

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

**EFEITO DA SIMPATRIA SOBRE A DIVERSIDADE
GENÉTICA DE *Aegla platensis* (CRUSTACEA,
DECAPODA)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jobber Vanderlei de Vargas Machado

Santa Maria, RS, Brasil. 2012

**EFEITO DA SIMPATRIA SOBRE A DIVERSIDADE
GENÉTICA DE *Aegla platensis* (CRUSTACEA, DECAPODA)**

por

Jobber Vanderlei de Vargas Machado

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Sistemática e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial da obtenção do grau de

**Mestre em Ciências Biológicas
Área Biodiversidade Animal**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Machado, Jober Vanderlei de Vargas
EFEITO DA SIMPATRIA SOBRE A DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Aegla platensis (CRUSTACEA, DECAPODA) / Jober Vanderlei
de Vargas Machado.-2012.
73 p.; 30cm

Orientadora: Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos
Coorientador: Sandro Santos
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2012

1. Aegla 2. Genética de Populações 3. AFLP 4. DNA
Barcoding 5. Estruturação Populacional I. Bartholomei-
Santos, Marlise Ladvocat II. Santos, Sandro III. Título.

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

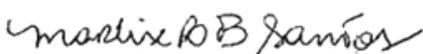
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

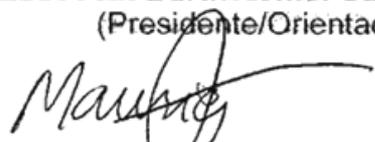
**EFEITO DA SIMPATRIA SOBRE A DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Aegla platensis (CRUSTACEA, DECAPODA)**

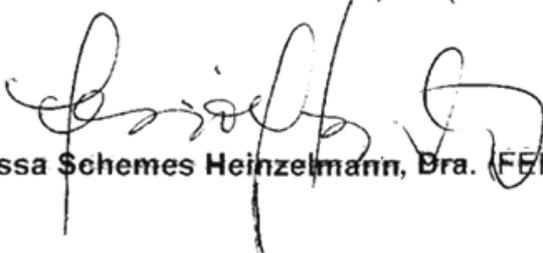
elaborada por
Jobber Vanderlei de Vargas Machado

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas - Área Biodiversidade Animal

COMISSÃO EXAMINADORA:


Marlise Ladvoat Bartholomei-Santos, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Mauricio Pereira Almerão, Dr. (UFRGS)


Larissa Schemes Heinzelmänn, Dra. (FEEVALE)

Santa Maria, 29 de fevereiro de 2012.

***Dedico este trabalho a
memória de minha avó
Maria Ieda de Vargas.
Nem as maiores conquistas
irão suprir tua perda Vó.***

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas fizeram parte da caminhada durante esses dois anos de mestrado, cada uma auxiliando como pode para o desenvolvimento dessa dissertação. Espero nessa seção fazer o devido agradecimento a todos:

Agradeço em especial a minha orientadora **Dra Marlise Ladvocat Bartholomei Santos**, por aceitar ser minha orientadora, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos proporcionados durante o mestrado e por todo apoio durante o desenvolvimento desse trabalho. Ao Meu Co-orientador **Dr. Sandro Santos** por toda a ajuda durante o trabalho, principalmente com os pontos de coleta e identificação dos indivíduos.

A **CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de mestrado concedida.

Aos colegas do laboratório de Diversidade Genética da UFSM (DiverGe): **Caroline, Vanessa, Rafaele, Thaís, Johnny e Cíntia**, pela ajuda nos procedimentos de bancada (Extrações de DNA, PCRs, Géis, preparo de soluções...), gargalhadas, almoços no RU, discussões dos seminários, conversas, e principalmente por não esquentarem a cabeça com as minhas piadas.

Aos **professores** do PPG em Biodiversidade Animal por todo o ensinamento proporcionado e aos **colegas do curso** que dividiram comigo está fonte de aprendizado me auxiliando e trocando conhecimentos durante o período das disciplinas.

A minha mãe **Isabel** por todo o apoio que recebi durante toda minha vida, pelos valores que me ensinou, por muitas vezes exercer o papel de pai e por conseguir suportar todas as dificuldades que surgiram por mim e por meu irmão. A meu irmão **Jordan**, por estar sempre a meu lado, por me ensinar o primeiro significado que conheci da palavra responsabilidade e por sempre aceitar ouvir meus conselhos. A meu padrasto **Tibiriçá** por todo apoio que recebi em todas as oportunidades que surgiram e por me auxiliar nas coletas durante o desenvolvimento deste estudo. Aos meus avós **Ieda** (em memória) e **Almiro** por terem cuidado de mim e de meu irmão sempre dando muito carinho para nós e nos ensinamentos os valores de uma pessoa responsável e ética.

Aos amigos **André, Diego, Guilherme**, por me proporcionarem várias risadas ao ir para casa e também dividir comigo a carreira de músico de final de semana. Aos amigos **Felipe, Pedro e Marcelo** que compartilharam comigo a jornada durante a graduação, não estando ausentes no mestrado, me proporcionando várias risadas e conselhos. Ao amigo **Carlos** pela ajuda durante as coletas do mestrado.

A minha noiva **Daniela** por aceitar que pudéssemos ficar longe durante esses dois anos, por sempre me dar apoio, acreditar em mim e apesar da distância sempre estar ao meu lado. Acredito que todo o tempo que passamos separados será uma vaga lembrança um dia.

Por último a **Deus** por sempre me proporcionar forças para lutar pelos meus objetivos e pela força adicional para superar as barreiras que foram impostas durante o decorrer dessa trajetória.

Agradeço a todos por fazerem parte de minha vida e me auxiliarem no desenvolvimento desse trabalho.

**“Não é o mais forte que sobrevive,
nem o mais inteligente,
mas o que melhor se adapta às mudanças.”**

Charles Robert Darwin

RESUMO

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

EFEITO DA SIMPATRIA SOBRE A DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Aegla platensis* (CRUSTACEA, DECAPODA)

AUTOR: JOBER VANDERLEI DE VARGAS MACHADO
ORIENTADORA: MARLISE LADVOCAT BARTHOLOMEI-SANTOS
Data e Local de Defesa: Santa Maria, 29 de fevereiro de 2012.

Simpatria é caracterizada pela existência de duas ou mais espécies filogeneticamente próximas ocupando um mesmo nicho ecológico. Este evento já foi registrado em espécies de caranguejos do gênero *Aegla* no Brasil, sendo estes registros realizados apenas entre duas espécies e utilizando para isto, apenas características morfológicas. Para *Aegla*, assim como na maioria dos crustáceos, existem poucos estudos destinados a avaliar se há alguma relação entre a simpatria e a diversidade genética das populações que vivem em tal associação. Neste estudo, além de ser apresentado mais um registro de simpatria entre duas espécies de eglídeos para o Brasil, sendo estas *Aegla platensis* e *Aegla spinipalma* ocorrendo no Rio Batú, também é apresentada ocorrência de simpatria entre três espécies, sendo estas *A. platensis*, *Aegla* sp. (em preparação) e *Aegla grisella* ocorrendo no Rio Cambará. Para verificar a existência de simpatria nos pontos de amostragem, além das características morfológicas utilizadas para a identificação dos indivíduos, foi realizada a técnica de DNA *Barcoding* com um fragmento de 207 pb do gene COI, amplificado em 22 indivíduos e a partir dessas sequências foram obtidos os valores de distâncias interespecífica, intra e interpopulacional através do modelo de distância *p*. A constatação da existência de simpatria entre duas espécies no Rio Batú foi verificada tanto pelos dados morfológicos quanto para os dados moleculares, porém para as espécies do rio Cambará os dados mitocondriais não foram totalmente congruentes com os morfológicos, pois algumas sequências de *A. grisella* agruparam com sequências de indivíduos de outras espécies e apresentaram baixos valores de distância interespecífica. Entretanto, estas sequências provavelmente são pseudo-genes nucleares e quando retiradas das análises permitiram a identificação de três espécies simpátricas no Rio Cambará. A fim de avaliar se existe alguma relação entre a simpatria e a diversidade genética de *A. platensis* foram utilizadas duas populações simpátricas desta espécie (Rios Cambará e Batú) e uma população alopátrica, oriunda do Rio Fiúza. A técnica de AFLP foi utilizada em 120 indivíduos (20 de cada população), onde constatou-se a existência de uma alta variabilidade genética em todas as populações, não tendo sido encontrada relação entre a simpatria e o nível de diversidade genética em *A. platensis*. Uma alta estruturação genética observada entre as populações, que provavelmente está associada à distância entre elas e à baixa capacidade de dispersão dos eglídeos. Os resultados do marcador mitocondrial COI e do marcador nuclear AFLP apresentaram algumas incongruências, quando comparados, visto que usando AFLP todas as populações de *A. platensis* e das demais espécies foram separadas por meio de análise Bayesiana e UPGMA, o mesmo não ocorrendo para o COI. A incongruência entre os dados nucleares e mitocondriais reforça a ideia de que algumas sequências de *A. grisella* são na verdade pseudo-genes nucleares co-

amplificados com o gene COI, devido à utilização de *primers* universais degenerados na PCR.

Palavras chaves: DNA *Barcoding*; Genética de Populações; Distância p ; AFLP; *Fst*; AMOVA; Estruturação Populacional.

ABSTRACT

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

EFFECT OF SYMPATRY ON THE GENETIC DIVERSITY OF *Aegla platensis* (CRUSTACEA, DECAPODA)

AUTHOR: JOBER VANDERLEI DE VARGAS MACHADO
ADVISOR: MARLISE LADVOCAT BARTHOLOMEI-SANTOS

Sympatry is characterized by the existence of two or more species phylogenetically related occupying the same ecological niche. This event has already been recorded in species of crabs of the genus *Aegla* in Brazil between two species, and through morphological characteristics only. For *Aegla*, as in most crustaceans, there are few studies to verify if there is any relationship between sympatry and genetic diversity of populations living in this association. In the present study, besides a new record of sympatry between two species of *Aegla* for Brazil, *Aegla platensis* and *Aegla spinipalma*, occurring in Batú River, the occurrence of sympatry among three species, *A. platensis*, *Aegla* sp. (in preparation) and *Aegla grisella*, living in Cambará River, is also presented. To verify the existence of sympatry at the sampling points, besides the morphological characteristics used for the identification of individuals, the technique of DNA-Barcoding was applied using a fragment of 207 bp of the gene COI amplified in 22 individuals and from these sequences interspecific, intra- and interpopulation p-distance values were obtained. Sympatry between two species in Batú River was verified by both morphological and molecular data. For the species living in Cambará River mitochondrial and morphological data were not completely congruent, because some sequences of *A. grisella* clustered with individuals of other species, presenting low values of interspecific distance. However, these sequences probably are nuclear pseudogenes and when they were removed from the analysis, three species were identified in Cambará River. To verify if there is any relationship between sympatry and genetic diversity of *A. platensis*, two populations living in sympatry (Cambará and Batú rivers) and one allopatric population from Fiuza River were used. The technique of AFLP was applied to 120 individuals (20 from each population) revealing a high genetic variability for all populations and no relationship between sympatry and level of genetic diversity was found in *A. platensis*. A high population structuring was observed among populations, which is probably due to the distance among populations and to the low dispersion capability in aeglids. Results from the COI mitochondrial data and from the AFLP nuclear data presented some incongruence when compared, since using AFLP all the *A. platensis* populations and also the other species were separated through Bayesian analysis and UPGMA, but the same was not found for COI data. The incongruence between mitochondrial and nuclear data reinforces the idea that some *A. grisella* sequences are in fact nuclear pseudogenes co-amplified in PCR, due to the utilization of degenerated universal primers.

Keywords: DNA Barcoding, Population Genetics; p-Distance; AFLP; *Fst*; AMOVA; Population Structure.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2. OBJETIVOS..... | 23 |
| 3. REFERÊNCIAS..... | 24 |
| 4. CAPÍTULO 1 – Novos registros de simpatria entre caranguejos do gênero <i>Aegla</i> (Crustacea: Decapoda) para o Brasil..... | 32 |
| Resumo..... | 34 |
| Introdução..... | 34 |
| Material e métodos..... | 36 |
| Resultados..... | 39 |
| Discussão..... | 43 |
| Conclusão..... | 46 |
| Referências..... | 47 |
| 5. CAPÍTULO 2 – Avaliação do efeito da simpatria sobre a diversidade genética em crustáceos, utilizando como modelo <i>Aegla platensis</i> (Decapoda: Anomura)..... | 52 |
| Resumo..... | 54 |
| Introdução..... | 54 |
| Material e métodos..... | 56 |
| Resultados..... | 61 |
| Discussão..... | 64 |
| Conclusão..... | 67 |
| Referências..... | 67 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 72 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistemática e evolução da família Aeglidae

A família Aeglidae atualmente está classificada dentro da superfamília Aegloidea e possui um único gênero, chamado de *Aegla*. Até pouco tempo, a família Aeglidae era classificada dentro da superfamília Galattheoidea juntamente com Galatheidae, Chirostylidae e Porcellanidae. Entretanto, muitos autores observaram vários caracteres taxonômicos que suportavam a separação de Aeglidae em uma nova superfamília. Pérez-Losada et al. (2002a) concluíram, com base em marcadores moleculares, que a família Aeglidae é um grupo à parte dentro dos Galattheoidea, destacando como caracteres taxonômicos a eclosão de ovos (pós-larval em eglídeos e na fase de zoea nos demais), pléopodos (vestigiais em machos de Aeglidae e bem desenvolvidos nos demais), estrutura das brânquias (tricobrânquias em Aeglidae, filobrânquias nos demais), ausência de linha anomúrica, a qual é bastante evidente nos outros galateídeos, presença de linhas calcificadas em *Aegla*, que dividem a carapaça em regiões discretas, e a estrutura dos espermatozoides (MARTIN & ABELE, 1988). Ao excluírem membros da família Aeglidae das análises, Pérez-Losada et al. (2002a) verificaram que os demais membros da superfamília Galattheoidea formam um grupo monofilético, tendo Porcellanidae e Chirostylidae entre seus grupos irmãos. Porém, foram McLaughlin; Lemaitre & Sorhannus (2007) que propuseram classificar a família Aeglidae dentro de uma superfamília própria, que foi denominada Aegloidea.

A estrutura taxonômica da Família Aeglidae segundo McLaughlin; Lemaitre & Sorhannus (2007) é a seguinte:

Subfilo: Crustacea

Classe: Malacostraca

Ordem: Decapoda

Infra-Ordem: Anomura

Super-Família: Aegloidea

Família: Aeglidae

Atualmente existem cerca de 70 espécies descritas de eglídeos (MCLAUGHLIN et al., 2010), todas pertencentes ao gênero *Aegla*. A família Aeglidae também possui duas espécies já extintas encontradas em rochas de origem marinha do Cretáceo: *Haumuriaegla glaessneri* Feldmann, 1984 proveniente da Nova Zelândia e *Protaegla miniscula* Feldmann et al., 1998 encontrada em Tapexi, México (FELDMANN, 1984 e FELDMANN et al., 1998).

Análises de padrões morfológicos e biométricos (SCHMITT, 1942; RINGUELET, 1949) e o estudo biogeográfico realizado por Morrone & Lopretto (1994) indicaram uma origem atlântica desses organismos. Porém, padrões de dispersão (ORTMANN, 1902), registros fósseis (FELDMANN, 1984; FELDMANN et al., 1998) e uma análise filogenética baseada em sequências de genes mitocondriais (PERÉZ-LOSADA et al., 2002a) atribuem a origem pacífica (ocidental) aos eglídeos, com posterior dispersão para o oriente, sendo esta hipótese a mais aceita na atualidade.

Pérez-Losada et al. (2004) analisaram a história evolutiva dos eglídeos utilizando metodologias-padrão de filogenética molecular, considerando o maior número possível de espécies e subespécies (58 das 63 espécies aceitas até então, além de seis novas espécies), e constataram que estes organismos surgiram há aproximadamente 75 milhões de anos, originários das regiões pacíficas, migrando para a região central e leste da América do Sul anteriormente a uma regressão marinha ocorrida antes da formação do mar do Paraná e do final do surgimento da Serra do Mar.

Os eglídeos são os únicos organismos pertencentes à Infra-ordem Anomura que vivem em águas continentais. São encontrados apenas no sul da América do Sul em lagos, arroios, rios de correnteza e de cavernas do Brasil, Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia e Chile, geralmente ocultos sob pedras e detritos vegetais. Podem ser encontrados desde 320 m de profundidade em lagos chilenos, até 4500 m de altitude na cordilheira dos Andes, geralmente em águas límpidas e bem oxigenadas (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994; BOND-BUCKUP; BUCKUP & ARAÚJO, 2003). Possuem hábitos bentônicos, sendo encontrados sob detritos vegetais ou enterrados no substrato arenoso, com sua dieta consistindo de detritos vegetais e larvas aquáticas de insetos (MAGNI & PY-DANIEL, 1989; BOND-BUCKUP, 2003; BUENO & BOND-BUCKUP, 2004). Esses organismos apresentam grande importância nas relações tróficas dos ambientes límnicos servindo de

alimento para rãs, peixes, aves (ARENAS, 1976), jacarés (BUENO & BOND-BUCKUP, 2004) e lontras (CASSINI et al., 2009).

