

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
MESTRADO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL**

**INFLUÊNCIA DE BARREIRAS GEOGRÁFICAS NA  
ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE  
*Aegla uruguayana* Schmitt, 1942  
(Crustacea, Decapoda, Anomura)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**João Vitor Trindade Bitencourt**

**SANTA MARIA, RS, Brasil  
2007**

**INFLUÊNCIA DE BARREIRAS GEOGRÁFICAS NA  
ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Aegla  
uruguayana* Schmitt, 1942 (Crustacea, Decapoda, Anomura)**

**por**

**João Vitor Trindade Bitencourt**

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

**Orientador: Prof. Dr. Sandro Santos**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

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

A comissão avaliadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**INFLUÊNCIA DE BARREIRAS GEOGRÁFICAS NA ESTRUTURA  
GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942  
(Crustacea, Decapoda, Anomura)**

Elaborada por  
**João Vitor Trindade Bitencourt**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Biológicas

**COMISSÃO AVALIADORA:**

**Sandro Santos, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

**Georgina Bond-Buckup, Dra. (UFRGS)**

**Monica Laner Blauth, Dra. (UNEMAT)**

Santa Maria, 04 de abril de 2007.

*“There are no freshwater Crustacea at all like Aegla anywhere else in the world”*  
Schmitt, 1942

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal

### **INFLUÊNCIA DE BARREIRAS GEOGRÁFICAS NA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 (Crustacea, Decapoda, Anomura)**

AUTOR: JOÃO VITOR TRINDADE BITENCOURT

ORIENTADOR: SANDRO SANTOS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 04 de abril de 2007.

Muitas espécies tiveram populações separadas por barreiras geográficas milhões de anos atrás durante a formação dos sistemas de drenagem dos Rios da América do Sul. Modificações no relevo levaram a atual formação das bacias hidrográficas do estado do Rio Grande do Sul. Como estas bacias não possuem ligação entre si, em espécies com distribuição ampla, como *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942, os divisores de água podem estar influenciando a variabilidade genética das populações que não podem manter um fluxo gênico. O objetivo desta dissertação é verificar a influência das barreiras geográficas na estruturação genética de diferentes populações de *A. uruguayana*. Foi utilizado padrão de bandas de DNA heteroduplex para analisar populações de *A. uruguayana* de duas regiões hidrográficas do estado (Leste e Oeste). Foi observado um número significativo de haplótipos em cada população, refletindo uma alta proporção de diversidade intra-populacional na AMOVA (49,38%). As barreiras geográficas parecem estar influenciando na diferenciação genética das populações de *A. uruguayana*, ao menos entre as populações dos Rios Santa Maria, Ibirapuitã e Camaquã, as quais tiveram os valores de  $F_{ST}$  calculados. Para as outras populações será necessária a análise de um número maior de indivíduos, possibilitando a verificação da estrutura genética. A utilização de um marcador molecular ultra-sensível, como os microssatélites, permitirá uma análise mais refinada sobre esta questão. Para tanto, foram isolados e caracterizados locos de microssatélites. A eficiência do isolamento de microssatélites foi bastante alta, pois designamos *primers* para três locos, desses, dois se mostraram polimórficos. Os dois locos, Au05 e Au13, amplificaram com sucesso e foram bastante polimórficos, com 07 e 08 alelos respectivamente, o que os torna promissores para avaliar diferenças entre populações de *A. uruguayana*. Esses locos amplificaram com sucesso em *Aegla longirostri*, tendo potencial para avaliar outras espécies do mesmo gênero.

Palavras-chave: caranguejo anomuro, DNA heteroduplex, microssatélites.

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Post-Graduation in Animal Biodiversity  
Universidade Federal de Santa Maria

### **INFLUENCE OF GEOGRAPHIC BARRIERS IN THE GENETIC STRUCTURE OF *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 (Crustacea, Decapoda, Anomura) POPULATIONS**

AUTHOR: JOÃO VITOR TRINDADE BITENCOURT  
ADVISER: SANDRO SANTOS

Millions of years ago many species had their populations isolated by geographic barriers, during the formation of the drainage systems of South America Rivers. Modifications in relief lead to the actual formation of the hydrographic basins from Rio Grande do Sul state. Since these basins do not have connection among them, species widely distributed, as *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942, may have their genetic variability being influenced by the watersheds which do not allow gene flow to occur. The aim of this study was to verify the influence of geographic barriers to the genetic structure of different populations of *A. uruguayana*. The migration patterns of heteroduplex DNA were used to analyze two populations of *A. uruguayana* from two hydrographic regions of the state (East and West). A significant number of haplotypes was observed in each population, reflecting a high proportion of intrapopulation diversity in AMOVA (49,38%). The geographic barriers seem to be influencing the genetic differentiation of *A. uruguayana* populations, at least among the populations from Rivers Santa Maria, Ibirapuitã and Camaquã, which had  $F_{ST}$  values calculated. For the other populations it is necessary to analyze a greater number of individuals, what will make easier the verification of the genetic structure. The utilization of an ultra sensitive molecular marker, such as the microsatellites, will allow a more refined analysis about this question. Thus, microsatellite loci were isolated and characterized. The efficiency of the microsatellite isolation was high and primers were designed for three loci, two of these being polymorphic. Two loci, Au05 and Au13, successfully amplified and were highly polymorphic, with seven and eight alleles, respectively, making them promising for the evaluation of differences among *A. uruguayana* populations. These loci also successfully cross-amplificated in *Aegla longirostri*, and have potential for the evaluation of other species from the same gender.

Keywords: anomuran crab, heteroduplex DNA, microsatellite

## AGRADECIMENTOS

Uma dissertação de Mestrado é um trabalho relativamente solitário, mas o estudo desenvolvido envolve várias pessoas, sem elas não seria possível realiza-lo, por isso gostaria de agradecer algumas pessoas especiais.

Aos meus pais científicos Sandro e Marlise que sempre estiveram ao meu lado nas dúvidas, nos problemas, ajudando sempre a buscar as melhores soluções; o Sandro desde o início da graduação, trabalhando com zoologia e posteriormente a Marlise com as ferramentas da biologia molecular para os nossos trabalhos com crustáceos.

Ao pessoal do Lab DiverGe: Ale, Darine, Stela, Talis, que conseguiram atirar por alguns anos aou alguns meses o mais persistente “Y” do laboratório.

À minha colega Paula Angélica, com quem aprendi muito do que sei em Biologia Moclular e com quem mais convivi nos últimos dois anos.

Ao pessoal do LaCrust: André, Bianca, Beto, Daniel, Gláucia, Jô, Lu e Marcelo, que mesmo não sabendo direito a qual laboratório “pertencia” sempre me apoiaram na caminhada. Em especial a Lu que me incentivou desde o início da graduação.

Ao professor Élgion e todo o pessoal do LabDros, sempre dispostos a ajudar.

Aos meus colegas de mestrado: Aline, Gisa, Fernanda, Lizélia, Manu, Paula, Rafaelle e Ricardo, com quem dividi experiências e boas risadas.

Ao Paulo, secretário da pós-graduação, que sempre estava disposto a esclarecer nossas dúvidas, avisar das disciplinas, explicar tudo novamente.

Aos meus pais, por me apoiarem em todos os momentos da minha vida, o que não deixou de ser diferente em mais essa fase.

A minha família, que mesmo querendo a minha presença na minha terra natal, entendiam que era necessário sacrificar alguns finais de semana para ficar no laboratório.

Aos meus amigos, principalmente João T. e Thiago, que me aturaram falando de microssatélites, eletroforese, mesmo sem entender muito bem do que se tratava e ainda entendiam que quando estava “meio” estressado tinha acontecido algum problema no laboratório, o que foi bastante freqüente.

Além de todas as pessoas de minha convivência que ajudaram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao PPG em Biodiversidade Animal pela oportunidade de realizar o mestrado.

A CAPES pelo apoio financeiro que contribuiu para o desenvolvimento desse estudo.

**Muito Obrigado!!!**

## SUMÁRIO

<b>Introdução .....</b>	<b>08</b>
<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>Metodologia Geral .....</b>	<b>16</b>
<b>Capítulo I .....</b>	<b>20</b>
Resumo .....	21
Introdução .....	21
Material e Métodos .....	23
Resultados .....	26
Discussão .....	29
Bibliografia .....	31
<b>Capítulo II .....</b>	<b>35</b>
Resumo .....	36
Introdução .....	36
Material e Métodos .....	38
Resultados .....	41
Discussão .....	44
Bibliografia .....	47
<b>Conclusões .....</b>	<b>50</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>51</b>
<b>Bibliografia Geral .....</b>	<b>52</b>

## INTRODUÇÃO

A Ordem Decapoda Latreille, 1802 é dividida em duas Subordens, a Dendrobranchiata Bate, 1888, que abrange os animais cujas brânquias são do tipo dendrobrânqueas e as fêmeas não incubam ovos (camarões peneídeos e sergestídeos), com exceção do gênero *Lucifer* Thompson 1829 que abriga os ovos nos terceiros pereiópodos por um tempo e a Subordem Pleocyemata Burkenroad, 1963, composta pelos animais que incubam seus ovos durante o período de desenvolvimento embrionário e possuem brânquias dos tipos filobrânquias e tricobrânquias (Martin & Davis, 2001; Perez-Farfante & Kelsley, 1997).

A Subordem Pleocyemata, por sua vez, é formada por sete infraordens, entre elas a Anomura MacLeay, 1838. Esta última é composta por cerca de 1.400 espécies (Kaestner, 1980), que estão divididas em 13 famílias (Martin & Davis, 2001). Apenas uma destas famílias, a Aeglidae, com aproximadamente 60 espécies, é encontrada atualmente em águas continentais, as demais famílias, com suas respectivas espécies, são marinhas.

Embora a família Aeglidae seja encontrada atualmente em ambientes límnicos, sua origem é atribuída ao ambiente marinho em função dos dois registros fósseis conhecidos até o momento. O primeiro é proveniente da Nova Zelândia, *Hamuriaegla glaessneri* (Feldmann, 1984) e o segundo, *Protoaegla minuscula*, é encontrado no México (Feldmann *et al.*, 1998).

O gênero *Aegla* Leach, 1820, abriga as espécies atuais da família Aeglidae. Estes animais habitam arroios, riachos, rios, lagoas e cavernas da parte subtropical e temperada da América do Sul. A existência de um único gênero vivo em águas doces continentais, em apenas um continente, com algumas dezenas de espécies que se diferenciam evolutivamente de outras 1.400 espécies da infraordem Anomura, de vida exclusivamente marinha, lagunar ou estuarina, representa um desafio para quem procura investigar a origem filogenética do grupo (Bond-Buckup & Buckup, 1994).

As espécies do gênero *Aegla* têm como limite norte de ocorrência, 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, Chile. As espécies ocorrem no Brasil, Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia e Chile, desde a profundidade de 320m, em lagos chilenos, até cerca de 4.500m de altitude no noroeste argentino (Bond-Buckup & Buckup, 1994).

A primeira espécie de *Aegla* efetivamente descrita como nova para águas continentais sul-brasileiras foi *Aegla odebrechtii* por Müller (1876) *apud* Bond-Buckup & Buckup (1994).

Até 1994 eram reconhecidas 42 espécies e subespécies do gênero *Aegla*, quando Bond-Buckup & Buckup (1994) realizaram uma revisão bastante detalhada sobre o grupo, onde citam listas de sinônimas, chaves de identificação, além do material tipo, diagnose, descrição, tamanhos dos animais examinados e distribuição geográfica de cada espécie. Com este estudo quatro espécies passaram a ser consideradas sinônimas, duas subespécies foram elevadas à categoria de espécie, 19 tiveram suas áreas de distribuição ampliadas e foram descritas 20 novas espécies. Mais recentemente, Jara (1994) descreveu mais uma espécie, *Aegla pewencha* Jara, 1994, coletada na região central do Chile.

Para o Brasil são registradas 35 espécies desse gênero, sendo que uma está presente no estado do Rio de Janeiro, dez em São Paulo, sete no Paraná, dez em Santa Catarina e a maioria, 22 espécies, no Rio Grande do Sul (Bond-Buckup, 2003).

Segundo a Secretaria Estadual do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul, o estado é dividido em três Grandes Regiões Hidrográficas, a do Guaíba, a do Uruguai e a do Litoral e em 25 bacias hidrográficas (Lei nº 10.350/94).

Das espécies registradas no Rio Grande do Sul dez são restritas à região hidrográfica do Uruguai (*Aegla camargoi* Buckup & Rossi 1977, *Aegla jarai* Bond-Buckup & Buckup 1994, *Aegla leptodactyla* Buckup & Rossi 1977, *Aegla ligulata* Bond-Buckup & Buckup 1994, *Aegla obstipa* Bond-Buckup & Buckup 1994, *Aegla odebrechtii* Muller, 1876, *Aegla rossiana* Bond-Buckup & Buckup 1994, *Aegla serrana* Buckup & Rossi 1977, *Aegla singularis* Ringuelet, 1948 e *Aegla spinosa* Bond-Buckup & Buckup 1994) e seis à região hidrográfica do Guaíba (*Aegla inconspicua* Bond-Buckup & Buckup 1994, *Aegla inermis* Bond-Buckup & Buckup 1994, *Aegla itacolomiensis* Bond-Buckup & Buckup 1994, *Aegla plana* Buckup & Rossi 1977, *Aegla spinipalma* Bond-Buckup & Buckup 1994 e *Aegla violacea* Bond-Buckup & Buckup 1994). *Aegla prado* Schmitt, 1942 é a única com distribuição restrita à região hidrográfica do Litoral. As demais espécies apresentam distribuição mais ampla e podem ser encontradas em mais de uma região hidrográfica. Como *Aegla platensis* Schmitt 1942, *Aegla longirostri* Bond-Buckup & Buckup 1994, *Aegla franciscana* Buckup & Rossi 1977 e *Aegla grisella* Bond-Buckup & Buckup 1994, que estão presentes nas regiões hidrográficas do Guaíba e do Uruguai e *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 que ocorre nas três regiões (Bond-Buckup & Buckup, 1994).

