dinda Leila, Tio Katuka, Loise e Luane por me acolherem mais uma vez, pelo carinho, dedicação e pelo prazer da convivência. À minha afilhada Luane, pela paciência e compreensão durante minha ausência e falta de atenção. Lindinha da Di, obrigada por ser essa criança tão especial na minha vida.

Ao Maiquel pelo companheirismo, dedicação e paciência em me ouvir falar de *Aegla*, microssatélites e géis de poliacrilamida, por aguentar meu mau-humor quando as coisas não iam bem no laboratório, me incentivar nos momentos de desânimo e comemorar comigo os resultados positivos.

Aos meus pais Eriberto e Tânia pelo amor e apoio incondicional. Pelas palavras de entusiasmo que não me deixaram desistir quando tudo parecia estar perdido Aos meus irmãos Daerty e Daiene. À vocês, minha família, que são meu alicerce em qualquer situação. A presença de vocês é indispensável em todos os momentos da minha vida.

Às demais pessoas com quem convivi durante estes dois anos e que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES, aos meus pais e ao meu marido pelo suporte financeiro.

Às eglas que cederam suas vidas para que este trabalho fosse possível.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal
Universidade Federal de Santa Maria

GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Aegla longirostri* (CRUSTACEA, DECAPODA, ANOMURA) DA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL

AUTORA: DARINE BUCHMANN

ORIENTADOR: MARLISE LADVOCAT BARTHOLOMEI-SANTOS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de março de 2009.

Os aeglídeos são crustáceos decápodos endêmicos da região Neotropical da América do Sul. São os únicos anomuros de água doce, habitantes principalmente de cursos d'água. A exigência por um habitat conservado tem restringido as populações de *Aegla* às nascentes, como efeito da constante degradação ambiental dos ecossistemas aquáticos continentais. Na região central do estado do Rio Grande do Sul destacamos a ocorrência de populações de *Aegla longirostri*, que além dos efeitos de fragmentação de habitat, estão expostas a uma barreira geográfica de formação montanhosa, que há cerca de 11 milhões de anos separa as bacias dos Rios Uruguai e Guaíba. Locos de microssatélites são marcadores que apresentam altos níveis de heterozigosidade e têm sido amplamente utilizados em estudos de genética de populações. Marcadores microssatélites previamente isolados do genoma de *A. longirostri* foram caracterizados determinando-se os níveis de heterozigosidade e a diversidade alélica para cada loco. Dos oito locos de microssatélites analisados, sete se mostraram polimórficos e foram empregados em indivíduos de quatro diferentes populações da região central do estado do Rio Grande do Sul para analisar a variabilidade genética entre as populações de *A. longirostri* em ambas as bacias. Os resultados mostram uma grande diferenciação genética entre todas as populações e não somente entre as populações isoladas pela barreira geográfica. Possivelmente, fatores como ausência de fase larval durante o desenvolvimento destes crustáceos, aliada a uma baixa capacidade de dispersão, podem estar contribuindo para esta diferenciação. A ação antrópica, resultando em degradação do ambiente aquático, também pode ser um fator recente a contribuir para a diferenciação genética entre as populações estudadas, visto que os aeglídeos são bem exigentes em relação à qualidade da água onde vivem.

Palavras-chave: *Aegla longirostri*; marcador microssatélite; diversidade genética

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal
Universidade Federal de Santa Maria

POPULATION GENETICS OF *Aegla longirostri* (CRUSTACEA, DECAPODA, ANOMURA) OF THE CENTRAL REGION OF THE RIO GRANDE DO SUL STATE

AUTHOR: DARINE BUCHMANN

ADVISER: MARLISE LADVOCAT BARTHOLOMEI-SANTOS

The Aeglidae are Decapoda crustaceans endemic from the neotropical region of South America. They are the only anomuran family entirely restricted to freshwater, occurring mainly in streams. Requirement for well conserved habitat has restricted the populations to springs, as an effect of the constant degradation of continental aquatic ecosystems. In the central region of Rio Grande do Sul state, the species *Aegla longirostri*, besides suffering the effects of habitat fragmentation, is subjected to a mountainous geographic barrier, which has been separating the basins of River Guaíba and River Uruguay for about 11 my. Microsatellite loci are molecular markers with high levels of heterozygosity which have been widely used in population genetics studies. Microsatellite markers previously isolated from *A. longirostri* genome were characterized and the levels of heterozygosity and allelic diversity were calculated for each locus. A total of seven polymorphic microsatellite loci were used to verify genetic variability among four different populations from central region of Rio Grande do Sul state concerned the two basins described above. Results show a great genetic differentiation among all populations and not only between populations isolated by the geographic barrier. Factors as lack of larval stage and low dispersion capacity are possibly contributing to such differentiation level. Anthropic actions, resulting in alteration of aquatic environments, can also be a more recent factor contributing to the genetic diversity among the populations studied, since aeglids are very strict in relation to the water quality.

Key words: *Aegla longirostri*; microsatellite markers; genetic diversity

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 1.1 Revisão Bibliográfica | 8 |
| 1.2 Objetivo geral | 17 |
| 1.3 Objetivos específicos | 17 |
| 2 METODOLOGIA | 18 |
| 2.1 Diagnose da espécie <i>Aegla longirostri</i> | 18 |
| 2.2 Descrição da área de amostragem | 19 |
| 2.3 Locais de coleta | 20 |
| 2.4 Coleta dos animais | 21 |
| 2.5 Extração de DNA | 21 |
| 2.6 Caracterizações dos locos microssatélites | 22 |
| 2.7 Análise populacional | 26 |
| 3 CAPÍTULO 1 | 28 |
| 4 CAPÍTULO 2 | 37 |
| 5 CONCLUSÃO | 60 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 61 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 A família Aeglidae

1.1.1.1 Taxonomia

Crustáceos decápodos são em sua maioria caranguejos marinhos, entretanto, dentro deste grupo encontramos uma única família restrita a ambiente de água doce, Aeglidae Dana, 1852. A família consiste de 61 espécies atuais, todas incluídas no gênero *Aegla* Leach, 1820 (Bond-Buckup e Buckup, 1994) e de duas espécies fósseis. No momento, ao menos seis novas espécies estão sendo descritas com base em estudos filogenéticos (Bond-Buckup et al., 2008). Os aeglídeos estão inseridos taxonomicamente na superfamília Galattheoidea, mas evidências morfológicas e dados moleculares sugerem que Aeglidae deve ser considerada uma superfamília (Perez-Losada et al., 2002a). Algumas características morfológicas são distintas às demais famílias do grupo, Galatheidae, Chirostylidae e Porcellanidae (Martin e Abele, 1988). Dentre estas há ausência de estágio larval e *linea anomurica*, além de possuírem tricobrânquias ao invés de filobrânquias e os machos possuírem pleópodos reduzidos enquanto estes são bem desenvolvidos nos demais galateídeos. Adicionado às diferenças morfológicas, um trabalho de filogenia com as superfamílias de Anomura, usando o gene ribossomal 18S, mostrou separação entre Aeglidae e demais famílias de Galattheoidea (Perez-Losada et al., 2002a).

1.1.1.2 Morfologia

Nos animais adultos a carapaça chega a medir 60 mm de comprimento. Sua cor varia de acordo com o substrato em que vivem, geralmente de marrom esverdeado a preto, porém também podem ser encontradas mais raramente espécies lacustres de cor azul, amarelo, laranja e vermelho (Jara, 1989). Diferentemente dos Brachyura os aeglídeos têm o quinto par de pereiópodos reduzido (Lopretto, 1978; Martin e Abele, 1988) e um minúsculo quelípodo (Martin e Felgenahuer, 1986). São organismos dióicos, nos machos os pleópodos são vestigiais e o poro genital abre na coxa do quinto par de pereiópodos enquanto nas fêmeas o poro genital abre na coxa do terceiro pereiópodo (Martin e Abele, 1988).

1.1.1.3 Reprodução

A fecundidade depende do tamanho da fêmea variando de 120 (Bahamonde e Lopez, 1961) a 1043 ovos que medem de 1,00 mm a 1,37 mm (Jara, 1977). Em algumas espécies a desova ocorre durante todo o ano, mas é mais comum no outono (Bahamonde e Lopez, 1961; Rodrigues e Hebling, 1978; Bueno e Bond-Buckup, 2000). As fêmeas não produzem mais de uma ninhada por ano uma vez que o fim do período de incubação acontece entre o quarto e o oitavo mês (Bond-Buckup et al., 2008). Os ovos eclodem no estágio pós-larval e os indivíduos nascem como juvenis de 1,13 mm a 1,58 mm CL (comprimento da carapaça) (Bond-Buckup et al., 1999) e permanecem com a mãe durante três a quatro dias (Lopez et al., 2004). O recrutamento ocorre normalmente apenas durante a primavera (de agosto a outubro) (Bahamonde e Lopez, 1961; Lopez, 1965; Bueno e Bond-Buckup, 2000), mas em *A. longirostri* e *A. castro* parecem existir dois períodos de recrutamento (Swiech-Ayoub e Masunari, 2001; Delevati et al., 2005). A densidade populacional em *Aegla* é variável, alcançando mais de 250 indivíduos por m² (Bahamonde e Lopez, 1961).

1.1.1.4 Ecologia

Os aeglídeos fazem parte das relações tróficas dos ambientes límnicos, constituindo a dieta de aves, jacarés, peixes salmonídeos (Arenas, 1976) e lontras (Medina, 1998) e se alimentando de partículas de matéria orgânica (Isler, 1988), detritos vegetais e de larvas aquáticas de insetos (Magni e Py-Daniel, 1989; Bueno e Bond-Buckup, 2004).

São animais de hábitos bentônicos e de distribuição restrita às regiões temperadas e subtropicais da América do Sul (Bond-Buckup e Buckup, 1999). Representam o único grupo de crustáceos decápodos anomuros que habitam cursos d'água continentais, sendo encontradas em rios, riachos, lagos e cavernas de águas correntes e bem oxigenadas, sob detritos vegetais ou enterrados no substrato arenoso (Bond-Buckup, 2003).

A maioria das espécies de *Aegla* tem áreas de distribuição restrita e são conseqüentemente de significativo interesse de conservação. Uma das ameaças para a conservação dos aeglídeos diz respeito às práticas de silvicultura relacionadas à monocultura de *Pinus* e eucalipto principalmente no sul do Brasil e ao longo da Costa da Cordilheira dos Andes. O uso excessivo de pesticidas na agricultura e o aumento da criação de suínos também são uma importante ameaça para as populações nativas de aeglídeos, particularmente nos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul (Bond-Buckup et al., 2008).

Devido a sua distribuição restrita e à rápida degradação das águas continentais o habitat das espécies de *Aegla* tem se restringido às nascentes (Bond-Buckup e Buckup, 1994) e isso pode estar causando um efeito de estruturação genética destas populações (diferenciação das frequências alélicas e genotípicas entre as populações). Além disso, a lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul traz incorporadas várias espécies de *Aegla* na categoria vulnerável (Marques et al., 2002). Uma vez que a viabilidade em longo prazo das espécies vulneráveis é incerta, a alocação das espécies de *Aegla* a tal condição aponta para a necessidade da realização de trabalhos ecológicos com o grupo, a fim de se obter dados confiáveis sobre as atuais condições dos aeglídeos nas bacias hidrográficas onde ocorrem (Gonçalves et al., 2006).

1.1.1.5 Distribuição e processo histórico

Atualmente ocorrem nas bacias hidrográficas do sul do Brasil, Uruguai, Argentina, sul da Bolívia, Paraguai e centro-sul do Chile, tendo como limite norte a bacia do Rio Grande, entre os estados de Minas Gerais e São Paulo, e ao sul, a Ilha de Madre de Dios, província de Nova Esperanza, no Chile. Vivem a profundidades que variam entre 320 m em lagos chilenos (Jara, 1977) a 4.500 m de altitude no noroeste argentino (Bond-Buckup e Buckup, 1994). No Brasil estão distribuídos desde o Rio Canoas, que faz fronteira entre o estado de Minas Gerais (municípios de Claraval) e o estado de São Paulo (município de Franca) (Bueno et al., 2007), até o Rio Grande do Sul (Bond-Buckup e Buckup, 1994).

Entre as espécies descritas duas são fósseis do Cretáceo superior, ambas marinhas, encontradas na Nova Zelândia (*Haumuriaegla glaessneri* Feldmann (1984)) e Sul do México (*Protaegla miniscula* Feldmann (1998)). As evidências fósseis adicionadas às análises filogenéticas apontam para uma origem marinha do gênero e posterior conquista do ambiente de água doce (Martin e Abele, 1986; Pérez-Losada et al., 2002a e 2002b). Apoiando-se no conhecimento do local de origem marinha onde foi descoberto o fóssil, Feldmann (1984) sugere que o ancestral do grupo possa ter vindo da região Indo-Pacífica (região biogeográfica oceânica que compreende o Oceano Índico e a porção ocidental e tropical do Oceano Pacífico) e se dispersado pela América do Sul e que a dispersão de larvas provavelmente tenha ocorrido antes do final do Oligoceno, junto com trocas ambientais associadas com a deriva continental. Ortmann (1902) *apud* Bond-Buckup e Buckup (1994) discute as evidências da união entre a América do Sul, a Austrália, a Nova Zelândia e a Antártica, no final do Mesozóico e início do terciário. O autor, apoiado em argumentos de cunho geológico, explica a presença do gênero *Aegla* em ambos os lados dos Andes pela sua distribuição antes do soerguimento da Cordilheira, sugerindo que, no início do Terciário, as espécies chilenas teriam migrado para o norte da Argentina e sul do Brasil. Eventos geológicos como a separação entre América e África, o soerguimento da Serra Geral e da Cordilheira dos Andes também foram relacionados com a distribuição atual dos aeglídeos em Perez-Losada et al., (2004). Segundo os autores, múltiplas ocorrências de vicariância e migrações podem ser postuladas para este cenário, entretanto pouco se sabe como se deu essa dispersão.

Ortmann (1902) *apud* Bond-Buckup e Buckup (1994) propôs que as espécies chilenas representam as formas mais primitivas do gênero. Entretanto, Schmitt (1942) hipotetizou que os aeglídeos do lado Atlântico da América do Sul são mais primitivos e que as espécies que alcançaram os rios chilenos são mais derivadas. Recentes estimativas de relações filogenéticas baseadas em uma variedade de dados moleculares suportam a hipótese de origem Pacífica e sugerem que o grupo como um todo se originou em torno de 75 milhões de anos (ma). As espécies ocidentais de *Aegla* se espalharam há aproximadamente 40-45 ma, mas a especiação dos táxons central e oriental ocorreu posteriormente, em torno de 23-35 ma (Perez-Losada et al., 2004).

