



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes


Nathalia Pereira Cavaleiro

**Ecologia molecular de ostras (*Crassostrea* spp.) do Atlântico
Tropical**

Rio de Janeiro
2013

Nathalia Pereira Cavaleiro

Ecologia molecular de ostras (*Crassostrea* spp.) do Atlântico Tropical



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Mateo Solé-Cava

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C376 Cavaleiro, Nathalia Pereira.
Ecologia molecular de ostras (*Crassostrea* spp.) do Atlântico Tropical / Nathalia Pereira Cavaleiro. – 2013.
182 f.

Orientador: Antonio Mateo Solé-Cava.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. *Crassostrea*. 2. *Crassostrea rhizophorae* – Teses. 3. Microsatélites – Teses. 4. Ostras – Criação – Teses. 5. Genética de populações – Teses. I. Solé-Cava, Antonio Mateo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 594.121

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Nathalia Pereira Cavaleiro

Ecologia molecular de ostras (*Crassostrea* spp.) do Atlântico Tropical

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de março de 2013.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Mateo Solé-Cava (Orientador)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Gisele Lobo Hajdu
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Paulo César de Paiva
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Às ostras.

AGRADECIMENTOS

Ao Solé, meu orientador, por ter confiado em mim. Afinal, arriscou orientar uma aluna cujo mestrado foi defendido em virologia molecular e que, então, o procurou pra trabalhar com genética de populações. Obrigada por ter me ensinado tanto, por todo o apoio e pela disponibilidade de sempre.

Ao Cris, que apesar de não ser meu co-orientador oficialmente, agiu como tal durante todo o meu doutorado. Obrigada também pelo imenso carinho e suporte.

Àqueles que colaboraram com as coletas: todos os laboratórios da rede Rede Nacional de Pesquisa em Ostras Nativas; ao Raphael Macieira, pelas amostras de Anchieta (ES); ao Pedro Carvalho, pelas amostras de João Pessoa (PB); ao Yoamel Milán-García, pelas amostras de Cuba; ao Claudio Melo, pelas amostras de Santa Catarina e à Betina, pelas amostras da Argentina.

À Julyanna Andrade, minha aluna de IC, por toda a ajuda essencial na bancada.

Aos laboratórios que me cederam muitos horários para utilização das máquinas de PCR: LabiPor (Lab. de Biologia de Porífera), Lab. de Polychaeta, Lab. de Virologia Molecular e Lab. de Biologia Evolutiva Teórica e Aplicada.

Às técnicas do sequenciador, Aretusa e Bianca.

À Ghennie, em especial, pela ajuda fundamental na reta final.

Aos amigos do laboratório que tornaram tudo mais leve: Anderson, Bianca, Ghennie, Julia, Cris, Haydée, Martinha, Sergim, André, Pedro, Rayssa e Carla.

Às novas meninas, com quem tive menos contato, mas não menos carinho: Isabela, Livia, Rebeca, Luana e Estela.

Aos amigos que me ajudaram com algumas dúvidas: André Elias, Anderson, Haydée e Guerra.

Aos amigos que encheram meus dias de alegria também fora do laboratório: Anderson, Cintia, Michelli, Adrianona e Ceci.

Ao amor

das melhores amigas, Dri, Ghennie, Lia e Thábata;

da minha família, mãe, pai e minha irmã, Nica;

do meu amor, Victor.

Sem o amor e apoio de vocês, tudo isso seria impossível.

Cambia lo superficial
Cambia también lo profundo
Cambia el modo de pensar
Cambia todo en este mundo

Cambia el rumbo el caminante
Aunque esto le cause daño
Y así como todo cambia
Que yo cambie no es extraño

Todo Cambia, Mercedes Sosa

RESUMO

CAVALEIRO, Nathalia Pereira. **Ecologia molecular de ostras (*Crassostrea* spp.) do Atlântico Tropical**. 2013. 182f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Crassostrea (Sacco, 1897) é o gênero mais importante do mundo de ostras de cultivo e consiste de 34 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas do globo. *C. gasar* e *C. rhizophorae* são as duas espécies nativas que estão distribuídas ao longo de toda a costa do Brasil até o Caribe. *C. gasar* também ocorre na costa da África. Ainda que sua distribuição seja extensa e com disponibilidade abundante, o cultivo de ostras nativas no Brasil ainda é incipiente e a delimitação correta dos estoques mantém-se incerta. O sucesso do desenvolvimento da malacocultura, que é recomendada internacionalmente como forma sustentável de aquicultura, depende da resolução desses problemas. Assim, com o objetivo de determinar geneticamente seus estoques no Atlântico como também estimar sua história demográfica, dois diferentes marcadores moleculares foram empregados: sequências de DNA da região controle mitocondrial e loci de microssatélites espécie-específicos, desenvolvidos no presente estudo. Foram sequenciados fragmentos da região controle de um total de 930 indivíduos de *C. gasar* e *C. rhizophorae* coletados em 32 localidades que incluíram o Caribe, a Guiana Francesa, a costa brasileira e a África. Também foram realizadas genotipagens de 1178 indivíduos, e ambas as espécies, com 9 e 11 loci de microssatélites para *C. gasar* e *C. rhizophorae*, respectivamente. Os dados genéticos foram analisados através de diferentes abordagens (índices de estruturação (F_{ST}) e de (Jost D), análise molecular de variância (AMOVA), análise espacial molecular de variância (SAMOVA), Bayesian Skyline Plots (BSP), análise fatorial de correspondência (AFC) e análise de atribuição Bayesiana (STRUCTURE)). Os resultados indicaram um padrão geral de estruturação, onde dois diferentes estoques foram detectados para ambas as espécies: grupos do norte e do sul, onde o Rio de Janeiro seria a região limitante entre os dois estoques. Os maiores valores dos índices de estruturação foram encontrados para *C. gasar*, indicando que esta espécie estaria mais estruturada do que *C. rhizophorae*. As análises demográficas indicaram uma provável expansão das populações durante o último período glacial e uma possível origem americana das populações africanas. Todos os resultados sugeriram a existência de uma barreira geográfica próxima ao Rio de Janeiro, que poderia ser a cadeia de Vitória-Trindade e o fenômeno de ressurgência que ocorre em Cabo Frio (RJ). Esses resultados serão de grande utilidade para estabelecer critérios para seleção de sementes para cultivo ao longo da costa do Brasil que permitirá o manejo adequado dos estoques ostreícolas, prevenindo seu desaparecimento como já ocorrido em outros recifes no mundo.

Palavras-chave: *Crassostrea*. Ostras. Genética de populações. Microssatélites. Região controle.

ABSTRACT

Crassostrea (Sacco, 1897) is the most important genus of cultivated oysters in the world and consisting of 34 species distributed by tropical and temperate regions of the globe. *C. gasar* and *C. rhizophorae* are the two native species which have wide distribution along the entire Brazilian coast up to the Caribbean. *C. gasar* also occurs on coast of Africa. Despite its extensive distribution and abundant availability, cultivation of those oysters in Brazil is incipient, and the correct delimitation of the existing stocks is still uncertain. The successful development of malacoculture which is recommended internationally as an environmentally sustainable form of aquaculture depends on the resolution of these issues. Thus, in order to genetically determinate their stocks in the Atlantic and to estimate their demographic history, two different molecular markers were employed: sequences of the mitochondrial DNA control region and species-specific microsatellite *loci*, developed in the present study. We have sequenced a fragment of the mitochondrial control region from a total of 930 individuals of *C. gasar* and *C. rhizophorae* collected in 32 localities including the Caribbean, French Guyana, Brazilian coast and Africa. We have also genotyped 1178 individuals of both species with 9 and 11 *loci* of microsatellites for *C. gasar* and *C. rhizophorae*, respectively. Genetic data were analyzed with different approaches (fixation (FST) and differentiation (Jost D) indices, analysis of molecular variance (AMOVA), spatial analysis of molecular variance (SAMOVA), Bayesian Skyline Plots (BSP), factorial correspondence analysis (AFC) and Bayesian attribution analysis (STRUCTURE)). The results indicated a general structure pattern, where two different stocks were detected for both species: north and south groups, where Rio de Janeiro would be the limited region between them. Higher values of fixation indices were found for *C. gasar*, indicating that this species would be more structured than *C. rhizophorae*. Demographic analyses showed a probable expansion of populations during the last glacial period and a probable American origin of African populations. All results suggested the existence of a barrier next to Rio de Janeiro, which could be Vitoria-Trindade chain and the upwelling in the region of Cabo Frio (RJ). These results will be useful to establish criteria for the selection of seeds for cultivation along the Brazilian coast which will allow proper management of stocks of oysters preventing its disappearance as in other reefs around the world.

Keywords: *Crassostrea*. Oysters. Population genetics. Microsatellites. Control region.

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	10
1	REVISÃO DA LITERATURA	11
1.1	Sobre detecção de estoques marinhos	11
1.2	Marcadores moleculares	13
1.2.1	<u>Região controle mitocondrial</u>	13
1.2.2	<u>Microsatélites</u>	19
1.3	O gênero <i>Crassostrea</i> e as espécies do Brasil	24
1.3.1	<u>Biologia do gênero <i>Crassostrea</i></u>	27
1.3.2	<u>Importância Econômica e ostreicultura no Brasil</u>	29
1.3.3	<u>Filogeografia e genética de populações do gênero <i>Crassostrea</i></u>	31
1.3.4	<u>Filogeografia de <i>C. gasar</i>, um caso especial</u>	33
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	35
2.1	Objetivos específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Amostragem	37
3.2	Extração de DNA	40
3.3	Sequenciamento de DNA	41
3.3.1	<u>Obtenção dos iniciadores</u>	41
3.3.2	<u>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</u>	43
3.3.3	<u>Reação de Sequenciamento</u>	45
3.3.4	<u>Identificação das espécies</u>	45
3.3.5	<u>Análise dos dados</u>	46
3.3.6	<u><i>Crassostrea sp.</i></u>	48
3.4	Microsatélites: desenvolvimento e análises	48
3.4.1	<u>Células quimiocompetentes</u>	48
3.4.2	<u>Construção da biblioteca enriquecida</u>	49
3.4.3	<u>Amplificação e genotipagem</u>	51
3.4.4	<u>Análise dos dados de genotipagem</u>	54
4	RESULTADOS – CAPÍTULO 1	57
4.1	Região controle mitocondrial	57

4.1.1	<u>Diversidade molecular e análise da estrutura populacional.....</u>	57
4.1.2	<u>Análise demográfica.....</u>	77
4.2	Microssatélites.....	88
4.2.1	<u>Sobre o desenvolvimento dos microssatélites.....</u>	88
4.2.2	<u>Análise dos erros de genotipagem.....</u>	93
4.2.3	<u>Análise da diversidade genética e estruturação populacional.....</u>	96
5	DISCUSSÃO.....	122
5.1	Sobre a dificuldade de amplificação dos loci de microssatélites e o excesso de alelos nulos.....	122
5.2	Estruturação populacional.....	124
5.3	Filogeografia.....	132
5.4	Sobre a população da Guiana Francesa.....	136
6	A NEW OYSTER INVADER (<i>CRASSOSTREA</i> SP.) ON THE EAST COAST OF SOUTH AMERICA (ARTIGO CIENTÍFICO).....	137
7	DISCUSSÃO GERAL.....	148
8	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	151
	REFERÊNCIAS.....	153
	APÊNDICE - Manuscrito submetido a Molecular Biology Reports - Polymorphic microsatellite loci for two Atlantic oyster species: <i>Crassostrea rhizophorae</i> and <i>C. gasar</i>	170

INTRODUÇÃO

Esta tese inclui dados de três diferentes espécies do gênero *Crassostrea* e está dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo inclui resultados e discussão sobre estruturação populacional e demografia das espécies *C. gasar* e *C. rhizophorae*. O segundo capítulo, em formato de artigo, apresenta resultados sobre uma nova espécie invasora detectada na costa da América do Sul, *Crassostrea* sp.

Esta introdução inclui informações relevantes para ambos os capítulos, embora uma introdução específica para a temática do segundo capítulo seja encontrada diretamente nele. E subsequente a eles, apresento uma breve discussão final abrangendo os resultados obtidos nos dois capítulos.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Sobre detecção de estoques marinhos

Segundo dados da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) a produção global total de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos atingiu 148,5 milhões de toneladas em 2010. A produção através de captura mantém-se em torno de 90 milhões de toneladas desde 2001, e o aumento na produção advém da aquicultura, que exibe um forte crescimento, aumentando em uma taxa média anual de 6,3%, de 34,6 milhões de toneladas em 2001 para 59,9 milhões de toneladas em 2010, cujo valor foi estimado em 119,4 bilhões de dólares (1).

Até o fim do século XIX, mesmo os mais proeminentes cientistas proferiam que os recursos pesqueiros seriam inesgotáveis (2). Entretanto, essa concepção foi descreditada à medida que a indústria pesqueira se expandiu e as novas tecnologias permitiram maiores capturas e em áreas mais abrangentes do oceano. Há estimativas de que aproximadamente 25% dos estoques pesqueiros têm sido explorados de maneira não-sustentável (1), e se essas taxas atuais de exploração dos recursos pesqueiros se mantiverem, associadas à degradação ambiental, é possível que o colapso completo da pesca ocorra antes da metade do Século XXI (3).

Os recursos pesqueiros representam as últimas populações não domesticadas do planeta exploradas em larga escala como recurso alimentar humano (4-7). Isso se torna uma problemática de cunho social, ambiental e conservacionista, uma vez que a exploração intensiva e não cuidadosa desses recursos pode levar a uma séria diminuição da viabilidade das espécies exploradas. Assim, a política de manejo dos estoques tem como objetivo principal a conservação do recurso pesqueiro e de sua variabilidade (8). No caso de qualquer população natural selvagem, seu manejo requer um acúmulo de conhecimentos biológicos geralmente complexos, por isso muitas vezes erroneamente aplicados. Um exemplo de conceito biológico conflitante foi a descoberta de que ambientes marinhos não seguem os mesmos padrões que

ambientes terrestres no que diz respeito a grupos tróficos sob maior ameaça de extinção: estudos sobre populações naturais terrestres sugerem que aquelas espécies de maior tamanho corporal e predadores de topo da cadeia estão sob maior risco de extinção que outros, e assume-se comumente que tais padrões também aplicar-se-iam no oceano. Entretanto, recentemente foram sugeridas diferenças fundamentais na maneira que a pesca industrial afeta comunidades naturais (9). Tal falta de informações e a dificuldade de lidar com tantos interesses diversos resultaram, em muitos países, no colapso ou degradação severa de seus recursos pesqueiros (10). Um dos maiores problemas atuais no manejo da pesca é a incapacidade, por parte do poder público de grande parte dos países do mundo, de transformar os dados científicos obtidos em políticas realmente eficientes de manejo da pesca que visem um mínimo de sustentabilidade dessa atividade (11).

O manejo pesqueiro racional deve procurar uma otimização não predatória da exploração, através da sua manutenção em níveis chamados de máximo esforço sustentável, cuja estimativa depende diretamente da caracterização e da delimitação dos estoques de cada espécie explorada comercialmente (12, 13). Considera-se como estoque pesqueiro grupos de indivíduos de uma determinada espécie que se cruzam ao acaso e mantêm uma dinâmica ecológica intrínseca e homogênea, formando uma unidade discernível (14, 15). Estoques pesqueiros apresentam autorecrutamento, o que faz com que estoques diferentes possam representar populações geneticamente estruturadas. Por isso, eles podem ser identificados através da análise de marcadores moleculares adequados, principalmente aqueles com altos níveis de variabilidade genética, como os observados com marcadores de sequências repetitivas como os microssatélites, ou regiões pouco conservadas, como a região controle mitocondrial.

De uma maneira geral, o procedimento usado em genética pesqueira é a amostragem extensiva na área de pesca, seguida de comparações nas frequências gênicas em sistemas polimórficos entre os vários pontos de coleta, visando avaliar se todos fazem parte de apenas uma grande população panmítica (ou seja, se existe apenas um estoque) ou se a variabilidade está distribuída de maneira hierárquica em vários estoques diferentes (16). No primeiro caso, o manejo do recurso deve ser feito de maneira unificada entre

todos os grupos que o exploram, e dados locais de biologia pesqueira podem ser extrapolados para toda a área de estudo. No segundo, o manejo deve ser feito separadamente para cada unidade de pesca, e a abrangência dos dados locais de biologia pesqueira tem de ser limitada à área para o qual eles foram obtidos. Naturalmente, a inexistência de diferenciação gênica entre regiões amostradas não significa, necessariamente, que se tratam de apenas um estoque, já que essa é a hipótese nula do trabalho, que não pode, por uma limitação da própria lógica do teste de hipóteses, ser provada verdadeira. Além disso, estoques podem se apresentar diferenciados do ponto de vista pesqueiro, mas manterem um grau de conectividade gênica entre eles que previne sua diferenciação no nível associado pela genética a populações mendelianas distintas. A delimitação de estoques tem implicações geopolíticas, como a atribuição de responsabilidades na administração dos recursos naturais compartilhados por estados ou países diferentes.

Nesta tese, utilizamos dois marcadores moleculares bastante variáveis de dois genomas distintos: mitocondriais (sequências da região controle) e nucleares (*loci* de microssatélites).

1.2 Marcadores moleculares

1.2.1 Região controle mitocondrial

As mitocôndrias têm sua origem nas α -proteobactérias, procariotos de vida livre e aeróbicos, que contêm entre 3000 a 5000 genes (17). Nos animais, essa organela é controlada por um sistema duplo, em cooperação entre os genes endógenos mitocondriais e outros genes nucleares, com duas diferentes origens: 1) genes mitocondriais translocados para o núcleo durante o curso da evolução e 2) genes nucleares que adquiriram sinais específicos e foram recrutados para funções derivadas na mitocôndria (18).

Algumas características únicas tornam o DNA mitocondrial (mtDNA) uma molécula frequentemente aplicada para estudos evolutivos, que incluem inferências filogenéticas, identificação da origem de determinada espécie,

filogeografia, análise de estrutura populacional e sua dinâmica e evolução molecular (19). Dentre essas características, por exemplo, podemos citar a ausência de íntrons nos genes mitocondriais (com raras exceções, como no caso de alguns cnidários (20), as sequências intergênicas são extremamente curtas ou mesmo inexistentes e alguns de seus genes são sobrepostos) (Figura 1). Além do mais, é um genoma haplóide (e por isso os genótipos mitocondriais são denominados como haplótipos), no qual a recombinação está ausente e que possui herança predominantemente materna (21).

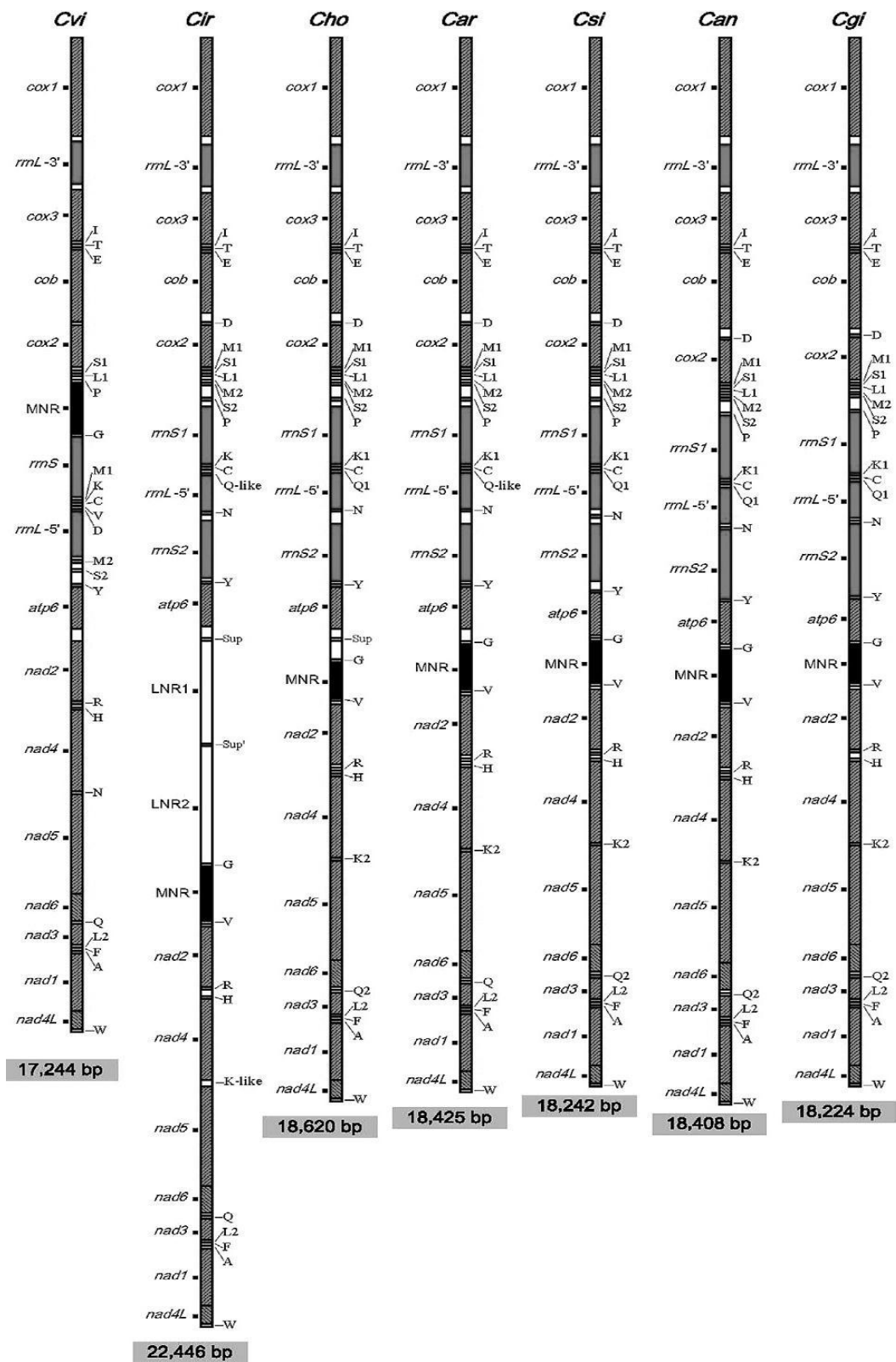


Figura 1: Mapa dos genomas mitocondriais de *Crassostrea hongkongensis* (Cho), *C. ariakensis* (Car), *C. angulata* (Can), *C. gigas* (Cgi), *C. sikamea* (Csi), *C. iredalei* (Cir) e *C. virginica* (Cvi). tRNAs estão representados por uma letra do aminoácido. MNR (Major Non-coding Region) = região controle mitocondrial. Extraído de Liu, Li (22).

A estrutura dos genomas mitocondriais de diferentes espécies exibe um alto nível de variação. O genoma mitocondrial (mtDNA) do parasita da malária *Plasmodium falciparum*, por exemplo, contém apenas 3 genes codificadores de proteínas, enquanto outra espécie de protista, *Reclinomas americana*, possui 97 genes codificantes (23). Apesar da enorme variação no tamanho, a função de codificação do genoma mitocondrial permanece relativamente estável em animais (24), que apresentam um mtDNA circular (com raras exceções, (25)), que contém genes para 13 proteínas, 2 RNAs ribossomais e 22 RNAs de transferência (26), compreendidos entre 12 e 20 kb. Em geral, os mtDNAs codificam apenas para genes envolvidos no aparato de tradução mitocondrial, transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. Adicionalmente, existe uma região não-codificante rica em A+T que contém elementos regulatórios para transcrição e replicação. Tal sequência é denominada como **região controle mitocondrial** (ou *d-loop*) (27) e justamente por ser uma região não-codificante é reconhecida por conter regiões hipervariáveis que formam estruturas secundárias relativamente conservadas com função de reconhecimento a proteínas regulatórias (Figura 2). Esta variabilidade intraespecífica presente em tal região reguladora no genoma mitocondrial é o que permite sua utilização para estudos de detecção e análise de estruturas populacionais.

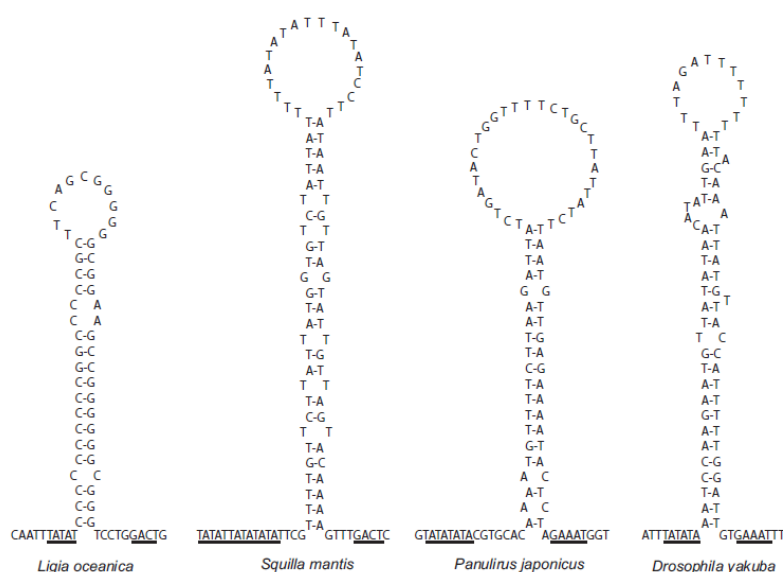


Figura 2: Estruturas similares em forma de grampo presentes na região controle mitocondrial de quatro espécies do filo Arthropoda. Motivos conservados nas regiões flanqueadoras 5' e 3' estão sublinhados. (Extraído de Kilpert and Podsiadlowski (28)).

A haploidia, associada à ausência de recombinação e a herança materna tornam as sequências haplotípicas de mtDNA marcadores moleculares também adequados para estimar a história matrilinear de indivíduos e populações. A transmissão maternal do mtDNA é análoga à transmissão masculina de sobrenomes (29). Na maioria das sociedades humanas, filhos de ambos os sexos assumem o sobrenome paterno, que apenas os filhos homens passam para sua prole. De maneira similar, também filhos e filhas recebem o genótipo mitocondrial materno, onde apenas as fêmeas passam adiante à progênie. Esse tipo de transmissão é muito adequado para seu estudo através da teoria da coalescência, que consiste em traçar a ancestralidade de todos os alelos de um gene compartilhado por todos os membros de uma população até convergir em uma cópia única do ancestral comum mais recente (MRCA, do inglês, *most recent common ancestor*) (30, 31). As relações de herança entre alelos são tipicamente representadas como uma genealogia gênica, semelhante a uma árvore filogenética (Figura 3).

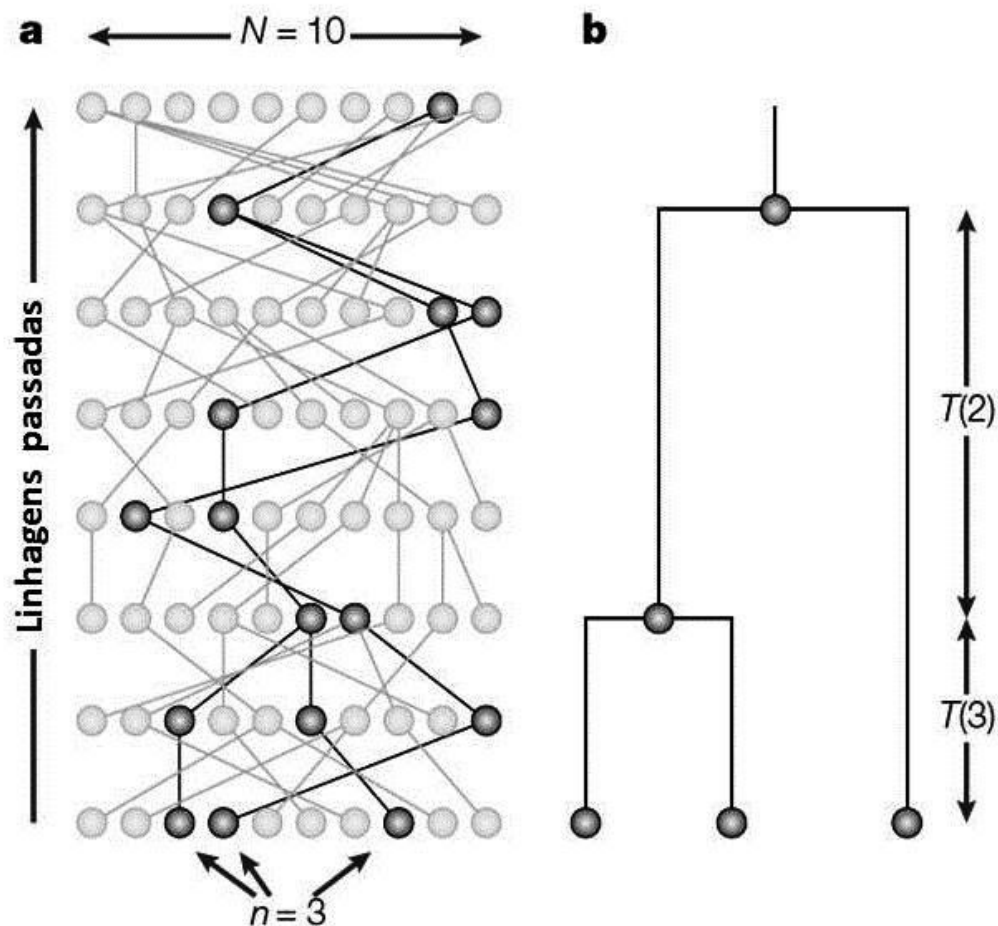


Figura 3: Representação esquemática do princípio básico da teoria da coalescência. A) Genealogia completa para uma população de dez indivíduos haplóides. Eventualmente todas as linhagens coalescem em uma única linhagem, o MRCA; no caso, três linhagens amostradas têm sua ancestralidade traçada (linhas em preto) até o ancestral comum. B) Subgenealogia para as três linhagens amostradas. $T(2)$ e $T(3)$, eventos de coalescência; N , número de cópias de alelos na população; n , tamanho da amostra. (Figura modificada de Rosenberg and Nordborg (32)).

O estudo do processo de coalescência é uma ferramenta matemática poderosa para estimativa do tempo decorrido entre a introdução de uma mutação e o surgimento de um alelo particular ou da distribuição de genes de uma população. Este período de tempo a ser estimado refere-se ao número de gerações decorridas desde o aparecimento do MRCA. A probabilidade de duas linhagens coalescerem na geração imediatamente anterior é equivalente à probabilidade deles compartilharem um parente: $1/N_e$ (onde N_e = tamanho efetivo da população). A cada geração precedente sucessiva, a probabilidade de coalescência é distribuída geometricamente, ou seja, é a probabilidade de

não coalescer na geração precedente $t-1$ multiplicada pela probabilidade de coalescer na geração de interesse:

$$P_c(t) = (1 - 1/N_e)^{t-1} (1/N_e)$$

Onde P_c é a probabilidade de coalescência, t é o número de gerações e N_e , o tamanho efetivo da população.

Os dados genéticos acima descritos, que são fornecidos especialmente pelas sequências de região controle mitocondrial, mostram-se adequados, portanto, a diferentes abordagens analíticas, que incluem a delimitação de estoques, análises filogeográficas (33) e demográficas.

1.2.2 Microsatélites

Os microsatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) ou ainda VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) são marcadores moleculares altamente polimórficos compostos por variações no número de pequenas sequências repetitivas (de 1-6 nucleotídeos) e que são amplamente distribuídos ao longo do genoma, seja nas regiões codificantes ou não-codificantes, tanto de procariotos quanto de eucariotos (34). O termo conhecido como DNA satélite originou-se na década de 60, através da observação de uma fração à parte durante uma centrifugação de gradiente de densidade, detectado como um “pico satélite”. Este foi subsequentemente identificado como sendo composto de grandes repetições *in tandem* da região centromérica. Mais tarde, cunhou-se o termo minissatélite para sequências formadas por repetições de 10-30 nucleotídeos. E, finalmente, a descoberta de sequências com repetições menores permitiu a denominação dos microsatélites.

Atualmente, os microsatélites são os marcadores mais empregados em estudos de genética pesqueira (35), devido a seus elevados níveis de polimorfismo, sua fácil interpretação e o fato de serem marcadores co-dominantes (36). Essas características tornam esses marcadores extremamente robustos para estudos de identificação de estoques (37, 38),

testes de paternidade (39, 40), identificação forense de pescado (41, 42) e testes de atribuição de indivíduos de origem desconhecida (43, 44).

A alta variabilidade dos *loci* de microssatélites pode ser explicada com base no modelo formulado por Levinson and Gutman (45), conhecido como “deslizamento da replicação”. Durante o processo de replicação do DNA, se a extremidade 3' da fita nascente volta a hibridizar à montante com a repetição complementar da fita molde, será formada uma alça na fita nascente e, assim, a nova fita será maior que a fita molde (Figura 4A). Inversamente, se o alinhamento incorreto ocorrer à jusante ao longo da fita molde, a fita recém-sintetizada será menor que a sequência molde (Figura 4B). Outra fonte para produção de novos alelos de microssatélites seria a recombinação através de pareamento desigual.

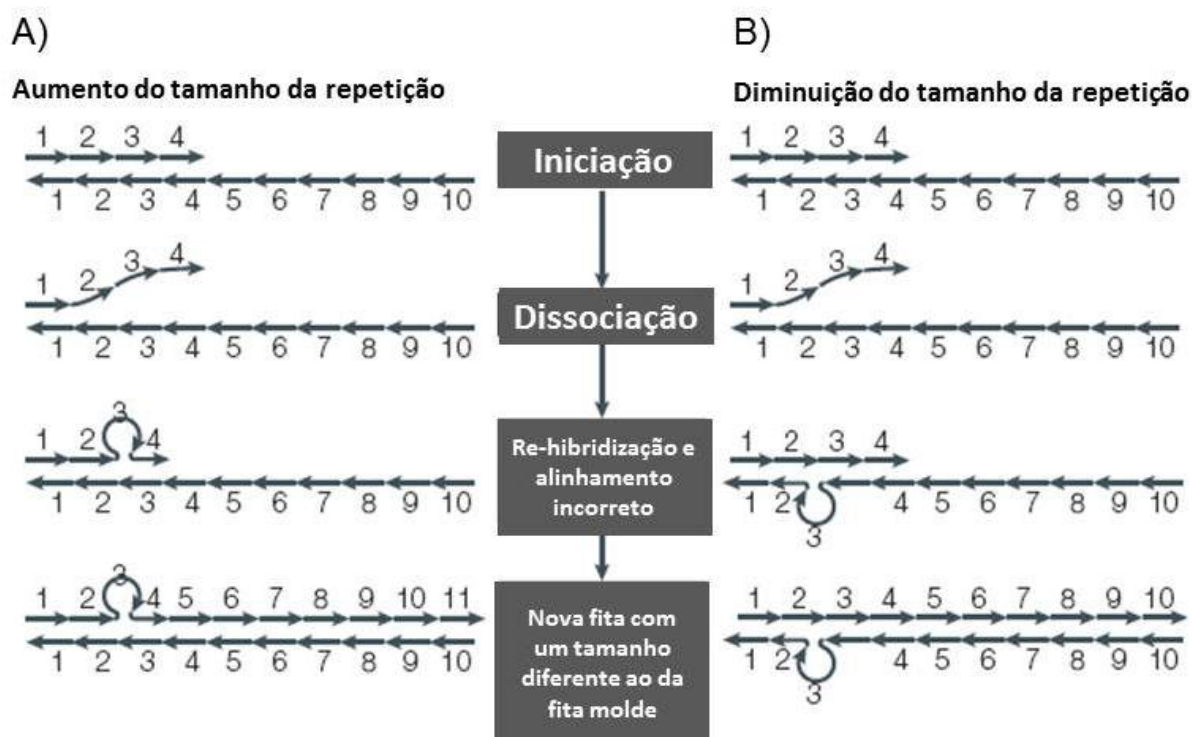


Figura 4: Modelo de mutação de microssatélites através de deslizamento na replicação. As unidades de repetição estão representadas por setas, indicando também o sentido 5'-3' da fita. A) Alça formada na fita nascente, durante pareamento inadequado à montante do que seria o alinhamento correto, formando uma nova fita maior que a molde. B) Situação inversa, onde a alça forma-se na fita molde, gerando um alinhamento errado à jusante ao longo da mesma, que permite a síntese de uma fita menor que a molde. (Modificado de Ellegren (46)).

A taxa de mutação dos microssatélites, por *locus* por geração, é frequentemente estimada na faixa de 10^{-3} até 10^{-4} , notadamente muitas ordens de magnitude maior que a taxa normal de mutação nas sequências de DNA eucariótico que é de 10^{-9} por nucleotídeo por geração (47, 48). Ademais, a taxa de mutação dos microssatélites é dependente principalmente do seu comprimento, que proporciona taxas diferenciadas não apenas entre espécies, mas também entre indivíduos (49). Dessa maneira, *loci* mais longos mutariam com maior frequência que *loci* curtos (48, 50). A taxa mutacional não varia apenas com o comprimento, mas também de acordo com a sua composição - microssatélites puros (com um único tipo de repetição: apenas $(CA)_n$ ou apenas $(TA)_n$) são mais variáveis que aqueles compostos (exemplo: $(CA)_{10}(TA)_5$) ou interrompidos $((CA)_2 TT(CA)_4 TT(CA)_3)$ – bem como de sua região flangeadora, que pode conter regiões de modificadores *cis*-atuantes que afetam a taxa de mutação. Como a complexidade de formação dos microssatélites e sua inconstante taxa mutacional não seguem o padrão de outras sequências, existe uma incongruência com relação à escolha do modelo de mutação mais adequado para este marcador.

O Modelo de Alelos Infinitos (IAM, do inglês, *Infinite Allele Model* (51)) é comumente aplicado à substituição de bases em análise de sequências, como a região controle mitocondrial, por exemplo. Esse modelo postula que cada mutação cria um novo alelo numa taxa μ , onde todos os alelos seriam igualmente diferentes entre si. O IAM nem sempre é aplicável para microssatélites: em contraste às substituições nucleotídicas, alelos de microssatélites podem ser idênticos em sua estrutura, sem que sejam, necessariamente, por descendência. Por exemplo, no caso de dois alelos $(GT)_{17}$, advindos de indivíduos diferentes de uma mesma população, podem ter alcançado esse estado a partir de alelos $(GT)_{16}$ ou $(GT)_{18}$ com maior probabilidade que de quaisquer outros.

Um modelo de mutação teoricamente mais aplicável aos microssatélites é conhecido como passo-a-passo (SMM, do inglês, *Stepwise Mutation Model* (52)). Esse modelo conjectura que cada mutação adiciona ou subtrai (com igual probabilidade μ) uma única unidade a/do alelo ancestral. Distintamente do modelo IAM, onde cada alelo tem a mesma chance de ter se originado de outro, no SMM os alelos de tamanho similar seriam mais próximos em termos

de passos mutacionais do que aqueles de tamanhos muito diferentes. Em outras palavras, o processo de mutação do SMM possui uma memória. Outros modelos evolutivos são também considerados para microssatélites, sendo todos derivados do SMM, uma vez que este modelo é considerado muito simples. Modelos mais complexos foram descritos, que incluem restrição dos limites (53, 54) ou taxas de mutação dependentes do comprimento da sequência(55). O esquema a seguir elucida alguns desses modelos (Figura 5).

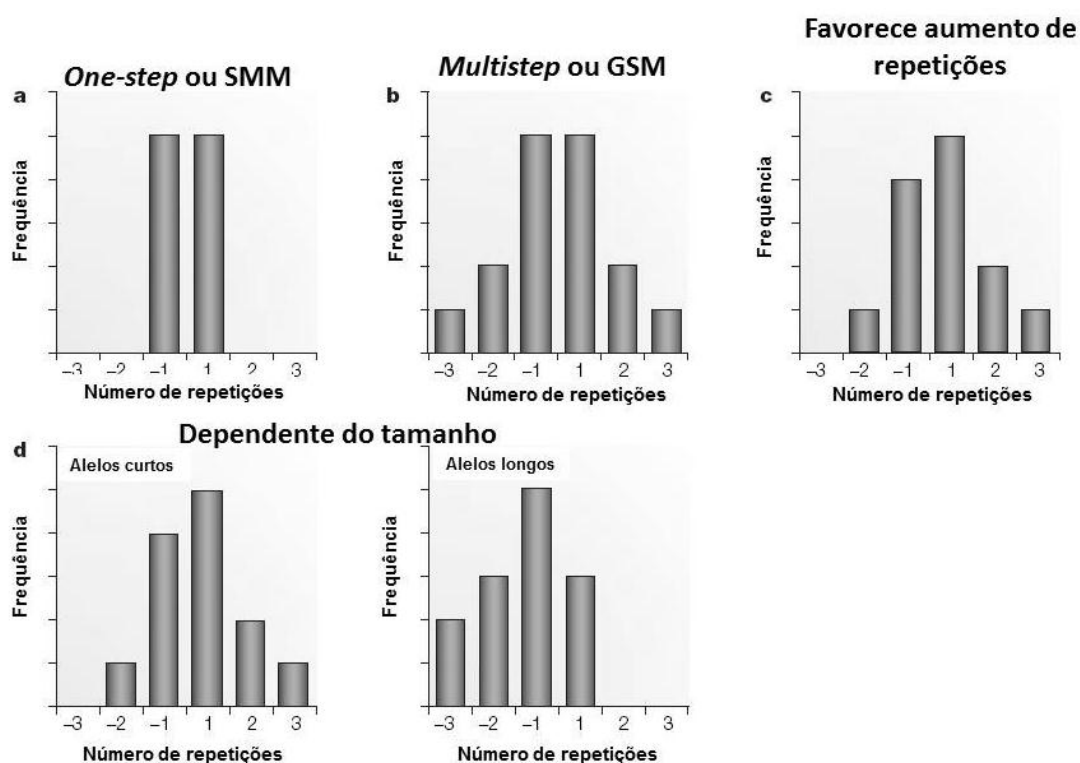


Figura 5: Modelos de mutação de microssatélites: Representações gráficas da magnitude e direção dos eventos de mutação de acordo com as diferentes formas de SMM. +1 equivale ao ganho de uma repetição, -1 é a perda de uma repetição, e assim sucessivamente. A) Modelo simples de SMM que envolve um passo mutacional. B) Modelo que envolve múltiplos passos mutacionais. C) Modelo que favorece a expansão da repetições. D) Modelo dependente do tamanho, onde alelos menores tendem a aumentar, enquanto alelos longos tendem a contrair. Extraído e modificado de Ellegren (46)).

Entretanto, como implicação desses modelos de mutação, a taxa de homoplasia em microssatélites é bastante alta. Dois alelos são reconhecidos como idênticos por descendência (IBD, do inglês, *Identical by Descent*) se eles descendem, sem qualquer mutação, do mesmo alelo ancestral. De forma distinta, alelos de microssatélites podem ter o mesmo tamanho e mesma

sequência (são idênticos no estado, IIS, do inglês, *Identical in State*), mas ainda assim, não seriam necessariamente IBD. Homoplasia é resumidamente definida como a ocorrência de alelos que são IIS, embora não IBD. Isso pode ser especialmente problemático quando sob o modelo SMM, uma vez que se espera uma alta taxa de homoplasia. A homoplasia pode ser detectada em microssatélites com a análise de sua sequência, mas não isto não excluiria todas as possibilidades de homoplasia. No caso de microssatélites puros, uma alternativa poderia ser a análise da constituição nucleotídica da região flanqueadora. Entretanto, são abordagens econômica e temporalmente dispendiosas, que reduziriam a praticidade da utilização dos *loci* de microssatélites como marcadores moleculares.

As estatísticas utilizadas para analisar a distribuição da variação genética dentro e entre populações, em geral, baseiam-se na ideia de IBD, assumindo que os *loci* estudados evoluem sob o modelo mutacional de alelos infinitos (IAM), como no caso do índice de endocruzamento F_{ST} . Se fosse confirmado que os microssatélites seguem o IAM, automaticamente seria assumido que IBD e IIS são iguais e, portanto, o modelo IAM poderia ser aplicado. Todavia sob o SMM, há uma ampla diferença entre IIS e IBD que é atribuída à homoplasia. Slatkin (56) introduziu um novo parâmetro R_{ST} que assume *loci* evoluindo sob o modelo SMM.

Os microssatélites são ainda considerados marcadores moleculares de alta resolução para aplicação em genética de populações, enfatizando a detecção de estruturação populacional e delimitação de estoques. No entanto, ainda não existe um consenso sobre sua utilização em análises filogeográficas e demográficas, cujas abordagens são estritamente dependentes do modelo evolutivo aplicado. Isso ocorre justamente devido à dificuldade de selecionar um modelo evolutivo adequado. Idealmente, seria necessário que houvesse um modelo de mutação para cada *locus* específico.

1.3 O gênero *Crassostrea* e as espécies do Brasil

O gênero mais importante das ostras cultivadas no mundo é o gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) constituído de 34 espécies atuais distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas do globo (Tabela 1, levantamento realizado nesta tese), cuja maior diversidade é encontrada no continente asiático. A única espécie do gênero originalmente descrita como europeia (*C. angulata* Lamarck, 1835) foi posteriormente considerada como sendo de origem asiática, mais precisamente de Taiwan (57).

No Brasil, assumia-se a existência de apenas uma espécie desse gênero (*C. rhizophorae* Guilding, 1828). Entretanto, estudos genéticos com análise de 17 *loci* de aloenzimas revelaram que a espécie *C. brasiliiana* Lamarck, 1819, considerada um sinônimo júnior de *C. rhizophorae* era, de fato, uma espécie biológica diferente (Ignacio et al 2000). Subsequentemente, verificou-se, através de análises moleculares (aloenzimas, sequências de espaçadores ribossomais e dos genes mitocondriais citocromo oxidase 1 e 16S) que *C. brasiliiana* era, na verdade, a mesma espécie que a ostra africana *C. gasar* (Andanson, 1757) da qual seria, portanto, um sinônimo júnior (58, 59), sem que ficasse estabelecido, até agora, se essa espécie se originou na África ou na América do Sul. As espécies do gênero que ocorrem na costa brasileira são, portanto, *Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae*.

Tabela 1: Espécies atuais do gênero *Crassostrea* e sua distribuição geográfica (informações compiladas nesta tese). *Ocorrência em dois continentes

Espécie	Origem
África	
<u><i>Crassostrea denticulata</i></u>	África Ocidental
<u><i>Crassostrea margaritacea</i></u>	África do Sul
<u><i>Crassostrea cucculata</i></u>	África Oriental
<u><i>Crassostrea forskali</i></u>	Mar vermelho
<u><i>Crassostrea gasar</i> *</u>	Costa do Brasil e África
Ásia	
<u><i>Crassostrea amasa</i></u>	Austrália
<u><i>Crassostrea commercialis</i></u>	Austrália
<u><i>Crassostrea nippona</i></u>	China e Japão
<u><i>Crassostrea plicatula</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea madrasensis</i></u>	Índia
<u><i>Crassostrea cuttackensis</i></u>	Índia
<u><i>Crassostrea discoidea</i></u>	Índia
<u><i>Crassostrea ariakensis</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea belcheri</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea gigas</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea hongkongensis</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea iredalei</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea rivularis</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea sikamea</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea lugubris</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea mordax</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea nigromarginata</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea vitreofacta</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea bilineata</i></u>	Indo-Pacífico
<u><i>Crassostrea laperousi</i></u>	Japão
<u><i>Crassostrea glomerata</i></u>	Nova Zelândia
<u><i>Crassostrea angulata</i></u>	Taiwan
América	
<u><i>Crassostrea virginica</i></u>	Atlântico norte
<u><i>Crassostrea columbiensis</i></u>	Costa Rica, Peru e Colômbia
<u><i>Crassostrea corteziensis</i></u>	Golfo da Califórnia no México ao Peru
<u><i>Crassostrea palmula</i></u>	Golfo da Califórnia no México ao Peru
<u><i>Crassostrea iridescens</i></u>	México
<u><i>Crassostrea chilensis</i></u>	Chile
<u><i>Crassostrea rhizophorae</i></u>	Mar do Caribe e Costa do Brasil
<u><i>Crassostrea brasiliiana</i> (sin. <i>C. gasar</i>*)</u>	Guiana Francesa, costa do Brasil e África

Crassostrea gasar e *C. rhizophorae* têm ampla distribuição litorânea (60, 61), ao longo de toda a costa brasileira. *C. gasar* tem registros até a Guiana Francesa (59) e *C. rhizophorae* estende-se até o Mar do Caribe e

costuma ser mais abundante ao longo de sua distribuição (Figura 6). Ao sul do Espírito Santo, no entanto, *C. gasar* tem sua densidade gradualmente aumentada atingindo dominância completa nas zonas mais temperadas. Na África, *C. gasar* estende-se através da costa do Senegal até Angola.

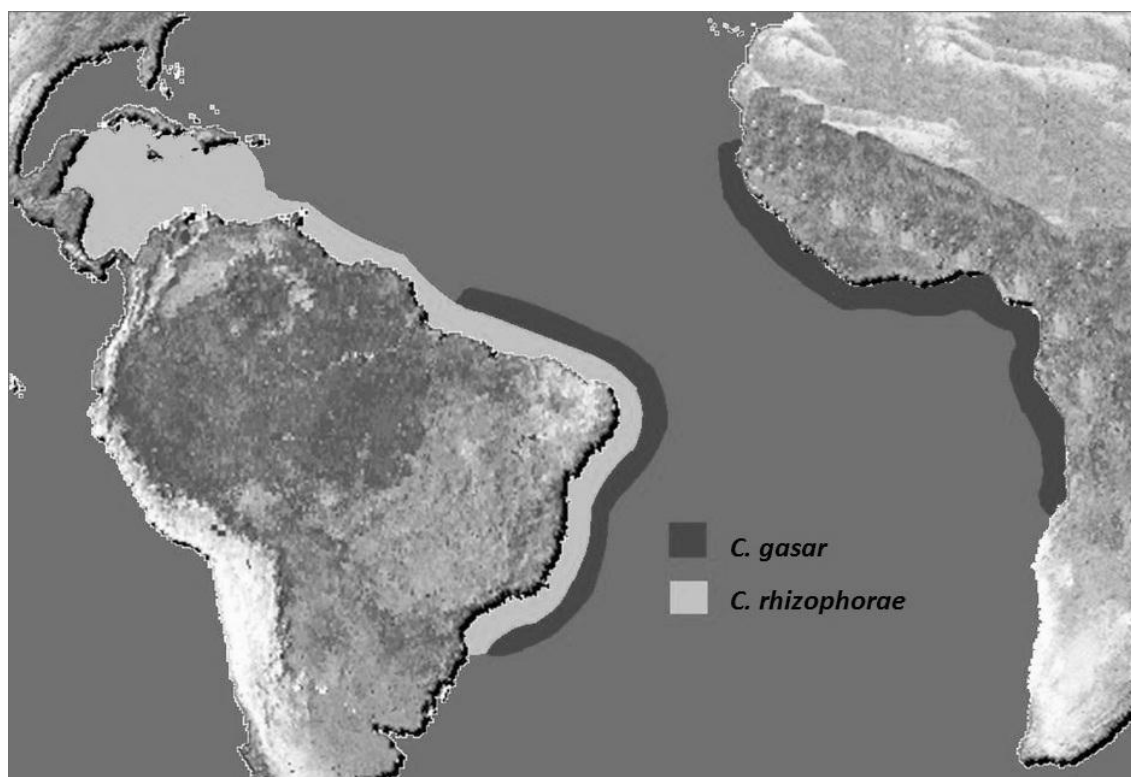


Figura 6: Mapa da distribuição das espécies de *Crassostrea* no Brasil: *C. rhizophorae* e *C. gasar*.