Uma compreensão dos padrões atuais de distribuição das espécies depende do conhecimento das modificações históricas do clima e topologia da área. A divisão de um bloco de terra ou de um corpo d'água em dois, onde membros de uma biota de distribuição

contínua tornam-se separados e passam a evoluir independentemente, é definida como vicariância (Futuyma, 1992).

Na região central do Estado do Rio Grande do Sul, durante o Terciário, formou-se um divisor de águas que provocou a inversão para leste da drenagem do Rio Jacuí (Região Hidrográfica do Guaíba), antes tributário da Região Hidrográfica do Uruguai (Moreira & Lima, 1977). Essa separação causou o isolamento das populações das duas regiões hidrográficas. Esse fato, segundo Vaz (1989), teria favorecido a subspeciação de *Biomphalaria tenagophila guaibensis* Paraense, 1984 (Gastropoda).

Além dos moluscos, crustáceos como *A. longirostri*, presente dos dois lados desse divisor de águas, também teria sofrido as conseqüências desse isolamento geográfico. Santos *et al.* (2007) indicam uma grande diferenciação genética entre as populações das duas bacias utilizando padrões de DNA heteroduplex.

Essas e outras modificações no relevo do RS, que apresenta uma topologia bastante diversificada (Rambo, 1994), levaram a atual formação das bacias hidrográficas do estado. Como estas bacias não possuem ligação entre si, em espécies com distribuição ampla, como *A. uruguayana*, os divisores de água podem estar influenciando a variabilidade genética das populações que, a princípio, não podem manter um fluxo gênico.

Nos últimos anos os pesquisadores conseguiram importantes ferramentas para facilitar as investigações sobre as variações genéticas e a evolução de organismos, os marcadores moleculares.

A análise do padrão eletroforético de algumas proteínas pode ser utilizada para estudos de populações. Caccone *et al.* (1986), utilizando alozimas, avaliaram diferentes populações do gênero *Typhlocirolana* (Crustacea, Isopoda) constatando a ocorrência de variabilidade genética e divergência entre populações destes isópodos, distribuídos nos sistemas de águas doces subterrâneas da costa do Mar Mediterrâneo, que se separaram há aproximadamente 3,5 Ma durante os ciclos sedimentares da costa mediterrânea.

Fragmentos de DNA heteroduplex também podem ser utilizados como marcadores moleculares (Carrington *et al.*, 1992; Wilkin *et al.*, 1993). O DNA heteroduplex é formado a partir da amplificação de seqüências repetitivas de DNA através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A PCR favorece o anelamento entre fitas simples de DNA sintetizadas a partir de várias cópias gênicas, com seqüências semelhantes, porém não-idênticas (DNA heteroduplex), diferentemente do DNA homoduplex, cujo anelamento das fitas simples é perfeito por se tratarem de seqüências completamente complementares. Os fragmentos de DNA heteroduplex, por formarem estruturas secundárias, apresentam migração eletroforética

diferenciadas, gerando um padrão de bandas característico para cada indivíduo, de acordo como a variação entre suas seqüências. A análise desses padrões pode fornecer informações a respeito do grau de polimorfismo entre diferentes populações.

Existem outros marcadores moleculares para detectar variabilidade e diferenciação genética como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), DNA mitocondrial, microssatélites, entre outros.

Todd *et al.* (1997), utilizando RAPD, analisaram copépodos ectoparasitas de salmonídeos da costa da Escócia e verificaram um padrão homogêneo para as populações naturais, enquanto as populações cultivadas apresentaram alto nível de diferenciação genética em relação as naturais e também entre as mesmas.

O primeiro estudo com marcadores moleculares em Aeglidae foi com RAPD, analisando a estrutura populacional de *Aegla jujuyana* (D'Amato & Corach, 1997a). Foram estudadas quatro populações deste eglídeo, num raio de 120 Km. Os resultados indicaram que as populações não estão subdivididas e que deve haver um fluxo gênico significativo entre elas.

A análise de seqüências de mtDNA também é útil para os estudos filogenéticos e de genética de populações em muitos *taxa*. O genoma mitocondrial apresenta taxas de evolução elevadas e, portanto, é mais informativo do que os genes nucleares. Apesar do genoma mitocondrial se comportar como um único loco, devido a sua natureza não recombinante, há diferentes genes dentro dessa mesma molécula que apresentam taxas de diferenciação distintas. A região controladora (ou *D-loop*) apresenta as maiores taxas de evolução, ao passo que a subunidade II do gene para citocromo oxidase (COII) apresenta taxas mais lentas (Meyer,1994). A disponibilidade de segmentos de DNA com taxas de evolução diferentes é extremamente útil, pois conforme a profundidade temporal do evento evolutivo de interesse, um ou outro desses segmentos pode ser utilizado em análises (Meyer,1994).

Essas seqüências podem ser usadas para filogenias moleculares como o caso de Maggiori *et al.* (2001) que analisaram seqüências parciais do gene mitocondrial 16S para fazer uma reconstrução filogenética dos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus*.

Microssatélite é o termo atualmente mais utilizado para descrever repetições em tandem de seqüências curtas de DNA, com no máximo seis bases. Essas seqüências têm sido encontradas em todos os organismos estudados (Hancock, 1999). Os microssatélites são classificados quanto à presença ou ausência de interrupção na unidade repetitiva ou o tipo de unidade repetitiva (Goldstein & Schlötterer, 1999).

Microsatélites perfeitos consistem de um único motivo de repetição, não sendo interrompido ao longo da seqüência por nenhuma base que altere o padrão da repetição (por exemplo, GTGTGTGTGTGTGT). Os imperfeitos apresentam uma ou mais repetições que contêm uma base que altera o padrão repetitivo (por exemplo, GTGTGTGTCTGTGTGT). Microsatélites interrompidos apresentam a inserção de um pequeno número de bases que não se encaixam na estrutura da repetição (por exemplo, GTGTGTGTCCCGTGTGTGT).

Microsatélites compostos apresentam dois ou mais microsatélites adjacentes com motivos de repetição diferentes (por exemplo, GTGTGTGTGTGTGTGCACACACACACA).

Os locos de microsatélites são instáveis, e essa instabilidade se torna útil para estudos evolutivos e genéticos. O motivo desta instabilidade seria a expansão ou redução do número de cópias dos motivos de repetição. Existem dois modelos que explicam o mecanismo que gera essa instabilidade. Um deles indica como motivo uma alta taxa de *crossing-over* desigual entre cromossomos homólogos imperfeitamente alinhados ao longo das repetições dos microsatélites. O modelo alternativo (SSM – *Slip Strand Mismatching*) sugere que a instabilidade é causada por uma alta taxa de deslizamento das fitas de DNA ao longo das repetições dos microsatélites durante a replicação. O segundo modelo tem sido mais aceito e amplamente citado na literatura, embora os dois modelos não sejam mutuamente excludentes (Eisen, 1999).

As aplicações relacionadas com os microsatélites variam desde sua utilização como marcadores moleculares muito acessíveis para segmentos cromossômicos, passando pela identificação de indivíduos até o rastreamento da história biológica de populações (Chambers & MacAvoy, 2000). Esta eficiência está levando ao estudo de microsatélites em vários grupos vegetais e animais. Porém, o primeiro passo para a utilização desses marcadores é o isolamento deles no genoma a ser estudado. Diversos trabalhos foram desenvolvidos primeiramente com o intuito de identificar esses marcadores para futuras aplicações. Alguns crustáceos já têm esses marcadores isolados e caracterizados, como é o caso do cladócer *Daphnia pulex* Leydig, 1860 (Cristescu *et al.*, 2006), da craca *Chthamalus montagui* Southward, 1976 (Pannacciulli *et al.*, 2005), o krill *Maganyctiphanes norvegica* Sars, 1856 (Ostellari *et al.*, 2000), os camarões *Penaeus vannamei* Boone, 1931 (Bagshaw & Buckholt, 1997), *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 (Wuthisuthimethavee *et al.*, 2003), *Farfantepenaeus notialis* Pérez Farfante, 1967 (Robainas *et al.*, 2002), *Triops cancriformis* Bosc, 1801 (Cesari *et al.*, 2004), *Eulimnadia texana* Packard, 1871 (Duff *et al.*, 2004), o lagostin *Austropotamobius pallipes* Lereboullet, 1858 (Gouin *et al.*, 2000), do caranguejo chinês *Eriocheir sinensis* Milne-Edwards, 1853 (Hänfling & Weetman, 2003 e Zhu *et al.*,

2006), o siri azul *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Steven *et al.*, 2005), o anfípoda *Dikerogammarus villosus* Sovinski, 1894 (Wattier *et al.*, 2006), os isópodos terrestres *Porcellionides pruinosus* Brandt, 1833 (Grandjean *et al.*, 2005) e *Armadillidium vulgare* Latreille, 1804 (Verne *et al.*, 2006).

Alguns pesquisadores vêm utilizando esses marcadores para estudos populacionais, como Xu *et al.* (2001), que trabalhando com microssatélites analisaram populações naturais e cultivadas de *Penaeus monodon* Fabricius, 1798, nas Filipinas e verificaram uma perda de variabilidade genética entre as populações cultivadas, em relação às naturais. Também relacionaram essas populações com a conservação do ambiente onde vivem e constataram que quanto mais impactado o ambiente menor a variabilidade das populações.

Maggioni *et al.* (2003), analisando a estrutura de populações de *Litopenaeus schmitt* Burkenroad, 1936 (Decapoda, Penaeidae) para a costa do Brasil, usaram seis locos polimórficos de microssatélites e constataram uma separação entre as populações do norte e do sul do Brasil, tendo como fronteira biogeográfica para essa espécie a região de Cabo Frio, reconhecida como fronteira entre as regiões tropical e subtropical, por ser provavelmente uma barreira física para a dispersão dessa espécie.

Goyard *et al.* (2003) avaliaram a variabilidade genética de populações de *Litopenaeus stylirostris* Stimpson, 1874, lagostim latinoamericano da costa pacífica, introduzidas em três ilhas (Taiti, Nova Caledônia e Havaí). Utilizaram microssatélites para comparar essas populações com uma população natural e verificam uma variabilidade muito baixa nos estoques domesticados em relação à população natural (20-60% de heterozigozidade observada em vez de 90% de heterozigozidade esperada).

Jorstad *et al.* (2004) avaliaram populações sub-árticas da lagosta americana *Homarus gammarus* Linnaeus, 1758, do norte da Noruega, utilizando alozimas, DNA mitocondrial e microssatélites e constataram uma separação das populações ao norte do círculo polar ártico em relação a outras regiões da costa Atlântica, com uma redução da diversidade genética, suportada pelos três marcadores utilizados.

Além do artigo enfocando o eglídeo *A. jujuyana* (D'Amato & Corach, 1997a), onde utilizou-se RAPD, outros marcadores moleculares foram empregados em estudos com a família Aeglidae.

D'Amato & Corach (1997b) investigaram as relações evolutivas entre os grupos de Decapoda, dando ênfase para as relações Aeglidae – Anomura e entre diferentes espécies de *Aegla*. Análise de restrição molecular e padrões de hibridização mostram uma banda de 400pb conservada entre Aeglidae. Todos os eglídeos mostram um alto grau de hibridização para

todas as espécies estudadas, denotando um alto nível de homologia entre eles. Este fenômeno pode indicar uma especiação recente.

Pérez-Losada *et al.* (2002a), utilizando gene nuclear (18S rDNA), analisaram as relações entre Aeglidae e as superfamílias Galathoidea, Paguroidea, Hippoidea (todos Anomura) e Callianassoidea (Thalassinidea). Os resultados mostraram uma clara separação dos Aeglidae diante das outras famílias de Galathoidea.

Pérez-Losada *et al.* (2002b), utilizando os genes mitocondriais 12S, 16S, COI e COII, estudaram as relações filogenéticas entre espécies de *Aegla* do Chile e verificaram a influência dos elementos biogeográficos, como o soerguimento da atual Cordilheira dos Andes, na diferenciação das espécies de eglídeos ao longo do tempo geológico.

Em Perez-Losada *et al.* (2004), os autores relacionaram os eventos geológicos, como o soerguimento da atual Cordilheira dos Andes (~60Ma) e a formação da Serra do Mar (~12Ma), com a distribuição atual dos eglídeos. Múltiplas ocorrências de vicariância e migrações podem ser postuladas sobre este cenário. A coalescência de drenagens levou a uma mistura de padrões de localização de espécies, como observado nas espécies estudadas. Além disso, esse estudo revelou que algumas espécies que não possuíam diferenciação morfológica estavam mais distantes geneticamente entre si que espécies classificadas como distintas.

Estes últimos estudos apontam para a necessidade de uma análise mais detalhada sobre a estrutura genética de espécies com distribuição ampla, como *A. uruguayana*, que no Rio Grande do Sul pode ser encontrada nas três regiões hidrográficas do estado.

Para isso seria necessário analisar algumas populações de diferentes bacias hidrográficas, utilizando-se marcadores moleculares sensíveis, para verificar se essas populações sofreram diferenciação por estarem separadas geograficamente.

## **OBJETIVO GERAL**

O objetivo desta dissertação é verificar a influência das barreiras geográficas na estruturação genética de diferentes populações de *A. uruguayana*.

### **Objetivos específicos**

- Análise da estruturação genética e do fluxo gênico entre diferentes populações de *A. uruguayana*, utilizando DNA heteroduplex como marcador molecular. Este aspecto será abordado no capítulo I;
- Isolamento e caracterização de microssatélites de *A. uruguayana*. Este assunto será explorado no capítulo II.

## **METODOLOGIA GERAL**

### **Diagnose da espécie *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942**

Espinho antero-lateral da carapaça ultrapassando a metade da córnea; rostró longo, tendendo a estiliforme, carenado em todo o seu comprimento; ângulo anterior da margem ventral do epímero dois projetado por um espinho; quarto esternito torácico elevado com um espinho; margem externa proximal do dedo móvel do quelípodo sem lobo; dedos do quelípodo com dente lobular; crista palmar do quelípodo ausente; margem interna da face ventral do ísquio do quelípodo com um espinho robusto distal e até três elevações ao longo do segmento; margem dorsal do mero do segundo pereiópodo com um espinho distal e tubérculos escamiformes; margem ventral do mero do segundo pereiópodo com escamas (Bond-Buckup & Buckup, 1994) (Fig.1).