Das 61 espécies atuais, 7 são endêmicas da Argentina, 16 do Chile e 36 espécies são endêmicas do sul do Brasil, sendo 22 delas existentes no estado do Rio Grande do Sul (Bond-Buckup et al., 2003). O território do Rio Grande do Sul é formado por três grandes bacias hidrográficas: a Bacia do Uruguai, a qual faz parte da Bacia do Rio da Prata e abrange cerca de 57% da área total do Estado; a bacia do Guaíba com 30% do total e a Bacia Litorânea com 13% do total (Atlas socioeconômico do RS). A maioria das espécies está restrita a uma única bacia, apenas uma é encontrada nas três regiões hidrográficas e quatro ocorrem nas bacias do Uruguai e do Guaíba, entre elas a espécie *Aegla longirostri* (Bond-Buckup e Buckup, 1994).

Populações de *A. longirostri* presentes nas duas bacias que drenam a região central do estado do Rio Grande do Sul são isoladas geograficamente devido a um divisor de águas de cerca de 11 milhões de anos, conhecido como Serra do Pinhal (Pereira et al., 1989). Uma faixa tectônica pós-cretáceo soergueu o planalto dando origem a esta barreira (Ab'Saber, 1970). Tal evento inverteu para leste a drenagem do Rio Jacuí (Bacia do Guaíba), antes tributário da bacia do Uruguai (Moreira e Lima, 1977), e separou as populações da bacia do rio Ibicuí (Bacia do Uruguai) e Jacuí (Bacia do Guaíba). O tempo de isolamento determinado pela barreira montanhosa talvez seja suficiente para originar um processo de especiação entre estas populações, uma vez que cessou o fluxo gênico entre os indivíduos dos dois lados da serra. O mesmo pode estar ocorrendo entre populações pertencentes à mesma bacia hidrográfica devido à fragmentação do habitat causado pela impactação do meio ambiente por ação antrópica.

1.1.2 Marcadores Moleculares

O componente genético da biodiversidade é fundamental, pois é a variação genética que fornece o material básico para a seleção natural e, portanto, para a evolução de todas as espécies (Allcock et al., 1995). A variabilidade genética, também chamada de biodiversidade molecular, além de importante para a evolução, pode ser usada como instrumento de investigação por ecólogos e sistematas em diversos campos como, por exemplo, para verificar as afinidades e os limites entre as espécies, para detectar modos de reprodução e estrutura familiar, para estimar níveis de migração e dispersão nas populações (Avice, 1994). A forma de analisar os fenômenos genéticos que ocorrem no nível populacional passou por grandes modificações nas últimas duas décadas. O período clássico da genética de populações contemplou o surgimento e o desenvolvimento de ferramentas teóricas para análises genético-populacionais. As ferramentas para esses estudos são os chamados marcadores moleculares, locos gênicos que apresentam alguma variabilidade no escopo do problema a ser estudado (Avice, 1994; Silva e Russo, 2000; Matioli, 2001).

Marcadores moleculares diferentes podem ter taxas de substituição/evolução diferentes, de modo que através de uma escolha criteriosa desses marcadores, podemos estudar desde problemas de identificação de indivíduos à identificação de espécies crípticas ou formulação de hipóteses filogenéticas em grupos supra-específicos. A escolha do método a ser usado na abordagem de cada problema depende de vários critérios, entre eles está, em primeiro lugar, a adequação do grau de variabilidade do marcador molecular escolhido ao nível da divergência que se deseja estudar (Matioli, 2001).

Os marcadores moleculares atualmente disponíveis podem ser classificados de acordo com a capacidade dos mesmos na detecção de dominância. Os métodos RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), por exemplo, revelam padrões de dominância, ou seja, não permitem distinguir entre indivíduos homozigotos dominantes e heterozigotos. Já os microssatélites são marcadores moleculares co-dominantes. Os marcadores

moleculares podem ainda ser classificados em relação às taxas evolutivas incluindo alozimas que evoluem de forma lenta e RAPD e microssatélites que evoluem muito rapidamente (Matioli, 2001).

1.1.3 Microssatélites

Microssatélites são seqüências de DNA nuclear com um número variável de repetições arranjadas lado a lado. Também são conhecidos como SSR “*Simple Sequence Repeats*” (Kashi et al., 1997) ou VNTRs “*Variable Number of Tander Repeats*” (Murray, 1996; Campos, 2003). Os microssatélites apresentam repetições que variam de 2 a 6 pares de base enquanto repetições com número entre seis e 70 pares de base são denominadas minissatélites (Murray, 1996; Campos, 2003).

Os microssatélites são encontrados no genoma de procariotos e eucariotos (Gur-Arie et al, 2000). A existência de microssatélites no genoma eucariótico é conhecida desde 1970 (Bruford et al, 1996), sendo demonstrado ampla ocorrência dessas seqüências desde leveduras até vertebrados (Hamada et al, 1982).

Os microssatélites são classificados em quatro categorias: perfeitos, imperfeitos, interrompidos e compostos (Goldstein e Schlötterer, 1999).

Microssatélites perfeitos são seqüências de bases com único motivo repetitivo sem nenhuma interrupção. Ex.: CACACACACACA.

Microssatélites imperfeitos são repetições que apresentam uma base que não se encaixa na estrutura repetitiva. Ex.: CACAGACACA.

Microssatélites interrompidos consistem na inserção de um pequeno número de bases que não se encaixam na estrutura repetitiva. Ex.: CACACAGGGCACACA.

Microssatélites compostos são dois ou mais microssatélites adjacentes com diferentes seqüências repetitivas. Ex.: CACACACACAGATGATGATGAT.

A maioria dos microssatélites são dinucleotídicos. O motivo de repetição $(CA)_n$ é o mais comum no genoma dos vertebrados seguido pelo motivo $(AT)_n$, duas vezes menos freqüente do que o primeiro. Os motivos tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídico são 1,5 vezes menos freqüentes do que dinucleotídeos (Toth et al, 2000). Microssatélites podem ser encontrados nas regiões codificante e não-codificante do DNA (Toth et al, 2000), embora sejam mais raros nas regiões codificadoras

(Hancock, 1999). Nestas regiões eles alcançam apenas entre 7 e 10% do total encontrado em plantas superiores (Wang et al., 1994; Varshney et al, 2002) e entre 9 e 15% em invertebrados (Van Lith e Van Zutphen,1996). Em vertebrados, motivos de repetição di- e tetranucleotídicas são 42 vezes menos frequentes em éxons do que em íntrons e 30 vezes menos frequentes em regiões intergênicas (Toth et al, 2000).

Ao contrário de outros tipos de motivos repetitivos, trinucleotídeos são encontrados em regiões codificantes e não-codificantes do genoma com alta frequência (Wren et al, 2000; Morgante et al., 2002). Em todos os vertebrados, motivos contendo (CG), como por exemplo CCG ou CAG, são mais comuns entre trinucleotídeos. Essas repetições são dominantes em éxons, considerando que elas são menos comuns em seqüências intrônicas (Toth et al, 2000).

São sugeridos dois modelos para explicar a formação e evolução dos microsatélites.

No modelo do “*Crossing-over* Desigual” (Smith,1976) a presença das repetições aumenta a probabilidade de erro durante o emparelhamento entre os cromossomos homólogos, acarretando alterações no número original de repetições de cada cromossomo, após a troca de cromátides.

O modelo conhecido como “Slipped-strand Mismatching”, ou seja, “deslizamento da DNA polimerase”, se refere a um deslize da DNA polimerase, que durante o processo de replicação do DNA pode acrescentar ou diminuir repetições (Streisinger et al., 1966).

Existem evidências de que a elevada taxa de “Slipped-strand Mismatching” seja a principal responsável pelo grande número de polimorfismos dos microsatélites, uma vez que esses erros durante o processo de replicação são mais frequentes em microsatélites do que em outras regiões do genoma (Eisen, 1999).

A média de mutação dos microsatélites é estimada entre 10^{-2} e 10^{-6} por loco por geração (Ellegren, 2000), o qual é algumas ordens de magnitude maior do que a do DNA regular não repetitivo (10^{-9}) (Li, 1997).

Análise de microsatélites (CA)_n em cinco classes de vertebrados (mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes) mostrou que o tamanho é o principal influente do padrão mutacional (Neff e Gross, 2001). Durante a replicação do DNA, longas unidades repetidas são mais propensas ao pareamento incorreto. Além disso,

grandes números de repetições fornecem mais oportunidades para o alinhamento incorreto durante o realinhamento da fita nascente. Embora ocorram diferentes tipos de mutação nos locos de microssatélites, as alterações no número de repetições são as mais frequentes (Eisen, 1999).

Análises mostraram que microssatélites perfeitos com cinco ou mais repetições em regiões não-codificantes mudam de comprimento pela adição ou deleção de uma unidade com igual probabilidade (Dokholyan et al., 2000), embora seja mais comum os microssatélites ganharem do que perderem uma repetição (Ellegren, 2000). A substituição de bases destrói repetições perfeitas longas, produzindo duas regiões curtas de repetições perfeitas (Dokholyan et al., 2000).

As interrupções parecem estabilizar os microssatélites, diminuindo a probabilidade de erro durante a replicação (Weber, 1990), fazendo com que os microssatélites perfeitos possuam mais alelos do que os interrompidos (Chung et al., 1993; Pépin et al., 1995).

Os microssatélites são caracterizados por um alto grau de polimorfismo que pode ser identificado pela reação em cadeia da polimerase (Weber et al., 1991; Hadonou et al., 2004) com o uso de pares de oligonucleotídeos que flanqueiam o segmento repetitivo e assim definem o loco de microssatélite (Powell et al., 1996). Microssatélites são polimórficos devido à variação no número de repetições (Amos e Pemberton, 1992), sendo que as regiões flanqueadoras dos microssatélites evoluem muito mais lentamente do que o número de repetições (Dimitry et al., 2005).

Por causa de sua natureza multi-alelica, herança codominante, pequena extensão, extensiva cobertura genômica e relativa abundância, os microssatélites são atualmente aplicados com sucesso em uma ampla variedade de campos de pesquisa (Powell et al., 1996), desde o estudo forense do DNA à genética de populações e conservação/manejo de recursos biológicos (Jarne e Lagoda 1996; Zane et al., 2002), como no estudo do grau de estruturação das populações e migração (Ciofi e Bruford, 1999; Waits et al., 2000). Os microssatélites são marcadores apropriados para quantificar a diferenciação genética em uma fina escala temporal e espacial. Microssatélites também provaram ser extremamente valiosos para o mapeamento genômico em muitos organismos (Schuler et al., 1996; Knapik et al., 1998). Microssatélites são mais sensíveis do que alozimas para estudar a evolução da dinâmica de populações (Ramstad et al., 2004), incluindo flutuações populacionais e tamanho efetivo da população (Waples, 2002). A diversidade alélica

e a proporção de locos polimórficos são medidas comuns da diversidade genética e heteroziguidade (Pujolar et al., 2005). Uma vez que eles evoluem 10^2 - 10^3 vezes mais rápido do que uma única cópia do DNA nuclear, eles são uma ferramenta poderosa para analisar eventos recentes e contemporâneos (Ellegren, 2000).

Marcadores microssatélites apresentam características ideais para estudos populacionais em *A. longirostri*, sendo possível verificar se está ocorrendo um efeito de estruturação genética nas populações da região central do Rio Grande do Sul causada por uma barreira montanhosa e pela degradação ambiental das águas continentais, verificar se existe fluxo gênico entre as populações, além de responder questões relacionadas à sua evolução, taxonomia e estado de conservação.

1.2 Objetivo geral

Analisar a variabilidade genética de populações de *A. longirostri* da região central do estado do Rio Grande do Sul empregando marcadores microssatélites previamente isolados (Roratto, 2007).

1.3 Objetivos específicos

- Caracterizar e selecionar marcadores microssatélites, determinando os níveis de heteroziguidade e a diversidade alélica para cada loco isolado;
- Empregar os locos selecionados em estudos populacionais de *Aegla longirostri* pertencentes às bacias do Uruguai e do Guaíba do estado do Rio Grande do Sul;
- Determinar o grau de diferenciação genética entre as populações, se houver;
- Verificar a ocorrência de fluxo gênico entre as populações analisadas.

2 METODOLOGIA

2.1 Diagnose da espécie *Aegla longirostri*

Margens laterais da área branquial da carapaça pouco expandidas com tubérculos escamiformes; espinho ântero-lateral da carapaça ultrapassando a metade da córnea; rostro muito longo, estiliforme, carenado em todo o seu comprimento; ângulo anterior da margem ventral do epímero dois projetado por espinho robusto; margem externa proximal do dedo móvel do quelípodo sem lobo; crista palmar retangular, escavada; margem interna da face ventral do ísquio do quelípodo com dois espinhos robustos e entre eles tubérculos; margem ventral do mero do segundo pereiópodo com espinho ântero-medial seguido de tubérculo escaniforme (Bond-Buckup e Buckup, 1994). A figura 1 apresenta um exemplar de *A. longirostri*.

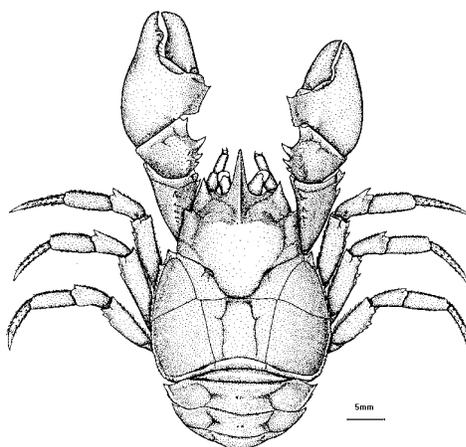


Figura 1 - Vista dorsal de um exemplar adulto de *Aegla longirostri*. (Extraído de Bond-Buckup e Buckup, 1994).

2.2 Descrição da área de amostragem

Para a amostragem dos indivíduos foram consideradas quatro populações da região central do estado do Rio Grande do Sul, uma delas pertencente à bacia do Uruguai e as demais pertencentes à bacia do Guaíba. Tais bacias são separadas pela Serra do Pinhal, um conjunto de formações montanhosas com picos de até 500 metros de altura, que corresponde ao soerguimento leste-oeste da Serra Geral (Pereira et al., 1989).

A área de estudo está inserida na Depressão Central do estado, localizada entre o limite sul do Planalto Meridional Brasileiro, a campanha ao oeste, o litoral ao leste e a Serra do Sudoeste ao sul (Rambo, 1994).



Figura 2 - Ponto de coleta de *A. longirostri* na região central do RS, caracterizado como ambiente com mata ciliar preservada, água corrente, limpa e gelada.

2.3 Locais de coleta

Ponto 1: Município de Val de Serra, Bacia do Uruguai, Rio Ibicuí-Mirim (29°28'57"S; 53°43'47"W);

Ponto 2: Município de Ivorá, Bacia do Guaíba, Rio Michelon (29°29'31"S; 53°34'19"W);

Ponto 3: Município de Vale Vêneto, Bacia do Guaíba tributário do Arroio Divisa (29°30'33"S; 53°32'02"W);

Ponto 4: Município de Santa Maria, Bacia do Guaíba, tributário do rio Vacacai-Mirim (29°40'13"s; 53°45'44"W) (Figura 3).