1.2 O Gênero *Aegla*

1.2.1 Situação atual do Gênero *Aegla*

Caranguejos do gênero *Aegla* são encontrados nas principais bacias da América do Sul, ocupando praticamente todos os tipos de habitats naturais de água doce (PÉREZ-LOSADA et al., 2009). Estes organismos apresentam uma maior sensibilidade às características ambientais do que outros decápodos de água doce, por exemplo, caranguejos do gênero *Trichodactylus* (DALOSTO & SANTOS 2011). Atualmente, observa-se que as populações de eglídeos estão cada vez mais restritas às nascentes dos rios, refletindo o fato de estes organismos serem muito exigentes quanto à qualidade da água e aos níveis de oxigênio (BOND-BUCKUP et al., 2008, DALOSTO & SANTOS 2011). Esta restrição às nascentes pode estar interferindo na estruturação genética das populações (diferenciação das frequências alélicas e genotípicas entre as populações).

Muitas espécies de eglídeos encontram-se ameaçadas e classificadas na categoria de criticamente em perigo, perigo, ou vulnerável (MARQUES et al., 2002; PÉREZ-LOSADA et al., 2009). Entre os principais fatores que ameaçam a conservação do grupo estão: a silvicultura de *Pinus* e eucalipto; uso de pesticidas na agricultura e a eliminação direta de dejetos da suinocultura nos rios (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994; BOND-BUCKUP et al., 2008). No Brasil, ainda não se tem tanto conhecimento sobre a conservação das espécies existentes, porém segundo Jara (1996 apud PÉREZ-LOSADA et al., 2002b) e Bahamond et al. (1998), as 19 espécies e subespécies do gênero *Aegla* endêmicas do Chile, têm sofrido redução progressiva em suas populações devido à degradação ambiental nos últimos 25 anos. Avaliando o grau de conservação das espécies chilenas, Pérez-Losada (2002b) confirmaram a extinção de *Aegla conceptionensis* e *Aegla expansa* de acordo com os parâmetros da Lista Vermelha de 2001 da IUCN (*Union for Conservation of Nature*), sendo classificadas na categoria de “extinta na natureza”. Os autores também classificaram quanto aos parâmetros da IUCN outras três

espécies na categoria “criticamente em perigo”, além de seis espécies como vulneráveis, associando a esta categorização os diferentes níveis de ameaça, principalmente a ação antrópica. Atualmente no Brasil existem pelo menos quatro espécies de eglídeos endêmicas do Rio Grande do Sul (*Aegla grisella*, *Aegla inermis*, *Aegla obstipa* e *Aegla violacea*) incluídas no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção na categoria de espécies vulneráveis (BOND-BUCKUP; BUCKUP & ARAÚJO, 2003). Além destas, existem duas espécies recentemente descritas e consideradas como ameaçadas, *Aegla manuinflata* (SANTOS et al. 2009) e *Aegla renana* (SANTOS et al 2010).

1.2.2 Características gerais

A família Aeglidae é caracterizada por possuir carapaça achatada dorsoventralmente, mais larga na região posterior, percorrida transversalmente por um sulco cervical distinto; região torácica subdividida em uma área cardíaca axial e áreas branquiais subdivididas por uma ou mais linhas transversais e/ou longitudinais; rostro proeminente, geralmente carenado, estendendo-se além do nível dos espinhos ântero-laterais; margem interna do carpo do quelípedo ornada com espinhos. As principais características do gênero *Aegla* são: o corpo dorsoventralmente deprimido, rostro simples, superfície dorsal da carapaça marcada por um complexo arranjo de suturas. Primeiro pereiópodo quelado; segundo, terceiro e quarto pereiópodos simples, não quelados; quinto pereiópodo atrofiado, menor do que os quatro anteriores e abrigando-se sob o abdômen; pléopodos do macho fortemente reduzidos; segmentos basais dos urópodos pelos menos a metade tão longos quanto os ramos laterais; telso inteiro ou com uma sutura mediana longitudinal e brânquias do tipo tricobrânquia (BUCKUP & BOND-BUCKUP, 1999).

Os animais adultos chegam a medir até 60 mm de comprimento de carapaça. A coloração varia de acordo com o substrato em que vivem, geralmente de marrom esverdeado a preto. No entanto, podem ser encontrados espécimes de cor azul, amarelo, laranja e vermelho (JARA, 1989). São organismos dióicos; nos machos os pleópodos são vestigiais e o poro genital se abre na coxa do quinto par de pereiópodos enquanto que nas fêmeas o poro genital se abre na coxa do terceiro pereiópodo (MARTIN & ABELE, 1988). Swiech- Ayoub & Masunari (2001) relatam

que geralmente os machos alcançam tamanhos maiores que as fêmeas, pois estes direcionam suas energias principalmente para o crescimento somático, enquanto as fêmeas gastam grande parte de sua energia nos processos reprodutivos, tais como: maturação de gônadas, desenvolvimento dos ovos, cuidado parental, entre outros. Segundo Trevisan (2008), o tamanho maior em machos de *Aegla manuinflata* provavelmente está associado a sua maior longevidade (3 anos para os machos e 2,5 anos para as fêmeas), uma vez que, vivendo mais tempo, eles devem passar por mais mudas, alcançando tamanhos maiores do que as fêmeas.

A fecundidade dos eglídeos depende do tamanho das fêmeas, variando a quantidade de postura entre 120 (BAHAMONDE & LOPEZ, 1961) e 1043 ovos, que medem aproximadamente entre 1,00 mm a 1,37 mm (JARA, 1977). A desova pode ocorrer durante todo o ano, sendo mais comum no outono (BAHAMONDE & LOPEZ, 1961; RODRIGUES & HEBLING, 1978; BUENO & BOND-BUCKUP, 2000). As fêmeas produzem uma ninhada por ano, sendo que o fim do período de incubação dos ovos varia entre o quarto e oitavo mês (BOND-BUCKUP et al., 2008). Os indivíduos apresentam desenvolvimento direto e nascem com cerca de 1,13 mm a 1,58 mm CL (comprimento da carapaça) dependendo da espécie (BUCKUP & BOND-BUCKUP, 1999). Os juvenis possuem incubação assíncrona e permanecem com a mãe até o terceiro ou quarto dia de vida. Após esta fase é observado um comportamento gregário, em que grupos de três a sete juvenis se agarram uns aos outros pelos pereiópodos (GRECO et al., 2004).

1.2.4 Simpatria

A simpatria pode ser conceituada como a ocorrência de duas ou mais populações em uma mesma área; mais precisamente, a existência de uma população em condição de reprodução dentro da área de movimento de indivíduos de uma outra população (MAYR, 1977).

Pode-se inferir que havendo simpatria, a competição causa maior divergência quando duas espécies ecologicamente semelhantes estão juntas do que nas partes não sobrepostas de seu território (RICKLEFS, 2003). Espécies simpátricas frequentemente diferem em características morfológicas e tais diferenças têm sido, geralmente, interpretadas no sentido de que as espécies

evoluíram para reduzir a competição interespecífica. Se, de fato, espécies coexistentes diferem na utilização de recursos mais do que ao acaso, a diferença pode ser atribuível a fatores ecológicos e/ou evolutivos. Assim, diferenças de nicho podem evoluir em resposta à competição interespecífica (FUTUYMA, 1998).

O conhecimento das relações tróficas entre espécies possibilita uma melhor compreensão dos mecanismos que permitem que espécies proximamente relacionadas explorem o mesmo nicho (ROSAS et al. 1994). Estudos sobre a largura e sobreposição de nicho trófico são importantes, pois podem avaliar se há a existência de competição entre as espécies (COLWELL & FUTUYMA, 1971). No entanto, outros mecanismos de isolamento podem ter função relevante na separação das espécies dentro do mesmo habitat, sendo esses mecanismos visuais e químicos, tais como: olfativos ou táteis (MAYER, 1977). Os poucos estudos destinados a avaliar as relações entre espécies simpátricas de eglídeos são relacionados principalmente a diferenciação de nicho trófico (CASTRO & BOND-BUCKUP, 2004; BOSS Jr., 2003). Para *Aegla*, assim como na maioria dos organismos, há uma carência de estudos destinados a avaliar se há relação entre a simpatria e os níveis de diversidade genética dos indivíduos que vivem em tal associação. Devido ao fato desses organismos habitarem apenas ecossistemas de água doce e apresentarem capacidade limitada de dispersão, podem ser considerados ótimos modelos para estudos destinados a comparar a diversidade genética das populações simpátricas.

O fenômeno de simpatria em eglídeos foi observado por outros autores, destacando Buckup & Rossi (1977) que verificaram a existência de *Aegla leptodactyla* e *Aegla camargoi* no Rio Divisa e no Rio Silveiras, ambos localizados em Bom Jesus (RS). Bond-Buckup & Buckup (1994) amostraram indivíduos de *A. platensis* e *Aegla itacolomiensis* no Rio Gravataí, em Taquara (RS), sendo que os autores também observaram a simpatria entre *Aegla spinosa* e *Aegla jarai* em Bom Retiro do Sul, Santa Catarina (SC). Estes autores destacam que a simpatria entre *Aegla spinipalma* e *Aegla longirostri* é comum em vários locais do Rio Grande do Sul. Boss Jr. (2003) realizou coletas em rios pertencentes à bacia do Rio Itajaí-Açu, localizado no Parque Natural Municipal das Nascentes do Ribeirão Gargia, Blumenau (SC) e observou simpatria entre *A. jarai* e *Aegla muelleri*. Machado (2009) observou a existência de simpatria entre as espécies *Aegla platensis*, *Aegla* sp. (em preparação) e *Aegla grisella*, ocorrentes no rio Cambará, Cruz Alta (RS).

Machado (2009) realizou coletas mensais ao longo de um ano no Rio Cambará, amostrando um total de 1535 indivíduos. Nesse trabalho foi possível verificar proporções diferenciais de ocorrência para o mesmo local entre as espécies, sendo que foi amostrado para *A. platensis* 782 indivíduos, *Aegla* sp. (em preparação) 559 indivíduos e *A. grisella* 194 indivíduos. Estes dados são similares aos relatados por Bond-Buckup & Buckup (1994), pois ambos observaram que a espécie *A. platensis* ocorre em maior proporção, porém ressaltando que a simpatria observada por Bond-Buckup & Buckup (1994) ocorre entre duas espécies e a simpatria descrita por Machado (2009) ocorre entre três espécies.

Baseado nestes dados assume-se que a simpatria parece ser um fenômeno comum entre algumas espécies de *Aegla*, no RS. Contudo, os mesmos evidenciam a ocorrência mais comum entre duas espécies, com exceção do trabalho de Machado (2009). No Chile, simpatria entre três ou até mais espécies foram relatadas em uma frequência maior (PÉREZ-LOSADA et al., 2002a).

1.2.5 *Aegla platensis* (SCHMITT, 1942) utilizada como modelo para estudos de Decápodos de água doce

A espécie *Aegla platensis* (Figura 1) possui uma ampla distribuição (MORRONE & LOPRETTO, 1994), sendo encontrada na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994). É encontrada principalmente em cursos de água lóticos, embaixo de pedras e da serrapilheira (BOND-BUCKUP, 2003). Quanto a sua dieta, esta espécie é considerada onívora, generalista e oportunista, pois se alimenta de acordo com a disponibilidade de recursos no ambiente, apresentando uma tendência ao forrageamento noturno (BUENO & BOND-BUCKUP, 2003). Os juvenis apresentam hábitos alimentares diferentes dos adultos, sendo a dieta composta principalmente por fragmentos de plantas (BUENO & BOND-BUCKUP, 2004).

Devido ao fato de *A. platensis* possuir ampla distribuição e aspectos biológicos, ecológicos, morfológicos e comportamentais bem estudados, essa espécie torna-se um bom modelo experimental (BUENO et al., 2000; BUENO & BOND-BUCKUP, 2000; BUENO & BOND-BUCKUP, 2004; ALMEIRÃO et al., 2007;

ALMEIRÃO et al., 2010) principalmente para estudos destinados a avaliar a simpatria em caranguejos do gênero *Aegla*.

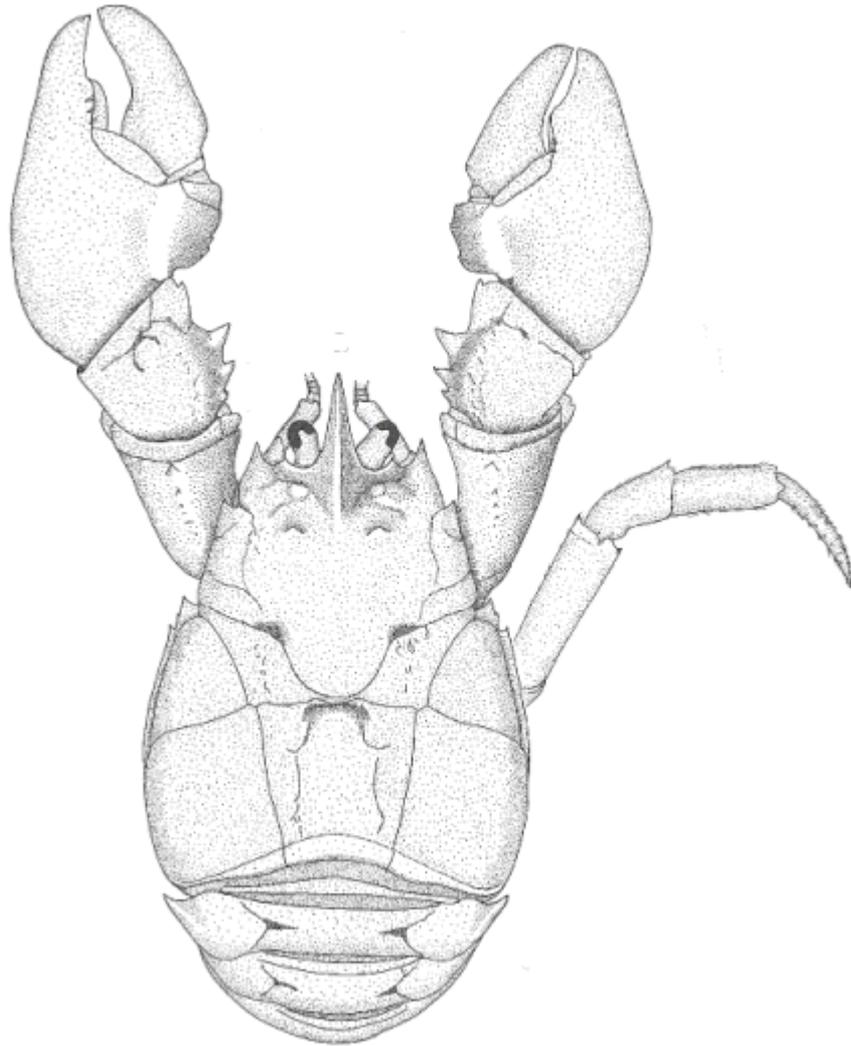


Figura 1: Representação de *Aegla platensis* (BOND-BUCKUP, 2003).

1.3 Marcadores moleculares

O componente genético da biodiversidade é fundamental, pois é a variação genética que fornece o material básico para a seleção natural e, portanto, para a evolução de todas as espécies (ALLCOCK et al., 1995). A variabilidade genética, também chamada de diversidade molecular, além de importante para a evolução, pode ser usada como instrumento de investigação por ecólogos e sistematas em diversos campos como, por exemplo, para verificar as afinidades e os limites entre

as espécies, para detectar modos de reprodução e estrutura familiar, para estimar níveis de migração e dispersão nas populações (AVISE, 2004). A forma de analisar os fenômenos genéticos que ocorrem no nível populacional passou por grandes modificações nas últimas duas décadas. Após o período clássico da genética populacional, o qual contemplou o surgimento de ferramentas teóricas para análises genético-populacionais, o desenvolvimento dos marcadores moleculares marcou um novo período e representou uma revolução para a genética de populações. Os marcadores moleculares são segmentos de genes que apresentam diferentes graus de variação e são escolhidos de acordo com o problema a ser estudado (AVISE, 2004; SILVA & RUSSO, 2000).

Marcadores moleculares diferentes podem ter taxas de substituição/evolução diferentes, permitindo o estudo desde problemas de identificação de indivíduos à identificação de espécies crípticas, ou formulação de hipóteses filogenéticas em grupos supra-específicos (MATIOLI, 2001).

Aeglidae é uma excelente família candidata a estudos moleculares por aspectos ecológicos, sistemáticos e biogeográficos exclusivos que instigam os pesquisadores e exigem mais do que as análises morfológicas podem inferir, principalmente pela falta de compartilhamento de caracteres derivados em relação ao grande número de espécies existentes (PÉREZ-LOSADA et al., 2002a).

1.4 Técnica de DNA-*Barcoding*

Devido às limitações do sistema de classificação de espécies baseado em morfologia, houve a necessidade da exploração de um novo sistema de identificação que poderia auxiliar a classificação morfológica, baseado em pequenas sequências de DNA. A técnica de DNA-*Barcoding*, a qual utiliza fragmentos de DNA padronizados como “códigos de barra” (*barcodes*) específicos para cada espécie, baseia-se na premissa de que uma sequência padronizada curta pode distinguir indivíduos de uma espécie, uma vez que a variação genética entre espécies excede a variação dentro de uma espécie (HEBERT; RATNASINGHAM & DEWAARD, 2003).

A técnica de DNA-*Barcoding* inicialmente teve a proposta de ser utilizada para a identificação de espécimes desconhecidos (MILLER, 2007; STOECKLE &

HEBERT, 2008), complementando o conhecimento existente a cerca da classificação das espécies. *DNA-Barcoding* e a descrição de novas espécies podem ser vistas como ferramentas complementares, pois sequências de DNA fornecem caracteres que podem ser utilizados juntamente com os dados morfológicos para a identificação de novas espécies (DESALLE et al. 2005).