### **Descrição da área de estudo**

A área de estudo abrange a Campanha do Sudoeste e a Serra do Sudeste do RS. A primeira, de modo geral, compreende as fontes do Rio Negro, a vertente brasileira do Quarai, toda bacia sul do Ibicuí e a bacia norte do mesmo rio até o pé da Serra Geral; assim, os limites são: ao leste, o divisor de águas entre as regiões hidrográficas do Litoral e do Rio Uruguai; ao norte, o talude do planalto sul-brasileiro; ao oeste, o Rio Uruguai; ao sul, a fronteira com o Uruguai. Pertence à região hidrográfica do Rio Uruguai, sendo dominada por dois de seus afluentes: o Quarai e o Ibicuí, este, com dois tributários ao sul, o Santa Maria e o Ibirapuitã. A Serra do Sudeste abrange a parte montanhosa do sul do Estado, situada na continuação do litoral, a oeste das lagoas Mirim e dos Patos. Hidrograficamente, toda a região pertence à região hidrográfica do Litoral, dirigindo-se todos os cursos de água para o escoadouro comum do Rio Grande. Sobressaem, pelo volume, os rios Jaguarão, Piratini e Camaquã (Rambo, 1994).

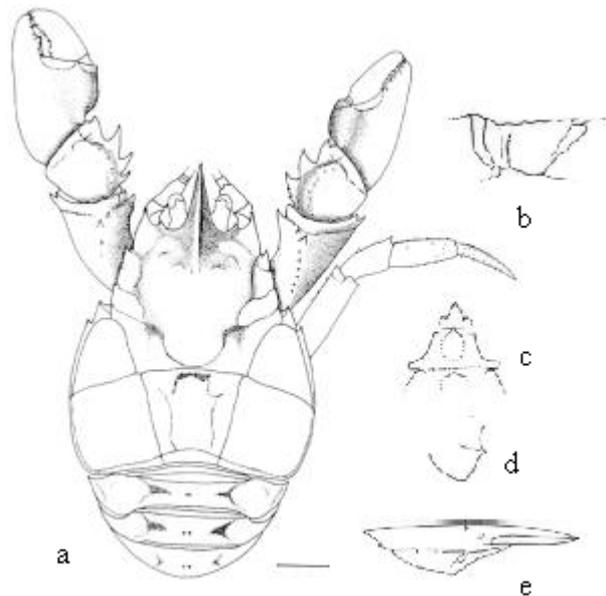


Figura 1 – *Aegla uruguayana* (macho, escala: 5mm): a, vista dorsal; b, base-ísquio do quelípodo (vista lateral); c, terceiro e quarto esternitos torácicos (vista ventral); d, epimero 2 (vista lateral); e, porção anterior da carapaça (vista lateral) (Extraído de Bond-Buckup & Buckup, 1994).

### Locais de amostragem

Foram definidas seis áreas de amostragem com base na distribuição da espécie no estado do Rio Grande do Sul (Bond-Buckup, 2003) (Fig.2).

Ponto 1: Município de Dom Feliciano, Bacia do Rio Camaquã, Arroio Sutil (30°25'75"S; 52°18'80"W);

Ponto 2: Município de Aceguá, Bacia do Rio Jaguarão, Arroio Jaguarão Chico (31°48'52"S, 54°01'38"W);

Ponto 3: Município de Santana do Livramento, Bacia do Rio Santa Maria, Arroio Cerro Verde (30°48'34"S; 55°32'14"W);

Ponto 4: Município de Santana do Livramento, Bacia do Rio Ibicui (Ibirapuitã), Arroio Gameleira (30°48'52"S; 55°35'53"W);

Ponto 5: Município de Santana do Livramento, Bacia do Rio Ibicui (Ibirapuitã), Arroio Sarandi (30°47'48"S; 55°37'44"W);

Ponto 6: Município de Santana do Livramento, Bacia do Rio Quaraí, Arroio Capão do Inglês (30°54'07"S; 55°41'23"W).

### **Amostragem**

Os espécimes de *A. uruguayana* foram coletados das populações naturais nas bacias hidrográficas do rio Jaguarão, Ibicui (Ibirapuitã), Santa Maria, Quarai e Camaquã.

Os animais das populações naturais foram capturados manualmente nas margens dos arroios e com auxílio de pulcás nos leitos, após a remoção das rochas do fundo, pois esses crustáceos ficam “escondidos” sob esse material. Foram coletados cerca de 12 espécimes de cada local de amostragem. Os animais foram mantidos em aquários e antes da dissecação foram crioanestesiados.

### **Procedimentos laboratoriais**

Inicialmente, os animais foram identificados de acordo com Bond-Buckup & Buckup (1994). Após a identificação os animais foram dissecados sobre o gelo para melhor conservação do material. Foram utilizados tecido muscular e brânquias para extração de DNA total.

### **Extração de DNA**

Aos tecidos removidos foram acrescentados 400 $\mu$ L de tampão de lise (Tris-HCl 100mM; EDTA 100mM; NaCl 250mM), 100 $\mu$ L de SDS 10%, 15 $\mu$ L de proteinase K e 10 $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol. O tempo de lise foi de, no mínimo, quatro horas em banho-maria à 65°C (Sambrook & Russel, 2001).

Foi utilizado o método de extração de DNA com fenol-clorofórmio, com modificações (Bitencourt *et al.*, 2006). As amostras foram posteriormente tratadas com RNase e purificadas com PEG 8.000 13%/NaCl 1,6 M, sendo conservadas a 4°C.

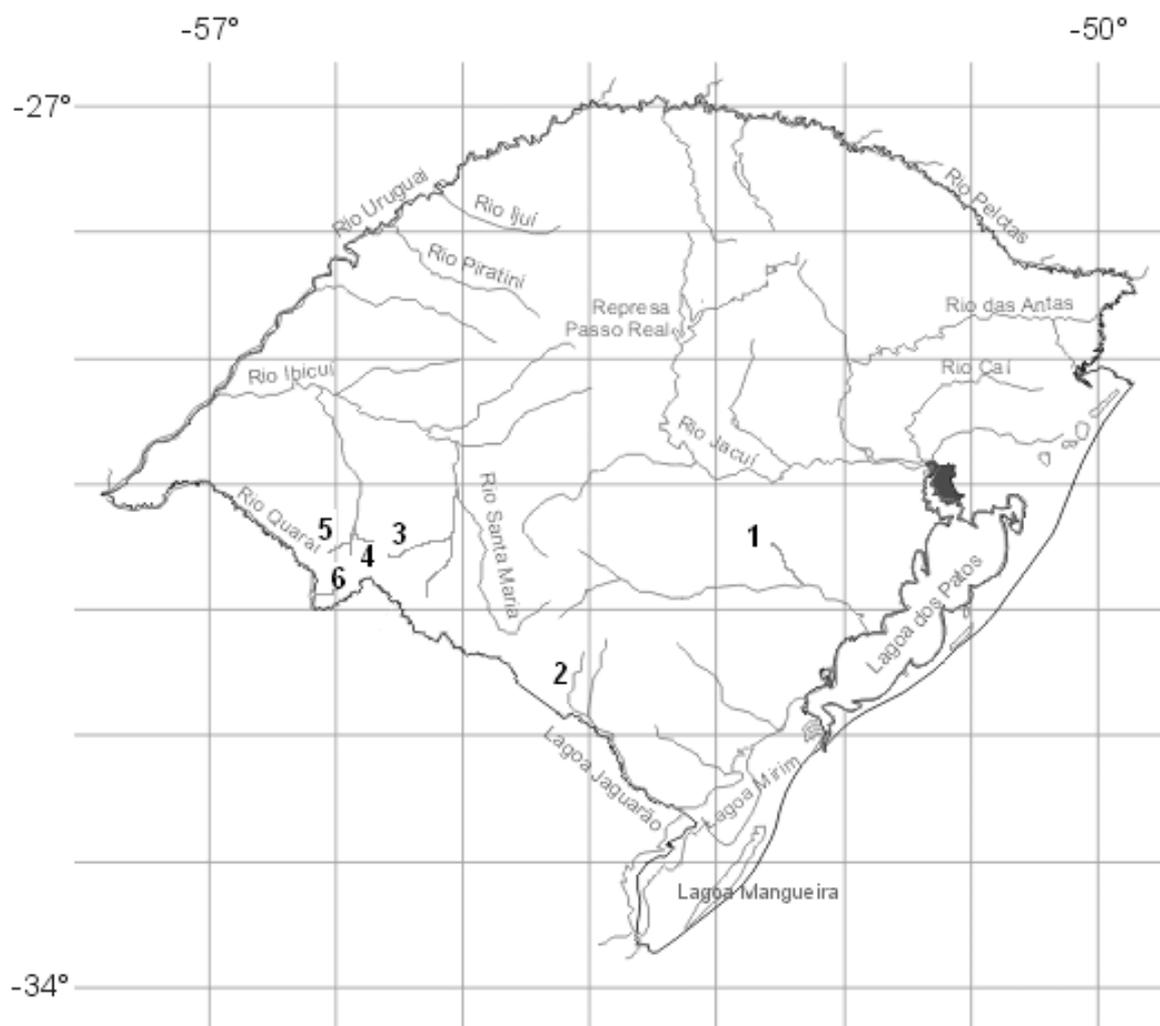


Figura 2 – Mapa com a rede hidrográfica do Rio Grande do Sul e os locais de amostragem. (1: Arroio Sutil, 2: Arroio Jaguarão Chico, 3: Arroio Cerro verde, 4: Arroio Gameleira, 5: Arroio Sarandi e 6: Arroio Capão do Inglês).

## Capítulo I

Análise da estrutura de populações de *Aegla uruguayana*  
(Crustacea, Decapoda, Anomura) utilizando DNA heteroduplex

## RESUMO

Algumas espécies de eglídeos, com distribuição muito ampla, estando presentes em mais de uma bacia, como *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942, despertam interesse em relação à estrutura genética de suas diferentes populações, muitas delas isoladas geograficamente de outras. Algumas técnicas, utilizando marcadores moleculares, podem ser bastante úteis para se acessar essas informações, como fragmentos de DNA heteroduplex. O objetivo desse trabalho é verificar a influência das barreiras geográficas na diferenciação de populações de *A. uruguayana*, utilizando análise de fragmentos de DNA heteroduplex de um microssatélite pentanucleotídico, analisando duas regiões hidrográficas do estado (Uruguai e Litoral) como sendo uma barreira para a distribuição dessa espécie. A análise dos produtos da PCR de *A. uruguayana* em gel de poliacrilamida depois da renaturação mostrou bandas de diferentes mobilidades de 180 a 360 pb. Foram observados 29 padrões diferentes (considerados como haplótipos) em 32 indivíduos analisados, indicando uma alta variabilidade intra-populacional. Embora alguns haplótipos ocorram em mais de um indivíduo de uma mesma população, não houve compartilhamento de haplótipos entre populações, sugerindo uma alta variação inter-populacional.

## INTRODUÇÃO

A compreensão dos padrões atuais de distribuição das espécies aquáticas continentais depende do conhecimento das modificações históricas do clima e topografia da área onde vivem tais organismos. A divisão de um bloco de terra ou de um corpo d'água em dois, onde membros de uma biota de distribuição contínua tornam-se separados e passam a evoluir independentemente, é definida como vicariância (Futuyma, 1992).

Essa situação é observada na região central do Estado do Rio Grande do Sul, onde durante o Terciário, formou-se um divisor de águas que provocou a inversão para leste da drenagem do Rio Jacuí (Região Hidrográfica do Guaíba), antes tributário da Bacia Hidrográfica do Uruguai (Moreira & Lima, 1977). Essa separação causou o isolamento das populações dessas regiões hidrográficas. Esse fato, segundo Vaz (1989), teria favorecido a subspeiação de *Biomphalaria tenagophila guaibensis* Paraense, 1984 (Gastropoda). Além dos moluscos, crustáceos como *Aegla longirostri* Bond-Buckup & Buckup, 1994, presente dos dois lados desse divisor de águas, também sofreram as conseqüências desse isolamento geográfico (Santos *et al.*, 2007).

Muitas espécies tiveram populações separadas por barreiras geográficas milhões de anos atrás durante a formação dos sistemas de drenagem dos Rios da América do Sul (Potter, 1997). Modificações no relevo levaram a atual formação das bacias hidrográficas do estado. Como estas bacias não possuem ligação entre si, em espécies com distribuição ampla, como

*Aegla uruguayana* Schmitt, 1942, os divisores de água podem estar influenciando a variabilidade genética das populações que não podem manter um fluxo gênico.

Algumas técnicas, utilizando marcadores moleculares, podem ser bastante úteis para se acessar essas informações, como alozimas, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites, genes moleculares e mitocondriais, entre outras.

Embora não seja uma metodologia freqüentemente utilizada, fragmentos de DNA heteroduplex também podem ser utilizados como marcadores moleculares (Carrington *et al.*, 1992; Wilkin *et al.*, 1993; Roratto *et al.*, 2006). O DNA heteroduplex é formado a partir da amplificação de seqüências repetitivas de DNA através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A PCR favorece o anelamento entre fitas simples de DNA sintetizadas a partir de várias cópias gênicas, com seqüências semelhantes, porém não-idênticas (DNA heteroduplex), diferentemente do DNA homoduplex, cujo anelamento das fitas simples é perfeito por se tratarem de seqüências completamente complementares. Os fragmentos de DNA heteroduplex, por formarem estruturas secundárias, apresentam migração eletroforética diferenciada, gerando um padrão de bandas característico para cada indivíduo, de acordo com a variação entre suas seqüências. A análise desses padrões pode fornecer informações a respeito do grau de polimorfismo entre diferentes populações.

Esta técnica já foi empregada com sucesso na análise de um microssatélite pentanucleotídico, presente em uma região repetitiva maior, para avaliar a diferenciação genética entre populações de *A. longirostri* que ocorrem em duas bacias hidrográficas, isoladas por uma barreira geográfica na região central do estado do Rio Grande do Sul (Santos *et al.*, 2007). O estudo mostrou uma grande diferenciação genética entre populações de duas bacias diferentes, revelando que a cadeia de montanhas que separa as bacias age como barreira para o fluxo gênico, apesar da pequena distância entre os pontos de amostragem.