Crassostrea rhizophorae é encontrada na região entre-marés, fixada nas raízes de *Rhizophora mangle* ou no costão rochoso e, por causa de sua procedência, é conhecida como ostra-do-mangue (62). *C. gasar* é comumente encontrada no infralitoral e em fundos lodosos, embora também já tenha sido observada fixada em raízes ou no costão rochoso (63), e atingem um tamanho maior que *C. rhizophorae*: *C. gasar* tem tamanho normal de até 10,5 cm, com alguns indivíduos podendo chegar a 25 cm (64), enquanto que *C. rhizophorae* tem tamanho de cerca de 5 cm, podendo chegar a 10 cm. Essas duas espécies são, morfologicamente, bastante semelhantes (Figura 7) e possuem alta plasticidade fenotípica, o que dificulta a sua identificação. Entretanto, a distinção pode ser feita com base em alguns caracteres conservados da concha e, no caso de ambiguidades, confirmada por análise de fragmentos de restrição de genes mitocondriais (PCR/RFLP de 16S e COI) (65).



Figura 7: *C. gasar* (1, 2 e 3) e *C. rhizophorae* (4, 5 e 6). Modificado de Lazoski, Gusmão (58).

1.3.1 Biologia do gênero *Crassostrea*

Alguns dos caracteres diagnósticos do gênero incluem a presença de uma larva não-incubatória, a valva esquerda mais convexa que a valva direita, alongamento dorsoventral e uma passagem promial do lado direito nos adultos (62). Além disso, distintamente das espécies do gênero *Ostrea*, ostras do gênero *Crassostrea* não apresentam dentículos internos próximos à borda da concha, sendo esta totalmente lisa.

As ostras do gênero são ovíparas, sendo os indivíduos hermafroditas incompletos ou protândricos. Inicialmente a gônada contém células antecedentes de ambos os sexos, mas sua natureza protândrica é manifestada com o início do processo de espermatogênese que ocorre em cerca de 90% dos animais que estão sexualmente maduros a partir de 120 dias após a fixação (em torno de 2 cm). Indivíduos com idade entre 6 e 18 meses (cerca de

4 a 6 cm) são majoritariamente fêmeas (66). Os espermatozóides são liberados na água através do fluxo exalante, enquanto que os ovos são expelidos para o ambiente externo pela contração do músculo adutor, por meio de uma pequena janela que se abre entre a câmara inalante e a margem do manto. A fertilização ocorre na coluna d'água e dentro de 48h o zigoto transforma-se em larva planctotrófica, denominada véliger, que permanece na coluna d'água por cerca de 2 a 3 semanas antes da fixação (67). Sob condições hidrográficas apropriadas, a larva livre-natante pode ter o potencial de ser dispersa por até 1300 km (68).

O desenvolvimento larval é composto de 3 estágios: larva D, umbo e pedivéliger (69). As duas primeiras fases são livre-natantes, sendo a segunda caracterizada pela formação e crescimento do umbo. Na fase pedivéliger, quando o pé toca uma superfície sólida e a larva encontra condições favoráveis para a fixação, ocorre o assentamento final, através da secreção de cimento liberada pela glândula do bisso, ocorrendo a fixação definitiva em substrato duro. A mudança de larva para ostra juvenil começa imediatamente. Durante a metamorfose, os órgãos larvais desaparecem, o pé é reabsorvido e o músculo retrator do velum desaparece, pondo fim à fase larval (69-71).

As duas espécies brasileiras reproduzem durante todo o ano, entretanto há picos de desova diferentes para cada uma. Para *C. rhizophorae*, a desova ocorre principalmente em março e outubro, enquanto para *C. gasar* os picos reprodutivos acontecem nos períodos de janeiro a junho e outubro a dezembro (66).

A salinidade ótima para *C. rhizophorae* varia de 0,72 a 2,88 ‰, ao passo que para *C. gasar* varia de 0,8 a 3,4 ‰. Apesar disso, as duas espécies suportam grandes variações de salinidade (de 0 no período de chuvas, até 4‰, no período seco) (Nascimento 1991). Quanto à temperatura, ambas espécies toleram bem grandes variações, mas em geral a temperatura ótima está entre 25 e 30 °C (66).

Como todos os bivalves, essas ostras são filtradoras de fitoplâncton e outras substâncias orgânicas que estejam em suspensão, sendo capazes de filtrar partículas desde 1µm a 98µm dentro de um volume de até 400L por dia (72).

1.3.2 Importância Econômica e ostreicultura no Brasil

As ostras compõem o grupo de moluscos marinhos de maior importância econômica mundial. Dados do Departamento de Pesca e Aquicultura da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) indicam que sua produção média global foi de 4,6 milhões de toneladas em 2010, cujo total referente à captura de populações naturais (apenas 0,2%) apresentou um decréscimo significativo de 30% no período de 2004 a 2010. De acordo com Beck, Brumbaugh (73), séculos de extração desregulada em diversas baías ao redor do mundo eliminaram mais do que 99% dos seus recifes ostreícolas que já podem ser considerados funcionalmente extintos.

No Brasil, os bancos de ostras do nordeste e sudeste também foram intensamente danificados, com perda de 50 a 89% (73). Do gênero *Crassostrea*, por enquanto, existe apenas um registro de extinção funcional na região da América Latina: em 1996, a espécie *C. rhizophorae* desapareceu completamente de uma região da Colômbia.

A malacocultura no Brasil tem registros de seu início em 1934, mas sua comercialização foi massivamente difundida apenas a partir de 1971, nas regiões Sudeste e Sul. O estado de Santa Catarina foi pioneiro no estabelecimento da malacocultura, que surgiu como uma alternativa para substituir a pesca artesanal decadente, em decorrência do aumento da pesca industrial e do desrespeito ao período de defeso de algumas espécies. Inicialmente, o cultivo de ostras era apenas uma opção de complementação de renda para os pescadores artesanais, mas, com o decorrer dos anos, passou a representar a principal fonte de renda.

A produção brasileira de ostras em 2010 alcançou 3.131 toneladas, do qual cerca de 61% é relativo à aquicultura de uma espécie exótica no estado de Santa Catarina, a ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*), com valor correspondente a R\$ 9.921.600,00 (1) O restante é referente, em sua maioria, à pesca extrativa artesanal das espécies nativas, com produção concentrada em alguns estados da região Nordeste.

Ainda que sua distribuição seja extensa e com disponibilidade abundante, os valores citados acima, comparados aos valores globais, demonstram que o cultivo de ostras nativas no Brasil ainda é incipiente. Isso se deve à recente dubiedade com relação à sistemática dessas ostras, bem como à incerteza sobre a quantidade de estoques existentes e seus limites. O sucesso do desenvolvimento da malacocultura depende da resolução desses problemas. E como explicado anteriormente nesta introdução, a delimitação dos estoques é feita geneticamente com sistemas polimórficos através da comparação das frequências gênicas de diferentes populações amostradas ao longo da área a ser explorada (74). Assim, pode-se avaliar de que forma a variabilidade está distribuída, ou seja, se estas populações fazem parte de apenas uma única unidade panmítica (se existe apenas um estoque) ou se existem vários estoques diferentes (16), condições que requerem diferenciais manejos do recurso disponível (item 1.1).

Uma vez estabelecidos os estoques e suas condições de manejo, é necessário ter o conhecimento da sua taxa de crescimento e o ciclo reprodutivo para posterior coleta de sementes, a fim de impedir a ocorrência de contaminação através da invasão de outras espécies, evitando a redução da produtividade. Para isso, é necessário certificar a identidade da espécie cultivada. O problema envolvendo a taxonomia dessas ostras, entretanto, já foi resolvido com o desenvolvimento de marcadores moleculares espécie-específicos no nosso (63, 65) e em outros laboratórios (Pie et al 2006).

A malacocultura é recomendada internacionalmente, inclusive pela Organização das Nações Unidas, como uma forma de aquicultura ambientalmente sustentável. O fomento e o incentivo do cultivo sustentável de moluscos promovem também a preservação e a manutenção dos recursos naturais marinhos. Essa atividade não só provê uma colheita sustentável de alta qualidade, como também possibilita a fixação de comunidades tradicionais costeiras em seus locais de origem, gera empregos e desenvolvimento social local, ao mesmo tempo em que proporciona benefícios tangíveis ao ambiente marinho.

1.3.3 Filogeografia e genética de populações do gênero *Crassostrea*

Os primeiros trabalhos de genética de populações de *Crassostrea* foram realizados nas décadas de 70 e 80, com a ostra do Pacífico, *C. gigas*, (75-77) e a ostra do Atlântico Norte (espécie mais próxima de *C. rhizophorae* e *C. gasar*), *C. virginica* (67, 78), que compõem a maioria das publicações na área até hoje. Em resumo, os estudos da ostra do Atlântico indicam uma estruturação populacional entre o Golfo do México e o Atlântico com uma clina de diferenciação genética ocorrendo ao longo da costa oriental da Península da Flórida que coincide com uma região de transição climática (79, 80). Esse padrão de diferenciação entre populações do Atlântico e do Golfo do México repete-se em outras espécies, como em peixes-sapo, *Opsanus tau*, (81) e o caranguejo-ferradura, *Limulus polyphemus* (82).

Apesar da maior diversidade de espécies do gênero *Crassostrea* se encontrar na Ásia, é nítida a escassez de trabalhos de genética de suas populações, causado, entre outros fatores, porque muitos dos problemas taxonômicos do gênero não foram resolvidos naquela região. Dentre os poucos estudos já realizados, destacam-se aqueles com *C. gigas* (83, 84), *C. plicatula* (85, 86), *C. ariakensis* (87) e *C. rivularis* (88). Ainda assim, pouco se sabe sobre as populações naturais dessas espécies, uma vez que a maioria desses estudos privilegiou a análise de populações de cultivo com o objetivo de monitorar a manutenção da sua diversidade genética.

Existe apenas um estudo de genética de populações naturais de uma das espécies americanas do Pacífico, *C. corteziensis*, que utilizou 4 *loci* de aloenzimas e um fragmento de 16S (89). Observou-se uma baixa diferenciação populacional na costa do Golfo da Califórnia, indicando haver alto fluxo gênico, pelo menos nos restritos pontos geográficos de coleta que não abrangem sua área de distribuição. Um trabalho recente do nosso Laboratório constitui o único estudo sobre a estruturação das populações de *C. gasar* e *C. rhizophorae* na costa do Brasil (58). Através da análise de 15 *loci* de aloenzimas e um fragmento de 661pb de COI, sugeriu-se a existência de três estoques distintos de *C. gasar* (o quarto estoque seria referente à população do Senegal), e oito estoques de *C. rhizophorae* (que incluem a população do

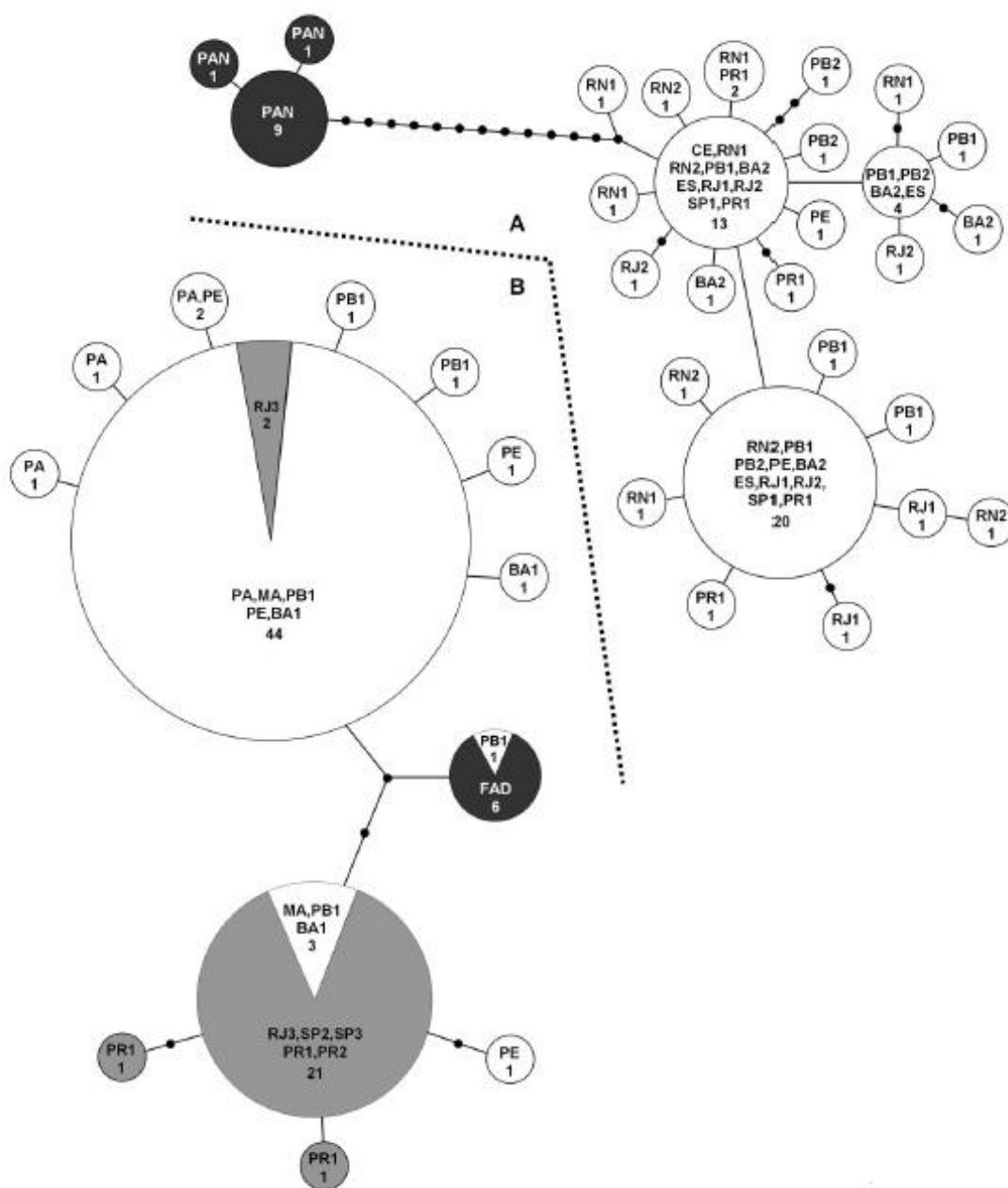


Figura 8: Rede haplotípica de COI para *C. rhizophorae* (A) e *C. gasar* (B). PAN-Panamá e FAD-Senegal. Os demais são as siglas dos estados do Brasil. Extraído de Lazoski, Gusmão (61).

1.3.4 Filogeografia de *C. gasar*, um caso especial

A distribuição transatlântica de *C. gasar* é considerada incomum devido ao baixo potencial de dispersão das larvas desse gênero, que, apesar de planctônicas, permanecem pouco tempo na coluna d'água (2-3 semanas) o que dificultaria sua sobrevivência por transporte natural pela corrente sub-equatorial, que atualmente leva, entre as ilhas da África ocidental e as ilhas da costa brasileira mais de um ano (90). Por outro lado, o transporte antropogênico também é pouco provável, pois existem registros de fósseis de *C. gasar* em sambaquis do Senegal e do sudeste do Brasil que datam do período pré-Colombiano (cerca de 4000-6000 anos atrás) (61). Deste modo, essa singular distribuição termina por instigar a formulação de diversas hipóteses filogeográficas sobre sua história demográfica.

A hipótese vicariante é preliminarmente excluída baseando-se no fato de que a separação dos continentes africano e sul-americano ocorreu no Cretáceo inferior (cerca de 130-110 m.a.), enquanto acredita-se que o gênero *Crassostrea* tenha se originado apenas no Cretáceo superior, com registros de *C. soleniscus* e *C. cusseta* Sohl & Kauffman, 1964, ou mais tardiamente no período Jurássico médio com *C. tetoriensis* Komatsu & Chinzei, 2002 (Komatsu et al. 2002). Além do mais, ainda que *C. gasar* tivesse se originado antes da separação dos continentes, em 100 milhões de anos, essas populações teriam divergido o suficiente a ponto de não serem mais consideradas a mesma espécie, o que não é compatível com o baixo grau de diferenciação genética observado entre populações dos dois continentes (menos do que 1% de divergência entre sequências de CO1; Lazoski et al. 2011). Por conseguinte, é provável que sua atual distribuição seja resultante de uma colonização posterior ao surgimento da espécie e à separação dos continentes, muito embora ainda não seja conhecida a polaridade dessa colonização (da África em direção à América do Sul, ou o contrário).

Lapègue e colaboradores (91) conjecturam que *C. gasar* teria sido transportada da África para a América do Sul devido ao padrão predominante

de circulação de correntes nessa região do Oceano Atlântico, hipótese também defendida em trabalho anterior (92). Entretanto, de acordo com sua posição na árvore filogenética (Figura 2B do item 6), que forma um clado monofilético com *C. corteziensis* (ostra americana do Pacífico), essa espécie aparenta ter origem nos mares da América. Essa hipótese também seria sustentada pela observação de que a diversidade nucleotídica de COI de *C. gasar* brasileira seria maior que a africana (58), ainda que o oposto tenha sido encontrado em outro estudo (Moreau 2001).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As enormes vantagens ecológicas e sócio-econômicas da malacocultura incentivaram a formação de uma Rede Nacional de Pesquisa em Ostras Nativas com financiamento do CNPq e da FINEP/SEAP cujo objetivo final é tornar acessível o desenvolvimento do cultivo de ostras nativas no Brasil. Essa rede abrange laboratórios de sete universidades, a Embrapa Meio Norte, a EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e de Extensão Rural de Santa Catarina S.A.) e o Instituto de Pesca de São Paulo que possuem atribuições distintas dentro de duas linhas de pesquisa: melhoramento genético e caracterização genética dos estoques, essa última de responsabilidade do Laboratório de Biodiversidade Molecular.

Em parceria com os demais integrantes da rede, esta tese tem como objetivos determinar a variabilidade genética das ostras nativas e delimitar estoques de suas populações ao longo do litoral brasileiro como subsídio para programas de exploração de populações naturais e de escolha de fundadores para cultivo, utilizando, para esse fim, diversos *loci* de microssatélites, desenvolvidos nesta tese, e o sequenciamento da região controle mitocondrial de ambas as espécies. Os resultados dessas análises permitirão estabelecer critérios para a seleção de sementes para o cultivo ao longo da costa brasileira. Ao se comparar populações em uma escala geográfica maior, incluindo amostras da África e do mar do Caribe, os resultados desta tese contribuirão, também, para a formulação de hipóteses filogeográficas sobre a origem e a evolução das populações de ostras no Atlântico, correlacionada com as suas províncias biogeográficas.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Desenho de iniciadores específicos para a região controle mitocondrial das espécies *C. rhizophorae* e *C. gasar*;
- 2) Desenho de iniciadores específicos para os genes mitocondriais 16S e COI, e nuclear ITS2 da espécie desconhecida *Crassostrea* sp., amostrada na região sul do Brasil e Argentina;
- 3) Desenvolvimento de iniciadores para loci de microssatélites das espécies *C. rhizophorae* e *C. gasar*, bem como testar esses marcadores em outras espécies relacionadas;
- 4) Comparar geneticamente as populações de cada uma das espécies (*C. rhizophorae* e *C. gasar*), empregando marcadores mitocondriais (sequenciamento da região controle) e nucleares (microssatélites), a fim de identificar e delimitar seus estoques presentes e distribuídos ao longo da costa do Brasil.
- 5) Inferir a polaridade e a rota de introdução da espécie *C. gasar* com posterior elaboração de hipóteses para o seu transporte.
- 6) Análise filogenética da espécie *Crassostrea* sp., com a inclusão de sequências de outras espécies disponíveis no GenBank.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Entre 1999 e 2012, 1226 amostras de *C. gasar* (N=593) e *C. rhizophorae* (N=633) foram coletadas em 32 diferentes localidades das Américas Central e do Sul e da África e tiveram seu DNA extraído de acordo com o protocolo descrito abaixo. A Tabela 2 contém informações sobre o número de indivíduos de *C. gasar* e *C. rhizophorae* coletados e seus referentes pontos de coleta. As Figuras 9 e 10 exibem os mapas indicando as localidades de coleta para *C. gasar* e *C. rhizophorae*, respectivamente. Os dados sobre amostragem de *Crassostrea* sp. estão disponíveis no item 6.

Tabela 2: Número e localidade das amostras coletadas de *Crassostrea gasar* e *C. rhizophorae*.ID: identificação ; *Para *C. rhizophorae*; ^a Para *C. gasar*.

Localização			ID	Coordenadas	<i>C. gasar</i>	<i>C. rhizophorae</i>
Caribe	Cuba	-	CRB1	21° 33' N 79° 6' W	-	25
	Panamá	-	CRB2	8° 58' N 79° 31' W	-	9
América do Sul	Guiana Francesa	Montsinery	GUI	5° 10' N 52° 38' W	50	-
	Pará	Belém	PA	1° 4' S 48° 26' W	10	-
	Maranhão	São Luís	MA2	2° 31' S 44° 18' W	12	-
		Carnaubeiras	MA1	2° 41' S 41° 58' W	59	-
	Piauí	*Barra Grande	PI	2° 54' S 41° 25' W	6	59
		^a Parnaíba		2° 48' S 41° 44' W		
	Ceará	Fortaleza	CE	3° 43' S 38° 31' W	-	12
	Rio G. do Norte	Natal	RN	5° 46' S 35° 11' W	-	44
	Paraíba	Mamanguape	PB2	6° 43' S 34° 55' W	23	10
		João Pessoa	PB1	7° 8' S 34° 49' W	-	40
	Pernambuco	Recife	PE2	7° 52' S 34° 50' W	25	34
		Gamela	PE1	8° 40' S 35° 7' W	37	29
	Bahia	Salvador	BA5	12° 56' S 38° 30' W	30	32
		Taperoá	BA4	13° 29' S 39° 3' W	21	18
		Tanque	BA3	14° 00' S 13° 59' W	28	14
		Canavieiras	BA2	15° 39' S 38° 56' W	3	-
		Caravelas	BA1	17° 44' S 39° 12' W	-	21
		Vitória	ES2	20° 16' S 40° 16' W	-	5
	Espírito Santo	Anchieta	ES1	20° 48' S 40° 39' W	-	30
		*Sepetiba	RJ1	22° 58' S 43° 42' W	11	30
	Rio de Janeiro	^a Rio das Ostras		22° 31' S 41° 56' W		
		Ilha Grande	RJ2	23° 8' S 44° 10' W	-	45
		Baía da Ribeira	RJ3	22° 59' S 44° 23' W	-	6
	São Paulo	Picinguaba	SP3	23° 21' S 44° 52' W	-	7
		Itanhaém	SP2	24° 11' S 46° 44' W	4	-
		Cananéia	SP1	25° 2' S 47° 56' W	64	60
	Paraná	Paranaguá	PR1	25° 17' S 48° 19' W	64	72
		Guaratuba	PR2	25° 52' S 48° 33' W	18	11
	Santa Catarina	São Fco. do Sul	SC	26° 15' S 48° 41' W	45	20
África	Senegal	Almadies	SEN1	14° 44' N 17° 31' E	22	-
		Joal	SEN2	14° 10' N 16° 51' E	15	-
	Nigéria	Estuário do Rio Níger	NIG	4° 12' N 5° 31' E	46	-
TOTAL					593	633
Total de amostras analisadas					1226	

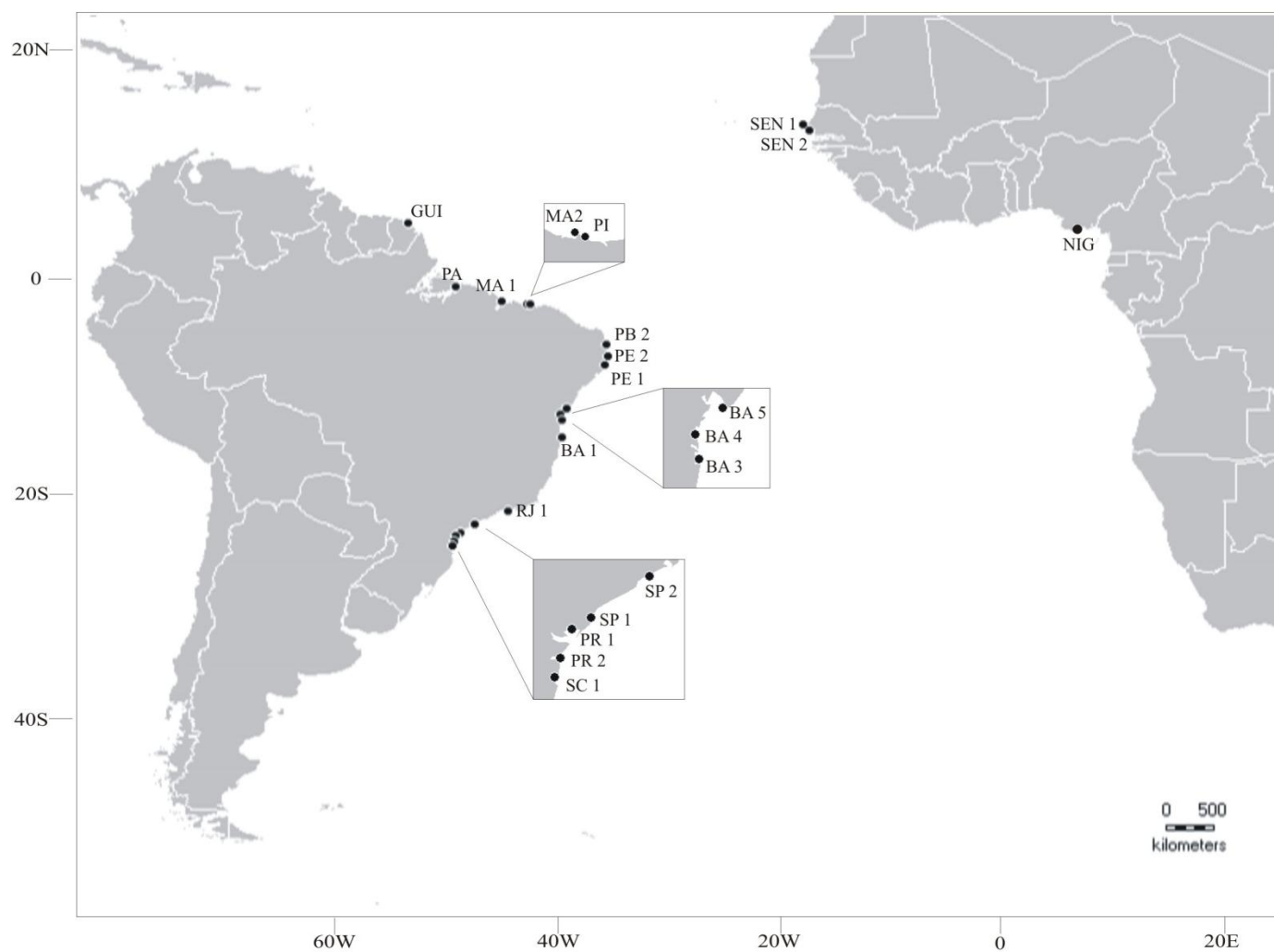


Figura 9: Mapa com as localidades amostradas de *Crassostrea gasar*.

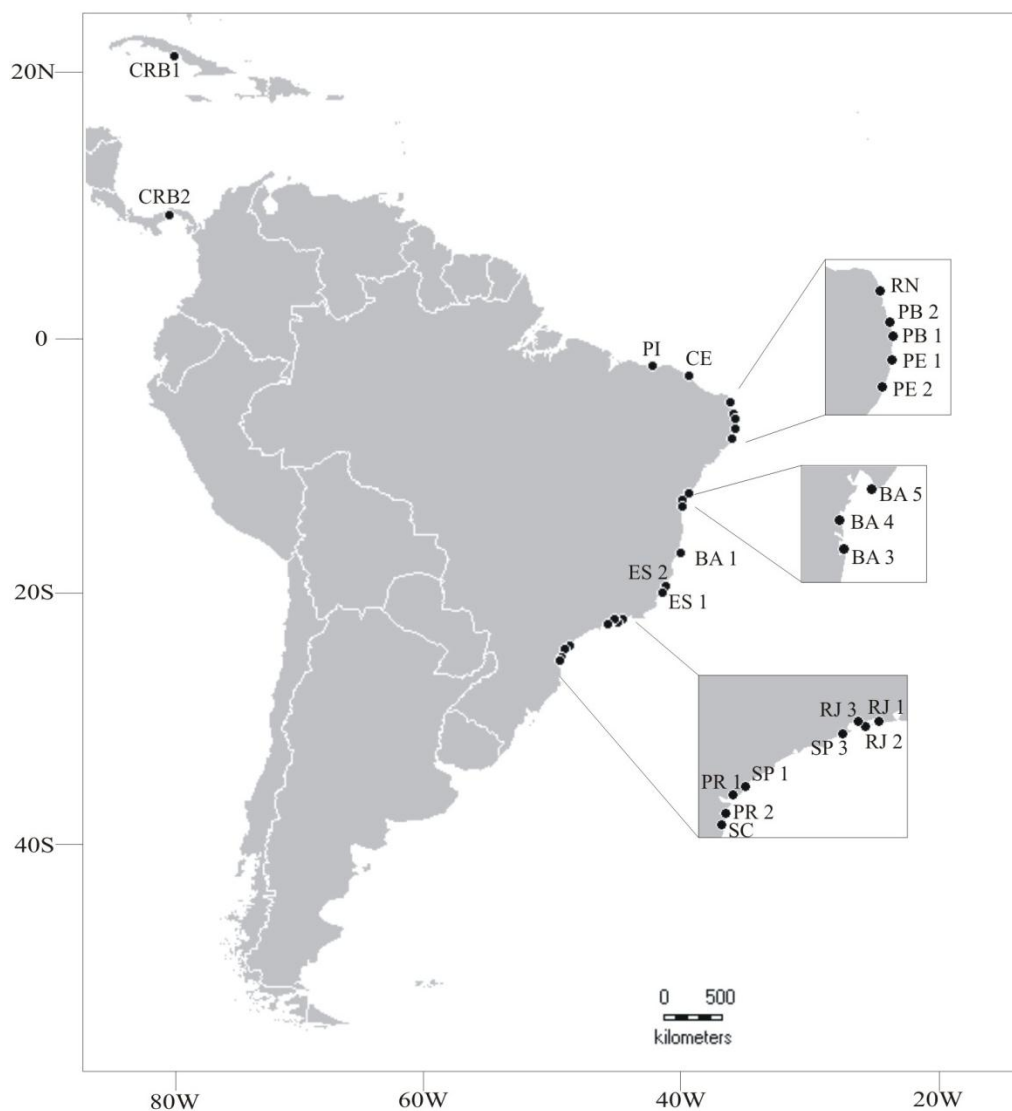


Figura 10: Mapa com as localidades amostradas de *Crassostrea rhizophorae*.

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada baseando-se no protocolo com CTAB, descrito em (93, 94). Esse protocolo iniciou-se com a maceração de cerca de 20 mg de tecido em 600 μ L de tampão CTAB (CTAB 2 %, EDTA 20 mM, β -mercaptoetanol 0,2 %, Tris 100 mM, NaCl 1,4 mM) adicionado de 60 μ g de proteinase K e foi, posteriormente, incubado em banho-maria a 55°C por 3 horas, até a completa digestão do tecido. O extrato foi centrifugado por 5 min a

14.000 rotações por minuto (RPM) para precipitação dos restos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 60µL de NaOAc a 3M e 660 µL de isopropanol gelado, sendo mantido a -20°C por duas horas para acentuar a precipitação do DNA. Subsequentemente, o homogeneizado foi centrifugado a 14.000 RPM por 30 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% (v/v) a fim de retirar o excesso de sal, sendo centrifugado por 5 min a 14.000 RPM. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado de DNA foi seco por duas horas a temperatura ambiente. Após esse período, o DNA foi ressuspensão em 50 µL de água ultrapura e quantificado em nanofotômetro (Implen®). Todas as amostras de DNA foram normalizadas para a concentração de 50 ng/µL.

3.3 Sequenciamento de DNA

3.3.1 Obtenção dos iniciadores

Os iniciadores utilizados para amplificação da região controle mitocondrial de *C. gasar* e *C. rhizophorae* foram desenvolvidos nesta tese. Até então, apenas 9 espécies de *Crassostrea* tiveram seus genomas mitocondriais inteiramente sequenciados: *C. virginica* (95), *C. nippona* (96), *C. ariakensis*, *C. iredalei*, *C. angulata*, *C. sikamea* (97), *C. hongkongensis* (98), *C. gigas* (99) e *C. diambaiensis* (100). Com exceção de *C. nippona*, as outras 6 espécies asiáticas possuem uma ordem gênica mitocondrial conservada que evidencia uma especiação recente desse grupo (99). Contudo, *C. virginica*, que é a espécie filogeneticamente mais próxima de *C. gasar* e *C. rhizophorae*, apresenta uma ordem gênica relativamente diferenciada (Figura 11). Dessa maneira, na ausência de qualquer informação sobre a ordenação dos genes mitocondriais nas demais espécies do Atlântico, consideramos a configuração genômica de *C. virginica* para o desenho de iniciadores sobre os genes flanqueadores da região controle mitocondrial de *C. gasar*. De acordo com a ordem em *C. virginica*, os genes à montante da RC são: t-RNASer, t-RNALeu e

t-RNAPro; à jusante aparecem t-RNAGly e s-rRNA, assim dispostos. Cada sequência gênica foi alinhada com seus respectivos homólogos de outras duas espécies mais distantes (*C. gigas* e *C. ariakensis*) com o propósito de buscar regiões conservadas para o desenho dos iniciadores. Deste modo, foi possível desenhar 3 iniciadores *forward* (t-RNASerF, t-RNALeuF e t-RNAProF) e 2 reversos (t-RNAGlyR e s-rRNAR) que foram testados em diversas condições a fim de amplificar a região controle mitocondrial (RC) de *C. gasar* e *C. rhizophorae*. Obtivemos êxito apenas na amplificação da RC em *C. gasar* com os iniciadores tRNASerF e s-rRNAR (Tabela 3 e Figura 12).

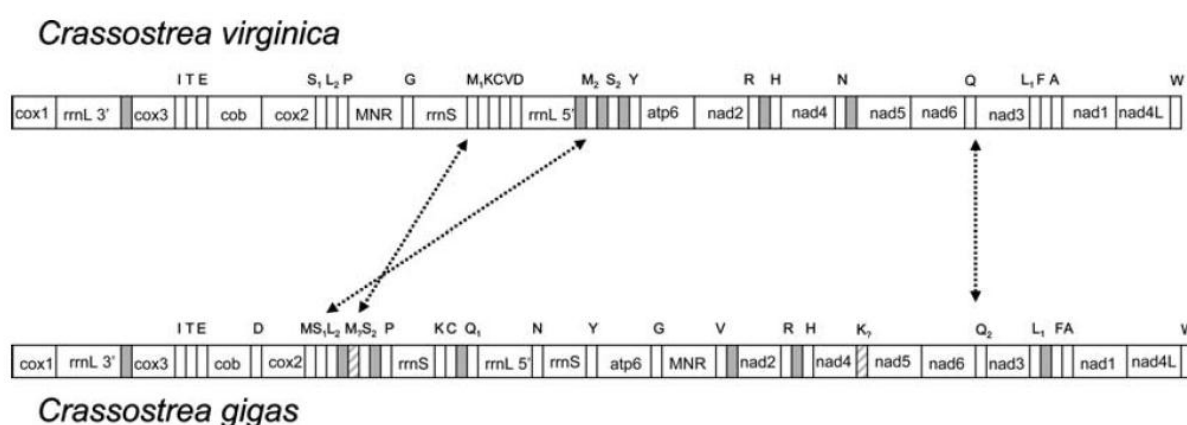


Figura 11: Ordem gênica mitocondrial de *C. virginica* e *C. gigas*. A região controle está indicada pela sigla MNR (*major noncoding region*). Extraído de Milbury and Gaffney (95).

Os iniciadores da região controle de *C. rhizophorae* são internos, anelando-se na própria região controle e foram desenvolvidos com base na sequência de um clone obtido a partir da biblioteca *shotgun* construída a partir de 8 kb de seu genoma mitocondrial. Não dispomos de informações sobre a região controle de *C. rhizophorae* além do fragmento amplificado. Por isso, não disponibilizamos um esquema indicando a região de anelamento dos iniciadores.

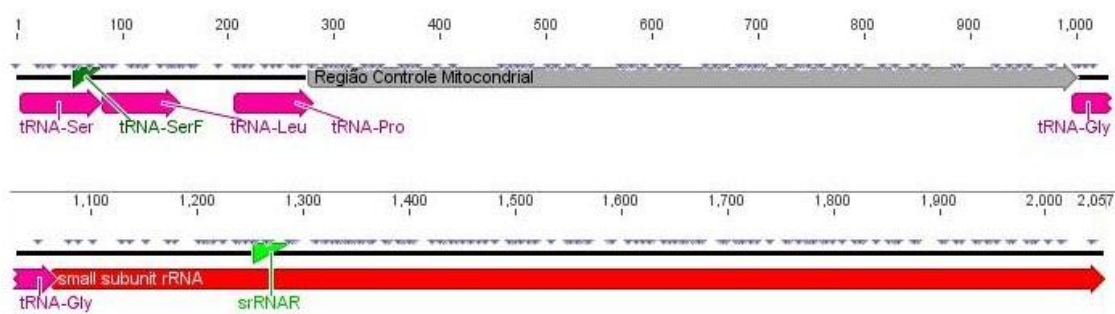


Figura 12: Esquema indicando a região de anelamento dos iniciadores para amplificação da região controle de *C. gasar*. Em rosa, os RNAs transportadores; em cinza, a região controle; em vermelho, a subunidade menor do RNA (ss-rRNA) e em verde, os iniciadores *forward* e reverso.

3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação da PCR continha uma concentração final de 0,5 μM dos oligonucleotídeos iniciadores; 2 a 3mM de MgCl_2 (Tabela 3 para informações detalhadas); Tampão 1X para PCR (Promega, EUA); 0,2 mM de cada um dos dNTPs de deoxinucleotídeos trifosfatados e 1U de *GoTaq* DNA Polimerase (Promega, EUA) em um volume final de reação de 25 μL , sendo realizada num termociclador ABI GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA). Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X, corados com brometo de etídeo e conferidos sob luz ultravioleta. Os tamanhos de fragmentos amplificados, bem como a concentração das amostras, foram estimados por comparação com o marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas). As condições de ciclagem para cada par de iniciadores encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas concentrações ótimas de MgCl₂ e condições de ciclagem. * Iniciadores desenvolvidos desta tese. ^aKessing, Croom (101).

Oligonucleotídeos		Gene	Concentração de MgCl ₂ [mM]	Ciclagem	Tamanho do fragmento (pb)	Espécie
*COIsp F	5' AGTTCTCTTATCCGTTGAAG 3'	COI	2,5	94°C – 3'	505	<i>Crassostrea</i> sp.
*COIsp R	5' TAAATGACGATCAGTAAGCAG 3'			93°C-1' / 60°C-1' / 72°C-1' (40x)		
^a 16SA	5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3'	16S	2,5	94°C – 3'	460	<i>Crassostrea</i> sp.
^a 16SB	5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'			93°C-1' / 50°C-1' / 72°C-1' (40x)		
*CS-ITS2 F	5' TCGGTAAACCATCAATCG 3'	ITS2	3	94°C – 3'	627	<i>Crassostrea</i> sp.
*CS-ITS2 R	5' GATCTGAGGTCGGAGTGA 3'			93°C-45" / 52°C-45" / 72°C-1' (40x)		
*tRNASer F	5' TTCGATTTTGTGCTCCCTT 3'	RC	2	94°C – 3'	1130	<i>C. gasar</i>
*srRNA R	5' TTCCAGATCTACCCACTT 3'			93°C-1' / 49°C-1' / 72°C-1' (40x)		
*Mitrhiz13F	5' CTTATATACACTTCTCTAACCCCAT 3'	RC	2,5	94°C – 3'	292	<i>C. rhizophorae</i>
*Mitrhiz16R	5' CCGAGTAGTTTAACTGGTAGAATT 3'			93°C- 45" / 50°C-45" / 72°C-30" (40x)		
				72°C-4'		

3.3.3 Reação de Sequenciamento

Os produtos amplificados foram purificados através de kit comercial illustra™ GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). Após purificação, os produtos da PCR foram quantificados por comparação usando 1µL de padrão de massa molecular GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X, seguindo-se de análise por coloração por brometo de etídeo e observação posterior em transiluminador de UV (~300nm). Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o BigDye® Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, EUA). A reação consistia de 1µL do mix comercial, 1,5 µL de tampão 5X, 2µL do iniciador (1,6 µM), 50ng do DNA e água MilliQ q.s.p. 20µL. Esta reação foi submetida à reação de ciclagem de sequenciamento: 25 ciclos de 94 °C / 15 seg; temperatura específica de anelamento da reação de PCR / 30 seg e 60 °C / 4 min. As reações foram feitas para as duas fitas de DNA independentemente, empregando os mesmos iniciadores utilizados para a reação de PCR. Após a reação, as amostras foram precipitadas com isopropanol 65%, centrifugadas por 20 min a 4 °C e lavadas com etanol 60%. Depois de secos, os produtos das reações foram ressuspensos em 10 µL de formamida, desnaturados a 98 °C por 3 min e resfriados imediatamente em banho de gelo. Os produtos assim desnaturados foram aplicados em sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, EUA).

3.3.4 Identificação das espécies

As espécies foram previamente identificadas através da análise morfológica (metodologia desenvolvida por Claudio Melo e Cristiano Lazoski, comunicação pessoal), e confirmada por análises de PCR-RFLP de genes mitocondriais (Citocromo oxidase I e 16S) e nucleares (espaçador ribossomal interno transcrito) (63, 65, 102).

3.3.5 Análise dos dados

Crassostrea gasar e *C. rhizophorae*

Todas as sequências de região controle mitocondrial de *C. gasar* e *C. rhizophorae* foram editadas no programa Seqman II (DNASTAR Inc.) e alinhadas utilizando o programa MEGA 5.1 (103). Das sequências de *C. gasar* foram excluídas sequências flangeadoras, restando 778 pb para análise referentes apenas à região controle. Os alinhamentos obtidos foram inspecionados visualmente e editados, quando necessário. O índice de endocruzamento (F_{ST}) (104) par a par, os índices de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) e a Análise Molecular de Variância (AMOVA), que visa buscar possíveis subdivisões da variação genética (com 1000 permutações), foram calculados através do programa Arlequin v. 3.11 (105). O programa SAMOVA 1.0 (106) foi utilizado para fazer uma análise como a AMOVA, mas sem que houvesse grupos definidos *a priori*.

Os testes de neutralidade D de Tajima (107, 108) e F_s de Fu (109) também foram efetuados no Arlequin v. 3.11 com 1000 amostras simuladas. Ao rejeitar-se a hipótese nula de neutralidade da região controle mitocondrial, fez-se necessária uma análise da distribuição das diferenças (*Mismatch Distribution Analysis*) (110) a fim de discriminar entre as duas possíveis hipóteses que explicariam esse resultado: seleção natural ou expansão populacional. Esta também foi realizada pelo Arlequin v. 3.11 e consiste em contabilizar o número observado de diferenças entre os pares de haplótipos. Conforme o padrão observado, é possível prever se a hipótese de expansão populacional é rejeitada ou não. Um comportamento multimodal da distribuição das diferenças assume que a população está em equilíbrio demográfico. Quando a hipótese de expansão populacional não é rejeitada, a distribuição se mostra unimodal refletindo a possibilidade de uma expansão recente (110).

Muitos métodos de inferência demográfica são baseados na teoria da coalescência, cujos modelos requeridos seriam simplesmente uma função matemática capaz de descrever a alteração do tamanho efetivo da população através do tempo. Cada um desses modelos demanda um ou mais parâmetros populacionais, onde os mais comumente aplicados são o modelo de tamanho populacional constante, de crescimento exponencial (taxa de crescimento

constante), crescimento logístico e crescimento com expansão (com aumento da taxa de crescimento ao longo do tempo). Entretanto, nem sempre é possível saber o modelo mais adequado para as sequências, e testar todos consumiria muito tempo, além de não garantir que qualquer dos modelos testados seria o mais apropriado. Buscando solucionar esse problema, um modelo mais flexível foi desenvolvido, denominado Skyline Plot (111). Todavia, devido à variabilidade estocástica inerente ao processo de coalescência existe muito ruído na análise e, além disso, a análise de skyline plot possui uma desvantagem fundamental: a história demográfica é inferida a partir de uma genealogia estimada, ignorando o erro associado a reconstruções filogenéticas. A fim de compensar esse erro, outra análise chamada de Bayesian Skyline Plot – BSP - (112) emprega a simulação de Monte Carlo em cadeias de Markov (MCMC) para estimar a distribuição posterior do tamanho efetivo populacional através do tempo diretamente a partir das sequências a serem analisadas, dado um modelo de substituição de nucleotídeos específico. Diferentemente dos outros modelos, o bayesian skyline plot inclui intervalos de confiança para quaisquer dos valores de tamanho efetivo amostrados. Essa análise foi efetuada através do programa BEAST v1.7.4 com duas corridas de 50 milhões de cadeias de MCMC cada (113) para geração dos dados, LogCombiner v1.7.4 para combinar os resultados das duas corridas e Tracer v1.5 para geração do gráfico referente aos dados produzidos.

As redes haplotípicas de máxima parcimônia construída sob o método de median joining foi gerada pelo programa Network – www.fluxus-engineering.com (114) e aquela construída sob o método de *minimum spanning* foi gerada pelo programa HapStar (115).

Foi realizado um teste de Mantel, no programa Arlequin v. 3.11 com o objetivo de verificar a existência de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, utilizando uma matriz de $F_{ST}/(1-F_{ST})$ e outra matriz de distância geográfica, com 1000 permutações. A fórmula $F_{ST}/(1-F_{ST})$ é mais apropriada para tal correlação segundo Rousset (116) visto que os valores absolutos de cada medição têm escalas extremamente diferenciadas, onde a distância geográfica possui uma extensa faixa de variação e o F_{ST} varia apenas de 0 a 1. A aplicação da fórmula $F_{ST}/(1-F_{ST})$ expandiria os valores relacionados ao F_{ST} entre 0 e infinito.

3.3.6 Crassostrea sp.

Todas as sequências referentes aos três marcadores moleculares (16S, COI e ITS2) utilizados para análise dos indivíduos identificados como *Crassostrea sp.* foram editadas e alinhadas como descrito no item 3.3.4. Os diferentes haplótipos foram detectados através do programa DNAsp. As árvores filogenéticas foram construídas no programa MEGA 5.1 aplicando-se o método de agrupamento Neighbour-Joining (117) ou máxima verossimilhança com os modelos evolutivos indicados pelo teste de seleção de modelos, também incluído no programa MEGA 5.1. Mais detalhes dos métodos estão descritos no capítulo 2.

3.4 **Microssatélites: desenvolvimento e análises**

3.4.1 Células quimiocompetentes

Para o preparo das células competentes, alíquotas foram retiradas de estoques bacterianos de *E.coli* TOP10 congelados à -70°C e preparados a partir de uma cultura em fase exponencial de crescimento pela adição de glicerol estéril (50% v/v). A alíquota da cultura congelada foi semeada sobre a superfície de placa de Petri contendo meio LB-Agar (1,0% bacto-triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl e 1,7% bacto-agar). A placa foi incubada a 37°C durante aproximadamente 12 horas. Para verificar a pureza dos estoques utilizados, colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo ou não 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. As culturas em suspensão foram incubadas a 37°C , sob agitação, durante um período de 12 horas.

Após as 12 horas, 500 μL dessa suspensão foram acrescidos a 50 mL de meio LB sem antibiótico e as bactérias foram cultivadas a 37°C , com agitação orbital até atingir a fase exponencial de crescimento ($\text{DO}_{600\text{nm}}=0,4$). A seguir, os 50 mL da cultura foram centrifugados a 5000 g por 10 min a 4°C .

O precipitado foi ressuspenso em 20mL de tampão gelado (CaCl_2 0,1M) e as bactérias incubadas no gelo por 1 hora. Em seguida, estas foram submetidas a uma centrifugação a 5000 g por 10 min a 4 °C, e o precipitado ressuspenso em 4 mL do mesmo tampão gelado descrito anteriormente adicionado de 15% de glicerol, e alíquotas de 100 µL foram mantidas à -70 °C até uso.