Para a finalidade da técnica de *DNA-Barcoding*, os marcadores mitocondriais apresentam-se mais vantajosos, pois estes não possuem íntrons, há a ausência de recombinação, possuem um grande número de cópias em todas as células, são haplóides e possuem herança exclusivamente materna. Um marcador muito utilizado nesta técnica é um fragmento do gene COI, com 650 pb. Outros genes mitocondriais têm sido utilizados para a identificação de espécies, sendo estes o 12S e o 16S, porém apresentam a desvantagem de apresentarem um grande número de indels, não sendo estes genes considerados ótimos para a técnica de *DNA-Barcoding* (BUCKLIN; STEINKE & BLANCO-BERCIAL, 2011).

Muitas espécies de invertebrados marinhos têm sido descritas usando *DNA Barcoding* (BUCKLIN; STEINKE & BLANCO-BERCIAL, 2011). A utilidade deste marcador em crustáceos foi avaliada por Costa et al. (2007) em um estudo com 150 espécies representando 23 ordens e concluíram que o marcador molecular COI apresenta melhores resultados para avaliar os relacionamentos interespecíficos do que intraespecíficos, confirmando o potencial do sistema de identificação de espécies por *DNA barcoding* nas espécies estudadas. Além disso, sabe-se que o COI apresenta valores de divergência mais variáveis do que outros genes mitocondriais, tais como o 12S e o 16S, sendo recomendado uso do COI para estudos que avaliam níveis taxonômicos inferiores (TOON et al., 2009). Segundo Folmer et al. (1994), o COI possui a vantagem da utilização de *primers* universais que permitem a amplificação da sua extremidade 5' na maioria dos filos animais.

Em crustáceos decápodos, esta técnica auxiliou na descrição de várias espécies, como por exemplo: Galateídeos do leste do Pacífico do gênero *Munidopsis* (JONES & MACPHERSON, 2007), caranguejos do gênero *Uca* no nordeste do oceano Índico (SHIH et al., 2009), caranguejo ermitão do gênero *Clibanarius* no arquipélago de Ryukyu no Japão (HIROSE et al., 2010).

1.6 Técnica de AFLP

A técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) é baseada em uma amplificação seletiva por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) de fragmentos gerados por clivagem enzimática a partir de DNA genômico. A técnica envolve três etapas: clivagem do DNA utilizando-se enzimas de restrição e ligação de um oligonucleotídeo adaptador; amplificação seletiva de conjuntos de fragmentos resultantes da etapa de clivagem e análise em géis, submetidos a um campo eletromagnético, dos fragmentos resultantes da amplificação (VOS et al., 1995). A figura 2 apresenta as principais etapas da técnica de AFLP. As análises dos fragmentos produzidos são realizadas através da presença e ausência de um determinado fragmento (banda no gel de eletroforese), sendo a presença do fragmento considerada dominante.

As vantagens do uso de AFLP estão associadas ao custo relativamente baixo, à rapidez, reprodutibilidade e à resolução, pois comparada com técnicas como RADP (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites, esta técnica apresenta desempenho parecido ou superior (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999).

Cinco anos antes da técnica de AFLP ser introduzida, o método de RADP descrito por Williams et al. (1990) era muito utilizado, pois esse método, assim como AFLP, observava apenas a dominância (presença ou ausência de uma banda). Esta técnica baseia-se na amplificação aleatória de regiões do DNA com pequenos *primers* compostos de aproximadamente dez nucleotídeos e posterior separação destes fragmentos por eletroforese (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999). A técnica primeiramente apresentou resultados muito satisfatórios, pois seu desenvolvimento era rápido e os resultados eram abundantes, no entanto, os mesmos dados não eram reproduzidos, tornando a técnica inviável (RIEDY et al. 1992; ELLSWORTH et al. 1993; AYLIFFE et al. 1994; PEREZ et al. 1998).

Devido às suas vantagens, os marcadores AFLP têm sido amplamente utilizados em estudos de sistemática, tipagem de patógenos, genética de populações, entre outros. Uma das principais aplicações da técnica de AFLP é para análises de variação genética intraespecífica (HAN & ELY, 2002; YUE et al., 2004; LIU et al., 2005), particularmente nas investigações da estrutura populacional e diferenciação entre populações. Os marcadores AFLP são também utilizados para

avaliar o fluxo e a dispersão gênica, exocruzamento, introgressão e casos de hibridização. Uma excelente revisão sobre AFLP pode ser encontrada em Mueller & Wolfenbarger (1999).

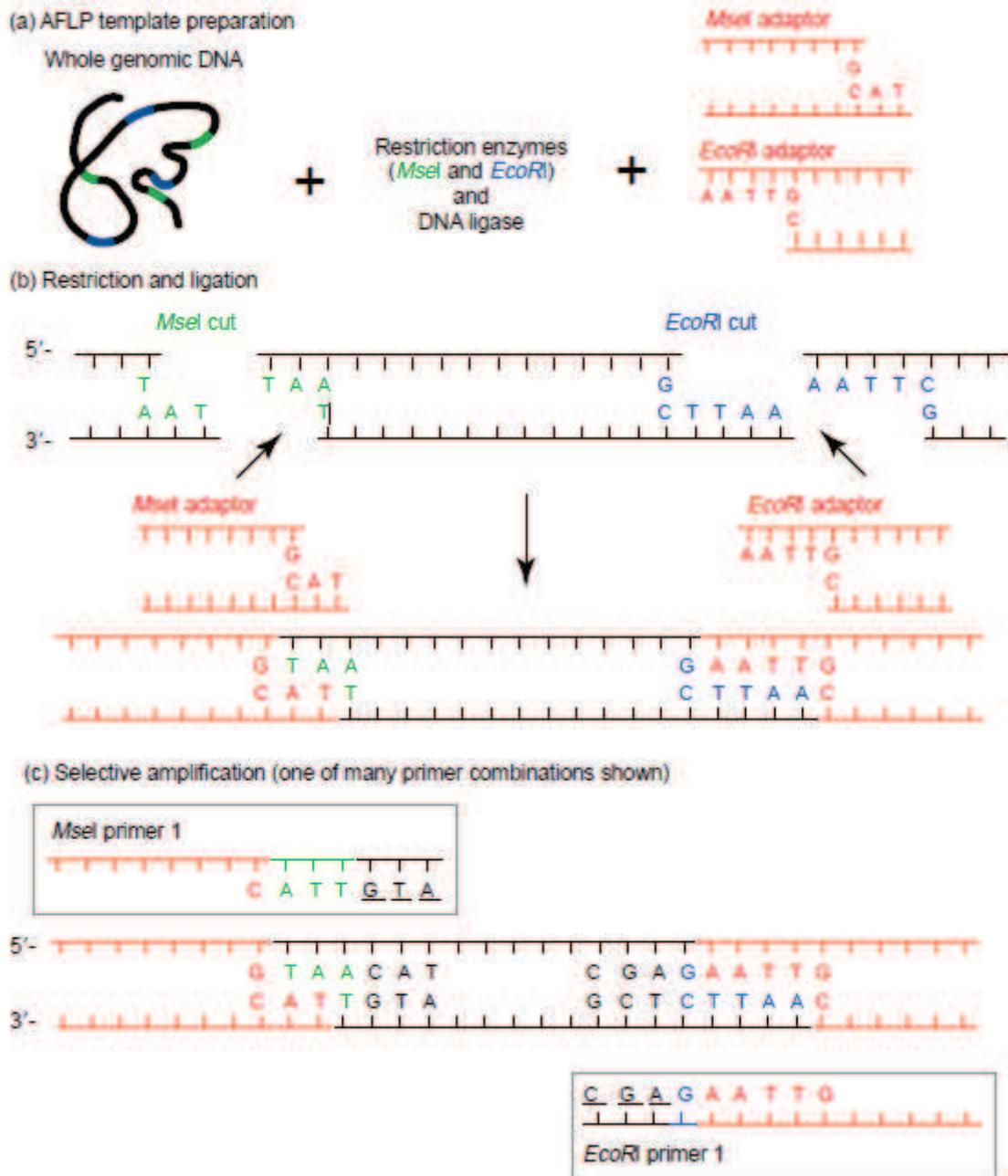


Figura 2: Principais etapas da técnica de AFLP (MILLER & WOLFENBARGER, 1999).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Verificar se há relação entre simpatria e níveis de diversidade genética na espécie *Aegla platensis*, através de marcadores moleculares.

2.2 Objetivos específicos

- Aplicar a técnica de *DNA Barcoding*, confirmando a existência de três espécies no Rio Cambará e duas espécies no Arroio Batú e avaliar as distâncias intraespecífica e interespecífica;
- Verificar se populações simpátricas de *Aegla platensis* possuem níveis de diversidade genética semelhantes ou diferentes em relação à uma população alopátrica;
- Comparar os níveis de diversidade genética entre as três populações de *A. platensis* e as demais espécies.

3. REFERÊNCIAS

ALMERÃO, M. P.; BOND-BUCKUP, G.; MENDONÇA Jr., M. de S. Mating Behavior of *Aegla platensis* (Crustacea, Anomura, Aeglidae) under Laboratory Conditions. **Journal of Ethology**, v. 28, p. 87-94, 2010.

ALMERÃO, M. P.; HEUSER-FACCIONE, M.C.; BOND-BUCKUP, G. An Ultrastructural Study of Tegumental Glands of the Fifth Pereiopods of *Aegla platensis* (Anomura: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 27, n. 4, p. 529-533, 2007.

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

ARENAS, R.L. La Cordillera de la Costa como Refugio de la Fauna Dulcícola Preglacial. **Archivos de Biología y Medicina Experimentales**, Santiago, Chile, v. 10, p. 1-40, 1976.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Sinauer Associates, New York. 2004. 684 p.

AYLIFFE, M.A. et al. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 1632-1636, 1994.

BAHAMONDE, N. & LOPEZ, M.T. Estudios biológicos en la población de *Aegla laevis laevis* (Latreille) de el Monte (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Investigaciones Zoológicas Chilenas**, Santiago, Chile, v. 7, p. 19-58, 1961.

BAHAMONDE, N. et al. Categorías de conservación de decápodos nativos de aguas continentales de Chile. **Boletín del Museo Nacional de Historia Natural**. v. 47, p. 91-100, 1998.

BOND-BUCKUP, G. & BUCKUP, L. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Archivos de Zoología**, São Paulo, SP, v. 2, p. 159-346, 1994.

BOND-BUCKUP, G. et al. Global Diversity of Crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in Freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 267-273, 2008.

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

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L.; ARAÚJO, P.B. Crustáceos. In. FONTANA, C.S.; BENCKE, G. A.; REIS, R. E. **Livro vermelho das espécies ameaçadas em extinção do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora EDIPUCRS, p. 73-83, 2003.

BOSS Jr., H. **Crustáceos límnicos e aspectos da biologia de *Aegla jarai* Bond-Buckup & Buckup e *Aegla* sp. (Decapoda, Aeglidae) no parque natural municipal das nascentes do Ribeirão Garcia, Blumenau, SC**, 2003, 81p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação Biologia Animal, UFRGS, 2003.

BUCKLIN, A.; STEINKE, D. & BLANCO-BERCIAL, L. DNA Barcoding of Marine Metazoa. **Annual Review of Marine Science**, v. 3, n. 1, p. 471-508, 2011.

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

BUCKUP, L. & ROSSI, A. O gênero *Aegla* no Rio Grande do Sul, Brasil (Crustácea, Decapoda, Anomura, Aeglidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 37, n. 4, p. 879-892, 1977.

BUENO, A. A. P. & BOND-BUCKUP, G. Estrutura da Comunidade de Invertebrados Bentônicos em Dois Cursos D'água da Bacia do Guaíba, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 1, p. 115-125, 2003.

BUENO, A. A. P. et al. Crescimento de *Aegla platensis* em Ambiente Natural (Crustacea, Decapoda, Aeglidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 1, p. 51-60, 2000.

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

BUENO, A.A.P. & BOND-BUCKUP, G. Natural diet of *Aegla platensis* Schmitt and *Aegla ligulata* Bond-Buckup (Crustacea, Decapoda, Anomura) from Brazil. **Acta Limnológica Brasileira**. v. 16, p.127-155, 2004.

CASSINI, M.H. et al. Scale-dependent analysis of an otter–crustacean system in Argentinean Patagonia. **Naturwissenschaften**, Southampton, United Kingdom, v. 96, p. 593-599, 2009.

CASTRO, T.S. & BOND-BUCKUP, G. O nicho trófico de duas espécies simpátricas de *Aegla* Leach (crustacea, Aeglidae) no tributário da bacia hidrográfica do Rio Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 4, p. 805-813, 2004.

COSTA, F.O. et al. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Canadian Journal Aquatic Science**, v. 64, p. 272-295, 2007.

COLWELL, R.K. & FUTUYMA, D.J. On the measurement of niche breadth and overlap. **Ecology**, v. 52, n. 4, p.567-576, 1971.

DALOSTO, M. M. & SANTOS, S. Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 160, p. 461-466, 2011.

DESALLE R. Conservation genetics – Genetics at the brink of extinction. **Heredity**, n. 94, p. 386 – 387, 2005.

ELLSWORTH, D.L. et al. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. **Biotechniques**, v. 14, p. 214–217, 1993.

FELDMANN, R.M. et al. Early Cretaceous arthropods from the Tlayúa Formation at Tapexi de Rodríguez, Puebla, México. **Journal of Paleontology**. v. 72, n. 1, p. 79-90, 1998.

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

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p.294-299, 1994.

FUTUYMA, D. **Biologia evolutiva**. Riberão Preto: Sociedade Brasileira de genética – SBG, 3 ed. 1998. 832 p.

GRECO, L. S. L. et al. Juvenile Hatching and Maternal Care in *Aegla uruguayana* (Anomura: Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 24, n. 2, p. 309-313, 2004.

HAN, K. & ELY, B. Use of AFLP analysis to assess genetic variation in Morone and Thunnus species. **Marine Biotechnology**, v. 4, p. 141–145, 2002.

HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, 270 Suppl, p. S96-99, 2003.

HIROSE, M.; OSAWA, M.; HIROSE, E. DNA barcoding of hermit crabs of genus *Clibanarius* Dana, 1852 (Anomura: Diogenidae) in the Ryukyu Islands, southwestern Japan. **Zootaxa**, p. 59–66, 2010.

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

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

JONES, W.J. & MACPHERSON, E. Molecular phylogeny of the East Pacific squat lobsters of the genus *Munidopsis* (Decapoda: Galatheidae) with the descriptions of seven new species. **Journal of Crustacean Biology**, v. 27, p. 477–501, 2007.

LIU, Y.G. Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers. **Biochemistry Systematic Ecology**, v. 33, p. 993–1005, 2005.

MACHADO, J.V.V. **Crescimento e distribuição de três espécies simpátricas de eglídeos ocorrentes no rio Cambará, Cruz Alta-RS**. 2009, 51p. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Ciências Biológicas, UNICRUZ, 2009.

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

MARQUES, A. A. B. et al. **Lista das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção no Rio Grande do Sul**. Decreto nº 41.672, de 11 de junho de 2002. Porto Alegre, FZB/MCT-PUCRS/PANGEA. 52p., 2002. (Publicações avulsas FZB, 11).

MARTIN, J. W. & ABELE L. G. External Morphology of the Genus *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aegliidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 453, p. 46, 1988.

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

MAYR, E. **Populações, espécies e evolução**. São Paulo, Companhia Editora Nacional, Editora da Universidade de São Paulo, série 3, v. 5, 1977, 485 p.

MCLAUGHLIN, P. A.; LEMAITRE, R.; CRANDALL, K. A. Annotated Checklist of Anomuram Decapod Crustacean of the World (Exclusive of the Kiwaoidea and Families Chirosttylidae and Galatheidae of the Galatheoidea) Part III – Aegloidea. **The Raffles Bulletin of Zoology**, v. 23, p. 131-137, 2010.

MCLAUGHLIN, P.A.; LEMAITRE, R.; SORHANNUS, U. Hermit crab phylogeny: a reappraisal and its “fall-out”. **Journal of Crustacean Biology**, v. 27, n. 1, p. 97-115, 2007.

MILLER, S.E. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. **P.N.A.S.**, n. 104, p. 4775 – 4776, 2007.

MORRONE, J.J. & LOPRETTO, E.C. Distributional patterns of freshwater Decapoda (Crustacea: Malacostraca) in southern South America: a panbiogeographical approach. **Journal of Biogeography**. v. 21, p. 97-109, 1994.

MUELLER, U.G. & WOLFENBARGER, L.R. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**, v. 14, n. 10, p. 389-394, 1999.

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

PEREZ, T. et al. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1347–1357, 1998.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Conservation Assesment of Southern South American Freshwater Ecoregions on the Basis of the Distribution an Genetic Diversity of Crabs from the Genus *Aegla*. **Conservation Biology**, 2009.

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

PÉREZ-LOSADA, M.; et al. Molecular Systematics and Biogeography of the Southern South America Freshwater “Crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) Using Multiple Heuristic Tree Search Approaches. **Systematic Biology**, Oxford, United Kingdom, v. 53, p. 767-780, 2004.

PÉREZ-LOSADA, M.; et al. Phylogenetic relationships among the species of *Aegla* (Anomura: Aeglida) fresh-water crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**. v. 22, n. 2, p.304-313, 2002a.

RICKLEFS, R.E. **A Economia da Natureza**. Rio de Janeiro-RJ : Guanabara Koogan, 5ed. 2003. 542 p.

RIEDY, M. F.,W.J. et al. Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 918–918, 1992.

RINGUELET, R. Los “cangrejos” Argentinos del Género *Aegla* de Cuyo y la Patagonia. **Rev. Mus. La Plata (N. S.), V, Secc. Zool**, v. 34, p. 297-349, 1949.

RODRIGUES, W.; HEBLING, N.J. Estudos biológicos em *Aegla perobae* Hebling e Rodrigues, 1977 (Decapoda, Anomura). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38 n. 2, p. 383-390, 1978.