O objetivo desse trabalho é verificar a influência das barreiras geográficas na diferenciação de populações de *A. uruguayana*, utilizando análise de fragmentos de DNA heteroduplex de um microssatélite pentanucleotídico, analisando duas regiões hidrográficas do estado (Uruguai e Litoral) como sendo uma barreira para a distribuição dessa espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

Os espécimes de *A. uruguayana* foram coletados das populações naturais nas bacias hidrográficas dos Rios Jaguarão: Arroio Jaguarão Chico; Ibicui (Ibirapuitã): Arroio Gameleira e Arroio Sarandi; Santa Maria: Arroio Cerro Verde; Quaraí: Arroio Capão do Inglês e Camaquã: Arroio Sutil (Tab.I, Fig. 1). Os animais foram identificados de acordo com Bond-Buckup & Buckup (1994).

Tabela I – Localização dos pontos de coleta, com as respectivas coordenadas e o número de indivíduos analisados.

<i>Pontos</i>	<i>Coordenadas</i>	<i>Município</i>	<i>Arroio</i>	<i>Bacia</i>	<i>n</i>
1	30°25'75"S; 52°18'80"W	Dom Feliciano	Sutil	Rio Camaquã	5
2	31°48'52"S, 54°01'38"W	Aceguá	Jaguarão Chico	Rio Jaguarão	2
3	30°48'34"S; 55°32'14"W	Santana do Livramento	Cerro Verde	Rio Santa Maria	15
4	30°48'52"S; 55°35'53"W	Santana do Livramento	Gameleira	Rio Ibicui (Ibirapuitã)	1
5	30°47'48"S; 55°37'44"W	Santana do Livramento	Sarandi	Rio Ibicui (Ibirapuitã)	7
6	30°54'07"S; 55°41'23"W	Santana do Livramento	Capão do Inglês	Rio Quaraí	2

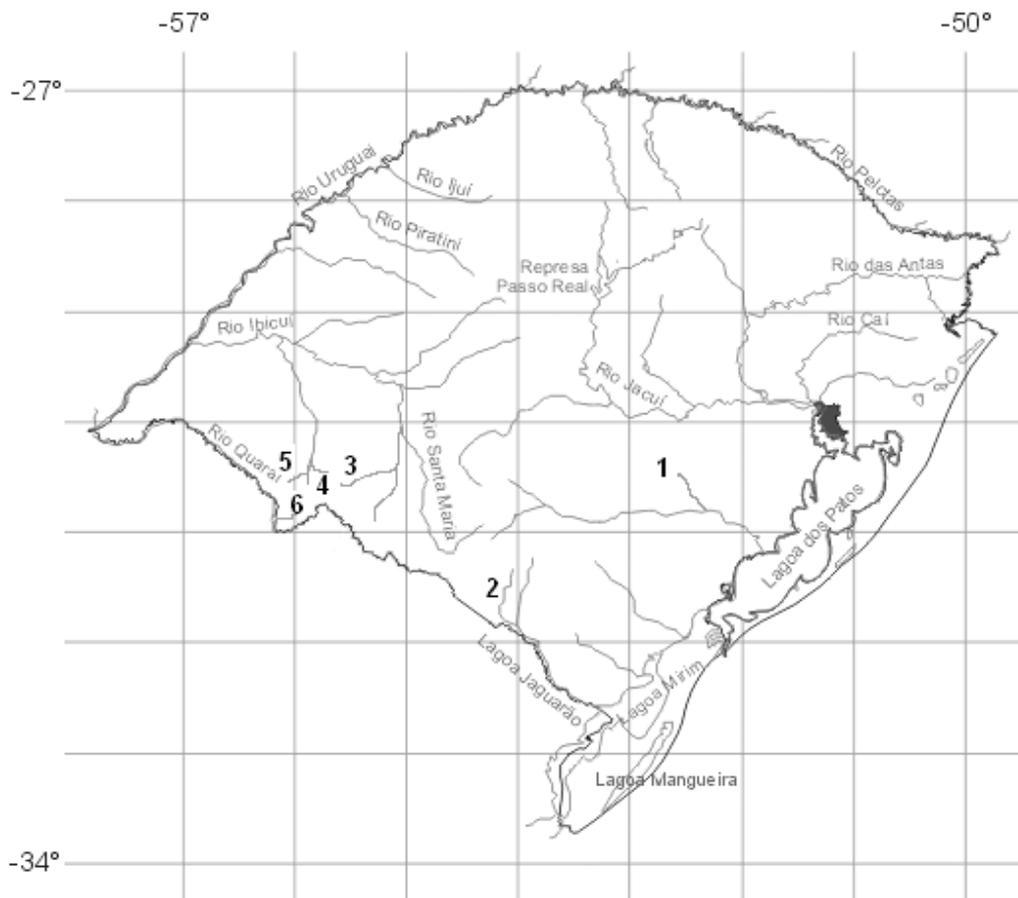


Figura 1 – Mapa do estado do Rio Grande do Sul com os pontos de coleta de *A. uruguayana*.

### Extração de DNA

Os indivíduos foram crioanestesiados antes da dissecação. O DNA total foi extraído do tecido muscular utilizando o método com fenol-clorofórmio (Sambrook & Russel, 2001) modificado por Bitencourt *et al.* (2006). As amostras foram posteriormente tratadas com RNase e purificadas com PEG 8.000 13%/NaCl 1,6 M, sendo conservadas a 4°C.

### Análise Populacional

Foram utilizados *primers* heterólogos, designados para amplificar um fragmento de aproximadamente 260pb, contendo uma região repetitiva pentamérica dentro do complexo gênico snRNA U1 em *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863 e em *Echinococcus granulosus* Batsch, 1786 (Bretagne *et al.*, 1996; Roratto *et al.*, 2006).

As amostras de DNA foram submetidas a uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de 25 µl (volume final) contendo 200 ng de DNA total de *A. uruguayana*, 0,1 mM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U de Taq I DNA polimerase (Cenbiot) e

20 pmol de cada *primer* (snRNA U1 F: 5'ATTGGTCGTTGCCATCTCTCC3' e snRNA U1 R: 5'GTCTCCATCACCACACATC3'). Para controle positivo da reação, utilizou-se um par de *primers* que amplificam um segmento do gene Citocromo oxidase I (COI) de crustáceos. Uma reação contendo água Milli-Q ao invés de DNA foi utilizada como controle negativo.

O programa de amplificação constituiu-se de 30 ciclos com 1' de desnaturação a 94°C, 45'' de anelamento a 57°C e 1' de extensão a 72°C, com um passo inicial de desnaturação de 5' a 94°C e extensão final de 7' a 72°C.

### **Análise dos padrões de heteroduplex para diferentes populações**

Antes da eletroforese, as amostras de DNA amplificadas foram desnaturadas a 95°C por cinco minutos e resfriadas a temperatura ambiente por 1h para facilitar a formação de DNA heteroduplex. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% a 100 V por 4 horas. Os géis foram corados utilizando o método tradicional com nitrato de prata (Sambrook & Russel, 2001) para análise dos padrões de bandas apresentados por cada indivíduo.

### **Métodos Estatísticos**

Foram analisados os indivíduos que apresentaram um número mínimo de 03 bandas de DNA heteroduplex. Os números 0 ou 1 foram atribuídos à ausência ou à presença, respectivamente, de cada banda no gel, permitindo a identificação dos padrões ou haplótipos para cada indivíduo analisado. Uma matriz fenética foi construída utilizando esses dados, a qual foi usada para as análises de agrupamento. A análise numérica dos resultados foi executada pelo programa NTSYSpc, versão 2.0 (Rohlf, 1998). O coeficiente de Jaccard foi utilizado para obter a matriz de similaridade, e UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Analysis*) no módulo SAHN (*Sequential, Agglomerative, Hierarchical and Nested Clustering Methods*) foi aplicado para obter o dendrograma correspondente. A matriz de valores cofenéticos foi produzida pela opção COPH e usada pelo módulo MXCOMP para mensurar a qualidade do ajuste da análise de agrupamento à matriz de similaridade produzida pelo SAHN.

Análise de variância molecular (AMOVA), desenvolvida por Excoffier *et al.* (1992) e incluída no programa ARLEQUIN 3.01 (Schneider *et al.*, 2000), foi usada para determinar a estrutura genética das populações. Esta análise é baseada na variância dos componentes obtidos da matriz Euclidiana de distância entre todos os pares de indivíduos. Para construir essa matriz foi usado o programa Amova-prep (Miller, 1998). A significância desses cálculos

foi estimada por permutações, no qual os indivíduos são randomicamente colocados dentro de diferentes populações e grupos.

A hierarquia utilizada na AMOVA foi baseada na divisão em dois grandes grupos hipotéticos, denominados de bacia do Leste (Litoral: abrangendo as bacias dos Rios Camaquã e Jaguarão) e bacia do Oeste (Uruguai: bacias dos Rios Santa Maria, Ibirapuitã e Quarai).

Através da AMOVA, o programa Arlequin calculou os valores  $F_{ST}$  (Wright, 1951) para cada dupla de população, no qual as taxas variam de 0 (indicando nenhuma diferenciação genética entre as populações) a um máximo teórico de 1 (apesar que na prática esse índice é bem menor que 1 mesmo em populações altamente diferenciadas), e essa significância é determinada baseada em 1.000 permutações. Os valores  $F_{ST}$  foram usados para uma estimativa indireta do número efetivo de migrantes ( $Nm$ ) entre populações através da equação:  $Nm = 0,25 (1/F_{ST} - 1)$  (Wright, 1951).

## RESULTADOS

### Aspectos morfológicos dos animais

Nenhuma diferença morfológica foi encontrada entre os indivíduos examinados, baseado nos caracteres diagnósticos de *A. uruguayana* (Bond-Buckup & Buckup, 1994; Bond-Buckup, 2003), independentemente da população.

### Análise populacional

A análise dos produtos da PCR de *A. uruguayana* em gel de poliacrilamida depois da renaturação mostrou bandas de diferentes mobilidades de 180 a 360 pb. Foram observados 29 padrões diferentes (considerados como haplótipos, Fig. 2) em 32 indivíduos analisados (Tab.II), indicando uma alta variabilidade intra-populacional. Embora alguns haplótipos ocorram em mais de um indivíduo de uma mesma população, não houve compartilhamento de haplótipos entre populações, sugerindo uma alta variação inter-populacional.

Tabela II – Número de bandas analisadas e polimórficas, número de haplótipos e tamanho da amostra.

<i>População</i>	<i>Faixa de tamanho das bandas (pb)</i>	<i>Número de bandas analisadas</i>	<i>Número de bandas polimórficas</i>	<i>Número de haplótipos</i>	<i>Tamanho da amostra</i>
Camaquã	180-360	11	11	5	5
Jaguarão	200-360	8	7	2	2
Santa Maria	180-350	10	10	12	15
Ibirapuitã*	200-350	13	11	8	8
Quarai	200-340	9	1	2	2
Total	180-360	23	-	29	32

\* as populações dos Arroios Gameleira e Sarandi foram analisadas conjuntamente

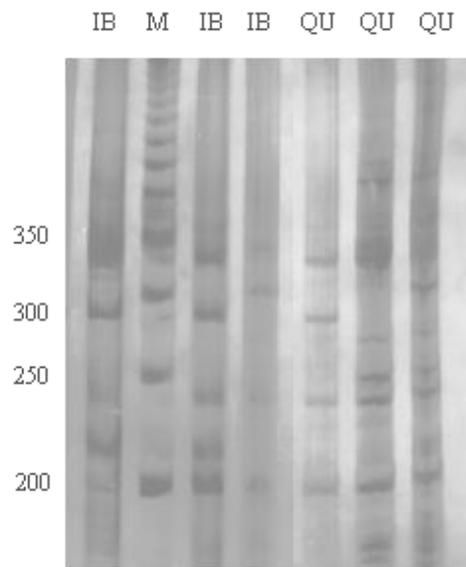


Figura 2: Gel de acrilamida com os padrões haplotípicos de alguns indivíduos analisados. IB, bacia do ibicuí, M, marcador de peso molecular (350, 300, 250, 200pb), QU, bacia do Quarai.

### Análise Estatística

Indivíduos coletados numa mesma localidade foram agrupados num clado único, exceto os indivíduos das bacias Jaguarão e Camaquã, que agruparam num mesmo clado (Fig. 3). O dendrograma mostrou dois grandes grupos, um composto pela população do Rio Santa Maria (grupo I) e o outro pelas demais populações (grupo II). No grupo II é possível reconhecer um grupo independente para a população do Rio Ibirapuitã e outro para o Rio Quarai.

A correlação cofenética entre a matriz de valores cofenéticos e a matriz de similaridade usando o coeficiente de Jaccard foi 0,94, indicando um ajustamento muito bom dos agrupamentos aos dados.