3.4.2 Construção da biblioteca enriquecida

O desenvolvimento de microssatélites específicos para as ostras nativas foi baseado no método de construção de biblioteca genômica enriquecida (118). Esse método é iniciado com a digestão de cerca de 10 µg totais de uma mistura de DNA de quatro indivíduos advindos de duas diferentes populações com 10 U de *Sau3A* (Promega, EUA), uma endonuclease de restrição de corte frequente. O produto digerido foi ligado por 3 horas a 22°C através de 6 U da enzima T4 DNA ligase (Promega) a 0,25 µM dos adaptadores (S61 5' GGCCAGAGACCCCAAGCTTCG 3' e S62 5' PO₄- **GATCCGAAGCTTGGGGTCTCTGGCC** 3') que contêm pontas coesivas específicas à sequência da enzima (nucleotídeos em vermelho). A união desses dois oligonucleotídeos complementares foi anteriormente realizada por meio de uma desnaturação inicial das estruturas secundárias formadas pelas fitas simples, a 80 °C por 5 min. Posteriormente, o anelamento dos oligos foi feita em temperatura ambiente durante uma hora, para formação do adaptador de fita dupla. Após a ligação dos adaptadores aos fragmentos produzidos pela digestão, uma reação de PCR foi realizada com o oligonucleotídeo S61. Essa reação foi feita com 0,2 mM de dNTP, 1 mM de BSA, 2,5 mM de MgCl_2 , tampão para PCR 1X, 1,5 µM do iniciador oligo S61, 1 µL do produto da ligação em um volume final de 60 µL. As condições da reação foram 95 °C por 5 min; 30 ciclos a 95 °C por 50 seg, 56 °C por 1 min e 72 °C durante 2 min; seguido de um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min. Esses produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e um rastro indicou o sucesso da reação de PCR. Os fragmentos de tamanho determinado (500 a 1000pb) foram selecionados, purificados com o kit Illustra GFX (GE Healthcare)

e, posteriormente, hibridizados com sondas biotiniladas de sequências repetitivas ($CA_{(12)}$ e $CAA_{(8)}$). Esses fragmentos foram então selecionados por meio de uma purificação com microesferas magnéticas cobertas de streptavidina (M-280 Dynabeads®, Invitrogen, EUA). Após sucessivas lavagens com um tampão SSC (NaCl 3M, 0,3M citrato de sódio – 20x concentrado) com diferentes condições de adstringência, as sondas biotiniladas se desligaram das microesferas e os fragmentos foram submetidos a uma nova PCR a fim de aumentar a concentração de DNA para posterior ligação ao plasmídeo. Nessa PCR foi utilizado novamente o oligo S61 como iniciador (0,5 μ M), tampão para PCR 1X, 1mM de BSA, 2,5 mM de $MgCl_2$, 1 U Taq DNA polimerase 8 μ L da suspensão com as microesferas, em 50 μ L de volume total. As reações foram mantidas por 3 min a 95°C; seguidos de 2 ciclos com 30 seg a 95°C, 30 seg a 56°C e 45 seg a 72°C; e de mais 30 ciclos com 30 seg a 92°C, 30 seg a 56°C e 55 seg a 72°C; e concluindo com 30 min de extensão final a 72°C. A amplificação foi confirmada por eletroforese em um gel de agarose a 2%. O produto do PCR foi ligado ao vetor pGEM-T (Promega, EUA) que, subsequentemente, foi usado para transformar células competentes de *E. coli* (linhagem TOP10). A transformação foi feita com 100 μ L da suspensão de células que foram misturados com a reação de ligação. A mistura de células e DNA foi mantida por 30 min no gelo, e posteriormente submetida a um choque térmico de 30 segundos à 42°C sem agitação, transferindo-se os tubos imediatamente para o gelo. Após dois min no gelo, todo o conteúdo dos tubos foi transferido para placas de *petri*, contendo meio seletivo S-GAL®/ÁGAR LB sólido (Sigma-Aldrich) acrescido de 50 μ g/mL de ampicilina. Para o crescimento das colônias bacterianas, as placas foram incubadas à 37°C por cerca de 18 horas. Posteriormente, foram selecionadas apenas as colônias brancas (que, teoricamente, contêm o inserto) para análise por PCR, quanto à presença dos insertos contendo microssatélites. Essa reação continha dois iniciadores diferentes: S61 (0,5 μ M) e o oligonucleotídeo-sonda utilizado para o enriquecimento (0,5 μ M). Dessa maneira, para as colônias que continham o inserto com regiões repetitivas equivalentes à sequência da sonda utilizada eram observadas duas bandas no gel de agarose referentes ao produto de PCR. Quando apenas uma banda era observada, significava que aquela colônia continha um inserto sem regiões repetitivas de interesse. Essa PCR foi

feita em um volume final de 20 µL, com as mesmas condições anteriores e com a temperatura de anelamento igual ao da sonda. As colônias por fim consideradas positivas para a presença de microssatélites foram submetidas a uma reação de PCR com iniciadores universais e específicos para a região M13 (M13-F 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' e M13-R 5' AACAGCTATGACCATG 3') presente no plasmídeo. Os fragmentos produzidos foram sequenciados com os mesmos iniciadores utilizados na reação de PCR (ver tópico 3.3.1) e editados no programa Seqman II (DNASTAR Inc.) permitindo desenhar iniciadores específicos para a região flanqueadora dos microssatélites com auxílio do programa WebSat (119). Foram desenhados 19 pares de iniciadores específicos para *C. gasar* e 57 iniciadores para *C. rhizophorae*, sendo a sequência do iniciador *forward* de cada par adicionada de uma cauda na extremidade 5' para permitir a genotipagem através do método descrito em Schuelke (120). Os fluoróforos utilizados nessa tese foram VIC, PET, 6-FAM e NED. Todos os pares de iniciadores foram subsequentemente otimizados e testados para polimorfismo.

3.4.3 Amplificação e genotipagem

O método selecionado para a genotipagem foi descrito em Schuelke (120) onde emprega-se um iniciador *forward* adicionado de uma cauda a sua extremidade 5' cuja sequência corresponde a 18 nucleotídeos específicos (5' TGTTAAACGACGGCCAGT 3') e complementares a outro iniciador que contém o fluoróforo. Essa abordagem diferencia-se da estratégia clássica de genotipagem, economicamente mais custosa, onde o iniciador *forward* é diretamente marcado com o fluoróforo correspondente.

Os oligonucleotídeos *forwards* de cada um dos pares de iniciadores foram sintetizados com 18 nucleotídeos a mais, correspondentes à cauda, além da sequência específica ao *locus* de microssatélite. Dessa forma, a reação de PCR contém duas diferentes ciclagens embutidas, onde a primeira inclui a temperatura de anelamento específica do par de iniciadores e a segunda contém a temperatura de anelamento da cauda com o fluoróforo. De acordo com essa estratégia, após os primeiros ciclos, o iniciador *forward* se esgota e o

iniciador marcado é incorporado ao fragmento sintetizado nos últimos ciclos da reação. Esses fragmentos marcados são, por fim, detectados pelo sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, EUA). As concentrações dos três iniciadores na reação não são equimolares, uma vez que sua incorporação na reação ocorre de forma coordenada. A relação de concentração entre iniciadores reverso / marcado / *forward* seguia a proporção 4:2:1, respectivamente. As maiores vantagens dessa técnica são o baixo custo para marcar as fitas e a possibilidade de alternar o uso de diferentes fluorescências em um mesmo sistema.

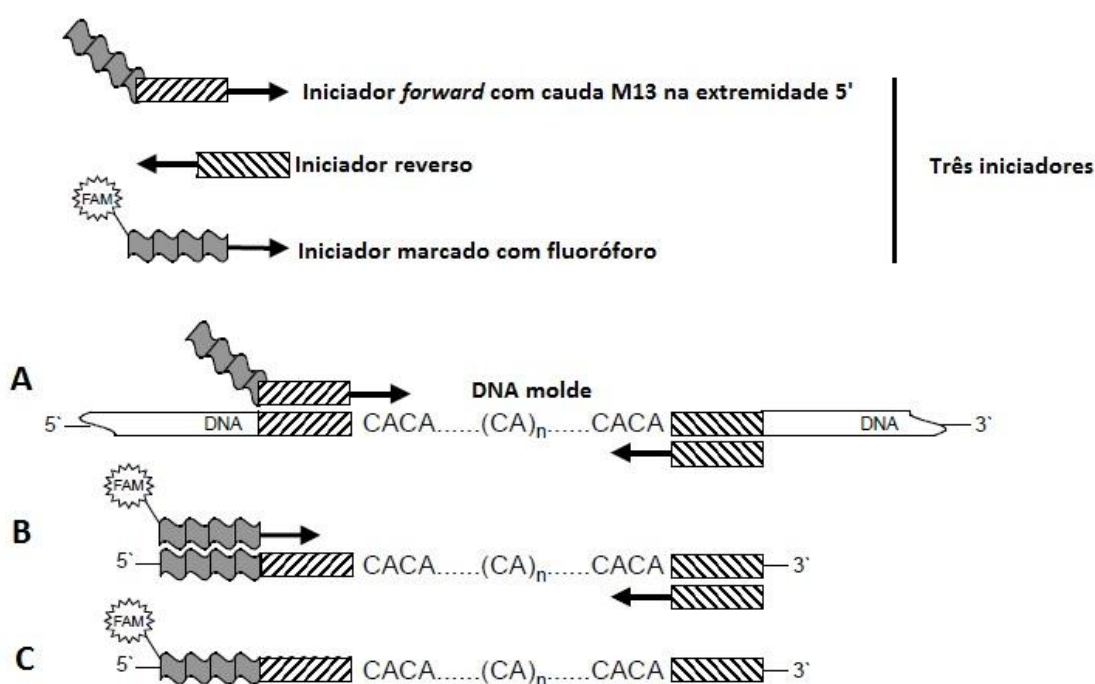


Figura 13: Esquema modificado de Schuelke (120) que ilustra o funcionamento do método de genotipagem do iniciador com cauda. (A) Ciclos iniciais com incorporação da cauda M13 aos fragmentos sintetizados. (B) Ciclos finais onde o iniciador marcado com fluoróforo é, enfim, incorporado aos fragmentos sintetizados. (C) Produto final da reação de PCR com fragmentos contendo as repetições de microsatélites e marcados com o respectivo fluoróforo.

Iniciadores de um trabalho anteriormente publicado por outro grupo (121) foram utilizados para *C. gasar* em adição àqueles desenhados durante a execução desta tese. A reação da PCR foi realizada separadamente para cada marcador e consistiu na adição de 0,5 μM do iniciador reverso, 0,25 μM do iniciador marcado, 0,13 μM do iniciador *forward*, 2,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de dNTP, 1 mM de BSA, tampão para PCR *Go Taq Green Buffer* (Promega) 1X, 1

U Taq DNA polimerase, 1 μL de DNA (50 ng/ μL) em um volume final de 15 μL com a seguinte ciclagem: 94 °C por 3 min; 30 ciclos de 93 °C por 45 seg, temperatura de anelamento do par de iniciadores *forward* e reverso por 45 segundos e 72 °C por 45 seg; seguido de 8 ciclos idênticos aos anteriores, sendo a temperatura de anelamento a 53 °C e finalizando com uma extensão de 5 min a 72 °C.

Com o intuito de otimizar o tempo e reduzir o uso dos capilares do sequenciador automático, *pools* de produtos de PCR foram formados com 2 μL de cada reação de PCR e agrupados de acordo com suas fluorescências e tamanhos, sem que houvesse sobreposição na leitura dos alelos. Após a formação dos *pools*, adicionou-se 0,5 μL de cada em 9,25 μL de formamida misturada com (*Applied Biosystems*). As amostras foram aquecidas a 95 °C por 5 min para desnaturação das fitas de DNA e imediatamente colocadas no gelo. Posteriormente, as amostras foram aplicadas no sequenciador. Todas as genotipagens foram realizadas em um sequenciador ABI3500 com corridas que duravam 2 horas, com a injeção simultânea de 8 amostras.

Os eletroferogramas resultantes foram analisados no programa GeneMarker 1.97 (SoftGenetics LLC - *free trial version*), no qual foi feita a determinação dos genótipos que foram revisados individualmente.

Apesar da revisão manual, a atribuição alélica automatizada conhecidamente introduz uma alta taxa de erro, em especial em alelos de *loci* de repetições dinucleotídicas (122). A origem desses erros encontra-se na diferente mobilidade do fragmento de DNA que é dependente tanto do comprimento quanto da sequência (conteúdo GC ou mutações na região flanqueadora, por exemplo (123, 124), bem como outras variáveis independentes do fragmento: velocidade de corrida, variações estocásticas de temperatura ambiente e qualidade da matriz utilizada no sequenciador automático (123, 125). Esses erros de denominação têm potenciais consequências prejudiciais para a análise, distorcendo estimativas de parâmetros como a heterozigosidade e criando falsas diferenças genéticas. O programa FLEXIBIN, cujo algoritmo básico é relativamente simples (122), foi aplicado com o objetivo de corrigir possíveis erros de atribuição das classes de alelos.

3.4.4 Análise dos dados de genotipagem

Os conjuntos de dados de *Crassostrea rhizophorae* e *C. gasar* foram analisados de maneira idêntica. O programa Create 1.3 (126) foi utilizado para converter os dados brutos das genotipagens em arquivos de entrada de todos os programas empregados nas análises.

As frequências gênicas e o número de alelos de cada um dos *loci* de microssatélites foram calculados através do programa FSTAT 2.9.3 (127). O mesmo programa foi utilizado para verificar se haviam *loci* ligados ou não, através da análise de desequilíbrio de ligação entre todos os pares de *loci* analisados para cada espécie, separadamente. A hipótese nula a ser testada era de não-ligação. Caso essa hipótese fosse rejeitada, um dos *loci* envolvidos seria descartado.

Diversos erros de genotipagem são passíveis de ocorrer, cujas causas podem surgir em quaisquer etapas durante todo o procedimento, desde a qualidade do DNA, passando pela reação de PCR e mesmo durante a análise dos eletroferogramas referentes aos genótipos. Baixas concentrações de DNA, por exemplo, podem resultar no insucesso da amplificação de um dos alelos, devido a um erro estocástico de amostragem, conhecido como alelos *drop-out* (128). Outros erros de genotipagem podem acontecer por causa da amplificação preferencial de alelos de menor tamanho (129). Também podem ocorrer deslizos da polimerase durante a amplificação devido à presença de repetições, especialmente dinucleotídeos, que produz bandas *stutter* gerando uma grande dificuldade de análise do eletroferograma e erros durante a denominação dos alelos (130). Por fim, a existência de SNPs nas regiões de anelamento dos iniciadores pode impedir a amplificação de certos alelos (alelos nulos), resultando numa alta frequência de falsos homozigotos (131). Tais erros de genotipagem provocam desvios nas proporções esperadas em populações que estariam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, particularmente detectados pela deficiência de heterozigotos. Este desequilíbrio pode ser causado também por endocruzamento, cruzamentos que não sejam ao acaso e efeito Wahlund (quando existem ao menos duas diferentes populações dentro do que foi considerado como apenas uma, ou seja, há estrutura subpopulacional). O

programa MICROCHECKER (132) auxilia na identificação desses erros de genotipagem, comparando as frequências esperadas e observadas de homozigotos.

O índice de fixação R_{ST} (Slatkin, 1995) é uma medida de diferenciação genética que leva em consideração o tamanho dos alelos, baseando-se no modelo de evolução dos alelos SMM (ver tópico 1.2.2 da Introdução). O programa SPAGeDi (*Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity*) foi empregado para testar a equivalência entre R_{ST} e a medida clássica de diferenciação genética, F_{ST} (calculada sob o modelo evolutivo de alelos infinitos – ver tópico 1.1.2 da Introdução) (Hardy et al., 2003; Hardy & Vekemans, 2002). Esse teste calcula o valor de R_{ST} a partir dos dados e então permuta os alelos entre as populações e recalcula os valores de R_{ST} (essa nova medida é denominada pR_{ST}). Se a diferença entre R_{ST} e pR_{ST} for significativa, então o tamanho dos alelos é considerado relevante para a estruturação populacional. E caso não seja significativamente diferente, conclui-se que $R_{ST} = F_{ST}$. Portanto, opta-se pela medida F_{ST} para estimar a diferenciação populacional uma vez que, comparativamente ao R_{ST} , aquele índice apresenta uma variância menor (133, 134). Ambos os índices foram calculados anteriormente ao teste através do programa Arlequin 3.11.

Recentemente, foi questionada a utilização do índice estatístico F_{ST} como estimador da diferenciação com dados de marcadores hipervariáveis (135). Como estimador diretamente dependente da heterozigosidade intra-populacional, o F_{ST} tenderia a subestimar a diferenciação entre as populações com o aumento da variação. Dessa maneira, Jost (135) propôs um novo índice que seria um estimador da diferenciação real (D_{EST}). Este novo índice foi calculado através do programa SMOGD (Crawford, 2010). Contudo, conforme argumentado por (136), o F_{ST} seria mais importante como estatística de sumário dos efeitos da estrutura populacional do que D_{EST} , enquanto R_{ST} seria o índice mais adequado quando o processo mutacional considerado é realmente o SMM.

A análise de subdivisão da variação genética nas populações foi calculada mediante AMOVA, similarmente àquela já descrita para a região controle mitocondrial no tópico 3.3.5, bem como o teste de Mantel foi também

aplicado para verificar uma possível correlação entre distâncias genética e geográfica (ver tópico 3.3.5).

O programa STRUCTURE (137) foi empregado para análise da estrutura genética e identificação de grupos homogêneos de indivíduos e sua atribuição a grupamentos definidos arbitrariamente, em geral variando entre 2 e 10. Através de uma abordagem bayesiana, este programa aplica um método de agrupamento sobre dados de genótipos *multilocus* a fim de inferir a estrutura populacional, bem como fazer a atribuição probabilística dos indivíduos às devidas populações (podendo ser mais de uma, caso seus genótipos indiquem que há mistura). Nesta tese, executamos 10 corridas para cada um dos valores de K, 100000 replicas de burn-in, 1000000 replicas de MCMC e modelo de ancestralidade mista (*admixture*). O K mais provável é aquele com maior valor de probabilidade posterior (137). Como muitas vezes essa estratégia não fornece uma estimativa correta do número de agrupamentos (K), foi desenvolvida outra abordagem para identificar o número de agrupamentos (ou populações) mais provável: um método denominado como ΔK e descrito por (138), que é baseado na taxa de mudança dos resultados de probabilidade de sucessivos valores de K, onde o maior valor de ΔK indica o valor de K mais provável. Os dados obtidos nas corridas do STRUCTURE foram utilizados para calcular os valores de ΔK empregando o programa STRUCTURE Harvester (139).

A análise fatorial de correspondência (140) é um tipo de análise canônica particularmente bem adequada para descrever associações entre duas variáveis categóricas (análise de uma tabela de contingência cruzando termos de duas variáveis). Os objetos (que podem ser indivíduos, loci ou populações) são distribuídos em um hiperespaço formando uma nuvem de pontos. Os dados genotípicos de cada indivíduo são codificados como 0 para ausência do alelo, 1 para a presença do alelo no estado heterozigótico e 2 para o estado homozigótico. Essa abordagem é apenas uma análise representativa da distribuição do objeto estudado, que não assume qualquer modelo evolutivo e foi realizada no programa Genetix 4.05 (141).

4 RESULTADOS – CAPÍTULO 1

Science, my lad, is made up of mistakes, but they are mistakes which it is useful to make, because they lead little by little to the truth.

Jules Verne em Viagem ao Centro da Terra

Este capítulo foi dividido em duas partes, com base nos marcadores moleculares utilizados. Os resultados para cada espécie (*C. gasar* e *C. rhizophorae*) serão descritos simultaneamente. As populações denominadas aqui como Norte e Sul, referem-se à localidade de amostragem na costa do Brasil e não às regiões politicamente estabelecidas. Assim, a não ser quando explicitamente declarado, “Norte” designará as amostras no norte e nordeste, e “Sul” das regiões sudeste e sul.

4.1 Região controle mitocondrial

4.1.1 Diversidade molecular e análise da estrutura populacional

Para *C. gasar*, foram obtidas 378 sequências compostas de 778 pb (Tabela 4). Para essas sequências, foram contabilizados 182 diferentes haplótipos e 214 sítios polimórficos (S). Algumas sequências continham um *indel* de 25 nucleotídeos que foi substituído por uma transição (C/T), para que a informação sobre esse *indel* pudesse ser incorporada mesmo em análises com deleção global. A ocorrência do *indel* nos haplótipos das várias regiões tinha distribuição com sentido geográfico, e é apresentada na Tabela 1. Para *C. rhizophorae*, um fragmento de 267 pb foi amplificado para 552 amostras (Tabela 5). Essas sequências apresentaram um total de 153 haplótipos com 101 sítios variáveis.

As Tabelas 4 e 5 mostram ainda os valores de diversidade nucleotídica e haplotípica para cada população de *C. gasar* e *C. rhizophorae*. Apesar do menor

valor para h de *C. gasar* ter sido encontrado em uma população do nordeste do Brasil, em geral os menores valores de h e π estão nos estados do sul e sudeste. O mesmo ocorre com as populações sul-americanas de *C. rhizophorae*. Essa tendência para uma maior diversidade genética no sentido sul-norte pode ser vista na Figura 14.

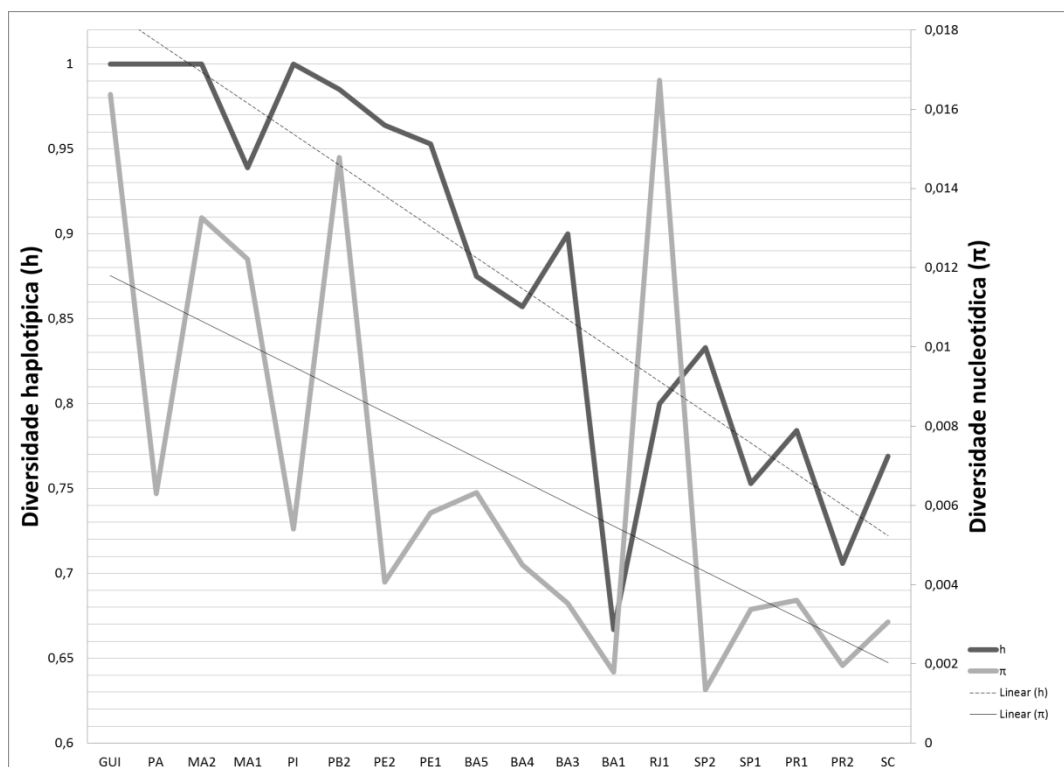
Tabela 4: Diversidade molecular das sequências da região controle mitocondrial de *C. gasar*. Nseq - número de sequências; Nhap – Número de haplótipos; *h* – diversidade haplotípica; π – diversidade nucleotídica. Abreviaturas das localidades de coleta de acordo com a Tabela 2.

	1Nseq	Nhap	<i>h</i>	π
GUI	16	16	1	0,01637
PA	3	3	1	0,0063
MA2	5	5	1	0,01326
MA1	38	25	0,939	0,01221
PI	3	3	1	0,00541
PB2	12	11	0,985	0,01478
PE2	11	9	0,964	0,00407
PE1	35	25	0,953	0,00581
BA5	17	9	0,875	0,00632
BA4	21	12	0,857	0,0045
BA3	25	14	0,9	0,00353
BA2	3	2	0,667	0,0018
RJ1	5	3	0,8	0,01673
SP2	4	3	0,833	0,00135
SP1	62	30	0,753	0,00338
PR1	47	24	0,784	0,0036
PR2	18	9	0,706	0,00196
SC	37	19	0,769	0,00306
SEN1	7	6	0,952	0,01081
SEN2	9	7	0,917	0,00332
TOTAL	378	182	0,952	0,018

Tabela 5: Diversidade molecular das sequências da região controle mitocondrial de *C. rhizophorae*. Nseq - número de sequências; Nhap – Número de haplótipos; *h* – diversidade haplotípica; π – diversidade nucleotídica. Abreviaturas das localidades de coleta de acordo com a Tabela 2.

	Nseq	Nhap	<i>h</i>	π
CRB1	23	8	0,632	0,01279
CRB2	10	3	0,378	0,00225
PI	49	27	0,936	0,00964
CE	11	8	0,945	0,01035
RN	42	24	0,937	0,01055
PB2	10	6	0,778	0,00707
PB1	35	18	0,914	0,00937
PE2	24	15	0,937	0,01174
PE1	25	12	0,88	0,00858
BA5	29	16	0,938	0,01244
BA4	14	8	0,89	0,00807
BA3	14	9	0,901	0,01589
BA1	18	13	0,928	0,01182
ES2	5	5	1	0,01648
ES1	28	20	0,971	0,01102
RJ1	22	5	0,658	0,0076
RJ2	45	23	0,83	0,00987
RJ3	4	4	1	0,01373
SP3	6	3	0,733	0,00749
SP1	53	20	0,717	0,0068
PR1	61	18	0,717	0,00699
PR2	10	4	0,644	0,00707
SC	14	6	0,736	0,00634
TOTAL	552	153	0,895	0,014

A)



B)

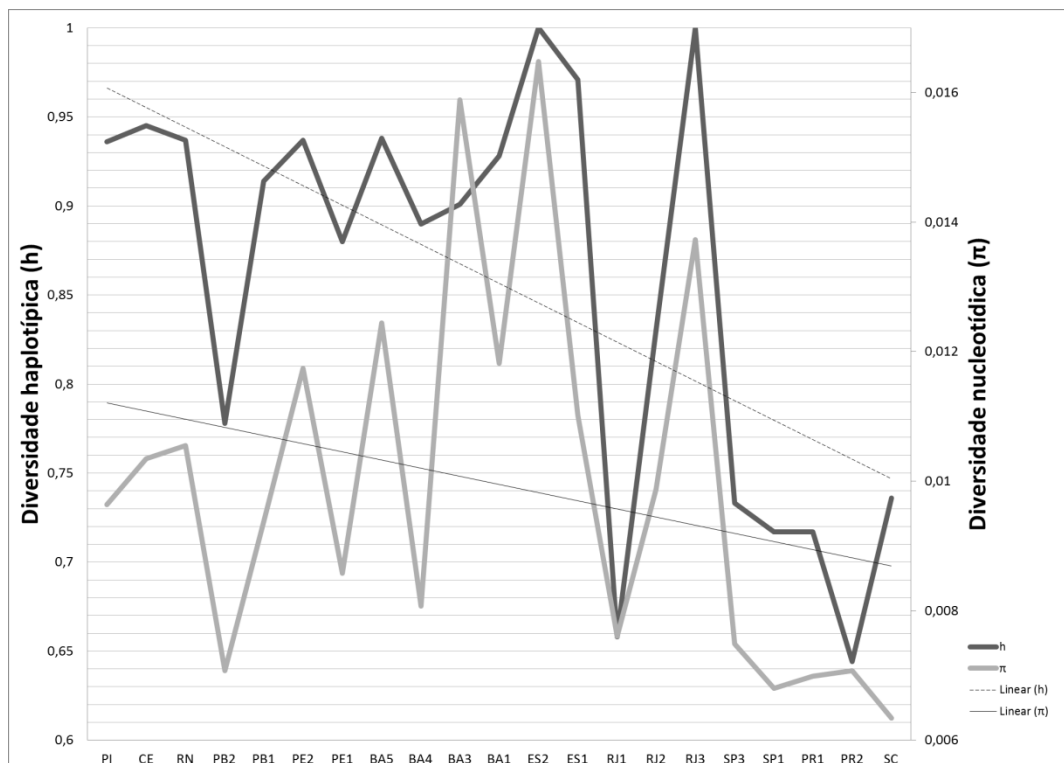


Figura 14: Representação gráfica dos índices de diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) de cada uma das populações de *C. gasar* (A) e *C. rhizophorae* (B), com suas respectivas linhas de tendência. (A) Todas as populações sul-americanas de *C. gasar*. (B) Todas as populações sul-americanas de *C. rhizophorae*.

Para avaliar o grau de diferenciação genética foram calculadas estimativas de F_{ST} par a par entre todas as populações de cada espécie. A Tabela 6, com os dados de F_{ST} para *C. gasar*, demonstra que os níveis de diferenciação entre as populações africanas e todas as demais foram altamente significativos. Mesmo entre as populações do Senegal (SEN1 e SEN2) obteve-se um valor de diferenciação bastante alto ($F_{ST} = 0,261$; $p=0,000$). A população da Guiana Francesa (GUI) mostrou ser significativamente diferente de quase todas as populações, com valores entre 0,234 ($p=0,000$) e 0,782 ($p=0,000$). Observou-se também um padrão geral de homogeneidade dentro das populações do norte e das populações do sul, com valores baixos de F_{ST} ou não-significativos, indicando que sejam dois estoques com homogeneidade genética.

Os dados de F_{ST} para *C. rhizophorae* demonstram uma clara diferenciação entre as populações do Caribe (CRB1 e CRB2) e as demais populações brasileiras, com valores entre 0,685 ($p=0,000$) e 0,913 ($p=0,000$) (Tabela 7). Os outros valores de F_{ST} significativos concentram-se especialmente nas comparações par a par entre populações do sul e norte do Brasil.

O valor máximo de F_{ST} entre as populações da América do Sul foi muito mais alto em *C. gasar* (0,879; $p=0,000$) do que *C. rhizophorae* (0,272; $p=0,000$), indicando que haveria uma estruturação mais alta na primeira espécie.

Em geral, os valores de F_{ST} calculados aumentam com a distância geográfica entre as localidades. Esse comportamento é condizente com um cenário de isolamento por distância. Essa hipótese foi testada através de um teste de Mantel (Figura 15), que demonstrou ser significativo tanto para *C. gasar* ($r = 0,377$; $p = 0,002$) como para *C. rhizophorae* ($r = 0,272$; $p = 0,004$). Como a análise dos dados indicava uma diferenciação entre as regiões norte e sul, decidimos realizar, também, o teste de mantel separadamente para cada região.

No caso de *C. gasar*, o grupo denominado como norte, que inclui as populações de PA até BA2, manteve a correlação positiva entre as distâncias genéticas e geográficas ($r = 0,291$; $p = 0,016$), confirmando um modelo de isolamento por distância. Entretanto, no grupo denominado como sul (RJ1 até

SC), a alta correlação observada ($r = 0,94$; $p = 0,005$) deixou de existir ($r=0,099$; $p=0,340$) quando a população RJ1, altamente diferenciada das demais, foi excluída. No caso de *C. rhizophorae*, o teste de mantel aplicado tanto para as populações do norte (aqui consideradas como PI até ES1) como do sul (RJ1 até SC) não indicou correlação significativa (N: $r=0,045$; $p=0,340$; S: $r=0,288$, $p=0,064$).

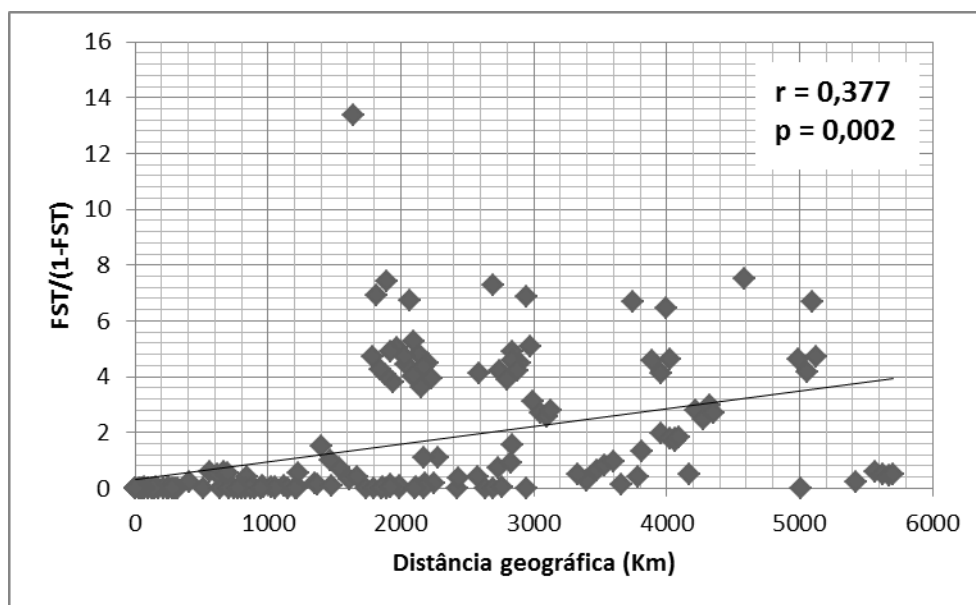
Tabela 6: F_{ST} par a par da região controle mitocondrial de *Crassostrea gasar*. Os números em cinza indicam os valores significativos ($p < 0,05$) após a correção de Bonferroni.

	GUI	PA	MA2	MA1	PI	PB2	PE2	PE1	BA5	BA4	BA3	BA1	RJ1	SP2	SP1	PR1	PR2	SC	SEN1	SEN2
GUI	-																			
PA	0,291	-																		
MA2	0,148	-0,070	-																	
MA1	0,234	-0,032	-0,071	-																
PI	0,283	-0,125	-0,164	-0,043	-															
PB2	0,289	-0,110	-0,055	0,025	-0,127	-														
PE2	0,417	-0,045	0,128	0,067	0,045	0,025	-													
PE1	0,473	-0,043	0,088	0,069	-0,027	0,038	-0,016	-												
BA5	0,388	-0,042	0,051	0,039	-0,009	0,016	-0,027	-0,015	-											
BA4	0,453	-0,039	0,135	0,102	0,013	0,064	-0,020	0,009	-0,005	-										
BA3	0,495	0,030	0,152	0,082	0,041	0,041	-0,003	-0,014	-0,005	0,021	-									
BA1	0,294	-0,111	-0,060	-0,055	-0,065	-0,121	-0,109	-0,129	-0,140	-0,134	-0,097	-								
RJ1	-0,025	0,328	0,126	0,205	0,323	0,257	0,517	0,521	0,428	0,500	0,598	0,355	-							
SP2	0,175	0,882	0,638	0,566	0,870	0,607	0,879	0,804	0,791	0,802	0,873	0,930	0,182	-						
SP1	0,372	0,823	0,735	0,665	0,820	0,757	0,830	0,808	0,798	0,816	0,834	0,825	0,372	-0,078	-					
PR1	0,337	0,807	0,710	0,638	0,804	0,730	0,818	0,796	0,783	0,802	0,824	0,810	0,330	-0,078	-0,004	-				
PR2	0,319	0,870	0,750	0,627	0,866	0,718	0,873	0,820	0,817	0,827	0,870	0,881	0,379	-0,068	-0,003	-0,007	-			
SC	0,341	0,826	0,728	0,644	0,822	0,736	0,835	0,808	0,797	0,814	0,841	0,830	0,361	-0,075	-0,008	-0,009	-0,007	-		
SEN1	0,723	0,820	0,787	0,809	0,819	0,759	0,881	0,890	0,869	0,875	0,909	0,831	0,762	0,839	0,902	0,893	0,897	0,896	-	
SEN2	0,782	0,931	0,885	0,840	0,929	0,825	0,939	0,918	0,916	0,914	0,942	0,941	0,866	0,942	0,921	0,916	0,941	0,923	0,261	-

Tabela 7: F_{ST} par a par da região controle mitocondrial de *Crassostrea rhizophorae*. Os números em cinza indicam os valores significativos ($p < 0,05$) após a correção de Bonferroni.

	CRB1	CRB2	PI	CE	RN	PB2	PB1	PE2	PE1	BA5	BA4	BA3	BA1	ES2	ES1	RJ1	RJ2	RJ3	SP3	SP1	PR1	PR2	SC
CRB1	-																						
CRB2	0,175	-																					
PI	0,774	0,831	-																				
CE	0,751	0,865	-0,010	-																			
RN	0,756	0,817	0,009	0,029	-																		
PB2	0,758	0,897	0,005	0,018	0,017	-																	
PB1	0,772	0,841	-0,007	-0,016	-0,007	0,020	-																
PE2	0,744	0,818	-0,009	-0,003	-0,012	0,001	-0,018	-															
PE1	0,772	0,860	-0,002	0,045	-0,016	0,040	-0,005	-0,016	-														
BA5	0,738	0,804	0,034	0,064	-0,009	0,031	0,021	-0,002	-0,014	-													
BA4	0,763	0,878	0,001	0,052	-0,021	0,002	0,001	-0,012	-0,032	-0,028	-												
BA3	0,685	0,775	-0,001	-0,009	0,008	0,002	0,009	-0,004	-0,001	0,021	-0,008	-											
BA1	0,744	0,830	0,018	0,050	-0,003	0,013	0,017	-0,012	-0,018	-0,018	-0,030	-0,001	-										
ES2	0,721	0,859	-0,027	-0,016	-0,036	0,004	-0,014	-0,053	-0,042	-0,058	-0,043	-0,059	-0,061	-									
ES1	0,751	0,822	-0,015	-0,012	-0,003	-0,008	-0,011	-0,014	-0,010	0,016	-0,012	-0,016	0,005	-0,037	-								
RJ1	0,787	0,879	0,032	0,016	0,045	0,155	0,010	0,019	0,041	0,073	0,100	0,045	0,077	0,037	0,031	-							
RJ2	0,778	0,835	0,050	0,031	0,059	0,144	0,030	0,041	0,047	0,084	0,095	0,058	0,083	0,039	0,048	-0,023	-						
RJ3	0,732	0,891	0,100	0,132	-0,006	0,167	0,059	0,012	0,026	-0,039	0,036	0,023	0,005	-0,095	0,069	0,135	0,107	-					
SP3	0,758	0,913	0,035	0,072	-0,018	0,181	-0,004	-0,021	-0,031	-0,035	0,027	0,005	-0,019	-0,053	0,017	-0,024	-0,034	-0,070	-				
SP1	0,822	0,880	0,131	0,065	0,186	0,263	0,124	0,145	0,202	0,237	0,272	0,161	0,240	0,210	0,140	0,045	0,055	0,350	0,182	-			
PR1	0,821	0,874	0,081	0,046	0,121	0,218	0,068	0,090	0,117	0,165	0,187	0,109	0,165	0,133	0,087	-0,008	0,003	0,261	0,070	0,014	-		
PR2	0,778	0,906	0,065	0,010	0,109	0,213	0,060	0,056	0,121	0,136	0,197	0,061	0,126	0,086	0,065	-0,019	-0,011	0,247	0,091	-0,031	-0,033	-	
SC	0,789	0,905	0,043	0,002	0,096	0,204	0,046	0,061	0,103	0,134	0,173	0,045	0,132	0,098	0,047	-0,005	0,001	0,269	0,119	0,002	-0,020	-0,034	-

A)



B)

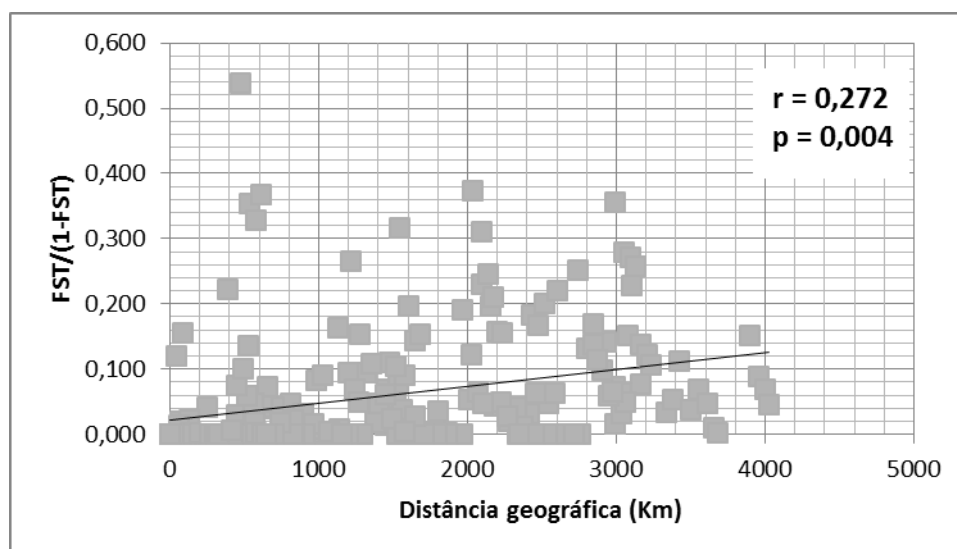
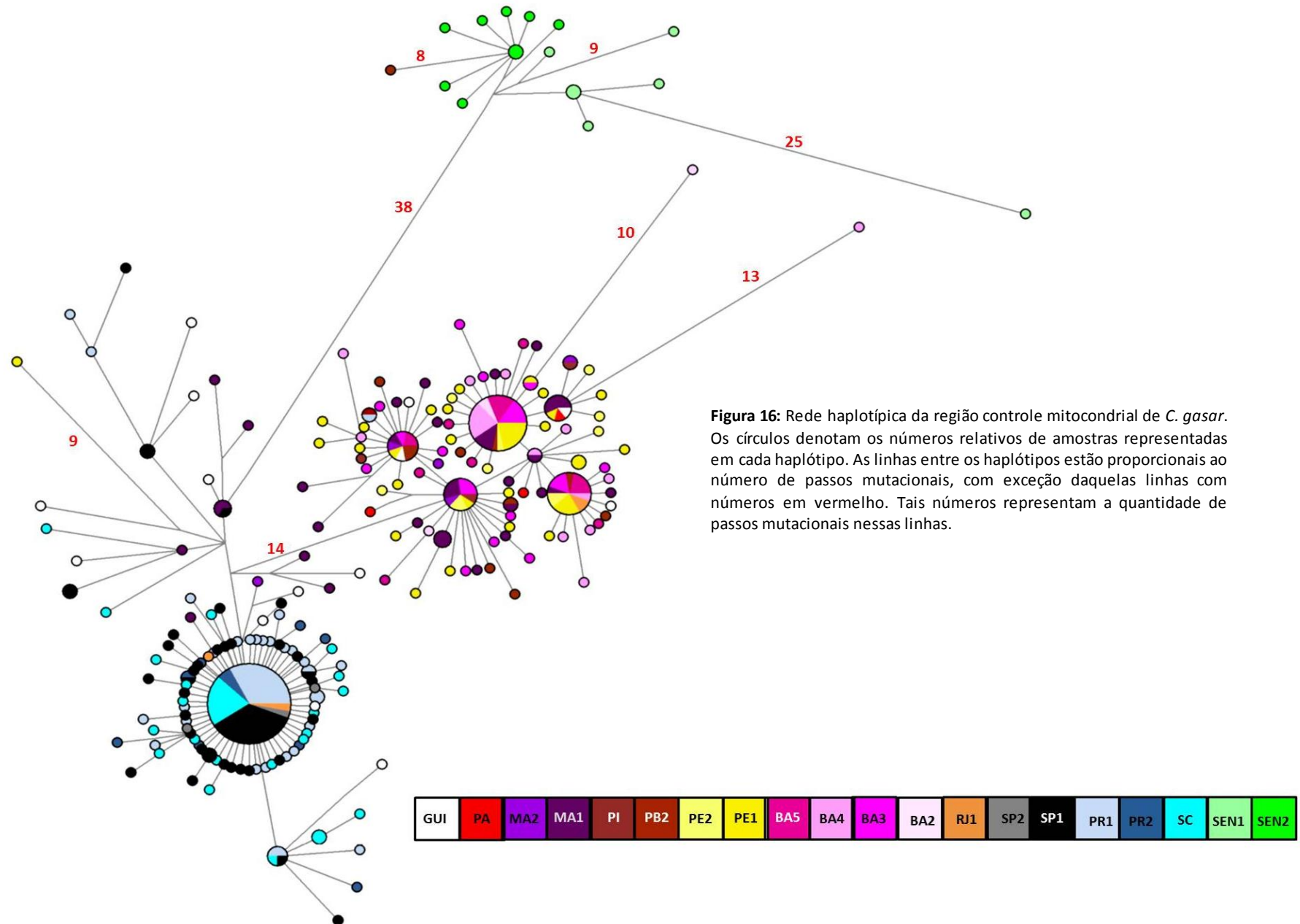


Figura15: Teste de Mantel para *C. gasar* (A) e *C. rhizophorae* (B) baseado em sequências de região controle mitocondrial indica a existência de uma correlação entre distância genética e distância geográfica. Em (A), todas as populações foram incluídas na análise, exceto as populações africanas. Em (B), as populações do Caribe foram excluídas da análise.

Nas Figuras 16 e 17 estão ilustradas as redes de haplótipos para *C. gasar* e *C. rhizophorae*, respectivamente. Em *C. gasar*, é claramente perceptível a formação de três grupamentos de haplótipos distintos que se diferenciam por sua localização geográfica: o grupo das populações africanas (SEN1 e SEN2), o das populações do norte-nordeste do Brasil (PA, MA2, MA1, PI, PB2, BA5, BA4, BA3 e BA2) e o das populações do sudeste-sul (RJ1, SP2, SP1, PR1, PR2 e SC). O grupamento formado pelos indivíduos da África é o mais distinto, separado do grupo brasileiro por ao menos 38 passos mutacionais. O grupo formado por populações do sudeste-sul possui um haplótipo muito frequente dividido pelas 6 localidades da região e outros haplótipos únicos advindos deste, formando uma rede com forma de estrela. Redes neste formato específico indicam expansão populacional. A rede haplotípica de *C. rhizophorae* foi construída apenas com haplótipos que foram observados em mais de um indivíduo (Figura 17A). Essa abordagem foi aplicada por conta da altíssima variabilidade desse marcador, para evitar o alto número de ambiguidades que inviabilizaria a interpretação da rede. Entretanto, os mesmos dados estão ilustrados em outra rede (Figura 17B) que exibe todos os haplótipos, incluindo aqueles exclusivos de um único indivíduo. A segunda rede foi construída utilizando o método *minimum spanning* que, diferente do método usual denominado como *median joining*, gera apenas uma rede mais provável, sem qualquer ambiguidade. O programa que utiliza este método, no entanto, não apresenta os haplótipos em tamanhos proporcionais nem mesmo é permitido editá-los; somente sua estrutura é exibida. A Figura 17 mostra dois grupos bastante distintos: populações do Caribe e populações do Brasil. Ao contrário das análises com F_{ST} , a rede de haplótipos brasileiros não indica estruturação populacional uma vez que os haplótipos são compartilhados por todas as localidades.



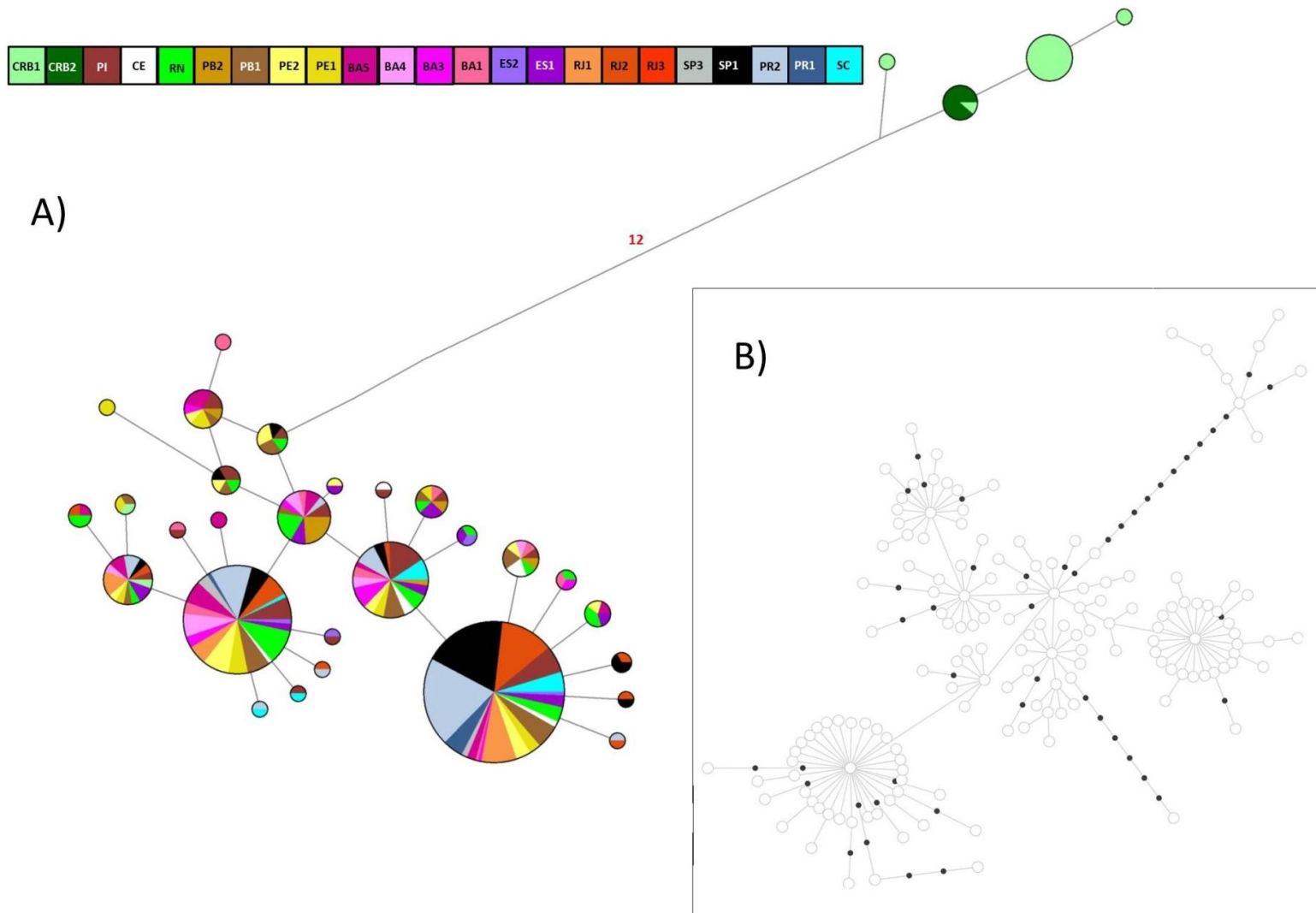
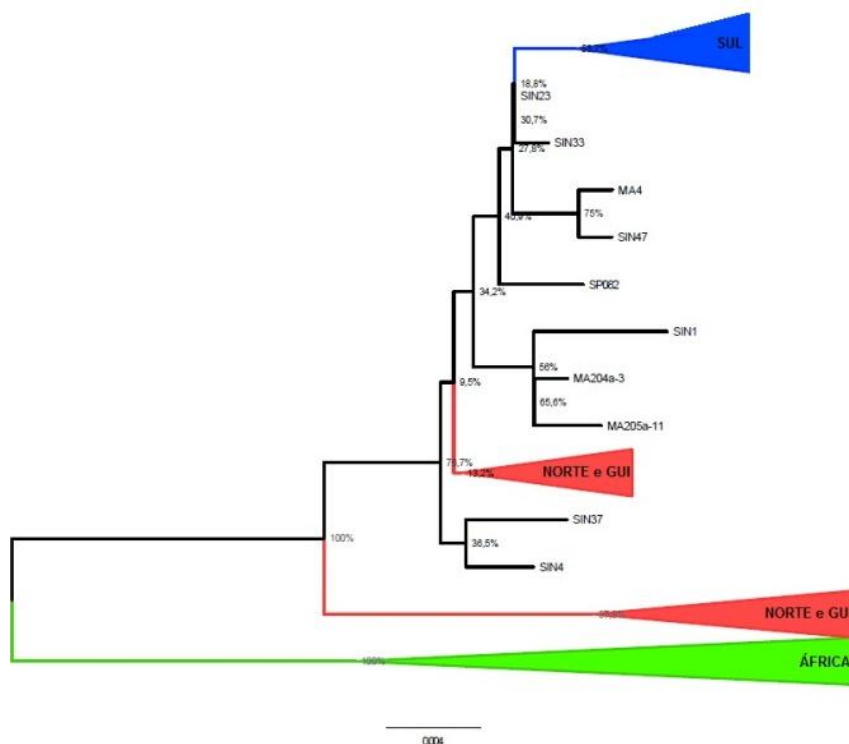


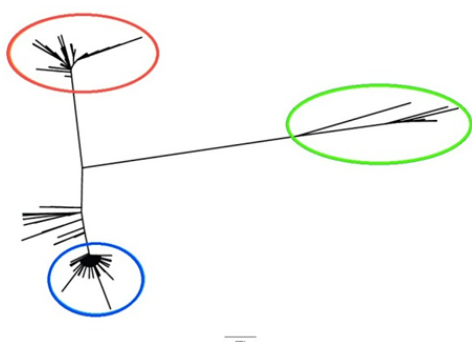
Figura 17: Redes haplotípicas da região controle mitocondrial de *C. rhizophorae*. Em (A), a rede exibe apenas os haplótipos com frequência maior que 1 indivíduo. Os círculos denotam os números relativos de amostras representadas em cada haplótipo. As linhas entre os haplótipos estão proporcionais ao número de passos mutacionais, com exceção da linha com número em vermelho, que representa a quantidade de passos mutacionais nessa linha. Em (B), uma representação da estrutura da rede haplotípica, onde todos os haplótipos compõem a rede.