ROSAS, C. et al. Feeding habitats and food niche segregation of *Callinectes sapidus*, *C. rathbunae* e *C. similis* in a subtropical coastal lagoon of the Gulf of Mexico. **Journal of Crustacean Biology**, v. 14, n. 2, p. 371-382, 1994.

SANTOS, S. et al. *Aegla manuinflata*, a new species of freshwater anomuran (Decapoda: Anomura: Aeglididae) from Brazil, determined by morphological and molecular characters. **Zootaxa**, Magnolia Press, v. 20, n. 88, p. 31-40, 2009.

SANTOS, S. et al. New records and description of a new species of Aeglididae (Crustacea: Anomura) from river basins in Southern Brazil. **Nauplius**, v. 18, n. 1, p. 79-86, 2010.

SCHMITT, W.L. The species of *Aegla*, endemic south American fresh-water crustaceans. **Proceedings of the United States National Museum**, v. 91, n. 31-32, p.431-524, 1942.

SHIH, H.T. ET AL. Genetic evidence for the recognition of two fiddler crabs, *Uca iranica* and *U. albimana* (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae), from the northwestern Indian Ocean, with notes on the *U. lactea* species-complex. **Hydrobiologia**, v. 635, p. 373-382, 2009.

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

STOECKLE M.Y. & HEBERT P.D.N. Barcode of Life: DNA Tags Help Classify Animals. **Scientific American**, n. 299, p. 82, 2008.

SWIECH-AYOUB, B.P.; MASUNARI, S. Biologia reprodutiva de *Aegla castro* Schmitt (Crustacea, Anomura, Aeglididae) no Buraco do Padre, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 3, p. 1019-1030, 2001.

TOON, A. et al. Decapod phylogenetics and molecular evolution. In MARTIN, J.W.; CRANDALL, K.A. & FELDER D.L. **Decapod crustacean phylogenetics**. CCR Press, Taylor & Francis group, Boca Raton, USA, p.15-29, 2009.

TREVISAN, A. **Biologia populacional de *Aegla sp.* (Crustacea, Decapoda, Aeglididae) no Arroio Passo da Taquara, São Pedro do Sul/RS**. 2008, 124p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, UFSM, 2008.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford university press, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531–6535, 1990.

YUE, G.H. et al. Monitoring the genetic diversity of three sian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites. **Aquaculture**, v. 237, p. 89–102, 2004.

4 CAPÍTULO 1

Novos registros de simpatria entre caranguejos do gênero *Aegla* (Crustacea: Decapoda) para o Brasil

New records of sympatry between crabs of the genus *Aegla* (Crustacea: Decapoda) from Brazil

Jobber Vanderlei de Vargas Machado¹, Sandro Santos^{1,2} & Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos^{1,2}

1 Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

2 Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

Corresponding author:

marliselbs@gmail.com

Laboratório de Diversidade Genética - DiverGe

Departamento de Biologia, sala 1140-H, prédio 17

Universidade Federal de Santa Maria

Av. Roraima, n° 1000, Camobi

97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

Fone: +55 55 3220 8465

Sub-ramal: 25

RESUMO

Simpatria é caracterizada pela existência de duas ou mais espécies filogeneticamente próximas ocupando um mesmo nicho ecológico. Neste estudo foi verificada a existência de dois eventos de simpatria entre espécies de eglídeos, sendo um no rio Cambará, onde foi observada a existência de simpatria entre três espécies, sendo estas: *Aegla platensis*, *Aegla* sp. (em preparação) e *Aegla grisella*. O outro registro foi observado no Rio Batú, ocorrendo entre *A. platensis* e *Aegla spinipalma*. Os indivíduos coletados foram classificados com chaves específicas para eglídeos e também utilizando a técnica de DNA *Barcoding* com a finalidade de avaliar a classificação com base nos caracteres morfológicos. Para isto foram utilizados os valores de distâncias intraespecífica, inter e intrapopulacional de um fragmento de 207 pb do gene COI. As análises moleculares confirmaram a existência de simpatria entre duas espécies no Rio Batú (*A. platensis* e *A. spinipalma*) e três no Rio Cambará (*A. platensis*, *Aegla* sp. e *A. grisella*). Entretanto, as sequências de *A. grisella* apresentaram altos valores de distância intra-específica, sendo que uma agrupou com *A. platensis*, uma com *Aegla* sp e a terceira ficou isolada na análise de Neighbor-Joining. Possivelmente estas sequências representam pseudogenes COI amplificados devido à utilização de *primers* degenerados. Análises adicionais estão sendo realizadas para a verificação desta hipótese.

Palavras-Chaves: DNA *Barcoding*; COI; Caracteres Morfológicos.

INTRODUÇÃO

Simpatria é definida por alguns autores como a existência de sobreposição na mesma área por espécies diferentes. Desse modo, são consideradas como simpátricas as espécies que ocorrem na mesma área, sendo estas filogeneticamente próximas e possuindo o mesmo nicho ecológico (RICKLEFS, 2003; FUTUYMA, 1998). O fenômeno de simpatria em eglídeos foi observado por

alguns autores, destacando Buckup & Rossi (1977) que verificaram a existência de *Aegla leptodactyla* e *Aegla camargoii* no Rio Divisa e no Rio Silveiras, ambos localizados em Bom Jesus (RS). Bond-Buckup & Buckup (1994) amostraram indivíduos de *A. platensis* e *Aegla itacolomiensis* no Rio Gravataí, em Taquara (RS), sendo que os autores também observaram a simpatria entre *Aegla spinosa* e *Aegla jarai* em Bom Retiro do Sul, Santa Catarina (SC). Estes autores destacam que a simpatria entre *Aegla spinipalma* e *Aegla longirostri* é comum em vários locais do Rio Grande do Sul. Boss Jr. (2003) realizou coletas na bacia Rio Itajaí-Açu, Blumenau (SC) e observou simpatria entre *A. jarai* e *Aegla muelleri*.

O gênero é composto por 69 espécies descritas até o momento (MCLAUGHLIN et al., 2010), as quais possuem hábitos bentônicos, sendo encontradas sob detritos vegetais ou enterrados no substrato arenoso, com sua dieta consistindo de detritos vegetais e larvas aquáticas de insetos (MAGNI & PYDANIEL, 1989; BOND-BUCKUP, 2003; BUENO & BOND-BUCKUP, 2004). São os únicos representantes da Infra-ordem Anomura que vivem em águas continentais sendo encontrados apenas no sul da América do Sul (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994; BOND-BUCKUP; BUCKUP & ARAÚJO, 2003).

Atualmente o gênero *Aegla* vem sendo alvo de alguns estudos que utilizam marcadores moleculares, por apresentarem aspectos ecológicos, sistemáticos e biogeográficos exclusivos que instigam os pesquisadores e exigem mais do que as análises morfológicas podem inferir, principalmente pela falta de compartilhamento de caracteres derivados em relação ao grande número de espécies existentes (PÉREZ-LOSADA et al., 2002a). Nos demais crustáceos, técnicas de biologia molecular têm sido muito utilizadas para resolver e auxiliar em problemas que envolvem a sistemática taxonômica (GUSMÃO et al., 2000; DANIELS et al., 2003; MACHORDOM & MACPHERSON, 2004). Marcadores moleculares podem ser utilizados como instrumento de investigação por ecólogos e sistematas em diversos campos como, por exemplo, para verificar as afinidades e os limites entre as espécies, para detectar modos de reprodução e estrutura familiar, para estimar níveis de migração e dispersão nas populações (AVISE, 2004).

Uma ferramenta para estudos moleculares muito utilizada nas últimas três décadas é o DNA mitocondrial (mtDNA), por suas características que permitem inferir o passado evolutivo e demográfico de populações e espécies (BALLARD & WHITLOCK, 2004). Em decápodos, os marcadores mitocondriais têm sido

amplamente utilizados para avaliar questões referentes a estudos taxonômicos e reconstruções filogenéticas (SCHUBART; NEIGEL & FELDER, 2000; PÉREZ-LOSADA et al., 2002a; MACPHERSON & MACHORDOM, 2005).

Uma técnica muito utilizada atualmente para identificar e caracterizar espécies diferentes é a técnica de DNA *Barcoding* (HEBERT; RATNASINGHAM & DEWAARD, 2003; HAJIBABAEI et al., 2007). Esta técnica utiliza fragmentos de DNA padronizados como “códigos de barra” (*barcodes*) específicos para cada espécie. Esta técnica baseia-se na premissa de que uma sequência padronizada curta pode distinguir indivíduos de uma espécie, uma vez que a variação genética entre espécies excede a variação dentro de uma espécie (HEBERT et al. 2003). Estudos em várias espécies mostraram que um fragmento de aproximadamente 658 pb do gene mitocondrial da enzima citocromo c oxidase subunidade I (COI) tem sido eficiente como *barcode*, apresentando mais de 95% de resolução no nível de espécie (HEBERT; RATNASINGHAM & DEWAARD, 2003; HEBERT et al. 2004a, HEBERT et al. 2004b). Este gene também é utilizado em estudos de filogenia e filogeografia (BUHAY, 2009) e possui a vantagem da utilização de *primers* universais que permitem a amplificação da sua extremidade 5' na maioria dos filos animais (FOLMER et al., 1994). Em eglídeos este marcador foi utilizado, em conjunto com outros genes, em estudos filogenéticos (PÉREZ-LOSADA et al., 2002a; PÉREZ-LOSADA et al., 2004) e de elaboração de estratégias de conservação (PÉREZ-LOSADA et al., 2002b; 2009).

No presente estudo são apresentados mais dois registros de simpatria entre eglídeos para o Brasil, sendo o primeiro entre três espécies e o segundo entre duas espécies verificados através de caracteres morfológicos e da técnica de DNA *Barcoding*.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos de coleta e identificação dos indivíduos

A avaliação de provável simpatria ocorreu em dois pontos pertencentes à bacia do Rio Uruguai, mais especificamente à sub-bacia do Rio Ijuí. O primeiro, localizado no Rio Cambará (28°34'11"S; 53°37'15"O), município de Cruz Alta - RS, e

o segundo no Arroio Batú (28°56'27''S; 53°47'56''O) localizado no município de Tupanciretã – RS. Os pontos de coleta estão representados na Figura 1.

Os indivíduos foram coletados inicialmente com armadilhas confeccionadas com garrafas plásticas que foram distribuídas entre as regiões de margem e centro em ambos os pontos de coleta, com profundidade entre 20 e 50 cm e distância mínima de 1 m entre uma armadilha e outra, colocadas no sentido oposto à correnteza às 16h e verificadas às 8h30min do dia seguinte. Também foram realizadas coletas com auxílio de um Coletor Surber de 0,1 m² e malha de 250 µm, após a retirada das armadilhas. O procedimento de coleta mencionado anteriormente teve a finalidade de aumentar o número de indivíduos coletados. Os animais coletados foram colocados em potes plásticos com água, após sendo criosacrificados e preservados em etanol absoluto até serem levados ao Laboratório de Diversidade Genética da UFSM (DiverGe), onde foram classificados. Após, tiveram suas brânquias dissecadas e armazenadas em etanol absoluto a uma temperatura de -20 °C até os demais procedimentos.

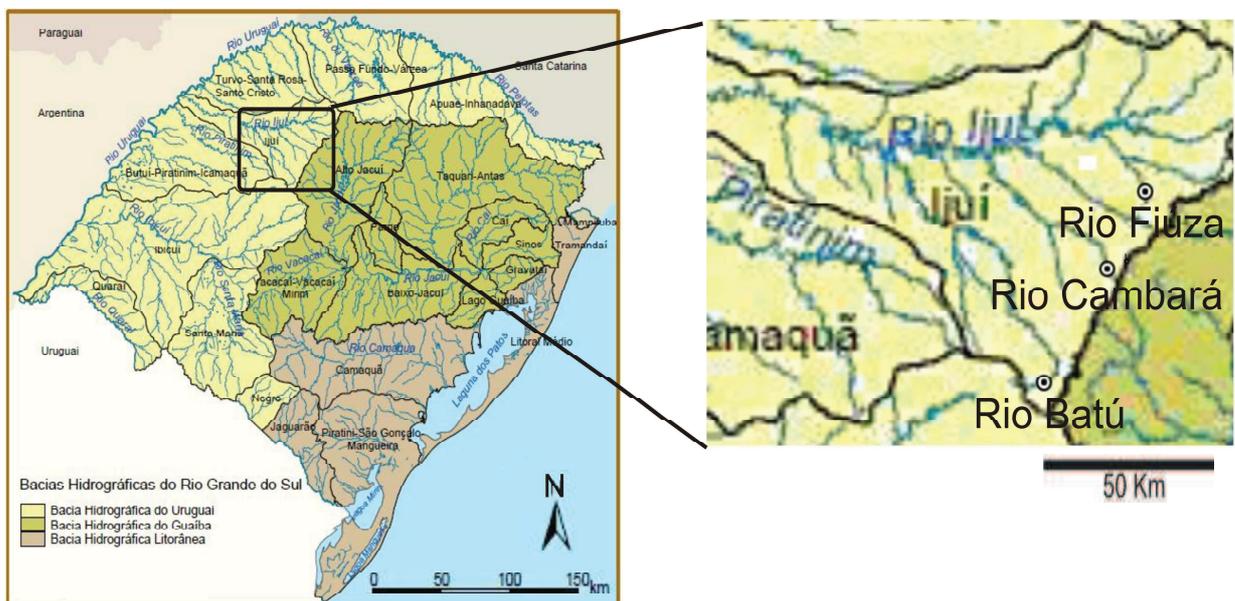


Figura 1: Pontos de coleta de indivíduos localizados na bacia do Rio Ijuí, sub-bacia do Rio Uruguai.

Fonte: SEMA, 2002.

Os indivíduos foram classificados com auxílio de chaves específicas para *Aegla* desenvolvidas por Bond-Buckup (2003) e Buckup & Bond-Buckup (1999). Foi constatada a existência de simpatria em ambos os pontos de coleta com a espécie

de *Aegla platensis*. Uma população alopátrica desta espécie, ocorrendo no Rio Fiúza (Figura 1), localizado no município de Panambi - RS (28°17'44''S; 53°29'47''O), foi utilizada como controle para avaliar a distância intraespecífica das populações de *A. platensis*, assim como as distâncias interespecíficas.

Procedimentos laboratoriais

Extração de DNA

O DNA foi extraído das brânquias seguindo o protocolo padrão de extração de DNA com Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), modificado para *Aegla longirostri* (BITENCOURT et al., 2007). Após essa etapa, o DNA foi ressuspenso em solução de TE (tris 10mM; EDTA 1mM) e tratado com RNase A (Macherey Magel) durante duas horas em banho-maria a 37°C.

Amplificação e Análise do gene COI

Para constatar a existência de simpatria nos locais de coleta e verificar se as populações de *A. platensis* seriam populações desta espécie, foi utilizada a técnica de DNA *Barcoding* utilizando como marcador um fragmento do gene COI, o qual foi amplificado em 30 indivíduos, sendo cinco de cada população estudada. O fragmento do gene mitocondrial COI foi amplificado utilizando os *primers* LCO 1490 *forward* (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 *reverse* (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'), descritos por Folmer et al. (1994). Estes *primers* amplificam uma região de 710 pb, dos quais 658 pb são utilizados para a técnica de DNA *Barcoding* (COSTA et al., 2007).

O volume total de cada reação foi de 50 µL, contendo 30 ng de amostra de DNA; 1 unidade (U) de *Taq* DNA polimerase (Fermentas); 50 µMol.L⁻¹ de cada dNTP (Ludwig); 1,5 mmol.L⁻¹ de MgCl₂ (Fermentas) e 0,3 µmol.L⁻¹ de cada *primer* (Bioner). Água Milli-Q foi utilizada como controle negativo no lugar da amostra de DNA. A PCR consistiu de um período inicial de desnaturação de 5 min a 94 °C, seguido por um primeiro estágio de cinco ciclos de 30 s a 94 °C, 90 s a 45 °C, 60 s a 72 °C, e um segundo estágio de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 90 s a 51 °C, 60s a 72 °C. A extensão final foi feita durante 5 min a 72 °C (COSTA et al., 2007). O produto de PCR foi

purificado com PEG 6000 30%/NaCl 1,5 M. Os fragmentos amplificados foram sequenciados em um sequenciador automático 3730XL pela empresa Macrogen (<http://www.macrogen.com/>).

Os cromatogramas das sequências foram analisados primeiramente pelo Programa Chromas 2.33 (<http://www.tecnelysium.com.au/>), sendo executada a análise de confiança da sequência através da ferramenta de BLAST no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e em seguida editados manualmente observando os níveis de confiança de cada nucleotídeo pelo pacote de programas Staden (STADEN; BEAL & BONFIELD 1998).

As sequências obtidas foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW (THOMPSON; HIGGINS & GIBSON, 1994) implementado no programa Mega 5.0 (TAMURA et al., 2011). No mesmo programa foram calculados os valores de distância interespecífica, intra e interpopulacional entre as sequências, utilizando o Modelo de distância p . Com este mesmo modelo, foi gerada uma árvore de *Neighbor-Joining* com 1000 réplicas de *bootstrap*, usando, além das sequências obtidas, três sequências previamente depositadas no GenBank: *A. platensis* (AY595662.1), *Aegla spinipalma* (AY595615.1) e *A. grisella* (AY595612.1) a fim de verificar a classificação taxonômica das espécies. A relação entre os haplótipos das espécies estudadas no Rio Cambará foi verificada através de uma rede de haplótipos construída no programa Network 4.6 (<http://www.fluxus-engineering.com/>) utilizando o algoritmo *Median Joining* (BANDELT; FORSTER & ROHL, 1999).