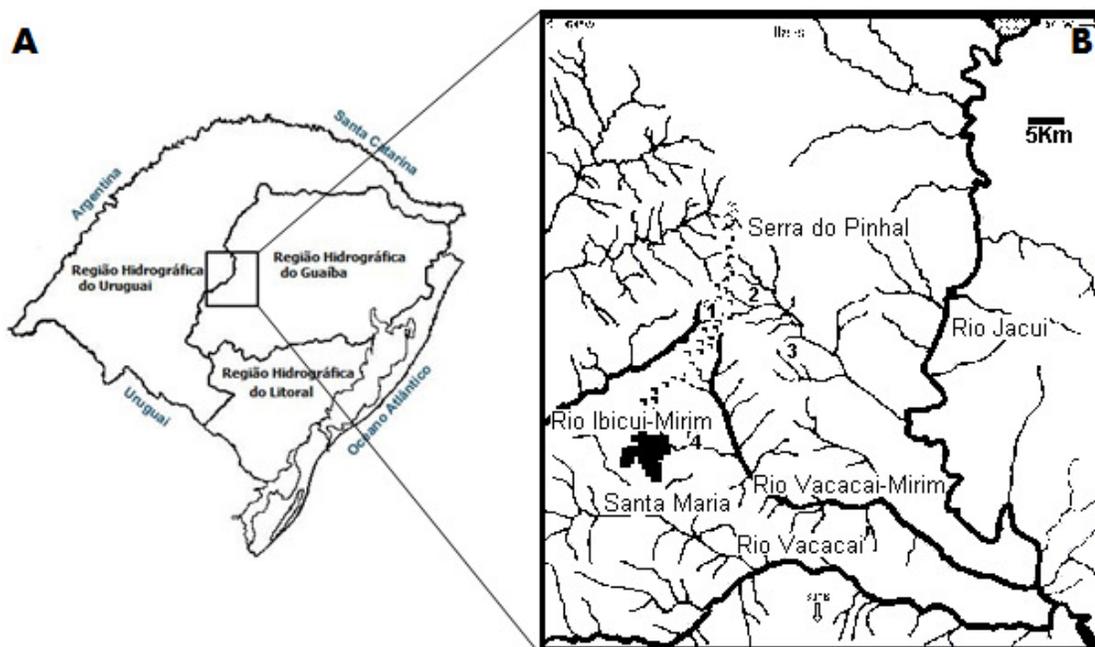


Figura 3 - A: Mapa com as bacias hidrográficas do estado do Rio Grande do Sul. B: Mapa hidrográfico enfatizando a região central do estado do Rio Grande do Sul com os quatro pontos de coleta. 1:Rio Ibicuí-Mirim (Val de Serra); 2: Rio Michelon (Ivorá) ; 3: tributário do Arroio Divisa (Vale Vêneto) ; 4: tributário do Rio Vacacai-Mirim (Santa Maria).

2.4 Coleta dos animais

Foram coletados de 25 a 40 indivíduos de cada população. Os exemplares estudados foram capturados manualmente ou com auxílio de puçá, após remoção das rochas do fundo do rio. Os animais foram transportados ao laboratório individualmente em sacos plásticos contendo água do local de coleta e mantidos em aquários até o momento da dissecação, quando os mesmos foram sacrificados por resfriamento durante 30 minutos.

2.5 Extração de DNA

Os tecidos das brânquias, dos músculos abdominais e quelípodos foram dissecados sobre superfície de gelo e submetidos à extração de DNA total. Os tecidos removidos foram inseridos em solução contendo 400mL de tampão de lise (Tris-HCl 100mM; EDTA 100mM; NaCl 250mM), SDS 2%, β -mercaptoetanol 1% e proteinase K 0,2mg/mL e macerados com auxílio de bastão de vidro. Em seguida, a solução foi submetida a banho-maria durante o mínimo de 4 horas a 65°C (Bitencourt et al., 2007).

Foi seguida a metodologia tradicional de extração de DNA com fenol-clorofórmio descrita por Sambrook e Russel (2001). O DNA extraído foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e 1% de NaCl 5M. Após centrifugação e 3 lavagens do precipitado com etanol 70%, o mesmo foi eluído em um volume de tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM) de acordo com a quantidade de material obtido. Depois de tratadas com RNase durante 1 hora a 37°C e purificadas por PEG 8000 13%, NaCl 1,6M (Sambrook e Russel, 2001), as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, quantificadas, identificadas e armazenadas a 4°C negativo.

2.6 Caracterização dos locos de microssatélites

Treze locos de microssatélites (AICA99, AICA105, AICA108, AICA119, AICA128, AICA120, AICA131, AICA135, AICA136, AICA138, AICA140, AICA145 e AICA159) contendo repetições (CA)_n e (GA)_n previamente isolados do genoma de *A. longirostri* (Roratto, 2007), foram selecionados para caracterização quanto ao polimorfismo em indivíduos provenientes da população do Arroio Divisa (Vale Vêneto) usando padrão de bandas eletroforéticas.

3.6.1 Padronização das Condições de Amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Os testes de padronização da PCR para cada loco foram realizados modificando-se as concentrações de cloreto de magnésio (MgCl₂) que variaram de 1,0 mM à 3,0 mM e testando-se diferentes temperaturas de anelamento. Quando não se obteve amplificação dos locos modificando essas duas variáveis, foram testadas concentrações de *primers* de 10 pmol e 20 pmol. A concentração dos demais reagentes utilizados para a preparação do produto da PCR foi a mesma para todos os microssatélites testados. Para um volume final de 15,0 µL utilizou-se 2,0 µL da amostra; 1,5 µL de tampão 10x para Taq DNA polimerase (10 mM tris-HCl, 50 mM KCl); 0,6 µL de trifosfato de deoxinucleotídeo (dNTP) 10 mM; 0,6 µL de *primer forward* 10 mM e *primer reverso* 10mM e 0,15µL de enzima Taq DNA Polimerase (5u/µL). Como controle positivo foram utilizados os plasmídeos contendo a repetição do microssatélite e para controle negativo foi acrescentado água milli-Q na reação.

As reações da PCR foram realizadas com uma temperatura de desnaturação de 94°C por 5 min. Subsequentemente, cada ciclo começou com desnaturação de 94°C por 1 min, temperatura de anelamento “teste” por 45 s e alongamento de 72°C por 45 seg, num total de 30 ciclos. O alongamento final ocorreu a 72°C por 5 min;.

Padronizadas as condições de amplificação para cada par de *primer* (Tabela 1), foram iniciadas as PCRs com as amostras da população de Vale Vêneto empregando oito dos treze microssatélites selecionados, uma vez que não se obteve amplificação para cinco locos.

Tabela 1 – Microsatélites isolados a partir do genoma de *A. longirostri* e suas respectivas condições de amplificação por PCR: temperatura de anelamento (T_a) e concentração de cloreto de magnésio.

| Loco | Motivo de Repetição | Forward PRIMER (direto) Reverse PRIMER (reverso) 5'- 3' | T_a (°C) | [MgCl ₂] (mM) | Tamanho do Fragmento Clonado (pb) |
|---------|--|---|------------|------------------------------|---|
| AICA99 | (AC) ₁₀ ... (CA) ₈ | F: CCTGGTCTTGACGTTCCCTG R: GTCTTGTAATAATTGCGTATTTTGG | 50 | 2,5 | 193 |
| AIGA120 | (CT) ₃ (CA) ₆ (CT) ₂₃ | F: TCTCACCCCTCGTTAGTGAAG R: TTGGACTCTCCCATTTACCTC | TD60/50 | 2,0 | 250 |
| AICA131 | (AC) ₂₁ | F: ACACATATACATGCAATTTCCG R: CCGTTGCCACATCTCACT | TD60/50 | 1,5 | 179 |
| AICA135 | (CA) ₁₃ | F: CATCTCGCTCACGTGCTTTA R: TTTATGAGGGAATGGGGTGTA | 60 | 2,0 | 216 |
| AICA136 | (CT) ₆ (CA) ₂₈ | F: CGAACTGGGCTAGCAGAATG R: GACCTCAGTCGCTGACTG | 55 | 2,0 | 152 |
| AIGA138 | (GA) ₁₇ | F: GATTAGCACCACTGCCACA R: TGAGTGAACGAA TGGGTGAA | TD63/58 | 2,0 | 246 |
| AICA145 | (CA) ₁₃ | F: CAAGGGACATACATGCCCTCA R: AGGGTGAGGTTGCGTATTTG | 55 | 2,0 | 193 |
| AICA159 | (CA) ₁₅ | F: CCTGTCTTGACCAATGCTT R: TCAAACAGGAAGAGGGGCTA | 55 | 2,0 | 204 |

3.6.2 Eletroforese

Nas eletroforeses foram aplicados 7,0 μ L de produto da PCR diluído em 5 μ L de tampão de amostra (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xilenocianol) em gel de poliacrilamida 6% corado com solução de nitrato de prata (Figura 4). O tempo de corrida das eletroforeses foi de aproximadamente 5h a 300V ou de 12h a 120V em cuba média de 25 cm.

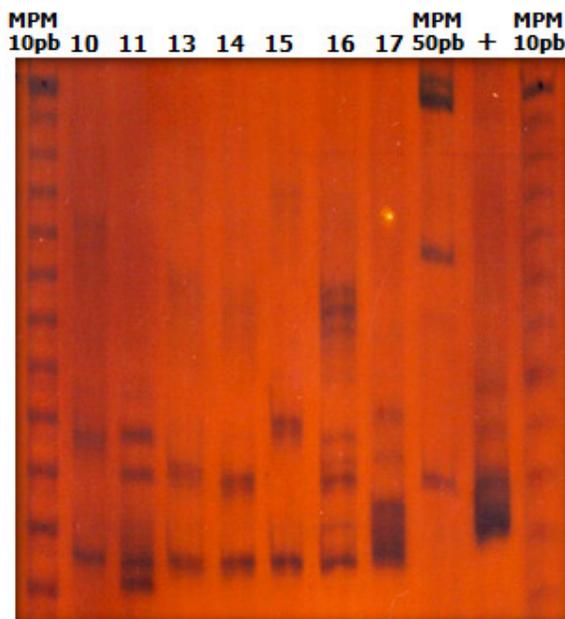


Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata.

3.6.3 Revelação dos Géis de poliacrilamida

Após a corrida eletroforética, os géis foram mergulhados em 200 mL de solução contendo 20 mL de álcool etílico e 1 mL de ácido acético glacial durante 5 minutos. Depois foram corados com 200 mL de solução de nitrato de prata (2,5g/L) por mais 5 minutos e por fim, revelados com 200 mL de solução de hidróxido de

sódio (6g) acrescido de formaldeído (600 µl) até o aparecimento dos fragmentos de DNA. As três soluções foram aquecidas a 60° C. Para interromper a revelação foi usado 200 mL de ácido acético 10%. Antes da troca de soluções, os géis foram lavados com água destilada. Para secar, os mesmos foram envolvidos com papel celofane permeável embebido em solução de secagem (glicerol 1% e álcool metílico 30%).

3.6.4 Análise dos géis

O tamanho dos alelos encontrados para cada indivíduo foi determinado manualmente por comparação com marcadores de peso molecular de 10pb e 50pb e com uma escala alélica construída com os próprios alelos encontrados para cada loco (Figura 5). O programa GENEPOP (Raymond e Rousset, 1995) constatou o número de alelos, heterozigosidade observada e esperada conforme o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação para cada marcador.

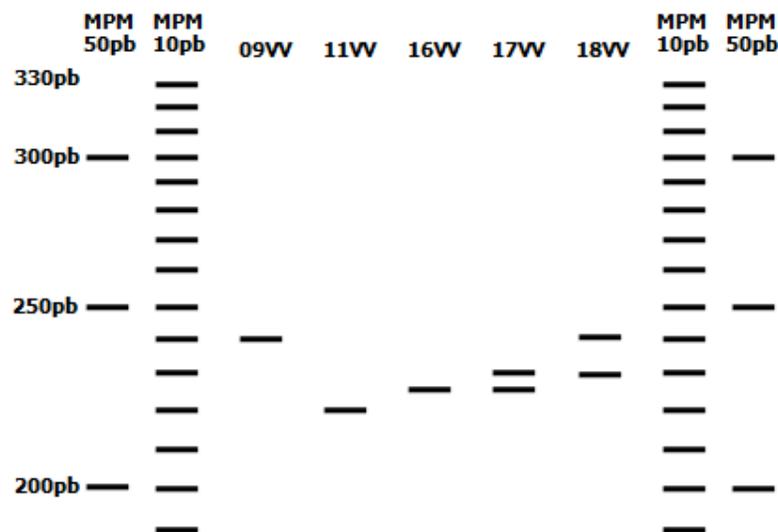


Figura 5 – Identificação de alelos tendo como referência marcadores de peso molecular de 10 e 50 pares de base.

2.7 Análise populacional

Os locos de microssatélites que se mostraram polimórficos foram amplificados por PCR a partir das amostras de DNA de *A. longirostri* pertencentes às demais populações citadas acima. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, como descrito anteriormente.

Os espécimes coletados em cada localidade (Val de Serra, Ivorá, Vale Vêneto e Santa Maria) (Figura 3) foram considerados como populações em todas as análises realizadas. A frequência alélica e estimativa da heterozigosidade esperada e observada foram calculadas para cada loco em cada população com o programa GENEPOP (Raymond e Rousset 1995), assim como testes para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação ao nível de significância de 5%. Com acasalamentos ao acaso, os alelos de um gene são combinados ao acaso dentro dos genótipos de acordo com a frequência dada pela proporção do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Genes associados ao acaso são chamados em estado de equilíbrio de ligação, e genes que não estão associados ao acaso são chamados em desequilíbrio de ligação (Hartl e Clark, 2007).

Em uma população grande onde a reprodução ocorre ao acaso, as frequências alélicas e genotípicas em um loco atingem o equilíbrio de Hardy-Weinberg após uma geração quando não existe mutação, migração ou seleção. O equilíbrio de Hardy-Weinberg proporciona a base para detectar desvios do acasalamento ao acaso, para testar a ocorrência de seleção, modelar os efeitos da endogamia e seleção, e estimar as frequências alélicas em locos que mostram dominância. Quando qualquer um dos pressupostos que compõem a base do equilíbrio de Hardy-Weinberg é violado, irão ocorrer desvios do equilíbrio das frequências genotípicas. Os desvios das frequências genotípicas daquelas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg são altamente informativos, permitindo detectar a ocorrência de endogamia, fragmentação de populações, migração e seleção (Frankham et al, 2008).

