

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Filogeografia Comparada e História Evolutiva da Planície Costeira Sul e Sudeste do Brasil

Fernanda Britto da Silva

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS
como requisito parcial para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Sandro Luis Bonatto

Porto Alegre

Novembro de 2007

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Filogeografia Comparada e História Evolutiva da Planície Costeira Sul e Sudeste do Brasil

Fernanda Britto da Silva

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS
como requisito parcial para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas
Co-orientador: Prof. Dr. Sandro Luis Bonatto

Porto Alegre
Novembro de 2007

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs).

Para o meu marido Marcelo.

AGRADECIMENTOS

À minha família.

Ao Sandro, pela orientação e pelo projeto, e por ser sempre um grande motivador.

Ao Thales pela orientação e principalmente por me aceitar em 2003 para que eu pudesse concorrer à seleção de doutorado no Departamento de Genética.

Ao Maximiliano Cledón pelas amostras de *Donax hanleyanus* e *Mesodesma mactroides* da Argentina.

Ao Felipe Grazziotin pela fundamental e prestativa ajuda nas análises e por discutir comigo muitos pontos desta tese.

À Cladinara Sarturi por toda ajuda ilimitada, mas principalmente por encorajar-me nos seqüenciamentos de placa, e pela grande amizade.

À Taiz Simão pela ajuda nas coletas e principalmente na bancada, durante o último ano.

À Larissa de Oliveira pela grande amizade e força (desculpa te incomodar tanto).

À Jaqueline Battilana pela ajuda em alguns PCRs que não funcionavam de jeito nenhum!

Pela amizade e tão longa convivência dos demais *Genômicos*, em especial à Roberta Graboski, Josiane Bandinelli, Helena Mata, Ana Lúcia Cypriano, Anelise Torres Hahn, Paulo Prates Júnior, Paulo Chaves e Nelson Fagundes, e às ex-genômicas Fernanda Vianna, Ana Maria Liedke, Fabiana Yanaka, Nadiesca Miotto e Karla Yotoko.

Aos meus amigos malacólogos, Professor Thomé, Rina Ramírez, Suzete Gomes, Guacira Maria Gil e Paulo Bergonci pelas discussões e grande ajuda.

Ao Prof. Dr. Francisco Sekiguchi Buchmann e ao Prof. Dr. Jorge Alberto Villwock pela ajuda nos assuntos geológicos e oceanográficos.

Ao Prof. Dr. Nelson Ferreira Fontoura da PUCRS pela ajuda nos assuntos ecológicos e de coleta.

Ao Elmo Cardoso e à Ellen Mezzeck pela ajuda e compreensão em qualquer momento, principalmente nos problemáticos, e à secretária do Thales, Lúcia Andréia de Oliveira.

Ao Professor e amigo Jomar Pereira Laurino pelo entusiasmo científico e pelos grandes incentivos.

Às bibliotecárias do Serviço de Comutação da Biblioteca da PUCRS, Rosana Chagas e Ana Cristina.

Ao Professor Dr. Luiz Glock, o qual, apesar de não ter relação com esta tese, foi um diferencial durante minha iniciação científica, tendo sido conseqüentemente fundamental para minha Pós Graduação.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao CNPq pela bolsa e taxas de bancada, fundamental para as coletas.

SUMÁRIO

Resumo	08
Abstract	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 Filogeografia em Ambientes Marinhos Costeiros	14
1.2 Filogeografia Comparada	20
1.3 Ambientes costeiros do sudeste e sul do Brasil, do Uruguai e da Argentina	21
1.4 A fauna de praia do sudeste e sul do Brasil	24
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Amostragem	29
3.2 Extração de DNA	34
3.3 Amplificação e Sequenciamento	34
3.4 Análise dos Dados	35
4. RESULTADOS	40
4.1 Diversidade nas seqüências do gene COI	40
4.2 Detecção de Barreiras Biogeográficas	45
4.3 Redes de Haplótipos do gene COI	47
4.4 Índices de Fixação Φ_{st} e F_{st} e Análise da Variância Molecular (AMOVA)	52
4.5 Expansão e Tamanho Populacional	64
4.6 Tamanho Efetivo e Taxas de Crescimento Populacionais	72
4.7 Diversidade Genética vs. Geográfica	73

5. DISCUSSÃO	76
5.1 Diversidade Genética e História Demográfica	76
5.2 Coalescência, Expansão Populacional e as Glaciações	77
5.3 Estruturação Populacional	85
5.4 Saídas de Água Doce no Mar como Barreiras Biogeográficas?	88
5.5 Influência das Correntes Marinhas e Ventos Litorâneos	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

RESUMO

O ambiente costeiro e marinho se caracteriza pela falta de barreiras físicas aparentes, além de ser rico em espécies que possuem fase de desenvolvimento larval livre natante. Devido a esta fase de desenvolvimento larval, as espécies marinhas geralmente apresentam alta capacidade dispersiva, proporcionando alto fluxo gênico e conseqüentemente baixa estruturação populacional. Por outro lado, algumas espécies têm apresentado padrões filogeográficos que não são compatíveis com este cenário clássico. Assim, fatores como tempo de duração da fase larval, predação da larva e o hidrodinamismo podem interferir de maneira significativa na dispersão das espécies. Além disso, fatores ambientais históricos, tais como as grandes mudanças climáticas do Pleistoceno também influenciaram os padrões de diversidade genética das espécies. Neste sentido, estudos comparativos são importantes ferramentas para o entendimento dos diferentes processos que deram origem à atual diversidade. Porém, poucos estudos filogeográficos comparativos foram realizados em espécies marinhas costeiras, em especial nenhum para a costa atlântica da América do Sul.

Neste estudo comparamos os padrões de diversidade genética de quatro espécies abundantes de invertebrados que ocorrem ao longo da costa sul-sudeste do Brasil, Uruguai e Argentina, com o objetivo de entender a história evolutiva destas espécies e o que elas podem contar sobre esta região geográfica. Sequenciamos parte do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I do moçambique *Donax hanleyanus* (n= 247), do marisco branco *Mesodesma mactroides* (n= 59), da tatuíra *Emerita brasiliensis* (n= 191) e do caranguejo maria-farinha *Ocypode quadrata* (n= 135). Análises filogeográficas e populacionais foram

utilizadas a fim de elucidar e comparar os padrões evolutivos para estas espécies de invertebrados costeiros.

Nossos dados revelaram um padrão de variabilidade genética muito baixa para todas as espécies, apesar de apresentarem ampla distribuição geográfica e populações censitárias gigantescas, demonstrando a grande influência das flutuações populacionais históricas na formação da variabilidade genética atual.

Apenas *E. brasiliensis* apresentou uma maior variabilidade ao norte da sua distribuição o que é compatível com expansão populacional recente a partir de algum refúgio de baixa latitude, neste caso, ao norte. Além disto, foi a única espécie a apresentar indicação de isolamento por distância.

As histórias demográficas destas espécies, apesar de apresentarem algumas diferenças, parecem estar intimamente ligadas às flutuações de temperatura durante o último grande ciclo glacial, pois três delas apresentaram ancestral comum mais recente (*time to most recent common ancestor* – TMRCA) dentro dos 100 mil últimos anos, com exceção de *O. quadrata*, que apresentou TMRCA há cerca de 500 mil anos. Para todas as espécies constatamos a ocorrência de um longo período de estabilidade demográfica (população reduzida) com expansão populacional mais recente, com exceção de *M. mactroides*, que apresentou TMRCA e expansão populacional praticamente simultâneos.

Emerita brasiliensis foi a espécie com a história demográfica mais recente, apresentando expansão populacional após o último máximo glacial (21 mil anos atrás), e coalescência há cerca de 60 mil anos. As demais espécies apresentaram expansão populacional entre 70 e 100 mil anos, entretanto não podemos descartar a hipótese de expansão simultânea para estas três espécies, já que os intervalos de confiança destas análises se sobrepõem, o que sugere a forte influência de um fator ambiental comum.

Ocypode quadrata, além de ter apresentado a história demográfica mais antiga, apresentou a maior diversidade genética, sendo também a espécie com a maior distribuição geográfica, sendo pancontinental, o que sugere ser a espécie mais resistente às mudanças ambientais. As espécies *D. hanleyanus* e *O. quadrata*, apresentaram baixa estruturação filogeográfica, o que sugere não haver barreiras biogeográficas efetivas para elas, e corrobora a hipótese de que larvas livres natantes são fator importante para o fluxo gênico elevado. Por outro lado sugerem uma estruturação populacional para *M. mactroides* (com uma possível barreira biogeográfica no sul de SP) e *E. brasiliensis* (barreira em Copacabana, RJ).

De maneira geral estes dados reforçam a idéia de que só a capacidade dispersiva larval não é suficiente para prever fluxo gênico e estruturação populacional em populações marinhas costeiras, mas sim uma combinação de fatores ecológicos intrínsecos de cada espécie, assim como os fatores geológicos históricos, como os ocorridos no Pleistoceno.

ABSTRACT

Coastal and marine environments are usually characterized by lack of evident physical barriers and having many species that show a free-swimming larval stage. Due to this larval stage, marine species commonly show high dispersion rates resulting in high gene flow and low geographical structure. Some species however present phylogeographical patterns that differ from this standard scenario. Factors such as duration of the larval phase, its predation level, and the hydrodinamism of the dispersion can significantly impact species dispersion. Moreover, historical environmental factors, such as the great climatic changes in the Pleistocene are also important elements to shape pattern of genetic diversity of the species. In this sense, comparative analyses are important tools for understanding the different processes that gave rise to the current diversity. Unfortunately, few comparative phylogeographical studies were carried out in sea coastal species, in special none for the Atlantic coast of the South America.

In this study we compare the patterns of genetic diversity of four abundant invertebrate species that occur along the beaches of the Brazilian south and southeastern coast, Uruguay and Argentina, to better understand their evolutionary histories as well as what they could tell about the history of this geographical region. For this aim we partially sequenced the mitochondrial Cytochrome Oxidase I gene of the moçambique *Donax hanleyanus* (n=247), yellow clam *Mesodesma mactroides* (n=59), mole crab *Emerita brasiliensis* (n=191) and of the ghost crab *Ocypode quadrata* (n = 135) and analyzed them using several phylogeographical and populational genetic methods.

Our results revealed a pattern of very low genetic diversity for all four species, in spite of their large geographical distribution and the huge population size, evidencing the great influence of the population historical fluctuations in the current genetic variability.

Only *E. brasiliensis* showed a relatively higher variability to the north of its distribution what is compatible with a recent populational expansion from a refugium in low latitudes. Besides it was the only species that presented evidence for isolation by distance.

The demographic histories of these species, in spite of presenting some differences, seems to be closely connected with the climatic fluctuations during the last glacial cycle, since three of them presented TMRCA in the last 100 kyr ago, with the exception of *O. quadrata*, which presented TMRCA about 500 kyr ago. All species presented a long period of demographic stability with relatively reduced population followed by a more recent population expansion. The exception to this picture is *M. mactroides*, which presented TMRCA and population expansion nearly simultaneous.

Emerita brasiliensis depicted the most recent demographic history, presenting a strong population expansion after the last glacial maximum (21 kyr ago), with TMRCA around 60 kyr ago. The other species presented population expansions between around 70 and 100 kyr ago, however we can not to reject the hypothesis of a simultaneous expansion for these three species, since to the confidence intervals of these analyses overlapped, which would indicate a strong influence of a common environmental feature. *Ocypode quadrata* presented the most ancient demographic history, the highest genetic diversity, and the largest geographical distribution (it is a pancontinental species). This may indicate that it could be the most tolerant to the environmental changes.

D. hanleyanus and *O. quadrata* presented low phylogeographical structure, which can mean the existence of no effective biogeographical barriers to these species, corroborating the hypothesis that a free-swimming larval stage is an important factor for an elevated gene flow. On the other hand, our results suggest a reasonable population

structure for *M. mactroides* (with a possible biogeographical barrier in the south of São Paulo) and *E. brasiliensis* (barrier around Copacabana, Rio de Janeiro),

In conclusion, our results support the proposal that the existence of a free-swimming larval stage is not sufficient to predict high gene flow and population structure in sea coastal species, being this pattern likely a combination of intrinsic ecological factors of each species, as well as biogeographical historical factors.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Filogeografia em Ambientes Marinhos Costeiros

No ambiente costeiro marinho, as barreiras ao fluxo gênico são difíceis de caracterizar e raramente são absolutas. Esta falta de barreiras físicas aparentes no mar e o fato de que as larvas de muitos grupos marinhos têm uma fase larval livre natante prediz altas taxas de dispersão (Imron *et al.*, 2007). Neste caso a alta conectividade faz com que as populações sofram processos genéticos evolutivos interdependentes, inibindo a divergência populacional (Luttikhuizen *et al.*, 2003). Entretanto, a dispersão larval pode ser afetada por barreiras físicas que impeçam seu transporte e sobrevivência (Lazoski *et al.*, 2001). Características marinhas, assim como barreiras biogeográficas, padrões da costa ou circulação estuarina, são alguns dos fatores que podem limitar o fluxo gênico (Wares *et al.*, 2001; Bilton *et al.*, 2002), além das características biológicas de cada espécie, como preferência de habitat (Dawson *et al.*, 2002).

Há evidências de que a circulação oceânica não explica totalmente os padrões estruturais genéticos encontrados entre populações marinhas contemporâneas, porém o papel de barreiras interferindo na dinâmica evolutiva dos organismos em ambientes marinhos permanece pouco compreendido, devido às poucas análises comparativas em ambientes costeiros (Perrin *et al.*, 2004).

Espécies marinhas geralmente possuem grande tamanho populacional (Chambers *et al.*, 2006), entretanto, qualquer evento oceanográfico que interfira na sobrevivência larval pode afetar o recrutamento da espécie (Hedgecock, 1986). Além disso, o mecanismo de reprodução das espécies marinhas torna seu sucesso reprodutivo extremamente variável e

dependente dos fatores físicos e químicos oceanográficos (Planes e Lenfant, 2002). Em geral essa alta variância no sucesso reprodutivo ocorre porque as espécies não conseguem conciliar sua alta fecundidade com as condições oceanográficas para permitir sua maturação, fertilização, desenvolvimento larval e recrutamento. Assim, apenas uma pequena proporção de adultos contribui para a manutenção de uma população marinha (Chambers *et al.*, 2006). Sendo assim, poucos membros de cada população acabam contribuindo para a próxima geração (Li and Hedgecock, 1998), o que sensivelmente diminui o tamanho populacional efetivo em relação ao tamanho populacional censitário (Hedgecock, 1986). Deste modo, esta alta variância no sucesso reprodutivo acelera os processos de redução e até mesmo de extinção populacional, acelerando processos de coalescência porque, apesar destas espécies possuírem grandes populações, a sobrevivência das linhagens se torna restrita a poucos indivíduos por geração (Awise, 2000)

Um dos modelos filogeográficos de Awise *et al.*, (1987) para relações intraespecíficas sugere que espécies com alta capacidade de dispersão em alguma fase de sua vida geralmente não apresentam estruturação populacional profunda. Neste sentido, a diferenciação genética em muitas espécies marinhas deve ser influenciada pela sua capacidade dispersiva larval (Santos *et al.*, 2006) e, com base no pressuposto citado acima, esperaríamos baixo nível de estruturação populacional para estes organismos. A grande maioria das espécies marinhas possui pelo menos um ciclo de vida com alto potencial dispersivo (estágio larval), período em que estariam sujeitas ao transporte através das correntes marinhas por períodos de tempo que podem variar de semanas a meses, podendo ser levadas a longas distâncias. Além disso, em geral, espécies com grande capacidade dispersiva possuem grande tamanho populacional e vasta distribuição geográfica além do alto fluxo gênico (Palumbi, 1992, Imron *et al.*, 2007).

Entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado que a alta capacidade dispersiva inferida para algumas espécies pode estar sendo superestimada por não levar em consideração fatores como a predação e o comportamento larval, e a hidrodinâmica da dispersão (Cowen *et al.*, 2000; Lazoski *et al.*, 2001). Além disso, há a constatação da existência de novas espécies nestes ambientes, as quais ainda não haviam sido reconhecidas através do uso de um pequeno número de caracteres taxonômicos e pela superestimativa de sua capacidade de dispersão larval (Lazoski *et al.*, 2001).

Por outro lado, em espécies com características ecológicas que podem restringir sua dispersão, tais como ciclo de vida com fase larval muito curta ou preferência de habitat, esperar-se-ia um menor nível de fluxo gênico e conseqüentemente algum grau de estruturação populacional (Imron *et al.*, 2007), como acontece com o crustáceo *Tigriopus californicus* (Burton e Lee, 1994) e o peixe *Embiotoca jacksoni* (Bernardi, 2000) na costa da Califórnia.

Encontram-se na literatura espécies marinhas que mostram uma alta estruturação populacional, como o molusco gastrópodo *Scutus antipodes* na Austrália, cuja estruturação foi atribuída, ou à presença de uma barreira paleogeográfica formada durante eventos de transgressão marinha, ou à diferença atual de temperatura (Waters *et al.*, 2007). Outros exemplos são o molusco bivalvo *Deminucula atacellana*, uma espécie pan-Atlântica (Zardus *et al.*, 2006), os crustáceos *Mysis relicta* e *Limnocalanus macrurus* na América do Norte (Dooh *et al.*, 2006), entre outros (Dawson, 2001; Barber *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2004; Bilodeau *et al.*, 2005; Cardoso e Vogler, 2005; Etter *et al.*, 2005; Lourie *et al.*, 2005; Audzijonyte e Väinölä, 2006). Mas também encontramos espécies com baixa ou nenhuma estruturação populacional (Palumbi, 1992; Ignacio *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2002; Maggioni *et al.*, 2003; Uthicke e Benzie, 2003; Richards *et al.*, 2007; Imron *et al.*, 2007),

mesmo as espécies tendo semelhanças em termos de dispersão, já que são todas espécies marinhas apresentando dispersão larval durante seu desenvolvimento. Estas espécies que não possuem estrutura filogeográfica corroboram a hipótese de que organismos com grande capacidade de dispersão, com frequência, resultam em grande fluxo gênico e pouca estruturação populacional.

Vale ressaltar ainda que a simples distância entre diferentes regiões não é pressuposto para potencial dispersivo, pois se sabe, por exemplo, que em cerca de 2000 km do mar da Tasmânia, entre a Nova Zelândia e a Austrália, os gastrópodos *Austrolittorina antipodum* e *Scutus breviculus* com conhecida alta capacidade larval dispersiva, atualmente apresentam alta divergência genética. Por outro lado, outras espécies, um crustáceo, *Chamaesipho* sp. e um gastrópodo, *Dicathais* sp., apresentaram sinal de dispersão recente entre as duas regiões (Waters *et al.*, 2007). Na costa brasileira, cerca de 2700 km foram suficientes para diferenciar esponjas do gênero *Chondrilla* apresentando alta estruturação populacional (Klautau *et al.*, 1999). Por outro lado, em uma distância de aproximadamente 8600 km entre Bermudas e Brasil, a esponja *Chondrosia reniformis* apresentou-se extremamente similar na análise eletroforética de alozimas (Lazoski *et al.*, 2001).

Estudos filogeográficos com uma espécie ou comparativos são muito abundantes no hemisfério norte, tornando estas regiões muito bem documentadas e conhecidas. A costa da Califórnia, por exemplo, possui grandes barreiras físicas que inibem o fluxo gênico entre certas espécies e que poderiam causar estruturação populacional. Entretanto Dawson *et al.*, (2002) encontraram diferentes padrões filogeográficos para espécies de peixes (*Clevelandia ios* e *Eucyclogobius newberryi*) ocorrentes em simpatria nesta região. Por um lado, encontraram inexistência de estruturação genética para *C. ios*, refletindo um alto

fluxo gênico histórico e provavelmente atual entre as populações. Em contraste, um nível consideravelmente alto de variação genética populacional e regional foi detectado em *E. newberryi*, refletindo um fluxo gênico histórico baixo. Presume-se que esses resultados reflitam a maior capacidade de dispersão encontrada para *C. ios* em relação à *E. newberryi*, que praticamente não sofre dispersão devido a características ecológicas, como preferência de habitat.

Os recentes períodos glaciais (Pleistoceno) tiveram interferência na arquitetura genética e nos padrões filogeográficos de diversas espécies em várias partes do mundo, principalmente onde os efeitos foram mais severos, como por exemplo, na América do Norte (Guralnick, 2006) e Europa (Pfenninger *et al.*, 2003; Trewick *et al.*, 2003), tendo sido atribuído à falta de diversidade genética em duas espécies de crustáceos do Atlântico Norte, as variações de temperatura e perda de habitat durante o último máximo glacial (Bucklin e Wiebe, 1998).

Entretanto, no Hemisfério Sul, em países onde o clima se assemelha ao do Brasil, e onde os efeitos das glaciações foram menos intensos, também existem sugestões da interferência destes períodos glaciais na história evolutiva dos organismos de diferentes habitats. Por exemplo, o molusco *Potamopyrgus antipodarum* na Nova Zelândia, apresenta um padrão filogeográfico de diferenciação populacional norte *vs.* sul, tendo provavelmente se isolado em refúgios pleistocênicos ao norte e ao sul, durante eventos glaciais (Neiman e Lively, 2004). Já na Austrália a estrela-do-mar *Coscinasterias muricata* apresenta-se geograficamente estruturada em um grupo de haplótipos norte e um sul, e mais ainda, no grupo do norte há uma subdivisão geográfica leste e oeste. Todas essas diferenças foram atribuídas a eventos de isolamento populacional causadas no Plioceno e no Pleistoceno (Waters e Roy, 2003).