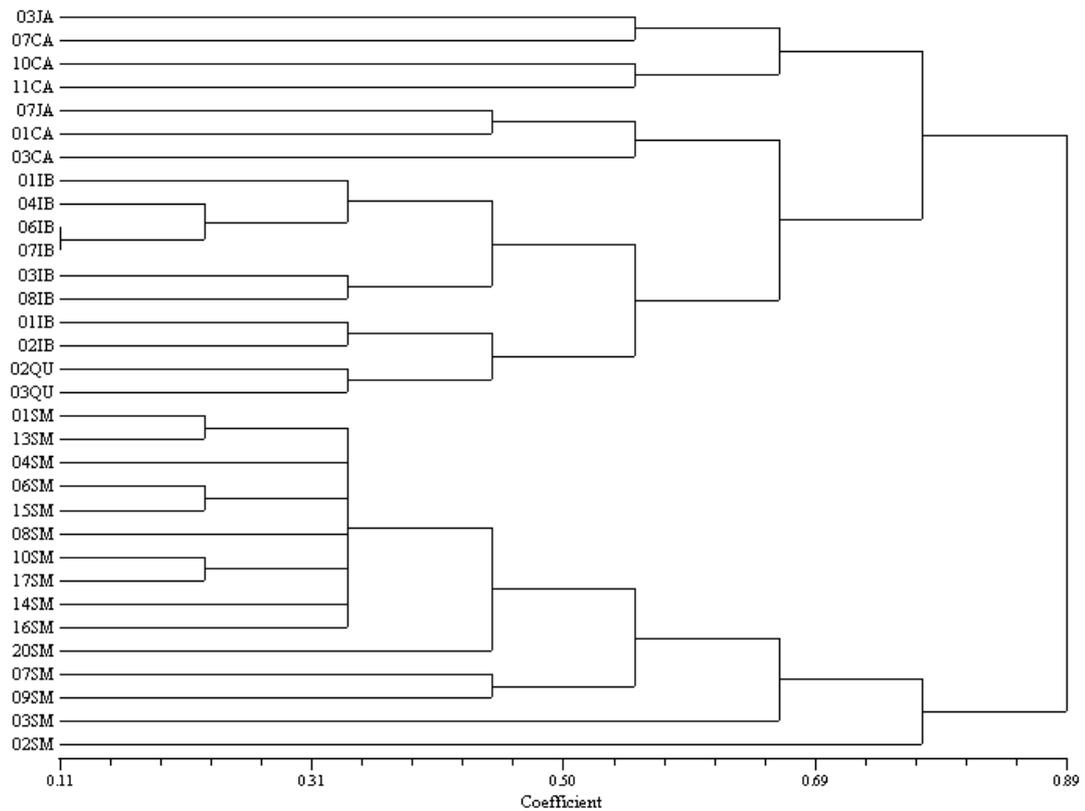


Figura 3 – Dendrograma mostrando as relações genéticas entre populações de *A. uruguayana* construído utilizando o coeficiente de Jaccard e análise de agrupamento (UPGMA). JA: Jaguarão; CA: Camaquã; IB: Ibirapuitã; QU: Quaraí; SM: Santa Maria.

O índice  $F_{ST}$  foi calculado apenas para as populações com número representativo de indivíduos (igual ou superior a cinco), pois o baixo número de indivíduos de algumas amostras provavelmente não representaria a estrutura da população. O valor de  $F_{ST}$  geral foi de 0,50615. Valores de  $F_{ST}$  entre os pares de populações foram altamente significativos ( $P < 0,005$ ) e extremamente altos, de 0,33329 a 0,56929 (Tab. III). A população da bacia do Rio Santa Maria foi a mais divergente em relação às demais, apresentando valores de  $F_{ST}$  de 0,49601 a 0,56929.

Essa variabilidade entre as populações reflete a estimativa obtida de pouco fluxo gênico ( $Nm$ ) entre as populações (Tab. III). Os valores de  $Nm$  variaram de extremamente baixo (0,189143) entre Santa Maria e Ibirapuitã, a baixo entre Camaquã e Ibirapuitã (0,500098).

Tabela III – Número efetivo de migrantes ( $Nm$ ) entre três populações de *A. uruguayana* (acima da diagonal) calculadas a partir do valor  $F_{ST}$  (abaixo da diagonal).

População	Ibirapuitã	Santa Maria	Camaquã
Ibirapuitã	-	0,189143	0,500098
Santa Maria	0,56929	-	0,254022
Camaquã	0,33329	0,49601	-

Na análise de variância molecular (AMOVA) as populações foram divididas em dois grupos: populações do leste (Jaguarão e Camaquã) e populações do oeste (Santa Maria, Ibirapuitã e Quaraí). Esta análise revelou maior diversidade de haplótipos entre populações dentro de grupos (51,5%) (Tab. IV) do que entre os grupos (leste e oeste) ou dentro de populações (48,5%).

Tabela IV – Análise de Variância Molecular (AMOVA) para os 32 espécimes das cinco populações de *A. uruguayana* testadas com DNA heteroduplex.

Variância	% de variação
Entre grupos	-0,88
Entre populações dentro de grupos	51,50
Dentro de populações	49,38
Total	100

## DISCUSSÃO

Neste estudo foi encontrado um número significativo de haplótipos em cada população (Tab. II), refletindo uma alta proporção de diversidade intra-populacional na AMOVA (49,38%) (Tab. IV). Para os 32 indivíduos analisados foram encontrados 29 padrões haplotípicos. As bandas de DNA heteroduplex variaram de 180 a 360pb. Em estudo anterior, enfocando *A. longirostri*, Santos *et al.* (2007) registraram bandas de 140 a 410 pb e 45 haplótipos para 55 indivíduos estudados. Embora o total de bandas de heteroduplex em *A. uruguayana* tenha sido inferior (23) ao apresentado por *A. longirostri* (48), a variabilidade intra-populacional na primeira espécie foi um pouco superior (~10%) à da segunda.

No cálculo dos valores de  $F_{ST}$  foram desconsideradas as populações com apenas dois indivíduos analisados uma vez que estes possivelmente não representariam a estrutura da população. Avaliando as três populações estudadas, quanto a este aspecto, há uma alta estruturação genética entre elas e um baixo fluxo gênico (veja tabela III), revelado pelo  $Nm$ . Os valores observados de  $F_{ST}$  foram todos superiores a 0,25, indicando uma diferenciação genética muito grande (Wright, 1978). Por outro lado, os valores de  $Nm$  foram todos

inferiores a 2,0, o que indica uma taxa de migração baixa o suficiente para permitir uma diferenciação genética significativa (Hartl & Clark, 1997).

Observando o dendrograma (Fig. 3), nota-se a formação de um grande grupo incluindo apenas indivíduos da Bacia do Rio Santa Maria (Fig.3, grupo II). A separação desta população em relação às outras é corroborada pelos altos valores de  $F_{ST}$  calculados para os Rios Santa Maria e Camaquã (0,49601) e Santa Maria e Ibirapuitã (0,56929) (Tab. III). Esse fato pode refletir a formação do relevo, uma vez que a bacia do Rio Santa Maria está separada das bacias dos Rios Ibirapuitã e Quarai por coxilhas que variam de 200 a 330 m de altitude (Ministério do Exército, Folha SH 21-Z-A-VI-4, MI-2991/4).

A população do Rio Camaquã não apresentou um agrupamento independente no dendrograma, possivelmente em função de seu alto nível de variabilidade intra-populacional, visto que esta população apresentou grande diversidade haplotípica (5 haplótipos em um total de 5 indivíduos). As populações da bacia do Leste (Camaquã e Jaguarão) agruparam no mesmo grupo (Fig. 3), possivelmente indicando uma separação mais recente dessas populações ou que ainda mantenham algum fluxo gênico.

As demais populações apresentam substancial diferenciação, mostrado pelo alto valor de  $F_{ST}$  e pelo baixo número de migrantes por geração (Tab. III).

A AMOVA revelou a ausência de estruturação genética entre os grupos hipotéticos bacia do Leste (Jaguarão e Camaquã) e bacia do Oeste (Santa Maria, Ibirapuitã e Quarai), pelo valor negativo da porcentagem da variação entre os grupos. Esse resultado pode estar relacionado ao pequeno número de indivíduos analisados em um dos grupos (bacia do Leste), onde apenas dois e cinco indivíduos das populações de Jaguarão e de Camaquã foram analisados, respectivamente. Se for real, esta ausência de estruturação entre os grupos pode indicar uma separação recente entre os mesmos.

Perez-Losada *et al.* (2004), analisando seqüências de genes mitocondriais e nucleares de 64 espécies e subespécies do gênero *Aegla* Leach, 1820, concluíram que pelo menos algumas espécies formam grupos não-monofiléticos como, por exemplo, *Aegla platensis* Schmitt, 1942. *A. platensis* é uma espécie de distribuição ampla (Bond-Buckup, 2003), estando presente na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, ou seja, é encontrada em várias bacias hidrográficas. *A. uruguayana* também tem uma ampla distribuição, sendo registrada naqueles mesmos países, com exceção do Paraguai (Bond-Buckup, 2003). Porém, o fato de Perez-Losada *et al.* (2004) terem analisado indivíduos de uma mesma população talvez tenha inviabilizado conclusões mais detalhadas em relação a *A. uruguayana*.

As barreiras geográficas parecem estar influenciando na diferenciação genética das populações de *A. uruguayana*, ao menos entre as populações dos Rios Santa Maria, Ibirapuitã e Camaquã, as quais tiveram os valores de  $F_{ST}$  calculados. Para as outras populações será necessária a análise de um número maior de indivíduos, possibilitando a verificação da estrutura genética. A utilização de um marcador molecular ultra-sensível, como os microssatélites, permitirá uma análise mais refinada sobre esta questão.

## BIBLIOGRAFIA

BERNSTEIN, L. B.; MANSER, T. & WEINER, A. M. 1985. Human U1 Small Nuclear RNA Genes: Extensive conservation of flanking sequences suggests cycles of gene amplification and transposition. **Molecular and Cellular Biology**: **5** (9): 2159-2171.

BITENCOURT, J. V. T.; RORATTO, P. A.; BARTOLOMEI-SANTOS, M. L. & SANTOS, S. 2006. Comparison of different methodologies for DNA extraction from *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Brazilian Archives of Science and Technology**, in press.

BOND-BUCKUP, G & BUCKUP, L. 1994. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). São Paulo. **Arquivos de Zoologia** **32** (4): 159-346.

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

BRETAGNE, S.; ASSOULINE, B.; VIDAUD, D.; HOUIN, R. & VIDAUD, M. 1996. *Echinococcus multilocularis*: microsatellite polymorphism in U1 snRNA genes. **Experimental Parasitology** 82:324-328.

BROWN, D. T.; MORRIS, G. F.; CHODCHOY, N.; SPRECHER, C. & MARZLUFF, W. F. 1985. Structure of the sea urchin U1 RNA repeat. **Nucleic Acid Research**, **13**: 537-556, 1985.

CARRINGTON, M.; WHITE, M. B.; DEAN, M.; MANN, D. & WARD, F. E. 1992. The use of DNA heteroduplex patterns to map recombination with the HLA class II region. **Human Immunology**, **33**: 114-121.

D'AMATO, M.E. & CORACH, D. 1997. Highly repetitive DNA sequences unique to Aeglidae (Anomura). **Journal Crustacean Biology**, **17**(1): 184 – 191.

DENISON, R. A.; VAN ARSDELL, S. W.; BERNSTEIN, L. B. & WEINER, L. M. 1981. Abundant pseudogenes for small nuclear RNAs are dispersed in the human genome (multigene families/Alu family sequence). **Biochemistry** **78**: 810-814.

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

FUTUYMA, D. J. 1992. **Biologia Evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq. 646p.

GOYARD, E.; ARNAUD, S.; VONAU, V.; BISHOFF, V.; MOUCHEL, O.; PHAN, D.; WYBAN, J.; BOUDRY, P. & AQUACOP. 2003. Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. **Aquatic Living Resource**, **16**: 501-508, 2003.

HARTL, D. L. & CLARK, A. G. 1997. **Principles of Population Genetics**. 3. ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderlands.

LEWIN, B. 2000. **Genes VII**. New York: Oxford. 990p.

MAGGIONI, R.; ROGERS, A. D. & MACLEAN, N. 2003. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. **Molecular Ecology**, **12**: 3213-3217.

MARZLUFF, W. F.; BROWN, D. T.; LOBO, S. & WANG, S.S. 1983. Isolation and characterization of two mouse U1b small nuclear RNA genes. **Nucleic Acids Research** **11**: 6255-6270, 1983.

MILLER, M. P. 1998. **AMOVA-prep 1.01**. A Program for the Preparation of AMOVA Input Files from Dominant Marker Raw Data. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona.

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

PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C.G.; BOND-BUCKUP, G; PORTER, M.L. & CRANDALL, K. 2002a. Phylogenetic position of the freshwater anomuram family aeglidae. **Journal of Crustacean Biology** **22** (3): 670-676.

PÉREZ-LOSADA, M; JARA, C.G.; BOND-BUCKUP, G; & CRANDALL, K. 2002b. Phylogenetic Relationships among the species of *Aegla* (Anomura: Aeglididae) freshwater crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**, 22(2): 304-313.

PÉREZ-LOSADA, M; JARA, C.G.; BOND-BUCKUP, G; & CRANDALL, K. 2004. Molecular systematics and biogeography of the southern south American freshwater “crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglididae) using multiple heuristic tree search approaches. **Systematic Biology** 53 (5): 767-780.

POTTER, P. E. 1997. The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: a natural history. **Journal of South American Earth Sciences**, 10, nos 5-6: 331-344.

ROHLF, F. J. 1998. **NTSYS-pc**. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80. Exeter Software, Setauket, NY.

RORATTO, P. A.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L.; GUTIERREZ, A. M.; KAMENETZKY, L.; ROSENZVIT, M. C. & ZAHA, A. 2006. Detection of genetic polymorphism among and within *Echinococcus granulosus* strains by heteroduplex analysis of a microsatellites from the U1 snRNA genes. **Genetics and Molecular Research** 5: 542-552.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. 2001. **Molecular Cloning**: a laboratory manual.3.ed. vol.2. New York: Cold Spring Harbor.

SANTOS, S.; RORATTO, P. A.; BITENCOURT, J. V. T. & BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. 2007. Genetic differentiation of *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura) populations isolated by a geographic barrier. Em preparação.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. 2000. **Arlequin**: A software for population genetics data analysis. Ver. 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.

VAZ, J. F. 1989. Distribuição e dispersão de *Biomphalaria tenagophila* (d’Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata). **Ciência e Cultura**, 41 (1): 14 – 27.

ZELLER, R.; CARRI, M. T.; MATTAJ, I. W. & DE ROBERTIS, E. M. 1984. *Xenopus laevis* U1 snRNA genes: characterisation of transcriptionally active genes reveals major and minor repeated genes families. **The EMBO Journal**, 3 (5): 1075-1081.

WILKING, D. J.; KOPRIVNIKAR, K. E. & COHN, D. H. 1993. Heteroduplex analysis can increase the information of PCR-amplified VNTR markers: applications using a marker tightly to the COL2A1 gene. **Genomics** **15**: 372-375.

WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics** **15**: 323–354.

WRIGHT, S. 1978. **Evolution and the genetics of populations**. Vol.4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.