A relação de similaridade entre as populações de *C. gasar* e *C. rhizophorae* está representada na Figura 18, através de árvores de Neighbour-Joining. As árvores recuperam a mesma estrutura observada na rede. Nas Figuras 18A e 18B, os 3 grupamentos distintos de *C. gasar* formados por amostras da África, Norte e Sul do Brasil são aparentes. E na Figura 18C, a grande distância filogenética entre o táxon do Caribe e as populações brasileiras é evidente.

A)



C)



D)

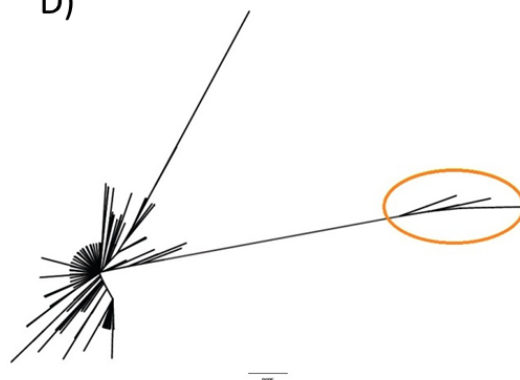


Figura 18: Árvores de Neighbor-Joining com o modelo evolutivo K2P baseado nas sequências de região controle de *C. gasar* (A e B) e *C. rhizophorae* (C). A e B) Em vermelho e azul, estão indicados os clados das populações do norte e sul do Brasil, respectivamente. Em verde, as ostras da África. Os indivíduos sem cor são uma mistura de indivíduos do norte, sul e Guiana Francesa. C) Em laranja, as ostras do Caribe.

A análise molecular de variância (AMOVA) foi realizada a fim de testar estatisticamente as possíveis partições entre as populações. Nesta análise, um agrupamento foi considerado mais adequado para explicar a distribuição espacial

dos haplótipos em subpopulações quando ele maximizava a parcela da variância entre grupos (Φ_{CT}) e minimizava a variância entre as populações dentro dos grupos (Φ_{SC}). Diversas combinações de grupamentos foram testadas para cada espécie e parte dessas está exposta nas Tabelas 6, 7 e 8. Para *C. gasar* (Tabela 8), os testes foram baseados na configuração da rede de haplótipos e foram testados até 6 grupamentos. Aquele que maximizou a parcela da variância entre grupos foi o de número 24 da Tabela 6, com 5 grupos distintos, que são referentes a: 1) grupo africano (SEN1 + SEN2), 2) Guiana Francesa (GUI), 3) grupo do norte do Brasil (PA, MA2, MA1, PI, PB2, BA5, BA4, BA3, BA2), 4) RJ1 e 5) grupo sul do Brasil (SP2, SP1, PR1, PR2 e SC). Essa subdivisão respondeu a 75,53% da variância encontrada e foi significativa ($p \cong 0,00$).

Como para *C. rhizophorae* a rede haplotípica não exibiu grupamentos claros que servissem de base para os testes da AMOVA, foi realizada uma análise espacial molecular de variância (SAMOVA), que é essencialmente igual à AMOVA, mas incorpora a informação espacial na forma das coordenadas geográficas dos haplótipos, excluindo a necessidade de definir os grupos *a priori*. Os critérios estabelecidos para escolha do grupamento mais adequado foram os mesmos utilizados para AMOVA, condicionado ao sentido geográfico, ou seja, um grupamento só poderia ser considerado caso envolvesse apenas populações adjacentes. As populações do Caribe foram excluídas da análise, uma vez que são extremamente diferenciadas geneticamente e poderiam causar um viés. O número de grupamentos testados variou de 2 até 12 e seus resultados estão expostos na Tabela 9. A configuração que maximiza a variação genética é a de 3 grupamentos respondendo por 9,63% ($\Phi_{CT} = 0,096$) da variação entre grupos presente, onde haveria uma notória diferenciação entre as amostras do norte e sul da costa do Brasil, e o RJ1 seria um estoque à parte. No entanto, os grupamentos resultantes da SAMOVA não atendem à segunda condição de escolha dos grupamentos sobre manter um sentido geográfico. Apesar de os resultados da SAMOVA não atenderem a todas as condições pré-estabelecidas, são um indicativo do número provável de grupamentos presentes nas populações de *C. rhizophorae* bem como de que há uma estruturação entre as populações do norte e sul. O resultado da SAMOVA de *C. rhizophorae* serviu como base para os testes da AMOVA onde grupamentos que variaram de 2 a 5 foram testados (Tabela 10). A melhor configuração testada foi a de número 7 com 3 grupamentos, cuja variação entre grupos foi de 9,42%,

correspondendo a: 1) norte do Brasil, Espírito Santo e parte do Rio de Janeiro (PI, CE, RN, PB2, PB1, PE1, PE2, BA5, BA4, BA3, BA1, ES2, ES1, RJ1 e RJ2); 2) RJ3 e SP3 e 3) o sul do Brasil (SP1, PR1, PR2 e SC).

Tabela 8: Análise molecular de variância (AMOVA) baseado em sequências de região controle mitocondrial de *C. gasar*. O grupamento mais provável, com maior Φ_{CT} e menor Φ_{SC} está destacado em negrito. As populações com a mesma cor pertencem ao mesmo grupamento.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
		GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI
		PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA
		MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2
		MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1
		PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI
		PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB
		PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2
		PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1
		BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5
		BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4
		BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3
		BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2
		RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1
		SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2
		SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1
		PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1
		PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2
		SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
		SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1
		SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2
Dentro das populações	Φ_{ST} p %	0,729 0,000 27,08	0,776 0,000 22,38	0,770 0,000 22,99	0,754 0,000 24,63	0,774 0,000 22,64	0,757 0,000 24,29	0,743 0,000 25,68	0,745 0,000 25,52	0,676 0,000 32,42	0,734 0,000 26,58	0,736 0,000 26,40	0,728 0,000 27,24	0,734 0,000 26,58	0,736 0,000 26,35	0,747 0,000 25,26	0,727 0,000 27,26	0,727 0,000 27,27	0,730 0,000 27,01	0,726 0,000 27,42	0,729 0,000 27,06	0,731 0,000 26,90	0,762 0,000 23,79	0,766 0,000 23,45	0,762 0,000 23,75
Entre populações, dentro dos grupos	Φ_{SC} p %	0,126 0,000 3,91	0,139 0,000 3,62	0,134 0,000 3,55	0,148 0,000 4,29	0,134 0,000 3,49	0,135 0,000 3,79	0,120 0,000 3,51	0,079 0,000 2,18	0,078 0,000 2,74	0,083 0,000 2,41	0,090 0,000 2,63	0,105 0,000 3,20	0,083 0,000 2,41	0,057 0,001 1,60	0,062 0,000 1,67	0,105 0,000 3,19	0,050 0,003 1,44	0,051 0,014 1,44	0,048 0,012 1,38	0,047 0,007 1,33	0,025 0,096 0,69	0,044 0,010 1,09	0,044 0,003 1,09	0,029 0,015 0,72
Entre grupos	Φ_{CT} p %	0,690 0,001 69,01	0,740 0,000 73,99	0,735 0,000 73,46	0,711 0,000 71,08	0,739 0,000 73,87	0,719 0,000 71,91	0,708 0,000 70,82	0,723 0,000 72,30	0,648 0,000 64,84	0,710 0,000 71,01	0,710 0,000 70,97	0,696 0,000 69,56	0,710 0,000 71,01	0,721 0,000 72,05	0,731 0,000 73,07	0,696 0,000 69,55	0,713 0,000 71,29	0,716 0,000 71,56	0,712 0,000 71,20	0,716 0,000 71,61	0,724 0,000 72,41	0,751 0,000 75,12	0,755 0,000 75,47	0,755 0,000 75,53

Tabela 9: Análise espacial molecular de variância (SAMOVA) com dados de região controle mitocondrial de *C. rhizophorae*. As populações com a mesma cor pertencem a um mesmo grupamento. N = número de grupamentos testados na SAMOVA. A coluna em destaque equivale ao grupamento com maior Φ_{CT} . As amostras do Caribe não estão incluídas.

N=	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI
	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE
	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2
	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1
	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2
	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1
	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5
	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4
	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3
	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1
	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2
	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1
	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1
	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2
	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3
	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3
	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1
	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1
	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2
	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Φ_{ST}	0,099	0,099	0,097	0,093	0,091	0,085	0,083	0,079	0,071	0,071	0,059
p Φ_{ST}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
%	90,05	90,12	90,34	90,65	90,93	91,53	91,69	92,13	92,85	92,90	94,14
Φ_{SC}						-	-	-	-	-	-
	0,004	0,003	0,003	0,001	0,001	0,004	0,004	0,006	0,012	0,011	0,024
p Φ_{SC}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,027	0,000
%	0,36	0,25	0,23	0,12	0,05	-0,40	0,35	-0,54	-1,09	1,02	-2,23
Φ_{CT}	0,096	0,096	0,094	0,092	0,090	0,089	0,087	0,084	0,082	0,081	0,081
p Φ_{CT}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
%	9,59	9,63	9,43	9,23	9,02	8,86	8,66	8,41	8,24	8,12	8,09

Tabela 10: AMOVA baseado em sequências da região controle mitocondrial de *C. rhizophorae*. As populações com mesma cor pertencem ao mesmo grupamento e o grupamento em destaque foi selecionado como aquele que melhor representaria a estruturação dessas populações. As amostras do Caribe não foram incluídas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI
	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE
	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2
	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1
	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1
	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2
	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5
	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4
	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3
	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1	BA1
	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2	ES2
	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1	ES1
	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1
	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2	RJ2
	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3	RJ3
	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3
	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1
	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1
	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2
	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Φ_{ST}	0,093	0,095	0,086	0,085	0,088	0,090	0,096	0,092	0,096	0,075	0,100	0,087	0,088	0,087	0,088
$p \Phi_{ST}$	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
%	90,64	90,53	91,38	91,55	91,22	90,98	90,36	90,70	90,39	92,46	89,99	91,32	91,17	91,25	91,21
Φ_{SC}	0,013	0,008	0,017	0,019	0,000	0,084	0,002	0,012	0,009	0,020	0,015	0,001	-0,002	0,001	-0,001
$p \Phi_{SC}$	0,035	0,115	0,008	0,008	0,529	0,219	0,412	0,043	0,093	0,007	0,023	0,470	0,699	0,450	0,677
%	1,21	0,75	1,58	1,77	0,03	0,57	0,22	1,14	0,82	1,89	1,39	0,13	-0,17	0,10	-0,11
Φ_{CT}	0,081	0,087	0,070	0,067	0,087	0,084	0,094	0,081	0,088	0,056	0,086	0,085	0,090	0,086	0,089
$p \Phi_{CT}$	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
%	8,14	8,71	7,04	6,68	8,74	8,44	9,42	8,16	8,79	5,64	8,63	8,55	9,01	8,65	8,90

4.1.2 Análise demográfica

Testes estatísticos originalmente desenvolvidos para avaliar a neutralidade seletiva das mutações foram depois adaptados para testar a expansão demográfica recente, pois os dois fenômenos (seleção natural e expansão populacional) têm efeitos semelhantes na mudança de proporções de haplótipos comuns e raros nas populações. Normalmente a discriminação entre os dois é feita através de simulações de expansões, de modo que, quando os dados não são incompatíveis com modelos de expansão a interpretação dada é demográfica e não seletiva. Isso é particularmente justificável quando as regiões consideradas não são codificantes, como é o caso da região controle mitocondrial usada nesta tese. Os testes de neutralidade Tajima D e F_s de F_u foram efetuados para as duas espécies e seus resultados são apresentados nas Tabelas 11 e 12, incluindo seus valores de p associados. Os valores de Tajima D significativos foram negativos para todas as populações das duas espécies, indicando que haja um excesso de variantes com nucleotídeos raros quando comparado ao esperado sob um modelo neutro de evolução, indicando expansão populacional. Para *C. gasar*, quase todas as populações do sul mostraram desvios de neutralidade (SP1, PR1, PR2 e SC), bem como as populações africanas e quatro populações do nordeste (PB2, PE2, BA5 e BA4). Em *C. rhizophorae*, apenas 6 populações das 23 analisadas exibiram desvio de neutralidade de acordo com os valores de p para Tajima D: PI, BA5, BA3, ES1, RJ2 e SP1. Os valores de F_s de F_u , que se baseia na distribuição dos haplótipos, foram significativos para um número maior de populações e também exibiram valores negativos para todas, indicando um excesso de haplótipos raros além do que seria esperado sob neutralidade. Considerando as duas análises, a hipótese de evolução neutra foi rejeitada para todas as populações, exceto as duas populações do Caribe (CRB1 e CRB2). Dessa maneira, fez-se necessária uma análise da distribuição das diferenças (*Mismatch Distribution Analysis*) (110) a fim de discriminar entre as duas possíveis hipóteses que explicariam esse resultado: seleção natural ou expansão populacional.

Tabela 11: Testes de neutralidade para as populações de *C. gasar*, baseado em sequências da região controle – D de Tajima e FS de Fu. Os valores em cinza foram significativos ($p < 0,05$).

	Teste D de Tajima		Teste FS de Fu	
	D Tajima	valor de p (D Tajima)	FS	valor de p (FS)
GUI	-0,372	0,364	-6,196	0,008
PA	0,000	0,757	0,308	0,365
MA2	-1,110	0,098	-0,261	0,254
MA1	-1,114	0,130	-9,887	0,003
PI	0,000	0,764	0,458	0,389
PB2	-2,002	0,002	-2,236	0,123
PE2	-0,845	0,203	-4,628	0,003
PE1	-2,225	0,002	-17,674	0,000
BA5	-1,927	0,018	-1,578	0,231
BA4	-1,826	0,016	-5,910	0,007
BA3	-1,491	0,054	-10,323	0,000
BA1	0,000	0,933	1,609	0,709
RJ1	1,704	0,985	4,313	0,971
SP2	-0,710	0,259	-0,887	0,090
SP1	-2,565	0,000	-25,864	0,000
PR1	-2,550	0,000	-17,765	0,000
PR2	-2,171	0,003	-3,938	0,007
SC	-2,582	0,000	-13,514	0,000
SEN1	-1,607	0,013	0,367	0,476
SEN2	-1,861	0,011	-3,977	0,006

Tabela 12: Testes de neutralidade para as populações de *C. rhizophorae*, baseado em sequências da região controle – D de Tajima e FS de Fu. Os valores em cinza foram significativos ($p < 0,05$).

	Teste D de Tajima		Teste FS de Fu	
	D Tajima	valor de p (D Tajima)	FS	valor de p (FS)
CRB1	-1,361	0,083	-0,093	0,538
CRB2	-1,562	0,051	-0,459	0,154
PI	-1,705	0,029	-25,070	0,000
CE	-0,811	0,243	-3,273	0,017
RN	-1,293	0,079	-19,689	0,000
PB2	-0,453	0,348	-1,985	0,051
PB1	-0,855	0,193	-11,875	0,000
PE2	-0,919	0,195	-7,777	0,001
PE1	-0,754	0,250	-5,750	0,001
BA5	-1,540	0,038	-7,590	0,000
BA4	-0,917	0,212	-3,064	0,018
BA3	-1,628	0,033	-1,925	0,137
BA1	-1,047	0,153	-7,353	0,000
ES2	-0,596	0,393	-1,554	0,100
ES1	-1,798	0,015	-16,780	0,000
RJ1	0,183	0,622	0,886	0,708
RJ2	-1,720	0,022	-17,745	0,000
RJ3	-0,389	0,477	-0,946	0,138
SP3	0,768	0,741	1,020	0,704
SP1	-1,932	0,002	-15,699	0,000
PR1	-1,473	0,058	-10,997	0,000
PR2	-0,453	0,342	0,466	0,622
SC	-0,370	0,406	-1,420	0,144

A análise da distribuição das diferenças foi submetida a grupos de populações previamente observados na rede haplotípica e AMOVA. Por conseguinte, a análise foi realizada para 4 grupos de populações distintos de *C. gasar*: 1- GUI; 2- norte do Brasil (PA, MA2, MA1, PI, PB2, BA5, BA4, BA3, BA2); 3- sul do Brasil (RJ1, SP2, SP1, PR1, PR2 e SC) e 4- África (SEN1 e SEN2) (Figura 19). O mesmo se sucedeu para *C. rhizophorae*, onde dois grupos foram analisados (Figura 20): 1- Norte da costa do Brasil (CE, RN, PB2, PB1, PE1, PE2, BA5, BA4, BA3, BA1, ES2, ES1); 2- Sul da costa do Brasil (RJ1, RJ2, RJ3, SP3, SP1, PR1, PR2 e SC). As populações do Caribe foram excluídas da análise, pois os valores obtidos nos testes de neutralidade não foram significativos. Os parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão demográfica encontram-se na Tabela 13 para *C. gasar* e *C. rhizophorae*. Os valores de p associados ao valor estimado para a soma dos quadrados dos desvios foram significativos apenas para Guiana Francesa (GUI), rejeitando a hipótese de expansão populacional para esta localidade. Em todos os grupos restantes analisados a hipótese de expansão não foi rejeitada, sugerindo que essas populações estejam em crescimento demográfico. Esta hipótese é graficamente representada nas Figuras 19 e 20, onde a distribuição se mostra unimodal, refletindo a possibilidade de uma expansão recente (110).

Um dos parâmetros estimados é o tau (τ) que está relacionado com o tempo de expansão através da fórmula:

$$t = \frac{\tau}{2} \times \frac{1}{u}$$

Onde t é o tempo decorrido desde a última expansão e u é a probabilidade cumulativa de substituição, estimada a partir de μ (taxa de substituição). Schenekar and Weiss (142) atentaram para o erro comum cometido em diversas publicações que confundiram u com μ . Para calcular u,

$$u = \frac{\mu}{My} \times pb$$

Onde, pb é o tamanho da sequência analisada.

A taxa de mutação utilizada para a região controle mitocondrial nesta tese foi de $14,84 \times 10^{-8}$. Na ausência de qualquer trabalho realizado com região controle mitocondrial de *Crassostrea* spp. e sua taxa de mutação, a estratégia utilizada foi uma aproximação baseada em outras informações disponíveis.

Foi observado que a taxa de mutação para citocromo oxidase I de invertebrados marinhos seria de $5,3 \times 10^{-8}$ (143). Ao mesmo tempo, foi observado que taxa de mutação da região controle seria 2,8 (144) vezes a taxa de mutação dos outros genes mitocondriais. Com base nas informações anteriores, a taxa de mutação da região controle mitocondrial de *Crassostrea* spp. foi estimada como sendo 2,8 vezes maior que a taxa mutação de COI de invertebrados marinhos ($5,3 \times 10^{-8}$), que resultou em $14,84 \times 10^{-8}$. Esse valor foi usado nos cálculos de estimativa do tempo transcorrido desde a última expansão baseado em τ e nas análises de *Bayesian Skyline Plot*. A Tabela 13 mostra o tempo calculado para cada grupo em que foi detectada uma provável expansão populacional na análise da distribuição das diferenças. Em *C. gasar*, o grupo do sul teve sua expansão demográfica estimada como a mais recente, em torno de 2700 anos, e o grupo com expansão mais antiga foi aquele formado pelas populações do norte do Brasil (aproximadamente 22,9 mil anos). As estimativas sugerem que o grupo africano começou sua expansão logo após as populações do norte, há 16,7 mil anos. Ainda na mesma tabela, as estimativas do tempo decorrido desde a última expansão para *C. rhizophorae* foram maiores: a população do norte teria iniciado sua expansão há 65,8 anos, enquanto a população do sul há 56,6 mil anos atrás.

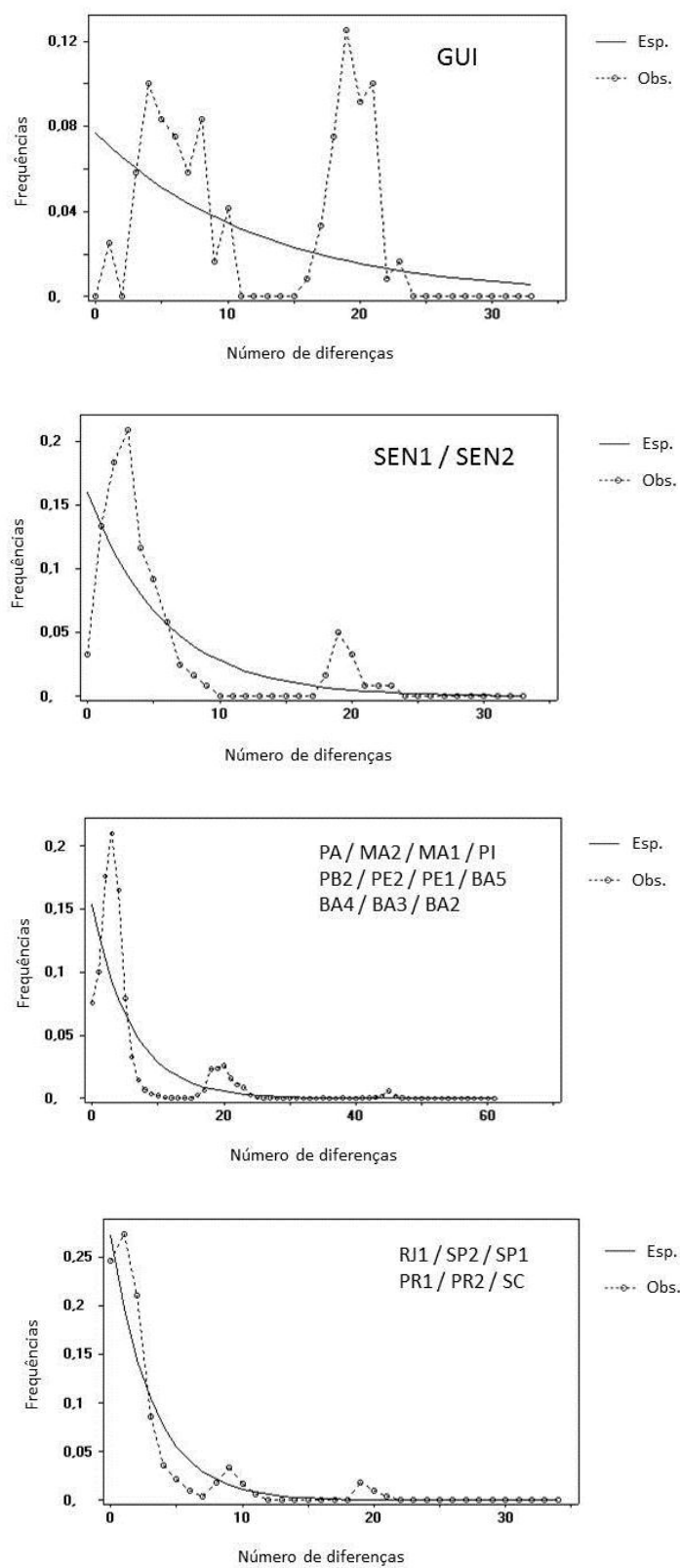


Figura 19: Análise da distribuição das diferenças das sequências da região controle mitocondrial de *C. gasar*. As linhas cheias indicam o comportamento esperado sob um cenário de expansão e as linhas pontilhadas o comportamento observado.

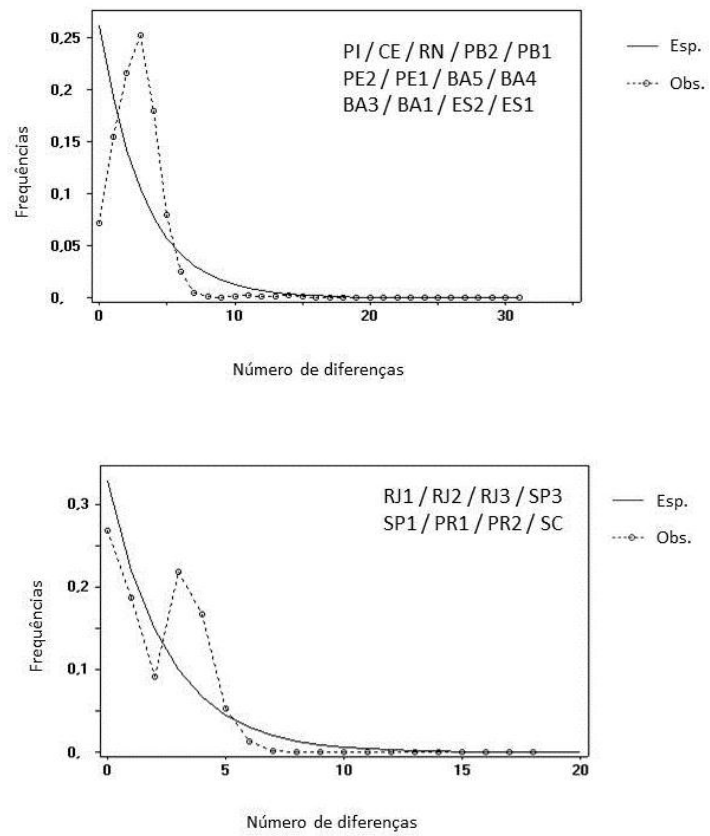


Figura 20: Análise da distribuição das diferenças das sequências da região controle mitocondrial de *C. rhizophorae*. As linhas cheias indicam o comportamento esperado sob um cenário de expansão e as linhas pontilhadas o comportamento observado.

Tabela 13: Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão demográfica para ambas as espécies. SSD = soma dos quadrados dos desvios, p (S.S.D.) = valor de p associado, $1/u$ = tempo mutacional calculado a partir de μ ($14,84 \times 10^{-8}$), T = tempo decorrido desde a última expansão. Em cinza, os valores de p estatisticamente significativos, que rejeitam a hipótese de expansão demográfica. *Em *C. gasar*: Africa = SEN1 e SEN2; Norte = PA, MA2, MA1, PI, PB2, PE2, PE1, BA5, BA4, BA3 e BA1; Sul = RJ1, SP2, SP1, PR1, PR2 e SC. ^aEm *C. rhizophorae*: Norte = PI, CE, RN, PB2, PB1, PE2, PE1, BA5, BA4, BA3, BA1 e ES2; Sul = ES1, RJ1, RJ2, RJ3, SP3, SP1, PR1 e SC.

	θ_0	θ_1	τ	S.S.D.	p (S.S.D)	$1/u$ (anos)	T (anos)
<i>C. gasar</i>							
GUI	0	100	22,14	0,0326	0,004	-	-
*Africa	3,18	509,38	2,64	0,0056	0,748	12650	16693
*Norte	0,028	29,98	3,62	0,0053	0,150	12650	22880
*Sul	2,354	100	0,430	0,0063	0,674	12650	2720
<i>C. rhizophorae</i>							
^a Norte	0,000	4,619	3,570	0,0145	0,401	36865	65803
^a Sul	0,005	80,0	2,908	0,0024	0,153	36865	53601

As análises de *bayesian skyline plot* (BSP) foram realizadas para todos os grupos que indicaram expansão populacional através do *mismatch distribution*, com exceção do grupo africano, pois segundo o Dr. Oliver Pybus (comunicação pessoal) é recomendado utilizar entre 20 e 30 sequências para uma análise de BSP, uma vez que os limites de confiança levam em conta o tamanho amostral.

A Figura 21 mostra os gráficos de BSP para os grupos do norte (A) e sul (B) de *C. gasar*. Em ambos os gráficos, estão marcados dois pontos distintos de expansão, de acordo com o aclave da curva. Os pontos mais recentes coincidem com os valores estimados para o tempo transcorrido desde a última expansão através do τ . Para a população do norte, o ponto mais recente de expansão ocorre há 12 mil anos, aproximadamente, e um segundo ponto aparece há cerca de 22 mil anos. A população do sul tem dois pontos de expansão, onde a mais recente teria ocorrido há cerca de 5 mil anos e a anterior, há 11 mil anos. Ambos os grupos demonstram ter iniciado sua expansão populacional no fim da última glaciação, após uma redução populacional.

Os gráficos de BSP de *C. rhizophorae* indicam uma expansão demográfica mais antiga, em convergência com os resultados a partir de τ (Figura 22). O grupo das populações do norte do Brasil exibe uma expansão a partir de 65 mil anos atrás, enquanto as populações do sul parecem ter começado a se expandir há 55 mil anos. Em ambos os casos, a expansão não parece ter sido precedida de uma redução populacional efetiva e a expansão teria ocorrido logo após um pico anterior ao último máximo glacial (LGM).

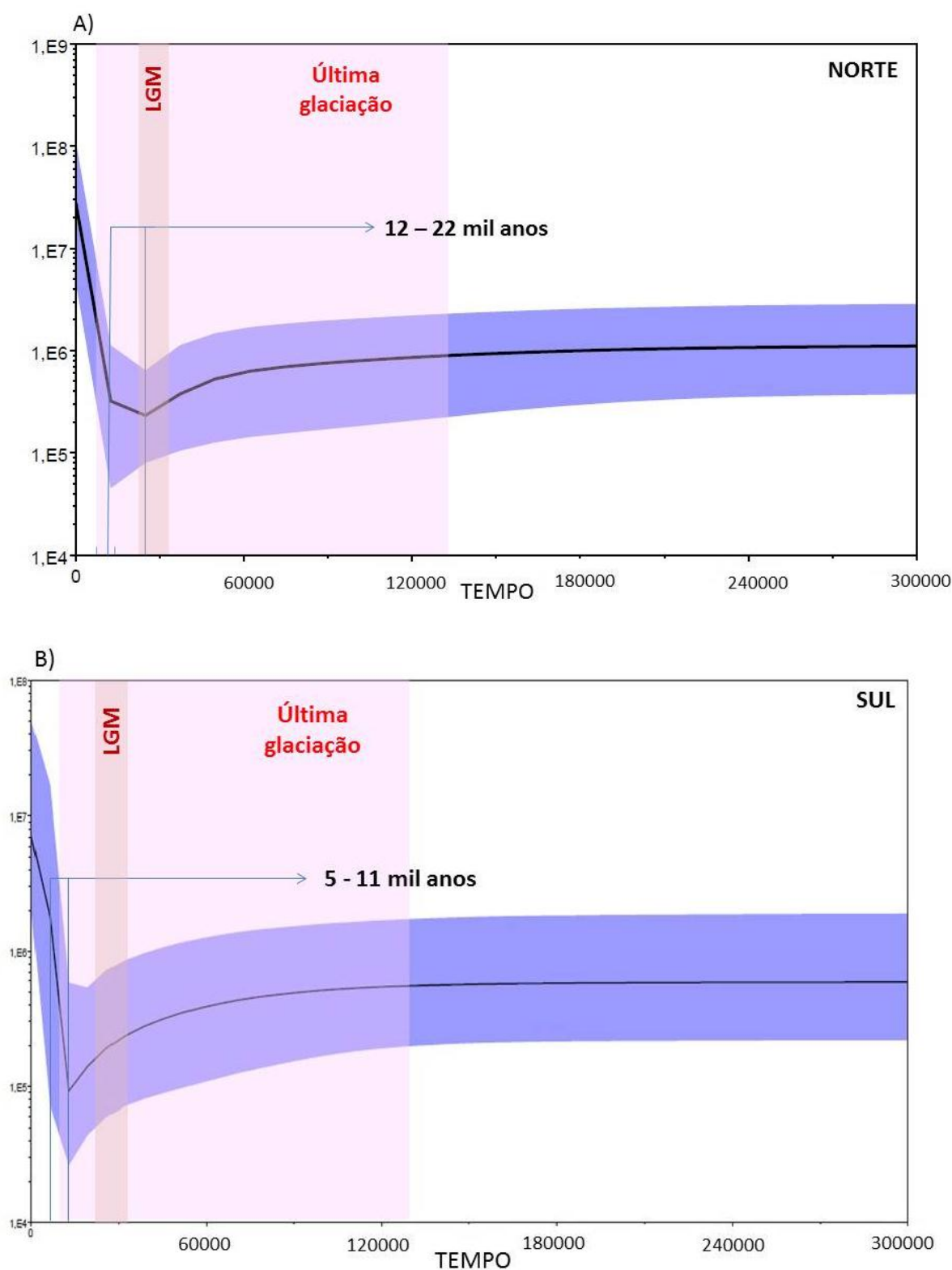


Figura 21: Gráficos de *Bayesian Skyline Plot* (BSP) baseado nas sequências da região controle mitocondrial de *C. gasar*, com amostras das populações do (A) norte (PA, MA2, MA1, PI, PB2, PE2, PE1, BA5, BA4, BA3 e BA1) e (B) sul (RJ1, SP2, SP1, PR1, PR2 e SC). Em azul, estão demarcados os limites para os intervalos de maior densidade *a posteriori* com 95% de probabilidade. LGM: Último máximo Glacial.

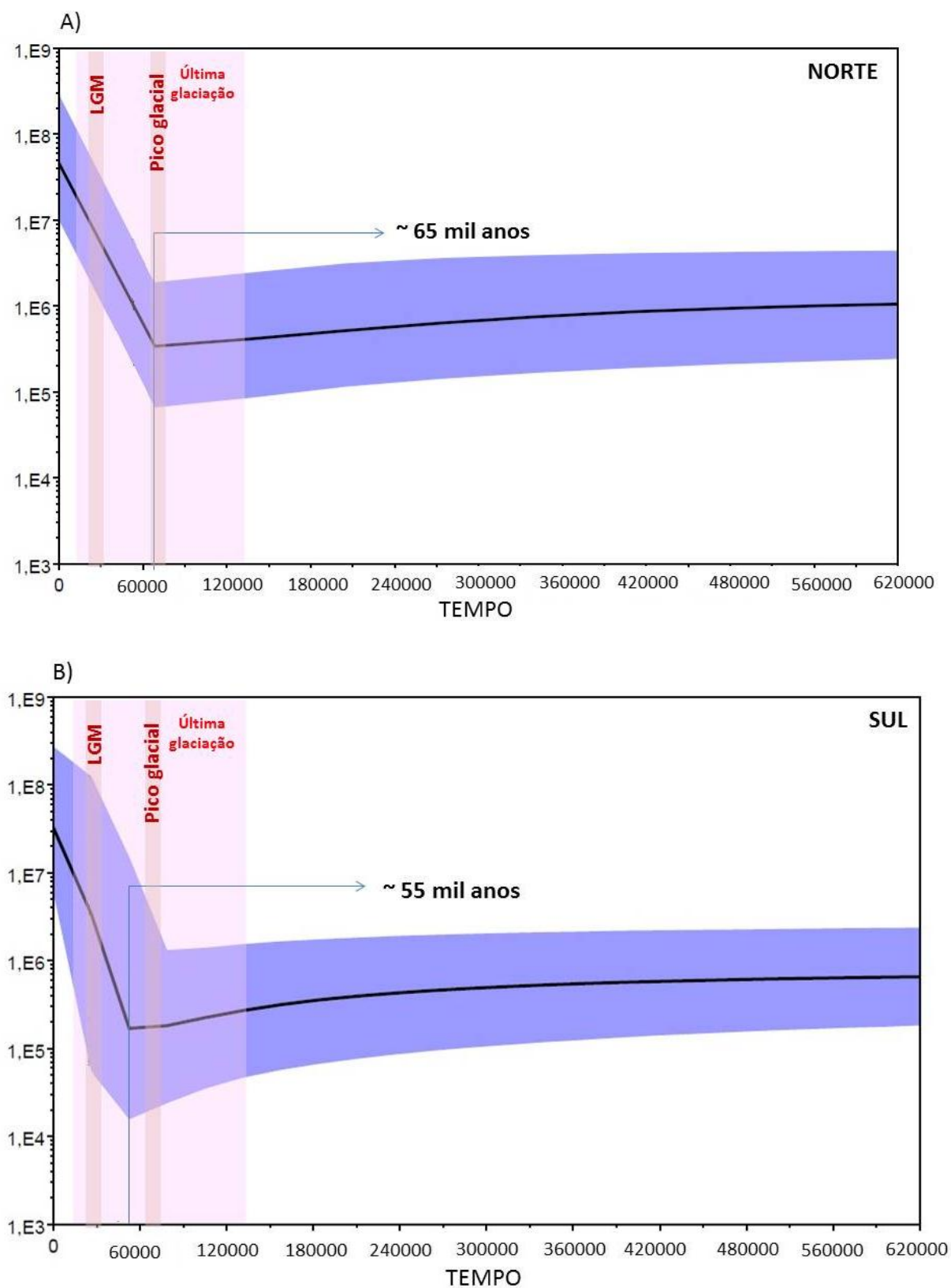


Figura 22: Gráficos de *Bayesian Skyline Plot* (BSP) baseado nas sequências da região controle mitocondrial de *C. rhizophorae*, com amostras das populações do (A) norte (PI, CE, RN, PB2, PB1, PE1, PE2, BA5, BA4, BA3, BA1 e ES2) e (B) sul (RJ1, SP2, SP1, PR1, PR2 e SC). Em azul, estão demarcados os limites para os intervalos de maior densidade *a posteriori* com 95% de probabilidade. LGM: Último máximo Glacial.

4.2 MICROSSATÉLITES

4.2.1 Sobre o desenvolvimento dos microsatélites

Uma etapa preliminar de análise do polimorfismo de 21 pares de iniciadores (10 de *C. gasar* e 11 de *C. rhizophorae*) de microsatélites desenvolvidos nesta tese foi realizada com cerca de 25 indivíduos advindos de uma única população de cada espécie¹. Entretanto, quando da amplificação de todas as populações utilizadas neste trabalho, 4 *loci* de *C. gasar* foram descartados pois não funcionavam para algumas populações inteiras. Os 17 pares de iniciadores foram também testados em dois indivíduos de *C. virginica* e outros dois de *C. gigas*, duas espécies economicamente importantes do gênero. Os resultados da amplificação cruzada encontram-se na Tabela 14, onde são mostradas as temperaturas ótimas para amplificação nessas espécies. Todos os *loci*, exceto RHIZ18, amplificaram ao menos uma espécie.

Tabela 14: Teste de amplificação cruzada dos iniciadores desenvolvidos para *C. gasar* e *C. rhizophorae*, testados em *C. virginica* e *C. gigas*. Ta = temperatura de anelamento.

Iniciador	<i>C. virginica</i> Ta (°C)	<i>C. gigas</i> Ta (°C)
GASA5	56	54
GASA6	58	-
GASA9	58	-
GASA11	-	54
GASA15	60	54
GASA25	58	-
RHIZ3	54	-
RHIZ7	60	58
RHIZ8	60	60
RHIZ11	54	56
RHIZ13	54	56
RHIZ12	54	-
RHIZ19	58	56
RHIZ42	62	-
RHIZ49	56	54
RHIZ56	56	58

¹ O manuscrito deste trabalho encontra-se no Anexo e foi submetido à revista *Molecular Biology Reports*. Está ainda sob revisão.

O *locus* GASA25 foi posteriormente excluído devido ao baixo sucesso de amplificação. Assim, com apenas 5 *loci* de microssatélites para *C. gasar*, decidimos testar outros 5 pares de iniciadores espécie-específicos publicados recentemente (121) e um par foi descartado pelo mesmo motivo. Por fim, seguimos as análises com 9 *loci* para *C. gasar* e 11 *loci* para *C. rhizophorae*. Esses marcadores foram agrupados em painéis considerando a faixa de distribuição dos tamanhos dos alelos. Aqueles marcadores cujo tamanho dos alelos se sobrepunha foram amplificados utilizando caudas marcadas com fluorescências distintas (VIC, 6-FAM, PET ou NED) (Tabela 15).

Foram analisadas 585 amostras para *C. gasar* e 593 amostras para *C. rhizophorae* (Tabela 16). Na mesma tabela, o número de amostras para cada população encontra-se discriminado. Em algumas populações de *C. gasar* a proporção de dados faltantes (*missing data*) foi extremamente alta. Duas populações da África (NIG e SEN1) e a população da Guiana Francesa (GUI), apresentaram 45%, 37% e 40,8% de dados faltantes, respectivamente. Não obstante tal proporção de ausência de dados não seja adequada, essas populações não foram excluídas na análise, dada sua importância geográfica. As análises utilizadas a seguir trabalham com dados faltantes e, por isso, não houve qualquer impedimento metodológico de seguir com as abordagens pré-estabelecidas.

Tabela 15: Iniciadores de microssatélites utilizados nesta tese. *(121) / ^aIniciadores desenvolvidos durante a execução desta tese.

Espécie		Primer (5'-3')	No de	Motif	Fluoróforo	Ta (°C)
<i>Crassostrea gasar</i>	*CGC04	CTCCACTTGTTTCAGTCTGCATC CGGAAATAACGACGGAAGACC	Sem número	(AG)21	VIC	60
	*CGE03	GGATCCAGCAGGTGTTAGGG GTTGCAAGAGGGACAGTATCG	Sem número	(AC)7	6-FAM	60
	*CGF05	CTGTGGGTCAACAGACATAGAGG GAGGATCCACCTTAACATGACC	Sem número	(AC)9	PET	60
	*CGG07	GAACGACGTCACCTTATCCCAAC GTCGCTCTGTAGGCCTATATTCTC	Sem número	(CA)26	PET	60
	^a GASA5	CTTGTAAGAATGAGCTTGGCCTT GATCTGAGTGTCTGTGAG	KC335527	(GT)17	PET	54
	^a GASA6	TTCTTTTCAACGAATTGAATCC GACCTTTTCTGAACCAACACA	KC335530	(GTT)57	NED	54
	^a GASA9	TGTTAGGTTTGTAGGTGTACTG GACGTGGTCTACTGTCTGAG	KC335528	(GTT)10	NED	54
	^a GASA11	GGCTCGACATTTTCTATTCCAG AAAGTCTAATCACGGTCAACCC	KC335531	(CT)32	PET	60
	^a GASA15	ACAACATTGGTCTTTTGTGGCT AGCGAGTGTTTGTAAAGGAGGAG	KC335529	(ACA)4	6-FAM	60
	^a GASA25	GGGGTGGGGTAGACAATTAAC CAATTCCTTTTGTGTGTTGC	KC335532	(CAA)4CATCAT(CAA)7	VIC	60
	^a RHIZ7	CGGCACTTCTTATGCCCTATAC ATATTTGTCATCACCGAGCAGG CTGAATGTCCATAGCATACCAGAA	KC335534	(TG)25	PET	64
	^a RHIZ8	TGGGCTTAAATTGATAAGACGG CTTGTGCTGTATGGGTTTTCTGT	KC335535	(CA)21	VIC	60
	^a RHIZ11	GATTACAAAGGGGTAAACAAGACAG TCAAGTGAAAACAAGTTCGCTC	KC335543	(TTG)12(GTT)11	PET	54
^a RHIZ12	TCGGTAGGTCAAAACCTTCAGT TTACACGCTCCCAAATGTTGT	KC335541	(CA)22	6-FAM	58	
^a RHIZ13	ATGGTAGTGAGAGCCACCAATC	KC335539	(TG)6(GT)11	6-FAM	58	

Continua

Continuação

Continua
Continuação

<i>Crassostrea rhizophorae</i>	^a RHIZ18	CATCCAGACCTCAATGTTACGA GATCATTTTAACACAACACCCC CATCATCTACTTCCTGCGAGAC	KC335542	(AC)14	NED	58
	^a RHIZ19	CTCCGAACTGTTCCACACAAGT GATCATGGAGGGTGTATCATCGTGT	KC335540	(TG)21A(GA)16	VIC	60
	^a RHIZ42	TTTGCAGAGAGTGGACGTAAG AGTAAATGCTGTTTCATACTTGGC	KC335536	(CA)5(CA)5(AC)7(CA)5(CA)7 (CA)5(AC)7(CA)9(CA)5	VIC	64
	^a RHIZ49	TGAACTGCATCAACTGAGGAAA GCCAACCTGACCCACTATTTTA	KC335537	CAA(6)n(CAC)4TAC(CAA)7	NED	64
	^a RHIZ56	CTCCTTACAGACCATGTGTTGC CAAAACCCAAGTTTACCACGTT	KC335538	(TTG)4(TCG)5	PET	62
						Conclusão

Tabela 16: Número de indivíduos de cada localidade, para cada espécie, analisados.

	<i>C. gasar</i> (9 loci)	<i>C. rhizophorae</i> (11 loci)
CRB1	-	25
CRB2	-	11
GUI	50	-
PA	10	-
MA2	12	-
MA1	59	-
PI	6	53
CE	-	12
RN	-	45
PB2	24	10
PB1	-	36
PE2	25	28
PE1	37	27
BA5	24	30
BA4	21	13
BA3	28	14
BA2	3	-
BA1	-	19
ES2	-	5
ES1	-	30
RJ1	11	29
RJ2	-	46
RJ3	-	6
SP3	-	7
SP2	4	-
SP1	65	55
PR1	63	66
PR2	15	11
SC	45	15
SEN1	22	-
SEN2	15	-
NIG	46	-
TOTAL	585	593
Total de amostras analisadas	1178	

4.2.2 Análise dos erros de genotipagem

Além de os possíveis erros de atribuição das classes de alelos terem sido submetidos a uma correção pelo programa FLEXIBIN, os dados genotípicos foram também analisados no programa MICROCHECKER em busca de erros de genotipagem ou presença de alelos nulos. Quando em condição de excesso de homozigotos, o programa indica a possibilidade de ter havido erros de atribuição, ou *dropout* de alelos maiores e, especialmente, indica a presença de alelos nulos. Muitos *loci* demonstraram conter um excesso de homozigotos em quase todas as localidades, mas nenhum deles indicou erros de atribuição. Em todos os casos, o programa apontou a existência de alelos nulos.

Foi calculada uma estimativa da frequência de alelos nulos através do método elaborado por Van Oosterhout (145) cujos resultados estão disponíveis nas Tabelas 17 e 18, para *C. gasar* e *C. rhizophorae*, respectivamente. Em *C. gasar* a maior estimativa de proporção de alelos nulos foi obtida para a população PE2, no *locus* GASA5, cujo valor foi de 38%, muito próximo do maior valor encontrado para *C. rhizophorae* (40,9%) na população RJ2, *locus* RHIZ18. É perceptível que *C. rhizophorae* apresentou, proporcionalmente, mais populações com *loci* com alelos nulos do que *C. gasar*. Tais resultados conduziram ao cálculo do coeficiente F_{IS} por população por *locus* (dados não mostrados). Este índice refere-se ao desvio médio das proporções de Hardy-Weinberg dentro das sub-populações. A análise obteve um valor médio considerado muito alto para o *locus* RHIZ18 (47,8%) e, por este motivo, este *locus* foi excluído das análises posteriores, restando 10 *loci* analisados para *C. rhizophorae*.

Tabela 17: Frequências estimadas de alelos nulos através do teste de Van Oosterhout (145) para cada *locus* de *C. gasar*. Os números marcados em cinza equivalem aos *loci* que tiveram a presença de alelos nulos detectada pelo programa Microchecker com $p < 0,05$. As populações BA2, RJ1 e SP2 não foram analisadas devido à ausência de dados suficientes.

	GUI	PA	MA2	MA1	PI	PB2	PE2	PE1	BA5	BA4	BA3	SP1	PR1	PR2	SC	SEN1	SEN2	NIG
CGC04	0,0348	0,1446	0,0844	0,1162	0,1412	0,1481	-0,0217	-0,0175	0,0353	-0,0429	0,0773	0,0986	0,0177	0,0487	0,0165	0,0783	0,0429	0,1668
CGE03	0,1639	0,1289	0,1391	0,1192	-0,1092	0,2239	0,244	0,1725	0,206	0,0226	0,1237	0,2161	0,0432	0,0376	0,0663	-0,0201	-0,0066	0,2106
CGF05	0,0336	-0,3167	0,0394	0,0167	0,0903	0,001	-0,0049	0,0698	0,022	0,0719	0,055	-0,0427	0,0148	-0,0255	-0,0441	-0,0015	-0,0024	0,095
CGG07	0,3413	0,1936	-0,0135	0,309	0,1959	0,1693	0,2441	0,2087	0,1335	0,3376	0,2201	0,3768	0,2128	0,2896	0,2642	0,1552	0,1123	0,1034
GASA5	0,0854	0,2323	0,0205	0,2433	0,2361	0,1506	0,3867	0,233	0,1575	0,2248	0,179	0,1859	0,2029	0,1577	0,1983	-0,1544	-0,0608	0,2308
GASA6	0,1215	0,3198	0,2854	0,0684	0,0903	0,2349	0,1843	0,2278	0,1745	0,0088	0,0986	0,2527	0,2063	0,0477	0,3069	0,1559	0,102	0,2895
GASA9	0,046	0,1209	0,0787	0,0446	0,0231	0,0862	0,1341	0,0626	-0,0369	-0,156	-0,106	-0,0038	-0,0917	-0,0388	-0,1263	0,0161	-0,0556	0,0141
GASA11	0,062	0,0862	-0,0209	0,04	0,1046	0,1142	0,0603	0,1743	0,0319	-0,0439	0,1026	0,1719	0,1215	0,2019	0,163	0,1228	0,1344	0,1455
GASA15	-0,0368	-0,1569	0	-0,018	0	-0,0241	-0,023	0	0,1667	-0,0766	0,2016	0,1481	-0,0388	-0,15	-0,0112	-0,0392	0,1226	-0,1301

Tabela 18: Frequências estimadas de alelos nulos através do teste de Van Oosterhout (145) para cada *locus* de *C. rhizophorae*. Os números marcados em cinza equivalem aos loci que tiveram a presença de alelos nulos detectada pelo programa Microchecker com $p < 0,05$. As populações ES2, RJ3 e SP3 não foram analisadas devido à ausência de dados suficientes.