Atribuiu-se a essas mudanças climáticas, também, os padrões filogeográficos encontrados para o molusco bivalvo *Macoma balthica*, o qual se apresenta com grande diferenciação genética nas populações européias e uma distribuição espacial disjunta com alta divergência mitocondrial, e em *Mytilus edulis* ocorrente no mar Báltico e costa oeste do Pacífico e do Canadá, o qual apresenta o mesmo padrão de divergência (Luttikhuisen *et al.*, 2003). Padrões populacionais semelhantes também foram encontrados no sudeste da Ásia inferindo-se que a capacidade dispersiva de quatro espécies de cavalos marinhos pertencentes ao gênero *Hippocampus*, tenha sido limitada por eventos de glaciações do Pleistoceno, apresentando-se hoje altamente estruturadas geneticamente (Lourie *et al.*, 2005).

Além dos eventos geológicos e climáticos qualquer fenômeno que afete drasticamente o ambiente marinho, assim como canais de descarga de água doce e a foz de rios, mudam a salinidade, temperatura e gradiente de nutrientes, sendo barreiras hidrodinâmicas e impedindo a formação do sedimento e modificando sua textura, dificultando, ou até mesmo impedindo, a fixação de larvas ao substrato (Defeo e de Alava, 1995; Defeo, 1996).

As correntes marinhas e os ventos costeiros também são fatores que podem interferir diretamente na distribuição das espécies por promoverem a dispersão larval. Na costa brasileira, a ocorrência de correntes frias e quentes parece ser um fator importante na estruturação genética do peixe *Macrodon ancylodon* o qual possui fase de desenvolvimento larval. Através da análise de genes mitocondriais (Santos *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2006), a espécie apresentou-se dividida em um grupo tropical, contendo espécimes viventes em regiões influenciadas por águas quentes, e um grupo subtropical,

com indivíduos de ambiente atingido por águas frias, provenientes das correntes do Brasil e das Malvinas.

1.2 Filogeografia Comparada

Os estudos genealógicos têm utilizado as explicações geográficas históricas para interpretar as relações evolutivas entre os táxons e também para examinar a colonização e dispersão entre as populações dentro de um contexto filogeográfico (Stevens e Hogg, 2003).

A filogeografia comparada tem o potencial de incorporar a informação dos componentes históricos e geográficos entre e dentro das espécies, assim tornando mais detalhado o entendimento dos padrões de variação em grupos codistribuídos (Hoffman e Baker, 2003). Comparar esses padrões filogeográficos intraespecíficos (Avice *et al.*, 1987) a partir de espécies codistribuídas promove a identificação de áreas geográficas onde uma comunidade inteira possa ter sofrido processos evolutivos dependentes, de acordo com os eventos históricos que tenham ocorrido. Nesta abordagem comparativa, quando os padrões evolutivos encontrados são concordantes entre as diferentes espécies, revelam a história biogeográfica da região, sendo possível encontrar padrões de diversidade genética para esta área, além de registrar os eventos evolutivos, como processos de vicariância, dispersão e a presença de barreiras biogeográficas (Avice *et al.*, 1987; Moritz e Faith, 1998).

Infelizmente, devido à natureza multidisciplinar e seu grande porte, poucos estudos deste tipo já foram realizados. Os mais conhecidos são os realizados no sudeste da América do Norte (Avice, 2000) e aqueles realizados em uma floresta tropical na Austrália (Hugall *et al.*, 2002). Além disso, diversos estudos, embora realizados geralmente de modo

independente, com diversos organismos na Europa e na América do Norte, têm permitido uma compreensão sem precedentes sobre a influência das glaciações mais recentes na distribuição e diversidade da biota destas regiões (Hewitt, 2001; Lourie *et al.*, 2005; Guralnick, 2006; Pfenninger *et al.*, 2003; Trewick *et al.*, 2003).

Por exemplo, padrões filogeográficos comparativos apresentados para populações codistribuídas de diferentes grupos de peixes em rios na costa sudeste dos Estados Unidos, mostram uma clara divisão de unidades filogeográficas nas populações do leste (costa do Atlântico) e do oeste (costa do Golfo). Essas subdivisões filogeográficas são consistentes com o cenário biogeográfico histórico que causou uma grande separação por rios de drenagem, no Pleistoceno ou antes, causando uma separação entre os peixes das duas regiões (Walker e Avise, 1998).

Na América do Sul e no Brasil nenhum estudo comparativo em áreas costeiras foi realizado até o momento. Os trabalhos de filogeografia comparada costeira já realizados no Brasil se restringem basicamente ao estudo de peixes do gênero *Acanthurus* (Rocha *et al.*, 2002), entretanto sem amostrar toda a costa brasileira.

1.3 Ambientes costeiros do sudeste e sul do Brasil, do Uruguai e da Argentina

Praias são ambientes costeiros contíguos aos mares, oceanos, estuários, entre outros e se estendem, perpendicularmente à linha da costa, desde o nível de baixa-mar média, até a zona de vegetação terrestre permanente, como dunas e falésias. São compostas basicamente de material mineral inconsolidado, mais comumente areias, podendo ser compostas também por lodo, cascalhos, pedras roladas, seixos, calhaus, conchas de moluscos, restos de corais e algas calcárias (Lamparelli e Moura, 1999).

A dinâmica costeira condiciona diretamente a construção geomorfológica da linha da costa. No Brasil as costas sudeste e sul são batidas pelas ondas provenientes de sudeste, geradas pelos ventos da zona tempestuosa subpolar do Atlântico Sul. No que se refere às marés, as costas sudeste e sul mostram um regime de micromarés (amplitude < 2 m) (Villwock, 1994).

A zona costeira do Brasil tropical atlântico estende-se por 1.500 km, do Cabo Frio até o Cabo de Santa Marta, sendo o macrossetor litorâneo mais diversificado, recortado e acidentado de todo o País. Esta zona é marcada pela Serra do Mar, um conjunto de terras altas constituídas pelo embasamento cristalino granito-gnáissico, cujas escarpas chegam até o mar constituindo promontórios rochosos, ornamentados por costões, que se alternam com reentrâncias, quase sempre tectonicamente controladas. Nelas, associadas ou não à desembocadura dos principais sistemas fluviais que chegam ao oceano, ocorrem pequenas planícies costeiras compostas por laguna/barreira, simples ou múltiplas, ou por sistemas de cordões litorâneos regressivos, pleistocênicos e holocênicos, ou somente holocênicos, parcialmente retrabalhados pelo vento. Algumas barreiras arenosas isolam áreas lagunares de pequeno porte onde, quase sempre, se desenvolvem manguezais (Villwock, 1994; Ab'Sáber, 2001). Nestas praias, os grupos faunísticos dominantes são os anelídeos poliquetas, moluscos e crustáceos, sendo que a composição de espécies e abundância de indivíduos variam de acordo com as características ambientais das praias, especialmente granulometria, hidrodinamismo, salinidade e quantidade de matéria orgânica (Lamparelli e Moura, 1999).

A partir da ponta sul da ilha de Itanhaém (SP), surgem as primeiras baías de ingressão marinha quaternária típicas do litoral paranaense e norte catarinense. A mais extraordinária reentrância de água costeira de toda a região é a Baía de Paranaguá-

Antonina, que se inicia na Serra do Mar paranaense, com dois braços principais irregulares e diversas reentrâncias secundárias em uma região de tectônica complexa.

A costa sul, do Cabo de Santa Marta (SC) até o Arroio Chuí (RS), caracteriza-se por uma ampla planície costeira com cerca de 700 km de comprimento com configuração praticamente retilínea, sem reentrâncias e irregularidades maiores, o que lhe confere um caráter aberto. Constitui o mais marcante habitat litorâneo arenoso do sul do Brasil, onde um sistema múltiplo e complexo de barreiras arenosas aprisiona um gigantesco sistema lagunar (Laguna dos Patos e Mirim) e uma série de outros corpos de água isolados e interligados com o mar por intermédio de canais estreitos e rasos (Villwock, 1994).

Toda esta área de estudo é influenciada pelas correntes marinhas que são chamadas Corrente das Malvinas, vindas do sul e transportando água subantártica gelada, e Corrente do Brasil, vinda do norte e transportando água tropical quente. A convergência e a mistura dessas águas forma a corrente chamada Água Subtropical, também chamada Água Central do Atlântico Sul, e este fenômeno é denominado Convergência Subtropical, o qual causa eventos de ressurgência de nutrientes em uma variação sazonal entre as latitudes 18 e 35° sul (Seeliger *et al.*, 1998). Já foi demonstrado que este fenômeno tem influência sobre a distribuição de espécies ocorrentes nestas regiões (Guimaraens e Coutinho, 1995; Maggioni *et al.*, 2003).

No Uruguai a planície costeira é formada por praias arenosas expostas, alternadas por promontórios rochosos. Estas praias são afetadas principalmente por canais artificiais de descarga de água doce (Lercari *et al.*, 2002), tais como o Arroio Chuy no norte, e o Canal Andreoni no sul. Estes canais influenciam na abundância e distribuição dos organismos, pois afetam a salinidade, que é um dos principais fatores que controlam a distribuição e abundância das espécies, e influenciam nos processos fisiológicos dos

organismos de praia. Os moluscos *Donax hanleyanus* e *Mesodesma mactroides*, e o crustáceo *Emerita brasiliensis* tiveram sua densidade populacional reduzida em um trecho de 22 km entre os dois pontos de descarga de água doce, provavelmente pela mortalidade das larvas, além de vários fatores ecológicos afetados (Lercari e Defeo 1999; Lercari *et al.*, 2002).

A costa argentina é uma plataforma larga e rasa coberta por águas subantárticas, sendo diretamente influenciada pela corrente das Malvinas (Seeliger *et al.*, 1998), entretanto são modificadas pelos ciclos de temperatura e prevalência de ventos locais (Lucas *et al.*, 2005). Foi fortemente afetada pelos eventos de transgressão marinha, especialmente após o Último Máximo Glacial (há cerca de 21 mil anos) (Cavallotto *et al.*, 2004).

Uma das principais descargas de água doce no mar em nossa área de estudo, é o Rio da Prata e está localizado ao norte da Argentina no limite com o Uruguai. Com uma vazão de cerca de 221 km, é uma importante região de estudo das flutuações do nível do mar durante o Holoceno, devido ao baixo relevo da costa que permitiu que o mar cobrisse zonas extensivas tendo depositado um grande número de sedimentos em vários ambientes (Cavallotto *et al.*, 2004). É também uma região ecológica muito dinâmica devido às mudanças de salinidade locais que interferem na vida das espécies que ali ocorrem (Lucas *et al.*, 2005).

1.4 A fauna de praia do sudeste e sul do Brasil

A fauna da zona de praia do sudeste e sul é caracterizada por organismos habitantes da areia que, em sua grande maioria, possuem desenvolvimento indireto, ou seja,

apresentam uma fase de desenvolvimento larval, vivendo na coluna d'água (Lamparelli e Moura, 1999). Os moluscos e os crustáceos marinhos possuem larvas planctônicas, o que lhes facilita a dispersão (Wells, 1995).

Simplificadamente, para os objetivos deste trabalho, podemos classificar os habitats litorâneos nas zonas de supralitoral, intermareal e zona de arrebentação, sendo que vários fatores que agem sobre o ambiente de praia têm sido considerados como afetando diretamente a distribuição e abundância da fauna em cada uma destas zonas. Dentre estes fatores incluem-se a ação das ondas, a declividade da praia, umidade da areia e nutrientes na zona de arrebentação (McLachlan, 1990). Além disto, o número de espécies declina com o aumento da latitude, refletindo a importância da temperatura no limite de distribuição dos invertebrados marinhos que vivem nas zonas intermareal e submareal rasa (Ansell, 1983).

Na zona supralitoral, os organismos mais conspícuos são o caranguejo *Ocypode quadrata* Fabricius, 1787 e o anfípode *Orchestoidea brasiliensis* Dana, 1853. Esta região da praia é caracterizada pela inundação com água do mar apenas em eventos extremos, como as marés de tempestades (Seeliger *et al.*, 1998).

Ocypode quadrata (Caranguejo-fantasma ou Maria-farinha) é um crustáceo de ampla distribuição, ocorrendo desde Rhode Island na América do Norte até o Rio Grande do Sul, no sul do Brasil (Alberto, 1995). Apesar de principalmente encontrados próximo às dunas, os jovens podem ocorrer junto à linha da água (Alberto, 1995; Vinagre *et al.*, 2007). Sua abundância populacional pode variar sazonalmente e de acordo com a praia, e é estimada através da contagem de tocas - geralmente encontra-se um indivíduo por toca (Alberto, 1995) - sendo que o número delas pode variar de 0,4 a 5 tocas/m² (Neves e Bemvenuti, 2006). Entretanto, em uma praia no México, por exemplo, a abundância foi

menor, tendo sido encontradas de 0,49 a 1,79 tocas/m² (Valero-Pacheco *et al.*, 2007). Nota-se ainda, uma acentuada diminuição populacional em praias com densa ocupação humana (Blankensteyn, 2006; Schlacher *et al.*, 2007).

Na zona intermareal, observa-se a maior biomassa e produção de invertebrados bênticos (Gianuca, 1983, 1985), tendo seus limites de distribuição restritos ao nível da água do mar e às alterações no perfil da praia (Gianuca 1987, Seeliger *et al.*, 1998). O crustáceo *Emerita brasiliensis* Schmitt, 1935 e os bivalvos *Mesodesma mactroides* Deshayes, 1854 e *Donax hanleyanus* Philippi, 1847, são responsáveis por aproximadamente 95% da biomassa total dos invertebrados desta zona na região estudada (Castello *et al.*, 1998).

O bivalvo *M. mactroides* (marisco branco) possui distribuição geográfica desde Ilha Grande no Rio de Janeiro até Bahia Blanca na Argentina (Rios, 1994). É um bivalvo de larva plantônica, que habita a zona intermareal de praias arenosas de regimes subtropicais e temperados, onde vivem agregados (Bergonci, 2005). A abundância populacional desta espécie já teve registros de variação de 920 até 8450 indivíduos/m² apenas no ano de 1980 (Gianuca, 1985). Entretanto, em épocas mais recentes, registra-se um acentuado declínio populacional da espécie (Bergonci, 2005).

Donax hanleyanus (moçambique), também com fase larval plantônica, é uma das quatro espécies do gênero *Donax* que ocorrem no Brasil, estando distribuída desde o Espírito Santo, até Necochea na Argentina (Castellanos e Fernandez, 1965; Rios, 1994) a cerca de 120 km de Mar Del Plata em direção ao sul, e vive preferencialmente, na região da praia varrida pelas ondas, onde o sedimento permanece saturado (Narchi, 1974; 1978). Apesar de escassos, os registros de abundância populacional, por exemplo, no Uruguai e extremo sul do Brasil, variaram de um valor médio anual de 19 indivíduos/m² a 178

indivíduos/m², variando também conforme a estação do ano, tendo chegado até 322 indivíduos/m² durante o verão de 1990 (Defeo e de Alava, 1995). Entretanto, destaca-se que em épocas de recrutamento já foi registrada a ocorrência de até 10.000 jovens indivíduos/m² (Penchaszadeh e Olivier, 1975). Tanto *M. mactroides* quanto *D. hanleyanus* têm alta importância comercial, sendo alvo de intensivas coletas para fins alimentícios (Bergonci, 2005; Gil, 2005).

Os crustáceos do gênero *Emerita* habitam as águas das regiões tropicais e temperadas de todos os oceanos, sendo exclusivamente marinhos. Estão adaptados a uma vida escavadora no interior de sedimentos não consolidados, sob as influências das correntes e das rebentações das ondas, apresentando marcada distribuição vertical por tamanho (Gil e Thomé, 2001). As larvas possuem uma fase planctônica e outra bentônica. Apresentam hábito alimentar diferenciado, sendo na fase larval carnívoros e na fase adulta filtradores ou detritívoros. Nutrem-se principalmente de restos orgânicos de pequenos anfípodos, isópodos e larvas em suspensão, recolhidos pelas antênulas, ou ainda de restos de outros crustáceos pequenos e de poliquetas (Bond-Buckup e Buckup, 1999). *Emerita brasiliensis* (tatuíra) distribui-se do Espírito Santo até o Uruguai (Velooso e Valentin, 1993), com relatos não confirmados de ocorrência na Venezuela e norte do Brasil, em simpatria com *E. portoricensis* (Defeo e Cardoso, 2004). É a de maior abundância populacional entre as espécies estudadas aqui, podendo ser encontrados até cerca de 3000 indivíduos por m² (Defeo e Cardoso, 2004).

2. OBJETIVOS

1. Estudar a diversidade genética mitocondrial no espaço e no tempo das espécies *Mesodesma mactroides*, *Donax hanleyanus*, *Emerita brasiliensis* e *Ocypode quadrata* ocorrentes no litoral sudeste e sul-brasileiro, uruguaio e do norte da Argentina;
2. Comparar os padrões filogeográficos inferidos para estas espécies para melhor compreender a influência dos processos históricos climáticos e geológicos na história evolutiva destas espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Aproximadamente a cada 100km foram coletadas amostras de duas espécies do filo Mollusca, os bivalvos *Mesodesma mactroides* (Fig. 1) (n= 59 em 9 pontos de coleta) e *Donax hanleyanus* (Fig. 2) (n= 247 em 25 pontos de coleta), e duas espécies do filo Crustacea, *Emerita brasiliensis* (Fig. 3) (n= 191 em 22 pontos de coleta) e *Ocypode quadrata* (Fig. 4) (n= 135 em 16 pontos de coleta) em uma abrangência de cerca de 3000 km de costa brasileira, uruguaia e argentina (Fig. 5-6 e Tabela 1). As amostras foram manualmente coletadas, sendo que quando necessário foi utilizada uma pequena pá, e os pontos de coleta foram georreferenciados com o auxílio de um aparelho *Global Positioning System* (GPS). É importante notar que *D. hanleyanus* e *E. brasiliensis* tiveram toda a sua distribuição conhecida amostrada.

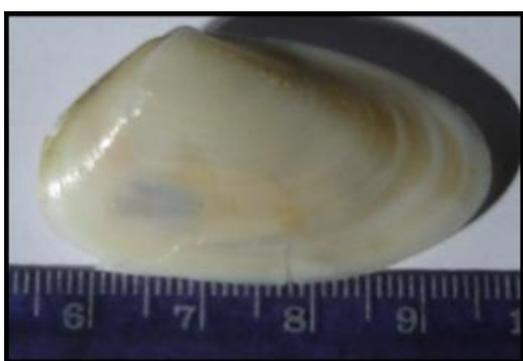


Figura 1: Exemplar de *M. mactroides*.

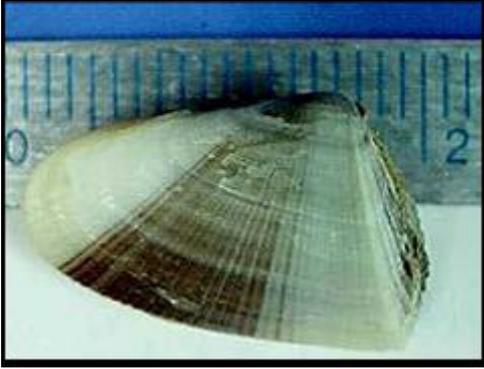


Figura 2: Exemplar de *D. hanleyanus*. (Foto de Guacira Gil).



Figura 3: Exemplar de *E. brasiliensis*.



Figura 4: Exemplar de *O. quadrata*.



Fig. 5- Distribuição geográfica das quatro espécies utilizadas neste estudo. Cinza= *O. quadrata* (não teve toda a sua distribuição representada, a qual estende-se até a América do Norte); Vermelho= *M. mactroides*; Amarelo= *E. brasiliensis*; Azul= *D. hanleyanus*. Mais detalhes na Introdução. Elipse: área amostrada.



Figura 6: Área amostrada, identificando os pontos de coleta.

Tabela 1- Pontos de coleta e número de indivíduos estudados em cada ponto por espécie.

Pontos de Coleta \ Espécies	<i>M. mactroides</i>	<i>D. hanleyanus</i>	<i>E. brasiliensis</i>	<i>O. quadrata</i>
1. Ilha dos Lençóis, Maranhão (MA)				8
2. Itaúnas, Espírito Santo (ES)		10	8	14
3. Vila Velha – Itapoã, ES		4	14	5
4. Copacabana, Rio de Janeiro (RJ)		2	8	
5. Iriiri, RJ				10
6. Picinguaba, São Paulo (SP)			10	
7. Cocanha, SP		10		
8. Itaguaré, SP				10
9. Enseada/Indaiá, SP		10	10	
10. Peruíbe, SP	4	10	7	
11. Ilha Comprida, SP	9	10	10	9
12. Pontal do Sul / Ilha do Mel, Paraná (PR)		10	10	7
13. Itapoá, Santa Catarina (SC)		8		
14. Barra do Sul, SC		6	9	5
15. Piçarras, SC		7	9	
16. Palmas, SC		8	8	
17. Pinheira/Praia do Sonho, SC		7	10	7
18. Farol de Santa Marta, SC	7	5	10	10
19. Arroio do Silva, SC				8
20. Torres, Rio Grande do Sul (RS)	10	6	13	5
21. Tramandaí, RS	8	7	11	
22. Mostardas, RS	5	7	5	11
23. Cassino, RS	7	9	5	7
24. Ponto Médio, RS	6	11	6	11
25. Chui, RS	3	10	10	8
26. Cabo Polônio, Uruguai			7	
27. La Paloma/La Pedrera, Uruguai		19	10	
28. José Ignacio, Uruguai		11		
29. Piriápolis, Uruguai			1	
30. San Clemente, Argentina		12		
31. Villa Gesell, Argentina		17		
32. Mar del Plata/Punta Mogotes, Argentina		31		
Total de indivíduos (n)	59	247	191	135

Hachurado: não encontrado, apesar de indicar na literatura.