A heterozigosidade é a medida mais comumente utilizada para caracterizar a diversidade genética para um loco. A heterozigosidade observada (H_o) é a proporção dos indivíduos amostrados que são heterozigotos. Em geral, quando

comparamos a amplitude da diversidade genética entre populações é usada a heterozigosidade média. Em populações com acasalamentos ao acaso, as heterozigosidades observada e esperada são geralmente similares (Frankham et al, 2008).

O número médio de alelos por loco (diversidade alélica) também é usado para caracterizar o nível de diversidade genética. Quando mais de um loco é estudado, a diversidade alélica é a média do número de alelos de todos os locos (Frankham et al, 2008).

A média do número de alelos por loco em cada população foi dada de duas formas, uma entre todos os sete locos e a outra descartando aqueles locos que não amplificaram para toda uma população.

Também foram realizadas análises para verificar a estrutura genética entre as populações. Através do programa GENEPOP (Raymond e Rousset 1995) foi calculado o índice F_{ST} que mostra o valor da diversidade genética entre as populações (Hartl e Clark, 2007). Este valor é calculado a partir das frequências gênicas encontradas em certa população em comparação com a que foi encontrada em outras populações; através da seguinte expressão: $F_{ST} = H_T - H_S / H_T$; sendo, H_T a heterozigosidade total e H_S a heterozigosidade em certa subpopulação ou grupo (Hartl e Clark, 2007). Por exemplo, a frequência encontrada em Vale Vêneto foi comparada com a que foi encontrada em cada uma das outras três populações. Assim, uma matriz com os valores de F_{ST} comparados par a par foi gerada. Foram obtidos valores de F_{ST} para cada dupla de populações, e ainda agrupando as populações a leste e a oeste da Serra do Pinhal. De acordo com Hartl e Clark, 2007, valores de F_{ST} inferiores a 0,05 indicam pequena diferenciação genética; valores entre 0,05 e 0,15 mostram uma estruturação genética moderada; valores entre 0,15 e 0,25, uma alta estruturação, e valores superiores a 0,25 indicam uma diferenciação genética muito alta.

Para estimar o número efetivo de migrantes (Nm) entre as populações foram usados valores de F_{ST} através da equação: $Nm = 0.25 (1/F_{ST} - 1)$ (Wright, 1951).

3 **CAPÍTULO 1:**

ARTIGO (*Short Communication*): **Caracterização de marcadores microssatélites para *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura).**

**Caracterização de marcadores microssatélites para *Aegla longirostri*
(Crustacea, Decapoda, Anomura)**

Darine Buchmann¹, Paula Angélica Roratto², Sandro Santos^{2,3}, Marlise Ladvoat Bartholomei-Santos^{2,3}

¹Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 7105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

²Laboratório de Citogenética e Evolução, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

³Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 7105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

Corresponding author:

maliselbs@gmail.com

Laboratório de Diversidade Animal

Departamento de Biologia, sala 3129

Universidade Federal de Santa Maria

Av. Roraima, 1000 Camobi

97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

Fone: +55 55 32208339 (Ramal 222); Fax: +55 55 32208465 (Ramal 21)

Resumo

Locos de microssatélites isolados de uma biblioteca genômica contendo motivo de repetição (CA)_n foram caracterizados em 25 indivíduos de *Aegla longirostri*, provenientes de uma população de Vale Vêneto (RS). Dos oito locos de microssatélites caracterizados, sete se mostraram polimórficos com média de 4,4 alelos por loco. A distribuição genotípica de 3 marcadores está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg e todos os locos se encontram em equilíbrio de ligação. Logo, 7 marcadores microssatélites são adequados para estudos populacionais em *A. longirostri*.

Palavras-chave: *Aegla longirostri*, marcador molecular, microssatélite

Os aeglídeos são crustáceos decápodos endêmicos da região neotropical da América do Sul (Perez-Losada et al., 2002a). Ocorrem nas bacias hidrográficas do Brasil, Uruguai, Argentina, Bolívia, Paraguai e Chile (Bond-Buckup e Buckup, 1994). São os únicos crustáceos da Infraordem Anomura habitantes do substrato de lagos, cavernas e principalmente de rios e riachos de águas correntes e bem oxigenadas (Bond-Buckup, 2003). A maioria das espécies de *Aegla* tem áreas de distribuição restrita e são conseqüentemente de significativo interesse de conservação (Bond-Buckup, 2008). Além disso, os aeglídeos só ocorrem em ambientes bem preservados, o que os torna suscetíveis à intensa degradação ambiental.

A realização de pesquisas, capazes de criar bases confiáveis para a identificação sistemática das espécies de crustáceos límnicos existentes, surge como uma importante etapa para ampliar o conhecimento sobre a distribuição geográfica, taxonomia e estado de conservação de algumas espécies do gênero *Aegla* (Bond-Buckup e Buckup, 1994).

Aegla longirostri, encontrada na região central do Rio Grande do Sul, é uma das 63 espécies descritas, todas pertencentes ao gênero *Aegla*. Entretanto, o seu estado taxonômico não se encontra bem definido (Perez-Losada et al., 2002b).

Portanto, para um melhor conhecimento a respeito deste grupo tão peculiar foram isolados e caracterizados locos de microssatélites para a espécie *A. longirostri*.

Foram projetados 13 pares de *primers* para as regiões flangeadoras de locos de microssatélites isolados previamente do genoma de *A. longirostri* (Roratto, 2007). O programa OLIGO (Rychlin e Rhoads, 1989) foi utilizado para desenhar *primers* para os locos AICA105, AICA119 e AICA128; o programa Primer 3 (Rozen e Skaletsky, 2000) foi utilizado para os locos AICA99, AICA108, AICA120, AICA131, AICA135, AICA136, AICA138, AICA140, AICA145 e AICA159.

Após sucessivas tentativas de otimização da PCR não se obteve produto de amplificação para cinco locos, ALCA105, ALCA108, ALCA128, ALCA119 e ALCA140, provavelmente devido ao sítio de anelamento desses *primers* serem regiões ricas em adenina e timina. Além disso, não pode ser descartada a hipótese de locos quiméricos para estes cinco marcadores (Roratto et al, 2008). Os demais microssatélites tiveram suas condições estabelecidas e foram amplificados em 25 indivíduos provenientes da população do Arroio Divisa, pertencente ao município de Vale Vêneto, na região central do estado do Rio Grande do Sul (Figura 1). Cada PCR consistiu de 2,0 µL da amostra de DNA (aproximadamente 50 ng); 1,5µL de tampão 10x para Taq DNA polimerase (10mM tris-HCl, 50mM KCl); 0,6 µL de trifosfato de deoxinucleotídeos (dNTP) 10mM; 0,6µl de *primer forward* 10mM e *primer reverso* 10mM e 0,15µL de enzima *Taq DNA Polymerase* (5u/µL) para um volume final de 15 µL. Os PCRs consistiam de um estágio inicial de desnaturação a 94°C por 5 min seguido por 30 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C, 45s de temperatura de anelamento *primer*-específico (Tabela 1) e 45s de extensão a 72°C, com um passo de extensão final de 72°C por 5 min. Para alguns locos utilizou-se programas com temperaturas de anelamento com diminuição progressiva (*touchdown* – TD). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, de 25 cm de comprimento, corados com solução de nitrato de prata. Foram usados marcadores de peso molecular de 50pb e 10pb para identificação do tamanho dos fragmentos analisados. O programa GENEPOP (Raymond e Rousset, 1995) foi usado para análise do número de alelos, heterozigidade observada e esperada conforme o equilíbrio de Hardy-Weinberg e para teste de desequilíbrio de ligação.

Tabela 1 – Microsatélites isolados a partir do genoma de *A. longirostri* e suas respectivas condições de amplificação por PCR: temperatura de anelamento (T_a) e concentração de cloreto de magnésio.

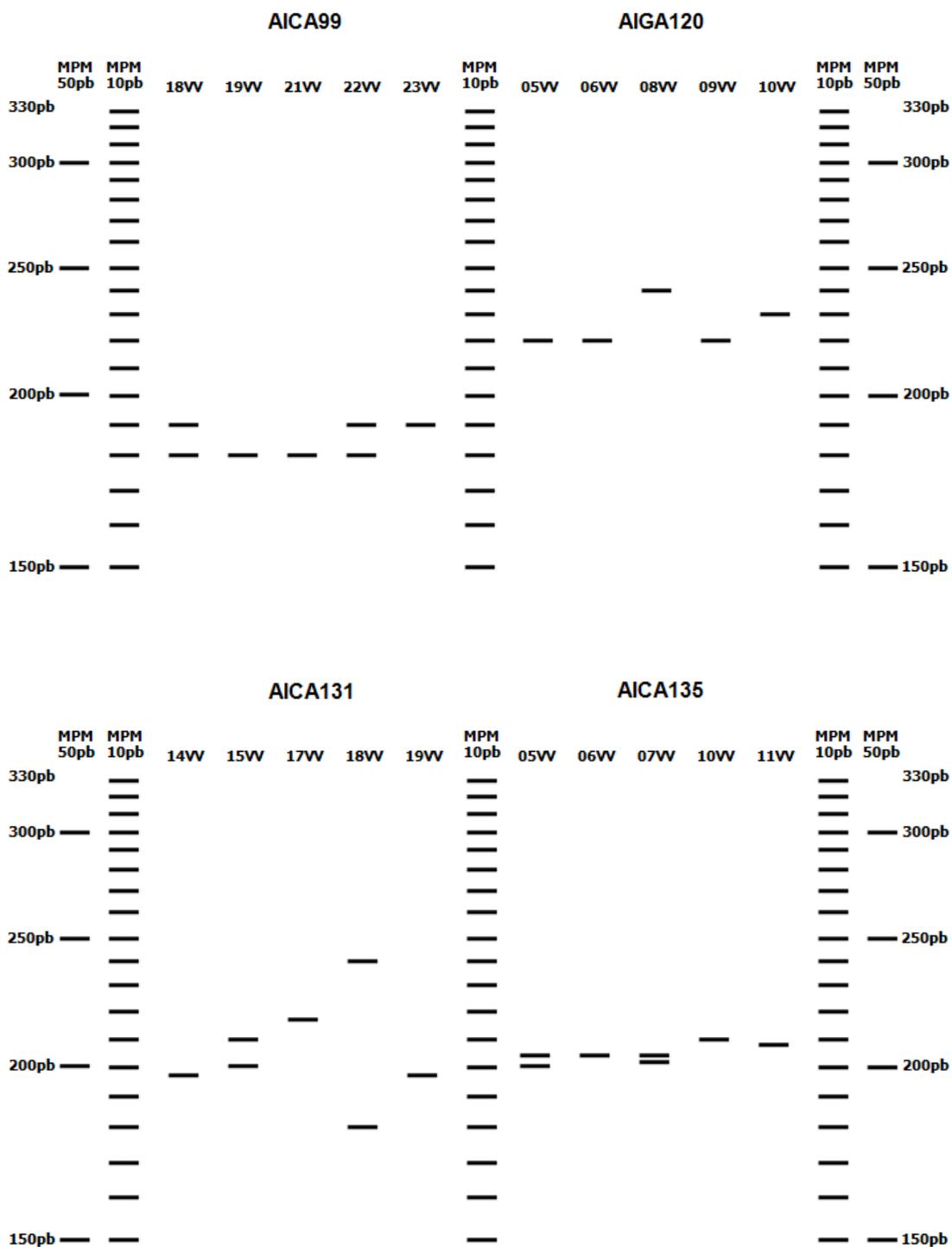
| Loco | Motivo de Repetição | Forward PRIMER (direto) Reverse PRIMER (reverso) 5'- 3' | T_a (°C) | [MgCl ₂] (mM) | Tamanho do Fragmento Clonado (pb) |
|---------|--|---|------------|------------------------------|---|
| AICA99 | (AC) ₁₀ ... (CA) ₈ | F: CCTGGTCTTGACGTTCCCTG R: GTCTTGTAATAATTGCGTATTTTGG | 50 | 2,5 | 193 |
| AIGA120 | (CT) ₃ (CA) ₆ (CT) ₂₃ | F: TCTCACCCCTCGTTAGTGAAG R: TTGGACTCTCCCATTTACCTC | TD60/50 | 2,0 | 250 |
| AICA131 | (AC) ₂₁ | F: ACACATATACATGCAATTTCCG R: CCGTTGCCACATCTCACT | TD60/50 | 1,5 | 179 |
| AICA135 | (CA) ₁₃ | F: CATCTCGCTCACGTGCTTTA R: TTTATGAGGGAATGGGGTGTA | 60 | 2,0 | 216 |
| AICA136 | (CT) ₆ (CA) ₂₈ | F: CGAACTGGGTC TAGCAGAATG R: GACCTCAGTCGTC T GACTG | 55 | 2,0 | 152 |
| AIGA138 | (GA) ₁₇ | F: GATTAGCACCACTGCCACA R: TGAGTGAACGAA TGGGTGAA | TD63/58 | 2,0 | 246 |
| AICA145 | (CA) ₁₃ | F: CAAGGGACATACATGCCCTCA R: AGGGTGAGGTTGCGTATTTG | 55 | 2,0 | 193 |
| AICA159 | (CA) ₁₅ | F: CCTGCTTTGACCAATGCTT R: TCAAACAGGAAGAGGGGCTA | 55 | 2,0 | 204 |