RESULTADOS

Os indivíduos foram identificados inicialmente com o auxílio de chaves específicas para *Aegla* desenvolvidas por Bond-Buckup (2003) e Buckup & Bond-Buckup (1999), onde constatou-se a existência de simpatria entre três espécies no Rio Cambará, sendo estas: *A. platensis*, *Aegla grisella* e *Aegla* sp. (em preparação); e duas espécies no Rio Batú (*A. platensis* e *A. spinipalma*).

Das 30 sequências obtidas (cinco de cada população), 22 após serem editadas apresentaram-se adequadas para serem analisadas, sendo estas: cinco de *A. grisella*, 12 de *A. platensis* (quatro de cada população), quatro de *Aegla* sp. e uma de *A. spinipalma*. O tamanho total dessas sequências foi 207 pb.

Inicialmente foi avaliado se os indivíduos de cada população foram classificados corretamente através dos dados de distância intrapopulacional (Tabela 1), onde constatou-se a classificação de todos os indivíduos dentro de cada espécie, exceto para os indivíduos de *A. grisella*, os quais apresentaram uma alta variação nos valores de distância intrapopulacional (0 a 0,238) e *A. spinipalma*, pois para essa espécie foi possível obter apenas uma sequência. Estes dados foram observados utilizando o modelo de distância *p*.

Tabela 1: Valores de distância Intrapopulacional para cada uma das populações estudada.

| Populações | Máxima | Média | Mínima |
|----------------------------|---------------|--------------|---------------|
| <i>A. grisella</i> | 0,238 | 0,12 | 0 |
| <i>Aegla sp.</i> | 0,012 | 0,008 | 0 |
| <i>A. platensis</i> | | | |
| Fiúza | 0,012 | 0,008 | 0 |
| Batú | 0 | 0 | 0 |
| Cambará | 0 | 0 | 0 |

Após, foi verificada a confirmação da existência de diferentes populações de *A. platensis*, sendo estas do rio Fiúza (alopátrica), Batú (simpátrica com *A. spinipalma*) e Cambará (simpátrica com *Aegla sp.* e *A. grisella*). Os valores de distância interpopulacional mostraram-se relativamente baixos, classificando estas populações na espécie de *A. platensis* (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de distância Interpopulacional para as populações *A. platensis*.

| Populações | Distância |
|----------------------|------------------|
| Fiúza/Batú | 0,03 |
| Fiúza/Cambará | 0,029 |
| Batú/Cambará | 0,06 |

Para confirmar a presença de mais de uma espécie (simpatria) nos locais de coleta, foram obtidos os valores de distância interespecífica entre as possíveis espécies simpátricas (Tabela 3) identificadas previamente com base em caracteres morfológicos, verificando que em todos os locais de coleta ocorre simpatria entre eglídeos. O sistema de identificação de espécies baseado no COI foi efetivo na separação dos indivíduos de *A. platensis*, *Aegla sp.* e *A. grisella*, no Rio Cambará. Entretanto, enquanto para as duas primeiras espécies os valores de distância interespecífica variaram de 0,125 a 0,134, os valores variaram de 0 a 0,238 entre *A.*

grisella e *A. platensis* e 0 a 0,19 entre *A. grisella* e *Aegla* sp. Esses valores ocorreram visto que dois indivíduos de *A. grisella* apresentaram sequências parciais do gene COI idênticas às de *Aegla* sp. e *A. platensis*, resultando em distância interespecífica mínima igual a 0. Ao se excluir das análises as sequências de *A. grisella* semelhantes às das outras duas espécies, as distâncias *p* variaram entre 0,045 e 0,134 para *A. grisella* e *Aegla* sp. e de 0,116 a 0,134 para *A. grisella* e *A. platensis*. A separação dos indivíduos de *A. platensis* e *A. spinipalma* (Batú) também foi confirmada pelo valor de distância interespecífica alto (0,083).

Tabela 3: Valores de distância Interespecífica das populações simpátricas.

| Local de Coleta | Populações | Distância | | |
|-----------------|------------------------------------|-----------|-------|--------|
| | | Máxima | Média | Mínima |
| Cambará | <i>A. platensis/ A. grisella</i> | 0,238 | 0,121 | 0 |
| Cambará | <i>A. platensis/ Aegla</i> sp. | 0,131 | 0,125 | 0,119 |
| Cambará | <i>A. grisella/ Aegla</i> sp. | 0,19 | 0,083 | 0 |
| Batú | <i>A. platensis/ A. spinipalma</i> | 0,083 | 0,083 | 0,083 |

A figura 2 apresenta a análise de *Neighbor-Joining*, onde verifica-se que alguns indivíduos de *A. grisella* agruparam com indivíduos das outras espécies, refletindo os valores de distância apresentados anteriormente. Além disso, é importante ressaltar que os indivíduos de *A. platensis* e *A. spinipalma* agruparam com as sequências destas espécies obtidas do GenBank . O mesmo resultado não foi observado para os indivíduos de *A. grisella*, os quais não agruparam com a sequência obtida da mesma espécie do GenBank.

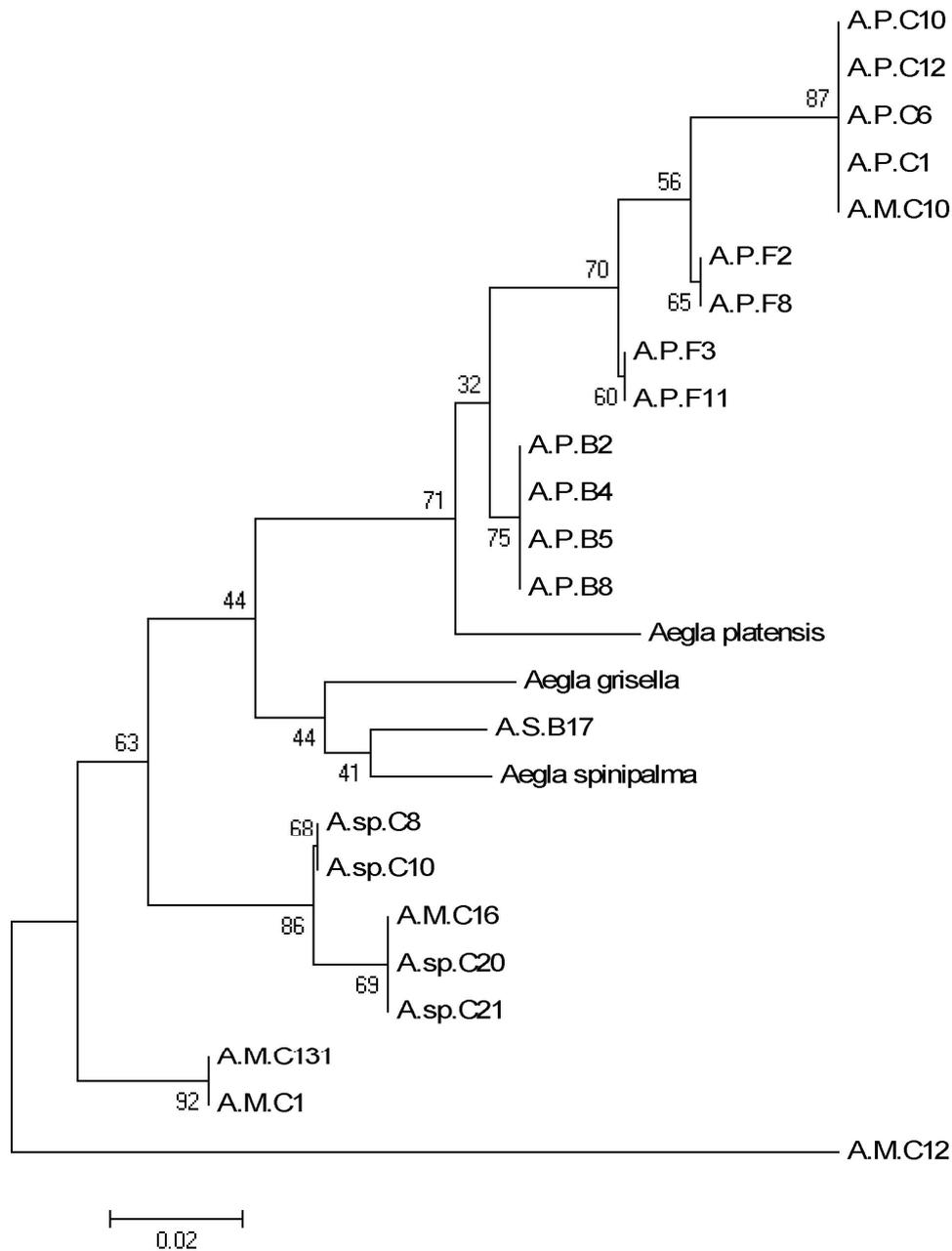


Figura 2: Análise NJ com 1000 réplicas de *bootstrap* utilizando distância *p*.

*Populações e espécies representadas pelas legendas: A.P.C (*A. platensis*, Cambará); A.P.B (*A. platensis*, Batú); A.P.F (*A. platensis*, Fiúza); A.M.C (*A. grisella*); A.sp.C (*Aegla* sp.) e A.S.B (*A. spinipalma*, Batú).

*Sequências obtidas do GenBank: *A. platensis* (AY595662.1), *A. grisella* (AY595612.1) e *A. spinipalma* (AY595615.1).

A relação entre as sequências parciais de COI obtidas para as espécies do Rio Cambará foi avaliada em uma rede de haplótipos (Figura 3), onde verificou-se a existência de cinco haplótipos. O primeiro haplótipo (H1) foi compartilhado por dois indivíduos de *A. grisella*. O segundo haplótipo (H2) foi observado em um único

indivíduo de *A. grisella* (A.M.C12), e apresentou um grande número de diferenças em relação ao haplótipo um. Os indivíduos analisados de *Aegla* sp. apresentaram dois haplótipos, sendo estes, o haplótipo cinco (H5) presente em dois indivíduos (A.sp.C8 e 10) e o haplótipo três (H3) que além de estar presente em dois indivíduos de *Aegla* sp. (A.sp.C20 e 21) foi compartilhado por um indivíduo de *A. grisella* (A.M.C16). O quarto haplótipo (H4) foi encontrado nos indivíduos de *A. platensis*, mas foi compartilhado com um indivíduo de *A. grisella* (A.M.C10).

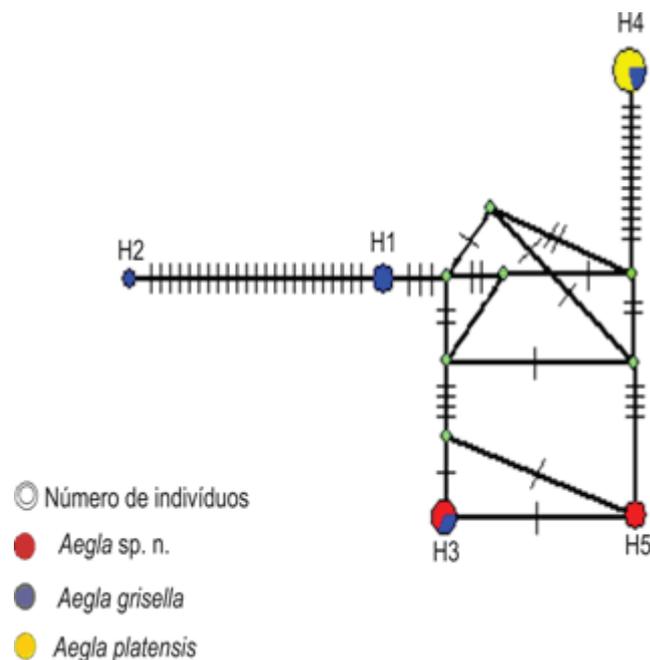


Figura 2 - Rede de haplótipos das espécies existentes no Rio Cambará. As cores representam os indivíduos das diferentes espécies. O diâmetro dos círculos representa o número de indivíduos carregando um haplótipo único onde o menor círculo representa um único indivíduo e o maior quatro indivíduos. As linhas entre os haplótipos demonstram as distâncias genéticas entre estes. Cada mutação pontual é representada por um marcador. Os vetores médios são indicados pelo círculo menor em verde.

DISCUSSÃO

Os registros de ocorrência de simpatria entre eglídeos realizados anteriormente pelos autores Buckup & Rossi (1977), Bond-Buckup & Buckup (1994), Boss Jr. (2003) e o novo registro apresentado nesse trabalho mostram que a simpatria parece ser um evento comum entre algumas espécies de *Aegla* no Rio Grande do Sul. Porém, os registros anteriores destacam a ocorrência de simpatria

entre duas espécies, verificada apenas pela análise de características morfológicas. Nesse trabalho além de ser encontrado mais um registro de simpatria entre duas espécies de eglídeos, também é evidenciado o primeiro registro entre três espécies para o Brasil, sendo verificado através de caracteres morfológicos e a técnica de DNA *Barcoding*, para a identificação das espécies. Embora ainda não registrada no Brasil, a simpatria entre três ou até mais espécies de caranguejos do gênero *Aegla* pode não ser um evento raro, tendo sido registrada no Chile por Pérez-Losada et al. (2002a).

Nos últimos anos, marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na identificação de espécies, empregados principalmente para verificar a correspondência com dados morfológicos (GUSMÃO et al., 2000; MACPHERSON & MACHORDOM, 2001; PÉREZ-LOSADA et al., 2002a; SPIVAK & SCHUBART, 2003), pois em alguns casos, as diferenças morfológicas são tão discretas que não podem ser verificadas, sendo necessária a análise de um marcador molecular (SARVER et al., 1998).

Quando a distância entre populações de *A. platensis* foi avaliada, os resultados mostraram-se mais baixos do que as distâncias entre espécies diferentes, porém estes valores são altos quando comparados a valores interpopulacionais para outras espécies de crustáceos (COSTA et al. 2007). Provavelmente estes valores são explicados pela distância geográfica entre as populações estudadas e à ausência de fluxo gênico entre elas.

A existência de simpatria nos pontos amostrados foi verificada inicialmente pelas características morfológicas apresentadas pelos indivíduos estudados, sendo no Rio Cambará verificada a existência entre três espécies (*A. platensis*, *A. grisella* e *Aegla* sp.) e no Rio Batú simpatria entre duas espécies (*A. platensis* e *A. spinipalma*). Para confirmar a identificação feita com base na morfologia, foram utilizadas análises do marcador mitocondrial COI, as quais suportaram a existência das duas espécies do Rio Batú e de três espécies no Rio Cambará, sendo estas *Aegla platensis* e *Aegla* sp. Entretanto, a espécie *A. grisella* não se apresentou monofilética na análise de NJ e de acordo com Cracraft (1983), indivíduos de uma mesma espécie devem formar agrupamentos monofiléticos. As distâncias genéticas interespecíficas, assim como a rede de haplótipos construída, mostraram que dois indivíduos de *A. grisella*, entre os quatro analisados, apresentaram sequências parciais de COI idênticas às de indivíduos das espécies de *A. platensis* e *Aegla* sp.

Os indivíduos de *A. grisella* apresentaram alta diversidade haplotípica (quatro haplótipos diferentes para cinco sequências analisadas), corroborando com a grande variação dos valores de distância obtidos e com os agrupamentos observados pela Análise de NJ. Porém devido à presença de um grande número de mutações em uma das sequências de *A. grisella* (A.M.C12), a existência de problemas referentes à amplificação, tais como coamplificação de pseudogenes ou numts (cópias não funcionais de mtDNA no núcleo) não pode ser descartada. Foram tomados cuidados para evitar a amplificação desses pseudogenes, sugeridos por Song et al. (2008) e Buhay (2009), tais como: utilização de tecidos ricos em mitocôndrias para extração de DNA (por exemplo brânquias); avaliação da confiança de cada nucleotídeo nos cromatogramas; verificação da sequência nucleotídica em fase de leitura; verificação de *stop* codons; e cuidados referentes ao alinhamento. Entretanto, a amplificação do COI ocorreu utilizando *primers* descritos por Folmer et al. (1994), os quais são considerados universais por possuírem a característica de amplificarem a região 5' na maioria dos filós dos animais, facilitando assim a ocorrência de amplificação de pseudogenes.

Numts ou pseudogenes surgem quando porções do mtDNA passam a fazer parte do genoma nuclear através de mecanismos de recombinação ou cruzamento (BUHAY, 2009), existindo casos da ocorrência destas sequências em crustáceos que inicialmente podem ser avaliadas através do comprimento das sequências e comparações entre diferentes sequências (SCHNEIDER-BROUSSARD & NEIGEL, 1997). Muitos organismos têm apresentado um número excessivo de numts em todo o genoma nuclear, tais como: camarões (WILLIAMS & KNOWLTON, 2001); pássaros (SORENSEN & QUINN, 1998); felinos (CRACRAFT et al., 1998); e primatas (HAZKANI-COVO & GRAUR, 2007). Numts de COI já foram evidenciados para algumas espécies de lagostins australianos (NGUYEN; MURPHY & AUSTIN, 2002; SONG et al., 2008).

A sequência dos aminoácidos que compõem o gene COI é muito conservada, devido às diferenças ocorrerem geralmente na terceira base do códon, a qual pode ser degenerada (BUHAY, 2009). O indivíduo A.M.C12 (*A. grisella*) apresentou sua sequência de aminoácidos muito diferente dos demais indivíduos analisados, porém não existindo a presença de *stop* codons nessa sequência. Não foi possível confirmar se esta sequência trata-se ou não de um fragmento de pseudogene, pois foram avaliados apenas 207 pb obtidos por *primers* que

amplificam uma região de 710 pb, não garantindo que códons de terminação ou indels possam estar ausentes das regiões não analisadas. Quanto às duas outras sequências que não agruparam com os indivíduos de *A. grisella* (A.M.C16 e A.M.C10), algumas explicações adicionais podem ser sugeridas, como por exemplo, polimorfismo ancestral e heteroplasmia ocorrendo por meio de hibridização (BUCKLIN, STEINKE & BLANCO-BERCIAL, 2011).