3.2 Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído dos moluscos a partir de um pequeno fragmento de tecido muscular do pé através da técnica de precipitação por *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) (Doyle e Doyle, 1987) a fim de dissolver o muco de polissacarídeo existente nestas espécies, o qual tem a característica de inibir reações de PCR. Já para os crustáceos utilizamos a técnica de precipitação por fenol-clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001) a partir de um pequeno fragmento de tecido muscular da perna. Para algumas amostras mais difíceis de extrair o DNA a partir dos protocolos citados acima, utilizamos o kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega).

3.3 Amplificação e Sequenciamento

Os *primers* LCO1490 e HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) foram utilizados para amplificar aproximadamente 700 pb do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI). Entretanto foi necessária a construção de três outros conjuntos de *primers* para amplificar amostras de *Donax hanleyanus*, *Emerita brasiliensis* e *Ocypode quadrata* (Tabela 2) as quais não amplificaram eficientemente com os *primers* de Folmer *et al.* (1994).

Tabela 2- Lista de *primers* desenhados neste estudo.

	<i>Forward</i> (5' - 3')	<i>Reverse</i> (5' - 3')
<i>D. hanleyanus</i>	CTGTTGGTTTAGTTTACAGTGTTATAAT	AAAGAACTGGATCCCCACCCCTACAGG
<i>E. brasiliensis</i>	GGAATAGTAGGAACTTCTCTAAGATTGAT	AAATGTTGATAGAGAACAGGATCTCC
<i>O. quadrata</i>	GGAGCTTGAGCAGGTATGGTAGG	AGTGTGGTATAGAACCGGTCTCCACC

Todas as reações de PCR foram feitas com volume final de 20 µl contendo 1,6 mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs, 0,2 µM de cada *primer*, 1 U de TaqDNA polimerase, 10X PCR buffer (Invitrogen) e 1µl de DNA (variando de 10 a 40 ng de DNA). As condições para amplificação a partir dos *primers* LCO1490 e HCO2198 seguiram o seguinte protocolo: 96° por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, *touch down* de 50°C a 40°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Os demais *primers* foram utilizados com as mesmas condições descritas acima, porém utilizando-se para anelamento, *touchdown* de 62°C a 52°C por 1 minuto.

Os produtos amplificados foram purificados com as enzimas Exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Amersham Biosciences). Após a purificação, os fragmentos foram seqüenciados utilizando-se o kit *DYEnamic™ ET Dye Terminator* (MegaBACE™) (GE Healthcare) e as reações foram lidas no seqüenciador automático de DNA MegaBACE 1000.

3.4 Análise dos Dados

Foram geradas sempre, para cada indivíduo, leituras com o *primer forward* e com o *primer reverse*, sendo que a partir das duas leituras foram geradas seqüências consenso com auxílio dos programas *Phred*, *Phrap* e *Consed* na plataforma Linux. Além disto, o programa Chromas 2.0 também foi utilizado para manualmente revisar os cromatogramas resultantes. As seqüências foram alinhadas através do programa ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) e foram manualmente ajustadas utilizando-se o programa Mega3 (Kumar *et al.*, 2004), onde também foi verificada a ocorrência de códons de terminação e as substituições de aminoácido.

Estatísticas básicas como diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (Hd), e os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1983), D de Fu e Li (Fu e Li, 1993), Fs de Fu (Fu, 1997) e F de Fu e Li (Fu e Li, 1993), foram estimados através do programa DnaSP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003).

A fim de se comparar a diversidade genética ao longo da área de estudo, valores de π e Hd também foram calculados para cada ponto de coleta, sendo que, quando necessário para se obter no mínimo dez indivíduos por análise, alguns pontos contíguos foram agrupados (com exceção de *O. quadrata* do Maranhão, em que devido a grande distância com os demais pontos de amostragem, manteve-se o número de 8 indivíduos nesta análise). Estes dados, juntamente com a distância em quilômetros entre pontos, a partir de um ponto de referência, foram utilizados em uma análise de regressão linear simples, com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o programa MS Excel 2003, para verificar se nestas espécies a diversidade genética varia conforme a sua distribuição geográfica. O ponto mais ao sul da amostragem de cada espécie foi designado como ponto zero, aumentando em direção ao norte conforme as distâncias verificadas entre cada ponto a partir do GPS. A distância geográfica constituiu a variável independente nesta análise.

Para se identificar a ocorrência de possíveis barreiras biogeográficas ao longo da área de amostragem, utilizamos o algoritmo de Monmonier (Monmonier, 1973), implementado nos programas AIS (*Alleles In Space*) (Miller, 2005) e Barrier 2.2 (Manni *et al.*, 2004) (apenas para *D. hanleyanus*), através da distância genética bruta, onde a maior distância genética entre quaisquer duas localidades forma o segmento inicial da possível barreira. Além disto, a correlação entre as distâncias geográfica e genética, entre todos os pares de indivíduos, foi testada através do teste de Mantel (Mantel, 1967) com 1000 replicações, utilizando-se o programa Arlequin 3.11 (Schneider *et al.*, 2000). Foram

também realizadas análises de autocorrelação espacial no programa AIS, tendo os dados sido divididos em classes iguais de distância e diferentes números de observações (número de indivíduos amostrados por classe) para todas as espécies. O número de classes utilizado para cada espécie variou conforme o tamanho de sua área de amostragem, sendo que para *O. quadrata* optamos por excluir as amostras do Maranhão, a fim de não termos a existência de classes sem amostragem. Foram utilizadas 13 classes para *M. mactroides*, 30 classes para *D. hanleyanus*, 25 classes para *E. brasiliensis* e 14 classes para *O. quadrata*. Para todas estas análises a significância estatística foi testada através de 1000 permutações.

Com os resultados obtidos através do uso do algoritmo de Monmonier, foi possível dividir os pontos de coleta em dois grupos para realizar a análise da variância molecular (AMOVA) (Excoffier e Smouse, 1994) a partir das diferenças nucleotídicas (Φ_{st}) e também apenas usando a frequência dos haplótipos (F_{st} clássico) (Wright, 1978), utilizando-se 1000 permutações. O Φ_{st} e o F_{st} também foram calculados par a par entre os pontos de coleta. Testes de AMOVA também foram feitos em nível de população (pontos de amostragem).

Redes de haplótipos foram estimadas através do método *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999), com auxílio do programa Network 4.1.0.8 (www.fluxus-engineering.com).

Para evidenciar a existência de sinal de expansão populacional realizamos análises de *mismatch distribution* (Rogers e Harpending, 1992) com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações de *bootstrap* para cada espécie, com o programa Arlequin 3.11 (Schneider *et al.*, 2000).

O programa *Lamarck* 2.1 foi utilizado para as estimativas do parâmetro teta (θ) e da taxa de crescimento populacional, os quais foram utilizados para estimar o tamanho efetivo populacional atual (N_{e0}) e ancestral no tempo t (N_{et}) utilizando:

$$Ne_0 = \theta / (2 \cdot \mu \cdot g)$$

e

$$Ne_t = \theta t / 2(\mu \cdot g \cdot Ne_0)$$

onde μ é a taxa evolutiva por geração em unidades de mutação e g é o tempo de geração (Kuhner, 2006). As análises no *Lamarck* consistiram de três replicatas de 20 cadeias iniciais e duas cadeias longas finais. As cadeias iniciais foram processadas com 500 amostragens com intervalos de 20 e *burn-in* igual a 1000. As duas cadeias finais foram processadas com mesmo *burn-in* e intervalo de amostragem igual a 50, porém com 10000 amostragens registradas. Os intervalos de confiança para o cálculo de teta e taxa de crescimento foram calculados pela abordagem de percentil.

Baseado nas estimativas utilizadas na maior parte dos trabalhos evolutivos de invertebrados marinhos (Knowlton *et al.*, 1993; Hellberg e Vacquier, 1999; Rocha-Olivares *et al.*, 2001; Mathews *et al.*, 2002; Jolly *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2007), a taxa de substituição para o gene COI utilizada neste estudo foi de 2% por milhão de anos.

O tempo de geração para cada espécie foi estimado levando-se em conta características biológicas assim como longevidade e idade reprodutiva, tendo sido calculado com base em Graziottin *et al.* (2006), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Tempo de geração} = ((A + B)/2) - 10\% \text{ de } A$$

onde “A” é a idade mínima de maturidade sexual e “B” é o tempo mínimo de vida, ambos expressos em ano. Para todas as espécies “A” foi igual a um ano, enquanto que “B” foi igual a sete anos para *M. mactroydes* (Bergonci, 2005), três anos para *D. hanleyanus* (Gil, 2005) e dois anos para *E. brasiliensis* (Silveira, 1998) e *O. quadrata* (Alberto, 1995).

Para estimar a flutuação do tamanho populacional de cada espécie utilizamos o método *Bayesian Skyline Plot* (BSP) implementado no programa BEAST 1.4 (Drummond

e Rambaut, 2003) o qual foi utilizado também para inferir a data do ancestral comum mais recente (TMRCA) para os haplótipos de cada espécie. Na análise de BSP utilizou-se um modelo de relógio molecular (com a taxa de substituição de 2% por milhão de anos) relaxado, os modelos de substituição sugeridos pelo Modeltest v. 3.06 (Posada e Crandall, 1998) para cada espécie, e 10 000 000 cadeias para *M. mactroides*, 200 000 000 para *D. hanleyanus*, 300 000 000 para *E. brasiliensis* e 200 000 000 para *O. quadrata*.

Além disto, a data de expansão populacional foi calculada utilizando o valor do parâmetro “tau” (época da expansão) gerado na análise de *mismatch distribution* no Arlequin, e a taxa de substituição descrita acima.

4. RESULTADOS

4.1 Diversidade nas seqüências do gene COI

Algumas seqüências obtidas apresentaram substituições não-sinônimas, mas estas foram entre aminoácidos de mesma cadeia lateral, que não interferem na atividade protéica final. Além disso, não foram encontrados códons de terminação, sugerindo que nestas seqüências não estão representadas inserções nucleares.

Com exceção de *E. brasiliensis*, as demais espécies apresentaram alguns sítios homoplásicos (mais de um passo de substituição), detectados na análise de rede de haplótipos no programa Network 4.1.0.8. *O. quadrata* apresentou 16 sítios com alguma homoplasia, seguida de *D. hanleyanus*, com nove sítios e *M. mactroides* com quatro. Todos estes sítios foram minuciosamente reanalisados nos cromatogramas, sendo as suas seqüências confirmadas em todos os casos.

Os dados de diversidade genética, bem como os resultados dos testes de neutralidade e os índices de fixação Φ_{st} e F_{st} (indivíduos agrupados de acordo com a divisão geográfica proposta pelo algoritmo de Monmonier) estão expressos na tabela 3.

Tabela 3- Estatísticas básicas e índices de diversidade genética para cada espécie.

Índices	<i>M. mactroides</i>	<i>D. hanleyanus</i>	<i>E. brasiliensis</i>	<i>O. quadrata</i>
N	59	247	191	135
Pares de base	578	548	515	518
Número de sítios variáveis	22	44	10	46
H/Hd	22 / 0,87 ± 0,030	48 / 0,662 ± 0,0013	11 / 0,347 ± 0,0016	51 / 0,947 ± 0,0001
π (%)	0,31 ± 0,038	0,21 ± 0,018	0,077 ± 0,010	0,71 ± 0,051
D de Tajima	-1,796*	-2,448*	-1,805*	-1,715
D de Fu e Li	1,796	-5,661*	-4,076*	-3,531*
F de Fu e Li	-2,749*	-5,114*	-3,889*	-3,328*
Fs de Fu	-16,853*	-74,825*	-10,518*	-47,197*
Φ_{st}	0,431*	0,04*	0,37*	0,004
F_{st}	0,43*	0	0,53*	0,0003

N= Tamanho amostral; H= Número de haplótipos; Hd= Diversidade haplotípica;

π = Diversidade Nucleotídica (%); ± desvio padrão; * = Significante ($P < 0,05$).

De maneira geral, as espécies apresentaram baixos valores de diversidade nucleotídica e valores mais altos de diversidade haplotípica, entretanto *E. brasiliensis* apresentou diversidade nucleotídica tão baixa quanto a sua diversidade haplotípica. Além disto, todos os testes de neutralidade mostraram valores negativos e significantes (com

exceção do D de Tajima de *O. quadrata* e do D de Fu e Li para *M. mactroides*), claramente sugerindo cenários de gargalos de garrafa populacional seguidos de expansão forte.

Os valores de Φ_{st} e F_{st} apresentaram-se semelhantes entre si para todas as espécies, sugerindo estruturação populacional alta para *M. mactroides* e *E. brasiliensis*, e baixa para *D. hanleyanus* e *O. quadrata*.

Os valores de diversidade genética nas áreas de coleta, apresentados nas tabelas 4-7, de uma maneira geral mostram para cada espécie valores bastante semelhantes ao longo da distribuição geográfica, apesar de alguns pontos apresentarem valores mais discrepantes.

Tabela 4- Diversidade genética por pontos de coleta para *Mesodesma mactroides*.

Locais de Coleta/Índices de diversidade genética	N	H	Hd	SD (HD)	π (%)	SD (π)
Enseada/Ilha Comprida (SP)	13	5	0,769	0,099	0,333	0,00075
FSM/Torres (SC/RS)	17	8	0,772	0,097	0,313	0,00079
Tramandaí/Mostardas (RS)	13	8	0,859	0,089	0,244	0,00044
Cassino/Ponto Médio/Chui (RS)	16	7	0,842	0,059	0,226	0,00034

N= tamanho amostral; H= Número de haplótipos; Hd= Diversidade haplotípica;

π = Diversidade nucleotídica; FSM= Farol de Santa Marta; SD= Desvio padrão.

Tabela 5- Diversidade genética por pontos de coleta para *Donax hanleyanus*.

Locais de Coleta/Índices	N	H	Hd	SD (HD)	π (%)	SD (π)
Itaunas/Itapoã/Copacabana (ES/RJ)	16	5	0,6	0,127	0,128	0,00034
Cocanha (SP)	10	3	0,511	0,164	0,101	0,00037
Enseada (SP)	10	5	0,667	0,163	0,292	0,00110
Peruíbe (SP)	10	6	0,867	0,085	0,349	0,00055
Ilha Comprida (SP)	10	8	0,956	0,059	0,418	0,00052
Pontal do Sul (PR)	10	5	0,667	0,163	0,219	0,00086
Itapoá/Barra do Sul (SC)	14	8	0,769	0,120	0,253	0,00067
Piçarras/Palmas (SC)	15	6	0,714	0,116	0,292	0,00078
Praia do Sonho/FSM (SC)	12	4	0,455	0,170	0,091	0,00038
Torres/Tramandaí (RS)	13	7	0,731	0,133	0,295	0,00094
Mostardas/Cassino (RS)	16	8	0,758	0,110	0,236	0,00059
Ponto Médio (RS)	11	3	0,564	0,134	0,192	0,00051
Chui (RS)	10	5	0,756	0,130	0,223	0,00053
La Paloma/La Pedrera (Uruguai)	19	8	0,647	0,120	0,197	0,00052
Jose Ignacio (Uruguai)	12	3	0,439	0,158	0,086	0,00034
San Clemente (Argentina)	13	2	0,154	0,126	0,028	0,00023
Villa Gesell (Argentina)	12	8	0,894	0,078	0,238	0,00041
Mar del Plata (Argentina)	23	9	0,585	0,122	0,173	0,00049

N= tamanho amostral; H= Número de haplótipos; Hd= Diversidade haplotípica;

π = Diversidade nucleotídica; FSM= Farol de Santa Marta; SD= Desvio padrão.

Tabela 6- Diversidade genética por pontos de coleta para *Emerita brasiliensis*.

Locais de Coleta/Índices	N	H	Hd	SD (HD)	π (%)	SD (π)
Itaúnas/Itapoã (ES)	22	4	0,515	0,111	0,132	0,00034
Copacabana/Picinguaba (RJ/SP)	18	3	0,569	0,071	0,123	0,00022
Enseada/Peruíbe (SP)	17	2	0,309	0,122	0,06	0,00024
Ilha Comprida (SP)	10	1	0	0,000	0	0,00000
Ilha do Mel (PR)	10	2	0,02376	0,154	0,078	0,00060
Barra do Sul/Piçarras/Palmas (SC)	26	3	0,151	0,093	0,03	0,00019
Praia do Sonho (SC)	10	1	0	0,000	0	0,00000
Farol de Santa Marta (SC)	10	3	0,378	0,181	0,078	0,00040
Torres (RS)	13	1	0	0,000	0	0,00000
Tramandaí/Mostardas (RS)	16	2	0,125	0,106	0,024	0,00021
Ponto Médio/Chui (RS)	16	3	0,242	0,135	0,07	0,00041
Cabo Polônio/La Paloma/Piriápolis (Uruguai)	18	2	0,111	0,096	0,022	0,00019

N= tamanho amostral; H= Número de haplótipos; Hd= Diversidade haplotípica;

π = Diversidade nucleotídica; SD= Desvio padrão.

Tabela 7- Diversidade genética por pontos de coleta para *Ocypode quadrata*.

Locais de Coleta/Índices	N	H	Hd	SD (HD)	π (%)	SD (π)
Ilha dos Lençóis (MA)	8	7	0,964	0,077	0,490	0,00084
Itapoã/Itaúnas (ES)	19	13	0,953	0,031	0,831	0,00156
Iriri (RJ)	10	8	0,956	0,059	0,596	0,00143
Itaguapé (SP)	10	7	0,911	0,077	0,764	0,00150
IC/Pontal do Sul/Barra do Sul (SP/PR/SC)	21	12	0,924	0,038	0,517	0,00083
Pinheira/Farol de Santa Marta (SC)	17	12	0,934	0,046	0,886	0,00139
Arroio do Silva/Torres (SC/RS)	13	10	0,949	0,051	0,698	0,00163
Mostardas/Cassino (RS)	18	12	0,954	0,030	0,699	0,00105
Ponto Médio/Chui (RS)	19	11	0,889	0,058	0,768	0,00155

N= tamanho amostral; H= Número de haplótipos; Hd= Diversidade haplotípica;

π = Diversidade nucleotídica; IC= Ilha Comprida; SD= Desvio padrão.

4.2 Detecção de Barreiras Biogeográficas

A análise utilizando o algoritmo de Monmonier para detecção de possíveis barreiras entre as populações apresentou resultados diferentes para cada espécie (Figura 7). Para *M. mactroides* a barreira principal divide as amostras entre os pontos Ilha Comprida, SP e Farol de Santa Marta, SC, enquanto que para *E. brasiliensis* a divisão de grupos foi entre Copacabana, RJ e Picinguaba, SP. *Ocypode quadrata* foi dividida entre Mostardas, RS e Cassino, RS, e *D. hanleyanus* entre Enseada e Prainha/Peruíbe ambos em SP.

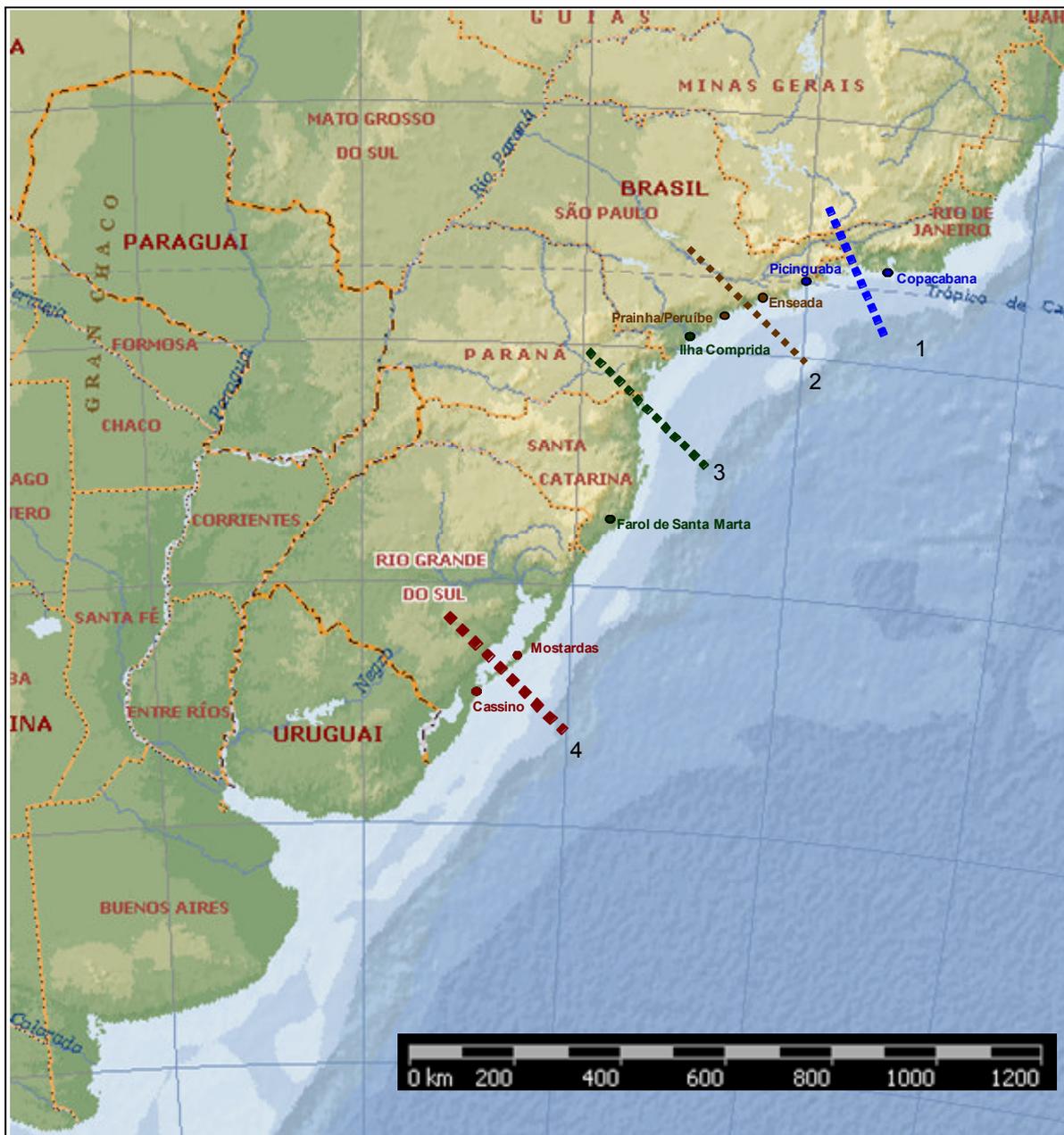


Figura 7- Barreiras encontradas pelo teste utilizando-se o algoritmo de Monmonier para as espécies 1: *E. brasiliensis*, 2: *D. hanleyanus*, 3: *M. mactroides*, e 4: *O. quadrata*.