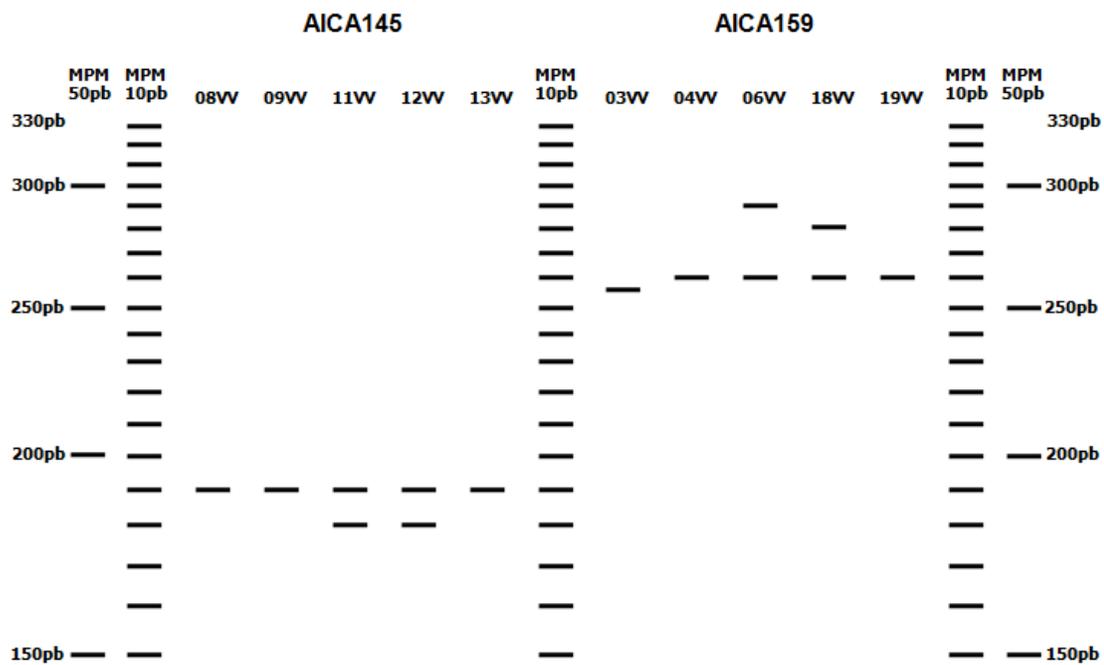
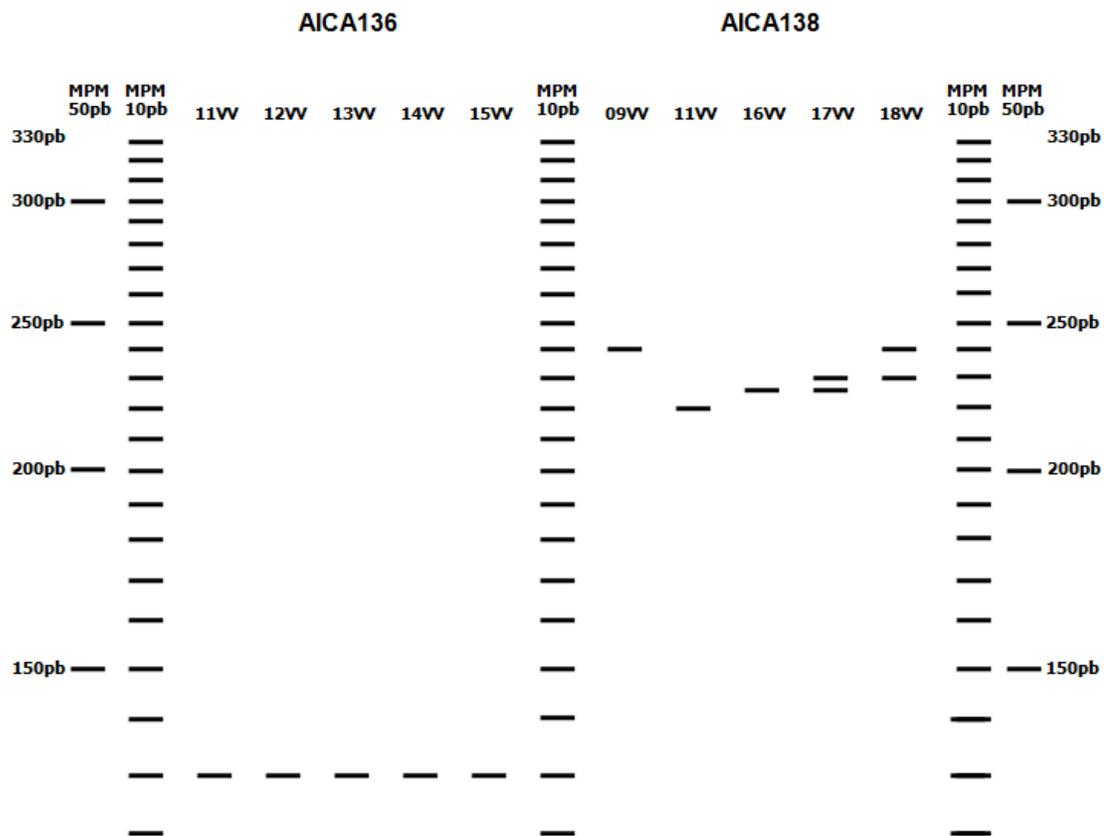
Dos oito microssatélites, sete mostraram-se polimórficos (Figura 6) com uma média de 4,4 alelos por loco. Os locos AICA99 e AICA145 foram menos polimórficos com apenas dois alelos, enquanto o loco AICA131 foi o mais polimórfico com 10 alelos (Tabela 2). A heterozigosidade média esperada e observada foi de 7,1 e 5,0, respectivamente. Testes exatos de Fisher revelaram que a distribuição genotípica dos marcadores AICA99, AICA145 e AICA159 está de acordo com a perspectiva do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) e que todos os locos estão em equilíbrio de ligação ($P > 0,05$). Desta forma, sete marcadores podem ser usados em estudos de diversidade genética e estrutura populacional na espécie *A. longirostri*. Estes marcadores constituem uma ferramenta molecular que será extremamente útil para estudos futuros visando responder questões-chave relacionadas à diferenciação genética entre populações, taxonomia e *status* de conservação da espécie.

Tabela 2 – Caracterização de 8 locos de microssatélites em indivíduos de *A. longirostri* oriundos do município de Vale Vêneto. Ho, heterozigosidade observada; He, heterozigosidade esperada; n, nº de indivíduos; HWE, teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

| Loco | Nº Alelos | Tamanho dos alelos (pb) | n | Ho | He | HWE (P) |
|---------|-----------|-------------------------|----|----|-----------|---------|
| AICA99 | 2 | 181-191 | 21 | 8 | 9.846154 | 0.6385 |
| AICA120 | 3 | 220-240 | 20 | 0 | 3.757576 | 0.0007 |
| AICA131 | 10 | 109-241 | 22 | 9 | 14.484847 | 0.0013 |
| AICA135 | 5 | 200-210 | 25 | 8 | 10.322580 | 0.0198 |
| AICA136 | 1 | 130 | 21 | — | — | — |
| AICA138 | 5 | 220-280 | 25 | 4 | 9.028571 | 0.0008 |
| AICA145 | 2 | 181-191 | 24 | 3 | 2.846154 | 1 |
| AICA159 | 4 | 257-291 | 24 | 8 | 6.818182 | 1 |

Figura 1 – Padrão de bandas correspondentes aos fragmentos de DNA de *Aegla longirostri* pertencentes à população de Vale Vêneto, amplificados com oito marcadores microssatélites.





¹Referências

BOND-BUCKUP, G. 2003. Família Aeglidae. *In*: Melo, G.A.S. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**, São Paulo: Loyola, p. 21-116.

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

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Arquivos de Zoologia**, v. 32, p. 159-346, 1994.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Conservation phylogenetics of Chilean freshwater crabs *Aegla* (Anomura, Aeglidae): assigning priorities for aquatic habitat protection. **Biological Conservation**, v.105, p. 345–353, 2002a.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Phylogenetic position of the freshwater anomuran family Aeglidae. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, p. 670-676, 2002b.

RAYMOND, M. E.; ROUSSET, F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenencism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

RORATTO, P. A. et al. PCR-mediated recombination in development of microsatellite markers: mechanism and implications. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 58-63, 2008.

RORATTO, P. A. **Isolamente e caracterização de microssatélites em *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

RYCHLIN, W. E.; RHOADS, R. E. A computer program for choosing optimal oligonucleotídeos for filter hibridization, sequencins and in vitro amplifications of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 8543-8551, 1989.

¹As referências bibliográficas estão de acordo com as regras da MDT da Universidade Federal de Santa Maria.

4 CAPÍTULO 2:

Artigo: **Estrutura genética de populações de *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura) revelada por locos de microssatélites**

Estrutura genética de populações de *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura) revelada por locos de microssatélites

Darine Buchmann¹, Paula Angélica Roratto², Sandro Santos^{2,3}, Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos^{2,3}

¹Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 7105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

²Laboratório de Citogenética e Evolução, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

³Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 7105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

Corresponding author:

maliselbs@gmail.com

Laboratório de Diversidade Animal

Departamento de Biologia, sala 3129

Universidade Federal de Santa Maria

Av. Roraima, 1000 Camobi

97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

Fone: +55 55 32208339 (Ramal 222); Fax: +55 55 32208465 (Ramal 21)

Resumo

Sete locos de microssatélites foram utilizados para avaliar a diversidade e diferenciação genética de *Aegla longirostri* em quatro populações da região central do estado do Rio Grande do Sul isoladas por uma barreira geográfica de origem montanhosa que separou as bacias do Uruguai e do Guaíba há cerca de 11 milhões de anos. Usando o índice de fixação F_{st} , uma considerável divergência genética foi detectada entre estas populações, com uma média de diferenciação de 33%. Diferenças significantes no número de alelos e na heterozigosidade entre as populações também foram detectadas. Os resultados indicam que a diferenciação genética é maior entre populações pertencentes a lados opostos da barreira do que entre populações pertencentes à mesma bacia hidrográfica, além do maior compartilhamento de alelos entre estas populações. Apesar de ser pouco provável a existência de fluxo gênico entre as populações da bacia do Guaíba, a separação geográfica das populações não corresponde ao padrão observado de diferenciação genética, fugindo à expectativa de um modelo de simples isolamento por distância.

Palavras-chave: *Aegla longirostri*; marcador molecular; fluxo gênico; estrutura genética, barreira geográfica

Introdução

O gênero *Aegla* representa o único grupo de crustáceos da Infraordem Anomura que habita cursos d'água continentais (Bond-Buckup, 2003). A maioria das espécies de *Aegla* tem áreas de distribuição limitadas às regiões de águas preservadas e limpas e são, portanto de significativo interesse de conservação. Entretanto, o seu estado de conservação se encontra comprometido pela ação humana principalmente por meio das atividades agrícolas, da silvicultura e criação suína no sul do Brasil (Bond-Buckup, 2008).

Devido a sua distribuição restrita e à rápida degradação das águas continentais o habitat das espécies de *Aegla* tem se reservado cada vez mais às nascentes (Buckup e Bond-Buckup, 1994). Usando o critério da lista vermelha das

espécies em ameaçadas da IUCN (IUCN, 2001), 36.5 % das 63 espécies reconhecidas do gênero foram identificadas sob perigo ou em risco de extinção (Bond-Buckup, 2008). Uma vez que as espécies de *Aegla* se encontram em tal condição, torna-se indispensável a realização de trabalhos ecológicos com o grupo, com o intuito de se obter dados confiáveis sobre as atuais condições dos aeglídeos nas bacias hidrográficas onde ocorrem (Gonçalves et al., 2006).

Aeglidae é a única família de anomuros endêmicos da América do sul meridional. Atualmente ocorrem nas bacias hidrográficas do sul do Brasil, Uruguai, Argentina, Bolívia, Paraguai e Chile. No Brasil estão distribuídos desde o limite entre o estado de Minas Gerais e o estado de São Paulo (Bueno et al., 2007), até o Rio Grande do Sul (Buckup e Bond-Buckup, 1994).

Das 63 espécies atuais, 36 são específicas do sul do Brasil, sendo 22 delas existentes no estado do Rio Grande do Sul (Bond-Buckup et al., 2003). O território do Rio Grande do Sul é formado por três grandes bacias hidrográficas: a Bacia do Uruguai, a qual faz parte da Bacia do Rio da Prata; a bacia do Guaíba e a Bacia Litorânea (Atlas Socioeconômico do RS). A maioria das espécies está restrita a uma única bacia, apenas uma é encontrada nas três regiões hidrográficas e quatro ocorrem nas bacias do Uruguai e do Guaíba, entre elas a espécie *Aegla longirostri* (Buckup e Bond-Buckup, 1994).

Populações de *A. longirostri* presentes nas duas bacias que drenam a região central do estado do Rio Grande do Sul estão sendo isoladas geograficamente devido a um divisor de águas de cerca de 11 milhões de anos conhecido como Serra do Pinhal. Uma faixa tectônica pós-cretáceo soergueu o planalto dando origem a esta barreira (Ab'Saber, 1970). Tal evento inverteu para leste a drenagem do Rio Jacuí, antes tributário da bacia do Uruguai (Moreira e Lima, 1977), e separou as populações da bacia do rio Ibicuí (Bacia do Uruguai) e Jacuí (Bacia do Guaíba). O tempo de isolamento determinado pela barreira montanhosa talvez seja suficiente para originar um processo de especiação entre estas populações, uma vez que cessou o fluxo gênico entre os indivíduos dos dois lados da serra. O mesmo pode estar ocorrendo entre populações pertencentes à mesma bacia hidrográfica devido à fragmentação do habitat causado pela impactação do meio ambiente.

No presente estudo foram utilizados marcadores moleculares com características ideais para analisar a variabilidade genética das populações de *A.*

longirostri e verificar a ocorrência de fluxo gênico entre as mesmas. Microssatélites são marcadores caracterizados por um alto grau de polimorfismo. Por causa de sua natureza multi-alélica, herança codominante, extensiva cobertura genômica e relativa abundância, os microssatélites são aplicados com sucesso em uma ampla variedade de campos de pesquisa (Powell et al., 1996), como no estudo do grau de estruturação das populações e migração (Ciofi e Bruford, 1999; Waits et al., 2000). Deste modo, são ferramentas ideais para verificar se está acontecendo um efeito de estruturação genética das populações de *A. longirostri* causada pela barreira montanhosa e pela degradação ambiental das águas continentais.

Metodologia

Amostragem e locais de coleta

Um total de 107 indivíduos de *Aegla longirostri* foi amostrado a partir de quatro diferentes populações da região central do estado do Rio Grande do Sul. Foram coletados 25 indivíduos no Rio Ibicuí-Mirim, Município de Val de Serra, pertencente à Bacia do Uruguai (29°28'57"S; 53°43'47"W); 34 no Rio Michelin, Município de Ivorá (29°29'31"S; 53°34'19"W); 25 no tributário do Arroio Divisa, Município de Vale Vêneto, (29°30'33"S; 53°32'02"W); 23 no tributário do Rio Vacacai-Mirim, Município de Santa Maria (29°40'13"s; 53°45'44"W). As últimas três populações pertencem à Bacia do Guaíba (Figura 1). Na região central do estado, as bacias do Uruguai e do Guaíba são separadas pela Serra do Pinhal, um conjunto de formações montanhosas, com picos de até 500 metros de altura, que corresponde ao soerguimento leste-oeste da Serra Geral (Pereira et al., 1989). A área de estudo está inserida na Depressão Central do estado, localizada entre o limite sul do Planalto Meridional Brasileiro, a campanha ao oeste, o litoral ao leste e a Serra do Sudoeste ao sul (Rambo, 1994).