A existência de simpatria nos Rios Cambará e Batú foi confirmada tanto pelas características morfológicas, quanto pelas análises do COI, porém a existência de simpatria entre três espécies no Rio Cambará pôde ser melhor visualizada, através da técnica de DNA *Barcoding*, apenas quando as três sequências problemáticas de *A. grisella* foram removidas das análises. Os problemas apresentados por estas amostras estão sendo verificados e as hipóteses citadas acima serão testadas.

CONCLUSÃO

A existência de populações de eglídeos vivendo em simpatria tem sido registrada por alguns autores, porém no Brasil, esta associação nunca foi observada para três espécies. Neste estudo além de ser verificada o registro de mais duas espécies vivendo em simpatria, também verificou-se a existência de simpatria entre três espécies. Estes registros foram confirmados por meio de características morfológicas e de um marcador molecular amplamente utilizado na identificação de espécies (DNA *Barcoding*). As análises deste marcador, apesar de corroborarem na avaliação da existência da simpatria, também apresentaram dados conflitantes com a morfologia, pois alguns indivíduos da espécie de *A. grisella* foram agrupados juntamente com indivíduos das outras espécies. Além disso, uma sequência desta espécie apresentou altos valores de distância, alta divergência haplotípica e alta divergência da sequência de aminoácidos. É possível que estas sequências sejam resultado da amplificação de numts. Análises adicionais estão sendo realizadas para a verificação destes resultados conflitantes.

REFERÊNCIAS

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Sinauer Associates, New York. 2004. 684 p.

BALLARD, J.W.O. & WHITLOCK, M.C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v.13, p.729-744, 2004.

BANDELT, H.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining Networks for Intraspecific Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37-48, 1999.

BITENCOURT, J.V. et al. Comparison of Different Methodologies for DNA Extraction from *Aegla longirostri*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 6, p. 989-994, 2007.

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

BOND-BUCKUP, G. & BUCKUP, L. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Archivos de Zoologia**, v. 2, p. 159–346, 1994.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L.; ARAÚJO, P.B. Crustáceos. In. FONTANA, C.S.; BENCKE, G. A.; REIS, R. E. **Livro vermelho das espécies ameaçadas em extinção do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora EDIPUCRS, p. 73-83, 2003.

BOSS Jr., H. **Crustáceos límnicos e aspectos da biologia de *Aegla jarai* Bond-Buckup & Buckup e *Aegla* sp. (Decapoda, Aeglidae) no parque natural municipal das nascentes do Ribeirão Garcia, Blumenau, SC, 2003, 81p.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação Biologia Animal, UFRGS, 2003.

BUCKLIN, A.; STEINKE, D.; BLANCO-BERCIAL, L. DNA Barcoding of Marine Metazoa, **Annual Review of Marine Science** v. 3, p. 471–508, 2011.

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

BUCKUP, L. & ROSSI, A. O gênero *Aegla* no Rio Grande do Sul, Brasil (Crustácea, Decapoda, Anomura, Aeglidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 37, n. 4, p. 879-892, 1977.

BUENO, A.A.P. & BOND-BUCKUP, G. Natural diet of *Aegla platensis* Schmitt and *Aegla ligulata* Bond-Buckup (Crustacea, Decapoda, Anomura) from Brazil. **Acta Limnológica Brasileira**. v. 16, p. 127-155, 2004.

BUHAY, J. "COI-Like" Sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, n. 1, p. 96-110, 2009.

COSTA, F.O. et al. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Canadian Journal Aquatic Science**, v. 64, p. 272-295, 2007.

CRACRAFT, J. et al. Sorting out tigers (*Panthera tigris*): Mitochondrial sequences, nuclear inserts, systematics, and conservation genetics. **Animal Conservation**, v. 1, p. 139-150, 1998.

CRACRAFT, J. Species Concepts and Speciation Analysis. **Current Ornithology**, v. 1, p. 159-187, 1983.

DANIELS, S.R. et al. Molecular and morphometric data demonstrate the presence of cryptic lineages among freshwater crabs (Decapoda: Potamonautes) from the Drakensberg Mountains, South Africa. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 78, p. 129-147, 2003.

FLUXUS TECHNOLOGY LTD. **Software NetWork 4.6.1.0**. Disponível em www.fluxus-engineering.com/.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.

FUTUYMA, D. **Biologia evolutiva**. Riberão Preto: Sociedade Brasileira de genética – SBG, 3 ed. 1998. 832 p.

GUSMÃO, J. et al. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase 1 analyses. **Marine Biology**, v. 137, p. 435– 446, 2000.

HAJIBABAEI, M. et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Science Direct**, v. 23, n. 4, 2007.

HAZKANI-COVO, E. & GRAUR, D. A comparative analysis of numt evolution in human and chimpanzee. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 13-18, 2007.

HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, 270 Suppl, p. S96-99, 2003.

HEBERT, P.D.N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270, n. 1512, p. 313-21, 2003.

HEBERT, P.D.N. et al. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**, v. 10, p. 1657– 1663, 2004a.

HEBERT, P.D.N. et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 101, p. 14812–14817, 2004b.

MACHORDOM, A. & MACPHERSON, E. Rapid radiation and cryptic speciation in squat lobsters of the genus *Munida* (Crustacea, Decapoda) and related genera in the SouthWest Pacific: molecular and morphological evidence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 33, p. 259–279, 2004.

MACPHERSON, E. & MACHORDOM, A. Use of morphological and molecular data to identify three new sibling species of the genus *Munida* Leach, 1820 (Crustacea, Decapoda, Galatheidae) from New Caledonia. **Journal of Natural History**, v. 39, p. 819–834, 2005.

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

MCLAUGHLIN, P. A.; LEMAITRE, R.; CRANDALL, K. A. Annotated Checklist of Anomuram Decapod Crustacean of the World (Exclusive of the Kiwaoidea and Families Chirosttylidae and Galatheidae of the Galattheoidea) Part III – Aegloidea. **The Raffles Bulletin of Zoology**, v. 23, p. 131-137, 2010.

NGUYEN, T.T.T.; MURPHY, N. P.; AUSTIN, C. M. Amplification of multiple copies of mitochondrial Cytochrome b gene fragments in the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark (Parastacidae: Decapoda). **Animal Genetics**, v. 33, p. 304-308, 2002.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Conservation Assesment of Southern South American Freshwater Ecoregions on the Basis of the Distribution an Genetic Diversity of Crabs from the Genus *Aegla*. **Conservation Biology**, 2009.

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

PÉREZ-LOSADA, M.; et al. Molecular Systematics and Biogeography of the Southern South America Freshwater “Crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglididae) Using Multiple Heuristic Tree Search Approaches. **Systematic Biology**, Oxford, United Kingdom, v. 53, p. 767-780, 2004.

PÉREZ-LOSADA, M.; et al. Phylogenetic relationships among the species of *Aegla* (Anomura: Aeglididae) fresh-water crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**. v. 22, n. 2, p.304-313, 2002a.

RICKLEFS, R.E. **A Economia da Natureza**. Rio de Janeiro-RJ : Guanabara Koogan, 5ed. 2003. 542 p.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SARVER, S.K.; SILBERMAN, J.D.; WALSH, P.J.; Mitochondrial DNA sequence evidence supporting the recognition of two subspecies or species of the Florida spiny lobster *Panulirus arhus*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 18, p. 177–186, 1998.

SCHNEIDER-BROUSSARD, R. & NEIGEL, J.E. A large subunit mitochondrial ribosomal DNA sequence translocated to the nuclear genomes of two stone crabs. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, p. 156-165, 1997.

SCHUBART, C.D.; NEIGEL, J.E.; FELDER, D.L. Molecular phylogeny of mud crabs (Brachyura: Panopeidae) from the northwestern Atlantic and the role of morphological stasis and convergence. **Marine Biology**, v. 137, p. 11–18, 2000.

SONG, H., J. et al. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v. 105, p. 13486-13491, 2008.

SORENSEN, M.D. & QUINN, T.W. Numts: A Challenge for Avian Systematics and Population Biology. **Auk**, v. 155, p. 214-221, 1998.

SPIVAK, E.D. & SCHUBART, C.D. Species status in question: a morphometric and molecular comparison of *Cyrtograpsus affinis* (Dana) and *C. altimanus* Rathbun (Decapoda, Brachyura, Varunidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 23, p. 212–222, 2003.

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

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (submitted). Disponível em: <http://www.megasoftware.net/>. 2011.

TECHNELYSIUM PTY LTD. **Software Chromas 2.33**, disponível em <http://www.Tecnelysium.com.au> 2008.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-80. 1994.

WILLIAMS, S.T. & KNOWLTON, N. Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 1484–93, 2001.

5 CAPÍTULO 2

Relação entre simpatria e diversidade genética em crustáceos, utilizando como modelo *Aegla platensis* (Decapoda: Anomura)

**Relation between genetic diversity in sympatric crustaceans, using as a model
Aegla platensis (Decapoda: Anomura)**

Jobber Vanderlei de Vargas Machado¹, Sandro Santos^{1,2} & Marlise Ladvoat
Bartholomei-Santos^{1,2}

1 Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

2 Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

Corresponding author:

marliselbs@gmail.com

Laboratório de Diversidade Genética - DiverGe

Departamento de Biologia, sala 1140-H, prédio 17

Universidade Federal de Santa Maria

Av. Roraima, n° 1000, Camobi

97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

Fone: +55 55 3220 8665 e 3220 8629

Sub-ramal: 25

RESUMO

Simpatria é caracterizada pela existência de duas ou mais espécies filogeneticamente próximas ocupando um mesmo nicho ecológico. Porém existem poucos estudos destinados a avaliar se a simpatria está relacionada à diversidade genética das populações (principalmente em crustáceos). A fim de avaliar se há relação entre simpatria e diversidade genética de *Aegla platensis*, a técnica de AFLP foi utilizada em três populações desta espécie, sendo a primeira encontrada no Rio Cambará, onde há a simpatria com *Aegla* sp. (em preparação) e *Aegla grisella* e a segunda encontrada no Rio Batú, onde há a simpatria com *Aegla spinipalma*. Para comparar os níveis de diversidade genética entre as populações simpátricas, foi utilizada uma população alopátrica encontrada no Rio Fiúza. Foram estudados 120 indivíduos (20 de cada população). Altos níveis de variabilidade genética foram encontrados nas três populações, não havendo relação entre estes e a ocorrência de simpatria, pois não foi observado redução ou aumento da diversidade para as populações que vivem em simpatria com uma ou com duas espécies em relação à diversidade genética da população que vive sozinha. Os valores de *Fst*, AMOVA e análise Bayesiana indicaram uma alta estruturação genética entre as populações de *A. platensis*. Este fato possivelmente está relacionado à distância geográfica entre as populações.

Palavras-Chaves: AFLP; *Fst*; Genética de Populações.

INTRODUÇÃO

O fenômeno de simpatria caracteriza-se pela coexistência de duas ou mais espécies ocupando um mesmo nicho. A existência de simpatria entre espécies de crustáceos anomuros do gênero *Aegla* já foi observada por alguns autores, destacando Buckup & Rossi (1977) que verificaram este fenômeno entre *Aegla leptodactyla* e *Aegla camargoi*; Boss Jr. (2003) constatou a ocorrência de simpatria entre *Aegla jarai* e *Aegla muelleri*; e Bond-Buckup & Buckup (1994) registraram a ocorrência de dois eventos de simpatria, sendo o primeiro entre *Aegla*

platensis e *Aegla itacolomiensis* e o segundo entre *Aegla spinosa* e *A. jarai*. Os últimos autores ainda observam que a simpatria entre *Aegla spinipalma* e *Aegla longirostri* é comum em vários locais do Rio Grande do Sul.

Os estudos citados acima são referentes à existência de simpatria entre duas espécies de eglídeos. Para o Brasil, existe apenas um registro de simpatria entre três espécies, sendo estas *Aegla* sp. (em preparação), *A. platensis* e *Aegla grisella* (Capítulo 1).

Técnicas que permitem acessar a estrutura genética de populações podem ser empregadas para avaliar e comparar a variabilidade genética entre populações simpátricas e isoladas. Uma destas técnicas é o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), descrita por Vos et al. (1995), caracterizada como um tipo de DNA *fingerprinting*, a qual combina os pontos positivos das técnicas de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RADP (*Random Amplified Polymorphic DNA*), superando os pontos fracos de ambas (WELSH & MCCLELLAND 1990; WILLIAMS et al. 1990). Os dados obtidos apresentam várias vantagens, tais como: grande número de fragmentos a serem avaliados; conhecimento prévio desnecessário sobre o genoma da espécie estudada; a praticidade, facilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999). Devido às suas vantagens, os marcadores AFLP têm sido amplamente utilizados em estudos de sistemática (HEUN et al., 1997; BEISMANN et al., 1997; TRIANTAPHYLLIDIS et al., 1997; SEMBLAT et al., 1997), tipagem de patógenos (KOELEMAN et al., 1997), avaliação dos níveis de diversidade genética inter e intraespecífica (HAN & ELY, 2002; YUE et al., 2004; LIU et al., 2005), avaliação do fluxo e da dispersão gênica, exocruzamento, introgressão e casos de hibridização. Uma excelente revisão sobre AFLP pode ser encontrada em Mueller & Wolfenbarger (1999).

Em crustáceos, não há estudos comparando a variabilidade genética de populações simpátricas e isoladas. Os poucos estudos que existem abordando a simpatria destinam-se a avaliar a divergência entre espécies que dividem um mesmo habitat (COOK; PAGE & HUGHES, 2008; MCMILLEN-JACKSON & BERT, 2003; COOK; BUNN & HUGHES, 2007). Já a maioria dos estudos de genética de populações de crustáceos estimam a divergência entre populações marinhas distantes, avaliando se a variação da distância geográfica influencia na diferenciação de populações destas espécies (KLINBUNGA et al., 2007; GOMEZ-UCHIDA, 2003).

O gênero *Aegla* é um excelente candidato a estudos moleculares, devido a aspectos ecológicos, sistemáticos e biogeográficos exclusivos que instigam os pesquisadores e exigem mais do que as análises morfológicas podem inferir, principalmente pela falta de compartilhamento de caracteres derivados em relação ao grande número de espécies existentes (PÉREZ-LOSADA et al., 2002). Neste trabalho a técnica de AFLP é utilizada a fim de verificar se há relação entre ocorrência de simpatria e níveis de diversidade genética das populações de *A. platensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais de amostragem e coleta de indivíduos

As populações amostradas são todas pertencentes à bacia do Rio Uruguai, mais especificamente à sub-bacia do Rio Ijuí. Os locais onde foram coletados os indivíduos são: Rio Fiúza, localizado no município de Panambi - RS (28°17'44"S; 53°29'47"O), onde encontra-se a população de *A. platensis*, sendo esta alopátrica; o Rio Batú (28°56'27"S; 53°47'56"O) localizado no município de Tupanciretã - RS, onde há simpatria entre *A. platensis* e *A. spinipalma*; e por último, o ponto onde ocorre a simpatria entre três espécies, localizado no rio Cambará (28°34'11"S; 53°37'15"O), município de Cruz Alta - RS, onde coexistem as populações de *A. platensis*, *A. grisella* e *Aegla* sp. (em preparação). Os pontos de coleta estão representados na Figura 1.

De cada população, foram coletados 20 indivíduos, totalizando 120 indivíduos amostrados. Os eglídeos foram coletados com o auxílio de armadilhas confeccionadas com garrafas plásticas, sendo utilizado como isca fígado bovino cru. As armadilhas foram colocadas no sentido oposto à correnteza no período da tarde e retirados no dia seguinte pela parte da manhã. Após a retirada das armadilhas, foram realizadas coletas adicionais com um coletor do tipo Surber com a finalidade de amostrar um maior número de indivíduos. Após os mecanismos de coleta, os indivíduos foram colocados em potes plásticos com água, sendo após criossacrificados e preservados em etanol absoluto até serem levados ao Laboratório de

Diversidade Genética da UFSM (DiverGe), onde tiveram suas brânquias dissecadas e conservadas em etanol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

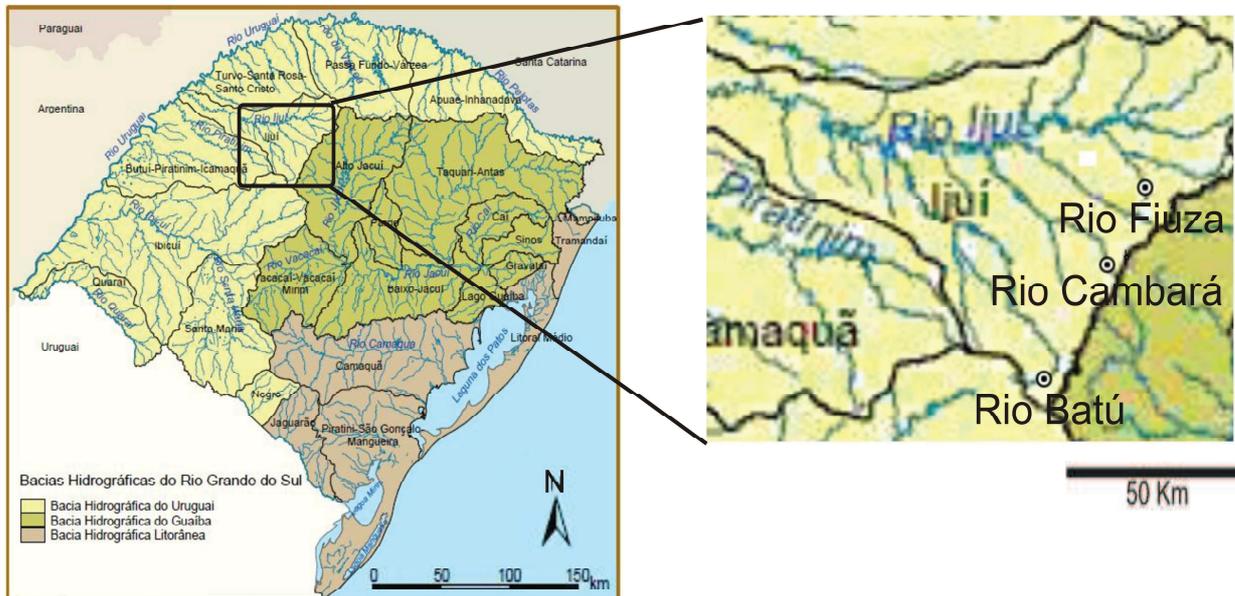


Figura 1: Pontos de coleta de indivíduos localizados na bacia do Rio Ijuí, sub-bacia do Rio Uruguai.