4.3 Redes de Haplótipos do gene COI

A análise da rede de haplótipos mostra para *M. mactroides* (Figura 8) a presença de dois haplótipos mais frequentes de onde irradiam os demais, separados praticamente por apenas uma mutação. Além disto, há dois grupos de haplótipos com boa estruturação geográfica, um com quase 90% dos haplótipos incluídos na região ao sul da barreira gerada pelo algoritmo de Monmonier (entre Ilha Comprida, SP e Farol de Santa Marta), e outro ao norte. No grupo sul há um alto compartilhamento de haplótipos entre as populações amostradas (não identificadas na figura). Não é possível estabelecer nenhuma tendência geográfica na relação entre os haplótipos de cada um dos dois grupos geográficos, já que esta relação ocorre no mesmo grau entre as populações mais distantes ou mais próximas geograficamente (não representados na figura).

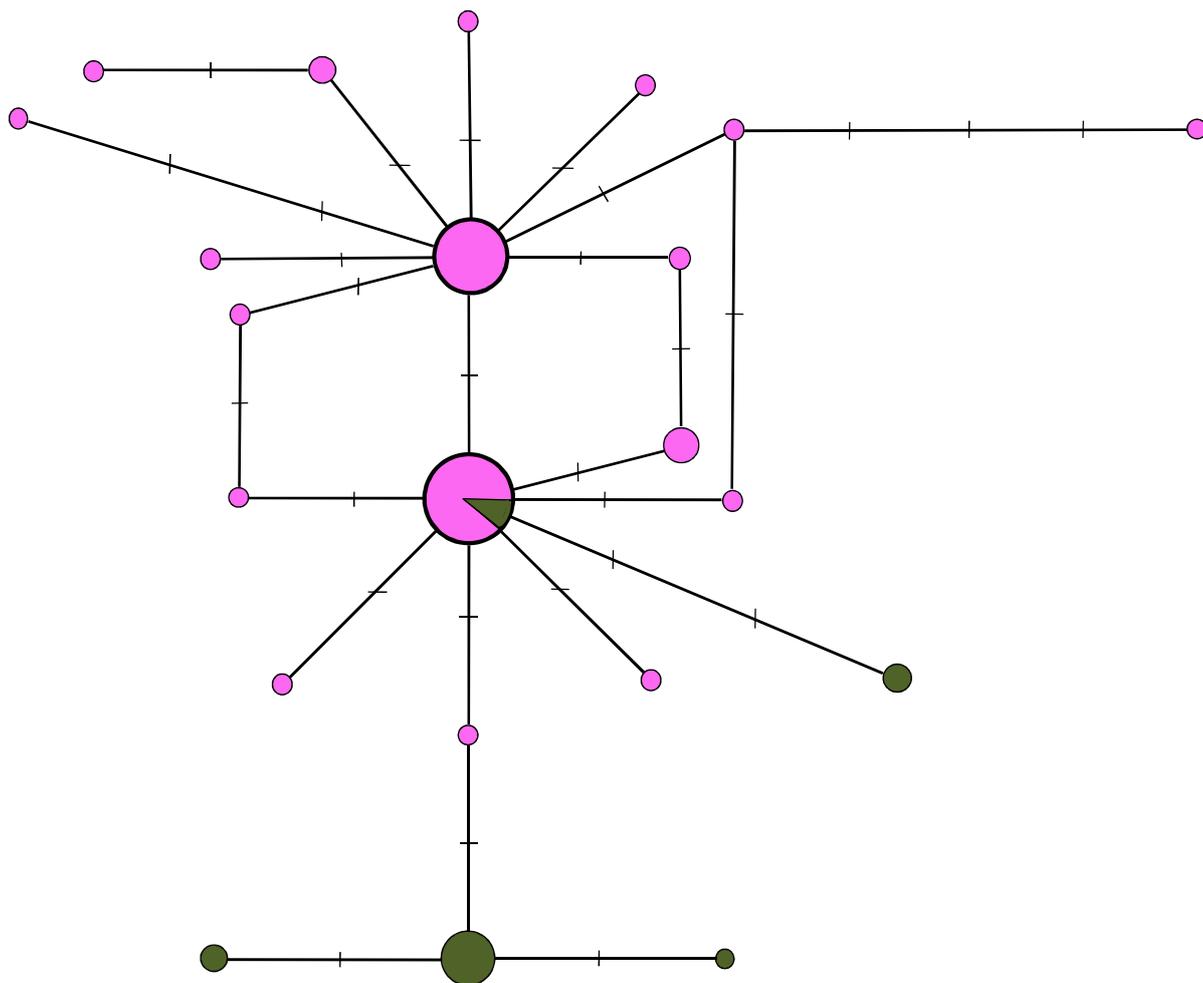


Figura 8- Rede de haplótipos de *M. mactroides*. Rosa= Grupo ao sul da barreira gerada pelo algoritmo de Monmonier (incluindo do Chui, RS até Farol de Santa Marta, SC), Verde= Grupo ao norte da barreira (Ilha Comprida, SP e Enseada, SP).

Na rede de haplótipos de *D. hanleyanus* (Figura 9) temos a presença de um haplótipo central de onde partem a maioria dos outros haplótipos, separados por apenas uma mutação, além de um segundo haplótipo mais freqüente que apresenta um padrão semelhante, mas em menor escala. Este é um padrão claramente identificado com um *bottleneck* populacional seguido de expansão populacional rápida. Como neste caso não foi possível obter resultados pelo algoritmo de Monmonier, os haplótipos estão divididos politicamente pelos estados brasileiros, Uruguai e Argentina.

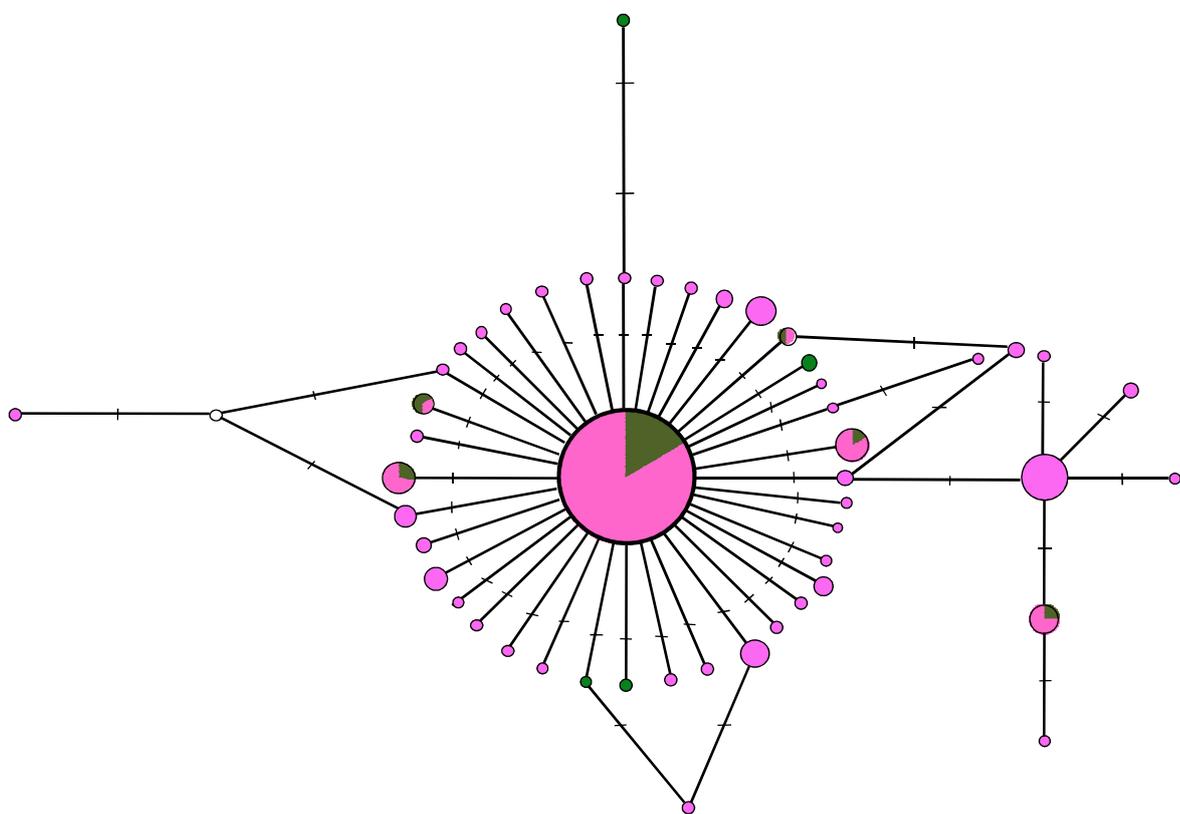


Figura 9- Rede de haplótipos de *D. hanleyanus*. Rosa= Grupo ao sul da barreira gerada pelo algoritmo de Monmonier (incluindo de Mar Del Plata, Argentina até Prainha/Peruíbe, SP), Verde= Grupo ao norte da barreira (Enseada, SP até Itaúnas, ES). Branco= haplótipo não amostrado, gerado pelo programa.

Na rede de haplótipos de *E. brasiliensis* (Figura 10) todos os haplótipos estão separados por apenas uma mutação, com dois haplótipos mais centrais de onde irradiam os outros, que também são indicativos de expansão populacional. O padrão geral desta espécie é semelhante ao de *M. mactroides*, porém com menor número de haplótipos. Não encontramos um padrão de estruturação muito forte nesta análise, apesar de indicado pelos valores altos de Φ_{st} e F_{st} . A maior parte dos haplótipos do sul estão no grupo à esquerda da figura, enquanto que a maioria dos haplótipos do norte encontra-se no outro grupo, entretanto existe um compartilhamento de haplótipos entre norte e sul (divididos pelo algoritmo de Monmonier).

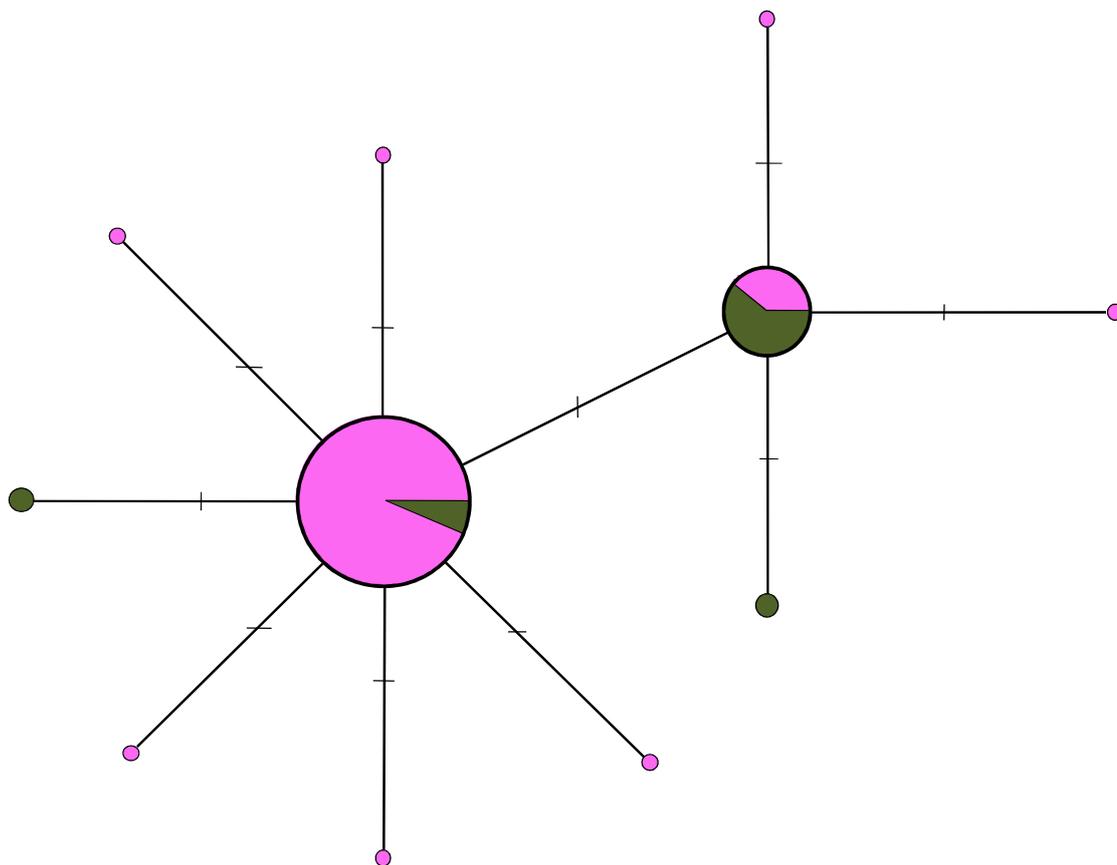


Figura 10- Rede de haplótipos de *E. brasiliensis*. Rosa= Grupo ao sul da barreira gerada pelo algoritmo de Monmonier (Picinguaba, SP - Piriápolis, Uruguai), Verde= Grupo ao norte da barreira (Copacabana, RJ – Itaúnas, ES).

A rede de haplótipos de *O. quadrata* (Figura 11) é a que apresenta maior complexidade, tendo dois haplótipos centrais mais comuns com um padrão de irradiação, ocorrendo, entretanto com uma grande quantidade de outros haplótipos mais divergentes, com frequência intermediária. Pode também ser observado um alto compartilhamento de haplótipos entre as populações.

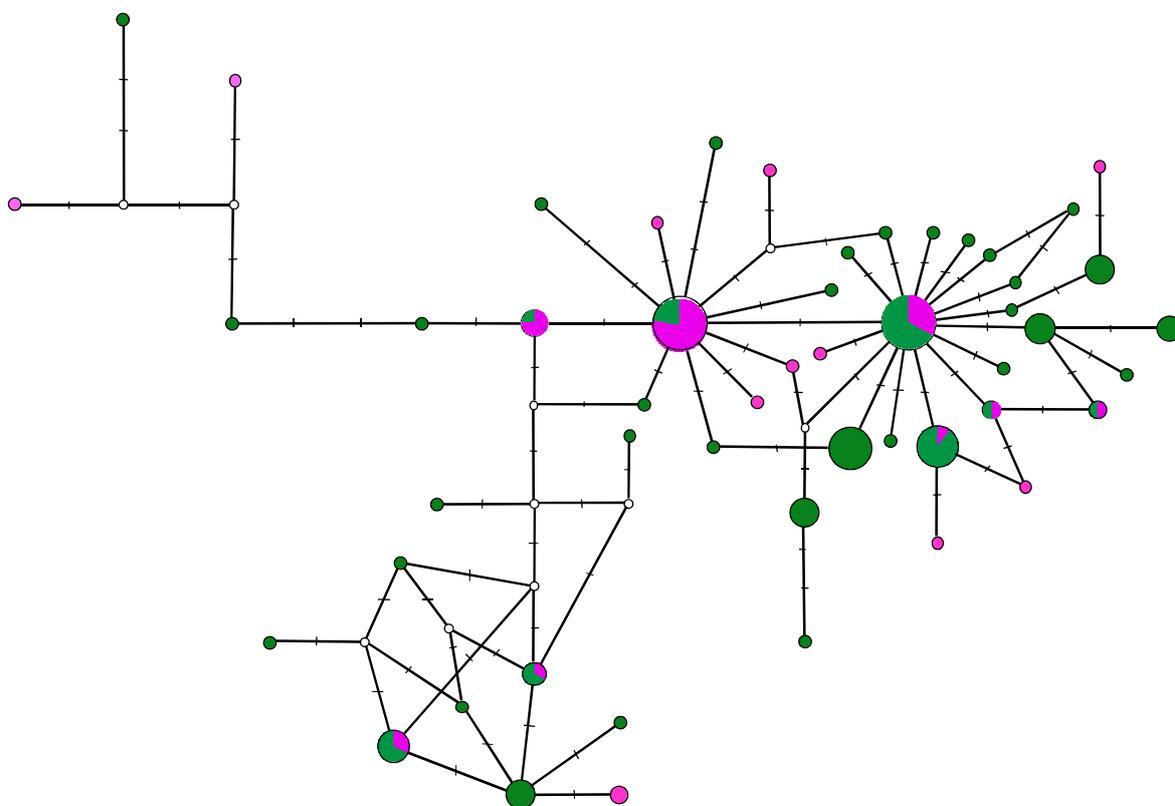


Figura 11- Rede de haplótipos de *O. quadrata*. Rosa= Grupo ao sul da barreira gerada pelo algoritmo de Monmonier (incluindo do Chui, RS até Mostardas, RS), Verde= Grupo ao norte da barreira (Tramandaí, RS até Ilha dos Lençóis, MA).

4.4 Índices de Fixação Φ_{st} e F_{st} e Análise da Variância Molecular (AMOVA)

A análise de Φ_{st} e F_{st} par a par entre os pontos de coleta apresentaram valores significativos separando praticamente as mesmas amostras separadas pelo algoritmo de Monmonier para as espécies *M. mactroides* (Tabela 8) e *E. brasiliensis* (Tabela 9), curiosamente diferindo nesta espécie que apresentou a barreira do Monmonier entre Copacabana, RJ e Picinguaba, SP, e diferenciação do Φ_{st} e F_{st} nas amostras de Picinguaba e ES com exclusão de Copacabana, RJ. *O. quadrata* (Tabela 10) apenas pelo F_{st} apresentou uma diferenciação entre o Ponto Médio (RS) e alguns outros pontos, e *D. hanleyanus* (Tabela 11) apresentou valores divergentes também apenas pelo F_{st} entre Ilha Comprida (SP) e os demais.

Tabela 8- Resultado dos testes de Φ_{st} e F_{st} par a par entre os pontos de amostragem para *M. mactroides*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Chui (RS)		-	-	-	-	-	-	+	-
2 Ponto Médio (RS)	-		-	-	+		-	+	+
3 Cassino (RS)	-	-		-	-	-	-	+	+
4 Mostardas (RS)	-	-	-		-	-	-	+	-
5 Tramandaí (RS)	-	+	-	-		-	-	+	+
6 Torres (RS)	-	-	-	-	-		-	+	+
7 Farol de Santa Marta (SC)	-	-	-	-	-	-		+	+
8 Ilha Comprida (SP)	+	+	+	+	+	+	+		-
9 Indaiá (SP)	+	+	+	-	+	+	-	-	

Sinal positivo= $\Phi_{st} > 0,05$ e significativo ($p < 0,05$); sinal negativo= $\Phi_{st} < 0,05$.

Triângulo superior= F_{st} ; Triângulo inferior= Φ_{st} ;

Hachurado em azul= destaque aos valores de Φ_{st} e F_{st} significativamente divergentes.

Tabela 9- Resultado dos testes de Φ_{st} e F_{st} par a par entre os pontos de amostragem para *E. brasiliensis*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1 Piriápolis (Uruguai)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 La Paloma (Uruguai)			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
3 Cabo Polônio (Uruguai)				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
4 Chui (RS)					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
5 Ponto Médio (RS)						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
6 Cassino (RS)							-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7 Mostardas (RS)								-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
8 Tramandaí (RS)									-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
9 Torres (RS)										-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
10 Farol de Santa Marta (SC)											-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
11 Praia do Sonho (SC)												-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
12 Palmas (SC)													-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
13 Piçarras (SC)														-	-	-	-	-	+	-	+	+	
14 Barra do Sul (SC)															-	-	-	-	+	-	+	+	
15 Ilha do Mel (PR)																-	-	-	+	-	+	+	
16 Ilha Comprida (SP)																	-	-	+	-	+	+	
17 Peruíbe (SP)																		-	-	-	-	+	-
18 Indaiá (SP)																			-	-	-	+	-
19 Picinguaba (SP)																						-	-
20 Copacabana (RJ)																						+	-
21 Itapoã (ES)																							-
22 Itaúnas (ES)																							

Sinal positivo = $\Phi_{st} > 0,05$ e significativo ($p < 0,05$); sinal negativo = $\Phi_{st} < 0,05$.

Triângulo superior= F_{st} ; Triângulo inferior= Φ_{st}

Hachurado em azul= destaque aos valores de Φ_{st} e F_{st} significativamente divergentes.