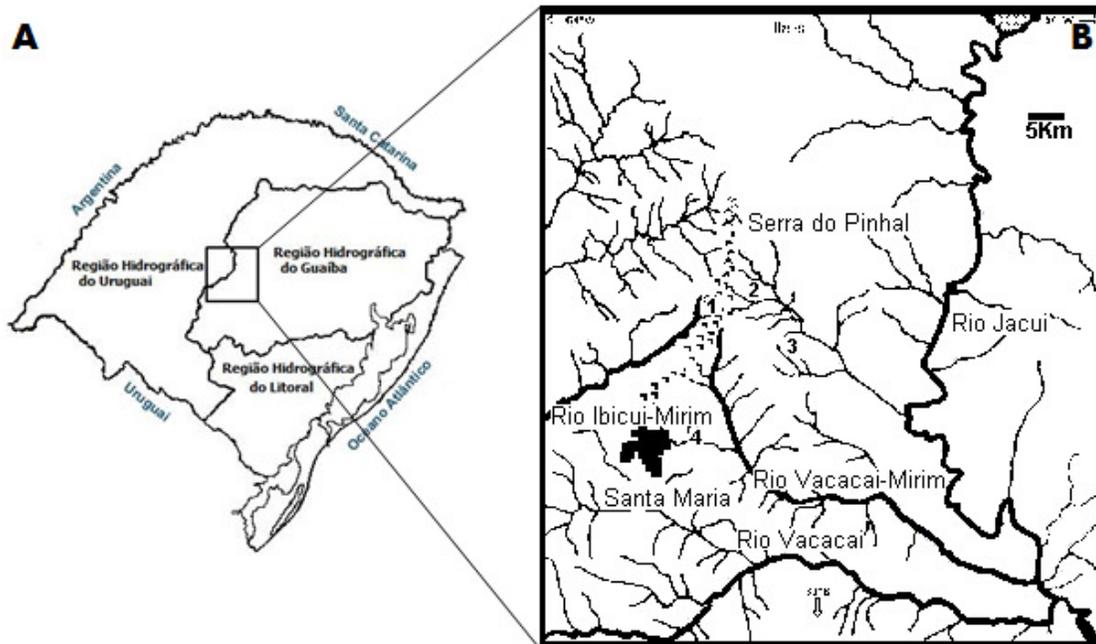


Figura 1- A: Mapa com as bacias hidrográficas do estado do Rio Grande do Sul. B: Mapa hidrográfico enfatizando a região central do estado do Rio Grande do Sul com os quatro pontos de coleta. 1: rio Ibicuí-Mirim (Val de Serra); 2: Rio Michelin (Ivorá) ; 3: tributário do Arroio Divisa (Vale Vêneto) ; 4: tributário do rio Vacacai-Mirim (Santa Maria).

5.3.2 Extração de DNA

No laboratório, os animais foram mantidos em aquários até o momento da dissecação, quando os mesmos foram sacrificados por resfriamento durante 30 minutos.

Os tecidos das brânquias, dos músculos abdominais e quelípodos foram dissecados sobre superfície de gelo e submetidos à extração de DNA total. Os tecidos removidos foram inseridos em solução contendo 400mL de tampão de lise (Tris-HCl 100mM; EDTA 100mM; NaCl 250mM), SDS 2%, β -mercaptoetanol 1% e proteinase K 0,2 mg/mL e macerados com auxílio de bastão de vidro. Em seguida, a solução foi submetida a banho-maria durante o mínimo de 4 horas a 65°C (Bitencourt et al., 2007).

Foi seguida a metodologia tradicional de extração de DNA com fenol-clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001). O DNA extraído foi precipitado com 2,5

volumes de etanol absoluto gelado e 1% de NaCl 5M. Após centrifugação e 3 lavagens do precipitado com etanol 70%, o mesmo foi eluído em um volume de tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM) de acordo com a quantidade de material obtido. Depois de tratadas com RNase durante 1 hora a 37°C e purificadas por PEG 8000 13%/NaCl 1,6M (Sambrook e Russel, 2001), as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, quantificadas, identificadas e armazenadas a 4°C negativo.

Amplificação por PCR

Sete locos de microssatélites polimórficos previamente isolados do genoma de *Aegla longirostri* foram amplificados por PCR a partir das amostras de DNA de indivíduos da mesma espécie pertencentes às quatro populações citadas anteriormente.

Para um volume final de 15,0 µL foram utilizados 2,0 µL da amostra; 1,5µL de tampão 10x para *Taq* DNA polimerase (10mM tris-HCl, 50mM KCl); 0,6 µL de trifosfato de deoxinucleotídeo (dNTP) 10mM; 0,6 µL de *primer forward* 10 mM e *primer* reverso 10 mM e 0,15 µL de enzima *Taq* DNA Polimerase (5u/µL). A quantidade de MgCl₂ variou de acordo com a concentração estabelecida para cada *primer*. Como controles positivos foram utilizados os plasmídeos contendo a repetição do microssatélite e para controle negativo foi acrescentado água milli-Q na reação. Os PCRs consistiram de um estágio inicial de desnaturação a 94°C por 5 min seguido por 30 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C, 45 s de temperatura de anelamento *primer*-específico (Tabela 1) e 45 s de extensão a 72°C, com um passo de extensão final de 72°C por 5 min.

Tabela 1 – Microsatélites isolados a partir do genoma de *A. longirostri* e suas respectivas condições de amplificação por PCR: temperatura de anelamento (Ta) e concentração de cloreto de magnésio.

| Loco | Motivo de Repetição | Forward PRIMER (direto) Reverse PRIMER (reverso) 5'- 3' | Ta (°C) | [MgCl ₂] (mM) | Tamanho do Fragmento Clonado (pb) |
|---------|--|---|---------|------------------------------|---|
| AICA99 | (AC) _{10...} (CA) ₈ | F: CCTGGTCTTGACGTTCCCTG R: GTCTTGTAATAATTGCGTATTTTGG | 50 | 2,5 | 193 |
| AIGA120 | (CT) ₃ (CA) ₆ (CT) ₂₃ | F: TCTCACCCCTCGTTAGTGAAG R: TTGGACTCTCCCATTTACCTC | TD60/50 | 2,0 | 250 |
| AICA131 | (AC) ₂₁ | F: ACACATATACATGCAAATTTCCG R: CCGTTGCCACATCTCACT | TD60/50 | 1,5 | 179 |
| AICA135 | (CA) ₁₃ | F: CATCTCGCTCACGTGCTTTA R: TTTATGAGGGAAATGGGGTGTA | 60 | 2,0 | 216 |
| AICA136 | (CT) ₆ (CA) ₂₈ | F: CGAACTGGGTCTAGCAGAAATG R: GACCTCACGTGCTCTGACTG | 55 | 2,0 | 152 |
| AIGA138 | (GA) ₁₇ | F: GATTTAGCACCCACTGCCACA R: TGAGTGAACGAAATGGGTGAA | TD63/58 | 2,0 | 246 |
| AICA145 | (CA) ₁₃ | F: CAAGGGACATACATGCCCTCA R: AGGGTGAGGTTGCCGATTTG | 55 | 2,0 | 193 |
| AICA159 | (CA) ₁₅ | F: CCTGTCTTGACCAATGCCTT R: TCAAACAGGAAGAGGGGCTA | 55 | 2,0 | 204 |

Eletroforese

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamina 6% não desnaturante com tamanho de 25 cm de comprimento. O tempo de corrida das eletroforeses foi de aproximadamente 5h a 300 V ou 12h a 120 V. Os géis foram corados com nitrato de prata.

Análise dos géis

O tamanho dos alelos encontrados para cada indivíduo analisado foi determinado manualmente por comparação com marcadores de peso molecular de 10pb e 50pb e com uma escala alélica construída com os próprios alelos encontrados para cada loco.

Análise populacional

As informações obtidas foram analisadas estatisticamente através do programa GENEPOP (Raymond e Rousset, 1995) para estimar a frequência alélica e a heterozigosidade esperada e observada para cada loco em cada população, além de testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação para cada marcador.

O índice de fixação F_{st} mostra o valor da diversidade genética entre as populações (Hartl e Clark, 2007). Valores de F_{st} foram obtidos para cada dupla de população para verificar a estrutura genética entre as mesmas, e ainda agrupando as populações a leste e oeste da barreira geográfica para averiguar o grau de divergência entre as populações das diferentes bacias.

Resultados

Polimorfismo e frequência alélica

Nas populações de *A. longirostri* estudadas foi encontrado um total de 41 alelos diferentes para os sete marcadores utilizados. O maior número de alelos por loco foi 14, para AICA131. Os locos com menor número de alelos foram AICA120 e AICA145, com apenas um alelo cada para as populações de Val de Serra e Santa Maria, respectivamente. A maioria dos locos apresentou polimorfismo dentro de cada população. Como pode ser visto nas tabelas 2 e 3, alguns marcadores não amplificaram igualmente entre as populações. O loco AICA159 amplificou somente na população de Vale Vêneto e os locos AICA120 e AICA145 foram os únicos que amplificaram nas quatro populações, e ainda, os únicos que amplificaram em Ivorá. A média de alelos por loco por população variou de 0,86 (Ivorá) a 4,43 (Vale Vêneto) para todos os locos de microssatélites utilizados.

Alelos encontrados em somente uma população são chamados alelos restritos. Foram detectados 23 desses alelos para todas as populações. Vale Vêneto é a população que possui o maior número de alelos restritos (Tabela 2). Val de Serra, pertencente ao lado oeste da Serra do Pinhal, compartilha alelos somente com a população de Santa Maria. Entretanto, foi detectado compartilhamento de alelos entre todas as populações da bacia do Guaíba.

Tabela 2 – Número de alelos encontrados para cada loco, número de alelos restritos e o valor da média de alelos por loco em cada população. ¹média somente com os *primers* que amplificaram; ²média entre todos os locos.

| Populações | Val Serra | Ivorá | Vale Vêneto | Santa Maria |
|---------------------------------|-----------|-------|-------------|-------------|
| AICA99 | 2 | - | 2 | - |
| AIGA120 | 1 | 4 | 3 | 3 |
| AICA131 | - | - | 10 | 9 |
| AICA135 | 3 | - | 5 | 3 |
| AIGA138 | - | - | 5 | 2 |
| AICA145 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| AICA159 | - | - | 4 | - |
| Nº alelos restritos | 2 | 1 | 15 | 5 |
| Média alelos/ loco ¹ | 2,0 | 3,0 | 4,43 | 3,6 |
| Média alelos/ loco ² | 1,14 | 0,86 | 4,43 | 2,57 |

Tabela 3 – Locos de microssatélites selecionados para análise de polimorfismo em quatro populações da região central do estado do Rio Grande do Sul. Os locos que não amplificaram estão identificados por alelo igual a zero. *alelos restritos

| VAL DE SERRA (Bacia do Uruguai) | | | | IVORÁ (Bacia do Guaíba) | | |
|---------------------------------|----|-----------|---|-------------------------------|-----------|---|
| Loco | N | Nº Alelos | Tamanho dos Alelos (pb) | N | Nº Alelos | Tamanho dos Alelos (pb) |
| AICA99 | 22 | 2 | 181, 191 | 32 | 0 | 0 |
| AIGA120 | 25 | 1 | 210 | 34 | 4 | 216, 220, 230, 250* |
| AICA131 | 22 | 0 | 0 | 31 | 0 | 0 |
| AICA135 | 25 | 3 | 220, 224*, 226* | 34 | 0 | 0 |
| AIGA138 | 23 | 0 | 0 | 26 | 0 | 0 |
| AICA145 | 24 | 2 | 181, 191 | 33 | 2 | 181, 191 |
| AICA159 | 25 | 0 | 0 | 34 | 0 | 0 |
| VALE VÊNETO (Bacia do Guaíba) | | | | SANTA MARIA (Bacia do Guaíba) | | |
| Loco | N | Nº Alelos | Tamanho dos Alelos (pb) | N | Nº Alelos | Tamanho dos Alelos (pb) |
| AICA99 | 21 | 2 | 181, 191 | 23 | 0 | 0 |
| AIGA120 | 20 | 3 | 220, 230, 240* | 23 | 3 | 210, 216, 220 |
| AICA131 | 22 | 10 | 109*, 181*, 191*, 197*, 199, 201, 211, 217*, 219, 241 | 23 | 9 | 199, 201, 209*, 211, 219, 227*, 231*, 241, 271* |
| AICA135 | 25 | 5 | 200, 202*, 204*, 208*, 210 | 23 | 3 | 200, 210, 220 |
| AIGA138 | 25 | 5 | 220*, 226*, 230*, 240, 280* | 16 | 2 | 240, 246* |
| AICA145 | 24 | 2 | 181, 191 | 23 | 1 | 191 |
| AICA159 | 24 | 4 | 257*, 261*, 281*, 291* | 23 | 0 | 0 |

Heterozigosidade e equilíbrio de Hardy-Weinberg

Acasalamentos ao acaso foram detectados para pelo menos um loco dentro de cada população ($P > 0.05$), entretanto, a proporção genotípica observada para a maioria dos marcadores para as quatro populações desvia-se daquela esperada para o HWE. A média de heterozigosidade observada para todos os locos variou de 5,71 (população de Vale Vêneto) a 1,71 (população de Ivorá e de Santa Maria). A heterozigosidade observada por loco em cada população difere daquela esperada sob HWE em 10 casos. Em todas elas, um déficit da heterozigosidade foi encontrado. Um total de quatro locos se encontra em HWE, sendo que um excesso na heterozigosidade foi detectado para AICA145 em relação às populações de Vale Vêneto e Val de Serra. O mesmo ocorreu para o primer AICA159 somente para a população de Vale Vêneto (Tabela 4).

Tabela 4 – Heterozigosidade observada e esperada e equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os locos em cada população. Tamanho amostral (N); heterozigosidade esperada (*He*) e heterozigosidade observada (*Ho*) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para sete locos. Locos sob HWE (negrito); *excesso de heterozigozidade

| População | Loco | N | <i>He</i> | <i>Ho</i> | HWE (P) |
|--------------|-----------------|----|------------------|-----------|---------------|
| VALE VÊNETO | AICA99 | 21 | 9.846154 | 8 | 0.6399 |
| | AICA120 | 20 | 3.757576 | 0 | 0.0010 |
| | AICA131 | 22 | 14.484847 | 9 | 0.0018 |
| | AICA135 | 25 | 10.322580 | 8 | 0.0155 |
| | AICA138 | 25 | 9.028571 | 4 | 0.0017 |
| | AICA145* | 24 | 2.846154 | 3 | 1 |
| | AICA159* | 24 | 6.818182 | 8 | 1 |
| | Média/ Loco | | 8,14 | 5,71 | |
| VAL DE SERRA | AICA99 | 22 | 4.047619 | 1 | 0.0369 |
| | AICA120 | 25 | - | - | - |
| | AICA131 | 22 | - | - | - |
| | AICA135 | 25 | 8.757576 | 4 | 0.0000 |
| | AICA138 | 23 | - | - | - |
| | AICA145* | 24 | 9.846154 | 10 | 0.3858 |
| | AICA159 | 25 | -- | - | - |
| | Média/ Loco | | 3,28 | 2,43 | |
| IVORÁ | AICA99 | 32 | - | - | - |
| | AICA120 | 34 | 17.176472 | 0 | 0.0000 |
| | AICA131 | 31 | - | - | - |
| | AICA135 | 34 | - | - | - |
| | AICA138 | 26 | - | - | - |
| | AICA145 | 33 | 12.830188 | 12 | 1 |
| | AICA159 | 34 | -- | - | - |
| | Média/ Loco | | 4,14 | 1,71 | |
| SANTA MARIA | AICA99 | 23 | - | - | - |
| | AICA120 | 23 | 7 | 3 | 0.0055 |
| | AICA131 | 23 | 11.039998 | 6 | 0.0015 |
| | AICA135 | 23 | 9.666667 | 3 | 0.0000 |
| | AICA138 | 16 | 1.714286 | 0 | 0.1452 |
| | AICA145 | 23 | - | - | - |
| | AICA159 | 23 | - | - | - |
| | Média/ Loco | | 4,28 | 1.71 | |

Desequilíbrio de Ligação

Ao se comparar pares de locos em todas as populações, todos os locos se encontraram em equilíbrio de ligação pelo Método de Fisher.