## Capítulo II

Isolamento e caracterização de locos de microssatélites em  
*Aegla uruguayana* (Crustacea, Decapoda, Anomura)

## RESUMO

A utilização de marcadores moleculares tornou-se uma ferramenta importante na busca de respostas para diversas questões biológicas. Um dos marcadores mais utilizados atualmente são os microssatélites, que são repetições em tandem de seqüências curtas de DNA, com no máximo seis bases. Algumas espécies de eglídeos, com distribuição muito ampla, estando presentes em mais de um país, como *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942, despertam interesse em relação à estrutura genética de suas diferentes populações, muitas delas isoladas geograficamente de outras. Isolar microssatélites de *A. uruguayana* constitui-se o passo inicial para se desenvolver uma análise detalhada sobre o estado de conservação genética desta espécie. O isolamento de microssatélites a partir do genoma de *A. uruguayana* seguiu o protocolo de construção de Biblioteca Genômica enriquecida com Microssatélites. Foram seqüenciados 42 clones; desses, 03 tiveram seus *primers* designados, 08 apresentaram microssatélites com pequeno número de repetições, 03 não apresentavam região flanqueadora adequada para projeção de *primers*. Dos três locos que tiveram *primers* designados, dois amplificaram com sucesso. Esses locos foram bastante polimórficos, com 07 e 08 alelos por loco, o que os torna promissores para avaliar diferenças entre populações de *A. uruguayana*. Além disso, esses locos apresentaram amplificação cruzada para *Aegla longirostri* Bond-Buckup, 1994, indicando que também podem ser úteis na análise de espécies relacionadas.

## INTRODUÇÃO

Os eglídeos são os únicos anomuros que habitam águas continentais, sendo que os demais são todos marinhos, além de ser um grupo endêmico do sul da América do Sul. Esse grupo instiga pesquisadores desde longa data, devido a muitos aspectos relacionados com a sua sistemática, morfologia, biogeografia e ecologia (Bond-Buckup, 2003).

A utilização de marcadores moleculares tornou-se uma ferramenta importante na busca de respostas para diversas questões biológicas, ligadas a este grupo. D'Amato & Corach (1997a) estudaram quatro populações de *Aegla jujuyana* Schmitt 1942, onde uma análise por RAPD indicou que as populações não são subdivididas e que deve haver fluxo gênico significativo entre elas. Outros trabalhos também utilizam marcadores moleculares para elucidar algumas questões, principalmente em relação à posição filogenética do grupo e as relações entre as espécies dentro do grupo (D'Amato & Corach 1997b, Pérez-Losada *et al.* 2002a, 2002b, 2004).

Um dos marcadores mais utilizados atualmente são os microssatélites, que são repetições em tandem de seqüências curtas de DNA, com no máximo seis bases. Essas seqüências têm sido encontradas em todos os organismos estudados (Hancock, 1999). Os locos de microssatélites são instáveis, e essa instabilidade se torna útil para estudos evolutivos

e genéticos. O motivo desta instabilidade seria a expansão ou redução do número de cópias dos motivos de repetição. Existem dois modelos que explicam o mecanismo que gera essa instabilidade. Um deles indica como motivo uma alta taxa de *crossing-over* desigual entre cromossomos homólogos imperfeitamente alinhados ao longo das repetições dos microssatélites. O modelo alternativo (SSM – *Slip Strand Mismatching*) sugere que a instabilidade é causada por uma alta taxa de deslizamento das fitas de DNA ao longo das repetições dos microssatélites durante a replicação e é o mais aceito atualmente, por apresentar muitas evidências a seu favor (Eisen, 1999).

Os microssatélites são classificados quanto à presença ou ausência de interrupção na unidade repetitiva ou o tipo de unidade repetitiva (Goldstein & Schlötterer, 1999). Microssatélites perfeitos consistem de um único motivo de repetição, não sendo interrompido ao longo da seqüência por nenhuma base que altere o padrão da repetição (por exemplo, GTGTGTGTGTGTGT). Os imperfeitos apresentam uma ou mais repetições que contêm uma base que altera o padrão repetitivo (por exemplo, GTGTGTGTCTGTGTGT). Microssatélites interrompidos apresentam a inserção de um pequeno número de bases que não se encaixam na estrutura da repetição (por exemplo, GTGTGTGTCCCGTGTGTGT). Microssatélites compostos apresentam dois ou mais microssatélites adjacentes com motivos de repetição diferentes (por exemplo, GTGTGTGTGTGTGTGCACACACACACA).

Os microssatélites apresentam diversas aplicações como identificação de indivíduos, espécies ou mesmo híbridos (Reid *et al.*, 2000; Jorstad *et al.*, 2005), paternidade múltipla (Gosselin *et al.*, 2005; Bilodeau *et al.*, 2005) ou até o rastreamento da história biológica das populações (Xu *et al.*, 2001; Maggiori *et al.*, 2003; Goyard *et al.*, 2003).

Algumas espécies de eglídeos, com distribuição muito ampla, estando presentes em mais de um país, como *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 (Bond-Buckup, 2003), despertam interesse em relação à estrutura genética de suas diferentes populações, muitas delas isoladas geograficamente de outras. Isolar microssatélites de *A. uruguayana* constitui-se o passo inicial para se desenvolver uma análise detalhada sobre o estado de conservação genética desta espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

Os espécimes de *A. uruguayana* foram coletados das populações naturais na bacia hidrográfica do Rio Santa Maria: Arroio Cerro Verde (30°48'34"S; 55°32'14"W), município de Santana do Livramento, RS. Os espécimes de *Aegla longirostri* Bond Buckup e Buckup, 1994, utilizados para os testes de amplificação cruzada foram coletados na Bacia hidrográfica do Rio Jacuí: Rio Michelon (29°29'31"S; 53°34'19"W), município de Ivorá e Arroio da Divisa, tributário do Rio Ibicuí (29°38'33"S; 53°32'02"W), município de São João do Polesine. Os animais foram identificados de acordo com Bond-Buckup & Buckup (1994).

### Extração de DNA

Os indivíduos foram crioanestesiados antes de serem dissecados. O DNA total foi extraído do tecido muscular usando o protocolo tradicional de extração de DNA com fenol-clorofórmio com algumas modificações (Sambrook & Russel, 2001; Bitencourt *et al.*, 2006). As amostras foram tratadas com RNase e purificadas com PEG 8.000 13%/NaCl 1,6 M, sendo conservadas à 4°C.

### Isolamento de Microsatélites

O isolamento de microsatélites a partir do genoma de *A. uruguayana* seguiu o protocolo de construção de Biblioteca Genômica enriquecida com Microsatélites, segundo Refseth *et al.* (1997) com algumas modificações.

Uma alíquota de 200ng/μL de DNA de *A. uruguayana* foi clivada com a enzima de restrição TaqI, de acordo com as instruções do fabricante. A amostra clivada foi precipitada com 2,5 volumes de etanol absoluto e 1/10 do volume de Acetato de Sódio 3M (pH 5,2) e ressuspendida em 40μL de água milli-Q.

Os fragmentos de DNA foram ligados a um adaptador TaqI (20/22mer) (5' ATGAAGCCTTGGTACTGGAT 3' e 5' CGATCCAGTACCAAGGCTTCAT 3') e posteriormente hibridizados a um oligonucleotídeo biotilado, contendo a seqüência (CA)<sub>8</sub> que funciona como sonda para capturar microsatélites (GT)<sub>n</sub>.

Foram utilizadas esferas magnéticas revestidas com estreptavidina (molécula que apresenta alta afinidade pela biotina) para capturar as seqüências hibridizadas à sonda, com o auxílio de um separador magnético.

Após sucessivas lavagens de estringência com soluções de 2X SSC/0,1% SDS e 1X TE/NaCl 2M e 1M, os fragmentos fita-simples capturados foram utilizados como molde em uma PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) que utiliza as seqüências dos adaptadores como *primer* (ver figura 1).

O produto da PCR foi purificado por PEG 8000 13%/NaCl 1,6 M, que precipita as moléculas de DNA de acordo com seu tamanho; posteriormente foi inserido em um vetor plasmidial pCR 2.1 com a utilização do kit de clonagem TA Cloning (Invitrogen). Bactérias *Escherichia coli* XL-1 Blue foram transformadas por choque térmico com os plasmídeos recombinantes e cultivadas em 25mL de meio LB sólido acrescido de 75µL de ampicilina (20ng/mL), 20µL de X-gal (20ng/mL) e 10µL de IPTG 0,1M. As colônias recombinantes obtidas foram cultivadas em meio LB líquido contendo ampicilina e os plasmídeos extraídos conforme o protocolo de *Mini-prep* (Sambrook & Russel, 2001).

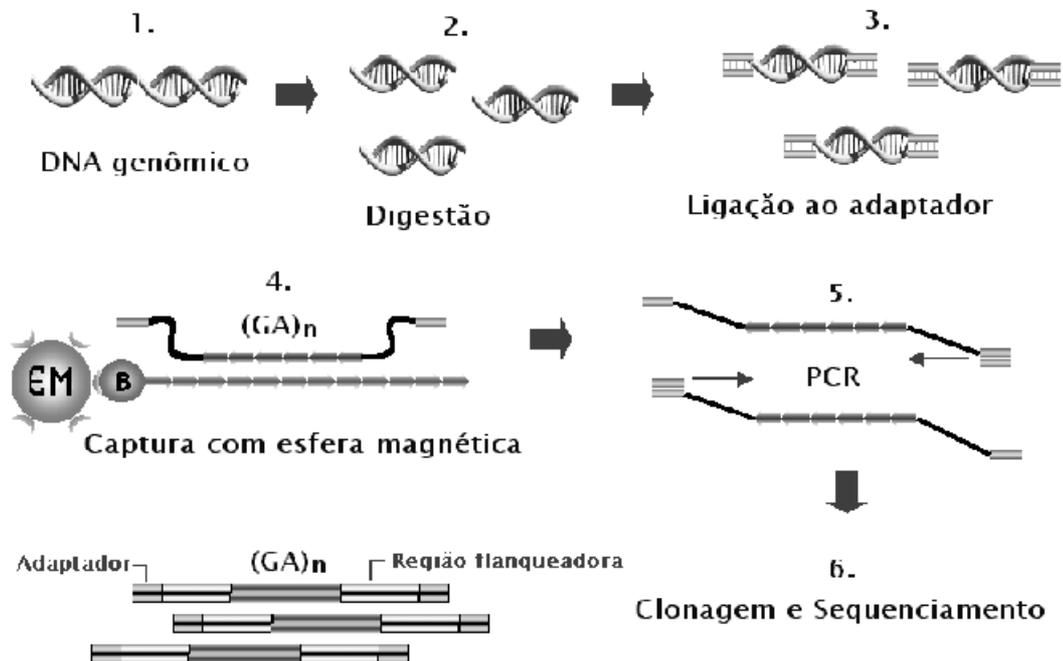


Figura 1 – Representação esquemática do procedimento de isolamento de microssatélites, segundo Refseth *et al.* (1997) com algumas modificações.

### Seqüenciamento

Os plasmídeos obtidos foram utilizados como molde em PCR. O produto da reação foi seqüenciado automaticamente utilizando-se o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE (Amershan Bioscience).

A qualidade das seqüências foi avaliada pelo programa Staden Package (Staden *et al.*, 1998).

As seqüências dos locos de microssatélites foram analisadas nos programas OLIGO (Rychlin & Rhoads, 1989) e Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) para projeção de *primers*.

As seqüências foram alinhadas no CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) para verificar se há homologia entre as mesmas.

### **Testes de Amplificação**

Os *primers* obtidos foram testados em PCRs com DNA genômico de *A. uruguayana* como molde, para o estabelecimento das condições ideais de amplificação.

### **Amplificação dos locos de microssatélites em *A. uruguayana***

Após o estabelecimento das condições ideais de amplificação para os locos de microssatélites Au05 e Au13 (locos isolados de *Aegla uruguayana*), amostras de DNA genômico foram amplificadas contendo 10 pmol de cada *primer*, 100µM de cada dNTP, 2,5U *Taq* polimerase, tampão de amplificação 1X (10mM tris-HCl, 50mM KCl) e 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>. Foram utilizados programas com temperatura de anelamento distintas para os dois locos: TD 56/51 e TD56/52, para os locos Au05 e Au13, respectivamente. Cinco minutos a 94°, 10 vezes {1' a 56° (-0,5°C para loco Au05 e - 0,4°C para o loco Au13 por ciclo), 1' a 72°C e 1' a 94°C, 1' a 56° (-0,5°C ou - 0,4°C por ciclo), 1' a 72°C e 1' a 94°C}, 1' a 51 ou 52°, 1' a 72°C e 1' a 94°C, por 20 ciclos, 1' a 51° ou 52° e 10' a 72°C.

### **Eletroforese dos fragmentos de DNA em gel de poliacrilamida**

Após a PCR, 5µL da reação com os fragmentos amplificados contendo microssatélites foram adicionados a 3µL de tampão de amostra (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilenocianol) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, não-desnaturante, em tampão TEB 1X (90 mM Tris-borato, 2mM EDTA), durante 12h a 150V.

### **Coloração do gel de poliacrilamida**

Após o término da eletroforese, os géis foram removidos imediatamente para uma solução etanol 10%, ácido acético 0,5% a 60°C, na qual permaneceu por 5 minutos. Em seguida os géis foram lavados com água destilada duas vezes e corados com uma solução de nitrato de prata 0,1% a 60°C por 5 minutos, lavados novamente com água destilada e revelados com uma solução de hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,1%, também a 60°C,

até o aparecimento das bandas de DNA. A revelação foi interrompida com ácido acético 10% e os géis foram secos entre duas folhas de celofane embebido em solução de metanol 30% e glicerol 1%.

### Análise estatística

A análise dos dados de polimorfismo dos locos foi feita com o auxílio do programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995). Os valores de  $F_{IS}$  foram calculados segundo Weir & Cockerham (1984).