Tabela 10- Resultado dos testes de Φ_{st} e F_{st} par a par entre os pontos de amostragem para *O. quadrata*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 Chui (RS)		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 Ponto Médio (RS)	-		-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
3 Cassino (RS)	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 Mostardas (RS)	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 Torres (RS)	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 Farol de Santa Marta (SC)	-	-	-	-	-		+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
7 Arroio do Silva (SC)	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-
8 Pinheira (SC)	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
9 Barra do Sul (SC)	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	+	-
10 Pontal do Sul (PR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
11 Ilha Comprida (SP)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		-	-	-	-	-
12 Itaguapé (SP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
13 Iriri (RJ)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
14 Itapoã (ES)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
15 Itaúnas (ES)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
16 Ilha dos Lençóis (MA)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Sinal positivo = $\Phi_{st} > 0,05$ e significativo ($p < 0,05$); sinal negativo = $\Phi_{st} < 0,05$.

Triângulo superior= F_{st} ; Triângulo inferior= Φ_{st} .

Tabela 11- Resultado dos testes de Φ_{st} e F_{st} par a par entre os pontos de amostragem para *D. hanleyanus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 Mar del Plata (Argentina)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2 Villa Gessel (Argentina)	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 San Clemente (Argentina)	+	-		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
4 José Ignacio (Uruguai)	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
5 La Pedrera (Uruguai)	+	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
6 Chui (RS)	+	-	+	+	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 Ponto Médio (RS)	+	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
8 Cassino (RS)	+	-	+	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 Mostardas (RS)	-	+	+	+	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 Tramandaí (RS)	-	-	+	+	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11 Torres (RS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
12 Farol de Santa Marta (SC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
13 Praia do Sonho (SC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
14 Palmas (SC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 Piçarras (SC)	-	+	-	+	+	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16 Barra do Sul (SC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17 Itapoá (SC)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18 Pontal do Sul (PR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
19 Ilha Comprida (SP)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 Peruíbe (SP)	+	+	-	+	+	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21 Indaiá (SP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22 Cocanha (SP)	-	-	-	-	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
23 Copacabana (RJ)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 Itapoã (ES)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25 Itaúnas (ES)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-

Sinal positivo = $\Phi_{st} > 0,05$ e significativo ($p < 0,05$); sinal negativo = $\Phi_{st} < 0,05$.

Triângulo superior = F_{st} ; Triângulo inferior = Φ_{st} .

O teste de Mantel apresentou correlação positiva e significativa entre as distâncias genética e geográfica apenas para *E. brasiliensis* ($r=0,14$ $p= 0,0009$), sendo também positiva, mas não significativa para *M. mactroides* ($r=0,1$ $p= 0,07$) e próxima a zero para *D. hanleyanus* ($r=-0,014$, $p= 0,68$), e para *O. quadrata* ($r=-0,00078$, $p= 0,49$). Estes resultados podem ser melhor visualizados através do teste de Autocorrelação Espacial, onde para *E. brasiliensis* nota-se um aumento contínuo da distância genética com o aumento da distância geográfica entre as populações, padrão compatível com a ocorrência de isolamento por distância (Fig. 12). Já para as outras espécies apenas algumas poucas classes de distância geográfica mostram valores de distância genética significativas (Figuras 13-15).

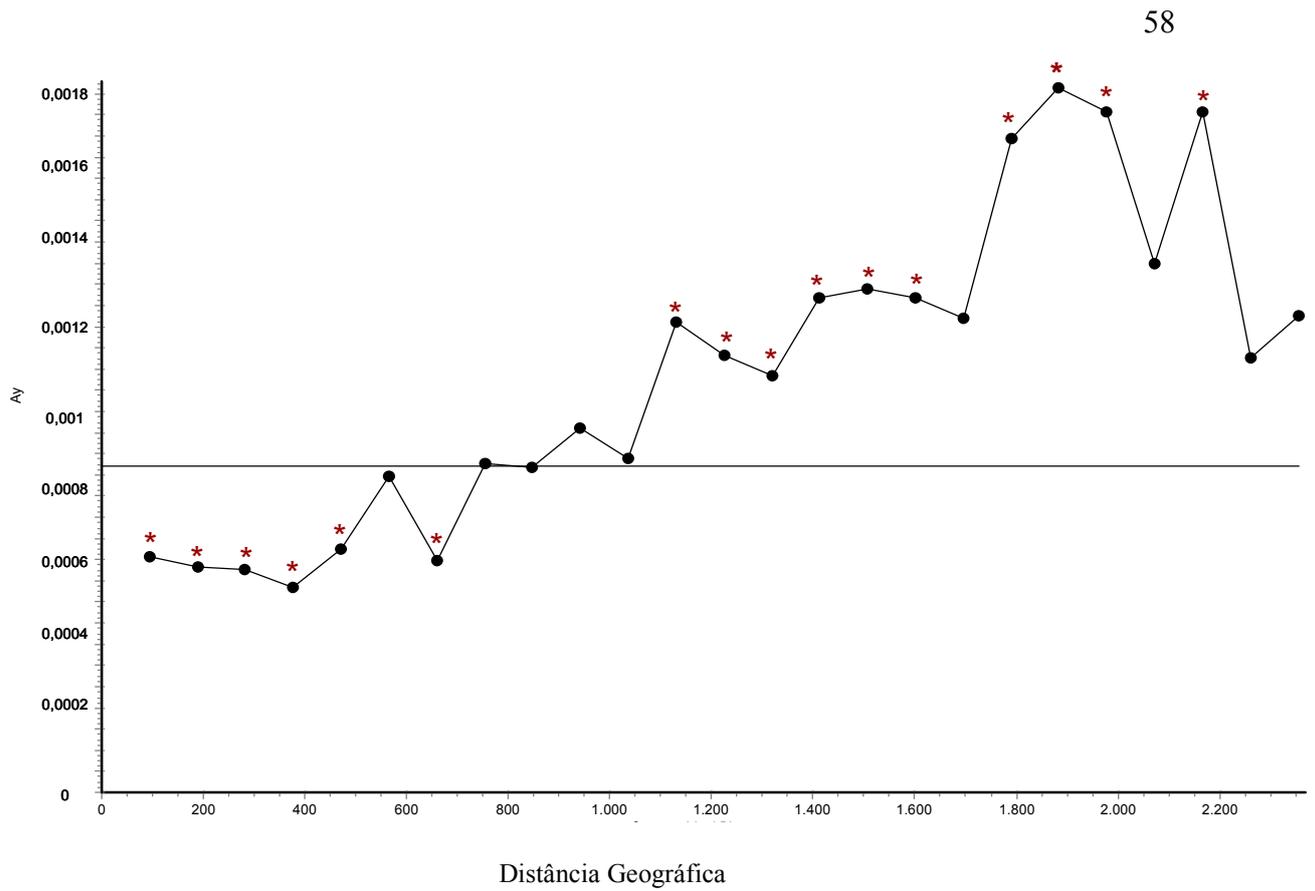


Figura 12- Análise de Autocorrelação Espacial para *E. brasiliensis*. Ay= média da distância genética entre pares de indivíduos. Linha paralela ao eixo “x” indica o valor médio de Ay para o grupo de dados. *= estatisticamente significante (p<0,05).

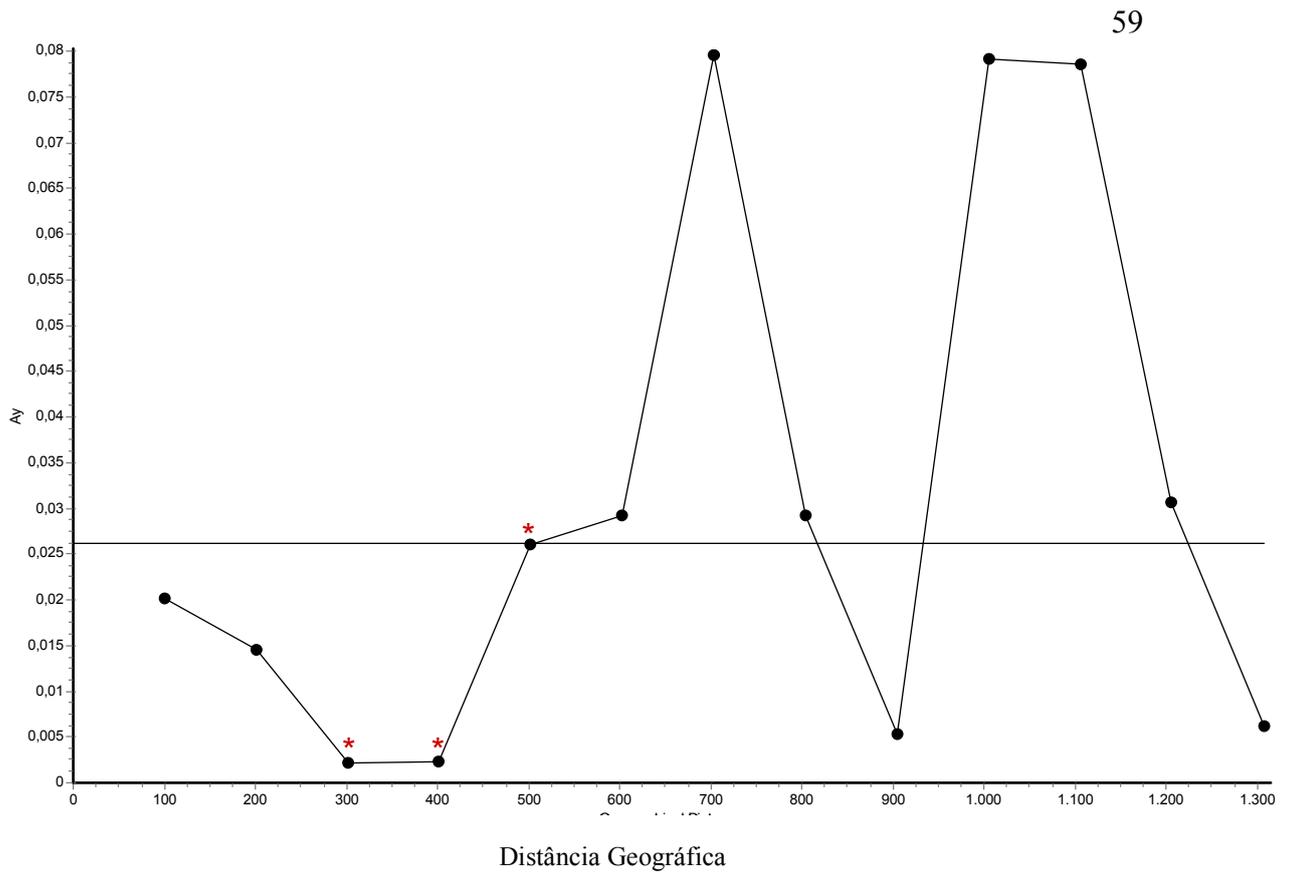


Figura 13- Análise de Autocorrelação Espacial para *M. mactroides*. Ay= média da distância genética entre pares de indivíduos. Linha paralela ao eixo “x” indica o valor médio de Ay para o grupo de dados. *= estatisticamente significante ($p < 0,05$).

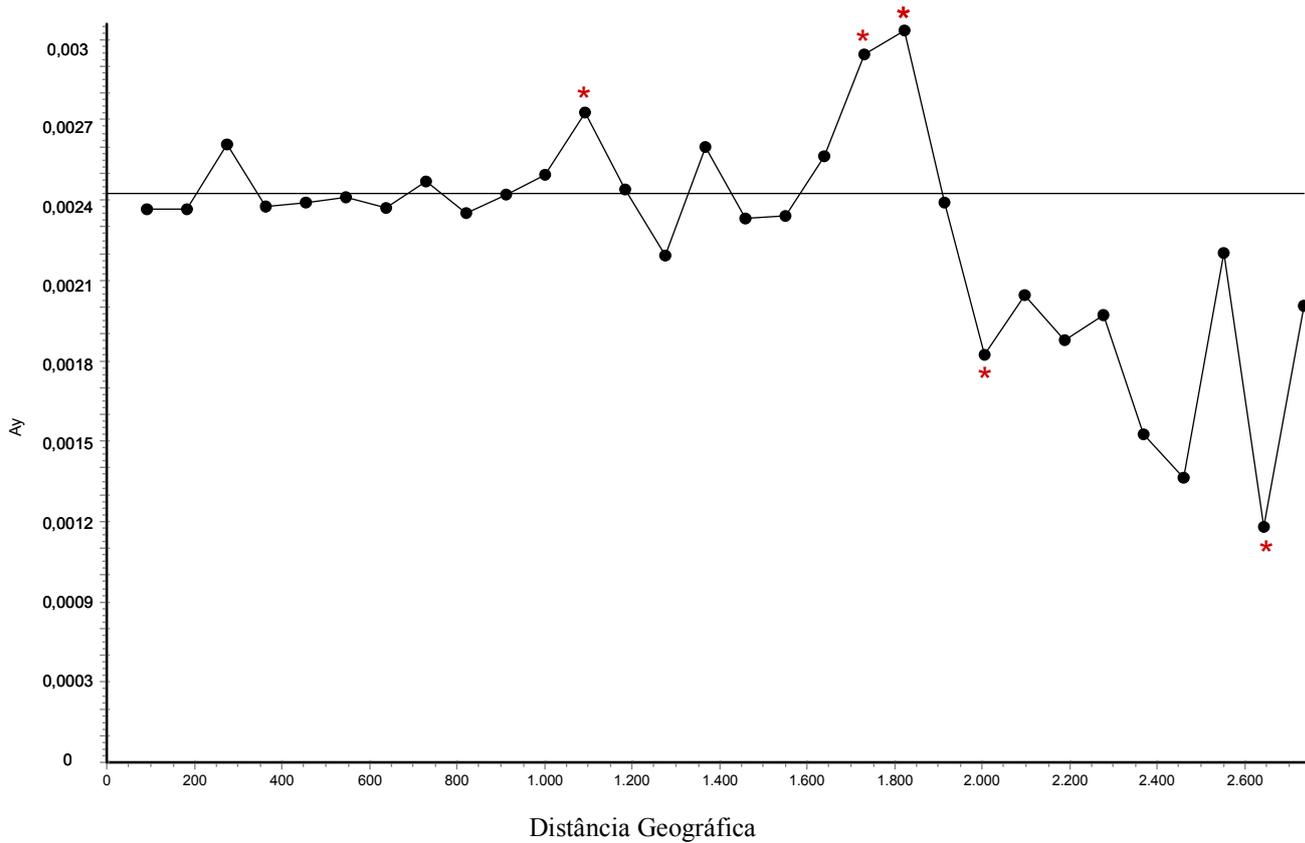


Figura 14- Análise de Autocorrelação Espacial para *D. hanleyanus*. Ay= média da distância genética entre pares de indivíduos. Linha paralela ao eixo “x” indica o valor médio de Ay para o grupo de dados. *= estatisticamente significante ($p < 0,05$).

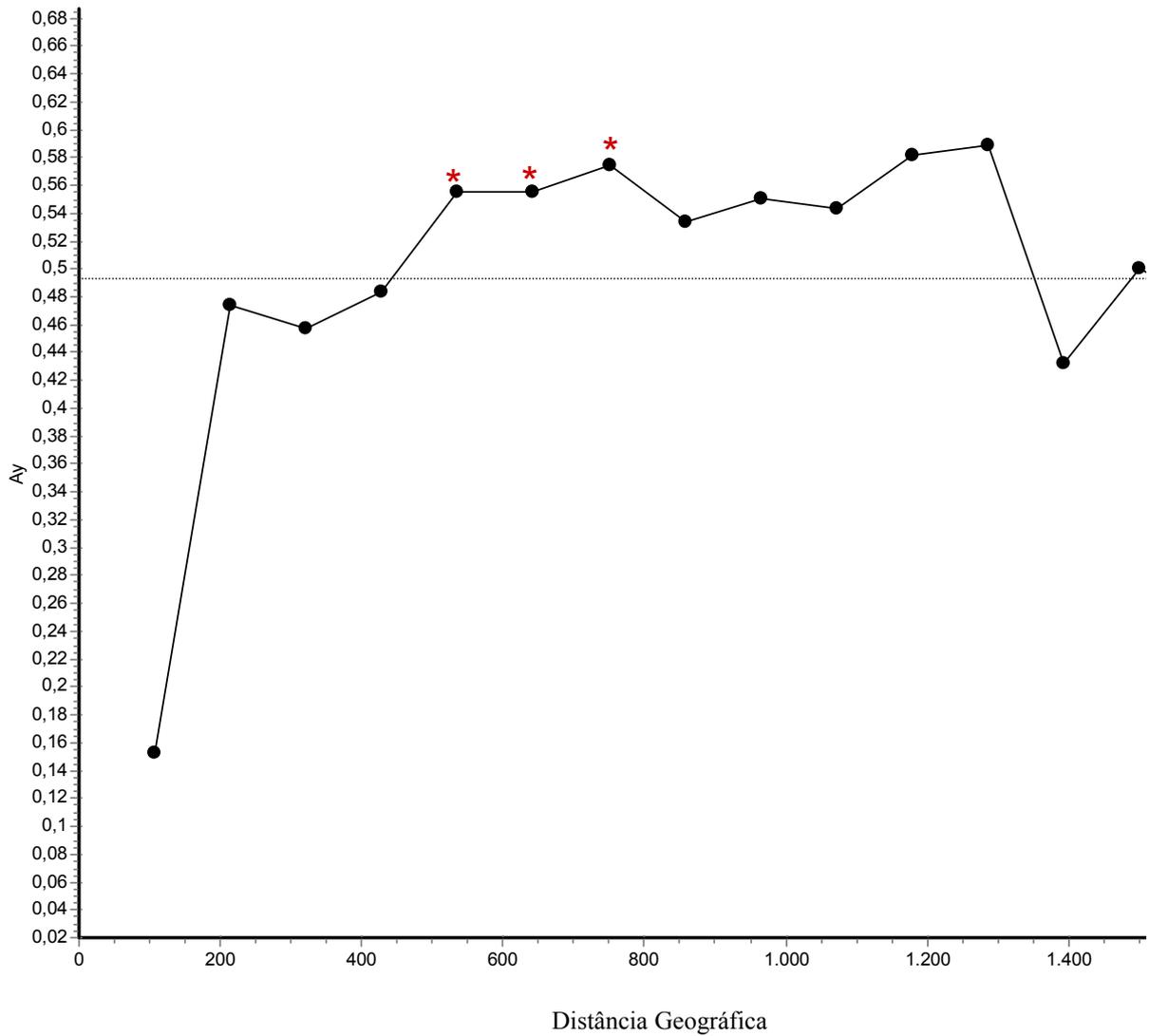


Figura 15- Análise de Autocorrelação Espacial para *O. quadrata*. Ay= média da distância genética entre pares de indivíduos. Linha paralela ao eixo “x” indica o valor médio de Ay para o grupo de dados. *= estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A análise da variância molecular (AMOVA) (Tabela 12) mostra dois padrões para os valores de variância intra e inter grupos (considerando que cada espécie está dividida em dois grupos de populações como sugeridos pela análise de algoritmo de Monmonier). Para *D. hanleyanus* e principalmente *O. quadrata* praticamente toda a diversidade encontra-se dentro das populações, enquanto que para *M. mactroides* e *E. brasiliensis* aproximadamente metade da variabilidade encontra-se dentro das populações e a outra metade entre os dois grupos de populações. A variância encontrada para o teste AMOVA considerando-se apenas em nível de população (cada ponto amostral, conforme a tabela 1) apresentou valores entre 18 e 30% da diversidade entre as populações para *M. mactroides* e *E. brasiliensis*, e entre 0,06 e 3 % para *O. quadrata* e *D. hanleyanus*.

Tabela 12- Resultados do teste de AMOVA.

Variância Φ_{st}/F_{st} (%) \ Espécies	<i>M. mactroides</i>	<i>D. hanleyanus</i>	<i>E. brasiliensis</i>	<i>O. quadrata</i>
Grupos de populações				
Entre os grupos	42,46 15,28	-0,06 0	47,46 50,29	-0,04 0,66
Entre as populações dentro dos grupos	0,7 0,15	3,95 0	6,04 6,19	0,08 2,7
Dentro das populações	56,84 84,57	96,10 100	46,5 43,52	99,97 96,65
<i>P</i>	0,0000 0,0000	0,00684 1,00	0,0000 0,0000	0,43109 0,47605
Nível de população				
Entre populações	18,15 23,37	3,93 35,58	29,30 29,29	0,06 8
Dentro das populações	81,85 76,63	96,07 64,42	70,70 70,71	99,94 92
<i>P</i>	0,0000 0,0000	0,00782 0,0000	0,0000 0,0000	0,42913 0,0000

P= significância estatística.

4.5 Expansão e Tamanho Populacional

Para as análises de flutuação histórica do tamanho populacional (*Bayesian Skyline Plot*) e tempo da coalescência (TMRCA), utilizamos os tempos de geração estimados em 3,9 anos para *M. mactroides*, 1,9 anos para *D. hanleyanus*, e 1,4 anos para *E. brasiliensis* e *O. quadrata*, e os modelos evolutivos sugeridos pelo Modeltest, que foram HKY para os dois moluscos e para *E. brasiliensis*, e GTR para *O. quadrata*.

Os TMRCA para os haplótipos deste gene para cada espécie obtido no BEAST apresentaram resultados bem distintos, tendo *E. brasiliensis* uma coalescência mais recente entre todas estas espécies, **57 mil anos atrás**, com um intervalo de confiança (IC) entre 7 a 146 mil anos, enquanto que *O. quadrata* parece ter uma história bem mais antiga, com ancestral comum mais recente de **508 mil anos atrás** (IC= 209 a 885 mil anos atrás). Os tempos de coalescência para *M. mactroides* e *D. hanleyanus* foram de **79 mil** (IC= 23 a 162 mil) e **107 mil** (IC=33 a 213 mil) anos atrás, respectivamente.