Fonte: SEMA, 2002.

Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir do tecido das brânquias de 120 indivíduos coletados, seguindo o protocolo padrão de extração de DNA com Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), modificado para *A. longirostri* (BITENCOURT et al., 2007). Após essa etapa, o DNA foi ressuspenso em solução de TE (tris 10mM; EDTA 1mM) e tratado com RNase A (Macherey Magel) durante duas horas em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Técnica de AFLP

Todas as amostras de DNA foram submetidas à técnica de AFLP realizada de acordo com a descrição de Vos et al. (1995). Inicialmente o DNA genômico de cada indivíduo foi totalmente digerido utilizando 8 U da enzima de restrição *EcoRI*

(Fermentas), a 37° C durante 3 horas, em um volume total de reação de 10 µL, contendo 50 ng/µl de DNA, solução tampão Tango 0,6 X (Fermentas) e água Mili-Q. Em seguida foram adicionadas 2 U da enzima de restrição *Tru 1I* (Fermentas) e as amostras foram novamente incubadas por 3 horas em banho-maria a 65° C.

Os adaptadores para as extremidades geradas por *EcoRI* e *MseI* foram formados pelo anelamento de oligonucleotídeos complementares entre si (Tabela 1). Os fragmentos gerados pela dupla digestão foram ligados aos adaptadores em uma reação de 20 µL (volume total) contendo: 10 µL de DNA clivado pelas enzimas de restrição; 0,2 mM de adaptador *EcoRI*; 1 mM de adaptador *MseI*; solução tampão 1 X (Fermentas); PEG 4000 (Polietileno glicol – Fermentas); 0,8 U de T4 DNA-ligase (Fermentas) e água Mili-Q. A ligação ocorreu a 22° C durante 3 horas e logo após a enzima foi inativada a 65° C por 10 minutos. Os fragmentos de DNA ligados aos adaptadores foram então diluídos 25 vezes em água e mantidos *overnight* a 4° C.

Foram feitas duas reações de PCR, sendo a primeira realizada com os *primers EcoRI+A* e *MseI+C* (Tabela 1) em um volume final de 20 µL: 6 mM cada primer; 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas); solução tampão 1 X (Fermentas); 25 mM de MgCl₂ (Fermentas), 10 mM de dNTP's (Ludwig) e Água Mili-Q. A PCR foi realizada com um passo inicial de desnaturação de 5 min a 94° C, seguido por 20 ciclos de 30 s a 94° C, 60 s a 56° C e 60 s a 72° C com extensão final de 5 min a 72° C. Os produtos da primeira amplificação foram diluídos 10 X em solução de TE (descrita anteriormente). A segunda reação de amplificação utilizou as mesmas condições da reação descrita acima, porém com *primers* contendo duas bases seletivas adicionadas na extremidade 3': *EcoRI+AC* e *MseI+CG* (Tabela 1). A PCR foi realizada utilizando um programa do tipo *touchdown*, no qual a temperatura de anelamento dos *primers* inicia-se mais elevada e diminui durante os ciclos iniciais, estabilizando-se após um certo número de ciclos. O programa de ciclagem de temperaturas utilizado consistiu de um passo de desnaturação inicial de 5 min a 94° C, seguido por 13 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s de temperatura de anelamento decrescente (iniciando a 65° C e reduzindo 0,7° C por ciclo) e temperatura de extensão de 72° C durante 30 s. O segundo estágio consistiu de 23 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 56° C e 60 s a 72° C, com extensão final de 5 min a 72° C. Os produtos da amplificação foram misturados ao tampão de amostra (30 % glicerol, 0,25 % azul de bromofenol e 0,25 % xilenocianol) e aplicados em gel de poliacrilamida 6 %, com 17 cm de comprimento, o qual foi submetido à eletroforese em cuba vertical.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na técnica de AFLP (Bioner)

| Oligonucleotídeos | Sequência |
|--------------------------|--------------------------------|
| Adaptadores | |
| EcoRI Adapter 1 | 5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3' |
| EcoRI Adapter 2 | 5' pAAT TGG TAC GCA GTC TAC 3' |
| MseI Adapter 1 | 5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3' |
| MseI Adapter 2 | 5' pTAC TCA GGA CTC AT 3' |
| Primers | |
| EcoRI+A | 5' GAC TGC GTA CCA ATT CA 3' |
| MseI+C | 5' GAT GAG TCC TGA GTA AC 3' |
| EcoRI+AC | 5' GAC TGC GTA CCA ATT CAC 3' |
| MseI+CG | 5' GAT GAG TCC TGA GTA ACG 3' |

Após a corrida eletroforética, os géis foram submetidos à coloração por nitrato de prata (SANGUINETTI; DIAS NETO & SIMPSON, 1994) mergulhados inicialmente em 200 mL de solução contendo 10 % de álcool etílico e 1 % de ácido acético glacial durante 5 minutos. Depois foram submersos em 200 mL de solução de nitrato de prata (0,25 %) por mais 5 minutos e por fim, revelados com 200 mL de solução de hidróxido de sódio (0,06 %) acrescido de formaldeído (0,006 %), até o aparecimento das bandas correspondentes aos fragmentos de DNA. As três soluções foram aquecidas a 60° C. Para interromper a revelação foi usado ácido acético 10 %. Antes de cada troca de soluções, os géis foram lavados com água destilada. Para secar, os mesmos foram envolvidos com papel celofane permeável embebido em solução de secagem (glicerol 1 % e álcool metílico 30 %).

As bandas observadas nos géis (Figura 2) foram quantificadas e transformadas em matrizes binárias (presença e ausência) e tiveram seu peso molecular medido em pares de bases através do programa Total Lab. Gel Quant. (<http://www.totallab.com/>).

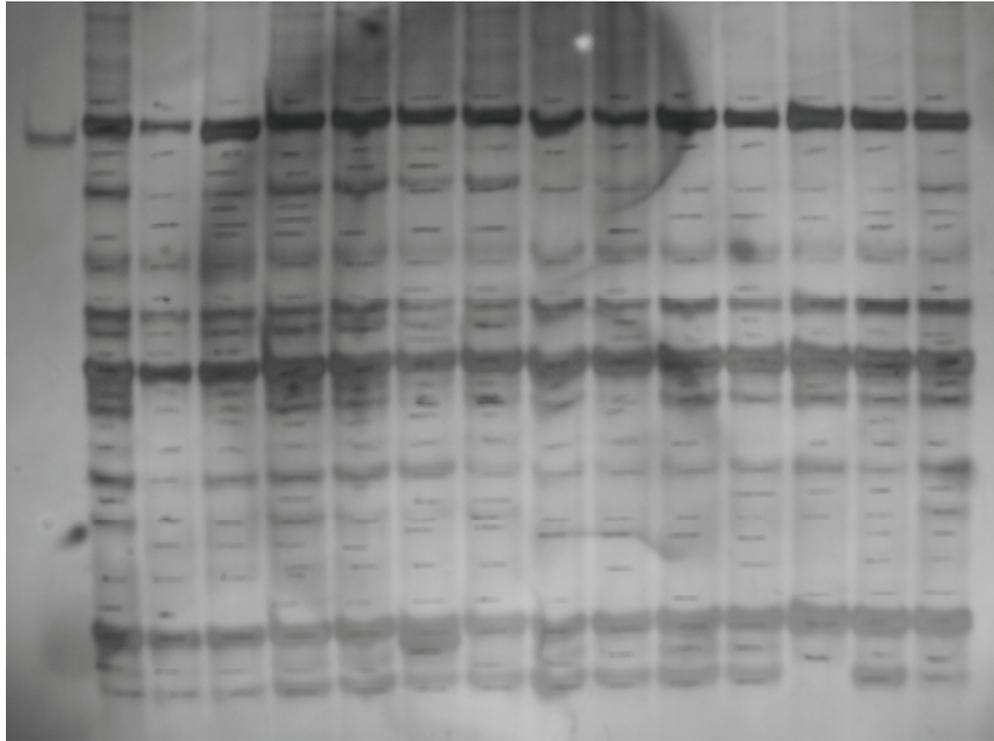


Figura 2: Gel de AFLP após a quantificação das bandas.

Após, as matrizes foram preparadas pelo Amova-Prep (MILLER, 2008), sendo criados os arquivos de entrada para o programa Arlequin (EXCOFFIER & LISCHER, 2010), o qual foi utilizado para avaliar os dados de diversidade genética. Este programa também foi usado para realizar a Análise de Variância Molecular (AMOVA) para determinar a estrutura genética das populações. A AMOVA foi realizada inicialmente para 155 fragmentos e 90 indivíduos (15 de cada população). Para uma segunda análise foram removidos os fragmentos que apresentavam frequência inferior a 22 % e não eram compartilhados entre populações diferentes, totalizando assim 122 fragmentos avaliados em 120 indivíduos (20 de cada população). A análise com um menor número de fragmentos foi realizada evitando-se o uso de locos únicos de alguns indivíduos, os quais poderiam aumentar os valores de distância entre indivíduos (quando presentes apenas em um indivíduo) e entre as populações (quando presentes apenas em determinada população).

A AMOVA foi realizada considerando-se duas situações diferentes. A primeira análise considerou todas as populações de *A. platensis* em um único grupo e as demais espécies em grupos diferentes e a segunda agrupou as populações de acordo com os locais de coleta. O programa Structure (FALUSH, 2007) foi utilizado para realizar uma análise Bayesiana que designa indivíduos a populações, sem

informações prévias da população de procedência dos espécimes. Esta análise foi realizada com 200.000 réplicas de *bootstrap* com *burnin* de 20.000.

Para melhor avaliar a proximidade entre as populações, foi realizada uma análise de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando o coeficiente de Jaccard, realizada através do programa DendroUPGMA (GARCIA-VALLVÉ & PUIGBO, 2009).

RESULTADOS

Através da técnica de AFLP foram obtidos 155 fragmentos, os quais variaram de 50 a 217 pb. Devido ao alto número de fragmentos obtidos, os que apresentaram frequência inferior a 22 % e não eram compartilhados entre diferentes populações foram removidos de algumas análises, restando assim 122 fragmentos. A tabela 2 apresenta o número de fragmentos polimórficos em cada população primeiramente para todos os fragmentos obtidos (155) e após para os que tiveram maior frequência (122).

Tabela 2: Número de fragmentos polimórficos em cada população.

| Espécies | População | Número de Fragmentos polimórficos | |
|----------------------|-----------|-----------------------------------|----------------|
| | | 155 analisados | 122 analisados |
| <i>A. grisella</i> | Cambará | 68 | 68 |
| <i>A. platensis</i> | Cambará | 72 | 71 |
| <i>Aegla sp.</i> | Cambará | 76 | 78 |
| <i>A. platensis</i> | Batú | 62 | 54 |
| <i>A. spinipalma</i> | Batú | 69 | 65 |
| <i>A. platensis</i> | Fiúza | 63 | 57 |

Quanto aos dados de polimorfismo avaliados a partir do número de fragmentos apresentados por cada população, observa-se que a população que apresentou mais locos polimórficos foi a de *Aegla sp.* (em preparação) e a população de *A. platensis*, ambas do rio Cambará. Porém de maneira geral, houve alta diversidade em todas as populações avaliadas, ocorrendo 120 haplótipos diferentes, ou seja, um haplótipo para cada indivíduo, denotando uma alta diversidade haplotípica.

Os altos valores de *Fst* de cada população (Tabela 3) mostraram a alta estruturação de cada uma das populações de *A. platensis* e das demais espécies

estudadas, não existindo fluxo gênico entre as populações e entre as espécies que vivem em simpatria. Os valores de *Fst* entre as populações estudadas foram calculados primeiramente para 90 indivíduos e 155 fragmentos e após para 120 indivíduos considerando-se 122 fragmentos (Tabela 4), os quais permaneceram elevados, pois também foram elevados dentro de cada população refletindo a alta estruturação de cada uma das populações estudadas.

Tabela 3: Valores de *Fst* e de Heterozigosidade esperada de cada população.

| Espécies | População | Valores de <i>Fst</i> de cada população | Heterozigosidade Esperada (<i>He</i>) |
|----------------------|-----------|---|---|
| <i>A. grisella</i> | Cambará | 0,4892 | 0,2575 |
| <i>A. platensis</i> | Cambará | 0,4628 | 0,2651 |
| <i>Aegla sp. n.2</i> | Cambará | 0,4180 | 0,2828 |
| <i>A. platensis</i> | Batú | 0,5689 | 0,2294 |
| <i>A. spinipalma</i> | Batú | 0,6083 | 0,2025 |
| <i>A. platensis</i> | Fiúza | 0,5631 | 0,2213 |

Tabela 4: Valores de *Fst* entre as populações *.

| População | Espécies | Cambará | | | Batú | | Fiúza |
|-----------|----------------------|----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | | <i>Aegla sp. n.2</i> | <i>A. grisella</i> | <i>A. platensis</i> | <i>A. spinipalma</i> | <i>A. platensis</i> | <i>A. platensis</i> |
| Cambará | <i>Aegla sp. n.2</i> | | 0,52616 | 0,54787 | 0,63853 | 0,59558 | 0,59751 |
| | <i>A. grisella</i> | 0,58935 | | 0,60396 | 0,65446 | 0,64226 | 0,63270 |
| | <i>A. platensis</i> | 0,68063 | 0,68607 | | 0,62855 | 0,64495 | 0,59900 |
| Batú | <i>A. spinipalma</i> | 0,57134 | 0,61324 | 0,64286 | | 0,69432 | 0,64499 |
| | <i>A. platensis</i> | 0,62977 | 0,68607 | 0,64962 | 0,70499 | | 0,69164 |
| Fiúza | <i>A. platensis</i> | 0,63277 | 0,65928 | 0,60101 | 0,65923 | 0,70444 | |

* Valores abaixo da diagonal obtidos para 155 fragmentos em 90 indivíduos.

* Valores acima da diagonal obtidos para 122 fragmentos em 120 indivíduos.

Os valores interpopulacionais de *Fst* são mais elevados abaixo da diagonal, pois estes dados foram obtidos a partir de 155 fragmentos, onde alguns apresentavam uma baixa frequência, sendo muitas vezes únicos de uma determinada população e em alguns casos únicos de alguns indivíduos. Quando estes fragmentos foram removidos das análises, observa-se valores de *Fst* mais baixos (acima da diagonal), porém não diferindo muito dos apresentados acima da diagonal.

Para a AMOVA, quatro simulações foram realizadas, sendo duas para o número de 155 fragmentos e 90 indivíduos, e duas para 122 fragmentos e 120 indivíduos (Tabela 5). No primeiro teste os indivíduos foram agrupados de acordo

com o local de coleta. No segundo teste considerou-se todas as populações de *A. platensis* em um único grupo e as demais espécies em um grupo cada.

Tabela 5: Valores de AMOVA para 155 fragmentos analisados.

| Fonte da variação | Porcentagem de variação | | F | |
|--|-------------------------|-------|---------------|---------------|
| | 155 | 122 | 155 | 122 |
| Agrupadas de acordo com o local de coleta | | | | |
| Entre grupos | 3,71 | 2,86 | Fct: 0,03710 | Fct: 0,02862 |
| Entre populações dentro dos grupos | 61,41 | 59,76 | Fst: 0,65119 | Fst: 0,62622 |
| Dentro de populações | 34,88 | 37,38 | Fsc: 0,63775 | Fsc: 0,61521 |
| Agrupadas de acordo com a espécie | | | | |
| Entre grupos | -0,74 | -3,37 | Fct: -0,00738 | Fct: -0,03366 |
| Entre populações dentro dos grupos | 65,46 | 65,45 | Fsc: 0,64977 | Fst: 0,62081 |
| Dentro de populações | 35,28 | 37,92 | Fst: 0,64719 | Fsc: 0,61521 |

Os altos valores de *Fst* em todos os testes realizados demonstram a alta estruturação populacional de todas as populações, sendo que os diferentes agrupamentos das populações não apresentaram diferenças significativas. Os maiores valores de variação genética foram observados para populações dentro dos grupos, demonstrando que as populações são geneticamente estruturadas e que esta estruturação independe da existência de simpatria.

A análise Bayesiana implementada no programa Structure (FALUSH, 2007), realizada a fim de atribuir indivíduos a populações, suporta a idéia de que *A. platensis* possui populações bem estruturadas e significativamente diferenciadas. Nos pontos onde há simpatria, verificou-se a existência de espécies bem definidas, não existindo nenhum indivíduo designado para uma população ou espécie diferente da qual este tenha sido classificado inicialmente.

Para verificar o agrupamento entre os indivíduos analisados foi realizada uma análise de UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard (Figura 3), onde confirmou-se novamente a separação de todas as populações, visto que os indivíduos agruparam de acordo com sua população de origem.