	CRB1	CRB2	PI	CE	RN	PB2	PB1	PE2	PE1	BA5	BA4	BA3	BA1	ES1	RJ1	RJ2	SP1	PR1	PR2	SC
RHIZ19	0,1371	0,2782	0,2053	0,0946	0,187	0,0463	0,0995	0,2218	0,1878	0,1649	0,1407	0,233	0,1501	0,1173	0,1069	0,173	0,0816	0,1288	0,0472	0,0676
RHIZ42	0,1128	0,1615	0,1154	-0,0138	0,103	0,0904	0,0964	0,0651	0,0001	0,0394	-0,0005	-0,0215	0,1657	0,0607	0,2366	0,2172	0,1277	0,0751	0,1006	0,0966
RHIZ49	0,1745	0,0678	0,1311	0,142	0,189	0,0609	0,1562	0,2006	0,0747	-0,0078	0,1252	0,1653	0,1764	0,046	0,1584	0,14	0,1772	0,2523	0,0825	0,0884
RHIZ56	0,1261	0,1581	0,1691	0,1576	0,1779	0,2877	0,2736	0,1758	0,0926	0,1508	0,0551	0,1466	0,0502	0,1337	0,2434	0,18	0,1594	0,1458	0,1253	0,0812
RHIZ3	0,1371	0,2782	0,2053	0,0946	0,187	0,0463	0,0995	0,2218	0,1878	0,1649	0,1407	0,2031	0,1501	0,1173	0,1069	0,173	0,0816	0,1288	0,0472	0,0676
RHIZ8	0,2117	-0,058	0,0856	0,0848	0,1145	-0,0998	0,0834	0,0073	0,0523	0,0858	-0,0091	0,068	0,1995	0,175	0,1	0,1754	0,0787	0,0842	0,1262	0,1565
RHIZ11	0,0712	-0,0599	0,0086	0,0284	-0,011	-0,0504	0,0458	0,0296	0,0149	-0,0125	-0,0551	-0,0801	-0,0314	0,0437	0,0069	0,0331	0,0472	0,049	0,0284	0,0538
RHIZ12	0,1383	0,0155	0,1805	0,1556	0,1479	0,1607	0,1242	0,1582	0,2371	0,1173	0,1252	0,1999	0,257	0,1243	0,2066	0,2033	0,1951	0,2227	0,1384	0,1034
RHIZ13	0,1459	0,0873	0,0405	0,1062	0,077	0,064	0,0981	0,054	0,0737	0,1107	0,1403	0,1806	0,1335	0,1085	0,0284	0,1099	0,0069	0,1574	0,0704	-0,0145
RHIZ18	0,2482	0,2372	0,2479	0,0932	0,2782	0,0904	0,2047	0,2429	0,0742	0,1548	0,1532	0,0764	0,2643	0,2052	0,3267	0,4092	0,2132	0,2661	0,1159	0,3798
RHIZ7	-0,331	-0,1291	0,16	0,233	0,099	0,0894	0,051	0,0498	0,1225	0,0099	-0,0172	-0,0241	0,1615	0,1641	0,2594	0,2218	0,094	0,1135	0,0775	0,2355

4.2.3 Análise da diversidade genética e estruturação populacional

As heterozigosidades observadas e esperadas, bem como o número de alelos de cada *locus* estão disponíveis nas Tabelas 19 (*C. gasar*) e 20 (*C. rhizophorae*). O número total de alelos amostrados em *C. gasar* variou entre 11 (CGE03 e GASA15) e 54 (GASA6), enquanto em *C. rhizophorae* variou de 23 (RHIZ11) a 51 (RHIZ42 e RHIZ12). Como demonstrado nas tabelas, em muitas populações o teste de conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi significativo mesmo após a correção de Bonferroni, rejeitando a hipótese nula de equilíbrio.

Os testes par a par de desequilíbrio de ligação entre os *loci* de cada espécie não evidenciaram qualquer associação estatisticamente significativa após a correção de Bonferroni ($\alpha_{\text{Bonf}} = 0,001389$ – *C. gasar* / $\alpha_{\text{Bonf}} = 0,001111$ – *C. rhizophorae*). A análise que testa a equivalência entre F_{ST} e R_{ST} efetuada no programa SPAGeDi indicou resultados diferentes para cada espécie. Com um $p = 0,493$, o melhor índice de estruturação a ser usado nas próximas análises para *C. gasar*, é o F_{ST} . Em contraposição, o índice mais adequado às análises subsequentes de *C. rhizophorae* é o R_{ST} , uma vez que obteve p significativo igual a 0,0005.

Os valores de F_{ST} par a par de *C. gasar* estão disponíveis na Tabela 21 e as médias harmônicas do índice de diferenciação Jost D da mesma espécie estão listadas na tabela seguinte (Tabela 22). Os valores demonstram uma consistência quanto a sua gradação: em geral, os maiores valores dos índices são encontrados nas comparações par a par entre as populações do norte e as do sul. Inesperadamente, os valores de F_{ST} calculados para as comparações com GUI e NIG foram muito baixos ou não-significativos. É provável que tal resultado se deva ao excesso de dados faltantes nessas populações, como dito anteriormente.

As Tabelas 23 e 24 apresentam resultados das comparações par a par dos índices de diferenciação R_{ST} e Jost D para *C. rhizophorae*. Em ambos os índices, os valores mais altos estão associados às comparações entre as populações do Caribe com as demais. No que se refere às populações do

Brasil, não houve um padrão geográfico com relação aos valores significativamente altos.

Tabela 19: Valores de heterozigosidades observada (Ho) e esperada (He) em cada *locus* para cada população de *C. gasar*. Aqueles valores em cinza mostram um desvio significativo do EHW, após a correção de Bonferroni ($\alpha_{\text{Bonf}} = 0,0055$). N.A. = Número de alelos.

		CGC04	CGE03	CGF05	CGG07	GASA5	GASA6	GASA9	GASA11	GASA15
N.A.		34	11	21	37	18	54	16	38	11
GUI	Ho	0,78	0,54	0,53	0,27	0,29	0,70	0,59	0,81	0,07
	He	0,87	0,81	0,61	0,93	0,39	0,93	0,66	0,95	0,07
	N.A.	12	10	7	11	6	30	5	21	4
PA	Ho	0,50	0,50	0,60	0,50	0,43	0,22	0,50	0,75	0,30
	He	0,73	0,73	0,53	0,88	0,88	0,73	0,69	0,95	0,28
	N.A.	6	4	4	8	6	6	4	12	3
MA2	Ho	0,70	0,50	0,67	0,92	0,64	0,25	0,45	0,91	X
	He	0,88	0,69	0,76	0,93	0,72	0,65	0,57	0,91	X
	N.A.	10	7	5	13	5	4	3	10	1
MA1	Ho	0,65	0,61	0,71	0,32	0,42	0,72	0,54	0,81	0,04
	He	0,85	0,79	0,76	0,88	0,83	0,85	0,60	0,89	0,04
	N.A.	12	8	9	13	11	17	7	26	2
PI	Ho	0,60	0,80	0,60	0,40	0,20	0,60	0,67	0,60	X
	He	0,91	0,73	0,76	0,78	0,51	0,82	0,76	0,89	X
	N.A.	7	4	5	4	3	5	5	6	1
PB2	Ho	0,60	0,41	0,75	0,60	0,56	0,44	0,52	0,71	0,05
	He	0,88	0,73	0,76	0,93	0,81	0,87	0,64	0,94	0,05
	N.A.	9	8	7	15	10	11	6	17	2
PE2	Ho	0,92	0,40	0,61	0,39	0,17	0,22	0,41	0,79	0,05
	He	0,91	0,81	0,65	0,79	0,88	0,39	0,57	0,93	0,05
	N.A.	12	8	6	12	9	7	4	17	2
PE1	Ho	0,92	0,52	0,59	0,47	0,45	0,38	0,51	0,61	X
	He	0,90	0,81	0,70	0,83	0,86	0,69	0,60	0,94	X
	N.A.	16	7	8	13	9	14	7	21	1
BA5	Ho	0,83	0,42	0,55	0,50	0,57	0,48	0,67	0,86	0,05
	He	0,91	0,74	0,59	0,68	0,85	0,81	0,64	0,95	0,13
	N.A.	14	5	7	9	12	12	6	19	2
BA4	Ho	0,94	0,76	0,50	0,22	0,44	0,53	0,86	1,00	0,15
	He	0,90	0,83	0,55	0,83	0,83	0,61	0,69	0,95	0,14
	N.A.	11	7	4	6	8	7	6	15	3
BA3	Ho	0,71	0,57	0,64	0,43	0,52	0,57	0,70	0,73	0,08
	He	0,85	0,77	0,71	0,77	0,85	0,73	0,59	0,93	0,19
	N.A.	10	7	7	13	10	18	5	16	4

Continua

Continuação										
BA2	Ho	1,00	0,33	0,00	X	1,00	0,33	0,00	1,00	X
	He	1,00	0,60	0,53	X	1,00	0,33	0,53	1,00	X
	N.A.	6	3	2	1	2	2	2	4	1
RJ1	Ho	0,80	0,50	0,80	1,00	0,50	0,67	0,67	0,57	X
	He	0,82	0,81	0,73	1,00	0,88	0,92	0,68	0,84	X
	N.A.	5	5	4	4	7	10	4	6	1
SP2	Ho	0,25	1,00	0,75	1,00	0,50	0,33	1,00	0,50	X
	He	0,89	0,89	0,61	1,00	0,86	0,87	0,75	0,79	X
	N.A.	5	5	3	6	4	4	3	4	1
SP1	Ho	0,72	0,44	0,63	0,22	0,53	0,38	0,65	0,60	0,03
	He	0,90	0,79	0,60	0,93	0,85	0,80	0,66	0,93	0,10
	N.A.	15	7	10	17	12	10	7	26	4
PR1	Ho	0,86	0,72	0,60	0,53	0,52	0,48	0,80	0,71	0,08
	He	0,90	0,80	0,62	0,94	0,89	0,84	0,70	0,95	0,08
	N.A.	17	8	10	22	14	15	7	26	3
PR2	Ho	0,79	0,71	0,57	0,36	0,50	0,77	0,71	0,53	0,29
	He	0,90	0,79	0,54	0,91	0,76	0,90	0,68	0,92	0,26
	N.A.	10	5	4	10	7	9	4	14	3
SC	Ho	0,85	0,68	0,64	0,40	0,52	0,32	0,81	0,64	0,02
	He	0,90	0,78	0,58	0,85	0,88	0,87	0,67	0,96	0,02
	N.A.	14	6	6	14	11	10	4	26	2
SEN1	Ho	0,77	0,88	0,75	0,64	0,94	0,61	0,80	0,67	0,08
	He	0,95	0,87	0,81	0,97	0,79	0,91	0,85	0,93	0,08
	N.A.	15	9	9	15	10	17	8	11	2
SEN2	Ho	0,85	0,80	0,77	0,70	0,67	0,69	0,80	0,67	0,20
	He	0,97	0,83	0,81	0,96	0,62	0,91	0,77	0,95	0,25
	N.A.	17	8	9	13	6	11	7	14	5
NIG	Ho	0,61	0,45	0,65	0,71	0,47	0,39	0,82	0,67	0,25
	He	0,94	0,80	0,82	0,96	0,91	0,94	0,85	0,96	0,23
	N.A.	19	8	12	11	10	26	12	21	4
Conclusão										

Tabela 20: Valores de heterozigosidades observada (Ho) e esperada (He) em cada *locus* para cada população de *C. rhizophorae*. Aqueles valores em cinza mostram um desvio significativo do EHW, após a correção de Bonferroni ($\alpha_{\text{Bonf}} = 0,0045$). N.A. = Número de alelos.

N.A.		RHIZ19	RHIZ42	RHIZ49	RHIZ56	RHIZ3	RHIZ8	RHIZ11	RHIZ12	RHIZ13	RHIZ7
		32	51	31	35	32	41	23	51	42	32
CRB1	Ho	0,32	0,62	0,50	0,53	0,32	0,52	0,77	0,67	0,53	0,60
	He	0,47	0,82	0,79	0,72	0,47	0,93	0,92	0,96	0,74	0,51
	N.A.	8	10	8	7	8	15	17	16	10	3
CRB2	Ho	0,27	0,56	0,64	0,45	0,27	1,00	1,00	0,91	0,73	0,86
	He	0,71	0,87	0,75	0,70	0,71	0,97	0,94	0,98	0,93	0,76
	N.A.	4	9	6	4	4	11	13	18	12	4
PI	Ho	0,50	0,71	0,60	0,58	0,50	0,75	0,90	0,62	0,87	0,62
	He	0,86	0,92	0,83	0,87	0,86	0,92	0,93	0,97	0,96	0,91
	N.A.	15	26	13	24	15	24	19	36	26	18
CE	Ho	0,67	0,89	0,58	0,50	0,67	0,75	0,82	0,63	0,73	0,27
	He	0,88	0,91	0,82	0,77	0,88	0,94	0,90	0,97	0,96	0,57
	N.A.	9	11	8	7	9	14	9	12	15	4
RN	Ho	0,55	0,75	0,51	0,50	0,55	0,69	0,93	0,68	0,80	0,68
	He	0,89	0,96	0,84	0,80	0,89	0,91	0,92	0,97	0,96	0,88
	N.A.	17	24	13	17	17	19	18	32	30	17
PB2	Ho	0,70	0,71	0,75	0,22	0,70	1,00	1,00	0,60	0,80	0,57
	He	0,83	0,92	0,90	0,61	0,83	0,90	0,96	0,92	0,97	0,81
	N.A.	7	9	8	5	7	9	13	11	15	7
PB1	Ho	0,64	0,76	0,55	0,35	0,64	0,78	0,83	0,71	0,76	0,74
	He	0,81	0,95	0,83	0,81	0,81	0,95	0,93	0,96	0,97	0,84
	N.A.	13	30	10	13	13	23	17	31	26	16
PE2	Ho	0,44	0,80	0,50	0,50	0,44	0,88	0,85	0,65	0,83	0,79
	He	0,81	0,93	0,86	0,79	0,81	0,91	0,92	0,98	0,94	0,90
	N.A.	11	22	10	14	11	17	14	30	23	14
PE1	Ho	0,54	0,92	0,70	0,62	0,54	0,81	0,88	0,50	0,79	0,67
	He	0,89	0,94	0,85	0,78	0,89	0,93	0,93	0,97	0,94	0,87
	N.A.	12	19	11	12	12	18	15	26	21	18
BA5	Ho	0,53	0,83	0,87	0,60	0,53	0,73	0,93	0,72	0,72	0,85
	He	0,82	0,93	0,86	0,88	0,82	0,89	0,93	0,96	0,94	0,88
	N.A.	20	20	15	12	12	12	18	16	29	16
BA4	Ho	0,62	0,83	0,62	0,69	0,62	0,90	1,00	0,69	0,67	0,82
	He	0,90	0,87	0,85	0,83	0,90	0,93	0,94	0,96	0,95	0,85
	N.A.	11	9	8	8	11	11	12	15	17	7
BA3	Ho	0,43	0,91	0,57	0,54	0,50	0,79	0,93	0,54	0,57	0,92
	He	0,83	0,92	0,89	0,80	0,87	0,94	0,84	0,93	0,93	0,91
	N.A.	9	10	10	8	10	15	10	13	12	10
BA1	Ho	0,58	0,58	0,53	0,71	0,58	0,53	0,94	0,44	0,68	0,56
	He	0,86	0,88	0,83	0,79	0,86	0,89	0,92	0,95	0,96	0,89
	N.A.	10	11	8	9	10	14	14	17	19	9
ES2	Ho	0,60	X	0,75	1,00	0,60	0,60	1,00	0,60	1,00	0,33
	He	0,73	X	0,68	1,00	0,73	0,80	0,89	0,91	0,93	0,87
	N.A.	4	X	3	2	4	5	6	7	7	4
ES1	Ho	0,63	0,81	0,70	0,47	0,63	0,57	0,83	0,71	0,73	0,59
	He	0,84	0,95	0,81	0,66	0,84	0,87	0,93	0,97	0,95	0,89
	N.A.	12	25	12	13	12	22	17	28	24	14
RJ1	Ho	0,68	0,46	0,57	0,26	0,68	0,72	0,86	0,56	0,89	0,43
	He	0,89	0,90	0,85	0,57	0,89	0,92	0,90	0,97	0,96	0,91
	N.A.	9	15	11	5	9	20	17	27	25	16
RJ2	Ho	0,53	0,47	0,59	0,40	0,53	0,57	0,85	0,56	0,73	0,41
	He	0,84	0,88	0,83	0,67	0,84	0,91	0,93	0,96	0,94	0,78
	N.A.	14	9	12	8	14	18	15	25	25	11
RJ3	Ho	1,00	0,67	1,00	1,00	1,00	0,67	1,00	1,00	0,75	0,25
	He	0,82	0,80	1,00	0,83	0,82	0,88	0,93	1,00	0,89	0,82
	N.A.	4	4	4	3	4	7	5	8	6	4
SP3	Ho	0,57	X	0,43	0,20	0,57	0,43	0,86	0,25	0,86	0,50
	He	0,93	X	0,67	0,60	0,93	0,88	0,91	0,89	0,98	0,82
	N.A.	9	X	4	3	9	7	9	5	12	6
SP1	Ho	0,69	0,64	0,53	0,50	0,69	0,76	0,83	0,58	0,94	0,71
	He	0,83	0,87	0,82	0,73	0,83	0,91	0,93	0,96	0,96	0,89
	N.A.	14	22	10	17	14	23	19	32	32	20
PR1	Ho	0,60	0,76	0,42	0,49	0,60	0,77	0,83	0,53	0,66	0,68
	He	0,83	0,90	0,87	0,71	0,83	0,93	0,92	0,97	0,97	0,88
	N.A.	13	26	20	18	13	24	20	38	32	22
PR2	Ho	0,73	0,70	0,73	0,64	0,73	0,64	0,82	0,67	0,80	0,73
	He	0,85	0,92	0,90	0,89	0,85	0,89	0,91	0,97	0,97	0,91
	N.A.	7	9	10	10	7	9	9	14	16	11
SC	Ho	0,73	0,67	0,64	0,54	0,73	0,62	0,79	0,73	0,92	0,46
	He	0,89	0,86	0,79	0,62	0,89	0,93	0,90	0,96	0,94	0,92
	N.A.	8	10	9	8	8	14	11	15	16	11

Conclusão

Tabela 21: Fst par a par dos 9 *loci* de microssatélites de *C. gasar*. Os números em cinza indicam os valores significativos ($p < 0,05$) após a correção de Bonferroni.

	GUI	PA	MA2	MA1	PI	PB2	PE2	PE1	BA5	BA4	BA3	BA1	RJ1	SP2	SP1	PR1	PR2	SC	SEN1	SEN2	NIG
GUI	-																				
PA	-0,069	-																			
MA2	-0,097	0,042	-																		
MA1	-0,077	0,002	-0,009	-																	
PI	-0,037	0,045	0,024	0,022	-																
PB2	-0,101	0,015	0,062	0,007	0,066	-															
PE2	-0,084	0,023	0,038	0,019	0,068	0,047	-														
PE1	-0,112	0,004	0,039	0,012	0,041	0,023	-0,003	-													
BA5	-0,134	0,004	0,049	0,023	0,049	0,030	0,012	0,011	-												
BA4	-0,055	-0,018	0,011	0,023	0,052	0,018	-0,028	-0,019	-0,012	-											
BA3	-0,150	-0,001	0,044	0,010	0,051	0,032	0,000	0,009	0,002	-0,026	-										
BA2	0,123	-0,001	0,010	0,041	0,101	0,048	-0,052	-0,030	-0,011	0,003	-0,047	-									
RJ1	0,024	0,011	-0,029	-0,006	0,049	-0,020	0,002	-0,033	-0,022	0,013	-0,045	0,128	-								
SP2	-0,134	0,033	0,092	0,069	0,123	0,045	0,082	0,065	0,061	0,050	0,058	0,039	-0,086	-							
SP1	-0,080	0,039	0,092	0,043	0,101	0,031	0,073	0,056	0,061	0,047	0,058	0,070	-0,033	0,021	-						
PR1	-0,103	0,030	0,078	0,034	0,097	0,036	0,065	0,051	0,055	0,033	0,052	0,043	-0,057	0,005	0,004	-					
PR2	-0,116	0,046	0,104	0,061	0,113	0,063	0,093	0,078	0,075	0,051	0,081	0,029	-0,084	0,003	0,017	0,007	-				
SC	-0,089	0,029	0,068	0,044	0,108	0,039	0,058	0,042	0,045	0,044	0,045	0,068	-0,064	0,011	0,006	-0,008	0,007	-			
SEN1	0,015	0,086	0,068	0,029	0,101	0,046	0,090	0,050	0,047	0,078	0,023	0,186	0,072	0,060	0,032	0,020	0,017	0,012	-		
SEN2	-0,057	0,099	0,127	0,109	0,099	0,106	0,152	0,130	0,128	0,135	0,115	0,121	0,026	0,108	0,114	0,106	0,103	0,107	-0,043	-	
NIG	0,048	0,012	-0,055	-0,016	0,005	-0,055	-0,010	-0,047	-0,047	0,038	-0,081	0,209	0,063	-0,098	-0,036	-0,071	-0,095	-0,044	-0,042	-0,121	-

Tabela 22: Média harmônica dos valores dos índices de Jost D nas comparações par a par para os 10 *loci* de microssatélites de *C. gasar*.

	GUI	PA	MA2	MA1	PI	PB2	PE2	PE1	BA5	BA4	BA3	BA2	RJ1	SP2	SP1	PR1	PR2	SC	SEN1	SEN2	NIG
GUI	-																				
PA	0,028	-																			
MA2	0,146	0,132	-																		
MA1	0,100	0,080	0,033	-																	
PI	0,126	0,011	0,005	0,018	-																
PB2	0,083	0,076	0,120	0,079	0,061	-															
PE2	0,124	0,078	0,105	0,040	0,106	0,077	-														
PE1	0,104	0,056	0,117	0,047	0,046	0,060	0,003	-													
BA5	0,105	0,037	0,122	0,058	0,042	0,097	0,011	0,006	-												
BA4	0,072	0,036	0,100	0,034	0,038	0,070	0,000	0,000	0,001	-											
BA3	0,122	0,062	0,103	0,062	0,125	0,095	0,018	0,008	0,014	0,002	-										
BA2	0,029	0,002	0,004	0,037	0,051	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	-									
RJ1	0,170	0,116	0,183	0,143	0,200	0,078	0,124	0,112	0,173	0,077	0,236	0,073	-								
SP2	0,033	0,113	0,096	0,154	0,217	0,033	0,094	0,102	0,129	0,090	0,151	0,076	0,000	-							
SP1	0,131	0,138	0,191	0,113	0,203	0,084	0,093	0,100	0,114	0,087	0,139	0,071	0,005	0,016	-						
PR1	0,140	0,132	0,136	0,107	0,209	0,099	0,068	0,090	0,111	0,079	0,118	0,016	0,003	0,000	0,007	-					
PR2	0,124	0,172	0,258	0,205	0,200	0,197	0,164	0,175	0,177	0,168	0,217	0,093	0,011	0,005	0,028	0,030	-				
SC	0,141	0,144	0,171	0,136	0,219	0,138	0,103	0,113	0,091	0,099	0,141	0,015	0,082	0,018	0,033	0,002	0,022	-			
SEN1	0,151	0,258	0,257	0,251	0,280	0,214	0,270	0,290	0,321	0,320	0,261	0,030	0,036	0,076	0,227	0,221	0,297	0,268	-		
SEN2	0,181	0,267	0,310	0,311	0,183	0,322	0,401	0,328	0,351	0,305	0,359	0,015	0,100	0,068	0,314	0,301	0,276	0,327	0,065	-	
NIG	0,162	0,191	0,222	0,284	0,292	0,148	0,351	0,282	0,305	0,350	0,355	0,204	0,111	0,178	0,209	0,192	0,282	0,184	0,067	0,070	-

Tabela 23: R_{ST} par a par dos 10 *loci* de microssatélites de *C. rhizophorae*. Os números em cinza indicam os valores significativos ($p < 0,05$) após a correção de Bonferroni.

	CRB1	CRB2	PI	CE	RN	PB2	PB1	PE2	PE1	BA5	BA4	BA3	BA1	ES2	ES1	RJ1	RJ2	RJ3	SP3	SP1	PR1	PR2	SC
CRB1	-																						
CRB2	0,058	-																					
PB2	0,378	0,275	-																				
PI	0,187	0,189	-0,024	-																			
CE	0,281	0,118	-0,007	-0,061	-																		
RN	0,200	0,119	0,019	-0,003	-0,033	-																	
PB1	0,159	0,179	-0,047	-0,006	0,028	-0,062	-																
PE2	0,134	0,129	-0,063	-0,010	-0,085	-0,029	0,000	-															
PE1	0,135	0,155	-0,063	-0,003	-0,082	-0,001	-0,008	0,001	-														
BA5	0,185	0,113	0,033	0,016	-0,070	-0,003	0,020	-0,030	-0,014	-													
BA4	0,375	0,262	0,001	-0,007	-0,019	0,034	0,011	-0,006	-0,017	0,010	-												
BA3	0,266	0,167	-0,037	-0,009	-0,021	0,026	-0,043	-0,034	-0,044	0,013	-0,020	-											
BA1	0,223	0,125	0,036	-0,013	-0,052	-0,005	-0,019	-0,079	-0,086	-0,024	-0,024	0,006	-										
ES2	0,124	-0,225	0,046	-0,245	-0,147	-0,174	-0,275	-0,460	-0,463	-0,243	-0,283	-0,067	-0,112	-									
ES1	0,170	0,161	-0,077	0,003	-0,057	0,005	-0,008	0,005	-0,008	-0,005	-0,018	-0,037	-0,092	-0,559	-								
RJ1	0,135	0,120	0,020	0,017	-0,035	-0,009	0,045	0,001	0,011	0,004	0,038	0,014	-0,016	-0,184	0,025	-							
RJ3	0,118	0,000	-0,003	-0,112	0,014	-0,052	-0,097	-0,149	-0,172	-0,064	0,003	-0,084	-0,020	0,137	-0,147	-0,079	-						
RJ2	0,163	-0,029	-0,015	-0,051	0,037	0,155	-0,141	-0,228	-0,215	-0,060	0,100	0,062	0,003	-0,027	-0,223	-0,073	0,071	-					
SP3	0,100	-0,030	-0,092	-0,228	-0,127	-0,133	-0,379	-0,405	-0,400	-0,152	-0,151	-0,088	-0,070	0,132	-0,460	-0,219	-0,005	-0,047	-				
SP1	0,171	0,153	0,021	0,007	-0,032	0,006	0,046	0,007	0,004	0,005	0,018	0,012	-0,044	-0,299	0,014	0,000	-0,096	-0,078	-0,246	-			
PR1	0,097	0,118	0,023	-0,018	-0,060	-0,010	0,020	-0,002	0,023	0,002	0,028	-0,004	-0,031	-0,222	0,024	-0,002	-0,123	-0,112	-0,289	0,018	-		
PR2	-0,008	0,041	0,046	-0,005	-0,068	-0,028	0,032	0,019	0,047	-0,002	0,080	0,009	-0,059	-0,484	0,053	-0,023	-0,208	-0,441	-0,490	0,023	-0,010	-	
SC	0,213	0,149	0,014	-0,013	-0,008	0,006	-0,012	-0,020	-0,040	-0,010	0,024	-0,013	-0,044	-0,208	-0,019	-0,020	-0,080	-0,015	-0,205	-0,018	-0,019	-0,024	-

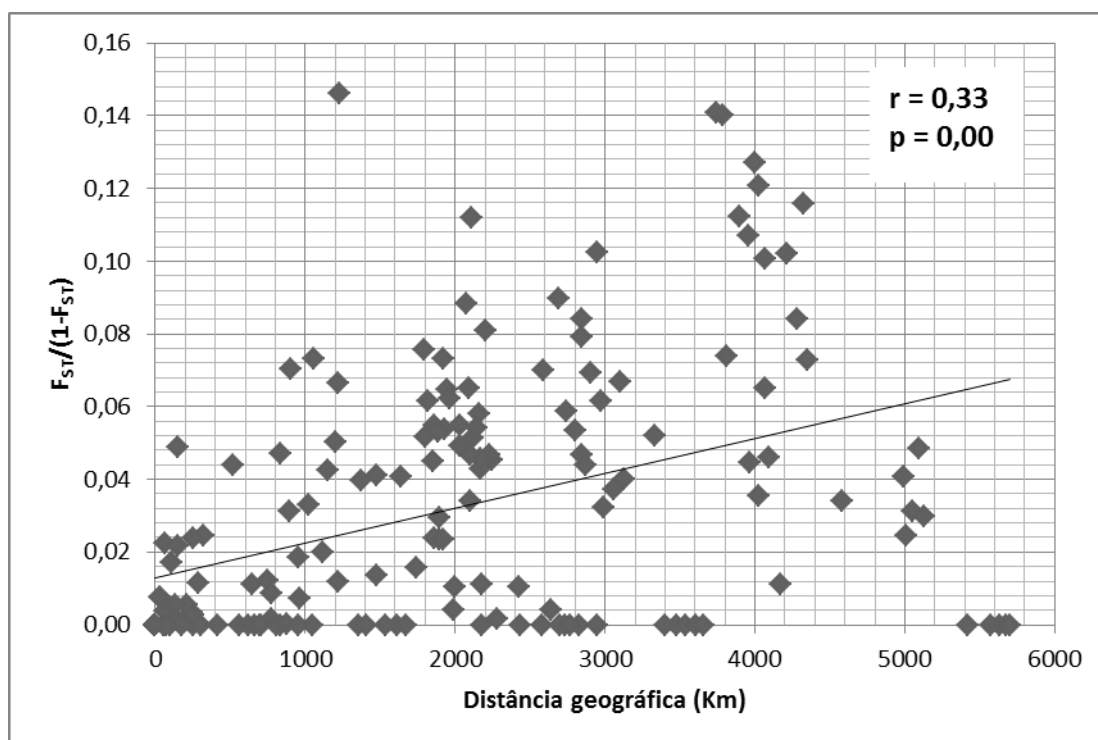
Tabela 24: Média harmônica dos valores dos índices de Jost D nas comparações par a par para os 10 *loci* de microssatélites de *C. rhizophorae*.

	CRB1	CRB2	PI	CE	RN	PB2	PB1	PE2	PE1	BA5	BA4	BA3	BA1	ES1	RJ1	RJ2	RJ3	SP1	PR1	PR2	SC
CRB1	-																				
CRB2	0,172	-																			
PI	0,331	0,222	-																		
CE	0,326	0,130	0,047	-																	
RN	0,354	0,293	0,052	0,003	-																
PB2	0,372	0,269	0,077	0,015	0,086	-															
PB1	0,400	0,193	0,037	0,063	0,059	0,072	-														
PE2	0,362	0,281	0,015	0,090	0,022	0,048	0,009	-													
PE1	0,338	0,138	0,008	0,015	0,013	0,037	0,042	0,013	-												
BA5	0,375	0,241	0,044	0,004	0,040	0,022	0,050	0,020	0,025	-											
BA4	0,387	0,248	0,006	0,010	0,029	0,065	0,026	0,023	0,009	0,027	-										
BA3	0,379	0,137	0,032	0,087	0,105	0,142	0,127	0,057	0,035	0,143	0,080	-									
BA1	0,395	0,285	0,032	0,017	0,011	0,092	0,064	0,051	0,012	0,028	0,021	0,089	-								
ES1	0,358	0,267	0,032	0,024	0,032	0,044	0,025	0,011	0,009	0,079	0,038	0,106	0,029	-							
RJ1	0,355	0,369	0,070	0,103	0,080	0,131	0,191	0,106	0,057	0,191	0,145	0,074	0,072	0,123	-						
RJ2	0,287	0,367	0,072	0,079	0,045	0,086	0,070	0,036	0,031	0,119	0,096	0,165	0,032	0,046	0,069	-					
RJ3	0,001	0,000	0,011	0,037	0,005	0,009	0,035	0,007	0,000	0,008	0,001	0,007	0,011	0,025	0,015	0,021	-				
SP1	0,325	0,141	0,052	0,114	0,070	0,081	0,039	0,026	0,026	0,061	0,092	0,101	0,074	0,028	0,061	0,050	0,007	-			
PR1	0,353	0,238	0,067	0,054	0,040	0,034	0,048	0,025	0,025	0,058	0,068	0,087	0,057	0,031	0,056	0,036	0,029	0,006	-		
PR2	0,320	0,124	0,030	0,024	0,043	0,041	0,039	0,022	0,045	0,024	0,050	0,075	0,116	0,026	0,041	0,095	0,000	0,000	0,000	-	
SC	0,323	0,332	0,096	0,071	0,072	0,036	0,138	0,079	0,064	0,141	0,110	0,151	0,054	0,053	0,008	0,050	0,049	0,045	0,051	0,008	-

Com o objetivo de testar os resultados observados nas comparações par a par dos índices de diferenciação F_{ST} (*C. gasar*) e R_{ST} (*C. rhizophorae*), foi realizado um teste de Mantel correlacionando as distâncias genéticas e geográficas. Para *C. gasar*, apenas as populações da América do Sul foram incluídas e pôde ser confirmada uma alta correlação entre as duas distâncias, indicando um isolamento por distância (Figura 23A). Todavia, o teste de Mantel para *C. rhizophorae*, que excluiu as populações do Caribe, não indicou a existência de qualquer correlação entre as distâncias genética e geográfica, como previsto nas tabelas de comparações par a par dos índices de diferenciação (Figura 23B).

Quando as populações brasileiras dos grupamentos Norte e Sul foram analisadas independentemente, a correlação entre diferenciação populacional e geográfica deixou de existir, rejeitando o modelo de isolamento por distancia: *C. gasar* Norte ($r=0,184$; $p=0,143$); Sul ($r=0,099$; $p=0,341$). *C. rhizophorae* Norte ($r=0,034$; $p=0,122$); Sul ($r=0,176$; $p=0,065$).

A)



B)

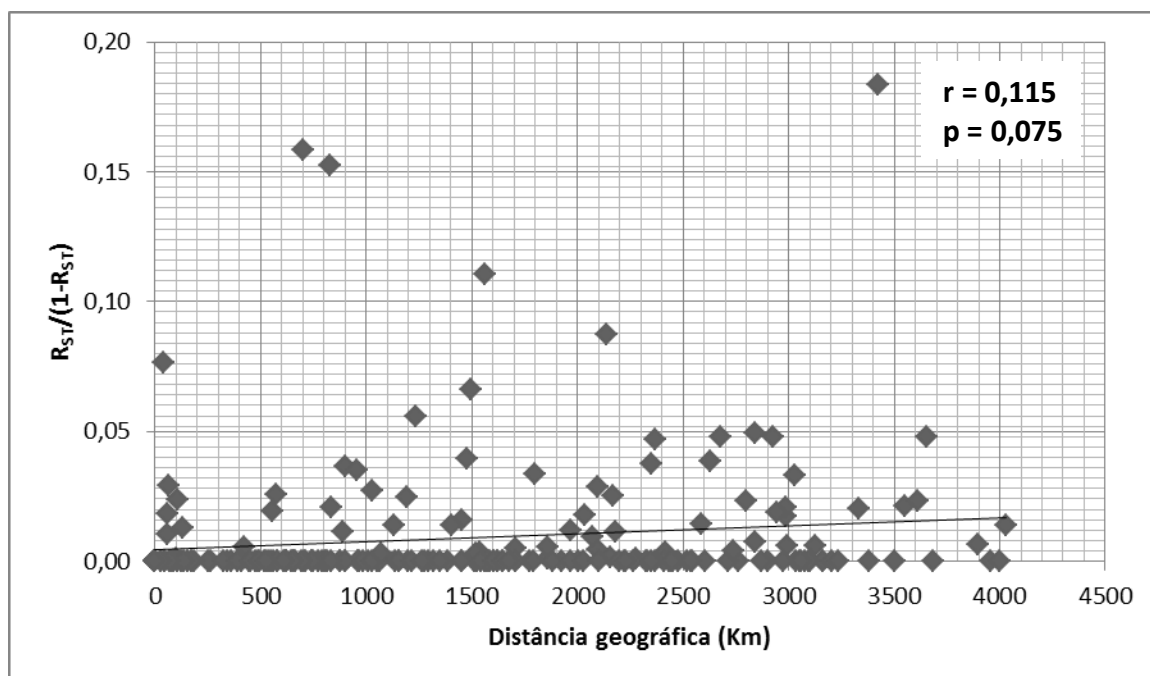
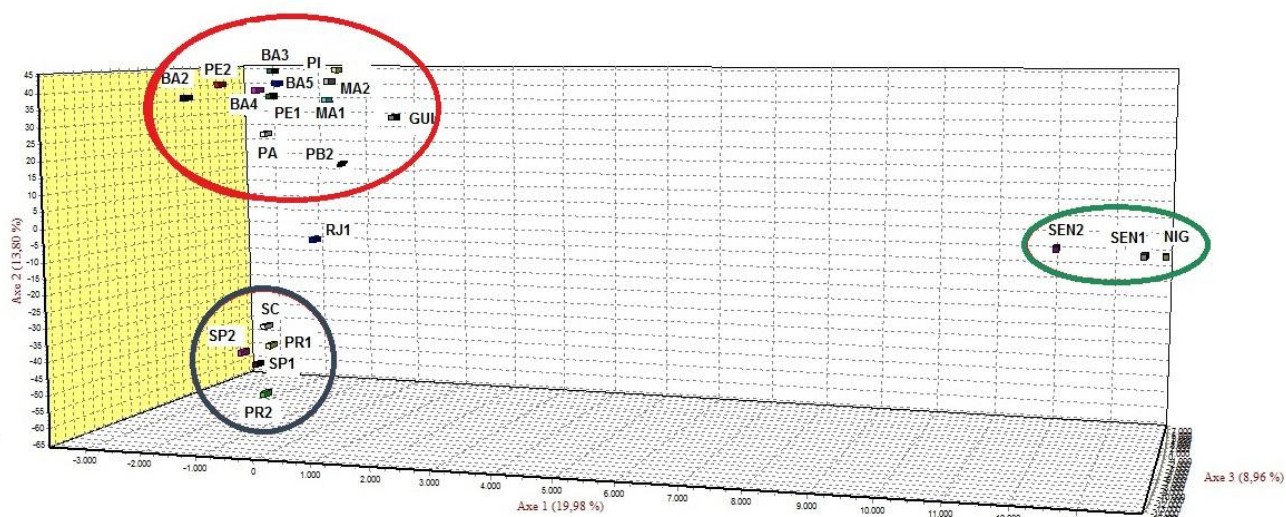


Figura 23: Teste de Mantel para *C. gasar* (A) e *C. rhizophorae* (B) baseado em dados de microssatélites indica a existência de uma correlação entre distância genética e distância geográfica apenas em *C. gasar*. Em (A), todas as populações foram incluídas na análise, exceto as populações africanas. Em (B), as populações do Caribe foram excluídas da análise.

A análise fatorial de correspondência (AFC) realizada para *C. gasar* demonstrou uma altíssima divergência entre as populações africanas e as populações sul-americanas (Figura 24). Entre essas últimas, é perceptível uma separação entre dois grandes grupos, tanto no gráfico de populações como no de indivíduos, correspondendo às populações do norte e sul. A população RJ1 mostrou-se divergente desses dois grupos.

A mesma análise AFC foi efetuada para os dados de *C. rhizophorae* e seus gráficos podem ser visualizados na Figura 25. Os dois primeiros gráficos (A e B) foram construídos com os dados de todas as populações. As populações do Caribe (CRB1 e CRB2) e RJ3 exibem uma alta divergência com relação às demais e entre si. Essas populações foram excluídas da segunda análise (Figura 25C) a fim de permitir uma interpretação mais clara das demais populações. Neste último gráfico a separação não é tão evidente como em *C. gasar*, mas é possível perceber que as populações do sul estão mais próximas que as populações do norte.

A)



B)

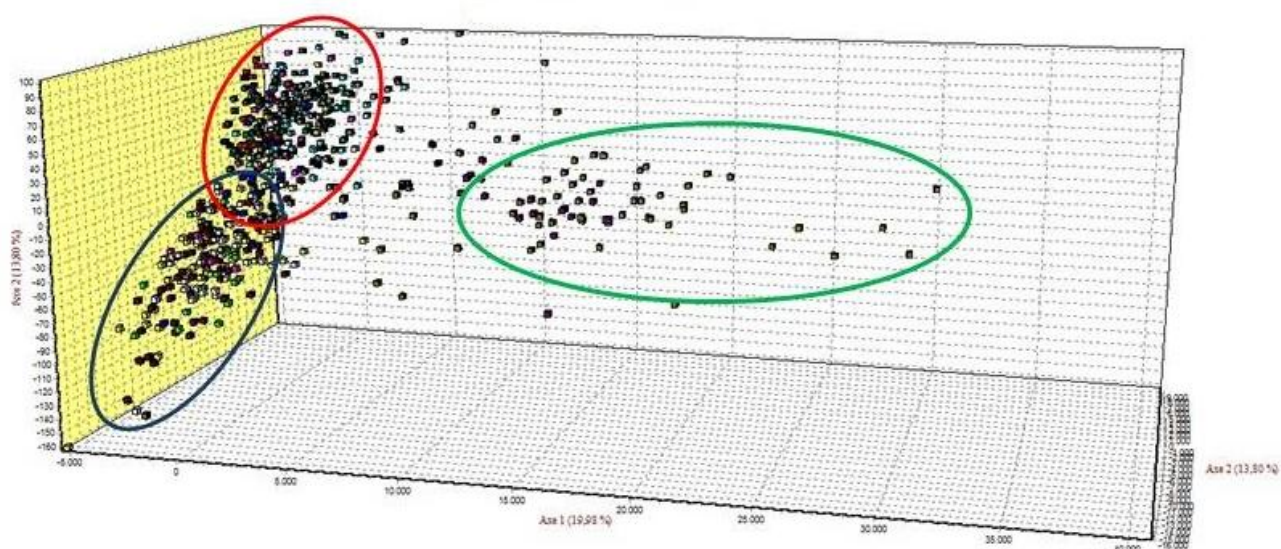
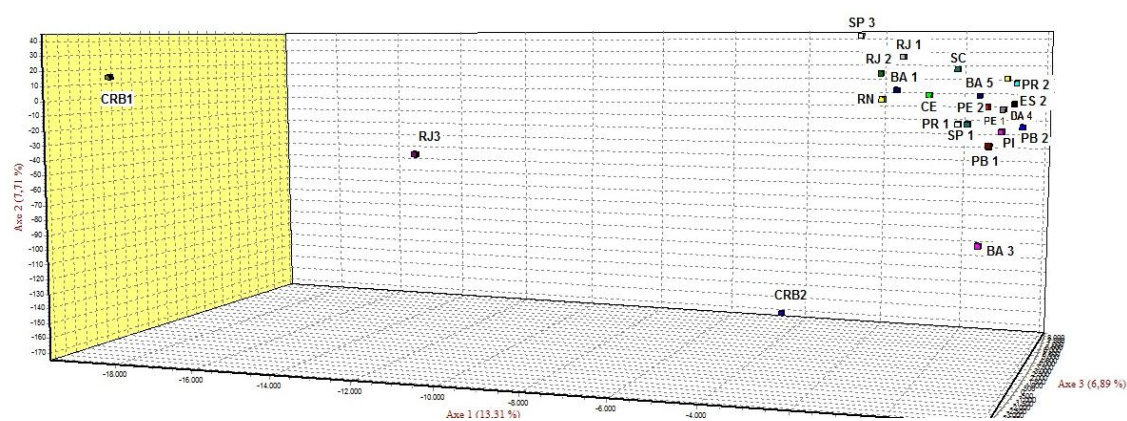
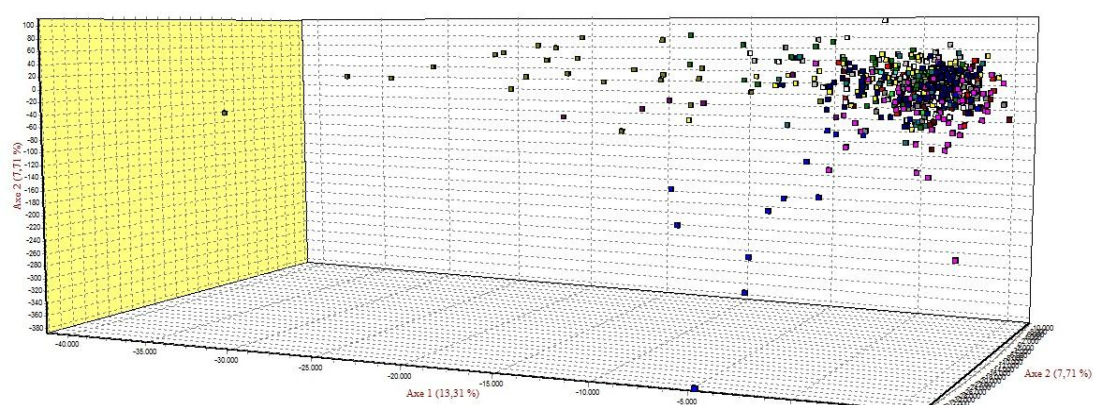


Figura 24: Análise Fatorial de Correspondência (AFC) para *C. gasar*, por população (A) e por indivíduo (B). Em vermelho, o grupo do norte; em azul, o grupo do sul e em verde, o grupo africano.

A)



B)



C)

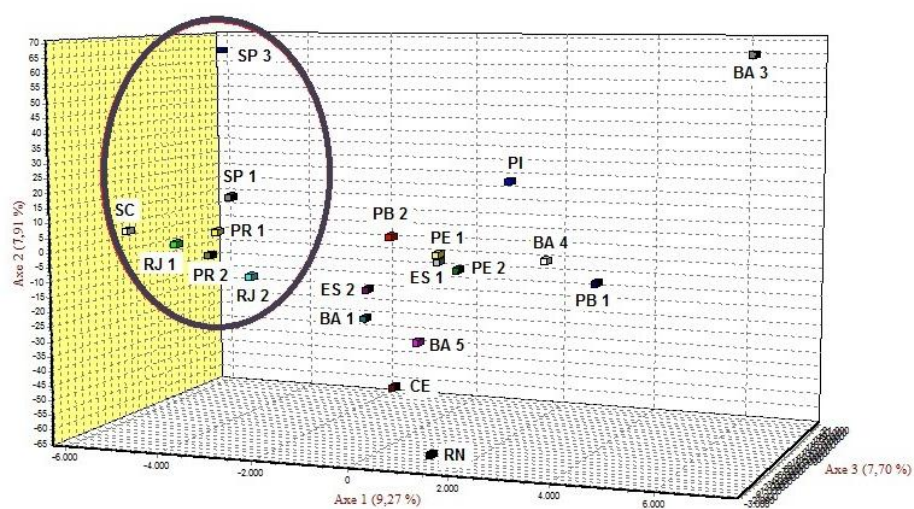


Figura 25: AFC para *C. rhizophorae*, por população (A) e por indivíduo (B), incluindo todas as populações. C) AFC por população, excluindo as populações CRB1, CRB2 e RJ3. Em (C), as populações do sul estão circundadas em azul.

Uma série de combinações foi testada na análise molecular de variância (AMOVA) e as Tabelas 25 e 26 mostram algumas delas.

Para *C. gasar*, inicialmente, a análise foi efetuada com todas as populações e depois as populações da África (SEN1, SEN2 e NIG) e Guiana Francesa (GUI) foram excluídas de acordo com o sugerido por Meirmans (146) devido à alta proporção de dados faltantes (Tabela 25). O cenário que maximizou a variação entre grupos e minimizou a variação dentro dos grupos do Brasil foi observado quando as amostras foram separadas em 2 grupamentos (coluna número 7): 1) populações do norte do Brasil (PA, MA2, MA1, PI, PB2, BA5, BA4, BA3 e BA2) e sul (RJ1, SP2, SP1, PR1, PR2 e SC). Esta configuração respondeu por 4,37% da variação entre os grupos ($F_{CT} = 0,044$). A configuração da coluna número 8 exibe um F_{CT} menor (0,042), mas um F_{SC} não-significativo. Esta configuração também seria apropriada e é similar à anterior, exceto pelo fato de as populações de PA, MA2, MA1 e PI formarem um grupo diferente do restante das populações norte.

As populações do Caribe foram excluídas da AMOVA em *C. rhizophorae*, com objetivo de evitar um provável viés na análise devido a sua alta diferenciação (Tabela 26). Diferentemente da AMOVA realizada para *C. gasar*, a AMOVA de *C. rhizophorae* foi realizada com o método da soma dos quadrados dos desvios, similar ao R_{ST} . A configuração mais provável obtida para as populações brasileiras foi a de número 14, com 4 grupos distintos e F_{CT} igual a 0,03 : 1) PI e CE; 2) RN; 3) PB2, PB1, PE1, PE2, BA5, BA4, BA3, BA1, ES2, ES1 e 4) RJ1, RJ2, RJ3, SP3, SP1, PR1, PR2 e SC.