Os gráficos de BSP, que estimam a flutuação populacional através do tempo, sugerem uma expansão populacional forte (à semelhança dos testes de neutralidade) e relativamente recente para todas as espécies. Para *E. brasiliensis* (Figura 16) a expansão populacional parece ter sido muito rápida e com maior intensidade do que ocorreu com as demais espécies, bem como mais recente, tendo ocorrido entre 10 e 20 mil anos atrás. Nas demais espécies (Figuras 17-19) a expansão foi mais antiga, aproximadamente entre 70 e 100 mil anos atrás. Uma comparação entre todas as espécies pode ser visualizada na figura 20, sugerindo que a expansão para as três últimas espécies possa ter sido simultânea.

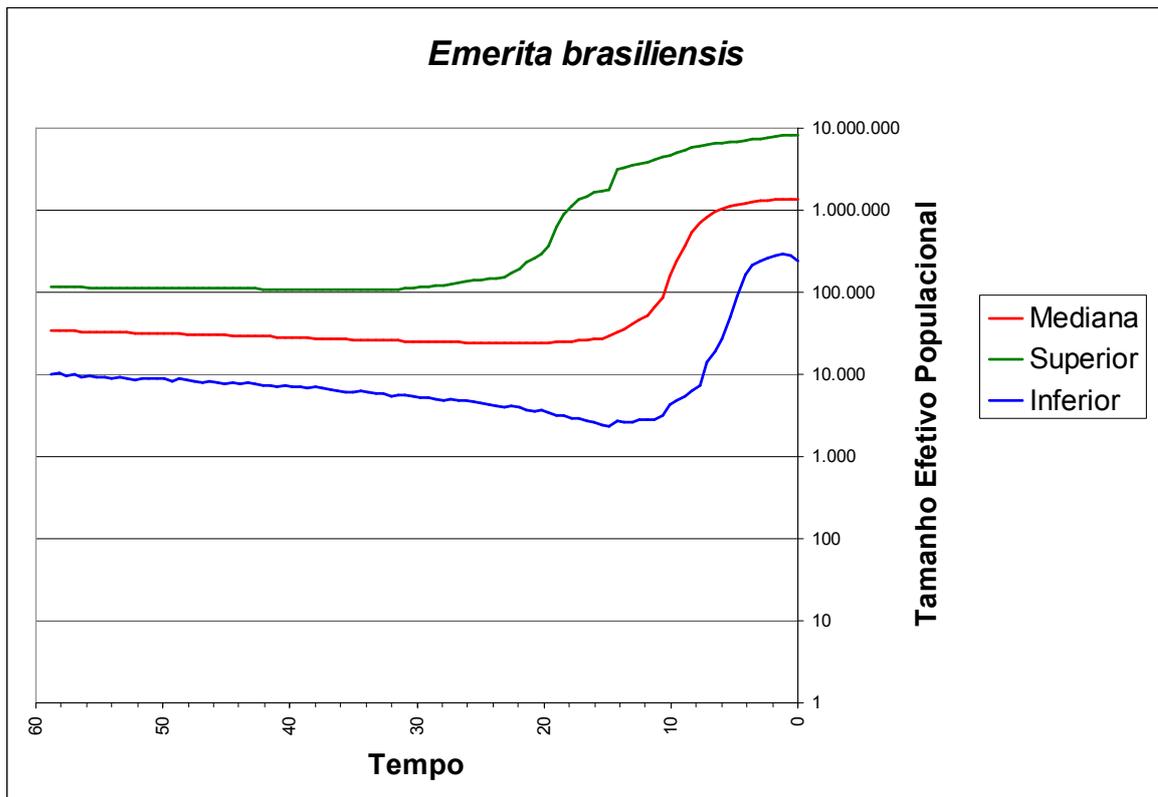


Figura 16- Análise *Bayesian Skyline plot* para a espécie *E. brasiliensis*. Superior e Inferior são os limites do intervalo de confiança.

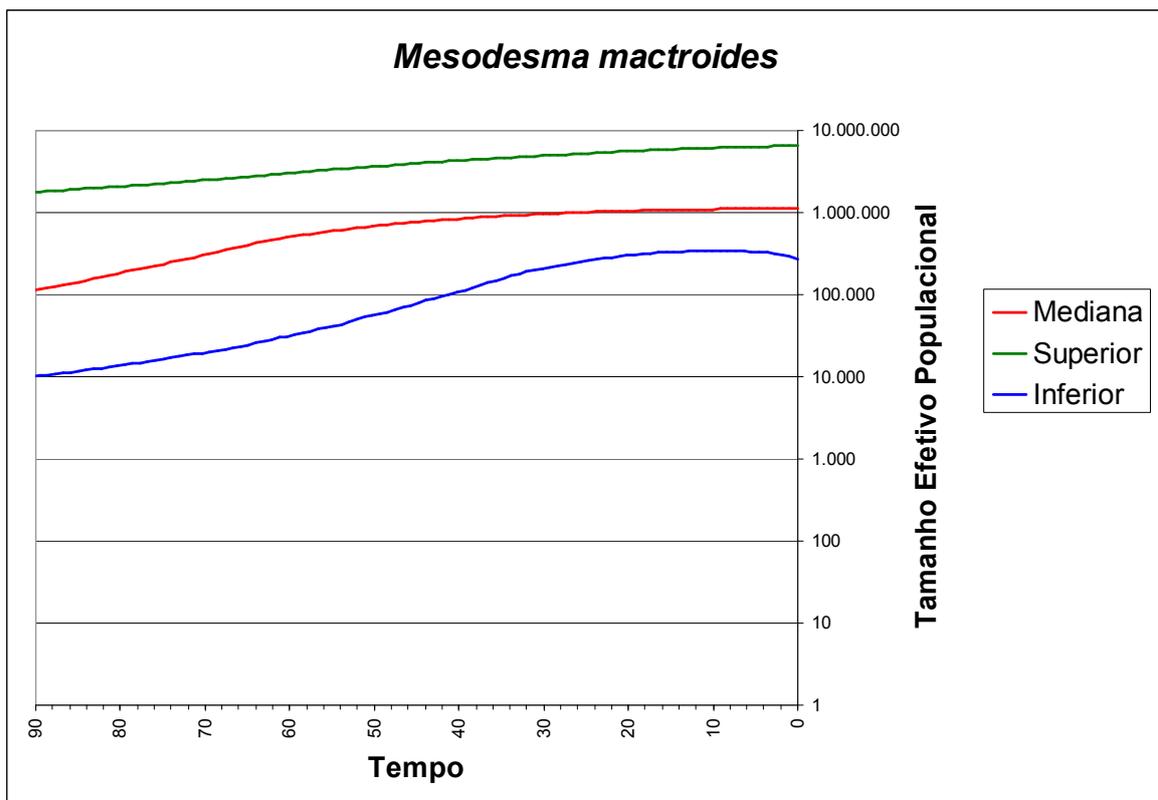


Figura 17- Análise *Bayesian Skyline plot* para a espécie *M. mactroides*. Superior e Inferior são os limites do intervalo de confiança.

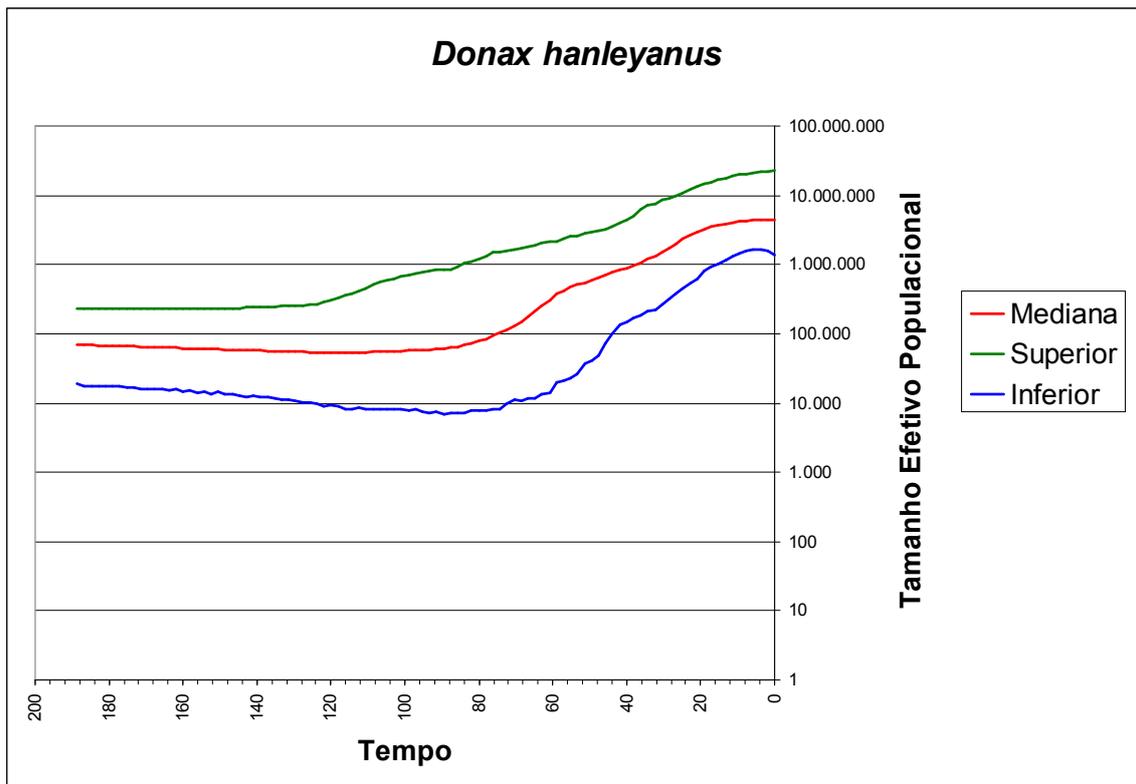


Figura 18- Análise *Bayesian Skyline plot* para a espécie *D. hanleyanus*. Superior e Inferior são os limites do intervalo de confiança.

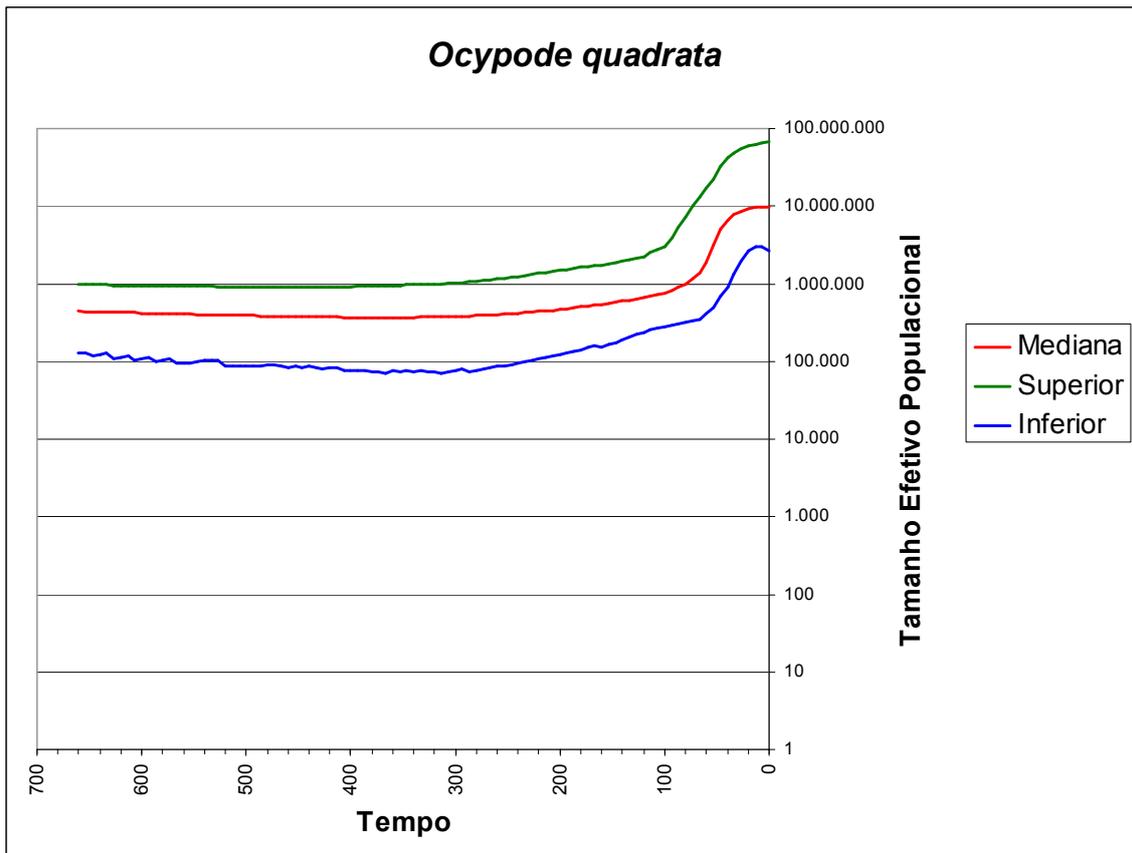


Figura 19- Análise *Bayesian Skyline plot* para a espécie *O. quadrata*. Superior e Inferior são os limites do intervalo de confiança.

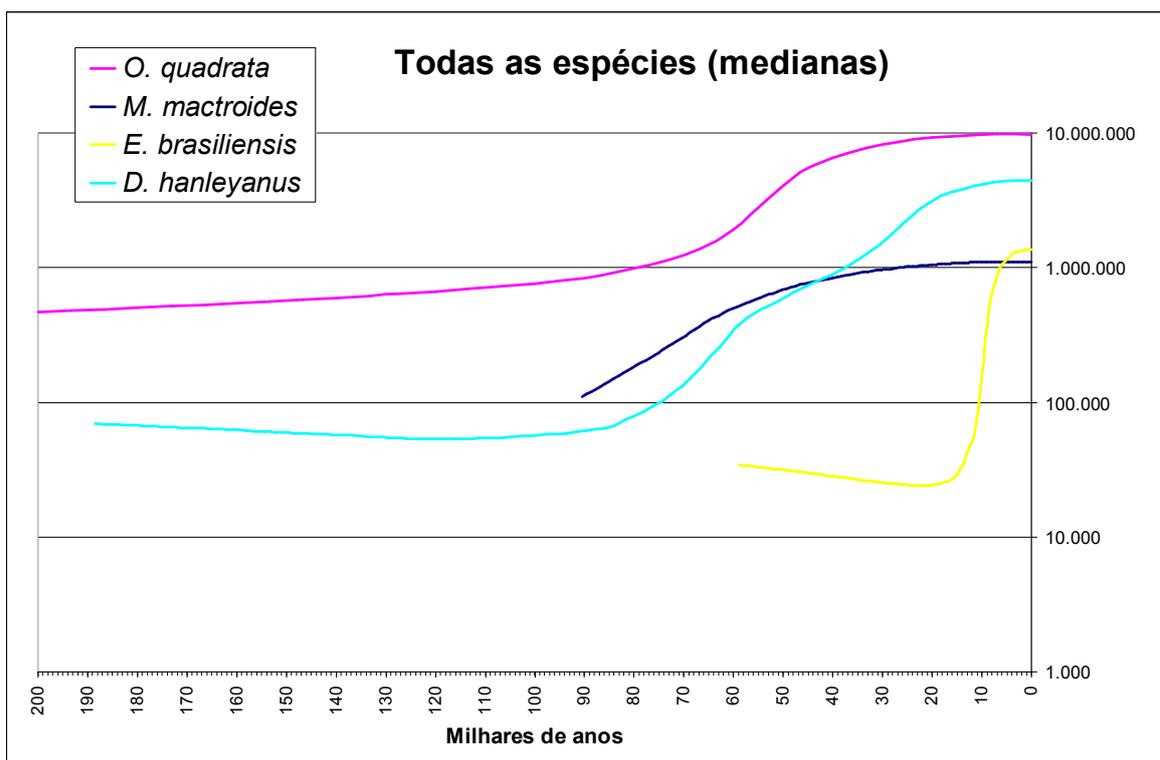


Figura 20- Análise *Bayesian Skyline Plot* para todas as espécies. Apenas a linha mediana é mostrada para facilitar a visualização.

A existência de expansão populacional foi corroborada pela análise de *mismatch distribution*, a qual mostra um sinal de expansão populacional súbita para as quatro espécies (Figuras 21-24). Porém, as datações de expansão populacional calculadas através do parâmetro “tau”, gerado na análise de *mismatch distribution* e corroborado através do programa DnaSP de modo geral apresentaram datas mais antigas do que as encontradas na análise *Bayesian Skyline Plot* (Tabela 13). O valor de “tau” para *E. brasiliensis* foi calculado pelo programa DnaSP, já que ocorreu um erro na análise para esta espécie no programa Arlequin.

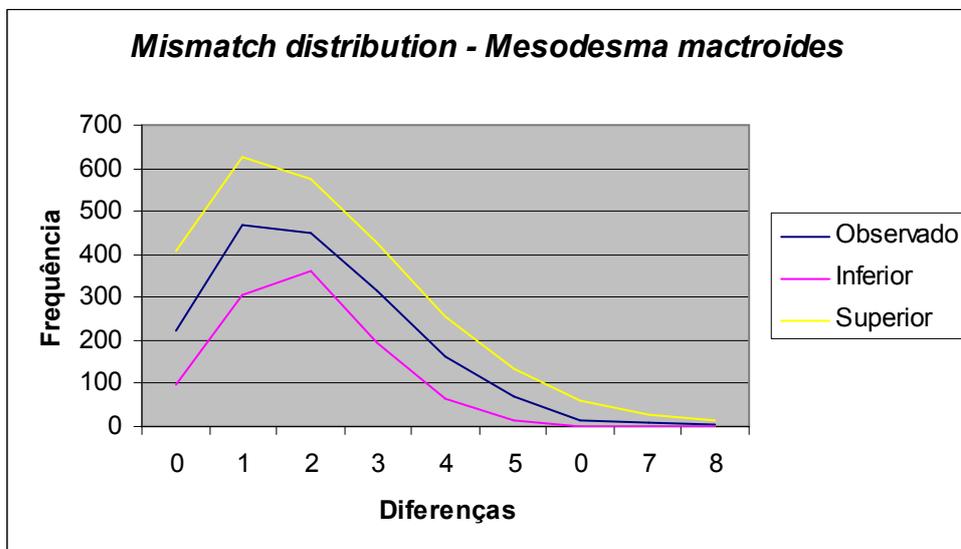


Figura 21- Análise de *mismatch distribution* para *M. mactroides*. Intervalo de confiança Superior e Inferior ($\alpha=0,05$ com 1000 replicações).

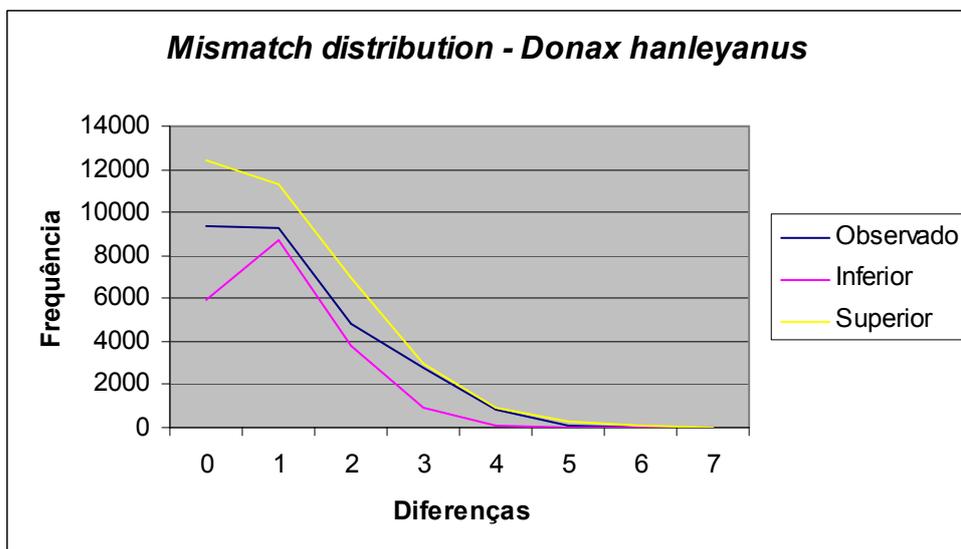


Figura 22- Análise de *mismatch distribution* para *E. brasiliensis*. Intervalo de confiança Superior e Inferior ($\alpha=0,05$ com 1000 replicações)

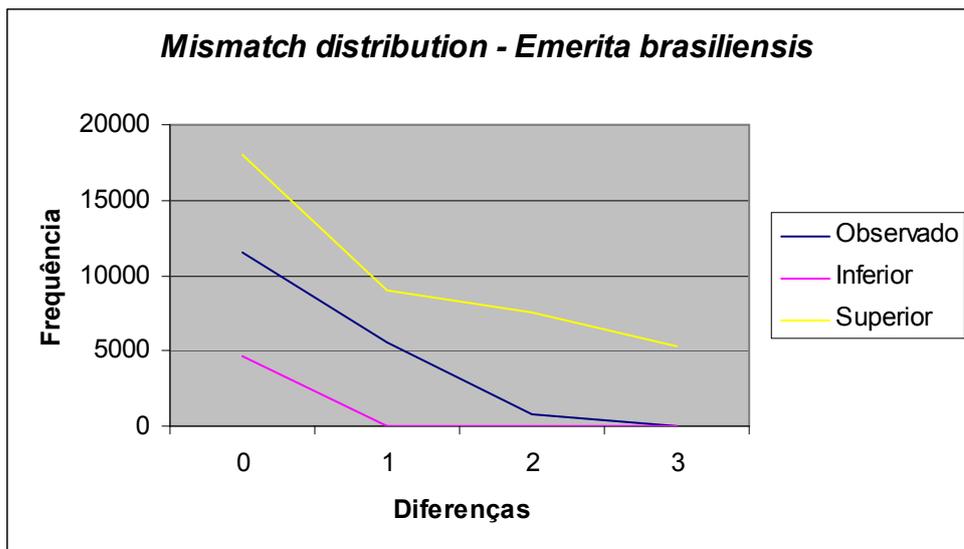


Figura 23- Análise de *mismatch distribution* para *D. hanleyanus*. Intervalo de confiança Superior e Inferior ($\alpha=0,05$ com 1000 replicações).