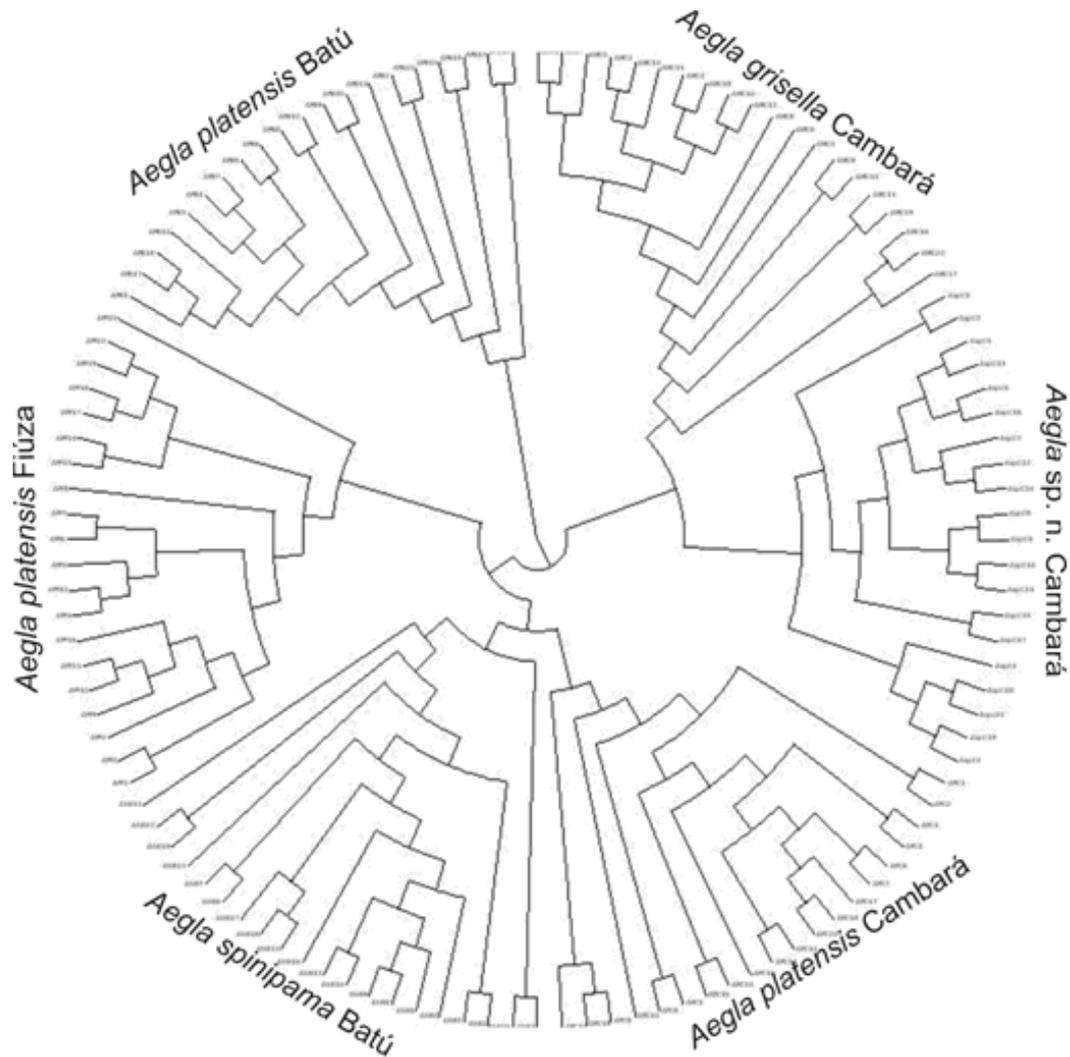


Figura 3: Dendrograma de UPGMA realizada através do Coeficiente de Jaccard para todas as populações estudadas.

DISCUSSÃO

Análises da diversidade genética e diferenciação de populações são essenciais para pesquisas genéticas (genética de populações, filogenias, taxonomia, sistemática molecular e estudos evolucionários) de vários organismos (AVISE, 2004). Entretanto, a avaliação da diversidade genética dos organismos em espécies simpátricas é pouco estudada, principalmente em decapódos. A existência de simpatria entre espécies do gênero *Aegla* já foi observada por alguns autores (BUCKUP & ROSSI, 1977; BOSS Jr., 2003 E BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994), porém estes estudos abordam questões envolvendo a dinâmica populacional das espécies e características voltadas a aspectos ecológicos das espécies que vivem

em simpatria. Além disso, os estudos citados anteriormente registram apenas a existência de simpatria entre duas espécies de eglídeos. No Capítulo 1 é apresentado o primeiro registro da ocorrência de simpatria entre três espécies de eglídeos no Brasil, ocorrendo no Rio Cambará, sub-bacia do Rio Ijuí, no Rio Grande do Sul.

Para verificar se há relação entre simpatria e diversidade genética de *A. platensis* foi utilizada a técnica de AFLP, que gerou um total de 155 locos para serem analisados. Para evitar o uso de um grande número de locos únicos de alguns indivíduos e de algumas populações, alguns fragmentos foram removidos por apresentarem uma menor frequência, restando assim 122. A avaliação de um grande número de fragmentos gerados por meio desta técnica foi evidenciada para algumas espécies de decápodos, podendo-se citar *Portunus pelagicus* (KLINBUNGA et al., 2007), *Penaeus japonicus* (LI et al., 2003) e *Paralichthys olivaceus* (LIU et al., 2005). Deve-se ressaltar que o grande número de fragmentos avaliados para as espécies de *Aegla* apresentados neste estudo é devido ao uso de *primers* compostos por duas bases seletivas, sendo este o principal motivo para o alto número de fragmentos obtidos. Nos estudos citados anteriormente, os autores utilizam *primers* compostos com três bases seletivas, isto reduz o número de fragmentos a serem analisados, pois a seletividade dos *primers* é aumentada em mais um sítio na extremidade 3' de cada um destes. Porém, para obter um maior número de locos polimórficos são utilizadas várias combinações de diferentes *primers*, gerando assim um grande número de locos, que também podem ser obtidos quando são utilizados *primers* com apenas duas bases seletivas (VOS et al., 1995).

Os 122 fragmentos mais frequentes apresentaram um grande polimorfismo nas populações, sendo que as populações que apresentaram maior número de fragmentos polimórficos foram *Aegla* sp. e *A. platensis* (ambas do Rio Cambará). O percentual de fragmentos polimórficos variou de 46,72 % (*A. platensis* Rio Fiúza) a 63,93 % (*Aegla* sp.), sendo estes muito próximos dos obtidos por Klinbunga et al. (2007).

De forma geral, a diversidade genética de todas as populações foi alta, considerando-se a alta diversidade haplotípica encontrada e a alta variação genética dentro das populações, apesar dos baixos valores de heterozigosidade esperada obtidos. Alta estruturação populacional em eglídeos foi observada para a espécie

Aegla alacalufi por Xu et al. (2009), onde os autores analisaram sequências dos genes COI, COII e 16S em 14 populações, verificando que apenas dois haplótipos eram compartilhados entre mais de uma população. Os autores atribuíram esta diferenciação e alta estruturação a pressões ambientais durante ciclos de glaciação. Porém, para as populações de *A. platensis*, esta estruturação também pode estar relacionada, em parte, à ação antrópica, pois a ocorrência de populações de eglídeos está cada vez mais restrita às nascentes dos rios, devido às altas exigências quanto à qualidade da água e aos níveis de oxigênio (BOND-BUCKUP et al., 2008, DALOSTO & SANTOS 2011).

Os valores de *Fst* observados para cada população e entre as populações mostraram a existência de alta estruturação populacional, também evidenciada pela AMOVA, demonstrando que a maior fonte de variação ocorre entre as populações dentro dos agrupamentos realizados, constatando que a simpatria não está relacionada à diversidade genética de *A. platensis*. Não houve diferença nos níveis de diversidade genética quanto ao número de espécies simpátricas comparadas. Em *Portunus pelagicus* foi observada a existência de alta estruturação populacional, e a existência de subpopulações desta espécie (KLINBUNGA et al., 2007), o que não era esperado pelos autores, apesar dos pontos amostrais de cada população serem muito distantes, variando de 359 a 2.545 km, pois *P. pelagicus* possui um longo período larval, o que proporcionaria um grande potencial de dispersão (YAP et al. 2002), facilitando o fluxo gênico entre as populações. Porém, para a espécie *A. platensis*, assim como para todas as espécies de eglídeos, não há a existência de estágio larval (GORE, 1985), o que dificulta a capacidade de dispersão dos indivíduos e o fluxo gênico entre as populações, mesmo em populações não tão distantes, pois as distâncias entre as populações de *A. platensis* variam de 85,9 km (Cambará e Fiúza) a 136,8 km (Batú e Cambará). A existência de alta estruturação populacional também foi observada no camarão marinho *Crangon crangon*, onde os valores da AMOVA revelaram que existe uma alta variação entre as populações mesmo em distâncias inferiores a 125 km (WEETMAN et al., 2006).

Os valores de *Fst*, os quais avaliam a divergência genética entre populações, corroboraram a existência de populações bem distintas de *A. platensis* e esta distinção independeu do fato de existir simpatria entre duas ou três espécies. A análise Bayesiana realizada pelo programa Structure verificou que não houve a mistura de indivíduos entre as populações de *A. platensis*, sendo estas populações

bem distintas. Para os pontos onde há simpatria também foi verificada a separação de todos os indivíduos dentro de cada uma das respectivas espécies classificadas no Rio Cambará (três espécies) e no Rio Batú (duas espécies). Todos esses resultados corroboram a existência de populações muito distintas e a ocorrência de simpatria nos locais estudados. O dendrograma gerado por UPGMA apresentou o agrupamento de todos os indivíduos em suas respectivas populações de origem, não havendo o agrupamento de nenhum indivíduo dentro de um grupo do qual esse não pertença, refletindo os dados obtidos pela análise Bayesiana.

CONCLUSÃO

O presente estudo apresenta a avaliação da simpatria e da diversidade genética do crustáceo decápodo *A. platensis*, as quais não parecem estar relacionadas, visto que não se observou redução ou aumento da variabilidade genética para a população que vive em simpatria com uma espécie, assim como para a população que vive em simpatria com duas espécies, em relação à diversidade genética da população que vive sozinha.

REFERÊNCIAS

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Sinauer Associates, New York. 2004. 684 p.

BEISMANN, H. et al. AFLP analysis sheds light on distribution of two *Salix* species and their hybrid along a natural gradient. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 989–993, 1997.

BITENCOURT, J.V. et al. Comparison of Different Methodologies for DNA Extraction from *Aegla longirostri*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 6, p. 989-994, 2007.

BOND-BUCKUP, G. & BUCKUP, L. A familia Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Archivos de Zoologia**, v. 2, p. 159–346, 1994.

BOND-BUCKUP, G. et al. Global Diversity of Crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in Freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 267-273, 2008.

BOSS Jr., H. **Crustáceos límnicos e aspectos da biologia de *Aegla jarai* Bond-Buckup & Buckup e *Aegla* sp. (Decapoda, Aeglidae) no parque natural municipal das nascentes do Ribeirão Garcia, Blumenau, SC, 2003, 81p.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação Biologia Animal, UFRGS, 2003.

BUCKUP, L. & ROSSI, A. O gênero *Aegla* no Rio Grande do Sul, Brasil (Crustácea, Decapoda, Anomura, Aeglidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 37, n. 4, p. 879-892, 1977.

COOK, B.; PAGE, T.; HUGHES, J. Importance of cryptic species for identifying “representative” units of biodiversity for freshwater conservation. **Biological Conservation**, v. 141, n. 11, p. 2821-2831, 2008.

COOK, B.D.; BUNN, S.E.; HUGHES, J.M. A comparative analysis of population structuring and genetic diversity in sympatric lineages of freshwater shrimp (Atyidae: Paratya): concerted or independent responses to hydrographic factors? **Freshwater Biology**, v. 52, p. 2156–2171, 2007.

DALOSTO, M. M. & SANTOS, S. Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 160, p. 461-466, 2011.

EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. Arlequin Suite ver. 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analysis under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.

FALUSH, D. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 574-578, 2007.

GARCIA-VALLVÉ, S. & PUIGBO, P. **DendroUPGMA: A dendrogram construction utility.** 2009 Disponível em: <<http://genomes.urv.es/UPGMA/>> Acesso em Janeiro de 2011.

GOMEZ-UCHIDA, D. et al. Allozyme and AFLP analyses of genetic population structure in the hairy edible crab *Cancer setosus* from the Chilean coast. **Journal of Crustacean Biology**, 23(2), 486-494. (2003).

GORE, R. H. Molting and growth in decapod larvae. In: WENNER, A.M. **Larval Growth**. Boston: A. A. Balkema, v. 2. (Crustacean Issues), p. 1-65. 1985.

HAN, K. & ELY, B. Use of AFLP analysis to assess genetic variation in *Morone* and *Thunnus* species. **Marine Biotechnology**, v. 4, p. 141-145, 2002.

HEUN, M. et al. Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. **Science**, v. 278, p. 1312-1314, 1997.

KLINBUNGA, S. et al. Genetic heterogeneity of the blue swimming crab (*Portunus pelagicus*) in Thailand determined by AFLP analysis. **Biochemical Genetics**, v. 45, p. 725-36, 2007.

KOELEMAN, J.G.M. et al. Nosocomial outbreak of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a surgical ward: epidemiology and risk factors for acquisition. **Journal Hospital Infection**, v. 37, p. 113-123, 1997.

LI, Y. et al. Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. **Science**, v. 219, p. 143 - 156, 2003.

LIU, Y.G. Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers. **Biochemistry Systematic Ecology**, v. 33, p. 993-1005, 2005.

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

MILLER, M.P. Software **AMOVA-PREP**, disponível em: <http://www.marksgeneticsoftware.net>, 2008.

MUELLER, U.G. & WOLFENBARGER, L.R. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**, v. 14, n. 10, p. 389-394, 1999.

PÉREZ-LOSADA, M.; et al. Phylogenetic relationships among the species of *Aegla* (Anomura: Aeglida) fresh-water crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, n. 2, p. 304-313, 2002.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E. & SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, p. 915-919, 1994.

SEMBLAT, J.P. et al. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 119–125, 1998.

TOTALLAB LTD. Software **TotalLab and Phoretix**, disponível em: <http://www.totallab.com>. 2009.

TRIANAPHYLLIDIS, G.V. et al. International study on *Artemia*. LVII. Morphological and molecular characters suggest conspecificity of all bisexual European and North African *Artemia* populations. **Marine Biology**, v. 129, p. 477–487, 1997.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford university press, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WEETMAN, D. et al. Hierarchical population genetic structure in the commercially exploited shrimp *Crangon crangon* identified by AFLP analysis. **Marine Biology**, v. 151, n. 2, p. 565-575, 2006.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

XU, J., et al. Pleistocene glaciation leaves deep signature on the freshwater crab *Aegla alacalufi* in Chilean Patagonia. **Molecular ecology**, v. 18, p. 904-918, 2009.

YAP, E.S. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Portunus pelagicus* (Crustacea: Portunidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 30–32, 2002.

YUE, G.H. et al. Monitoring the genetic diversity of three sian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites. **Aquaculture**, v. 237, p. 89–102, 2004.

5 CONCLUSÃO

A existência de populações de eglídeos vivendo em simpatria tem sido registrada por alguns autores, porém no Brasil, esta associação nunca foi observada para três espécies. Neste estudo, além de ser registrada a existência de simpatria entre duas espécies de caranguejos do gênero *Aegla*, sendo estas *Aegla platensis* e *Aegla spinipalma* no Rio Batú, também é apresentado o primeiro registro de simpatria entre três espécies de eglídeos para o Brasil, ocorrendo no Rio Cambará, entre as espécies *A. platensis*, *Aegla grisella* e *Aegla* sp. (em preparação).

A existência de simpatria entre as espécies do rio Batú foi confirmada pelas análises do fragmento do gene COI, assim como para as três espécies de eglídeos no Rio Cambará, embora neste último caso os dados moleculares não tenham sido totalmente congruentes com os morfológicos. Algumas sequências de indivíduos de *A. grisella* agruparam com sequências de *A. platensis* e *Aegla* sp. na análise de Neighbor-Joining, além de uma sequência que apresentou uma divergência muito elevada e que ficou isolada no dendrograma. Algumas evidências indicam que estas sequências possivelmente são numts, ou seja, sequências de pseudogenes nucleares.

A técnica de AFLP evidenciou que a existência de simpatria não está relacionada ao nível de diversidade genética de *A. platensis*, o qual foi alto em todas as populações estudadas. Também foi verificado através de altos valores de *Fst*, AMOVA e análise Bayesiana que esta espécie apresenta uma alta estruturação populacional, possivelmente associada à distância entre as populações e à baixa capacidade de dispersão dos eglídeos.

Quando comparados os resultados do marcador mitocondrial COI e do marcador nuclear AFLP, observou-se uma certa incongruência entre os mesmos, visto que usando AFLP todas as populações de *A. platensis* e das demais espécies foram separadas por meio da análise Bayesiana e UPGMA. Entretanto, usando o marcador mitocondrial COI verificou-se que alguns indivíduos de *A. grisella* apresentaram uma alta distância intraespecífica e agruparam com os indivíduos de *A. platensis* e *Aegla* sp. A incongruência entre os dados nucleares e mitocondriais reforça a ideia de que algumas sequências de *A. grisella* são na verdade pseudogenes nucleares co-amplificados com o gene COI, devido à utilização de *primers* universais degenerados na PCR.