## RESULTADOS

### Isolamento dos locos de microssatélite

Para a biblioteca enriquecida de microssatélites, 42 clones foram seqüenciados (Tab.I). Desses, 03 tiveram seus *primers* designados, 08 apresentaram microssatélites com pequeno número de repetições, 03 não apresentavam região flanqueadora adequada para projeção de *primers*, sendo que os locos Au01 e Au12 por ter poucos pares de bases (Tab.II) e o loco Au04 por apresentar uma das extremidades flanqueadoras rica em AT (Fig.2). Para o restante dos locos não foi possível obter uma seqüência consenso, ou pelo fato dos locos serem muito extensos, de modo que as leituras direta e reversa não se encontraram, ou porque o seqüenciamento não gerou leituras de boa qualidade, apesar de terem sido repetidas. Dos três locos que tiveram *primers* designados, dois amplificaram com sucesso, Au05 e Au13 (Tab.II).

Todos os locos isolados apresentaram motivo de repetição AC/GT, com um número mínimo de quatro (loco Au03) e o máximo de 38 repetições (Au01), Apesar de provavelmente ser polimórfico, não foi possível designar *primers* para este último, pois apresentava região flanqueadora de tamanho insuficiente.

Tabela I – Situação dos clones seqüenciados.

<i>Clones seqüenciados</i>	<i>Número (%)</i>
Número total de clones seqüenciados	42 (100%)
Número total de clones com microssatélite	42 (100%)
Microssatélites com até 8 repetições	08 (19,05%)
Microssatélites sem região flanqueadora adequada	03 (7,14%)
Microssatélites sem seqüência consenso	28 (66,6%)
Pares de <i>primers</i> designados	03 (7,14%)
Condições da PCR otimizadas	02 (66,6%)
Locos polimórficos	02 (100%)



Tabela 3 – Características dos locos de microssatélites de *Aegia uruguayana* para os quais foram designados primers.

Loco	Motivo de repetição	Primers 5' – 3'	$T_m$ (°C)	Tamanho do alelo clonado (pb)	n	A	$H_o$	$H_e$	EHW (valor P)
Au05	(GT) <sub>12</sub>	F: GATAAAGGAGTGTGATGGTG R: ATTGACTATGGAACTTTTG	56/51	256	12	8	0,416	0,786	0,000
Au13	(TG) <sub>13</sub>	F: GTTATGTGGCTGTGTTTGG R: GTCGGAGAGAGGACGAGAAATA	56/52	217	11	7	0,454	0,870	0,0039
Au14	(GT) <sub>5</sub> (GC) <sub>2</sub> (GT) <sub>1</sub> AG(GT) <sub>4</sub>	F: CAATAGAAACAAAACCGACCG R: AAAGGTGGGAGTGAAGAAGC	-	284	-	-	-	-	-

$T_m$ , intervalo de temperatura de anelamento, usando programa "touch-down"; n, tamanho da amostra; A, número de alelos;  $H_o$ , heterozigotidade observada;  $H_e$ , heterozigotidade esperada; EHW, Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

### Amplificação cruzada

O loco Au13 amplificou com sucesso em *Aegla longirostri*. Os produtos da PCR foram purificados e seqüenciados e foi confirmada a identidade entre as seqüências das duas espécies para o loco Au13 (Fig.2). As seqüências tiveram 98% de identidade, com seis repetições a menos do microssatélite em *A. longirostri*. Foram testados 12 indivíduos de *A. longirostri* de duas populações, sendo que o loco Au13 se mostrou monomórfico para todas as amostras.

```

Au13      TGGAACAGTCTTGAGAAAAGATACATATCATCCATACATATTTTAAATATTGTTTTTTATA 60
a113      -----

Au13      TATTTTTTTTCATTTTTTTGTATAGCTGGAGAGGACGAGAAAATACATACCAGTTATATGAAT 120
a113      -----GCTGGAGAGGACGAGAAAATACATACCAGTTATATGAAT 38
                *****

Au13      AGTAGTCTGATTATGCTATGCATGTATATTAAGTAAATTTACGCATAGCGTAAAAATTTTA 180
a113      AGTAGTCTGATTATGCTATGCATGTATATTAAGTAAATTTACGCATAGCGTAAAAATTTTA 98
                *****

Au13      GGATGTTTTCAAATGCCATTTCGGTTTTAGCTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTA 240
a113      GGATGTTTTCAAATGCCATTTCGGTTTTACCTTTGTGTGT-----ATGTGTGTA 146
                *****

Au13      TGTAGGTAGGTATATAGTCATGGCGGCCAGAGATGATCATATGACGTTCTGTCTACTTTC 300
a113      TGTAGGTAGGTATATAGTCATGGCGGCCAGAGATGGTTCATATGACGTT--GTCTACTTTC 204
                *****

Au13      CAAACACAGCCACATAACGAATACACTGGAAGGTTAAATATATACTCATGTTTTACCAGT 360
a113      CAAACACAGCCACATAAC----- 222
                *****

Au13      ATCACTAATTCATTAGCATCTATTAATCG 390
a113      -----

```

Figura 03 – Alinhamento pelo programa Clustal W das seqüências do loco Au13 para *Aegla uruguayana* e *Aegla longirostri*.

## DISCUSSÃO

A maior parte dos trabalhos de isolamento e caracterização dos microssatélites utiliza mais de uma sonda para captura das seqüências repetitivas, mas a eficiência dessas sondas varia bastante. Por exemplo, Pannacciulli *et al.* (2005), utilizando uma sonda CA, encontraram sete locos polimórficos entre 16 locos isolados. Já Robainas *et al.* (2002), utilizando seis sondas com motivos repetitivos diferentes, isolaram cinco locos polimórficos entre 15 para os quais designaram *primers*. Neste trabalho, utilizando uma sonda, designamos *primers* para três locos, desses, dois se mostraram polimórficos, tendo uma alta eficiência, considerando o número de *primers* designados.

O único loco que não foi amplificado com sucesso, Au14, está relacionado com o loco Au02, mas não se trata de locos redundantes, ou seja, não são clones com seqüências idênticas. A seqüência da região flanqueadora 3' do loco Au14 tem 93% de identidade com a seqüência 5' do loco Au02, mas a região flanqueadora 5' do loco Au14 apresenta apenas 8% de identidade com a 3' do Au02, se tratando possivelmente de clones quiméricos. Estes produtos quiméricos podem surgir quando seqüências semelhantes servem como molde em uma reação de amplificação. Um loco de microsatélite capturado não é totalmente estendido durante a fase de alongamento do ciclo de PCR (é estendido somente até a repetição CA<sub>n</sub>). Esta fita incompletamente estendida anela sua extremidade 3' com uma repetição GT<sub>n</sub> de outro loco de microsatélite em um ciclo subsequente, funcionando como um *primer* para dar seguimento à extensão da molécula. A fita nascente gerada é uma quimera formada pela região 5' flanqueadora de um loco, a repetição CA<sub>n</sub> que foi o ponto de ligação entre as fitas e uma região 3' flanqueadora de outro loco (ver Roratto *et al.*, 2007). Esta seqüência quimérica não representa uma seqüência contígua presente no genoma de *A. uruguayana*, e sim, um artefato da técnica de PCR. Conseqüentemente, *primers* projetados para amplificar estes locos não funcionam.

O loco Au04 possui um microsatélite imperfeito e interrompido [(AC)<sub>14</sub>G(CA)<sub>11</sub>...(AC)<sub>5</sub>]. Além disso, a sua região flanqueadora 3' é uma seqüência rica em AT, o que resulta em *primers* reversos com *Tm* baixa. A *Tm* (temperatura de fusão) é a temperatura em que 50% dos pares de bases em um duplex estão desnaturados (Sambrook & Russel, 2001). Para o cálculo da *Tm* do oligonucleotídeo é levado em conta o conteúdo AT/GC do *primer*, pois as associações entre A e T são mais fracas do que as entre C e G, as quais são unidas por duas e três pontes de hidrogênio, respectivamente. Assim, quanto maior a proporção de AT em relação a GC do *primer* menor é a *Tm* do mesmo. *Primers* com baixas *Tm* são inadequados, pois requerem a utilização de temperaturas de anelamento mais baixas durante a PCR, o que favorece a amplificação de produtos inespecíficos (Sambrook & Russel, 2001). Para se obter um par de *primers* com *Tm* próximas, o programa Primer3 sugeriu a utilização de um oligonucleotídeo reverso longo, com 27 nucleotídeos, complementar a uma região contendo uma repetição (GT)<sub>5</sub>. Uma das maneiras de elevar a *Tm* de um *primer* é aumentando a quantidade de nucleotídeos do mesmo, entretanto *primers* longos também favorecem o anelamento em regiões inespecíficas durante a PCR. Além disso, por conter uma repetição, este *primer* possivelmente anelaria em outras regiões que possuíssem essa repetição, e até com o próprio microsatélite desse loco, resultando em fragmentos de vários tamanhos, o que impossibilitaria a análise.

Os locos que apresentaram microssatélites com até oito unidades repetitivas não tiveram *primers* designados, pois provavelmente não seriam polimórficos, visto que quanto menor o número de repetições menor o polimorfismo dos locos. A instabilidade dos locos aumenta com o aumento do número de repetições, pois o deslizamento das fitas de DNA molde e nascente é facilitado quando há um número maior de bases repetitivas em tandem (ver revisão Schlötterer, 2000). De acordo com Ramel (1997), os microssatélites formam quatro grupos: 1) microssatélites estáveis ou monomórficos (alelos com pequeno número de repetições); 2) microssatélites polimórficos, mas estáveis entre gerações (alelos com repetições de tamanho médio); 3) microssatélites instáveis entre gerações (alelos longos, pré-mutacionais); e 4) microssatélites com instabilidade meiótica e mitótica (alelos muito longos). O segundo grupo é o adequado para análises populacionais.

A heterozigotidade observada foi menor que a esperada, mostrando que a população não está em equilíbrio ( $P < 0,01$ ). Isso pode ser explicado por se tratar de uma população com alto grau de endocruzamento, como mostrou os valores de  $F_{IS}$  (coeficiente de endocruzamento) que foram de 0,4811 e 0,4898, para os locos Au05 e Au13, respectivamente, que são bastante altos; mas pode ser também um problema de sub-amostragem, sendo a amostra não significativa para avaliar a diversidade de alelos da população.

O loco Au13 amplificou com sucesso em *A. longirostri* e o fragmento obtido apresentou 98% de identidade com a seqüência de *A. uruguayana*, com seis repetições a menos no microssatélite. Alelos de microssatélites encontrados na espécie focal tendem a ser mais longos que aqueles encontrados em locos homólogos de espécies relacionadas, entretanto este fenômeno reflete uma tendência de averiguação, visto que durante a seleção dos locos na espécie focal, os pesquisadores escolhem aqueles com maior número de repetições (Amos, 1999; Chambers & MacAvoy, 2000). O loco Au13 foi testado em 12 indivíduos de *A. longirostri* de duas populações, sendo que se mostrou monomórfico para todas as amostras. Apesar disso, esse loco possivelmente tem potencial para avaliar espécies próximas, podendo ser polimórfico.

Os dois locos que amplificaram com sucesso em *A. uruguayana*, Au05 e Au13, foram bastante polimórficos, com 07 e 08 alelos respectivamente, o que os torna promissores para investigar a variabilidade genética de populações de *A. uruguayana* isoladas por barreiras geográficas.

## BIBLIOGRAFIA

AMOS, W. 1999. A comparative approach to the study of microsatellite evolution. *In*: GOLDSTEIN, D. B. & SCHÖLTTERER, C. (Ed.) **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford University Press, Oxford.

BILODEAU, A. L.; FELDER, D. L. & NEIGEL, J. E. 2005. Multiple paternity in the thalassinidean ghost shrimp, *Callichirus islagrande* (Crustacea, Decapoda, Callinassidae). **Marine Biology**, **146**: 381-385.

BITENCOURT, J. V. T.; RORATTO, P. A.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. & SANTOS, S. 2006. Comparison of different methodologies for DNA extraction from *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Brazilian Archives of Science and Technology**, in press.

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

CHAMBERS, G.K. & MACAVOY, E. S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, **126**: 455-476.

D'AMATO, M.E. & CORACH, D. 1997a. Population genetic structure in the fresh water anomura *Aegla jujuyana* by RAPD analysis. **Journal of Crustacean Biology**, **17**(2): 269 – 274.

D'AMATO, M.E. & CORACH, D. 1997b. Highly repetitive DNA sequences unique to Aeglidae (Anomura). **Journal of Crustacean Biology**, **17**(1): 184 – 191.

EISEN, J. A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. *In*: GOLDSTEIN, D. B & SCHÖLTTERER, C. (Ed.) **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford University Press, Oxford.

GOSSELIN, T.; SAINT-MARIE, B. & BERNATCHEZ, L. 2005. Geographic variation of multiple paternity in the American lobster, *Homarus americanus*. **Molecular Ecology**, **14**: 1517-1525.

GOYARD, E.; ARNAUD, S.; VONAU, V.; BISHOFF, V.; MOUCHEL, O.; PHAN, D.; WYBAN, J.; BOUDRY, P. & AQUACOP. 2003. Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. **Aquatic Living Resource**, **16**: 501–508, 2003.

JORSTAD, K. E.; PRODÖHL, P. A.; KRISTIANSEN, T. S.; HUGHES, M.; FARESTVEIT, E.; TAGGART, J. B.; AGNALT, A. L. & FERGUSON, A. 2005. Communal larval rearing of European lobster (*Homarus gammarus*): Family identification by microsatellite DNA profiling and offspring fitness comparisons. **Aquaculture**, **247**: 275-285.

MAGGIONI, R.; ROGERS, A. D. & MACLEAN, N. 2003. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. **Molecular Ecology**, **12**: 3213–3217.

PANNACCIULLI, F. G.; PIYAPATTANAKORN, S.; BISHOP, J. D. D.; HAWKINS, S. J. & MACLEAN, N. 2005. Isolation of high polymorphic microsatellites from the intertidal barnacle *Chthamalus montagui* Southward. **Molecular Ecology Notes** **5**, 641-643, 2005.

PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C.G.; BOND-BUCKUP, G; PORTER, M.L. & CRANDALL, K. 2002a. Phylogenetic position of the freshwater anomuram family aeglidae. **Journal of Crustacean Biology** **22** (3): 670-676.

PÉREZ-LOSADA, M; JARA, C.G.; BOND-BUCKUP, G; & CRANDALL, K. 2002b. Phylogenetic Relationships among the species of *Aegla* (Anomura: Aeglidae) freshwater crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**, **22**(2): 304-313.