Diferenciação Populacional

Nas análises realizadas para verificar a estrutura genética entre as populações foram obtidos valores de F_{st} para cada dupla de populações. Estes índices mostraram diferentes níveis de diferenciação genética entre as populações estudadas. A maioria dos pares de populações mostrou estrutura genética muito alta. Entretanto, a população com o maior N , Val de Serra, foi a mais diferenciada. Esta população apresentou uma estrutura genética maior quando comparada às demais populações do que entre as populações da bacia do Guaíba. As populações menos diferenciadas são Ivorá e Santa Maria, que apresentaram o menor valor de F_{st} , embora este valor ainda seja alto. O valor do F_{st} gerado, quando as populações separadas pela serra do Pinhal foram agrupadas em duas, Val de Serra na bacia do Uruguai e Vale Vêneto, Ivorá e Santa Maria agrupadas na bacia do Guaíba, foi de 0,2813. Para esse valor a estrutura genética é considerada muito alta entre os dois grupos, porém foi menor do que quando se comparou separadamente a população de Val de Serra com as outras três populações (Tabela 5).

Esta variabilidade genética entre as populações reflete o fluxo gênico (Nm) entre elas. Os valores Nm foram muito baixos variando de 0,3254 entre Ivorá e Santa Maria a 0,4872 entre Val de Serra e Vale Vêneto, indicando fluxo gênico muito baixo entre todas as populações (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores de F_{ST} gerado para cada dupla de populações e número de migrantes (Nm) entre as populações calculado a partir dos valores de F_{ST} .

| Populações | Val Serra | Vale Vêneto | Ivorá | Santa Maria | B. Uruguai | B. Guaíba |
|-------------|-----------|-------------|----------|-------------|------------|-----------|
| Val Serra | | 0.4868 | - 0.4236 | - 0.3716 | | |
| Vale Vêneto | - 0.4872 | | - 0.3373 | - 0.3547 | | |
| Ivorá | 0.4099 | 0.2589 | | - 0.3254 | | |
| Santa Maria | 0.3273 | 0.2952 | 0.2318 | | | |
| B. Uruguai | | | | | | 0.2813 |
| B. Guaíba | | | | | -0.3478 | |

Discussão

Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação

Um significativo desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi encontrado para a maioria dos locos em todas as populações, provavelmente um efeito da subdivisão populacional. A heterozigosidade observada foi inferior àquela esperada sob o HWE para a maioria dos marcadores utilizados. Este efeito sugere que nas populações estudadas os acasalamentos não acontecem ao acaso. Entretanto, todos os locos se encontram em equilíbrio de ligação, o que segundo Hartl e Clark, 2007, acontece em populações nas quais os acasalamentos se dão ao acaso.

Como microssatélites em geral são locos seletivamente neutros, é pouco provável que a ausência de equilíbrio de Hardy-Weinberg se deva à seleção natural atuando sobre os locos estudados. Como o fluxo gênico é muito baixo entre as populações, também não pode ser associado à ausência de equilíbrio. Assim, o efeito observado de ausência de equilíbrio de Hardy-Weinberg na maioria dos locos possivelmente está relacionado à pequena amostragem em cada população (16 a 34 indivíduos analisados) e/ou à presença de alelos nulos não identificados dentro de cada população.

Frequência de alelos e diversidade genética

Uma significativa diferença no número de alelos foi encontrada entre todas as populações principalmente entre Vale Vêneto e as demais populações. Os marcadores microssatélites detectaram diferenças no número médio de alelos por loco de 0,86 a 4,43 entre as populações. Essa variação foi proporcional a média da heterozigosidade observada para todos os locos, que variou de 1,71 a 5,17 entre as populações. Estes resultados mostram que a diversidade alélica foi perdida tanto quanto a heterozigosidade. Implicações diferentes foram encontradas em um estudo com quatro populações de *Leontopithecus rosalia* isoladas por fragmentos de floresta no estado do Rio de Janeiro (Grativol et al., 2001), onde a variação alélica foi perdida mais rapidamente do que a heterozigosidade.

Outro resultado que indica a perda da diversidade genética em *A. longirostri*, é proporcionado pelo número de alelos restritos. Estes estão presentes em todas as populações e em número ainda maior em Vale Vêneto, provavelmente por causa do maior número de alelos encontrados na população.

Fst e diferenciação populacional

A estrutura genética populacional é estudada a partir de divergência genética entre as populações. Quando existe uma alta estruturação genética entre populações significa que estas estão isoladas, no que diz respeito ao fluxo gênico; e quando não existe estruturação genética entre populações significa que estas são panmíticas, ou seja, geneticamente se comportam como uma única população (Andrade, 2006). Neste trabalho, a estrutura genética das populações inferida pelos valores de Fst mostra que existem dois níveis de estruturação, dependendo das populações em questão. Em comparação com os valores definidos por Hartl e Clark, 1997, foi possível encontrar populações com estrutura genética alta e muito alta (Tabela 3).

Um dos principais aspectos nos estudos de estruturas populacionais constitui a determinação dos níveis de fluxo gênico entre as populações, pois este é o maior

componente da estrutura populacional, determinando a extensão a qual cada população local de uma espécie é uma unidade geneticamente diferenciada (Slatkin, 1994). O presente estudo revelou divergência genética considerável entre todas as populações, com uma média estimada do F_{st} de 33%. Este grau de diferenciação genética indica pouca troca de migrantes entre as populações. Como consequência, as populações não possuem um intenso fluxo gênico, ou seja, são populações separadas.

Neste caso, embora seja possível o sucesso de migração de *A. longirostri* entre as três populações analisadas da bacia do Guaíba, ela parece improvável. Ao mesmo tempo, não existe praticamente nenhuma chance de migração entre estas populações e Val de Serra.

De fato, o número de migrantes por geração para todas as duplas de populações comparadas foram muito baixos. A relação genética entre a proporção de migração, especialmente para populações há muito tempo isoladas, como as de *A. longirostri*, deve refletir a atual dinâmica populacional da espécie. Ainda pouco se sabe a respeito da dispersão de *Aegla longirostri*. Entretanto, uma evidência que ressalta a possibilidade de ausência de fluxo gênico entre as populações reside no fato de não existir estágio larval em aeglídeos. Uma vez que os ovos eclodem como juvenis de indivíduos adultos, deduz-se que sua dispersão seja dificultada, restringindo a migração, o que provavelmente causou a diferenciação genética encontrada nestas populações.

Parte da divergência genética pode estar sendo causada pela ausência de fluxo gênico entre populações separadas por grandes distâncias ou pela barreira montanhosa. A ação antrópica também pode estar contribuindo, mas em proporção bem menor, visto que o nível de diferenciação genética encontrado entre as populações estudadas é muito alto, o que requer um tempo evolutivo longo.

Como pode ser visto na tabela 4, a estrutura genética mais elevada foi encontrada entre as populações de *Aegla* de Val de Serra e Vale Vêneto ($F_{st} = 0,4868$). Todas as populações quando comparadas com Val de Serra apresentaram estruturação genética muito alta com os valores mais elevados de F_{st} . Os valores de F_{st} encontrados neste trabalho corroboram a hipótese do isolamento das populações de *Aegla longirostri* por barreira geográfica, sendo que a população de Val de Serra foi a mais divergente. Além disso, o compartilhamento de poucos alelos

entre as populações, mencionado anteriormente, também reforça a idéia do isolamento pela Serra do Pinhal.

O valor de F_{st} gerado quando as populações foram divididas em dois grupos separados pela barreira montanhosa, bacia do Uruguai e bacia do Guaíba, apontam para elevada divergência genética, mas encontra-se um valor menor do que aquele determinado para as quatro populações separadas. Entretanto, o valor de F_{st} (0,2813) entre essas duas populações permanece indicando estruturação genética muito alta. Como conseqüência da suposta ausência de fluxo gênico provocada pela barreira geográfica, as populações estariam se diferenciando cada vez mais com o passar do tempo.

Neste estudo, a estruturação genética entre todos os pares de populações foi muito alta ($> 0,25$), exceto entre as populações de Ivorá e Santa Maria, que apresentou estruturação genética alta ($0,20 < F_{st} < 0,25$). Pode-se ainda ver que a diferenciação genética entre as populações de Ivorá e Santa Maria é menor do que a observada entre Ivorá e Vale Vêneto, apesar destas duas populações estarem geograficamente mais próximas do que aquelas (Figura 1). Deste modo, a separação geográfica das populações não corresponde ao padrão observado de diferenciação genética. Esta relação não sugere isolamento por distância, mas a ausência de fluxo gênico deve explicar o padrão ocorrente de divergência genética das populações de *Aegla*.

Índices de fixação F_{st} entre as populações foram muito elevados, o que deve explicar a diferenciação genética dentro das populações isoladas de uma população previamente panmítica, dado o tempo desde o início da fragmentação (aproximadamente 11 milhões de anos, quando houve o soerguimento da Serra do Pinhal).

Os resultados deste estudo estão de acordo com os de Santos et al. (2007) que inferiram, a partir da utilização de perfis eletroforéticos de DNA Heteroduplex, diferenciação genética entre populações de *A. longirostri* de ambas as bacias, bem como o compartilhamento de bandas entre indivíduos de populações do mesmo lado da barreira geográfica.

Entretanto, ao analisarmos as tabelas 3 e 4, a população mais diferenciada parece ser Ivorá. Dos sete marcadores utilizados, somente dois amplificaram nesta população, sendo um deles monomórfico, além de ser um loco conservado em todas

as populações. Portanto, apenas o loco AICA120 é informativo para a população de Ivorá.

O fato de alguns marcadores não amplificarem em populações inteiras não pode ser atribuído a problemas nas amostras de DNA uma vez que as mesmas amplificaram com outros pares de *primers*. Também foram descartados problemas com a enzima Taq DNA polimerase e demais reagentes usados na reação de PCR. Os mesmos reagentes foram empregados em outras reações de PCR que amplificaram. Quando uma nova enzima Taq DNA polimerase era utilizada, testes de amplificação eram realizados em amostras anteriormente amplificadas antes de se iniciar o procedimento com novas amostras.

Rejeitados tais inconvenientes, pode ser considerada a hipótese de alelos nulos para toda uma população para a qual não se obteve amplificação. Alelos nulos ocorrem quando há mutação no sítio de anelamento do *primer*, impedindo assim a amplificação daquele loco. Se for realmente um caso de alelos nulos, a população de Ivorá parece ser a mais diferenciada. Esta questão diz respeito à confiabilidade nas análises realizadas pelo programa GENEPOP, quando não se obtém amplificação de um loco em uma população inteira. Não sabemos se o programa leva em consideração as populações sem nenhuma amplificação, ou seja, se o programa avalia a população com todos os indivíduos possuindo alelos nulos, ou se ele desconsidera a população das análises. Comparando-se os dados brutos com as análises feitas pelo GENEPOP, pode-se presumir que a segunda alternativa seja a correta, ou seja, o programa consideraria populações com ausência de amplificação em certo loco como dados faltantes, o que pode levar a interpretações errôneas dos resultados.

A presença de alelos nulos para certos locos em populações inteiras faz com que outra hipótese deva ser considerada: a existência de espécies crípticas entre as populações analisadas. Microssatélites necessitam ser isolados para as espécies que estão sendo estudadas pela primeira vez, o principal inconveniente do uso desse marcador (Zane et al., 2002), pois geralmente não amplificam em outras espécies. Entretanto, a amplificação cruzada é possível para alguns locos. Testes de amplificação cruzada são comuns em estudos de microssatélites. Freitas et al. (2007), por exemplo, testou oito locos isolados para *Litopenaeus vannamei* em cinco espécies diferentes de camarão. Cinco marcadores amplificaram em pelo menos uma delas.

Os dados sobre estas populações são preliminares, uma vez que o tamanho amostral é baixo devido a dificuldades de coleta, bem como o lado oeste da barreira montanhosa ser representado por uma única população. Para um melhor entendimento sobre as questões populacionais tratadas neste trabalho são necessários estudos adicionais com um número maior de populações, amplificação cruzada dos microssatélites isolados, uso de marcadores de DNA mitocondrial, além de questões comportamentais como dispersão da espécie e uso de outros programas computacionais.

²Referências

AB'SABER, A. N. Províncias geológicas e domínios morfológicos do Brasil. **IGE-USP, Série Morfologia**, São Paulo, p. 20, 1970.

ANDRADE, C. C. F. **Estudo da estrutura genética das populações de Sagüis (*Callithrix spp.*) introduzidos na área de proteção ambiental da bacia do Rio São João/ mico-leão-dourado, no estado do Rio de Janeiro**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacazes, RJ.

Atlas socioeconômico do RS Disponível em: < <http://www.scp.rs.gov.br/atlas>>. Acesso em: 7 fev. 2009.

BITENCOURT, J. V. T. et al. Comparison of different methodologies for DNA extraction from *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 989-994, 2007.

BOND-BUCKUP, G. Família Aeglidae. *In*: MELO, G.A.S. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**, São Paulo: Loyola, p. 21-116, 2003.

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

² As referências bibliográficas estão de acordo com as regras da MDT da Universidade Federal de Santa Maria.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Arquivos de Zoologia**, v. 32, p. 159-346, 1994.

BUENO, S. L. DE S.; SHIMIZU, R. M.; ROCHA S. S. DA. Estimating the population size of *Aegla franca* (Decapoda: Anomura:Aeglidae) by mark-recapture technique from an isolate section of Barro Preto stream, county of Claraval, state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v.27, p. 553–559, 2007.

CIOFI, C.; BRUFORD, M. W. Genetic structure and gene flow among komodo dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 17-30, 1999.

FREITAS, P.D.; JESUS, C. M.; GALETTI JR. P. M. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and cross-species amplification in other penaeid species. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 324–326, 2007.

GONÇALVES, R. S.; CASTIGLIONI D. S.; BOND-BUCKUP G. Ecologia populacional de *Aegla franciscana* (Crustacea, Decapoda, Anomura) em São Francisco de Paula, RS, Brasil. **Iheringia, Série. Zoologia**, v. 96: p. 109-114, 2006.