Tabela 25: AMOVA baseados em dados de microssatélites de *C. gasar*. As populações de cor idêntica pertencem ao mesmo grupo testado. A coluna em destaque refere-se ao cenário mais provável.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	GUI	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA
PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA
MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2	MA2
MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1
PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI
PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB
PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2	PE2
PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1	PE1
BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5	BA5
BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4	BA4
BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3	BA3
BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2	BA2
RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1	RJ1
SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2
SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1
PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1	PR1
PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2	PR2
SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1	SEN1													
SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2	SEN2													
NIG																			
FST	0,020	0,029	0,039	0,043	0,042	0,029	0,050	0,043	0,046	0,049	0,050	0,046	0,042	0,040	0,040	0,044	0,043	0,041	0,041
p FST	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
%	97,96	97,10	96,07	95,75	95,81	97,08	94,96	95,67	95,35	95,05	95,03	95,43	95,85	95,98	96,02	95,60	95,73	95,90	95,85
FSC	0,003	0,007	-0,006	-0,009	-0,007	0,007	0,007	0,002	0,010	0,008	0,007	0,011	0,008	0,008	0,006	0,008	0,008	-0,001	-0,001
p FSC	0,704	0,096	0,999	1,000	0,998	0,136	0,031	0,760	0,001	0,007	0,022	0,000	0,008	0,006	0,079	0,017	0,015	0,965	0,943
%	0,28	0,65	-0,58	-0,83	-0,64	0,64	0,67	0,18	0,98	0,77	0,69	1,03	0,76	0,76	0,59	0,73	0,77	-0,09	-0,06
FCT	0,018	0,023	0,045	0,051	0,048	0,023	0,044	0,042	0,036	0,042	0,043	0,035	0,034	0,033	0,034	0,037	0,035	0,042	0,042
p FCT	0,028	0,013	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
%	1,76	2,25	4,51	5,08	4,83	2,28	4,37	4,15	3,67	4,18	4,28	3,54	3,40	3,26	3,38	3,67	3,50	4,19	4,21

Tabela 26: AMOVA baseados em dados de microssatélites de *C. rhizophorae*. As populações de cor idêntica pertencem ao mesmo grupo testado. A coluna em destaque refere-se ao cenário mais provável. As populações do Caribe foram excluídas da análise.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC	PI CE RN PB2 PB1 PE2 PE1 BA5 BA4 BA3 BA1 ES2 ES1 RJ1 RJ2 RJ3 SP3 SP1 PR1 PR2 SC
FST	-0,014	-0,013	-0,015	-0,028	-0,014	-0,015	-0,016	-0,012	-0,029	-0,023	-0,014	-0,015	-0,015	-0,012	-0,016
p FST	1,000	1,000	1,000	0,094	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
%	101,40	101,35	101,49	101,41	101,40	101,45	101,64	101,19	102,19	102,34	101,44	101,54	101,50	101,26	101,64
FSC	-0,024	-0,024	-0,025	-0,028	-0,026	-0,026	-0,024	-0,031	-0,016	-0,016	-0,026	-0,024	-0,030	-0,036	-0,27
p FSC	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
%	-2,390	-2,440	-2,430	-2,770	-2,610	-2,550	-2,340	-3,080	-1,640	-1,680	-2,560	-2,470	-2,930	-3,530	-2,68
FCT	0,010	0,010	0,009	0,014	0,012	0,011	0,007	0,019	-0,005	-0,007	0,011	0,009	0,014	0,023	0,010
p FCT	0,210	0,073	0,094	0,011	0,025	0,031	0,143	0,005	0,860	0,836	0,104	0,146	0,028	0,030	0,111
%	0,990	1,090	0,940	1,360	1,210	1,100	0,700	1,890	-0,550	-0,650	1,120	0,930	1,430	2,270	1,05

Além das abordagens anteriores, outra análise de estruturação genética baseada em inferência bayesiana foi aplicada e implementada no programa STRUCTURE.

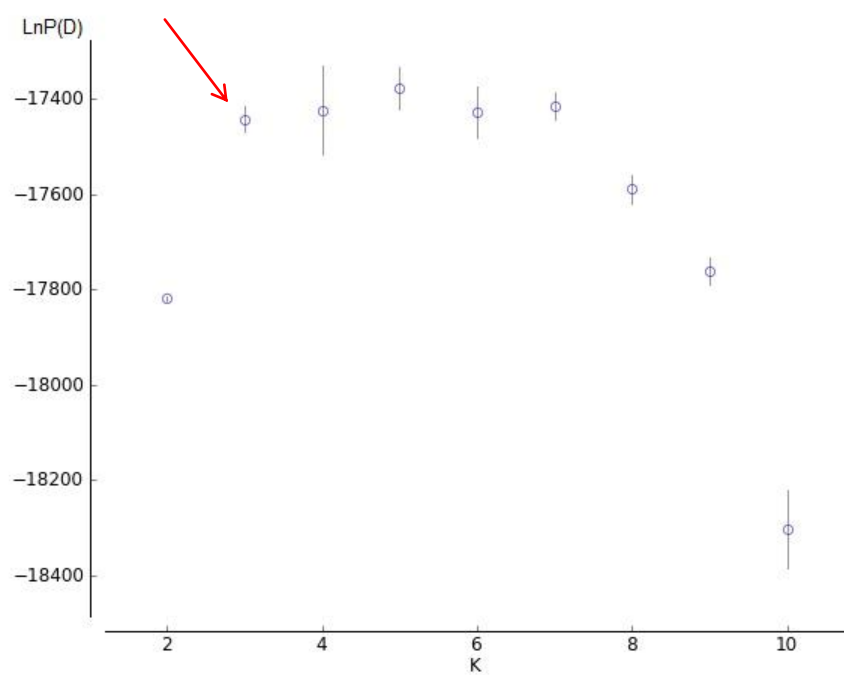
Para *C. gasar*, esta análise indicou a existência de três partições (Figura 26). O gráfico do método com base na média dos valores de verossimilhanças das 10 corridas (LnP(D)) indica a existência de um platô abrangendo valores de K de 3 a 7. Quando isso se sucede, normalmente escolhe-se o primeiro valor com menor variância; neste caso $K=3$. O outro método utilizado para calcular o K mais provável, conhecido como estatística Delta K e baseada na taxa de mudança entre os sucessivos valores de K, também indicou a existência de 3 partições.

A análise do gráfico de barras com o coeficiente Q indicou a ocorrência de uma notável divisão entre as populações do norte e sul, onde o limite entre os dois grupos estaria na população RJ1 (Figura 27). A Figura mostra dois diferentes cenários, onde um foi o encontrado através dos métodos de identificação do K mais provável ($K=3$) e o outro ilustra um cenário que seria indicado pelo gráfico de LnP(D) da Figura 27A ($K=5$) caso o K escolhido fosse o de maior verossimilhança média, ignorando a regra do platô. Além de ilustrarem uma provável divisão entre as populações norte e sul, o gráfico A ($K=3$) coloca as populações da África e Guiana Francesa na mesma partição. Já no gráfico B ($K=5$), esses grupos são diferenciados e as populações de PA, MA2, MA1, PI e PB2 formam um grupo à parte das outras populações do sul.

A mesma análise foi realizada apenas para as populações sul-americanas de *C. gasar* e, novamente, dois diferentes cenários foram indicados pelas estatísticas de LnP(D) e Delta K. A maior verossimilhança média indicada pelo gráfico A da Figura 28 foi para o $K=2$, dividindo as populações brasileiras em norte e sul, cujo limite seria a população de RJ1 (Figura 29). Este cenário foi recuperado pela mesma estatística na análise com todas as populações (Figura 27, $K=3$), que exibe os dois mesmos grupamentos. A estatística Delta K, por sua vez, sugere a existência de 6 partições entre as populações sul-americanas (Figura 28B). Os resultados das duas análises (todas as populações e populações sul-americanas) referentes à estatística Delta K convergem no que diz respeito às populações do extremo norte da costa brasileira. A Figura 29 ($K=6$) também indica

uma diferenciação abrangendo as populações PA até PB2, entretanto nesta análise todas seriam diferentes entre si.

A)



B)

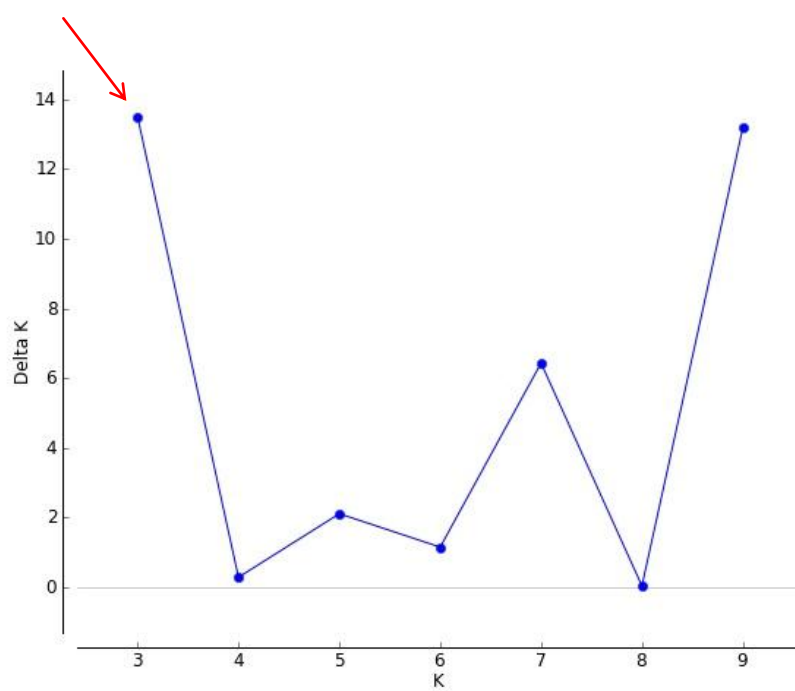
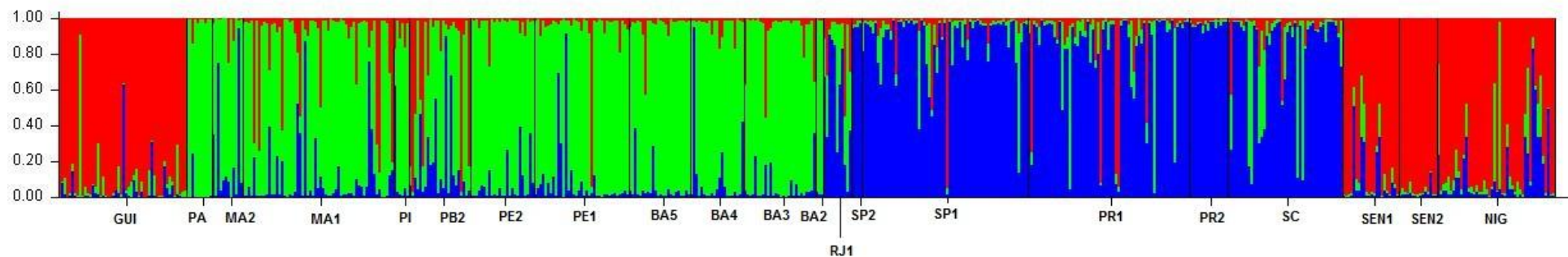


Figura 26: Números de partições possíveis incluindo todas as populações de *C. gasar*. (A) $\text{LnP}(D)$ e (B) estatística ΔK .

$K=3$



$K=5$

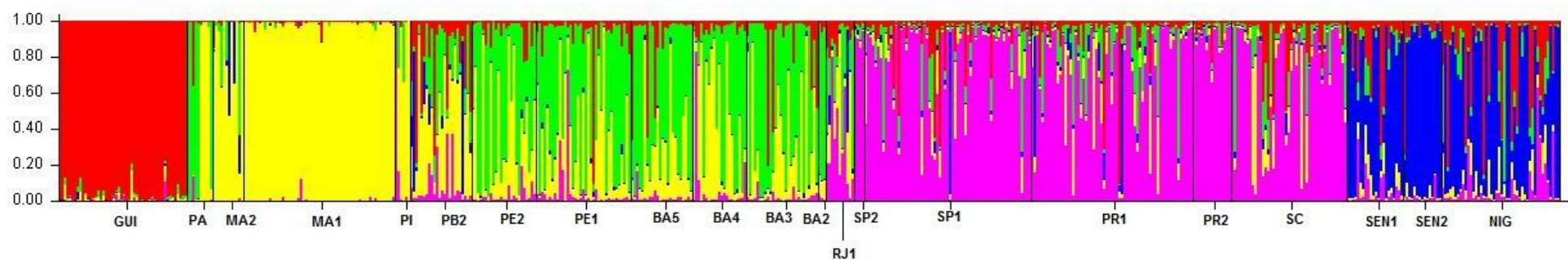
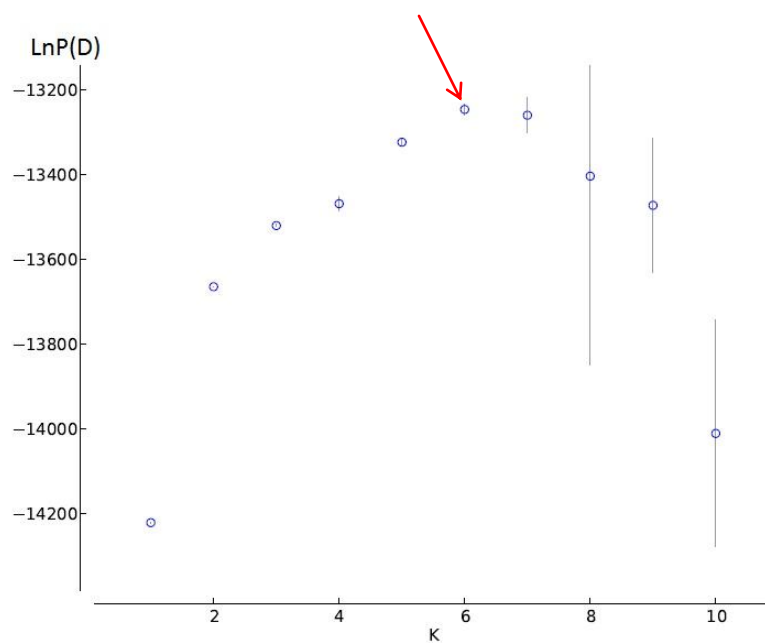


Figura 27: Gráfico de barras do coeficiente Q para cada indivíduo de todas as populações da espécie de *C. gasar*, de acordo com os cenários de $K=3$ e $K=5$.

A)



B)

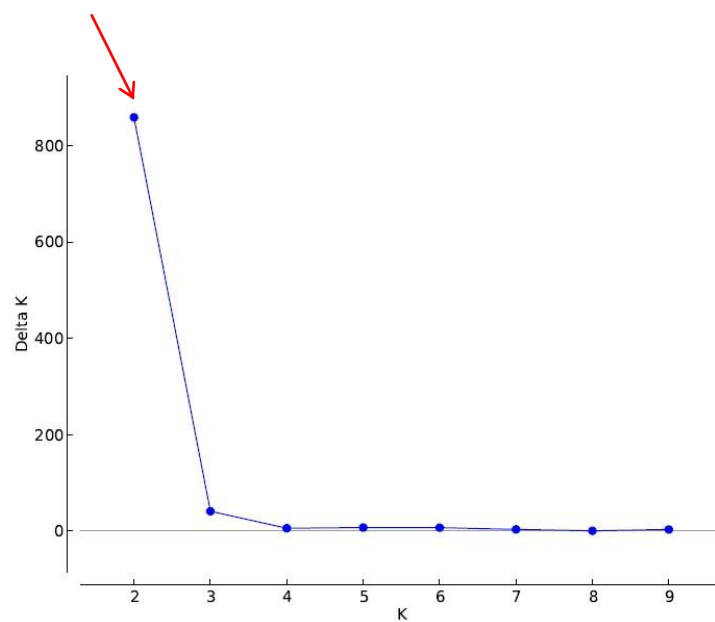
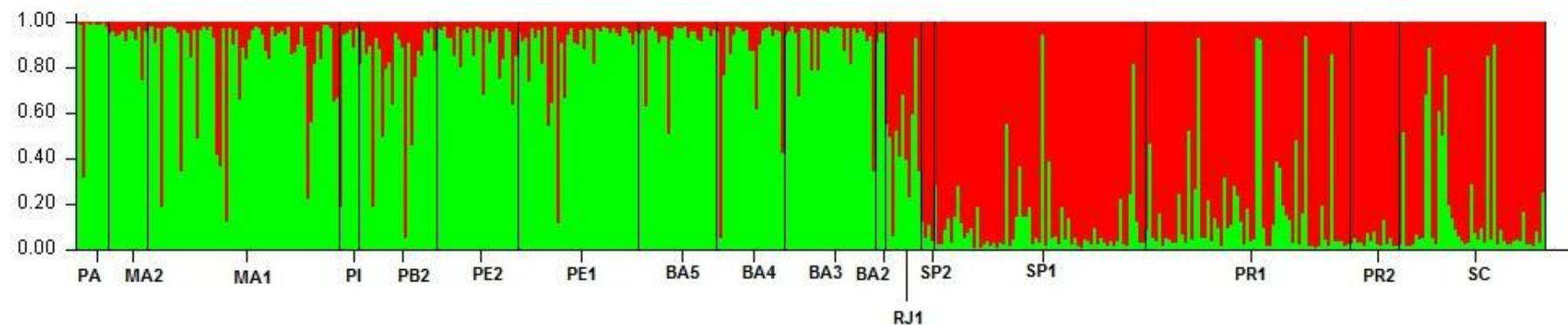


Figura 28: Números de partições possíveis para *C. gasar*, excluindo as populações da Guiana Francesa e África. (A) $\text{LnP}(D)$ e (B) estatística ΔK .

$K = 2$



$K = 6$

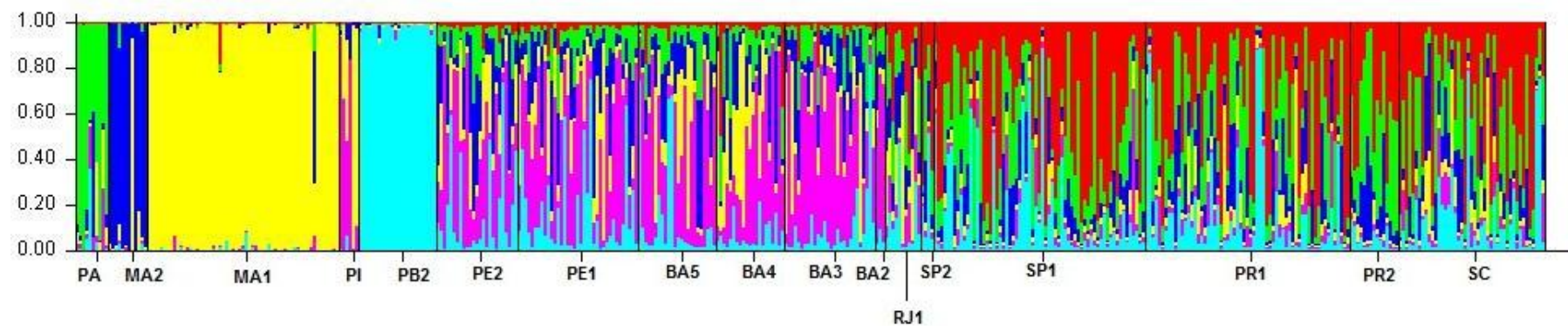


Figura 29: Gráfico de barras do coeficiente Q para cada indivíduo das populações sul-americanas da espécie de *C. gasar*, de acordo com os cenários de $K=2$ e $K=6$.

A análise de estruturação populacional realizada no STRUCTURE gerou resultados diferentes para *C. rhizophorae* em cada um dos métodos de estimativa do K mais provável, onde todas as populações foram analisadas. O gráfico de $\ln P(D)$ indica que K=6 deve ser considerado o número de partições mais provável (Figura 30A). Observa-se também a formação de platô que inclui os valores 5 até 9. Seguindo a regra de escolha do primeiro valor com menor variância, K=6 foi o número escolhido. Já o gráfico de Delta K mostra dois prováveis valores de K: 5 e 6, embora o valor de Delta K para K=5 seja ligeiramente maior que K=6 (Figura 30B).

Os gráficos de coeficiente Q de *C. rhizophorae* para K=5 e K=6 são exibidos na Figura 31. Uma clara diferenciação entre as populações do Caribe é observada. Outras partições visíveis nos gráficos são aquelas formadas por PI+CE e a de RN. Em K=6, PB2 apareceria como uma partição independente. As outras populações do norte do Brasil e sul não formam partições distinguíveis, sendo possível afirmar que a análise não obteve sucesso em sua totalidade.

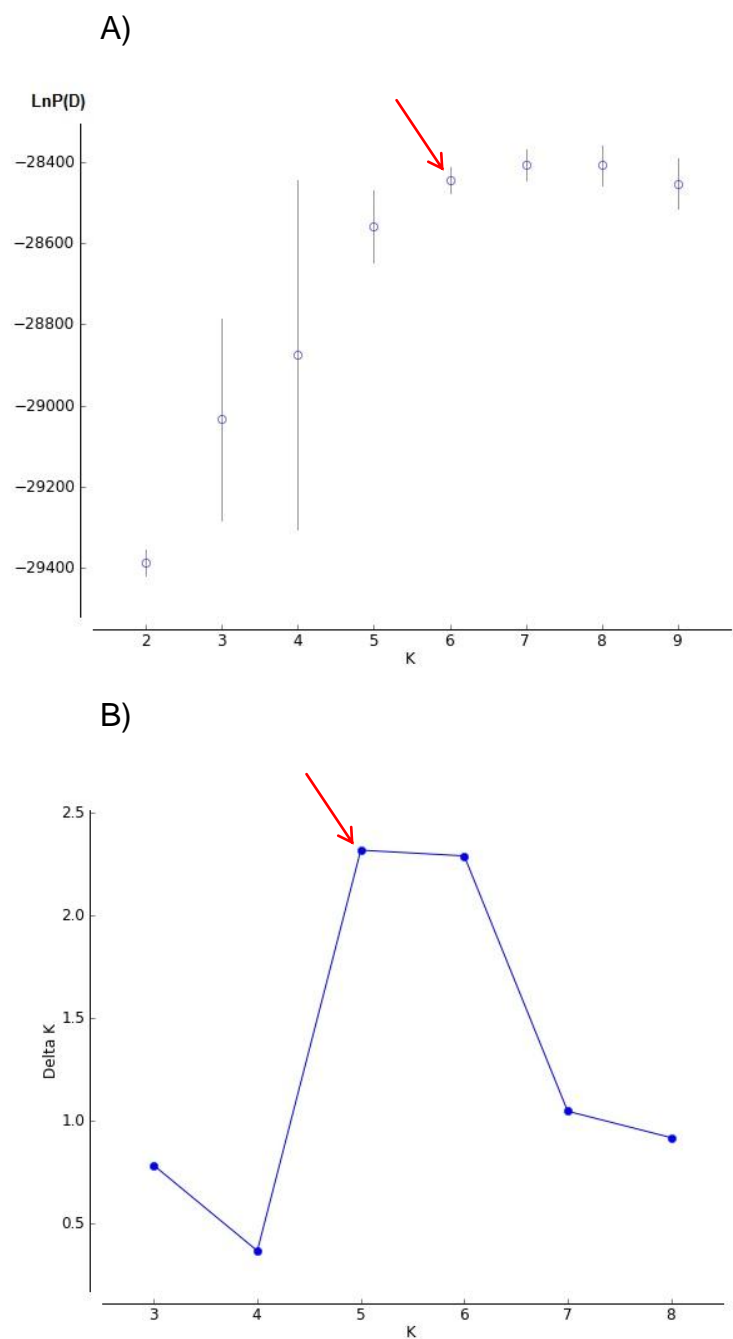
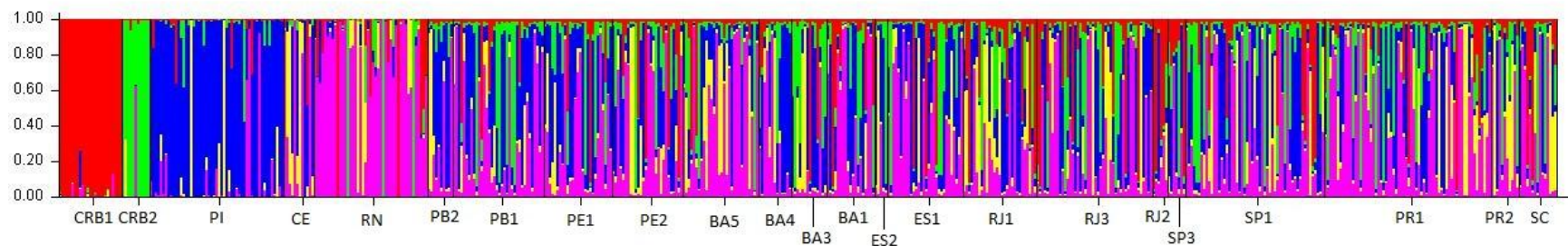


Figura 30: Números de partições possíveis incluindo todas as populações de *C. rhizophorae*. (A) LnP(D) e (B) estatística DeltaK.

K=5



K=6

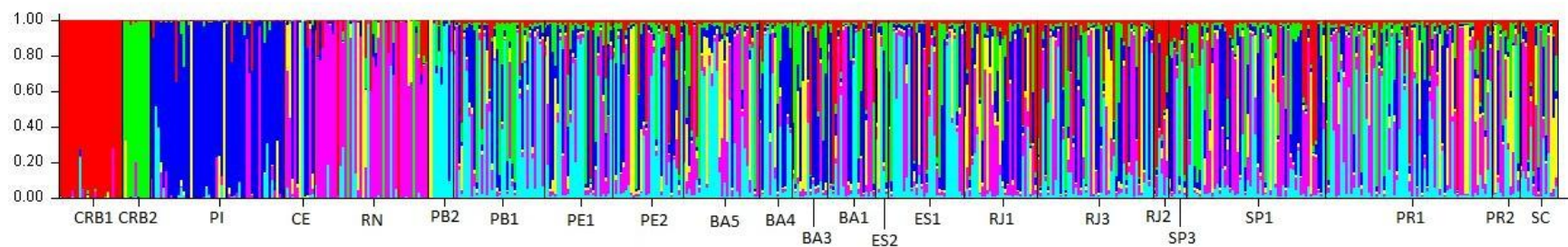


Figura 31: Gráfico de barras do coeficiente Q para cada indivíduo de todas as populações da espécie de *C. rhizophorae*, de acordo com os cenários de K=5 e K=6.

5 DISCUSSÃO

Para as análises de estruturação populacional e filogeografia de *C. gasar* e *C. rhizophorae*, esta tese utilizou sequências de um marcador mitocondrial de alta variabilidade: a região controle, e frequências de marcadores nucleares *multilocus* co-dominantes e altamente polimórficos: os microssatélites. Apenas um trabalho anterior a este analisou a estrutura populacional dessas espécies, abordando a questão populacional ao longo da costa do Brasil aplicando análises com aloenzimas e sequências de COI em aproximadamente 35% do número de amostras utilizadas nesta tese (61). Além de um maior número amostral, o diferencial desta tese está na escolha de marcadores mais variáveis e nas novas análises mais robustas realizadas.

5.1 Sobre a dificuldade de amplificação dos *loci* de microssatélites e o excesso de alelos nulos

De todos os pares de iniciadores de microssatélites inicialmente desenvolvidos, apenas 20% foi aplicado nas análises (como descrito no item 3.4.2 de Material e Métodos e no item 2.1 de Resultados). O baixo sucesso quanto à obtenção de *loci* adequados é determinado pela dificuldade de amplificação, quando indivíduos ou populações inteiras não têm estes *loci* amplificados, ou os mesmos geram produtos de PCR com múltiplas bandas. Esses fatores motivaram a exclusão da maioria dos *loci*. Outro problema durante a genotipagem foi a presença de alelos nulos, que só pôde ser verificada após as análises.

A análise dos resultados de microssatélites demonstra que todos os *loci*, exceto CGF05 (para *C. gasar*) e RHIZ11 (para *C. rhizophorae*), indicaram desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabelas 18 e 19) em ao menos uma população. Tais desvios seriam consequência de um excesso de homozigotos causados por alelos nulos cujas frequências estimadas atingiram até 80% (GASA11 em GUI e RHIZ13 em RN e PB2).

Um trabalho com outra espécie do mesmo gênero, *C. virginica*, demonstrou a presença de alelos nulos em três dos 18 *loci*, após uma pré-análise realizada com cerca de 50 indivíduos de uma população controlada de cultivo (147). É possível que a mesma análise em populações naturais mais diversificadas e com uma abrangência amostral maior indicaria mais *loci* com alelos nulos. Em nosso manuscrito, recém-submetido à *Molecular Biology Reports* (em anexo), detectamos apenas 4 *loci*, dos 17 descritos, com a presença de alelos nulos. No entanto, para o artigo, analisamos cerca de 25 indivíduos apenas, de uma única população para cada espécie. Uma frequência maior de alelos nulos só foi observada quando a análise foi estendida para mais populações. Isso demonstra que a política editorial das revistas que publicam artigos sobre o desenvolvimento de microssatélites, de exigir uma análise de 20 indivíduos de apenas uma população para demonstrar o seu bom funcionamento pode estar equivocada e levar a publicação de muitos *loci* inadequados.

Um trabalho mais recente discute sobre a dificuldade de desenvolver marcadores de microssatélites para moluscos, especialmente devido à complexidade genômica diferencial entre espécies, com a presença de DNAs repetitivos crípticos nas regiões flangeadoras (148). Essas sequências instáveis nas regiões flangeadoras causam a falha do PCR, o que se considera como alelo nulo. Os autores realizaram uma comparação entre sequências de 3 diferentes espécies de gastrópodes que continham microssatélites e verificaram uma associação positiva entre a dificuldade de amplificação do *loci* de microssatélites e quantidade de alelos nulos, com a quantidade de elementos de transposição (TE). Os autores teorizam em que os TEs não-autônomos (dependentes da maquinaria de outros transposons autônomos para efetuar sua transposição) tenderiam a se acumular nas regiões genômicas predominantemente neutras, como os microssatélites. Assim, eles argumentam que os TEs seriam responsáveis por processos de rearranjo genômico através de *crossing-over* desigual.

Elementos de transposição já haviam sido identificados em *C. virginica* (149). Porém, mais recentemente um trabalho com informações acerca do genoma e transcriptoma de *C. gigas* apresentou as informações mais consistentes sobre a presença de TEs no genoma de uma espécie do gênero (150). Foram caracterizadas sequências abundantes de DNA repetitivo e

elementos de transposição ativos o que conduziu a conjecturas de que teriam um papel ativo na formação da variabilidade genômica.

Em *C. gasar*, uma análise preliminar de 5.204 *contigs* feitos a partir de 172.024 *reads* gerados por pirossequenciamento encontrou a presença, em 272 *contigs* (5,2% de todos os *contigs* analisados), do elemento de transposição CvA descrito por Gaffney et al (2007) (Solé-Cava, comunicação pessoal).

É possível que o excesso de alelos nulos bem como a perda de loci devido à dificuldade de obtenção de iniciadores adequados em *C. gasar* e *C. rhizophorae* sejam devidos, ao menos parcialmente, a um excesso de elementos de transposição em seus genomas que seriam a causa da instabilidade estrutural das regiões flangeadoras, impedindo o sucesso de amplificação da região de microssatélites.

5.2 Estruturação populacional

Como um padrão geral das análises de estruturação, as comparações feitas com os microssatélites indicaram valores de F_{ST} muito menores que aqueles encontrados com a região controle do DNA mitocondrial. Diferenças desse tipo são recorrentes em estudos envolvendo as duas classes de marcadores (151) e podem estar refletindo o fato do tamanho populacional efetivo mitocondrial ser quatro vezes menor que o tamanho efetivo para genes nucleares, o que faria com que a deriva genética fosse muito maior para uma região mitocondrial do que uma região nuclear, inflacionando os valores calculados, apesar do oposto, ou seja, F_{ST} maiores em análises de microssatélites do que em sequências mitocondriais ser algumas vezes também encontrado (152).

Os resultados obtidos das análises de estruturação com sequências de região controle mitocondrial e indicaram que as populações da África (*C. gasar*) e do Caribe (*C. rhizophorae*) seriam as mais divergentes daquelas do Brasil, com altos valores de índices de diferenciação nas comparações par a par e visivelmente estruturadas nas redes haplotípicas (Tabelas 6, 7, 21 – 24 e

Figuras 16, 17 e 18). O gráfico do coeficiente Q e o AFC também exibiram esses grupos como os mais diferenciados (Figuras 24, 25, 27 e 30).

Em *C. gasar*, é perceptível também a formação de dois grupos bastante diferenciados na costa do Brasil, referentes às regiões norte e sul. A denominada região norte abrange os estados do Pará até a Bahia, enquanto a região sul seria composta pelos estados de São Paulo até Santa Catarina. O estado do Rio de Janeiro formou um grupo à parte, diferenciado dos demais. Esse padrão foi observado em todas as análises de estruturação com região controle mitocondrial e microssatélites, apesar de apenas a AMOVA realizada com dados de microssatélites ter indicado o melhor cenário com o Rio de Janeiro agrupado às populações do sul. Ao se investigar as sequências dos indivíduos do Rio de Janeiro, verificamos que dois deles apresentam haplótipos do norte e três apresentam haplótipos do sul (ver rede, Figura 16). A análise de atribuição individual no gráfico de coeficiente Q do STRUCTURE também demonstra que, além da clara divisão norte-sul, o Rio de Janeiro teria indivíduos com probabilidade iguais de atribuição aos dois grupos, norte e sul (Figuras 27 e 29). As análises de atribuição individual a partir de dados de microssatélites também indicaram outra configuração alternativa que mantém a estruturação entre as populações do norte e sul cujo limite estaria no Rio de Janeiro, mas com um nível adicional de estruturação entre as populações brasileiras do extremo norte: Pará, Maranhão, Piauí e Paraíba que, quando não agrupadas com as demais populações do grupo norte (Figuras 27, K=3 e 29, K=2), ora formaram um grupo homogêneo (Figura 27, K=5), ora um grupo totalmente estruturado, com quatro grupos formados por: Pará, norte do Maranhão, sul do Maranhão com Piauí e Paraíba.

Lazoski e colaboradores (61) observaram a mesma estruturação em *C. gasar*, com sequências de citocromo oxidase I (COI) (Figura 8 da Introdução). Esta tese analisou uma amostragem mais abrangente, mas a estruturação vista aqui foi consistente com a observada por eles, com o grupo norte formado pelas populações do Pará, Paraíba, Pernambuco e Bahia e o grupo sul contendo as populações de São Paulo e Paraná. Os autores também encontraram uma diferenciação única da população do estado do Rio de Janeiro em comparação com os demais grupos e esta população também seria formada pela mistura de haplótipos do norte e sul. Da mesma maneira que os

resultados alternativos encontrados nesta tese para os dados de microssatélites, Lazoski e colaboradores também encontraram uma estruturação diferenciada ao norte, onde o Pará formaria um grupo à parte. Esse resultado foi também obtido por eles com a análise de aloenzimas, que são marcadores nucleares.

A diferença de resultados obtidos entre marcadores mitocondriais e nucleares pode ser devida à diferença de ordem de grandeza nas taxas de mutação. Apesar de ser uma região altamente variável, a região controle mitocondrial ainda tem uma taxa de mutação menor (10^{-8}) do que aloenzimas, com taxas na ordem de grandeza de 10^{-6} (153) e microssatélites, cujas taxas estão na média de 10^{-3} (46). Com uma taxa de mutação mais lenta, os resultados de região controle mitocondrial podem refletir padrões de estruturação mais antigos (históricos), enquanto a estruturação resultada de análises com os marcadores nucleares (microssatélites e aloenzimas) revelaria a estrutura populacional contemporânea, evidenciando padrões, em geral, mais sutis do que aqueles identificados por marcadores mitocondriais.

Em contrapartida, *C. rhizophorae* não apresentou um cenário de estruturação tão claro como *C. gasar*. A rede de haplótipos, por exemplo, apresentada na Figura 17 ilustra uma clara diferenciação apenas com relação às populações do Caribe, como já afirmado acima. A parte da rede referente às populações brasileiras não indica estruturação aparente. No entanto, os resultados de SAMOVA e AMOVA sugerem cenários de estruturação, ainda que menor que a observada em *C. gasar* (Tabelas 8, 9 e 25). Um consenso desses resultados sugere também uma diferenciação entre as regiões norte e sul, com uma indefinição sobre seus limites que estariam na região do estado do Rio de Janeiro. Enquanto a AMOVA baseada em dados de microssatélites agrupa todos os pontos de amostragem do RJ com as populações do sul, os resultados de AMOVA e SAMOVA de região controle são discretamente diferentes. Quando o sentido geográfico é forçado, recusando hipóteses de grupamentos intercalados por alguma população divergente, o resultado proposto é o da Tabela 9, de AMOVA. Neste caso, o limite estaria dentro do estado do Rio de Janeiro, onde as populações de Sepetiba e Ilha Grande agrupariam com todas as populações ao norte e a população da Baía da Ribeira seria agrupada com o sul. Essa estrutura é questionável, pois as

populações da Baía da Ribeira (em Angra dos Reis) e da Ilha Grande estão geograficamente muito próximas (35 km). No entanto, quando se permite a existência de uma população intercalada, o resultado da SAMOVA é o que oferece o maior índice de diferenciação entre grupos, onde haveria dois grandes grupos: um deles formado por populações do Piauí até o Espírito Santo e outro com populações do Rio de Janeiro até Santa Catarina. Uma das populações do estado do Rio de Janeiro mostrou-se singular e diferenciada das demais: a população de Baía da Ribeira formaria um estoque à parte dentro do grupo do sul. Em consonância com os resultados obtidos para *C. gasar*, a região do extremo norte da amostragem indicou estruturação apenas no resultado da AMOVA com os dados de microssatélites. Isso seria também um indicativo de padrões evolutivos diferenciados para cada classe de marcadores. O trabalho de Lazoski e colaboradores encontrou um padrão diferente de estruturação, com mais populações isoladas formando estoques independentes. Apesar disso, eles também verificaram um índice mais baixo de diferenciação entre os grupos para *C. rhizophorae* em comparação com o de *C. gasar*. Os resultados do STRUCTURE não foram tão robustos na atribuição dos indivíduos às populações como os obtidos para *C. gasar*. Isso se deve, provavelmente, ao excesso de alelos nulos que levaram as populações a um desequilíbrio de Hardy-Weinberg aparente. O programa assume este equilíbrio para suas análises e, devido à fraca estruturação presente em *C. rhizophorae*, o teste de atribuição não obteve o sucesso esperado (Figura 30), muito embora seja clara a estruturação das populações do Caribe. Ao contrário do observado para *C. gasar*, o AFC individual não indicou estruturação em *C. rhizophorae*. Apesar disso, com a exclusão das populações mais diferenciadas (Caribe e Baía da Ribeira), observa-se uma conformação das populações com sentido geográfico, onde as populações do sul estariam mais próximas entre si que as populações do norte. O mesmo teste aplicado para as populações de *C. gasar* mostrou a divisão clara de dois grupos norte e sul, com o norte do Rio de Janeiro como um grupo à parte.

Apesar de possuírem larvas planctotróficas que permanecem de 2 a 3 semanas no plâncton, tempo considerado suficiente para dispersão pela costa do Brasil, verificamos níveis de estruturação nas duas espécies. *C. gasar* mostrou um nível mais alto de estruturação, onde podemos afirmar existir

quatro grandes grupos: África, Guiana Francesa, grupo do norte e grupo do sul do Brasil. O ponto amostral referente à população do norte do Rio de Janeiro indicou ser um ponto de mistura de indivíduos dos grupos norte e sul. *C. rhizophorae* apresentou uma alta estruturação entre as populações do Caribe e as populações brasileiras. Dentro do Caribe, as populações do Panamá e Cuba indicam também um alto nível de estruturação. Com relação unicamente às populações brasileiras, *C. rhizophorae* também indicou níveis de estruturação embora mais fracos que os observados para *C. gasar*. Dois grandes grupos mostraram-se consensuais em todas as análises para esta espécie e são também coincidentes geograficamente com os grupos encontrados para *C. gasar*: um grupo do norte, de Piauí até o Espírito Santo e outro do Rio de Janeiro até Santa Catarina.

O sinal de isolamento por distancia que existia dentro de cada espécie ao longo da costa brasileira desaparece quando os grupos norte e sul são tratados separadamente. Ou seja, os resultados não indicaram isolamento por distância verdadeiro, mas sim um reflexo da alta diferenciação entre os dois grupos, de forma que amostras da Bahia são mais próximas daquelas de populações mais de 1000 km ao norte, enquanto que populações do Sul do Rio de Janeiro são mais próximas daquelas mais de 1000 km ao sul. Essa discordância geográfica indica que o padrão de estruturação das duas espécies é devido à existência de uma barreira à sua dispersão. A região que compreende o limite de diferenciação entre os dois grandes grupos observados para as duas espécies contém duas possíveis barreiras geográficas.

Serão apresentados, a seguir, três fatores importantes para a compreensão da história demográfica de ambas as espécies.

5.2.1 Cadeia Vitória-Trindade

São cadeias montanhosas submersas de origem vulcânica a partir da costa do estado do Espírito Santo (20°30'S, 29°20'W) e que se elevaram há cerca de 3 a 3,5 milhões de anos atrás (154). Os topos de seus picos submersos são achatados, sendo resultantes de períodos alternados de crescimento (durante

períodos de nível do mar alto) e erosão (durante períodos de baixo nível do mar) de depósitos de algas calcárias sobre a base da montanha (155). No nível atual do mar, os topos da cadeia estão situados em águas relativamente rasas, onde as profundidades mínimas variam de 10 a 100 m como expostas na Figura 32 (156).

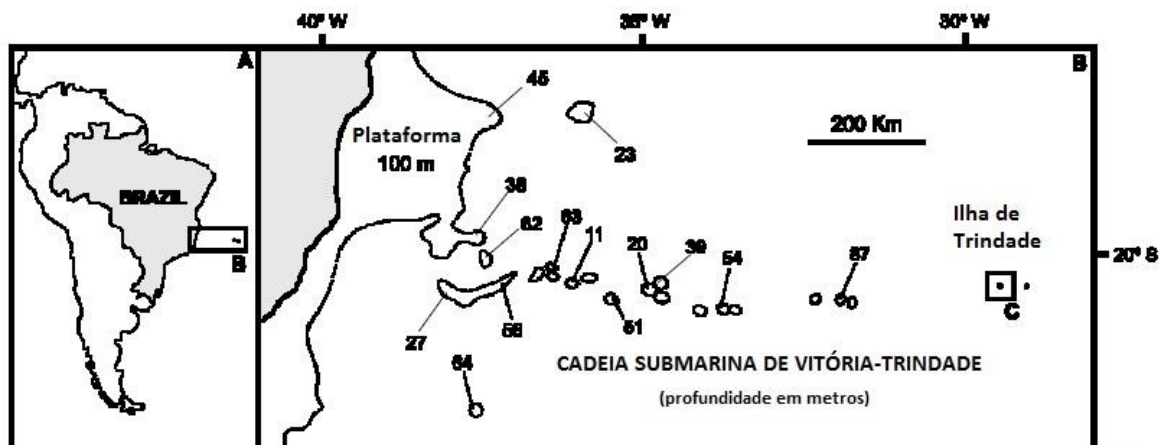


Figura 32: A) Mapa do Atlântico Sul ocidental. B) Cadeia submersa de Vitória-Trindade. Os números indicam a profundidade do topo dos picos da cadeia, em metros. (Modificado de Gasparini and Floeter (156))

5.2.2 Ressurgência em Cabo Frio, RJ

Os sistemas costeiros de ressurgência são caracterizados pela ascensão de águas frias que tornam os nutrientes disponíveis na camada eufótica para o crescimento e aumento da produção de fitoplâncton. No Brasil, a região do Cabo Frio (RJ) é o principal sistema de ressurgência costeira. A temperatura mais fria das águas nessa região atinge, durante o fenômeno de ressurgência, cerca de 13 a 14° C e apresenta-se com maior intensidade durante a estação do verão, de dezembro a fevereiro (157).

5.2.3 Último Máximo Glacial

O último período glacial ocorreu nos últimos anos do Pleistoceno de, aproximadamente, 110 a 10 mil anos atrás. Durante esse período, são caracterizados dois picos de glaciação: o primeiro ocorrido em torno de 65 mil anos atrás e o segundo, conhecido como 'último máximo glacial' (LGM, do inglês *Last Maximum Glacial*), com ocorrência entre 22 e 19 mil anos atrás (Figura 33), quando o volume de gelo atingiu seu nível máximo. Em poucas centenas de anos, um rápido decréscimo do volume de gelo determinou o fim do LGM, cuja ocorrência foi há 19000 ± 250 anos (158).

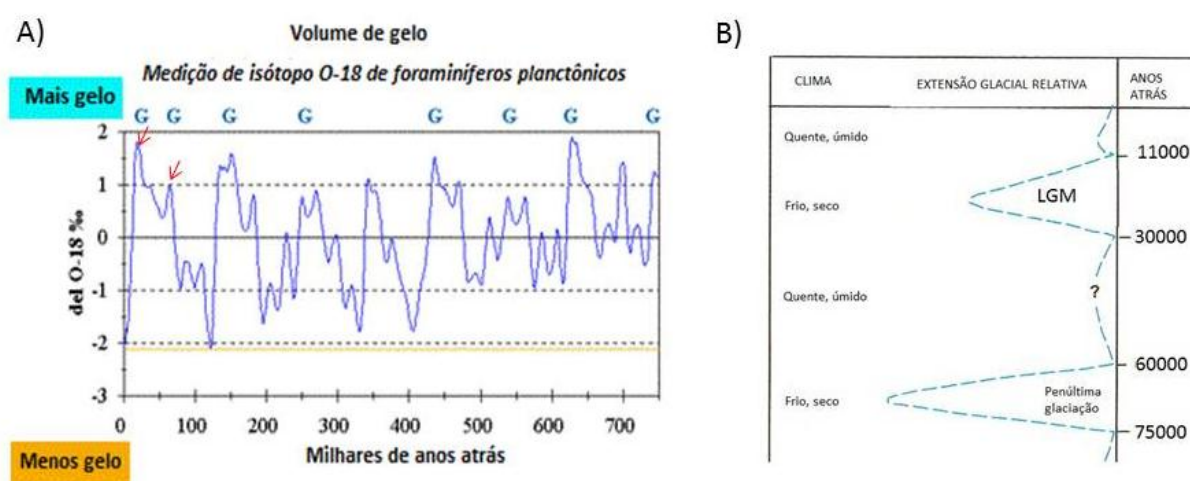
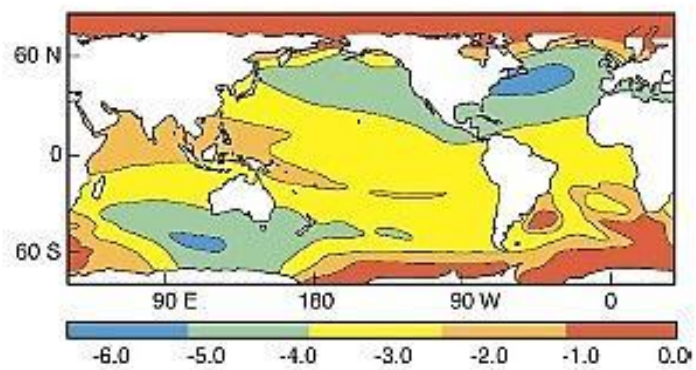


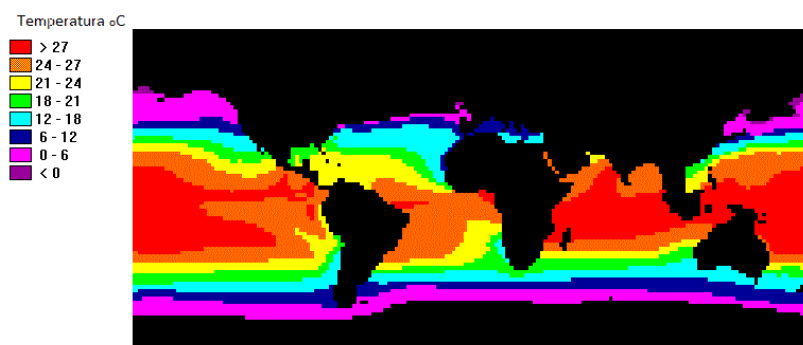
Figura 33: A) Oscilação do volume de gelo ao longo dos últimos 800 mil anos estimada através da medição da concentração de O^{18} em tecas de fósseis de foraminíferos. G- picos de glaciação. As setas vermelhas indicam os dois últimos picos, ocorridos no fim do Pleistoceno (modificado e extraído de Illinois State Museum) B) Os picos indicam as duas últimas glaciações (Figura extraída do site <http://redoubtreporter.wordpress.com> e gentilmente confirmada, por comunicação pessoal, pelo Dr. Dick Reger que cedeu a Figura ao jornal).

É sabido também que, durante o LGM, a temperatura da superfície da água reduziu ao menos 3°C no Atlântico Tropical em comparação com a temperatura atual (Figura 34). Já ao fim do LGM, há 18 mil anos, a temperatura já era equivalente à atual. O nível do mar foi outro fator também bruscamente alterado durante o LGM cujo declínio global chegou a 120 – 140 m, expondo a plataforma continental (158).

A)



B)



C)

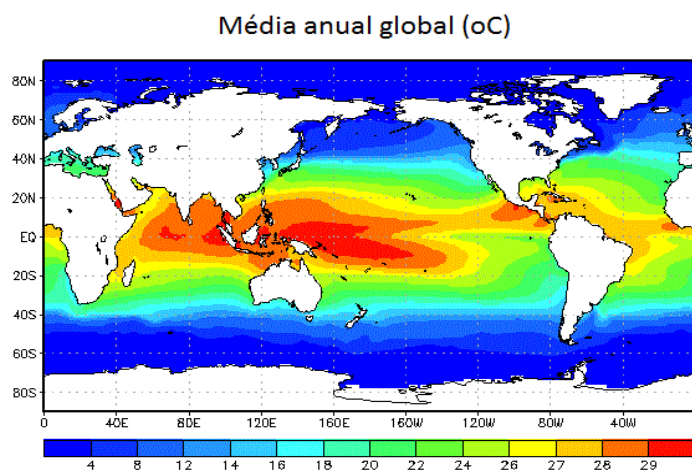


Figura 34: Temperatura da superfície do mar durante e após o LGM. A) Diferença de temperatura entre o período LGM e o presente (159). B) Temperatura estimada para fevereiro há 18 mil anos atrás, fim do LGM (160) C) Temperatura atual (modificado do site do NOAA).

5.3 Filogeografia

Os resultados de estimativa de tempo desde a última expansão baseados em τ (estimado pelo *mismatch distribution*) e BSP foram congruentes e revelam a história demográfica dessas espécies.

As populações de *C. gasar* parecem ter se expandido ao fim do LGM, que terminou há cerca de 19 mil anos. Em ordem cronológica, a população norte teria se expandido primeiro (cerca de 18 mil anos atrás), seguida da população africana (16 mil anos) e, por último, teria se expandido a população do sul (cerca de 7 mil anos). Em contrapartida, *C. rhizophorae* teria se expandido há mais tempo, entre 55 e 65 mil anos atrás, que coincide com o fim do penúltimo pico de glaciação (Figura 33). As populações do norte e do sul desta espécie exibiram proximidade entre os tempos desde a última expansão estimados, indicando que se sucederam concomitantemente.

A diferença no nível de estruturação das duas espécies e a datação do início da expansão indicam que *C. rhizophorae* estaria já distribuída ao longo da costa do Brasil antes do LGM. Vindo de uma expansão recente pós-glaciação (há 65 mil anos), o tamanho efetivo da população de *C. rhizophorae* seria suficientemente alto para não sofrer retração com a glaciação seguinte (LGM).