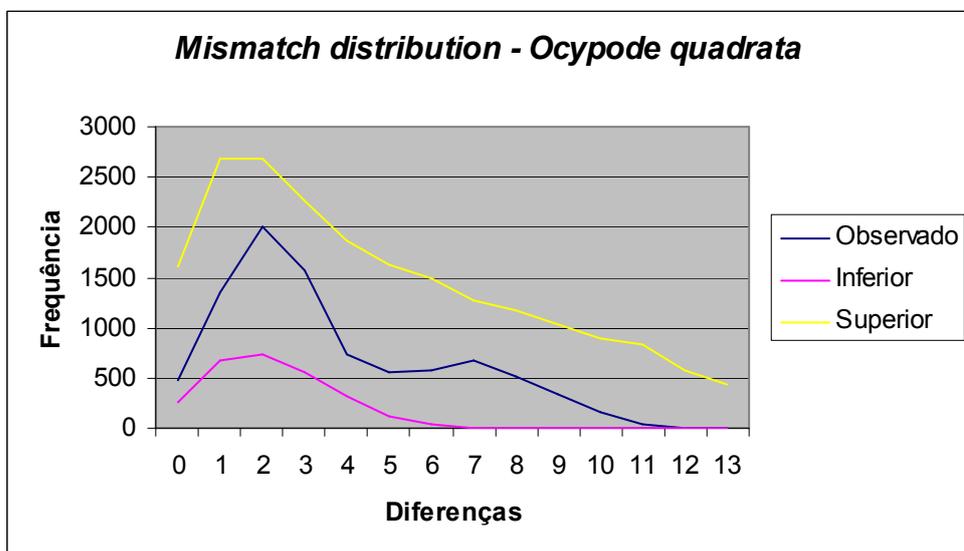


Figura 24- Análise de *mismatch distribution* para *O. quadrata*. Intervalo de confiança Superior e Inferior ($\alpha=0,05$ com 1000 replicações).

Tabela 13- Valores de “tau” e os intervalos de confiança superior e inferior.

Parâmetros	<i>M. mactroides</i>	<i>D. hanleyanus</i>	<i>E. brasiliensis</i> *	<i>O. quadrata</i>
Tau	2,016	0,967	0,395	1,4
Limite Superior	2,656	1,428	-	6,76
Limite Inferior	1,453	0,717	-	0,297
Data de expansão (milhares de anos antes do presente)	174	88,22	38	135

* estimado pelo DnaSP, que não calcula os limites de confiança.

4.6 Tamanho Efetivo e Taxas de Crescimento Populacionais

Os valores de teta (θ) e crescimento populacional calculados pelo programa Lamarc 2.1, assim como o cálculo de tamanho efetivo populacional atual (N_{e0}) e ancestral (N_{et}) para as quatro espécies estão representados na tabela 14. Todas as espécies apresentaram forte sinal de crescimento populacional, representados nas grandes taxas de crescimento (todas superior a mil), e nos valores de tamanho efetivo populacional atual, quando comparado aos valores de N_e históricos. *E. brasiliensis* foi a espécie que apresentou o maior teta e a maior taxa de crescimento, apresentando um N_e atual bastante alto, acima de 15 milhões, sendo que todas as espécies apresentaram N_e maior do que 2 milhões.

Tabela 14- Parâmetros demográficos obtidos com o programa Lamarc.

	<i>M. mactroides</i>	<i>D. hanleyanus</i>	<i>E. brasiliensis</i>	<i>O. quadrata</i>
θ	0,136019	0,223063	0,3958	0,157279
N_{e0}	2 060 893,93	7 435 433,33	15 223 076,92	6 049 192,30
N_{et}	40 586,33	20,31507	1950,729	6121,387
G	3 106,297	6 563,46	15 000	1 345,543

θ = teta; G= Taxa de crescimento populacional; N_{e0} = Tamanho Efetivo Populacional atual;

N_{et} = Tamanho Efetivo Populacional ancestral.

4.7 Diversidade Genética vs. Geográfica

As análises de regressão linear entre diversidade genética intrapopulacional e latitude (representadas pela distância do ponto mais ao sul) estão expressas nas figuras 25-28, parecendo haver uma tendência de aumento de diversidade em direção ao norte da amostragem, em especial em *E. brasiliensis*, porém nenhum destes resultados apresentou correlação significativa. Esta análise tinha como objetivo tentar identificar se, durante o *bottleneck* populacional sugerido pelos resultados acima, as espécies poderiam ter permanecido em refúgios (ao norte ou ao sul da distribuição), identificados como regiões com maior diversidade genética, dos quais teriam se expandido para as demais localidades onde se encontram hoje.

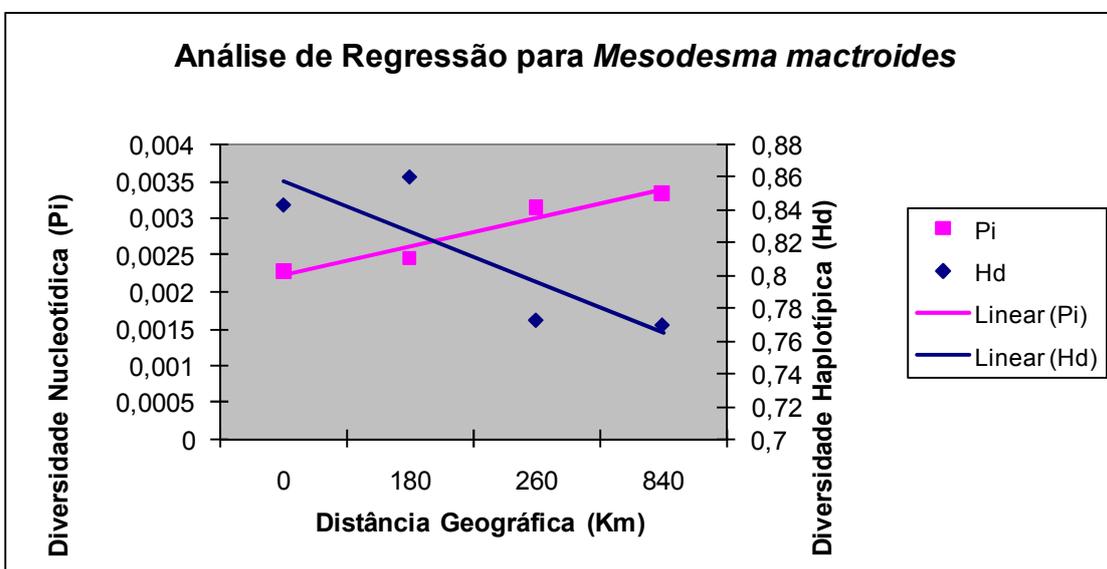


Figura 25- Análise de Regressão para *M. mactroides*. $P > 0,05$.

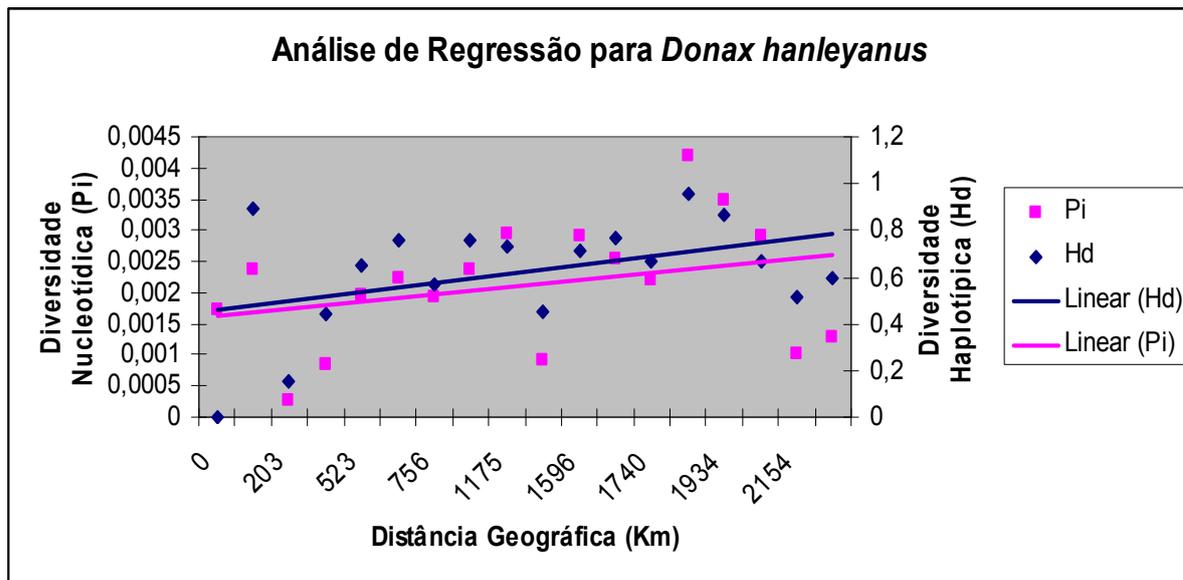


Figura 26 - Análise de Regressão para *D. hanleyanus*. $P > 0,05$.

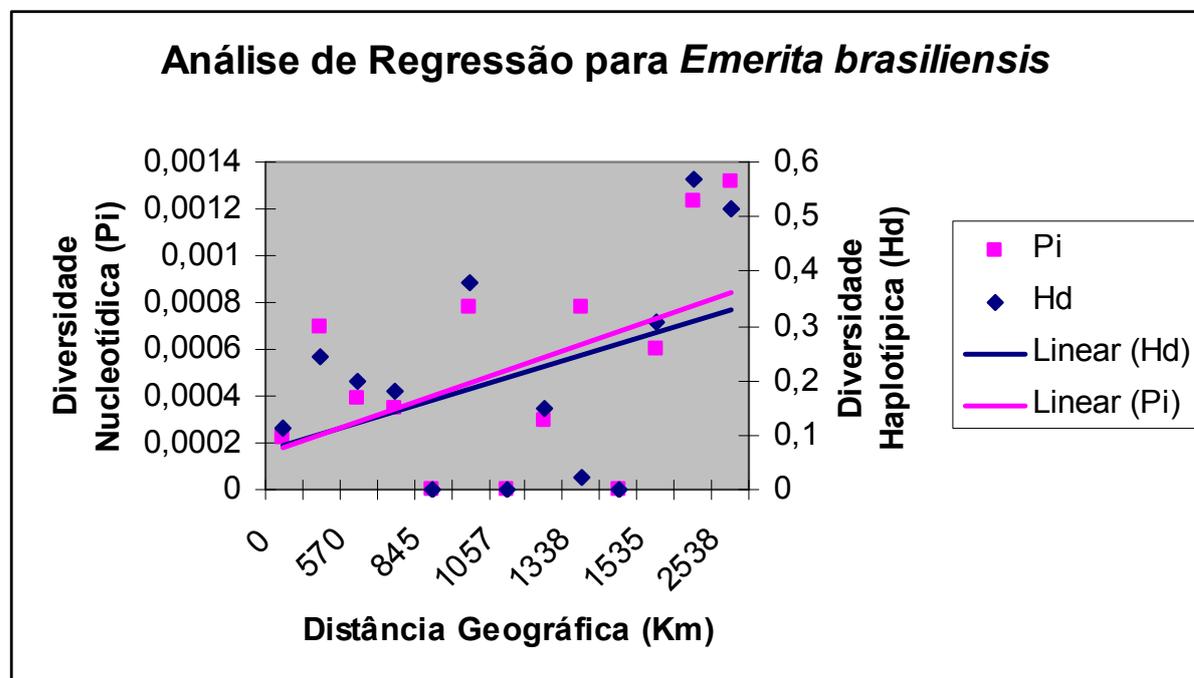


Figura 27 - Análise de Regressão para *E. brasiliensis*. $P > 0,05$.

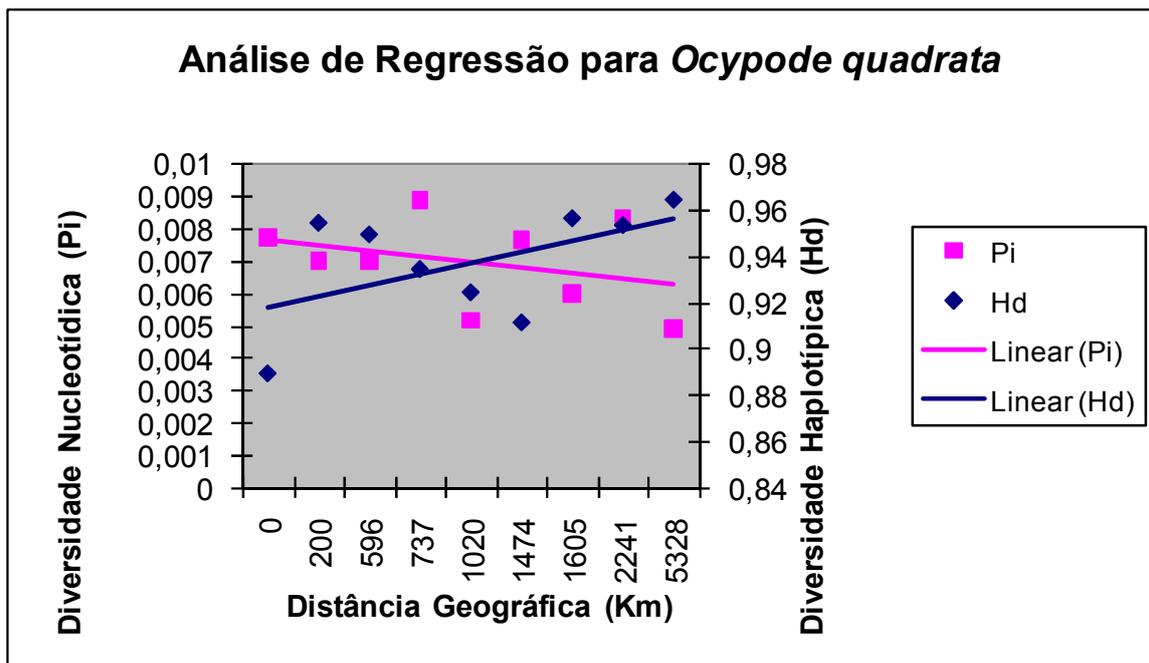


Figura 28- Análise de Regressão para *O. quadrata*. $P > 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Para se entender os processos que determinam a diversidade de organismos costeiros e marinhos, é fundamental que se conheça a história evolutiva e os fatores que determinaram a distribuição espacial das espécies que vivem nestes ambientes. Neste sentido, ressaltamos que este estudo é o primeiro trabalho de filogeografia comparativa na área geográfica em que foi desenvolvido (região costeira da América do Sul) e o primeiro para estas espécies, além de ser um dos poucos a incluir uma área tão abrangente.

Apesar de a biologia destas espécies de moluscos e crustáceos apresentarem semelhanças em termos ecológicos, tais como a fase larval livre natante, o tempo de geração e a longevidade, os padrões foram parcialmente concordantes, revelando a complexidade da história filogeográfica de uma região e de suas espécies.

5.1 Diversidade Genética e História Demográfica

As quatro espécies apresentaram diversidade genética relativamente baixa quando comparadas a outros invertebrados marinhos (p.ex. Bucklin e Wiebe (1998), Hamm e Burton (2000), Marko (2004)), com diversidade nucleotídica entre ~0,3% e ~0,7%, sendo que *E. brasiliensis* apresentou uma diversidade ainda menor, de 0,07%. Interessantemente, não há relação entre a diversidade genética e a abundância atual das espécies, pois *E. brasiliensis* é a mais abundante atualmente, e a espécie menos abundante, *M. mactroides*, apresentou a segunda maior diversidade nucleotídica e haplotípica. Um fator que pode auxiliar no entendimento desta falta de correlação entre abundância populacional censitária e diversidade genética é uma alta variância no sucesso reprodutivo, um fenômeno muito

conhecido em invertebrados marinhos (Boudry *et al.*, 2002; Planes e Lenfant, 2002; Chambers *et al.*, 2006). Quanto maior a variância no sucesso reprodutivo individual menor o tamanho efetivo de uma população, chegando a casos em que o N_e é várias ordens de magnitude menor do que a tamanho populacional censitário (p.ex. Hedgecock, 1986; Hedrick, 2005; Chambers *et al.*, 2006; Araki *et al.*, 2007; revisão em Avise 2000).

5.2 Coalescência, Expansão Populacional e as Glaciações

As estimativas de ponto de tempo de coalescência dos haplótipos (TMRCA) foram diferentes para as quatro espécies, três dentro do último ciclo glacial (com início há cerca de 100 mil anos) e *O. quadrata* bem anterior, o que sugere que as quatro espécies tiveram histórias demográficas com pelo menos alguns detalhes diferentes, que pode ser diferentes tamanhos para as populações ancestrais, ou que as mesmas tivessem diferentes graus de estruturação populacional. Por outro lado, os intervalos de confiança das estimativas de TMRCA das espécies (com exceção de *O. quadrata*) se sobrepõem, o que significa que não podemos refutar a hipótese de que os TMRCA destas três espécies sejam simultâneos. Porém o tempo de coalescência para os haplótipos de *O. quadrata* apenas marginalmente se sobrepõe ao de *D. hanleyanus*, sugerindo fortemente que podemos considerá-lo como sendo mais antigo do que as outras três espécies.

Os resultados adicionais tais como os testes de neutralidade e as estimativas do *mismatch distribution*, parecem sugerir que estas épocas de TMRCA ocorreram simultaneamente a um forte efeito “gargalo de garrafa” populacional (*bottleneck*) antigo, seguido de expansão rápida, para as quatro espécies. Porém, os resultados mais detalhados do BSP sugerem que, com exceção de *M. mactroides*, as expansões são mais recentes do

que as datas de coalescência (Fig. 20) e que as espécies passaram por períodos de relativa “estabilidade demográfica” com diferentes durações, anteriores à expansão populacional. Entretanto, esta “estabilidade demográfica” não deve ser considerada de modo literal, pois, sabe-se que populações estruturadas podem inflar estes valores, mas apesar disto, estes resultados sugerem para as três espécies um longo período com populações no mínimo uma ordem de magnitude mais reduzidas do que a atual. Isto sugere que estas populações menores devem ter tido distribuição bem mais limitada durante este período, cujas áreas de ocorrência poderiam ser caracterizadas como refúgios, dos quais as espécies teriam se expandido espacial e numericamente (ver abaixo). No caso de *M. mactroides*, cuja coalescência ocorreu imediatamente antes da expansão, o resultado pode ser explicado simplesmente considerando um tamanho populacional ancestral bastante pequeno em termos absolutos, forçando uma coalescência muito rápida.

Os períodos glaciais, em especial o mais recente e no hemisfério norte, reduziram drasticamente a distribuição das espécies a poucos refúgios em latitudes menores, onde elas ficaram abrigadas e dali se expandiram, como está bem documentado para muitas espécies, por exemplo, na América do Norte (Marko, 2004), na Europa (Verovnik *et al.*, 2005; Gittenberger *et al.*, 2004) e no Ártico (Audzijonyte e Vainölä, 2006). Estes prováveis refúgios glaciais são também os locais de maior diversidade genética em relação às regiões mais recentemente colonizadas (Stevens e Hogg, 2003). Contudo, as conseqüências dos períodos glaciais no hemisfério sul, em especial em regiões de latitudes intermediárias (com é o caso aqui) são ainda pouco conhecidas e muito debatidas (Lessa *et al.*, 2003). Além disso, a influência destes ciclos glaciais nas espécies marinhas de praia é ainda menos conhecida e geralmente menos drástica, neste caso devido à ausência de geleiras em boa parte da costa apesar de elas ocorrerem no continente na mesma latitude

(Murray-Jones e Ayre, 1997; Collin, 2001; Andrade *et al.*, 2003; Lessa *et al.*, 2003; Hickerson *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2006; Wilson, 2006).

Não observamos nenhuma tendência clara de correlação estatística entre valores de diversidade dentro das populações e a latitude, em especial para *D. hanleyanus*, *M. mactroides* e *O. quadrata*. Esta análise tinha como objetivo tentar identificar se, durante a estabilidade populacional sugerida pelos resultados, as espécies poderiam ter permanecido em refúgios (ao norte ou ao sul da distribuição), identificados como regiões com maior diversidade genética atual, dos quais teriam se expandido para as demais localidades onde se encontram hoje. Entretanto, não há evidência com nossos dados de que estas três espécies tenham passado por um processo em que tenham se abrigado em refúgios, semelhante ao encontrado nas zonas continentais do hemisfério norte. Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos nos poucos estudos de diversidade genética ao longo do litoral brasileiro (Ignacio *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2002). Além disso, mesmo no hemisfério norte, muitas espécies também apresentam este mesmo cenário evolutivo, não tendo se abrigado em refúgios e mostram hoje, padrões de estruturação populacional e de diversidade genética semelhantes aos de *D. hanleyanus* e *O. quadrata* (Bucklin e Wiebe, 1998; Wares, 2002).