PÉREZ-LOSADA, M; JARA, C.G.; BOND-BUCKUP, G; & CRANDALL, K. 2004. Molecular systematics and biogeography of the southern south American freshwater “crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) using multiple heuristic tree search approaches. **Systematic Biology** **53** (5): 767-780.

RAMEL, C. 1997. Mini- and microsatellites. **Environmental Health Perspectives** **105**: 781-789.

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

REID, V. A.; CARVALHO, G. R. & GEORGE, D. G. 2000. Molecular genetic analysis of *Daphnia* in the English Lake District: species identify, hybridization and resting egg banks. **Freshwater Biology**, **44**: 247-253.

REFSETH, U. H.; FANGAN, B. M. & JAKOBSEN, K. S. 1997. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. **Electrophoresis**, **18**: 1519-1523.

ROBAINAS, A.; MONNEROT, M.; SOLIGNAC, M.; DENNEBOUY, N.; ESPINOSA, G. & GARCÍA-MACHADO, E. 2002. Microsatellite loci from the pink shrimp *Farfantenaeus notialis* (Crustacea, Decapoda). **Molecular Ecology Notes**, **2**: 344-345.

RORATTO, P. A.; BUCHMANN, D.; SANTOS, S. & BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. 2007 PCR-mediated recombination in microsatellite markers development: mechanism and implications. Em preparação.

ROZEN, S. & SKALETSKY, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S; MISENER, S (ED) **Bioinformatics Methods and Protocols**: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

RYCHLIK, W. & RHOADS R.E. 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, **17** (21):8543–8551.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. 2001. **Molecular Cloning**: a laboratory manual.3.ed. vol.2. New York: Cold Spring Harbor.

SCHLÖTTERER, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, **109**: 365-371.

STADEN, R.; BEAL, K. F. & BONFIELD, J. K. 1998. The Staden Package, 1998. **Methods in Molecular Biology**, **132**: 115-130.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** **22**: 4673-4680.

WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** **38**:1358–1370.

XU, Z.; PRIMAVERA, J. H.; DE LA PENA, L. D.; PETTIT, P.; BELAK, J. & ALCIVAR-WARREN, A. 2001. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines using microsatellites. **Aquaculture**, **199**: 13–40, 2001.

## CONCLUSÕES

- As barreiras geográficas parecem estar influenciando na diferenciação genética das populações de *A. uruguayana*, ao menos entre as populações dos Rios Santa Maria, Ibirapuitã e Camaquã, as quais tiveram os valores de  $F_{ST}$  calculados;
- O número de locos polimórficos foi alto em relação ao número de *primers* designados, pois foram designados *primers* para três locos, desses, dois se mostraram polimórficos;
- O único loco que não apresentou amplificação, possivelmente se trata de um artefato da técnica de isolamento, não representando a seqüência real do microssatélite e suas regiões flaqueadoras, mas sim, uma seqüência quimérica entre dois locos;
- Os dois locos que amplificaram com sucesso foram bastante polimórficos, com 07 e 08 alelos, o que os torna promissores para avaliar diferenças entre populações de *A. uruguayana*;
- Os locos Au05 e Au13 amplificaram com sucesso em *Aegla longirostri*, tendo potencial para avaliar espécies do mesmo gênero.

## PERSPECTIVAS

- Análise de um número maior de indivíduos através da técnica de DNA heteroduplex, o que facilitará a verificação da estrutura genética;
- Seqüenciamento de mais clones para obtenção de um maior número de locos de microssatélites;
- Utilização dos locos polimórficos de microssatélites para análises populacionais em *A. uruguayana*, principalmente para avaliar as populações já estudadas com DNA heteroduplex;
- Testar a amplificação cruzada em outras espécies do gênero *Aegla* e também em outros grupos de crustáceos para avaliar a aplicação desse marcador para outras espécies.

## BIBLIOGRAFIA

ALTSCHUL, S. F., GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, **215**: 403-410.

BAGSHAW, J. C. & BUCKHOLT, M. A. 1997. A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. **Gene** **184**: 211-214.

BOND-BUCKUP, G & BUCKUP, L. 1994. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). São Paulo. **Arquivos de Zoologia**, **32** (4): 159-346.

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

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

CACCONE, A.; ALLEGRUCCI, G.; CESARONI, D.; SBORDONI, M. C.; MATTHAEIS E.; LA ROSA, G. & SBORDONI, V. 1986. Genetic Variability and Divergence Between Cave Dwelling Populations of *Typhlocirolana* from Majorca and Sicily. **Biochemical Systematics and Ecology**, **14** (2): 215 – 221.

CARRINGTON, M.; WHITE, M. B.; DEAN, M.; MANN, D. & WARD, F. E. 1992. The use of DNA heteroduplex patterns to map recombination with the HLA class II region. **Human Immunology**, **33**: 114-121, 1992.

CESARI, M.; MULARONI, L.; SCANABISSI, F. & MANTOVANI, B. 2004. Characterization of dinucleotide microsatellite loci in the living fossil tadpole shrimp *Triops cancriformis* (Crustacea Branchiopoda Notostrace). **Molecular Ecology Notes** **4**, 733-735.

CHAMBERS, G. K. & MCAVOY, E. S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** **126**: 455-476.

CRISTESCU, M. E. A.; COLBOURNE, J. K.; RADIVOJAC, J. & LYNCH, M. 2006. A microsatellite-based genetic linkage map of the waterflea, *Daphnia pulex*: On the prospect of crustacean genomics. **Genomics** **88**: 415-430.

D'AMATO, M.E. & CORACH, D. 1997a. Population genetic structure in the fresh water anomura *Aegla jujuyana* by RAPD analysis. **Journal of Crustacean Biology**, **17**(2): 269 – 274.

D'AMATO, M.E. & CORACH, D. 1997b. Highly repetitive DNA sequences unique to Aeglidae (Anomura). **Journal of Crustacean Biology**, **17**(1): 184 – 191.

DUFF, R. J.; HOEH, W. R.; COOK, D. & WEEKS, S. C. 2004. Isolation and characterization of 13 polymorphic microsatellite loci from the clam shrimp *Eulimnadia texana* (Crustacea: Spinicaudata). **Molecular Ecology Notes** **4**, 397-399.

EISEN, J. A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In GOLDSTEIN, D. B; SCHÖLTTERER, C. (ED.) **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford University Press, Oxford.

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

FELDMANN, R.M.; VEGA, F.J.; APPLGATE, S.P. & BISHOP, G.A. 1998. Early Cretaceous arthropods from the Tlayúa Formation at Tepexi de Rodríguez, Puebla, México. **Journal of Paleontology** **72**(1): 79-90.

FUTUYMA, D.J. 1992. **Biologia Evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq. 646p.

GOLDSTEIN, D. B & SCHÖLTTERER, C. (Ed.). 1999. **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford University Press, Oxford.

GOUIN, N.; GRANDJEAN, F. & SOUTY-GROSSET, C. 2000. Characterization of microsatellite loci in the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Astacidae) and their potential use in other decapods. **Molecular Ecology** **9**, 636-637.

GOYARD, E. ARNAUD, S.; VONAU, V.; BISHOFF, V.; MOUCHEL, O.; PHAN, D.; WYBAN, J.; BOUDRY, P. & AQUACOP. 2003. Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. **Aquatic Living Resource**, **16**: 501–508.

GRANDJEAN, F.; GOUIN, N.; VERNE, S.; DELAUNAY, C. & PATRI, S. 2005. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus*. **Molecular Ecology Notes** **5**, 507-509, 2005.

HANCOCK, J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *In*: GOLDSTEIN, D. B; SCHÖLTERER, C. (Ed.). **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford University Press, Oxford.

HÄNFLING, B & WEETMAN, D. 2003. Characterization of microsatellite loci for the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Molecular Ecology Notes** **3**, 15-17.

HEBLING, N. J. & RODRIGUES, W. 1977. Sobre uma nova espécie brasileira do gênero *Aegla* Leach. 1820 (Decapoda, Anomura). **Papéis Departamento Zoologia São Paulo**, **30** (19): 289-294.

JARA, C. 1994. *Aegla pewencha*, a new species of Central Chilean fresh water decapod (Crustacea, Anomura, Aeglidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, **107** (2): 325-339.

JORSTAD, K. E.; FARESTVEIT, E.; KELLY, E. & TRIANTAPHYLLIDIS, C. 2004. Sub-arctic populations of European lobster, *Homarus gammarus*, in northern Norway. **Environmental Biology of Fishes** **69**: 223-231.

KAESTNER, A. 1980. **Invertebrate Zoology**. Vol. III. Crustacea. Krieger, 523 pp.

LEWIN, B. 2000. **Genes VII**. New York: Oxford. 990p.

MAGGIONI, R.; ROGERS, A. D. & MACLEAN, N. 2003. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. **Molecular Ecology**, **12**: 3213-3217.

MAGGIONI, R. ROGERS, A. D; MACLEAN, N. & D'INCAO, F. 2001. Molecular Phylogeny of western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Lipopenaeus* shrimp based on mitochondrial 16S partial sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **18**: 66-73.

MARTIN, J.W. & DAVIS, G.E. 2001. **An Updated Classification of the Recent Crustacea**. Science Series 39, Natural History Museum of Los Angeles County.

MEYER, D. 1994. **Árvores evolutivas humanas**. Dissertação de Mestrado, USP. 171p.

- MOREIRA, A.A.N. & LIMA, G.R. 1977. Relevô In: **Geografia do Brasil, Região Sul**. Vol. 5. Rio de Janeiro: Fundação IBGE, p. 01-34.
- OSTELLARI, L.; ZANE, L.; MACCATROZZO, L.; BARGELLOONI, L. & PATARNELLO, T. 2000. Novel microsatellite loci isolated from the northern krill, *Meganyctiphanes norvegica* (Crustacea, Euphausiacea). **Molecular Ecology** **9**, 377-378.
- PANNACCIULLI, F. G.; PIYAPATTANAKORN, S.; BISHOP, J. D. D.; HAWKINS, S. J. & MACLEAN, N. 2005. Isolation of high polymorphic microsatellites from the intertidal barnacle *Chthamalus montagui* Southward. **Molecular Ecology Notes** **5**, 641-643.
- PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C.G.; BOND-BUCKUP, G; PORTER, M.L. & CRANDALL, K. 2002a. Phylogenetic position of the freshwater anomuram family aeglidae. **Journal of Crustacean Biology** **22** (3): 670-676.
- PÉREZ-LOSADA, M; JARA, C.G.; BOND-BUCKUP, G; & CRANDALL, K. 2002b. Phylogenetic Relationships among the species of *Aegla* (Anomura: Aeglidae) freshwater crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**, **22**(2): 304-313.
- PÉREZ-LOSADA, M; JARA, C.G.; BOND-BUCKUP, G; & CRANDALL, K. 2004. Molecular systematics and biogeography of the southern south American freshwater “crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) using multiple heuristic tree search approaches. **Systematic Biology** **53** (5): 767-780.
- RAMBO, B. 1994. **A fisionomia do Rio Grande do sul**: ensaio de monografia natural. 3. ed. São Leopoldo: Ed. Unisinos. 473p.
- ROBAINAS, A.; MONNEROT, M.; SOLIGNAC, M.; DENNEBOUY, N.; ESPINOSA, G. & GARCÍA-MACHADO, E. 2002. Microsatellite loci from the pink shrimp *Farfantenaes notialis* (Crustacea, Decapoda). **Molecular Ecology Notes** **2**, 344-345.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. 2001. **Molecular Cloning**: a laboratory manual.3.ed. vol.2. New York: Cold Spring Harbor.
- SANTOS, S.; RORATTO, P. A.; BITENCOURT, J. V. T. & BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. 2007. Genetic differentiation of *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura) populations isolated by a geographic barrier. Em preparação.

STEVEN, C. R.; HILL, J; MASTERS, B. & PLACE, A. R. 2005. Genetic markers in blue crabs (*Callinectes sapidus*) I: Isolation and characterization of microsatellite markers. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** **319**: 3-14.

TODD, C. D.; WARKER, A. M.; WOLFF, K.; NORTHCOTT, S. J.; WALKER, A. F.; RITCHIE, M. G.; HOSKINS, R.; ABBOTT, R. J. & HAZON, N. 1997. Genetic differentiation of populations of the copepod sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) ectoparasitic on wild and farmed salmonids around the coasts of Scotland: Evidence from RAPD markers. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, **210**: 251-274.

TÜRKAY, M. 1972. Neue Hohlendekapoden aus Brasilien (Crustacea). **Revue Suisse de Zoologie**, **79**(1): 415 – 418.

VAZ, J. F. 1989. Distribuição e dispersão de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata). **Ciência e Cultura**, **41** (1): 14 – 27.

VERNE, S.; PUIILLANDRE, N.; BRUNET, G.; GOUIN, N.; SAMOLLOU, P. B.; ANDERSON, J. D. & GRANDJEAN, F. 2006. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. **Molecular Ecology Notes** **6**, 328-330.

WATTIER, R. A.; BEGUET, J.; GAILLARD, M.; MÜLLER, J. C.; BOLLACHE, L. & PERROT-MINNOT, M.-J. 2006. Molecular markers for systematic identification and population genetics of the invasive Ponto-Caspian freshwater gammarid *Dikerogammarus villosus* (Crustacea, Amphipoda) **Molecular Ecology Notes** **6**, 487-489.

WILKING, D. J.; KOPRIVNIKAR, K. E. & COHN, D. H. 1993. Heteroduplex analysis can increase the information of PCR-amplified VNTR markers: applications using a marker tightly to the COL2A1 gene. **Genomics** **15**: 372-375.

WUTHISUTHIMETHAVEE, S.; LUMUBOL, P.; VANAVICHIT, A. & TRAGOONRUNG, S. 2003. Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). **Aquaculture** **224**: 39-50.

XU, Z.; PRIMAVERA, J. H.; DE LA PENA, L. D.; PETTIT, P.; BELAK, J. & ALCIVAR-WARREN, A. 2001. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines using microsatellites. **Aquaculture**, **199**: 13–40.

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