Entretanto, a configuração da rede haplotípica de *C. gasar* e seus resultados de forte estruturação indicam outra história: *C. gasar* possui uma espécie-irmã mais próxima que *C. rhizophorae*, denominada *C. corteziensis* (ver Figura 2B do item 6), espécie com ocorrência na costa do Pacífico, desde o Golfo da Califórnia (México) até o Peru (89). Sua posição filogenética é uma indicação de que o ancestral comum das duas espécies teria sido separado com o soerguimento do Istmo do Panamá há 3 milhões de anos, quando as duas populações de cada oceano teriam sofrido especiação alopátrica, como diversos outros *taxa* marinhos (161, 162). Além disso, a população da Guiana Francesa não teve sinal de expansão, indicando que essa população teria mantido seu tamanho constante e, por isso, seria uma população mais antiga. A partir disso, seria mais parcimonioso concluir que as populações de *C. gasar* que ocorrem na costa africana teriam origem americana, diferente do sugerido

por Lapègue, Boutet (91). O tempo de expansão das populações africanas também é discretamente menor que o tempo estimado para a população do norte do Brasil, reforçando a hipótese de sua origem no Atlântico ocidental.

A rota Oeste-Leste sugerida para a migração de *C. gasar* parece contra intuitiva se levarmos em conta o padrão de correntes superficiais do Atlântico Sul Tropical, onde, por conta do efeito de Coriolis, a correnteza predominante vai da África para a América do sul. Entretanto, os resultados sugerem que a rota de migração de *C. gasar* teria ocorrido durante ou pouco antes do LGM, em um momento geológico diferente do atual. De fato, as correntes marítimas em muitas áreas, como no Indo-Pacífico (163) e no Mar do Labrador (164), foram diferentes das atuais no último máximo glacial, devido à mudança na temperatura do mar e, especialmente, à diminuição brusca do nível do mar. A possibilidade de ter havido mudanças nas correntes do Atlântico Tropical explicaria a migração da *C. gasar* no sentido oriental, da América do Sul para a África. Uma alternativa seria a introdução antropogênica, como sugerido por Lapègue e colaboradores (2002), mas essa hipótese foi refutada por Lazoski e colaboradores (2011) pois fósseis desta espécie foram encontrados em sambaquis de ambos os continentes e datados de 4 a 6 mil anos atrás, antes da expansão marítima. Ao mesmo tempo, uma hipótese alternativa e extrema à antropogênica explicaria a co-ocorrência de *C. gasar* através de vicariância após a separação dos continentes. Esta também foi refutada pelo mesmo trabalho, uma vez que a separação ocorreu há 16 milhões de anos; tempo suficiente para ter havido especiação. Naturalmente, a demonstração da presença da espécie nos dois continentes em períodos pré-colombianos não exclui que migrações mais recentes tenham ocorrido entre África e América do Sul, mas seguramente a origem das populações nos dois continentes não pode ser explicada por transporte antropogênico apenas.

As populações brasileiras de *C. gasar* são bastante divergentes entre si, e o tempo de expansão entre os grupos norte e sul é bem diferente. Com a drástica diminuição do nível do mar no LGM, a cadeia de Vitória-Trindade teria ficado exposta e seria uma barreira geográfica bastante eficiente contra a migração das larvas (165). Assim, a população do norte recém-chegada teria ficado restrita ao norte da cadeia. Ao fim da glaciação, há 19 mil anos atrás, o aumento da temperatura da superfície oceânica permitiria a expansão da

população do norte. Somente com a subida do nível do mar e submersão total da cadeia Vitória-Trindade, *C. gasar* pôde migrar para o sul. O gráfico da Figura 35 mostra o nível do mar, com relação ao atual, nos últimos 35.000 anos. Segundo o gráfico, a cadeia teria submergido durante a deglaciação somente entre 10.000 e 5.000 anos atrás (166), exatamente o tempo estimado médio de expansão da população do sul.

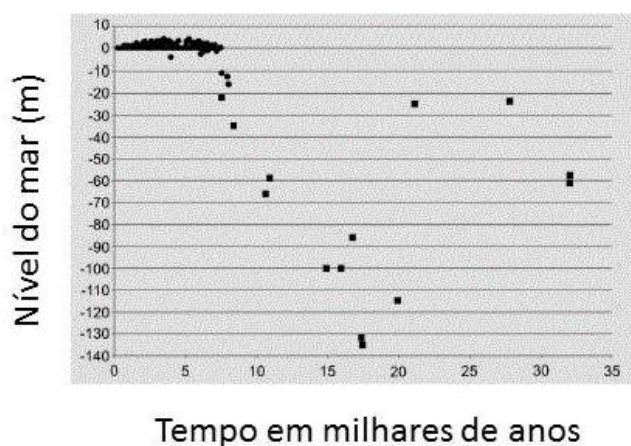


Figura 35: Nível do mar na costa brasileira nos últimos 35000 anos (extraído e modificado de Nagai, Mello e Sousa (166))

Parte da alta estruturação entre as populações norte e sul de *C. gasar* em comparação com a baixa diferenciação das populações de *C. rhizophorae* pode ser explicada pela barreira geográfica imposta à dispersão de *C. gasar* para o sul durante o LGM, ficando restrita à região ao norte da barreira. Outra possível explicação para acentuação da distância genética entre as populações de *C. gasar* seria a existência de uma barreira atual.

Como explicado na introdução, as duas espécies possuem picos reprodutivos em épocas diferentes do ano. O maior pico de desova de *C. gasar* acontece em dezembro (66, 69), justamente em período de formação da ressurgência na região de Cabo Frio. As temperaturas mínimas registradas nessa região durante a ressurgência (13 a 14 °C) certamente seriam limitantes à sobrevivência larval, uma vez que abaixo de 20 °C não ocorre a metamorfose da *C. gasar* (larva pediveliger para "pré-semente") (Carlos Gomes, comunicação pessoal) tornando o fenômeno uma barreira específica para *C.*

gasar e não para *C. rhizophorae*, cujo pico reprodutivo ocorre no meio do ano (66, 69). A ressurgência nessa região também explicaria a detecção de mistura de indivíduos de ambas as populações na população de Rio das Ostras (RJ1), cidade muito próxima a Cabo Frio, que é um ponto amostral que está geograficamente sobre a barreira. A ressurgência também parece ser uma barreira para a sobrevivência de ostras na África: as águas ao sul da latitude de 15° S são mais gélidas, associadas à ressurgência da Corrente de Benguela (167) e a distribuição de *C. gasar* na África estaria restrita do Senegal a Angola, cujo limite sul estaria sobre a latitude 17 °S.

Dessa maneira, as histórias demográficas de *C. gasar* e *C. rhizophorae* diferem quanto à imposição de barreiras geográficas que justificariam a diferença de estruturação populacional de cada uma. Nossos dados indicam que a distribuição de *C. gasar* é reflexo de uma barreira geográfica histórica imposta recentemente e de outra barreira sazonal atual que afetaria a conectividade entre suas populações. *C. rhizophorae* não seria tão afetada pela barreira da ressurgência, mas teria sido dividida em duas populações durante o LGM pela cadeia de Vitória-Trindade, pois já estava distribuída ao longo da costa durante a regressão marinha da última grande glaciação. Por isso, vemos um sinal fraco de estruturação, que seria resultante da separação das populações durante o LGM apenas, indicando que esta espécie talvez mantenha hoje um fluxo migratório e, por isso, uma maior homogeneidade genética. O gradiente latitudinal de diversidade observado para ambas as espécies é também um padrão recorrente (168, 169), provavelmente causado pela retração das populações nas latitudes atualmente tropicais durante o LGM e posterior expansão a partir do equador após o aumento da temperatura superficial oceânica.

5.4 Sobre a população da Guiana Francesa

Na rede haplotípica de *C. gasar* (Figura 16) os haplótipos referentes à localidade da Guiana Francesa aparecem distribuídos pela rede. A maioria dos indivíduos analisados possui haplótipos também compartilhados pelo Pará e Maranhão, mas parte da população é de indivíduos que compartilham haplótipos do grupo do sul. Essa distribuição incomum, comparada às outras populações analisadas, parece ser resultado de alguma introdução artificial de indivíduos do grupo do sul especificamente na Guiana Francesa ou vice-versa. Uma análise histórica indica um acontecimento que poderia explicar essa introdução. Em 1809, a Guiana Francesa foi invadida por tropas portuguesas com assessoria de tropas inglesas, em represália à primeira invasão francesa de Portugal, quando houve a fuga de Dom João VI para o Brasil. Souza Coutinho, ministro da Guerra e relações exteriores, estava decidido a levar a colônia à ruína total (170), com exceção do famoso jardim *La Gabriele*, em Caiena, que reunia todas as espécies vegetais almejadas pelos portugueses (171). Durante os 8 anos de ocupação da Guiana Francesa pelo Brasil, diversas especiarias e frutos, como noz-moscada, cana caiena (muito superior à cana de açúcar), cravo, fruta-pão e possivelmente carambola e fruta-do-conde e mudas de plantas (nogueira, camboeira e abacateiro) foram levadas ao Brasil em inúmeras viagens realizadas em navio. Tais mudas de plantas seriam parte de uma coleção precursora do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (170).

Até aproximadamente 1880, os navios utilizavam lastro sólido como pedras e areia (172) transportando comunidades de organismos fixos. Um exemplo seria o caso de *Littorina littorea*, uma espécie de caramujo europeu introduzido nos Estados Unidos da América provavelmente através de lastro seco (173). Existe a possibilidade desse estranho padrão de distribuição dos haplótipos da Guiana Francesa ser resultante dos 8 anos de inúmeras viagens entre a Guiana e o Rio de Janeiro no século XIX, através da introdução de ostras aderidas a pedras de lastro ou ao casco dos navios.

6 A NEW OYSTER INVADER (*CRASSOSTREA* SP.) ON THE EAST COAST OF SOUTH AMERICA (ARTIGO CIENTÍFICO)

Cavaleiro NP¹; Turek CR²; Melo CMR²; Lomovasky B⁴; Solé-Cava AM¹, Lazoski C¹

¹ Laboratório de Biodiversidade Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 21941-590, Brazil

² Laboratório de Moluscos Marinhos, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Fortaleza da Barra da Lagoa, Florianópolis, SC, Brazil

³ Laboratorio de Ecología, Dpto. Biología, FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata, CC 573 Correo Central (B7600WAG) Mar del Plata, Bs. As. Argentina

Abstract

We used analyses of mitochondrial (16S and COI) and nuclear (ITS-2) sequences to infer the phylogenetic relationships of an unidentified species of *Crassostrea* oyster that occurs both in the West Atlantic and Indo-Pacific oceans. Ninety-three samples of *Crassostrea* sp. from south of Brazil and Argentina formed a monophyletic clade with those from the Indo-Pacific. These results suggest that this unknown species is a probable new invader in the Americas.

Introduction

There are about 34 described recognized extant species in the genus *Crassostrea* Sacco, 1897 (Mollusca; Ostreidae) which are distributed in the tropical regions, mostly in the Indo-Pacific Ocean. This is one of the most important economic *genus* of oysters and, in 2010, it accounted for 80% of the world's oyster production (FAO 2012). Many species of *Crassostrea* are cultivated (174) around the world, of which Pacific oysters (*C. gigas*) are the most important. Cultivation of Pacific oysters started in Brazil in 1989 (66) and, in Argentina, in 1982 (175). Recently this species has become an invader of natural banks on the south Brazilian coast (Melo et al. 2010) and in Argentina, from Patagonia (175, 176) to the mouth of the Plata River (177). Invasive

species may influence complex ecological processes, potentially causing changes in trophic dynamics of coastal ecosystems (174). If not controlled, exotic oyster introductions can impact habitat structure, greatly reducing or even leading to the extinction of native populations, introducing disease-causing organisms (174, 178), facilitating other bioinvasions (179) or outcompeting native oyster species (180). Other bivalve species have already been registered as invasive in South America. *Isognomon bicolor* was accidentally introduced to the Brazilian coast, most probably on oil platforms (181) from different regions or from ballast water due to the heavy transit of foreign and national ships through local ports (181, 182). *Limnoperna fortune* is another bivalve that was likely introduced in ballast water discharged into the Río de la Plata estuary by a transoceanic vessel (183, 184) and is now distributed along Argentinean and Brazilian coasts. Meanwhile, in addition to these three species, a probable new nonidentified bivalve invader was found in north of Brazil in two different phylogenetic analyses of *Crassostrea* (60, 185). What appears to be the same species was also detected in China (22) which was also recently observed in southeast Brazil by 16S analysis (Galvão et al. 2012)

Cultivation of native oysters (*C. gasar*) by harvesting seeds from the environment has not been successful in Southeast Brazil, where most harvested seeds did not grow to an appropriate size for consumption, so that adults had to be extracted from their natural habitats for reproduction in laboratory (Galvão et al. 2012). This alternative is not the best option for oyster cultivation, because it is environmentally unfriendly and results in a higher cost in time and resources. It is possible that the reason for the failure in cultivation is the co-occurrence, in the oyster banks, of another species, possibly *Crassostrea* sp.

The aim of this work was to verify that hypothesis, through the sequencing of mitochondrial and nuclear markers and their comparison with Atlantic and Indo-Pacific species. The phylogenetic analyses confirmed that Atlantic and Indo-Pacific oysters form two reciprocally monophyletic clades, and that the small oysters present in oyster banks in South Brazil and Argentina belong to a possibly new Indo-Pacific species, previously found only in Southeast and North Brazil and South China. Giving its impact in southern

South-America oyster culture, this species is a new important invader in the South Atlantic.

Materials and methods

Samples of *Crassostrea* sp. were obtained from south of Brazil (Santa Catarina; 26° 15' S, 48° 41' W; N=77) and from Northeast Argentina (Samborombon Bay; 36° 19' S, 56° 46' W; N=16). They could be easily identified morphologically through the absence of denticles (characteristic of genus *Crassostrea*) and the presence of spiny projections on their valves, which does not occur on other species of *Crassostrea*, and their identification was confirmed by nucleotide sequencing.

DNA was extracted using a modified CTAB protocol (Gusmão and Solé-Cava 2002). We amplified a 460 bp fragment from the mitochondrial large ribosomal subunit (16S) with primers 16SAR (CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT) and 16SBR (CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T) (101). We designed new specific primers both for the amplification of 627 bp of nuclear internal transcribed spacer 2 (ITS-2) (ITS2CS-F: TCG GTT AAA CCA TCA ATC G; ITS2CS-R: GAT CTG AGG TCG GAG TGA) and of 505 bp of cytochrome c oxidase I (COI) (COIsp-F: AGT TCT CTT ATC CGT TGA AG; COIsp-R: TAA AAT GAC GAT CAG TAA GCA G). In total, we amplified and sequenced 58 (16S), 77 (COI) and 42 (ITS-2) samples from Santa Catarina and 16 (16S and COI) and 2 (ITS-2) samples from Argentina. Polymerase chain reaction (PCR) was performed on a Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems) using an initial denaturing at 95 °C for 3 min; 35 cycles of 1 min at 93 °C, 1 min at 50 °C (16S), 60 °C (COI) or 52°C (ITS-2), and 1 min at 72 °C, followed by a final extension at 72 °C for 7 min. PCR reactions used 10 ng of template DNA, 1 unit of Taq polymerase (GoTaq® DNA Polymerase, Promega), 200 µM each of the four dinucleotides, 200 nM of each primer, and 2.5 mM (16S and COI) or 3 mM (ITS2) of MgCl₂, in 20 µL of 1x PCR buffer. We included negative controls in all PCR amplifications. The PCR products were purified using Agencourt® AMPure® XP (Beckman), while sequencing reactions were purified with Agencourt® Cleanseq® (Beckman), both according to the manufacturer's

instructions. Purifications were performed with the help of an EpMotion 5075 liquid handling station (Eppendorf).

Both strands of every PCR product were sequenced using the same amplification primers through dye terminator cycle sequencing reactions (ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, Applied Biosystems), that were subsequently loaded onto an automatic sequencer (Applied Biosystems model 3500), according to the manufacturer's protocols. Other sequences used in this work are available from GenBank, from state of Pará, north of Brazil and from China (Table 1).

Sequences were edited on SeqMan II 4.0 program (DNASTAR Inc.) and aligned using ClustalW included on MEGA 5.1 (186). Alignments were inspected and edited when necessary, and final alignment lengths were 399 pb (16S), 503 pb (COI) and 438 pb (ITS-2). Nine ambiguous sites in 16S sequences were excluded from the analyses. Different haplotypes of each molecular marker were detected using DNASP software (187) to be used on subsequent analyses and have been deposited in GenBank (Table 1). Neighbor-joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) were the inference methods applied on phylogenetic analyses and both were performed on MEGA 5.1 with 1,000 replicates for node supports. NJ trees were performed under Kimura-2-parameter (K2P) model of base substitution (188). The starting trees were estimated by BioNJ, and the gamma distribution parameter and the proportion of invariable Models used on ML analysis were chosen through employing a model selection test included in MEGA 5.1 software under the Akaike information criterion (AIC). ML tree topology was also estimated on MEGA 5.1 using Generalised time-reversible (GTR) model (189) for 16S and ITS-2 sequences, and Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) model (190) for COI sequences. All datasets were performed with estimates of invariable sites (I) and gamma distribution (G), except for ITS-2 tree which was not estimated with G.

Results

Blast searches indicated that the 16S and COI sequences of the oysters from south Brazil and Argentina were retrieved highly similar (100% coverage; 98% identity, E-value=0.00) to those of *Crassostrea* sp. an unknown species which

has been previously found in North Brazil (Varela et al. 2007; Melo et al. 2010) and from the Guangxi Province in China (22, 60, 185)) which were, thereby, also included in our analyses (Table 1).

Low haplotype diversity (h) and moderate nucleotide diversity (π) were detected in all three markers (Fig. 1). We found three (16S), nine (COI) and ten (ITS-2) haplotypes different from those already published. Distribution and frequencies of haplotypes are shown on networks (Fig. 1). All five Chinese 16S sequences corresponded to only one haplotype exclusive to that area.

In all tree topologies, besides the two southwestern Atlantic species of *Crassostrea*, a third monophyletic group was found. That group was highly differentiated from the others, and was sister to the other Indo-Pacific species. Pairwise distances were calculated between all *Crassostrea* species from which sequences were available, and the most similar sequences to those from *Crassostrea* sp. Were those from *C. iredalei*, *C. madrasensis* and *C. hongkongensis* ($d=0.080/16S$); *C. gryphoides* ($d=0.210/COI$) and *C. nippona* ($d=0.540/ITS-2$) while the most different were *C. rhizophorae* ($d=0.180/16S$) and *C. gasar* ($d=0.314/COI$ and $d=0.996/ITS-2$). All analyses show that *Crassostrea* sp. is highly differentiated from the Atlantic oysters, and that it probably belongs to the Indo-Pacific clade (Fig. 2). *Crassostrea* sp. is a smaller oyster than the others found in the Atlantic: over 300 specimens morphologically analysed, none were larger than 40 mm, which contrasts with the maximum lengths of *C. rhizophorae* (100 mm), *C. gasar* (190 mm) and *C. virginica* (180 mm). *Crassostrea* sp. can be morphologically identified by the absence of denticles, which distinguish *Crassostrea* from other genus of Ostreidae and by the presence of spiny projections at left valve, which differentiate it from other species of *Crassostrea* (Fig. 3)

Discussion

Species of *Crassostrea* from the Atlantic and from the Indo-Pacific form two easily recognized reciprocally monophyletic groups in analyses performed using mitochondrial markers. We confirmed the existence of the two groups using a nuclear marker, and detected the existence of an oyster from the Indo-Pacific group in south of Brazil and north of Argentina. The species detected does not correspond to any of the *Crassostrea* species genetically studied to date, and is

the same as that found in north (State of Pará) and southeast of Brazil (State of São Paulo – sequences not used in our analysis) and, more interestingly, in south China. The co-occurrence of *Crassostrea* sp. on both continents associated with its phylogenetic position and the higher genetic identity with Indo-Pacific oysters lead us to believe that this unidentified species is from the Indo-Pacific and, therefore, it is another bivalve invader on the west coast of South America.

This species can be considered as an important threat to Brazilian oyster populations and aquaculture, due to probable competitive exclusion and affecting ecological structure of the native benthic community at the same time jeopardizing the development of aquaculture of these native species. For example, in Santa Catarina State (south Brazil), where there are the largest oyster cultivation plants in the Southwest Atlantic, at least 80% of all captured seeds consisted of *Crassostrea* sp. (unpublished results). Thus, it is possible that the unsuccessful oyster cultivation in Cananéia (São Paulo State, Brazil) using seed from natural oyster banks was due to the abundance of this exotic unknown species of *Crassostrea* where 100% of juveniles from spat collection were identified as being *Crassostrea* sp. The unsuccessful of this strategy stimulated of taking oyster adults from natural environment which are placed in trays for a few months until reach a commercial length. During the extraction, producers select the largest adults, probably with great potential of growth, which were observed as being *C. gasar* (191), compromising the natural stock of this species. The introduction route of *Crassostrea* sp. remains unknown. The arrival of invasive species may be accidental or intentional. The four main recognized sources of introduction are via aquaculture, in ballast water, attachment to ships' hulls, and when canals create new connections between oceans (192). *Crassostrea* sp. may have been imported together with *C. gigas* when that species was introduced to Brazil in the 1980s, or more recently through the import of new *C. gigas* adults for cultivation. Its occurrence both in North Brazil and in Argentina, which are over 6,566 km apart, is puzzling, since the species has not been observed across 3,650 km of coastline between Rio and Northeast Brazil. Ecological conditions in the two areas are very different, particularly in relation to temperature, but also turbidity and salinity. This apparent high ecological plasticity of the species indicates that it may pose a

serious threat to native populations in the near future. It is fundamental that the occurrence of the species in other areas be monitored, and that date and origin of the introduction be investigated, to prevent further invasions that could bring in new adaptive genetic variation. For that, population genetics studies using samples from China and highly polymorphic markers, like microsatellites, are needed.

Table 1: Information of specimens and sequences from GenBank analyzed in this study.

¹ Sequences obtained in this study, ² Sequences from (185), ³ Sequences from (22) and ⁴ Sequences from (60).

Figure 1: Haplotype networks of COI (A), 16S (B) and ITS-2 (C). Circles identify the different haplotypes and their frequencies. Colors indicate their geographic origin: black – Santa Catarina; white – Pará; grey – Argentina; crosshatched – China. N: number of sequences, H: haplotype diversity, π : nucleotide diversity.

Figure 2: Phylogenetic trees based on COI, 16S, and ITS-2 sequences. Numbers on branches correspond to bootstrap values (%) of Neighbor-Joining and Maximum Likelihood analyses, respectively. (*) indicates bootstrap values lower than 60%. The Indo-Pacific group is highlighted.

Figure 3: Valves of *Crassostrea* sp. Internal (A) and external (B) faces of left valve. Internal (C) and external (D) faces of right valve.

Species	Accession number on GenBank		
Subfamily Crassostreinae	16S	COI	ITS-2
	Lbdm ¹	Lbdm ¹	Lbdm ¹
	Lbdm ¹	Lbdm ¹	Lbdm ¹
	Lbdm ¹	Lbdm ¹	Lbdm ¹
	Lbdm ¹	Lbdm ¹	Lbdm ¹
	EF473280 ²	Lbdm ¹	Lbdm ¹
<i>Crassostrea</i> sp.	EF473278 ²	Lbdm ¹	Lbdm ¹
	EF473281 ²	Lbdm ¹	Lbdm ¹
	HQ660984 ³	Lbdm ¹	Lbdm ¹
	HQ660985 ³	Lbdm ¹	Lbdm ¹
	HQ660986 ³	HM003525 ⁴	Lbdm ¹
	HQ660987 ³	HM003526 ⁴	
<i>Crassostrea angulata</i>	HQ660967	DQ659374	
<i>Crassostrea hongkongensis</i>	AY632549	HM627878	
<i>Crassostrea iredalei</i>	HQ660981	JF915472	
<i>Crassostrea madrasensis</i>	JF915516	JF915506	
<i>Crassostrea nippona</i>	FJ743508	AF300616	EU252080
<i>Crassostrea cuttackensis</i>		FJ262983	
<i>Crassostrea gryphoides</i>		FJ262985	
<i>Crassostrea ariakensis</i>		AF300617	EU252081
<i>Crassostrea belcheri</i>		JF915510	
<i>Crassostrea gigas</i>	FJ743509	DQ659370	EU252079
<i>Crassostrea sikamea</i>	HQ660977	AB641327	
<i>Crassostrea corteziensis</i>	EU733651		
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	FJ717607	FJ717638	FJ478039
<i>Crassostrea gasar</i>	EF473270	FJ717611	FJ544300
<i>Crassostrea virginica</i>	FJ743510	FJ717610	EU072460
<i>Saccostrea cucullata</i>	AF458907		
<i>Saccostrea mordax</i>	HQ660993	HQ661029	
<i>Saccostrea palmula</i>	FJ768524		
Subfamily Ostreinae			
<i>Cryptostrea permollis</i>		DQ226531	
<i>Ostrea denselamellosa</i>			FJ356689
<i>Ostrea edulis</i>	JF808187	AF120651	
<i>Ostrea lurida</i>	FJ768588		
<i>Ostrea stentina</i>	AY376604		
<i>Ostrea spreta</i>	DQ640402		
<i>Ostrea aupouria</i>		DQ226533	
<i>Ostrea angasi</i>		DQ078666	
<i>Ostreola equestris</i>		DQ640082	
<i>Ostreola stentina</i>		DQ226517	
Subfamily Lophinae			
<i>Dendostrea crenulifera</i>	EU815984		
<i>Dendostrea folium</i>	AF052069		
<i>Dendostrea frons</i>	AF052070		
<i>Lopha cristagalli</i>	AF052066		

Figure 1

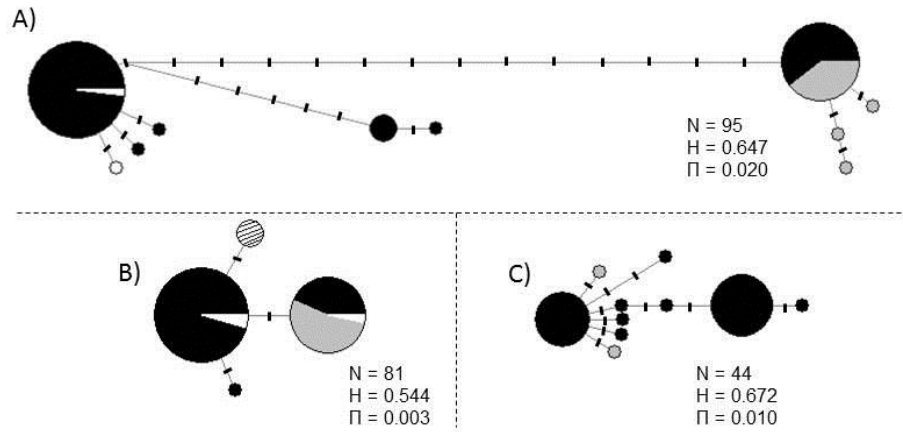
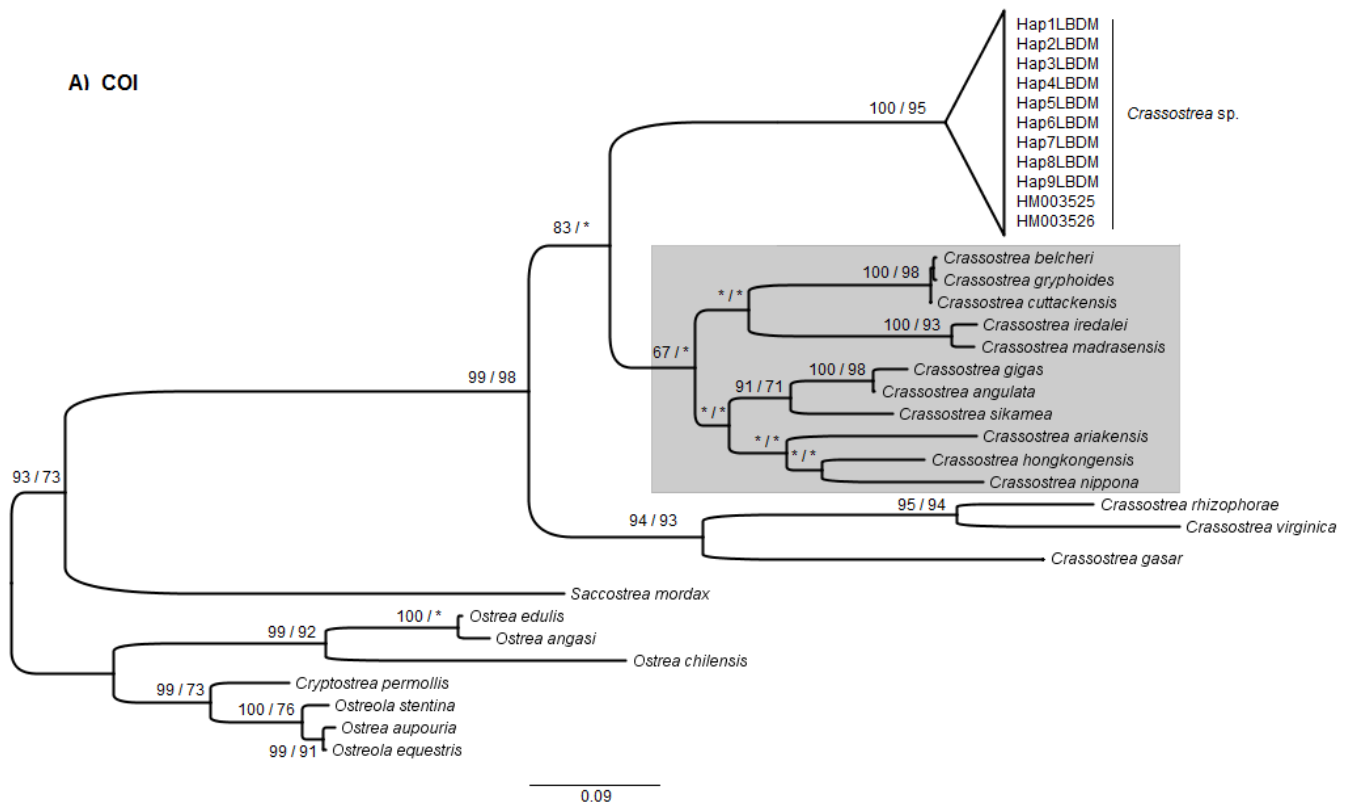
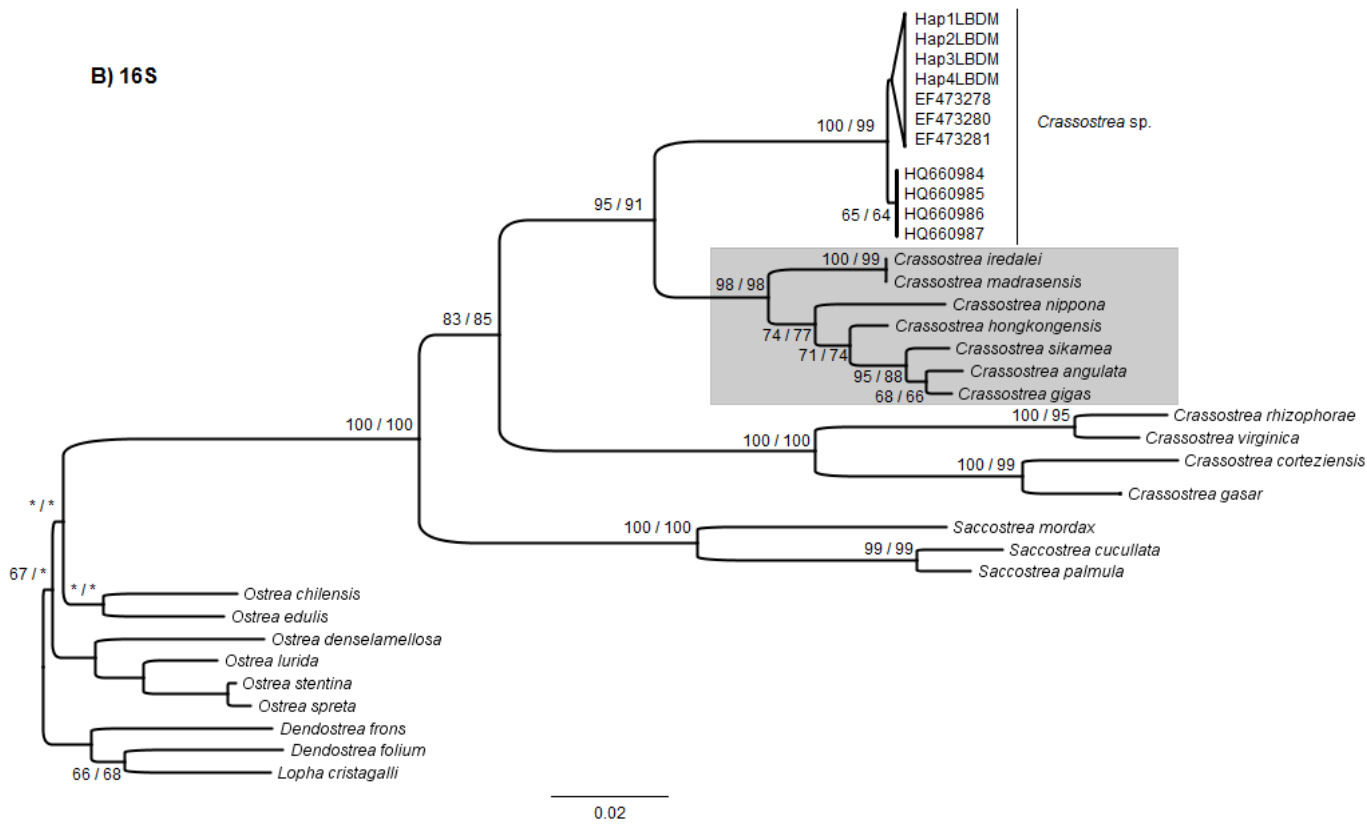


Figure 2



B) 16S



C) ITS-2

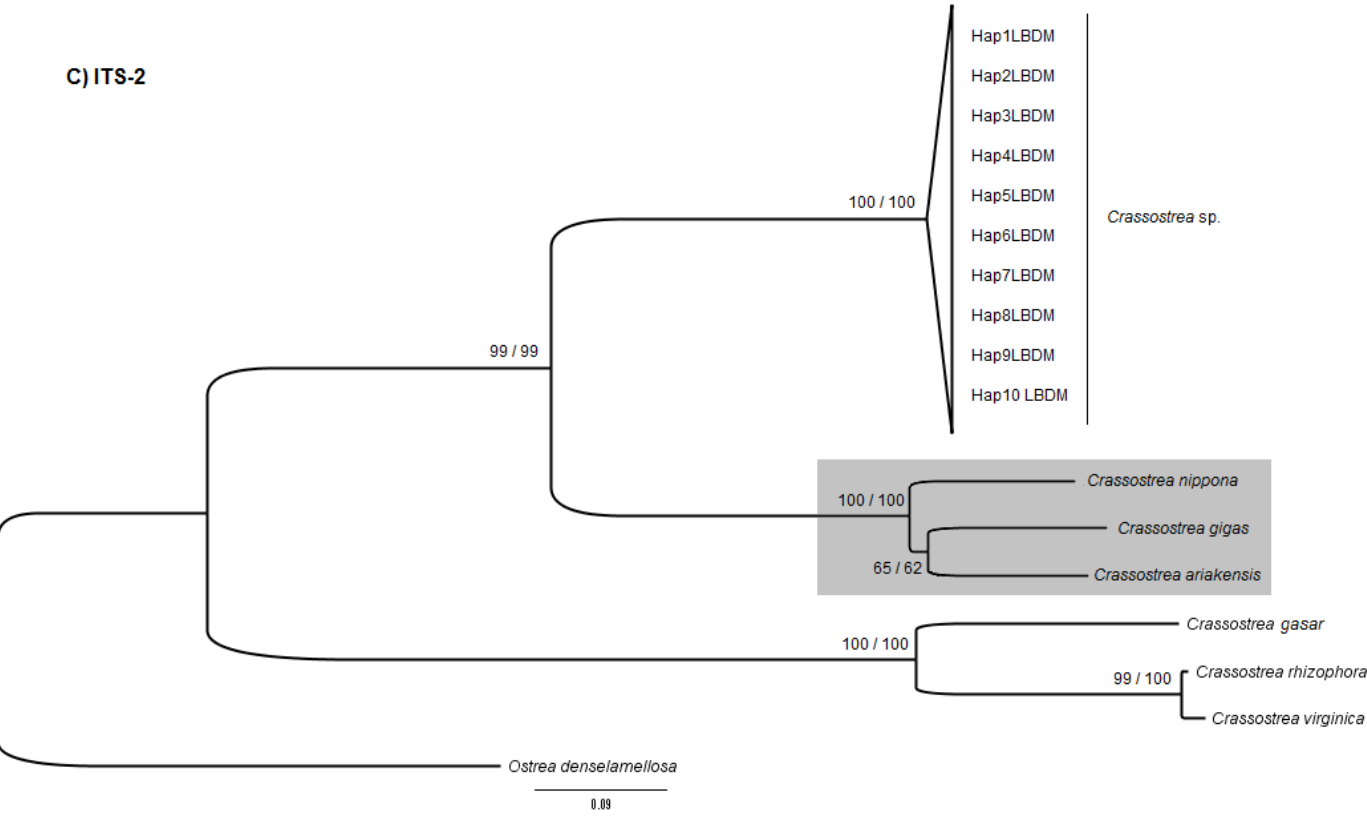


Figure 3



7 DISCUSSÃO GERAL

Os resultados observados para *C. gasar* e *C. rhizophorae* no Capítulo 1 e a detecção da espécie de *Crassostrea* sp. invasora no Capítulo 2 sugerem estratégias de manejo especiais, no Brasil, que considerem as diferenças genéticas entre os estoques como também a presença de mais uma espécie invasora.

Observou-se, para *C. gasar* e *C. rhizophorae*, a existência de dois estoques diferentes e coincidentes para cada uma delas, cujo limite estaria no estado do Rio de Janeiro. Caso apresentassem cenários de isolamento por distância, seria fundamental que seu manejo focasse em regiões com relativa homogeneidade genética. Nessa situação hipotética, seria desafiador encontrar áreas minimamente homogêneas que permitissem um manejo sob as mesmas regras (193). Entretanto, pode-se considerar que não exista isolamento por distância em cada um dos dois estoques detectados para ambas as espécies. Assim, os estoques do norte e do sul deveriam ser julgados como grupos diferentes entre si, mas de total homogeneidade genética interna cujas regras de manejo seriam igualmente aplicadas em quaisquer pontos de cada estoque. Todavia, é preciso avaliar o manejo sob uma ótica conservacionista e não apenas econômica. Os recifes ostreícolas brasileiros já foram intensamente danificados, com perda de 50 a 89% (73) e toda cautela na aplicação do manejo é necessária. Assim, sob o princípio da precaução, adequado a espécies em risco de extinção, seria menos grave particionar uma área geneticamente homogênea do que tratar como panmítica uma área onde há subdivisões na variação genética mesmo que as mesmas sejam tênues (131). Nessas condições, é apropriado que se considere as subdivisões do grupo norte observadas nos resultados com microsatélites para as duas espécies. Assim, sugerimos que os diferentes estoques considerados para manejo da *C. gasar* sejam: 1) Pará; 2) Norte do Maranhão; 3) Sul do Maranhão; 4) Norte da Paraíba; 5) Pernambuco e Bahia; 6) Rio de Janeiro; 7) São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Enquanto para *C. rhizophorae* seriam: 1) Piauí e Ceará; 2) Rio Grande do Norte; 3) Paraíba até o Espírito Santo; 4) Rio de Janeiro e 5) São Paulo a Santa Catarina. Em ambas as

espécies, optamos pela separação do estoque do Rio de Janeiro dos demais, uma vez que é uma região de características genéticas dúbias, como exposto na discussão do capítulo 1.

Recentemente, cerca de 1 milhão sementes de ostras de *C. gasar* produzidas do Laboratório de Moluscos Marinhos (UFSC) foram vendidas a um produtor de Natal (RN) que recém-introduziu o cultivo de ostras na sua fazenda marinha (comunicação pessoal). Todas essas sementes de ostras catarinenses, advindas do grupo sul, foram introduzidas levemente no grupo norte, cujo impacto potencial nas populações naturais de Natal pode ser devastador, especialmente considerando a forte estruturação entre as populações do norte e sul de *C. gasar*.

Além dessas equivocadas trocas de indivíduos de diferentes estoques, ainda existe a depleção de indivíduos adultos das populações naturais para cultivo. *C. gasar* é a espécie nativa com maior potencial de sucesso em cultivo, além de atingir um tamanho mais satisfatório para consumo do que *C. rhizophorae*. Por isso, como analisado na discussão do Capítulo 2, os maiores indivíduos adultos são extraídos dos bancos naturais de ostras devido à dificuldade de coletar sementes desta espécie (Galvão et al. 2012). O provável complicador dessa abordagem é a presença de uma espécie exótica do mesmo gênero, identificada apenas como *Crassostrea* sp. Sua introdução na costa sul-americana foi bem sucedida de tal maneira que contabiliza até 100% das sementes coletadas, impedindo o uso dessa estratégia para cultivo de *C. gasar*. A alternativa encontrada em Cananéia (SP) foi coletar os indivíduos adultos diretamente do ambiente e usá-los como reprodutores.

As ostras do gênero *Crassostrea* são mundialmente reconhecidas pela sua grande importância no mercado de consumo. No Brasil, existe um engajamento recente em busca do incentivo ao cultivo das ostras nativas. Para isso é necessário o conhecimento dos estoques, seus números e limites, com o objetivo de manejá-los da maneira mais produtiva e menos impactante possível. A existência de uma espécie invasora e, potencialmente, competidora interfere diretamente no processo de manejo sustentável dos estoques, agindo como um impedimento ao processo clássico de obtenção de sementes, cuja técnica mostra-se menos impactante e menos dispendiosa econômica e temporalmente.

Mais estudos genéticos e taxonômicos sobre a ostra invasora são necessários, a fim de esclarecer detalhes sobre sua origem e rota introdutória e, a partir dessas informações, estabelecer estratégias que evitem a captação total de sementes desta ostra. Esses estudos também são necessários para estimar o real impacto dessa ostra invasora sobre as populações naturais das ostras nativas.

É preciso ampliar a amostragem de ambas as espécies, especialmente na região do Rio de Janeiro e limites próximos. Infelizmente, muitas das populações amostradas no Rio de Janeiro e Espírito Santo foram identificadas como *C. rhizophorae*, exclusivamente, que criou um *déficit* de amostragem para *C. gasar*. A ampliação da amostragem será de grande valia para esclarecer os limites dos estoques nessa região e a atuação das barreiras sugeridas nesta tese.

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Concluimos que, de acordo com os resultados obtidos, as populações de *C. gasar* e *C. rhizophorae* estão estruturadas, sendo que a primeira demonstra sinais mais fortes de estruturação do que a segunda. Os limites geográficos entre as populações das duas espécies no Brasil são coincidentes, com dois grupos separados: um grupo que abrange os estados do norte, nordeste e Espírito Santo e um grupo contendo os estados de São Paulo até Santa Catarina. Diante desses estoques bem estabelecidos e de outros prováveis níveis de estruturação mais sutis ao extremo norte sugere-se que sejam manejados independentemente 7 estoques para *C. gasar* e 5 estoques para *C. rhizophorae*, partindo do princípio de precaução para conservação das espécies.

As amostras do estado do Rio de Janeiro apresentaram varias ambiguidades em relação às suas afinidades com as populações do norte e do sul: No caso de *C. gasar*, as poucas amostras obtidas de Rio das Ostras (RJ) demonstraram ser uma mistura de indivíduos, com alguns atribuídos ao grupo norte e grupo sul. Em *C. rhizophorae*, três localidades foram amostradas no RJ e uma delas, Baía da Ribeira, parece ser uma população diferenciada das demais populações do sul, apesar de outras 2 populações fluminenses estarem extremamente próximas, formando um triângulo de amostragem.

É provável que a estruturação observada entre os grupos norte e sul para as duas espécies seja reflexo da barreira imposta pela Cadeia de Vitória-Trindade durante o último período glacial. *C. gasar* teria ficado retida ao norte da barreira e só teria se expandido ao sul no fim do último máximo glacial, há cerca de 9 mil anos atrás. Por outro lado, as análises de distribuição de diferenças indicam que *C. rhizophorae* já estaria distribuída ao longo da costa brasileira e exibiu uma expansão mais antiga, indicando que teria sofrido retração e expansão ao início e fim do penúltimo pico glacial, há cerca de 60 mil anos atrás. Atualmente, uma segunda barreira sazonal seria efetiva para *C. gasar* mas não para *C. rhizophorae*: a ressurgência em Cabo Frio (RJ), que ocorre justamente durante o pico reprodutivo de *C. gasar*, mas não coincide com o período de reprodução de *C. rhizophorae*. Essa barreira adicional e

recente seria uma das responsáveis pela maior diferenciação entre as populações de *C. gasar* do que entre as de *C. rhizophorae*.

No entanto, a partir desses resultados parece que são necessárias mais amostras da região do Rio de Janeiro e Espírito Santo, abrangendo áreas no entorno das possíveis barreiras, o que permitiria realizar um estudo minucioso que identificaria e confirmaria as barreiras históricas e atuais.

Também é essencial obtermos uma quantidade maior de amostras da África e realizar estudos mais aprofundados sobre história demográfica dessas populações a fim de desvendar a rota introdutória dessa espécie. As amostras desta tese foram obtidas do laboratório de La Tremblade, França, da Dra. Sylvie Lapègue e, devido ao tempo que permaneceram acondicionadas, a maioria não estava em bom estado: o DNA demonstrou estar bastante degradado e, por isso, foi mais fácil amplificar sequências menores (microssatélites) do que maiores (região controle mitocondrial). Com mais amostras, seria possível utilizar outra metodologia analítica denominada como Computação Bayesiana Aproximada (ABC) que vem sendo extensivamente utilizada para inferências demográficas em modelos evolutivos complexos, como é o caso da maioria das populações naturais (194). É uma abordagem bastante atrativa especialmente por oferecer uma grande flexibilidade em tratar diferentes tipos de dados genéticos e cenários evolutivos. Além disso, essa metodologia permite confrontar esses diferentes cenários, estabelecidos *a priori*. Em ABC, resumidamente, as hipóteses de diferentes cenários evolutivos geram dados por simulação que são então reduzidos a estatísticas de sumário. Para isso, temos uma parceria estabelecida com o grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Mark Beaumont, (*University of Bristol*) que possui uma reconhecida experiência com inferências estatísticas em genética de populações e representa uma referência mundial em estudos com ABC.

A espécie invasora ainda não identificada, *Crassostrea* sp., que é problemática ao cultivo das espécies nativas, precisa ser ainda descrita por taxônomos, bem como é necessário um levantamento meticuloso sobre as espécies até hoje descritas do gênero *Crassostrea* e outros próximos a fim de verificar que esta espécie já não havia sido descrita anteriormente. Também será necessário obter mais amostras desta espécie ao longo da costa do Brasil e da China para que seja identificada a rota de introdução desta espécie.

REFERÊNCIAS

1. FAO. Global Production by production source 1950-2010 2012. Available from: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>.
2. Smith T. Scaling Fisheries. Cmbrigde: Cambridge University Press; 1994.
3. Worm B, Barbier EB, Beaumont N, Duffy JE, Folke C, Halpern BS, et al. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*. 2006 Nov;314(5800):787-90. PubMed PMID: WOS:000241729800037.
4. Everhart PR, Raven PH. Principles of fishery science. Ithaca: Cornell University Press; 1981.
5. Ward RD. Genetics in fisheries management. In: Solé-Cava AM, Russo CAM, Thorpe JP, editors. *Marine Genetics*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 191-201.
6. Thorpe JP, Sole-Cava AM, Watts PC. Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia*. 2000 Feb;420:165-84. PubMed PMID: WOS:000086541700018.
7. Solé-Cava AM. Genética da Conservação. In: Mattioli S, editor. *Biologia Molecular e Evolução*. São Paulo: Holos Press; 2001. p. 172-92.
8. Ovenden JR. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. 1990;41:835-53.
9. Pinsky ML, Jensen OP, Ricard D, Palumbi SR. Unexpected patterns of fisheries collapse in the world's oceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 May;108(20):8317-22. PubMed PMID: WOS:000290719600050.
10. Graves JE. Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. *Journal of Heredity*. 1998 Sep-Oct;89(5):427-37. PubMed PMID: WOS:000076113200006.
11. Mora C, Myers RA, Coll M, Libralato S, Pitcher TE, Sumaila RU, et al. Management effectiveness of the World's Marine Fisheries. *Plos Biology*. 2009;7(6):1-11.
12. Ryman N. Conservation Genetics Considerations in Fishery Management. *Journal of Fish Biology*. 1991;39:211.
13. Carvalho GR, Pitcher TJ. *Molecular genetics in fisheries*. London: Chapman and Hall; 1995.

14. Begg GA, Friedland KD, Pearce JB. Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview. *Fish Res.* 1999 Oct;43(1-3):1-8. PubMed PMID: ISI:000083505000001. English.
15. Booke HE. The stock concept revisited: perspectives on its history in fisheries. *Fish Res.* 1999 Oct;43(1-3):9-11. PubMed PMID: ISI:000083505000002. English.
16. Carvalho GR, Hauser L. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. . Carvalho GR, Pitcher TJ, editors. London: Chapman and Hall; 1995.
17. Boussau B, Karlberg EO, Frank AC, Legault BA, Andersson SGE. Computational inference of scenarios for alpha-proteobacterial genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004 Jun;101(26):9722-7. PubMed PMID: WOS:000222405600038.
18. Rand DM, Haney RA, Fry AJ. Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. *Trends Ecol Evol.* 2004 Dec;19(12):645-53. PubMed PMID: WOS:000225778100011.
19. Avise JC. Molecular markers, natural history and evolution. 2nd ed. London: Chapman & Hall; 2004.
20. Beagley CT, Okada NA, Wolstenholme DR. Two mitochondrial group I introns in a metazoan, the sea anemone *Metridium senile*: One intron contains genes for subunits 1 and 3 of NADH dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996 May;93(11):5619-23. PubMed PMID: WOS:A1996UN25300081. English.
21. Thao ML, Baumann L, Baumann P. Organization of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids, and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha). *Bmc Evolutionary Biology.* 2004 Aug;4. PubMed PMID: WOS:000223503100001.
22. Liu J, Li Q, Kong L, Yu H, Zheng X. Identifying the true oysters (Bivalvia: Ostreidae) with mitochondrial phylogeny and distance-based DNA barcoding. *Molecular ecology resources.* 2011 Sep;11(5):820-30. PubMed PMID: 21592313.
23. Kurland CG, Andersson SGE. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2000 Dec;64(4):786-+. PubMed PMID: WOS:000167056400007.
24. Ballard JWO, Rand DM. The Population Biology of Mitochondrial DNA and Its Phylogenetic Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics.* 2005;36(1):621-42.
25. Kayal E, Bentlage B, Collins AG, Kayal M, Pirro S, Lavrov DV. Evolution of Linear Mitochondrial Genomes in Medusozoan Cnidarians. *Genome*

- Biology and Evolution. 2012;4(1):1-12. PubMed PMID: WOS:000301979900001.
26. Boore JL. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*. 1999 Apr;27(8):1767-80. PubMed PMID: WOS:000079966900001.
 27. Wolstenholme DR. ANIMAL MITOCHONDRIAL-DNA - STRUCTURE AND EVOLUTION. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology*. 1992;141:173-216. PubMed PMID: WOS:A1992ME11200006.
 28. Kilpert F, Podsiadlowski L. The complete mitochondrial genome of the common sea slater, *Ligia oceanica* (Crustacea, Isopoda) bears a novel gene order and unusual control region features. *BMC Genomics*. 2006;7:241. PubMed PMID: 16987408. Pubmed Central PMCID: 1590035.
 29. Avise JC. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*. 2009;36(1):3-15.
 30. Tavaré S, Balding DJ, Griffiths RC, Donnelly P. Inferring coalescence times from DNA sequence data. *Genetics*. 1997 Feb;145(2):505-18. PubMed PMID: WOS:A1997WM59900026.
 31. Griffiths RC. Coalescent lineage distributions. *Advances in Applied Probability*. 2006 Jun;38(2):405-29. PubMed PMID: WOS:000238756300006.
 32. Rosenberg NA, Nordborg M. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*. 2002 May;3(5):380-90. PubMed PMID: WOS:000175350000015.
 33. Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, et al. Intraspecific Phylogeography - The Mitochondrial-Dna Bridge Between Population-Genetics And Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1987;18:489-522. PubMed PMID: WOS:A1987K958800020.
 34. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*. 2002 Jan;11(1):1-16. PubMed PMID: WOS:000173384800002.
 35. Hauser L, Seeb JE. Advances in molecular technology and their impact in fisheries genetics. *Fish and Fisheries*. 2008;9:473-86.
 36. Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 2002 Feb;11(2):155-65.
 37. Johnson MA, Banks MA. Genetic structure, migration, and patterns of allelic richness among coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) populations of the Oregon coast. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2008 Jul;65(7):1274-85. PubMed PMID: ISI:000257359100004. English.