GRATIVOL A. D; BALLOU J.D.; FLEISCHER R. C. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). **Conservation Genetics**, v. 2, p.1–9, 2001.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 3. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2007. cap. 4, p. 111-162.

IUCN , 2001. **IUCN Red List Categories**: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland.

MOREIRA, A. A. N.; LIMA, G. R. Relevô *In: Geografia do Brasil, Região Sul*, Rio de Janeiro: Fundação IBGE, v. 5. p. 01-34. 1977.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v.1, p. 215-222, 1996.

RAYMOND, M. E.; ROUSSET, F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenencism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

SAMBROOCK, J. e RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 3.ed, v.2, 2001.

SANTOS, S.; RORATTO, P. A.; BITENCOURT, J. V. T. BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. Genetic differentiation of *Aegla longirostri* (Decapoda, Anomura) isolated by a geographical barrier. (Manuscrito em preparação).

SLATKIN, M. Gene flow and popularion structure. **Ecological Genetics**, Princecton University Press, 238p., 1994.

WAITS, L. et al. Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctos*). **Molecular Ecology**, v. 9, p. 421–431, 2000.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.

5 CONCLUSÃO

Quanto à caracterização dos microssatélites, obteve-se um número regular de marcadores polimórficos, uma vez que foi possível caracterizar mais de 50% dos locos selecionados e 87,5% deles se mostraram polimórficos.

Existe uma diferenciação genética muito grande entre todas as populações e não somente com relação ao isolamento pela barreira geográfica, indicando um baixo fluxo gênico.

O nível de diferenciação não pode ser atribuído exclusivamente à ação antrópica, a qual restringe os aeglídeos às nascentes, devido à poluição dos corpos d'água.

Estudos a respeito da capacidade de dispersão e também das taxas de mutação nestes crustáceos, poderão nos auxiliar no entendimento dos fatores relacionados à alta diversidade genética de *Aegla longirostri*.

Um estudo incluindo mais populações da bacia do Uruguai deve ser feito para obtenção de resultados mais robustos quanto à influência da Serra do Pinhal como barreira geográfica na diferenciação genética de populações das duas bacias estudadas.

Também não deve ser descartado o uso de um maior número de marcadores microssatélites e também de marcadores mitocondriais para corroborar nossos dados.

6 ³REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB'SABER, A. N. Províncias geológicas e domínios morfológicos do Brasil. **IGE-USP, Série Morfologia**, São Paulo, p. 20, 1970.

ALLCOCK, A. L. et al. Genetic diversity as a component of biodiversity. **Global biodiversity assessment**, p.57-88, 1995.

AMOS, B.; PEMBERTON, J. DNA fingerprinting in non-human populations . **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 2, p. 857-860, 1992.

ARENAS, R. L. La cordillera de la costa como refugio de la fauna dulcícola preglacial. **Archivos de Biología y Medicina Experimentales**, v.10, p. 1-40, 1976.

Atlas socioeconômico do RS Disponível em: < <http://www.scp.rs.gov.br/atlas>>. Acesso em: 7 fev. 2009.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Champman e Hall, London. 1994.

BAHAMONDE, N.; M. T. LÓPEZ. Estudios biológicos en la población de *Aegla laevis laevis* (Latreille) de El Monte. **Investigaciones Zoológicas Chilenas**, v. 7, p. 19–58, 1961.

BECKMANN, J. S.; WEBER, J.L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, v. 12, p. 627-631, 1992.

BITENCOURT, J. V. T. et al. Comparison of different methodologies for DNA extraction from *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 989-994, 2007.

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

³ As referências bibliográficas estão de acordo com as regras da MDT da Universidade Federal de Santa Maria.

BOND-BUCKUP, G. Família Aeglidae. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. São Paulo: Loyola, p. 21-116, 2003.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Arquivos de Zoologia**, v. 32, p. 159-346, 1994.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. Família Aeglidae (caranguejos anomuros de água doce). In: **Os crustáceos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade, UFRGS, p. 362-382, 1999.

BOND-BUCKUP, G.; BUENO, A. P.; KEINECKE, K. A. Morphological characteristics of juvenile specimens of *Aegla* (Decapoda, Anomura, Aeglidae). **Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress**, Koninklijke Brill NV, Leiden, p. 372–381, 1999.

BRUFORD, M. W. et al. Microsatellites and their application to conservation genetics. **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. Oxford: University Press, p. 278-297, 1996.

BUENO, A. A. P.; BOND-BUCKUP, G. Natural diet of *Aegla platensis* Schmitt and *A. ligulata* Bond-Buckup & Buckupl (Crustacea, Decapoda, Aeglidae) from Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 16, p. 115-127, 2004.

BUENO, A.P.; G. BOND-BUCKUP. Dinâmica populacional de *Aegla platensis* Schmitt (Crustacea, Decapoda, Aeglidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, p. 43–49, 2000.

BUENO, S. L. DE S.; SHIMIZU, R. M.; ROCHA S. S. DA. Estimating the population size of *Aegla franca* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) by mark-recapture technique from an isolate section of Barro Preto stream, county of Claraval, state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v.27, p. 553–559, 2007.

CAMPOS, T. T. **Estutura genética das populações de *Leopardu tigrinus* (Carnívora, Felidae) no sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, inferida pela análise de microssatélites**. 2003. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CHUNG, M. et al. Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. **Nature Genetics**. v. 5, p. 254-258, 1993.

CIOFI, C.; BRUFORD, M. W. Genetic structure and gene flow among komodo dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 17-30, 1999.

DELEVATI C. K.; RIBEIRO L. O.; SANTOS S. Population biology of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Aeglidae) from South Brazilian streams. **Journal of Crustacean Biology**, v.25, p. 495–499, 2005.

DIMITRY A. et al. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review special reference to fish genetics. **Aquaculture**. p. 29-58, 2005.

DOKHOLYAN, N. V. et al. Distribution of dimeric tandem repeats in noncoding and coding DNA sequences. **Journal of Theoretical Biology**, v. 202, p. 273-282, 2000.

EISEN, J. A. **Mechanistic basis for microsatellite instability**. Evolution and Applications. Oxford: Oxford University Press, p. 34-48, 1999.

ELLEGREM, H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. **Trends Genetic**. v. 16, p. 551-558, 2000.

FELDMANN. R. M. *Haumuriaegla glaessneri* n.gen. and sp. (Decapoda: Anomura: Aeglidae) from Haumurian (Late Cretaceous) rocks near Cheviot, New Zeland. **New Zeland Journal of Geology and Geophysic**, v.27, 379-385, 1984.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**, 1. ed. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2008, p. 12-30.

GOLDTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites**: Evolution and Applications, New York: Oxford University Press, 1999.

GONÇALVES, R. S.; CASTIGLIONI D. S.; BOND-BUCKUP G. Ecologia populacional de *Aegla franciscana* (Crustacea, Decapoda, Anomura) em São Francisco de Paula, RS, Brasil. **Iheringia, Série. Zoologia**, v. 96: p. 109-114, 2006.

HADONOU, A. M.; WALDEN, R.; DARBY, P. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for assessment of genetic variation of hops (*Humulus lupulus* L.). **Molecular Ecology Notes**, v. 4: 280–282, 2004.

HAMADA, H.; PETRINO, M.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukarotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.79, p. 6465-6469, 1982.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 3. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2007. cap. 4, p. 111-162.

ISREL, M. L., **Alimentación natural, conducta alimentaria y preferencia dietaria en *Aegla denticulata* Nicolet, 1849 (Crustacea: Decapoda: Anomura: Aeglidae)**. 1988. Unpublished Thesis, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

JARA, C. G. *Aegla denticulata lacustris*, new subspecies, from Lake Rupanco, Chile (Crustacea: Decapoda: Anomura: Aeglidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 102, p. 385–393, 1989.

JARA, C. G. *Aegla rostrata* n.sp., (Decapoda, Aeglidae), nuevo crustáceo dulceacuícola del Sur de Chile. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 12, p. 165–176, 1977.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 424-429, 1996.

KAESTENER, A. **Invertebrate Zoology**. Huntington, Robert E. Krieger Publishing Company, p. 523, 1980.

KASH, Y.; KING, D. C.; SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends Genetic**. v. 13, p. 74-78, 1997.

KNAPIK, E. W. et al. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). **Nature Genetics**, v.18, p. 338-343. 1998.

LI, W. H. Molecular Evolution. **Sinauer Associates**, Sunderland, MA, p.177-213, 1997.

LÓPEZ, L .S. et al., Juvenile hatching and maternal care in *Aegla uruguayana* (Anomura, Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**, v.24, p. 309–313, 2004.

LÓPEZ, M. T. Estudos biológicos em *Aegla odebrechtii paulensis* Schmitt (Crustacea, Decapoda, Anomura). Boletim de Zoologia da Faculdade de Ciências e Letras de São Paulo, v. 25, p. 301–314, 1965.

LOPRETTO, E. C. Estructura exoesqueletaria y miológica del quinto par de pereiópodos del macho de la familia Aeglidae (Crustacea, Anomura). **Limnobiós**, v. 1, p. 284–298, 1978.

MAGNI, S. T.; PY-DANIEL, V. *Aegla platensis* Schmitt, 1942 (Decapoda, Anomura) um predador de imaturos de Simuliidae (Diptera: Culicomorpha). **Revista de Saúde Pública**, v. 23, p. 258-259, 1989.

MARQUES, A. A. B. et al. **Lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul**. Decreto n° 41.672, de 11 de junho de 2002. Porto Alegre, FZB/MCT-PUCRS/PANGEA. 52p. (Publicações avulsas FZB, 11).

MARTIN, J. W.; ABELE, L. G. External morphology of the genus *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 453, p. 46, 1988.

MARTIN, J. W.; ABELE, L. G. Phylogenetic relationships of the genus *Aegla* (Decapoda, Anomura, Aeglidae), with comments on anomuran phylogeny. **Journal of Crustacean Biology**, v. 6, p. 576–616, 1986.

MARTIN, J. W.; FELGENHUER, B. E. Grooming behavior and the morphology of grooming appendages in the endemic South American crab genus *Aegla* (Decapoda, Anomura, Aeglidae). **Journal of Zoology**, England, v. 209: p. 213–224, 1986.

MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. 1.ed. Ribeirão Preto: Holos. 202p, 2001.

MEDINA, G. Seasonal variations and changes in the diet of southern river otter in different freshwater habitats in Chile. **Acta Theriologica**, v. 43, p. 285–292, 1998.

MOREIRA, A. A. N.; LIMA, G. R. Relevô *In: Geografia do Brasil, Região Sul*, Rio de Janeiro: Fundação IBGE, v. 5. p. 01-34. 1977.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, p. 129-200, 2002.

MURRAY, B. W. The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. Disponível em <<http://helix.biology.mcmaster.ca/brent>> Acesso em: 2 nov. 2000.

NEFF, B. D.; GROSS, M. R. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. **Evolution**. v.55, p. 1717-1733, 2001.

ORTMANN, A. E. The geographical distribution of the freshwater decapods and its bearing upon ancient geography. **Proceedings of the Philadelphia Society**, v.41, p.267-400, 1902.

PÉPIN, L. Sequence conservation of microsatellites between *Taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. **Heredity**. v.74, p. 53-61, 1995.

PEREIRA, P. R. B. et al. Contribuição à geografia física do município de Santa Maria: Unidades de paisagem. **Geografia, Ensino e Pesquisa**, v.3, p. 37-68, 1989.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Phylogenetic position of the freshwater anomuran family Aeglidae. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, p.670-676, 2002a.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Phylogenetic relationships among the species of *Aegla*. (Anomura: Aeglidae) fresh-water crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, p. 304-313, 2002b.

PÉREZ-LOSADA, M. et al.; Molecular systematics and biogeography of the southern South American freshwater "crabs" *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) using multiple heuristic tree search approaches. **Systematic Biology**, v.53, p. 767-780, 2004.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v.1, p. 215-222, 1996.

PUJOLAR, J. M. et al. Growth rate correlates to individual heterozygosity in European eel, *Anguilla anguilla* L. **Evolution**. v. 59, p. 189-199, 2005.

RAMBO, B. **A fisionomia do Rio Grande do sul**: ensaio de monografia natural. 3. ed. São Leopoldo: Unisinos. 473p. 1994.

RAMSTAD, K. M. et al. Founding events influence genetic population structure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Lake Clark, Alaska. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 277-290, 2004.

RAYMOND, M. E.; ROUSSET, F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenencism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

RODRIGUES, W.; J. N. HEBLING. Estudos biológicos em *Aegla perobae* Hebling e Rodrigues , 1977 (Decapoda, Anomura). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, p. 383–390, 1978.

RORATTO, P. A. **Isolamente e caracterização de microssatélites em *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SAMBROOCK, J. e RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 3.ed, v.2, 2001.

SCHMITT, W. The species of *Aegla*, endemic South American freshwater crustaceans. **Proceedings of the United States National Museum**, v. 91, p. 431–520, 1942.

SCHULER, G. D. et al. A gene map of the human genome. **Science**, v. 274, p. 540-546, 1996.

SILVA, E. P.; RUSSO, C. A. M. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. **Hidrobiologia**, v. 420, p. 119-135, 2000.

SMITH, G. P. Evolution of repeat DNA sequences by unequal crossover. **Science**, v. 191, p. 528-535, 1976.

STREISINGER, G. et al. Frameshift mutations and the genetic code. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 31, p. 77-84, 1966.

SWIECH-AYOUB, B. P.; S. MASUNARI. Biologia reprodutiva de *Aegla castro* Schmitt (Crustacea, Anomura, Aeglidae) no Buraco do Padre, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 18, p. 1019–1030, 2001.

TÓTH, G.; GASPARI, Z.; JURCA, J. Microsatellites in different eukayotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-981, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. **Estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses : MDT / Universidade Federal de Santa Maria**. 7. ed. rev. e ampl. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2008.

VAN LITH, A.; VAN ZUTPHEN, L. F. Characterization of rabbit DNA microsatellites extracted from the EMBL nucleotide sequence database. **Animal Genetic**, v. 27, p. 387-395, 1996.

VARSHNEY, R. K. et al. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. **Cell Molecular Biology**, v. 7, p. 537-546, 2002.

WAITS, L. et al. Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctos*). **Molecular Ecology**, v. 9, p. 421-431, 2000.

WANG, Z. et al. Survey of plant short tandem repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 1-6, 1994.

WAPLES, R. S. Effective size of fluctuating salmon populations. **Genetics**, v. 161, p. 783-791, 2002.

WEBER, J. L. et al. Mapping of human chromosome-5 microsatellite DNA polymorphisms. **Genomics**, v. 11, p. 695-700, 1991.

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

WREN, J. D.; FORGACS, E.; FONDON, J. W. Repeat polymorphism within gene regions: phenotypic and evolutionary implications. **American Journal of Human Genetics** . v. 67, p. 345-356, 2000.

WRIGHT S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.

ZANE, L.; BARGELLONI, L., PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.