38. Vaha JP, Erkinaro J, Niemela E, Primmer CR. Life-history and habitat features influence the within-river genetic structure of Atlantic salmon. *Molecular Ecology*. 2007 Jul;16(13):2638-54. PubMed PMID: ISI:000247561800006. English.
39. MacKiewicz M, Fletcher DE, Wilkins SD, DeWoody JA, Avise JC. A genetic assessment of parentage in a natural population of dollar sunfish (*Lepomis marginatus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 2002 Sep;11(9):1877-83.
40. Bekkevold D, Hansen MM, Loeschcke V. Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (*Gadus morhua*, L.). *Molecular Ecology*. 2002 Jan;11(1):91-102.
41. Renshaw MA, Saillant E, Broughton RE, Gold JR. Application of hypervariable genetic markers to forensic identification of 'wild' from hatchery-raised red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Forensic Science International*. 2006 Jan 6;156(1):9-15.
42. Ogden R. Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries*. 2008;9:462-72.
43. Hauser L, Seamons TR, Dauer M, Naish KA, Quinn TP. An empirical verification of population assignment methods by marking and parentage data: hatchery and wild steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) in Forks Creek, Washington, USA. *Molecular Ecology*. 2006;15:3157-73.
44. Hansen MM, Kenchington E, Nielsen EE. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers. *Fish and Fisheries*. 2001;2:93-112.
45. Levinson G, Gutman GA. Slipped-Strand Mismatching - A Major Mechanism For Dna-Sequence Evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 1987 May;4(3):203-21. PubMed PMID: WOS:A1987H523000001.
46. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. 2004 Jun;5(6):435-45. PubMed PMID: 15153996.
47. Weber JL, Wong C. MUTATION OF HUMAN SHORT TANDEM REPEATS. *Human Molecular Genetics*. 1993 Aug;2(8):1123-8. PubMed PMID: WOS:A1993LV83600005.
48. Kayser M, Roewer L, Hedman M, Henke L, Henke J, Brauer S, et al. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *American Journal of Human Genetics*. 2000 May;66(5):1580-8. PubMed PMID: WOS:000088373700012.
49. Weber JL. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 1990;7:524-30.

50. Brinkmann B, Junge A, Meyer E, Wiegand P. Population genetic diversity in relation to microsatellite heterogeneity. *Human Mutation*. 1998;11(2):135-44. PubMed PMID: WOS:000071841800006.
51. Kimura M, Crow JF. Number Of Alleles That Can Be Maintained In Finite Population. *Genetics*. 1964;49(4):725-&. PubMed PMID: WOS:A19641917B00012.
52. Ohta T, Kimura M. Model Of Mutation Appropriate To Estimate Number Of Electrophoretically Detectable Alleles In A Finite Population. *Genetical Research*. 1973;22(2):201-4. PubMed PMID: WOS:A1973S206000008.
53. Nauta MJ, Weissing FJ. Constraints on Allele size at microsatellite loci: Implications for genetic differentiation. *Genetics*. 1996 Jun;143(2):1021-32. PubMed PMID: WOS:A1996UN68400035.
54. Feldman MW, Bergman A, Pollock DD, Goldstein DB. Microsatellite genetic distances with range constraints: Analytic description and problems of estimation. *Genetics*. 1997 Jan;145(1):207-16. PubMed PMID: WOS:A1997WC86800021.
55. Sainudiin R, Durrett RT, Aquadro CF, Nielsen R. Microsatellite mutation models: Insights from a comparison of humans and chimpanzees. *Genetics*. 2004 Sep;168(1):383-95. PubMed PMID: WOS:000224393700030.
56. Slatkin M. A Measure Of Population Subdivision Based On Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics*. 1995 Jan;139(1):457-62. PubMed PMID: WOS:A1995PZ24800039.
57. O Foighil D, Gaffney PM, Wilbur AE, Hilbish TJ. Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Mar Biol*. 1998 Jun;131(3):497-503. PubMed PMID: ISI:000075378700010. English.
58. Lazoski C, Gusmão J, Boudry P, Solé-Cava A. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. *Mar Ecol-Prog Ser*. 2011;426:197-212.
59. Lapegue S, Boutet I, Leita A, Heurtebise S, Garcia P, Thiriot-Quievreux C, et al. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. *Biol Bull*. 2002 Jun;202(3):232-42. PubMed PMID: ISI:000176519800005. English.
60. de Melo AGC, Varela ES, Beasley CR, Schneider H, Sampaio I, Gaffney PM, et al. Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). *Genet Mol Biol*. 2010;33(3):564-72. PubMed PMID: ISI:000281913300029. English.
61. Lazoski C, Gusmão J, Boudry P, Solé-Cava AM. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited

- genetic connectivity and isolation by distance. *Marine Ecology Progress Series*. 2011;426:197-212.
62. Carriker MR, Gaffney PM. A catalogue of selected species of living oysters (Ostreacea) of the world.: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds). 1996.
 63. Lazoski C. Sistemática molecular e genética populacional de ostras brasileiras (*Crassostrea* spp.) [Tese de Doutorado]: Universidade Federal do Rio de Janeiro.; 2004.
 64. Absher TM. Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná - Desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento. . São Paulo: USP; 1989.
 65. Melo CMR, Silva FC, Gomes CHAM, Solé-Cava AM, Lazoski C. *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. *Biol Invasions*. 2010 Mar;12(3):441-9. PubMed PMID: ISI:000274614800005. English.
 66. Nascimento IA. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *C. brasiliana* (Lamarck) in South and Central America.: Menzel RW 1991.
 67. Buroker NE. Population-Genetics Of The American Oyster *Crassostrea virginica* Along The Atlantic Coast And The Gulf Of Mexico. *Marine Biology*. 1983;75(1):99-112. PubMed PMID: WOS:A1983RB71300012.
 68. Day JM, Franklin DE, Brown BL. Use of competitive PCR to detect and quantify *Haplosporidium nelsoni* infection (MSX disease) in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Marine Biotechnology*. 2000 Sep-Oct;2(5):456-65. PubMed PMID: WOS:000090136500007.
 69. Christo SW, Absher TM. Reproductive period of *Crassostrea Rhizophorae* (Guilding, 1828) and *Crassostrea Brasiliana* (Lamark, 1819) (*Bivalvia* : *Ostreidae*) in Guaratuba Bay, Parana, Brazil. *Journal of Coastal Research*. 2006 Win:1215-8. PubMed PMID: WOS:000202961400129.
 70. Galtsoff PS. The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). US Fish and Wildlife Service, Fish Bull. 1964;64: 1-430.
 71. Wakamatsu T. A ostra de Cananéia e o seu cultivo. . SUDELPA, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. 1973:141.
 72. Borges MTM. Sobre a nutrição de Moluscos Bivalves em cultura controlada, com especial referência aos aspectos qualitativos. Portugal: Universidade do Porto; 1989.
 73. Beck MW, Brumbaugh RD, Airolidi L, Carranza A, Coen LD, Crawford C, et al. Oyster Reefs at Risk and Recommendations for Conservation, Restoration, and Management. *BioScience*. 2011;61(2):107-16.

74. Ovenden JR. Mitochondrial-DNA and marine stock assessment - a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. 1990;41(6):835-53. PubMed PMID: ISI:A1990EV48400013. English.
75. Nagaya N, Sasaki K, Fujino K. Biochemical Polymorphism In Pacific Oyster .3. Local Populations In Hokkaido And Northeast Districts Of Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 1978;44(9):1041-5. PubMed PMID: WOS:A1978FS92700018.
76. Buroker NE, Hershberger WK, Chew KK. GENETIC-VARIATION IN PACIFIC OYSTER, CRASSOSTREA-GIGAS. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 1975;32(12):2471-7. PubMed PMID: WOS:A1975BA28300017.
77. Buroker NE, Hershberger WK, Chew KK. Population-Genetics Of The Family Ostreidae .1. Intraspecific Studies Of Crassostrea-Gigas And Saccostrea-Commercialis. *Marine Biology*. 1979;54(2):157-69. PubMed PMID: WOS:A1979HR22200007.
78. Reeb CA, Avise JC. A Genetic Discontinuity in a Continuously Distributed Species - Mitochondrial-DNA in the American Oyster, Crassostrea-Virginica. *Genetics*. 1990 Feb;124(2):397-406. PubMed PMID: ISI:A1990CM17600018. English.
79. Karl SA, Avise JC. Balancing Selection at Allozyme Loci in Oysters - Implications from Nuclear Rflps. *Science*. 1992 Apr 3;256(5053):100-2. PubMed PMID: ISI:A1992HL82200036. English.
80. Gaffney PM, Varney RL, Galindo-Sanchez CE, Cruz P. Population Genetics of the Eastern Oyster Crassostrea Virginica (Gmelin, 1791) in the Gulf of Mexico. *J Shellfish Res*. 2009 Dec;28(4):855-64. PubMed PMID: ISI:000273446900015. English.
81. Avise JC, Reeb CA, Saunders NC. Geographic Population-Structure and Species-Differences in Mitochondrial-DNA of Mouthbrooding Marine Catfishes (Ariidae) and Demersal Spawning Toadfishes (Batrachoididae). *Evolution*. 1987 Sep;41(5):991-1002. PubMed PMID: ISI:A1987K176000005. English.
82. Saunders NC, Kessler LG, Avise JC. Genetic-Variation and Geographic Differentiation in Mitochondrial-DNA of the Horseshoe-Crab, Limulus-Polyphemus. *Genetics*. 1986 Mar;112(3):613-27. PubMed PMID: ISI:A1986A108400014. English.
83. Yu H, Li Q. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster Crassostrea gigas assessed by microsatellite markers. *J Genet Genomics*. 2007 Dec;34(12):1114-22. PubMed PMID: 18155624. Epub 2007/12/25. eng.
84. Appleyard SA, Ward RD. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (Crassostrea gigas). *Aquaculture*. 2006 Apr;254(1-4):148-59. PubMed PMID: WOS:000237838800018.

85. Yu H, Li Q, Yu R. Genetic differentiation between Zhe oyster *Crassostrea plicatula* and Pacific oyster *Crassostrea gigas* populations in China assessed by microsatellite analysis. *Fisheries Science*. 2008;74:88-97.
86. Yu H, Li Q, Yu R. Microsatellite variation in the oyster *Crassostrea plicatula* along the coast of China. *Journal of Ocean Univ Chin*. 2008;7(4):432-8.
87. Xiao J, Cordes J, Wang H, Guo X, Reece KS. Population genetics of *Crassostrea ariakensis* in Asia inferred from microsatellite markers. *Mar Biol*. 2010;157(8):1767-81.
88. Wang H, Guo X, Zhang G, Zhang F. Classification of jinjiang oysters *Crassostrea rivularis* (Gould, 1861) from China, based on morphology and phylogenetic analysis. *Aquaculture*. 2004;242(137-155).
89. Perez-Enriquez R, Avila S, Ibarra AM. Population genetics of the oyster *Crassostrea corteziensis* in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*. 2008 Dec;34(4):479-90. PubMed PMID: WOS:000262591300007.
90. Rudorff CAG, Lorenzetti JA, Gherardi DFM, Lins-Oliveira JE. Modeling spiny lobster larval dispersion in the Tropical Atlantic. *Fish Res*. 2008;96:206–15.
91. Lapègue S, Boutet I, Leitão A, Heurtebise S, Garcia P, Thiriot-Quiévreux C, et al. Trans-Atlantic distribution of mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. *Biological Bulletin*. 2002;202:232-42.
92. Lessios HA, Kessing BD, Robertson DR, Paulay G. Phylogeography of the pantropical sea urchin *Eucidaris* in relation to land barriers and ocean currents. *Evolution*. 1999 Jun;53(3):806-17. PubMed PMID: ISI:000081507300014. English.
93. Damato ME, Corach D. Genetic diversity of populations of the freshwater shrimp *Macrobrachium borellii* (Caridea: Palaemonidae) evaluated by RAPD analysis. *J Crustac Biol*. 1996 Nov;16(4):650-5. PubMed PMID: ISI:A1996VR91200002. English.
94. Gusmão J, Solé-Cava A. Um sistema de diagnóstico molecular para a identificação de espécies comerciais de camarões marinhos brasileiros. CIVA 2002: Comunicaciones y Foros de Discusión Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura Zaragoza. 2002:754-64.
95. Milbury CA, Gaffney PM. Complete mitochondrial DNA sequence of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Biotechnol*. 2005 Dec;7(6):697-712. PubMed PMID: ISI:000233548000014. English.
96. Yu H, Li Q. Mutation and Selection on the Wobble Nucleotide in tRNA Anticodons in Marine Bivalve Mitochondrial Genomes. *Plos One*. 2011 Jan 18;6(1):- . PubMed PMID: ISI:000286519500042. English.

97. Wu XY, Xu XD, Yu ZN, Wei ZP, Xia JJ. Comparison of seven *Crassostrea* mitogenomes and phylogenetic analyses. *Mol Phylogenet Evol*. 2010 Oct;57(1):448-54. PubMed PMID: ISI:000281992900038. English.
98. Ren JF, Liu X, Zhang GF, Liu B, Guo XM. "Tandem duplication-random loss" is not a real feature of oyster mitochondrial genomes. *BMC Genomics*. 2009 Feb 19;10:-. PubMed PMID: ISI:000264124200002. English.
99. Ren JF, Liu XA, Jiang F, Guo XM, Liu B. Unusual conservation of mitochondrial gene order in *Crassostrea* oysters: evidence for recent speciation in Asia. *Bmc Evol Biol*. 2010 Dec 28;10:-. PubMed PMID: ISI:000287579600001. English.
100. Wu X, Li X, Li L, Xu X, Xia J, Yu Z. New features of Asian *Crassostrea* oyster mitochondrial genomes: a novel alloacceptor tRNA gene recruitment and two novel ORFs. *Gene*. 2012 Oct 10;507(2):112-8. PubMed PMID: 22846367.
101. Kessing B, Croom H, Martin A, McIntosh C, Owen M, Palumbi S. The simple fool's guide to PCR. University of Hawaii, Havaí 1989.
102. Pie MR, Ribeiro RO, Boeger WA, Ostrensky A, Falleiros RM, Angelo L. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliensis*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; *Bivalvia* : *Ostreidae*) cultured in Southern Brazil. *Aquac Res*. 2006 Nov 15;37(15):1598-600. PubMed PMID: ISI:000241763000014. English.
103. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011 Oct;28(10):2731-9. PubMed PMID: WOS:000295184200003.
104. Wright S. The Interpretation Of Population-Structure By F-Statistics With Special Regard To Systems Of Mating. *Evolution*. 1965;19(3):395-420. PubMed PMID: WOS:A1965CLA4300012.
105. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform*. 2005;1:47-50. PubMed PMID: ISI:000207065900004. English.
106. Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*. 2002 Dec;11(12):2571-81. PubMed PMID: WOS:000179492800010.
107. Tajima F. Statistical-Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*. 1989 Nov;123(3):585-95. PubMed PMID: ISI:A1989AX26700018. English.
108. Tajima F. The Effect of Change in Population-Size on DNA Polymorphism. *Genetics*. 1989 Nov;123(3):597-601. PubMed PMID: ISI:A1989AX26700019. English.

109. Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997 Oct;147(2):915-25. PubMed PMID: WOS:A1997XY91900047.
110. Rogers AR, Harpending H. Population-Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic-Differences. *Molecular Biology and Evolution*. 1992 May;9(3):552-69. PubMed PMID: ISI:A1992HP20200014. English.
111. Pybus OG, Rambaut A, Harvey PH. An integrated framework for the inference of viral population history from reconstructed genealogies. *Genetics*. 2000 Jul;155(3):1429-37. PubMed PMID: WOS:000088056800038.
112. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 2005 May;22(5):1185-92. PubMed PMID: WOS:000228700200004.
113. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. 2012 Aug;29(8):1969-73. PubMed PMID: WOS:000307171300008.
114. Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 1999 Jan;16(1):37-48. PubMed PMID: ISI:000077903600005. English.
115. Teacher AGF, Griffiths DJ. HapStar: automated haplotype network layout and visualization. *Molecular ecology resources*. 2011 Jan;11(1):151-3. PubMed PMID: WOS:000285249800019.
116. Rousset F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*. 1997 Apr;145(4):1219-28. PubMed PMID: WOS:A1997WQ56200030.
117. Saitou N, Nei M. The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987 Jul;4(4):406-25. PubMed PMID: ISI:A1987J406700007. English.
118. Bloor PA, Barker FS, Watts PC, Noyes HA, Kemp SJ. Microsatellite Libraries by Enrichment. <http://www.genomicsliv.ac.uk/animal/MICROSATPDF>. 2001.
119. Martins WS, Lucas DCS, Neves KFdS, Bertoli DJ. WebSat--a web software for microsatellite marker development. *Bioinformatics*. 2009 2009;3(6):282-3. PubMed PMID: MEDLINE:19255650.
120. Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*. 2000 Feb;18(2):233-4. PubMed PMID: WOS:000085146900036.
121. Melo MAD, Silva ARB, Varela ES, Sampaio I, Tagliaro CH. Development and characterization of ten microsatellite markers for population studies

- of the native Brazilian oyster *Crassostrea gasar*. *Conservation Genetics Resources*. 2012;4(3):583-6.
122. Amos W, Hoffman JI, Frodsham A, Zhang L, Best S, Hill AVS. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes*. 2006;7(1):10-4.
 123. Rosenblum BB, Oaks F, Menchen S, Johnson B. Improved single-strand DNA sizing accuracy in capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Research*. 1997 Oct;25(19):3925-9. PubMed PMID: WOS:A1997XZ39800025.
 124. Wenz HM, Robertson JM, Menchen S, Oaks F, Demorest DM, Scheibler D, et al. High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis. *Genome Research*. 1998 Jan;8(1):69-80. PubMed PMID: WOS:000071807000009.
 125. Bruland O, Almqvist EW, Goldberg YP, Boman H, Hayden MR, Knappskog PM. Accurate determination of the number of CAG repeats in the Huntington disease gene using a sequence-specific internal DNA standard. *Clinical Genetics*. 1999 Mar;55(3):198-202. PubMed PMID: WOS:000079876100010.
 126. Coombs JA, Letcher BH, Nislow KH. CREATE: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Molecular ecology resources*. 2008 May;8(3):578-80. PubMed PMID: WOS:000254810300014.
 127. Goudet J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em: <http://www2.unilch/popgen/software/fstat.htm>. 2001.
 128. Miller CR, Waits LP. The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): Implications for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Apr 1;100(7):4334-9. PubMed PMID: WOS:000182058400142.
 129. Wattier R, Engel CR, Saumitou-Laprade P, Valero M. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*. 1998 Nov;7(11):1569-73. PubMed PMID: WOS:000076933000014.
 130. Shinde D, Lai YL, Sun FZ, Arnheim N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. *Nucleic Acids Research*. 2003 Feb 1;31(3):974-80. PubMed PMID: WOS:000181114500025.
 131. Shaw PW, Pierce GJ, Boyle PR. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*. 1999 Mar;8(3):407-17. PubMed PMID: WOS:000079637800006.

132. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004 Sep;4(3):535-8. PubMed PMID: WOS:000223649300069.
133. Balloux F, Goudet J. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. *Molecular Ecology*. 2002 Apr;11(4):771-83. PubMed PMID: WOS:000175250300011.
134. Hardy OJ, Charbonnel N, Freville H, Heuertz M. Microsatellite allele sizes: A simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics*. 2003 Apr;163(4):1467-82. PubMed PMID: WOS:000182517900021.
135. Jost L. $G'(ST)$ and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*. 2008 Sep;17(18):4015-26. PubMed PMID: WOS:000259152900005.
136. Whitlock MC. $G'(ST)$ and D do not replace F_{ST} . *Molecular Ecology*. 2011 Mar;20(6):1083-91. PubMed PMID: WOS:000288074600003.
137. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000 Jun;155(2):945-59. PubMed PMID: WOS:000087475100039.
138. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005 Jul;14(8):2611-20. PubMed PMID: WOS:000229961500029.
139. Earl DA, vonHoldt BM. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 2012 Jun;4(2):359-61. PubMed PMID: WOS:000303536400036.
140. Escofier B, Pagès J. Multiple factor analysis. . *Computational Statistics & Data Analysis*. 1990;18: 121–40.
141. Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. GENETIX 4.04, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. 2002;Université de Montpellier II, Montpellier (France).
142. Schenekar T, Weiss S. High rate of calculation errors in mismatch distribution analysis results in numerous false inferences of biological importance. *Heredity (Edinb)*. 2011 Dec;107(6):511-2. PubMed PMID: 21731052. Pubmed Central PMCID: 3242633.
143. Crandall ED, Sbrocco EJ, DeBoer TS, Barber PH, Carpenter KE. Expansion Dating: Calibrating Molecular Clocks in Marine Species from Expansions onto the Sunda Shelf Following the Last Glacial Maximum.

- Molecular Biology and Evolution. 2012 Feb;29(2):707-19. PubMed PMID: WOS:000299129000020.
144. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987;325 31 - 6.
 145. Van Oosterhout C, Weetman D, Hutchinson WF. Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6(1):255-6.
 146. Meirmans PG. AMOVA-based clustering of population genetic data. *The Journal of heredity*. 2012 Sep-Oct;103(5):744-50. PubMed PMID: 22896561.
 147. Reece KS, Ribeiro WL, Gaffney PM, Carnegie RB, Allen SK. Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios. *Journal of Heredity*. 2004;95(4):346-52. PubMed PMID: WOS:000222729700010.
 148. McInerney CE, Allcock AL, Johnson MP, Bailie DA, Prodohl PA. Comparative genomic analysis reveals species-dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in molluscs. *Heredity (Edinb)*. 2011 Jan;106(1):78-87. PubMed PMID: 20424639. Pubmed Central PMCID: 3183849.
 149. Gaffney PM, Pierce JC, Mackinley AG, Titchen DA, Glenn WK. Pearl, a novel family of putative transposable elements in bivalve mollusks. *Journal of Molecular Evolution*. 2003 Mar;56(3):308-16. PubMed PMID: WOS:000181329500007.
 150. Zhang G, Fang X, Guo X, Li L, Luo R, Xu F, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):49-54. PubMed PMID: 22992520.
 151. Zulliger DE, Tanner S, Ruch M, Ribi G. Genetic structure of the high dispersal Atlanto-Mediterranean sea star *Astropecten aranciatus* revealed by mitochondrial DNA sequences and microsatellite loci. *Marine Biology*. 2009 Mar;156(4):597-610. PubMed PMID: WOS:000263380800007.
 152. Karl SA, Toonen RJ, Grant WS, Bowen BW. Common misconceptions in molecular ecology: echoes of the modern synthesis. *Molecular Ecology*. 2012 Sep;21(17):4171-89. PubMed PMID: WOS:000308047100005.
 153. Nei M. *Molecular population genetics and evolution*. Nova Iorque.: American-Elsevier; 1975.
 154. Greenwood JC. Barian-titanian micas from Ilha da Trindade, South Atlantic. *Mineralogical Magazine*. 1998 Oct;62(5):687-95. PubMed PMID: WOS:000076763300010.

155. Almeida FFM. As ilhas oceânicas brasileiras e uma hipótese sobre a origem do Atlântico. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 1965;37:141–5.
156. Gasparini JL, Floeter SR. The shore fishes of Trindade Island, western south Atlantic. *Journal of Natural History*. 2001 Nov;35(11):1639-56. PubMed PMID: WOS:000171985800005.
157. Coelho-Souza SA, Lopez MS, Guimaraes JRD, Coutinho R, Candella RN. Biophysical Interactions In The Cabo Frio Upwelling System, Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*. 2012 Jul-Sep;60(3):353-65. PubMed PMID: WOS:000310536600008.
158. Yokoyama Y, Lambeck K, De Decker P, Johnston P, Fifield LK. Timing of the Last Glacial Maximum from observed sea-level minima. *Nature*. 2000;406:713-6.
159. Mix AC, Bard E, Schneider R. Environmental processes of the ice age: land, oceans, glaciers (EPILOG). *Quaternary Science Reviews*. 2001 Feb;20(4):627-57. PubMed PMID: WOS:000167169100004.
160. CLIMAP. Seasonal reconstruction of the Earth's surface at the last glacial maximum. Geological Society of America, Map and Chart Series. 1981:1-18.
161. Heads M. Towards a panbiogeography of the seas. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2005 Apr;84(4):675-723. PubMed PMID: WOS:000228433300001. English.
162. Marko PB. Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the Isthmus of Panama. *Molecular Biology and Evolution*. 2002 Nov;19(11):2005-21. PubMed PMID: WOS:000179367200018.
163. De Deckker P, Tapper NJ, van der Kaars S. The status of the Indo-Pacific Warm Pool and adjacent land at the Last Glacial Maximum. *Global and Planetary Change*. 2003 Jan;35(1-2):25-35. PubMed PMID: WOS:000179712400002.
164. Fagel N, Innocent C, Stevenson RK, Hillaire-Marcel C. Deep circulation changes in the Labrador sea since the last glacial maximum: New constraints from Sm-Nd data on sediments. *Paleoceanography*. 1999 Dec;14(6):777-88. PubMed PMID: WOS:000084268100012.
165. Coimbra JC, Carreno AL. Richness And Palaeo-Zoogeographical Significance Of The Benthic Ostracoda (Crustacea) From The Oceanic Island Of Trindade And Rocas Atoll, Brazil. *Revista Brasileira De Paleontologia*. 2012 May-Aug;15(2):189-202. PubMed PMID: WOS:000309308800007. English.
166. Nagai RH, Mello e Sousa SH, Lourenço RA, Bicego MC, Mahiques MM. Paleoproductivity Changes During The Late Quaternary In The

Southeastern Brazilian Upper Continental Margin Of The Southwestern Atlantic. *Brazilian Journal Of Oceanography*. 2010;58:31-41.

167. Wainer I, Taschetto AS. Diagnostico para os períodos relativos aos levantamentos pesqueiros do Programa REVIZEE. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 2006.
168. Adams RI, Hadly EA. Genetic diversity within vertebrate species is greater at lower latitudes. *Evolutionary Ecology*. 2013 Jan;27(1):133-43. PubMed PMID: WOS:000312876500010.
169. Cunha HA. Sistemática molecular e filogeografia do gênero *Sotalia* (Delphinidae) no Brasil. Rio de Janeiro: UFRJ; 2007.
170. Dean W. A Botânica e a Política Imperial: Introdução e Adaptação de Plantas no Brasil Colonial e Imperial. *Revista Estudos Históricos*. 1991;4(8).
171. Sanjad NR. Nos jardins de São José: uma história do Jardim Botânico do Grão-Pará (1796-1873). Campinas, SP: Unicamp; 2001.
172. Granziera MLM, Gonçalves A. Os problemas da zona costeira no Brasil e no mundo. Santos: Editora Universtária Leopoldianum; 2012.
173. Ray GL. Invasive Animal Species in Marine and Estuarine Environments: Biology and Ecology. Aquatic Nuisance Species Research Program. 2005.
174. Ruesink JL, Lenihan HS, Trimble AC, Heiman KW, Micheli F, Byers JE, et al. Introduction of non-native oysters: Ecosystem Effects and Restoration Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2005;36(1):643-89.
175. Orensanz JM, Schwindt E, Pastorino G, Bortolus A, Casas G, Darrigran G, et al. No longer the pristine confines of the world ocean: a survey of exotic marine species in southwest atlantic. *Biological Invasions*. 2002;4:115 - 43.
176. Escapa M, Isacch JP, Daleo P, Alberti J, Iribarne O, Borges M, et al. The distribution and acological effects of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in Northern Patagonia. *Journal of Shellfish Research*. 2004;23(3):765-72.
177. Penchaszadeh PE. Invasores: invertebrados exóticos en el Río de la Plata y región marina aledaña. Buenos Aires: Eudeb; 2005. 384 p.
178. McKindsey CW, Landry T, O'Beirn FX, Davies IN. Bivalve aquaculture and exotic species: a review of ecological considerations and management issues. *Journal of Shellfish Research*. 2007;26(2):281-94.
179. Mineur F, Belsher T, Johnson MP, Maggs CA, Verlaque M. Experimental assessment of oyster transfers as a vector for macroalgal introductions. *Biological Conservation*. 2007;137(2):237-47.

180. Krassoi FR, Brown KR, Bishop MJ, Kelaher BP, Summerhayes S. Condition-specific competition allows coexistence of competitively superior exotic oysters with native oysters. *The Journal of animal ecology*. 2008 Jan;77(1):5-15. PubMed PMID: 18177325.
181. Breves-Ramos A, Junqueira AOR, Lavrado HP, Silva SHG, Ferreira-Silva MAG. Population structure of the invasive bivalve *Isognomon bicolor* on rocky shores of Rio de Janeiro State (Brazil). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2010;90(03):453.
182. Martinez AS. Spatial distribution of the invasive bivalve *Isognomon bicolor* on rocky shores of Arvoredo Island (Santa Catarina, Brazil). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2011;92(03):495-503.
183. Pastorino G, Darrigran G, Martin SM, Lunaschi L. *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. . *Neotropica*. 1993;39:34.
184. Zhan A, Perepelizin PV, Ghabooli S, Paolucci E, Sylvester F, Sardiña P, et al. Scale-dependent post-establishment spread and genetic diversity in an invading mollusc in South America. *Diversity and Distributions*. 2012;18(10):1042-55.
185. Varela ES, Beasley CR, Schneider H, Sampaio I, Marques-Silva NDS, Tagliaro CH. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. *J Mollus Stud*. 2007;73(3):229-34.
186. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*. 2011 Oct;28(10):2731-9. PubMed PMID: 21546353. Pubmed Central PMCID: 3203626.
187. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 2009;25:1451-2
188. Kimura M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 1980;16:111-20.
189. Tavaré S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences, American Mathematical Society*. 1986;17:57–86.
190. Hasegawa M, Kishino H, Yano TA. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 1985;22(2):160-74.
191. Galvão MSN, Pereira OM, Hilsdorf AWS. Molecular identification and distribution of mangrove oysters (*Crassostrea*) in an estuarine ecosystem in Southeast Brazil: implications for aquaculture and fisheries management. *Aquac Res*. 2012:1 - 13.

192. Branch GM, Steffani CN. Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2004;300:189-215.
193. Laikre L, Palm S, Ryman N. Genetic population structure of fishes: Implications for coastal zone management. *Ambio*. 2005 Mar;34(2):111-9. PubMed PMID: WOS:000228090700008.
194. Csillery K, Blum MGB, Gaggiotti OE, Francois O. Approximate Bayesian Computation (ABC) in practice. *Trends Ecol Evol*. 2010 Jul;25(7):410-8. PubMed PMID: ISI:000279531700007. English.

APÊNDICE - Manuscrito submetido a Molecular Biology Reports - Polymorphic microsatellite loci for two Atlantic oyster species: *Crassostrea rhizophorae* and *C. gasar*

Polymorphic microsatellite loci for two Atlantic oyster species: *Crassostrea rhizophorae* and *C. gasar*

Nathalia P. Cavaleiro^{1,2}, Antonio M. Solé-Cava¹, Cristiano Lazoski¹, Haydée A. Cunha^{1,3}

¹Laboratório de Biodiversidade Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, UFRJ, 21941-590, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA), Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding author: Nathalia P. Cavaleiro, Email: npcavaleiro@gmail.com, Tel: +55 21 2562-6389, Fax: +55 21 2562-6333

Abstract

Using a CA / CAA enriched library screening procedure, we isolated and characterised a total of seventeen polymorphic microsatellite *loci* for two species of *Crassostrea* with recognised economic importance. Eleven microsatellite *loci* were developed for *C. rhizophorae*, a Western Atlantic species for which no microsatellites were previously known. Another six *loci*

were developed for *C. gasar*, a species that occurs on both sides of the South Atlantic, adding to the ten loci previously described for the species. The levels of polymorphism were estimated using 24 *C. rhizophorae* from Southeast Brazil (São Paulo) and 23 *C. gasar* individuals from North Brazil (Maranhão). The number of alleles per polymorphic *locus* varied from 3 to 27, and the observed and expected heterozygosities ranged between 0.174 and 0.958 and between 0.237 and 0.972 in *C. rhizophorae* and *C. gasar*, respectively. No linkage disequilibrium was found between any *locus* pair, and four of them exhibited deviations from Hardy-Weinberg expectations. Of the seventeen *loci* developed, eight cross-amplified in *C. gigas* and thirteen in *C. virginica*. These markers are useful for evolution and population genetics studies of *Crassostrea* species and may provide fundamental data for the future cultivation of native oysters in Western Atlantic.

Keywords: SSR, population structure, stock, aquaculture, mollusc

Introduction

Crassostrea species are responsible for almost all of the worldwide oyster production [1]. Oyster production in the South Atlantic is dominated by three species: the native *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757; sin. *C. brasiliiana*, [2]) and *C. rhizophorae* (Guilding, 1828), which are extracted from natural banks, and the cultivated *C. gigas* (Thunberg, 1793), responsible for 91% of the total Brazilian oyster production [3] and recently becoming invasive in natural banks [4]. Native oyster species have a wide distribution along the Atlantic coast of Latin America and Africa [5], but their cultivation is hampered by the uncertainty about the existing stocks and their limits. To date, the few studies that have analysed the genetic structure of *C. gasar* and *C. rhizophorae* used mitochondrial (cytochrome oxidase I) and allozyme markers [2, 4, 6]. Recently, ten microsatellite *loci* were developed for *C. gasar* [7] and will allow new genetic structuring studies with more polymorphic markers. In contrast, microsatellite *loci* for *C. rhizophorae* are still lacking.

According to Beck et al. [8], over one hundred years of intense and unregulated exploitation has eliminated more than 99% of the oyster reefs of many bays around the world, and thus, the worldwide oyster populations can be considered functionally extinct. In some cases, oyster populations have vanished altogether, such as for *C. rhizophorae*, which has not been found in Ciénaga Grande de Santa Marta (Colombia) since 1996, most likely due to the combined effects of uncontrolled extraction and alterations in freshwater flow [9]. Aquaculture is accepted as an alternative to this uncontrolled oyster extraction; however, to avoid the risks of outbreeding depression and loss of locally adapted gene traits, it relies on knowledge of the number and limits of genetic stocks. This knowledge can be greatly improved by population genetics

studies based on highly polymorphic *loci*. Here, we describe the isolation and characterisation of microsatellite *loci* for *C. gasar* and *C. rhizophorae* and test their cross amplification in the cultivated *C. gigas* and the native *C. virginica* (Gmelin, 1791).

Material and Methods

DNA was extracted from the adductor muscle according to the modified cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol, as previously described [10]. Microsatellite DNA was isolated from an enriched partial genomic library following the protocol of Bloor et al. [11]. A pool of high-quality genomic DNA from four individuals (10 µg) was digested with *Sau*III and ligated to phosphorylated double-stranded linkers; the fragments (between 500 and 1,000 bp) were excised from a 2% agarose gel. The DNA fragments were hybridised with biotinylated (CA)₁₂ and (CAA)₈ probes and isolated using streptavidin-coated magnetic beads. A PCR primed with the forward linker oligonucleotide was used for enrichment of the DNA containing microsatellites. The enriched fragments were cloned using the pGEM-T vector (Promega) for posterior insertion in One Shot TOP10 competent cells (Invitrogen). White colonies were selected during screening on S-gal (Sigma)/agar/ampicillin plates. The presence of a microsatellite insert was confirmed by two or more PCR products after amplification using the forward linker oligonucleotide and (non-biotinylated) microsatellite oligonucleotides as primers. Forty-eight positive clones from each species were sequenced in both directions using an ABI3500 automated sequencer (Applied Biosystems). The sequences were edited using SEQMAN (Lasergene Inc.). Nineteen and forty-seven sequences from *C. gasar* and *C. rhizophorae*, respectively, were selected for the design of primer pairs flanking

the microsatellite regions using WEBSAT [12]. Primers were initially screened for quality of PCR amplification on a Veriti® Cyclor (Applied Biosystems), using eight individuals of each species. Those primers that did not amplify, or that produced multiple bands on high-resolution agarose gels were discarded. The twenty-two *loci* selected were tested for polymorphism through genotyping on an ABI3500 automated sequencer using the tailed primer method [13], whereby all the forward primers were synthesised with a M13 tail at their 5' end to which oligonucleotides labelled with different dyes (6-FAM, VIC, NED, or PET) could anneal. The best annealing temperature (T_a) for each set of primers was estimated in a 54 to 64 °C temperature gradient PCR. Subsequently, thermocycling was performed using an initial denaturing at 94 °C for 3 min, 30 cycles of 45 sec at 93 °C, 45 sec at the specific T_a , and 1 min at 72 °C, followed by 8 cycles identical to the 30 initial cycles but with the T_a fixed at 53 °C (as in [13]). The cycling was finalised with a 15 min extension at 72 °C. The PCR reactions included 20 ng template DNA, 1 U GoTaq® DNA Polymerase (Promega), 200 µM dNTPs, 0.2 µM tailed forward primer, 0.4 µM labelled primer, 0.8 µM reverse primer, 2.5 mM MgCl₂, and 15 µg BSA in a 15 µL total volume. The PCR products were pooled with a GSLIZ-600 size standard (Applied Biosystems) and were denatured in formamide prior to capillary electrophoresis. Allele sizing and genotype confirmation were performed using the GENEMARKER 1.97 programme (SoftGenetics - free trial version). After the analyses, five monomorphic *loci* were discarded, so seventeen polymorphic *loci* (six for *C. gasar* and eleven for *C. rhizophorae*) were selected. Binning of the alleles was performed using FLEXIBIN software [14]. The number of alleles was determined, and tests of linkage disequilibria were performed using FSTAT [15]. The observed and expected heterozygosities and tests of Hardy-Weinberg

equilibrium were calculated using ARLEQUIN 3.5 [16]. The presence of null alleles was investigated with the MICRO-CHECKER programme [17].

Results and discussion

Twenty-four individuals of *C. rhizophorae*, from Southeast Brazil (São Paulo: 25°01'S, 47°55'W) and 23 individuals of *C. gasar* from North Brazil (Maranhão: 02°41'S, 41°58'W) were genotyped. Linkage disequilibrium was not found for any pair of *loci* after Bonferroni correction for either species, but four *loci* (GASA5, RHIZ7, RHIZ12, and RHIZ18) exhibited significant heterozygote deficiencies, possibly due to the presence of null alleles (Table 1). A high frequency of null alleles has been previously verified for microsatellite markers in molluscs [18]. The analysed *loci* demonstrated high polymorphism, ranging from 5 to 27 alleles, and the observed and expected heterozygosities ranged between 0.609 to 0.958 and 0.582 to 0.972 in *C. rhizophorae* and *C. gasar*, respectively (Table 1). An exception was GASA15, which had only three alleles and observed and expected heterozygosities of 0.174 and 0.237, respectively.

Cross-amplification was tested for all the *loci* in two other species of *Crassostrea*: *C. virginica* and *C. gigas*. Seven *C. virginica* individuals from Panamá (8°58'N, 79°31'W) and eight *C. gigas* individuals from an oyster farm in South Brazil (Santa Catarina: 26°15'S, 48°41'W) were analysed. Eleven *loci* amplified well for *C. virginica*, while just two *loci* worked for *C. gigas*. No pairwise linkage disequilibrium was found between *loci* of either species, nor did they present any significant deviations (after Bonferroni correction) from Hardy-Weinberg equilibrium. Values of annealing temperature, heterozygosity and number of alleles for cross-amplification are shown in Table 2. All *loci* exhibited

high levels of polymorphism, except for RHIZ8 in *C. virginica* ($H = 0.14$). Surprisingly, none of the *loci* from *C. rhizophorae* could be used in *C. gasar* and vice-versa: some heterologous *loci* did amplify between the two species, but they did not pass the stringent conditions set for the selection of *loci* for the two species that were the main objective of this work.

The new markers developed here will be useful for population and aquaculture studies. More specifically, they will help with the delimitation of the genetic stocks along the coast, which will provide critical information for the cultivation of native species, contributing both to their protection and to habitat restoration.

Acknowledgments

We would like to thank AV Vasconcellos and G Rodriguez-Rey for assistance during the microsatellite development process. This work is part of the PhD thesis of Nathalia Cavaleiro at the Universidade do Estado do Rio de Janeiro, with scholarships from Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and was supported by grants from the Brazilian Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI; CT-AGRO/CT-HIDRO), CNPq, CAPES, and Agência Brasileira da Inovação (FINEP).

References

1. FAO (2012) Fishstat Plus 2.30: Universal software for fishery statistical time series. Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit, Rome
2. Lazoski C, Gusmão J, Boudry P, Solé-Cava AM (2011) Phylogeny and

- phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. *Mar Ecol Prog Ser* 426:197-212
3. Oliveira Neto FM (2008) Síntese informativa da produção de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras) comercializados em 2007 no Estado de Santa Catarina. <http://www.epagri.rct-sc.br>
 4. Melo CMR, Silva FC, Gomes CHAM, Solé-Cava AM, Lazoski C (2010) *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. *Biol Invasions* 12:441-449
 5. Lapègue S, Boutet I, Leitão A, Heurtebise S, Garcia P, Thiriot-Quiévreux C, Boudry P (2002) Trans-Atlantic distribution of mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. *Biol Bull* 202:232-242
 6. Ignacio BL, Absher TM, Lazoski C, Solé-Cava AM (2000) Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. *Mar Biol* 136:987-991
 7. Melo MAD, Silva ARB, Varela ES, Sampaio I, Tagliaro CH (2012) Development and characterization of ten microsatellite markers for population studies of the native Brazilian oyster *Crassostrea gasar*. *Cons Gen Resour* 4:583-586
 8. Beck MW, Brumbaugh RD, Airoidi L, Carranza A, Coen LD, Crawford C, Defeo O, Edgar GJ, Hancock B, Kay MC, Lenihan HS, Luckenbach MW, Toropova CL, Zhang G, Guo X (2011) Oyster reefs at risk and recommendations for conservation, restoration, and management. *Bioscience* 61:107-116
 9. Valero AL, Caballero YQ (2003) A practitioner's guide for the culture of marine bivalves in the Colombian Caribbean Sea: pearly oysters, oysters and scallops. *Serie de Documentos Generales Invemar, Cargraphics, Bogota*
 10. Gusmão J, Solé-Cava AM (2002) Um sistema de diagnóstico molecular para a identificação de espécies comerciais de camarões marinhos brasileiros. In: CIVA 2002: Comunicaciones y Foros de Discusión Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, Zaragoza, pp 754-764
 11. Bloor PA, Barker FS, Watts PC, Noyes HA, Kemp SJ (2001) Microsatellite Libraries by Enrichment. <http://www.genomics.liv.ac.uk/animal/MICROSAT.PDF>

12. Martins WS, Lucas DCS, Neves KFS, Bertoli DJ (2009) WebSat - a web software for microsatellite marker development. *Bioinformation* 3:282-283
13. Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233-234
14. Amos W, Hoffman JI, Frodsham A, Zhang L, Best S, Hill AVS (2006) Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Mol Ecol Notes* 7:10-14
15. Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 86:485-486
16. Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564-567
17. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535-538
18. McInerney CE, Allcock AL, Johnson MP, Bailie DA, Prodöhl PA (2011) Comparative genomic analysis reveals species-dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in molluscs. *Heredity* 106:78-87

Table 1. Microsatellite *loci* developed for *Crassostrea gasar* and *C. rhizophorae*. *Ta*: annealing temperature; *Na*: number of observed alleles; *H_o*: observed heterozygosity; *H_e*: expected heterozygosity; *Null freq*: null allele frequency. **P* < 0.05, for tests of Hardy-Weinberg (HW) equilibrium after Bonferroni correction.

Primer (5'-3')	GenBank Accession n°.	Motif	<i>Ta</i> (°C)	Size range (bp)	<i>Na</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	P-value (HW)	Null freq.
GASA5 CTTGTAGAATGAGCTTGGCCTT GATCTGAGTGTCTGTGAG	KC335527	(GT)17	54	216-240	7	0.435	$\frac{0.75}{5}$	0.00030*	0.200
GASA6 TTCTTTTCAACGAATTGAATCC GACCTTTTCTGAACCAAACACA	KC335530	(GTT)57	54	156-261	10	0.609	$\frac{0.78}{2}$	0.11901	0.093
GASA9 TGTTAGGTTTGTAGGTGTACTG GACGTGGTCTACTGTCTGAG	KC335528	(GTT)10	54	329-350	5	0.652	$\frac{0.58}{2}$	0.95081	0
GASA11 GGCTCGACATTTTCTATTCCAG AAAGTCTAATCACGGTCAACCC	KC335531	(CT)32	60	235-305	19	0.826	$\frac{0.90}{2}$	0.16830	0.030
GASA15 ACAACATTGGTCTTTTGTGGCT AGCGAGTGTTTGTAAAGGAGGAG	KC335529	(ACA)4	60	276-300	3	0.174	$\frac{0.23}{7}$	0.31082	0.095
GASA25 GGGGTGGGGTAGACAATTAAC CAATTCCTTTTGTGTGTTGC	KC335532	(CAA)4CATCAT(CAA)7	60	157-310	16	0.783	$\frac{0.82}{9}$	0.57381	0.010
RHIZ3 TACATGAAGCAACACCCTTGTG CGGCACTTCTTATGCCCTATAC	KC335533	(TG)14	62	135-191	12	0.833	$\frac{0.88}{1}$	0.23220	0.017
RHIZ7 ATATTTGTCATCACCGAGCAGG CTGAATGTCCATAGCATACCAGAA	KC335534	(TG)25	64	310-362	13	0.667	$\frac{0.89}{0}$	0.00075*	0.112
RHIZ8 TGGGCTTAAATTGATAAGACGG CTTGTGCTGTATGGGTTTTCGT	KC335535	(CA)21	60	223-293	19	0.833	$\frac{0.93}{3}$	0.25509	0.017
RHIZ11 GATTACAAAGGGGTAACAAGACAG TCAAGTGAAGAACAGTTCGCTC	KC335543	(TTG)12(GTT)11	54	163-223	15	0.875	$\frac{0.93}{0}$	0.37966	0.019
RHIZ12 TCGGTAGGTCAAAACCTTCAGT	KC335541	(CA)22	58	294-378	25	0.583	0.97	0.00000*	0.019

	TTACACGCTCCCAAATGTTGT							2			
RHIZ13	ATGGTAGTGAGAGCCACCAATC CATCCAGACCTCAATGTTACGA	KC335539	(TG)6(GT)11	58	228-314	27	0.958	$\frac{0.97}{1}$	0.73694	0	
RHIZ18	GATCATTTTAAACACAACACCCC CATCATCTACTTCCTGCGAGAC	KC335542	(AC)14	58	248-310	14	0.583	$\frac{0.91}{1}$	0.00000*	0.171	
RHIZ19	CTCCGAACTGTTCCACACAAGT GATCATGGAGGGTGTATCATCGTGT	KC335540	(TG)21A(GA)16	60	135-190	12	0.833	$\frac{0.88}{1}$	0.25756	0.017	
RHIZ42	TTTGCAGAGAGTGGACGTAAG AGTAAATGCTGTTTCATACTTGGC	KC335536	(CA)5(CA)5(AC)7(CA)5(CA)7 (CA)5(AC)7(CA)9(CA)5	64	183-341	17	0.708	$\frac{0.89}{0}$	0.03268	0.093	
RHIZ49	TGAACTGCATCAACTGAGGAAA GCCAACCTGACCCACTATTTTA	KC335537	CAA(6)n(CAC)4TAC(CAA)7	64	188-239	9	0.583	$\frac{0.82}{7}$	0.01822	0.141	
RHIZ56	CTCCTTACAGACCATGTGTTGC CAAAACCCAAGTTTACCACGTT	KC335538	(TTG)4(TCG)5	62	247-349	13	0.583	$\frac{0.81}{7}$	0.00908	0.131	

Table 2. Cross-amplification of the developed *loci* in *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. *Ta*: annealing temperature; *Na*: number of observed alleles; *H_o*: observed heterozygosity; *H_e*: expected heterozygosity.

<i>C. virginica</i>						<i>C. gigas</i>				
	<i>Ta</i> (°C)	<i>Na</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	P-value (HW)	<i>Ta</i> (°C)	<i>Na</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	P-value (HW)
GASA5	56	7	0.867	0.802	0.744	54	4	0.885	0.692	0.091
GASA15	60	2	0.143	0.143	1.000	-	-	-	-	-
RHIZ3	54	3	0.439	0.385	1.000	-	-	-	-	-
RHIZ7	60	9	0.714	0.912	0.034	-	-	-	-	-
RHIZ8	60	2	0.143	0.143	1.000	-	-	-	-	-
RHIZ11	54	6	0.714	0.681	0.551	56	3	0.635	0.585	1.000
RHIZ12	54	2	0.600	0.477	1.000	-	-	-	-	-
RHIZ13	54	5	1.000	0.768	0.517	-	-	-	-	-
RHIZ19	58	5	0.800	0.822	0.341	-	-	-	-	-
RHIZ42	62	3	0.500	0.449	1.000	-	-	-	-	-
RHIZ49	56	4	0.571	0.780	0.358	-	-	-	-	-