Apenas os dados de diversidade de *E. brasiliensis* (Tabela 6) sugerem maior diversidade nas duas regiões mais ao norte da distribuição, compatível com um cenário de expansão populacional recente a partir de refúgio ao norte da distribuição. Interessantemente, os resultados da história demográfica estimada pelo BSP mostram que *E. brasiliensis* é a única espécie que apresenta um padrão de expansão populacional diferente das demais, muito mais recente, mais especificamente imediatamente após o LGM, seguindo o aumento da temperatura e do nível do mar. Este resultado é compatível

com um cenário em que *E. brasiliensis* teria estado reduzida a um refúgio em baixas latitudes durante a último ciclo glacial, em especial durante o LGM e que teria se expandido em direção ao sul deste refúgio após o LGM (ver abaixo).

No caso de *M. mactroides*, a coalescência se deu exatamente no momento da expansão, o que sugere um “bottleneck” populacional intenso daquele momento para o passado, sugerindo possivelmente ser esta a espécie mais suscetível às mudanças ambientais relacionadas ao ciclo glacial. Apesar de especulativo, esta maior sensibilidade pode ser um dos fatores explicativos (junto com a exploração humana) da aparente diminuição populacional recente observada nesta espécie.

Um tempo de coalescência muito mais antigo e a maior diversidade de *O. quadrata* poderia ser explicada porque é única das quatro espécies que apresenta uma distribuição muito maior do que a região de estudo (até a América do Norte), o que sugere uma tolerância ecológica bastante extensa, além de dificultar a interpretação da questão dos refúgios, pois, por exemplo, ela pode ter se abrigado em refúgios fora de nossa área amostral.

Diferentemente de *E. brasiliensis*, as outras três espécies (*M. mactroides*, *D. hanleyanus* e *O. quadrata*) apresentam um cenário de expansão populacional entre o final do último interglacial e a metade da última idade glacial (entre 100 e 60 mil anos atrás, Fig. 29).

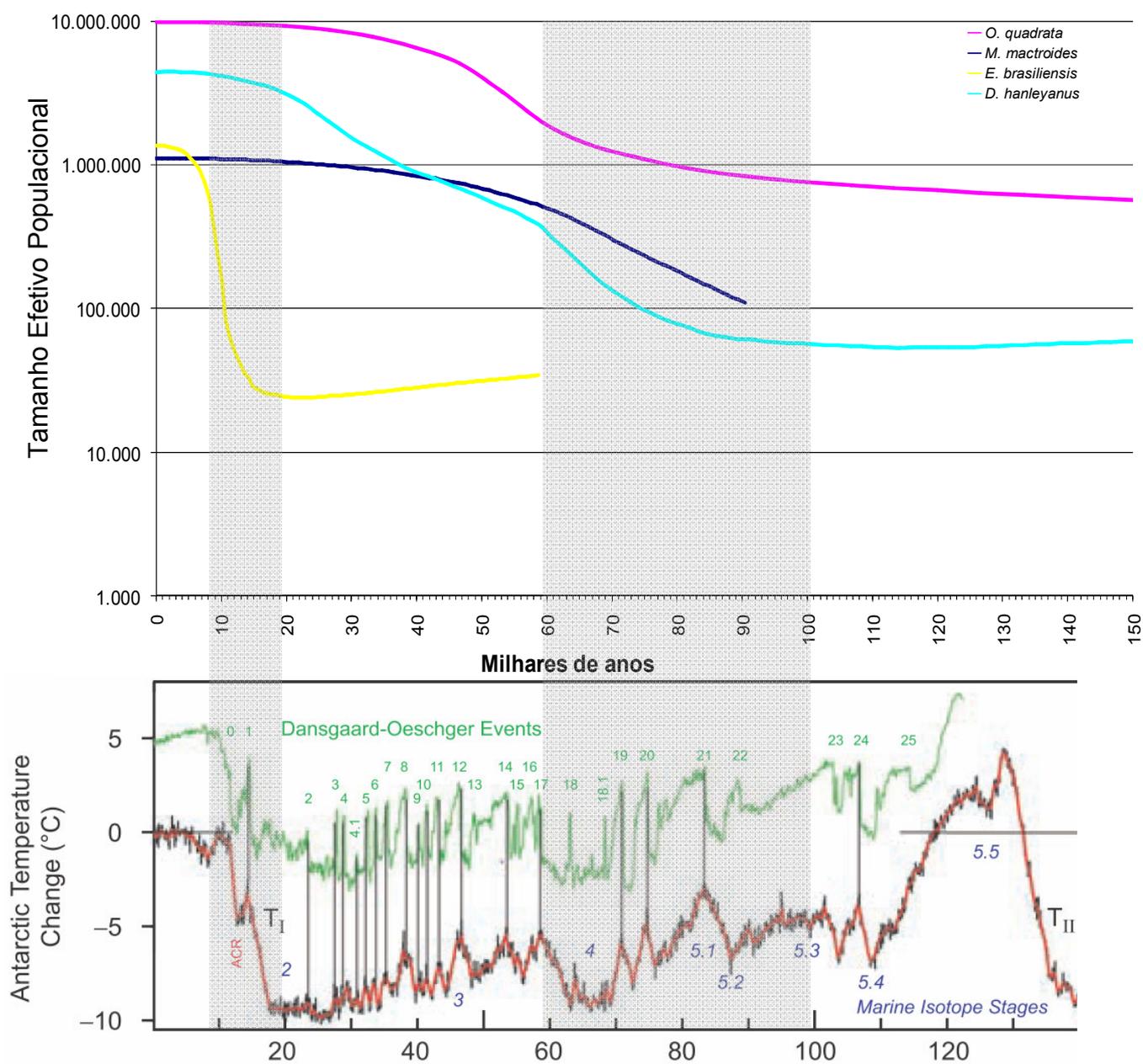


Figura 29 - Flutuação populacional para as quatro espécies estudadas e representação das oscilações do nível do mar durante os últimos 150 mil anos (Jouzel *et al.*, 2007). Barras cinza= expansão populacional.

Considerando o largo intervalo de confiança e a natureza qualitativa desta avaliação, os resultados são compatíveis com a hipótese de que estas expansões tenham ocorrido simultaneamente, durante o período glacial (mas antes do LGM), sugerindo que elas podem ter se beneficiado de algum modo das condições ambientais durante o período glacial, ao contrário de *E. brasiliensis*.

Uma expansão populacional bastante rápida e forte ocorreu há aproximadamente 15 mil anos (entre 20 e 10 mil anos atrás) em *E. brasiliensis*. A partir de 21 mil anos atrás (LGM) teve início o aumento acentuado da temperatura global em direção ao atual clima interglacial (Smith *et al.*, 2005) acompanhado da subida do nível do mar atingindo gradualmente o nível atual (Fig. 29). A coincidência temporal entre a curva do aumento de temperatura e a curva da expansão populacional sugere fortemente uma relação causal da primeira em relação à segunda. Portanto, no caso de *E. brasiliensis*, o final do clima glacial parece ter sido o fator que mais influenciou a dinâmica demográfica da espécie.

Todas as espécies aqui estudadas possuem características biológicas dependentes de calor, assim como reprodução, crescimento e até mesmo disponibilidade de alimento (Silveira, 1998; Bergonci, 2005), sendo que *E. brasiliensis* é capaz de interromper a reprodução em condições de temperatura desfavoráveis (Silveira, 1998). O pico reprodutivo de *E. brasiliensis* ocorre no verão, com o aparecimento de larvas maiores, ocorrendo quase a ausência de larvas no inverno e seu reaparecimento na primavera. Neste período ocorre uma grande queda de temperatura e salinidade, entretanto, em águas mais frias os ovos são maiores e possuem mais reserva nutritiva, podendo sobreviver por mais tempo no plâncton (Silveira, 1998).

A drástica diminuição populacional desta espécie durante o LMG pode ser explicada pelo provável deslocamento para o norte devido à queda na temperatura do mar,

aliado à diminuição do nível do mar em mais de 100 metros, o que deve ter reduzido drasticamente o habitat adequado à espécie, visto que a plataforma continental é mais vertical em direção ao norte do litoral brasileiro, e nesta profundidade, o nível do mar alcançou o talude, o qual, na região ao norte da distribuição de *E. brasiliensis*, apresenta-se na forma de grandes cânions (Figueiredo Jr e Madureira, 2004). Além disso, as características biológicas desta espécie, como sendo a única que tem um sistema de alimentação por filtração passiva, necessitando de um fluxo laminar de água para obter alimento, também pode ajudar a explicar este padrão demográfico diferente, já que o mar estando a mais de 100 metros impossibilitava a ocorrência de locais onde a espécie pudesse sobreviver (sedimento) e se alimentar (não havendo fluxo de água). Entretanto, apesar de especulativo, uma análise detalhada de mapas batimétricos (Dias, 1999) da região de ocorrência da espécie, mostra pequenos locais onde a declividade é significativamente menor, podendo ter sido locais de refúgio para a espécie.

Já a expansão populacional intensa após o LGM pode estar relacionada à expansão para o sul e o aumento expressivo do habitat favorável com a recolonização da planície costeira, onde a plataforma continental é bem menos inclinada.

Os jovens e recrutas de *M. mactroides* são migradores mareais, enquanto que os adultos tendem a permanecer na mesma posição, independente da maré, movendo-se somente durante ocasiões incomuns, como uma forte e brusca mudança no nível das marés (Bergonci, 2005). O inverno, devido às baixas temperaturas, é o período em que a espécie menos cresce, e apresenta uma mudança em relação ao seu comportamento, migrando para a região inferior da zona de varrido. Este comportamento pode ser devido à escassez de alimento, quando os animais reduzem a atividade metabólica, ou uma tentativa de evitar o estresse provocado por temperaturas extremamente frias (Bergonci, 2005).

É sabido que *O. quadrata* é muito sensível ao frio, sendo que o acasalamento ocorre no verão, pois ela necessita de calor para a reprodução, além disso, depende da umidade nos seus canais branquiais para respiração (Alberto, 1995). Em meses de inverno, com temperaturas abaixo de 16°C, a espécie hiberna, e devido à necessidade de umidade, as tocas onde vivem não podem ser construídas muito longe da linha do mar (Alberto, 1995). Além disto, o clima glacial era frio e seco (Porter, 2000) e tendo afetado as populações da maioria das espécies (Souza *et al.*, 2005), pode ter interferido na disponibilidade de alimento para *O. quadrata*, a qual alimenta-se de restos orgânicos que se acumulam na praia (peixes, ovos de pássaros e vegetais).

Ao mesmo tempo, as diferenças encontradas entre as espécies em termos de diversidade genética, nível de estruturação e taxa de crescimento populacional, podem ter sido influenciadas pelas diferenças ecológicas intrínsecas entre as espécies, que determinam respostas idiossincráticas aos eventos de mudança ambiental, influenciando a sua história demográfica e o nível de fluxo gênico, como ocorreu com *E. brasiliensis*.

Além destes fatores, não podemos desconsiderar que processos estocásticos também são importantes na determinação da variação genética das populações, possibilitando que as espécies respondam de maneira diferente aos mesmos eventos ambientais. Por exemplo, no hemisfério norte, duas espécies de gastrópodo marinho com mesmo tipo de desenvolvimento larval, apresentam hoje diferentes padrões de estruturação populacional, inferindo-se que as diferenças ecológicas entre os grupos foi fator determinante na sua história evolutiva, mais até mesmo do que a sua capacidade dispersiva larval (Marko, 2004).

5.3 Estruturação Populacional

Embora contestado por alguns trabalhos (Dooh *et al.*, 2006; Zardus *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2007), um dos pressupostos a respeito da estruturação populacional em espécies marinhas supõe que em espécies com ciclo de vida larval relativamente longo, a alta conectividade marinha resultaria em alto fluxo gênico e conseqüente baixa estruturação populacional. Porém, existem trabalhos que mostram evidências de que organismos com dispersão larval nem sempre realizam todo seu potencial dispersivo (Becker *et al.*, 2007), pois muitas vezes as larvas são predadas antes mesmo de dispersarem a longas distâncias, além do fato de que estas constatações de dinâmica larval, geralmente feitas em laboratório, não levam em consideração, por exemplo, o comportamento larval e a hidrodinâmica da dispersão (Cowen *et al.*, 2000; Lazoski *et al.*, 2001).

Neste caso, não é surpreendente encontrarmos organismos marinhos com fase larval livre natante com alto nível de estruturação populacional, como encontrado neste trabalho para o molusco *M. mactroides* e o crustáceo *E. brasiliensis*, os quais apresentaram alto índice de estruturação em praticamente todas as análises, apresentando barreira ao fluxo gênico em locais muito próximos aos locais com valores de Φ_{st} e F_{st} estatisticamente divergentes.

Resultados similares de estruturação populacional para organismos com aspectos ecológicos semelhantes aos das espécies aqui estudadas, como a presença de fase larval, foram encontrados para uma espécie de camarão na região do Indo-Oeste Pacífico. *Haptosquilla pulchella* apresentou alto padrão de estruturação populacional diferenciando populações habitantes de diferentes bacias oceânicas separadas durante os eventos glaciais

pleistocênicos quando o nível do mar baixou a ponto de separar essas populações, e mostrou que mesmo as larvas desta espécie tendo a capacidade de se dispersarem pelas correntes marinhas, elas não se distanciaram mais de 300 km de seu local de origem (Barber *et al.*, 2002). Entretanto para esta mesma região o gastrópodo *Haliotis asinina* com a mesma capacidade dispersiva, não apresentou nenhum padrão de estruturação populacional (Imron *et al.*, 2007).

Este trabalho sugere que *M. mactroides* está dividida em duas subpopulações: uma incluindo as amostras aqui denominadas do Sudeste (representadas por Ilha Comprida e Peruíbe ambas pertencentes ao estado de São Paulo) e outra incluindo as amostras denominadas do Sul (do Farol de Santa Marta, SC até o Chui, RS). Através da análise da rede de haplótipos, 81,8% dos pertencentes ao Sudeste apresentaram-se em um agrupamento separado do grupo Sul, entretanto estão separados por uma única mutação, o que indica um nível de estruturação populacional recente (Avice, 2000). É claro que esta subdivisão pode também ser explicada pelo hiato amostral entre estes dois grupos, principalmente se houver um isolamento por distância nestas populações. Porém, a análise de autocorrelação espacial (Fig. 13) não apresenta evidências deste fenômeno para esta espécie.

Por outro lado, *M. mactroides* não apresenta diferenciação populacional para as amostras da região costeira do extremo Sul, onde o sucesso amostral foi significativamente maior, o que poderia ocorrer se as saídas de água doce desta região fossem barreiras significativas à dispersão larval desta espécie. Este resultado corrobora o único estudo para esta espécie nesta região, realizado mais especificamente no sul do Rio Grande do Sul, em que Marins e Levy (2000) inferiram homogeneidade genética e alto fluxo gênico em uma região de 100 km ao redor da desembocadura da Lagoa dos Patos.

E. brasiliensis também apresentou padrão de estruturação populacional pelos índices de fixação Φ_{ST} e F_{ST} , dividindo-se em uma população incluindo desde Picinguaba (norte de São Paulo) até Itaúnas (norte do Espírito Santo), e outra população abrangendo as demais amostragens em direção ao sul, embora curiosamente Copacabana (RJ) não tenha apresentado esta diferenciação. Entretanto, a barreira gerada pelo algoritmo de Monmonier foi encontrada entre Copacabana (RJ) e Picinguaba (SP). Apesar disto, a análise da rede de haplótipos não deixa clara esta divisão, apresentando um alto compartilhamento de haplótipos nos dois agrupamentos resultantes.

Cabo Frio a cerca de 120 km ao norte de Copacabana tem sido reconhecido como uma barreira biogeográfica entre as regiões Tropical e Temperada-Quente (Maggioni *et al.*, 2003). Esta região foi considerada barreira biogeográfica para o camarão *Litopenaeus schmitti* (Maggioni *et al.*, 2003) e para algumas espécies de algas bentônicas que só ocorrem deste ponto para o norte, além de se encontrar uma maior diversidade de organismos ao norte de Cabo Frio, provavelmente devido à abundância de nutrientes proporcionado pelo fenômeno da ressurgência (descrito na Introdução) (Guimaraens e Coutinho, 1995). Entretanto, apesar de estar próxima à área onde encontramos a barreira para *E. brasiliensis*, com os dados que temos, é difícil avaliar se esta região e estes fenômenos realmente serviram como uma barreira para esta espécie.

Por outro lado as espécies *D. hanleyanus* e *O. quadrata* não apresentaram estruturação populacional significativa, estando quase ao nível de população panmítica, revelado pelos valores de Φ_{st} e F_{st} muito próximos a zero (Wright, 1978). Além disto, as análises de AMOVA em nível de população e utilizando-se a divisão sugerida pelo algoritmo de Monmonier corroboram esta falta de estruturação, apresentando valores muito baixos de variância entre as populações (pontos de coleta). Estes resultados estariam

de acordo com outros estudos costeiros investigando espécies com ou sem ciclo de vida larval, para espécies de invertebrados ocorrentes no Brasil (Ignacio *et al.*, 2000; Maggioni *et al.*, 2003) e em outras partes do mundo (Barber *et al.*, 2002; Uthicke e Benzie, 2003; Richards *et al.*, 2007).

Sendo assim, a ocorrência de estruturação populacional para duas espécies estudadas neste trabalho, assim como a sua ausência para outras duas, apesar de todas possuírem modos de vida semelhantes, sugere que a dinâmica larval é muito específica e depende de vários fatores ambientais e casuais, o que já foi mostrado até mesmo para as espécies do mesmo gênero, *Mytilus californianus* e *M. galloprovincialis* que apresentaram diferentes padrões de dispersão larval na costa da Califórnia (Becker *et al.*, 2007).

5.4 Saídas de Água Doce no Mar como Barreiras Biogeográficas?

Nenhuma foz representada por rios que desembocam ao longo da região costeira estudada foi significativa para diferenciação das populações para as quatro espécies. Por maior que seja o volume de água destes rios, a maioria deles é constituída de uma pequena extensão em sua foz, de 100 a 200 m de vazão em média. Entretanto, a maior vazão de água doce encontrada em nossa área amostral, é a foz do Rio da Prata, entre a Argentina e o Uruguai, com cerca de 230 km de extensão (Urien, 1972), lançando um volume considerável de água doce na costa. Porém, para *D. hanleyanus*, a qual pudemos amostrar ambos os lados deste rio (Argentina e Uruguai) esta foz não se apresentou como uma barreira efetiva para a dispersão desta espécie, sendo que nenhuma das análises mostrou possibilidade de barreira geográfica nesta região.

Entretanto, durante as transgressões marinhas pleistocênicas, a salinidade na foz do Rio da Prata era muito maior do que a que encontramos a partir do último máximo regressivo há cerca de 21 mil anos, o que tornava a zona da foz deste rio com característica euhalina, ou seja, com salinidade maior do que 30‰ (Fucks *et al.*, 2005). Esta maior salinidade pode ter proporcionado o fluxo gênico em ambos os sentidos norte e sul do Rio da Prata, podendo ter sido um dos fatores responsáveis por uma homogeneização genética para esta espécie.

Para o litoral brasileiro o único rio que já se mostrou como uma barreira biogeográfica (para os peixes *Acanthurus bahianus* e *A. coeruleus*) foi o Rio Amazonas, o qual possui uma vazão que pode chegar até 230 km em época de cheia (Siqueira *et al.*, 2006) e tem se mostrado como uma das principais barreiras biogeográfica entre o Brasil e o Caribe (Rocha *et al.*, 2002). Entretanto para outra espécie deste mesmo gênero, *A. chirurgus*, esta barreira não teve nenhum efeito (Rocha *et al.*, 2002). Esta diferença foi atribuída a diferenças de preferência de habitat do animal adulto, já que *A. chirurgus*, possui menor restrição de habitat, podendo se dispersar muito mais do que as outras duas espécies (Rocha *et al.*, 2002).

5.5 Influência das Correntes Marinhas e Ventos Litorâneos

As correntes marinhas e os ventos litorâneos podem influenciar na dispersão das espécies, pois ambos têm influência direta ou indireta sobre a margem e a plataforma continental (Seeliger *et al.*, 1998). Na costa sudeste e sul brasileira, temos o registro da ação de algumas destas correntes. O anticiclone do Atlântico Sul, criado pela zona de convergência entre a corrente das Malvinas, vinda do Sul e trazendo águas frias, com a

corrente do Brasil, vinda do norte e trazendo águas quentes, tem uma posição que varia na faixa de 18° a 35° de latitude Sul, que corresponde desde o Uruguai até o Espírito Santo (Vieira e Rangel, 1988). A ação destas correntes certamente tem influencia (direta ou indiretamente) na dispersão das larvas das espécies aqui estudadas e pode ser um fator de homogeneização para *D. hanleyanus* e *O. quadrata*.

Os ventos de Nordeste que atingem a costa sul ao longo do ano e os de Sudoeste que atingem a costa durante a passagem de frentes frias são fenômenos resultantes diretamente do efeito do anticiclone do Atlântico Sul (Seeliger *et al.*, 1998). A direção dos ventos, sendo diretamente influenciada pela ação das correntes, interfere nos padrões de circulação locais e na margem continental, e influencia até mesmo na descarga de água doce a partir de canais de acesso ao mar, além do fato de essas correntes poderem chegar até a margem continental. Sendo assim, além do transporte de água sobre a plataforma continental ser influenciado pelos ventos, ele também é uma consequência do impacto de correntes do oceano aberto nas feições topográficas da plataforma (Seeliger *et al.*, 1998), onde as larvas dos invertebrados aqui estudados podem ser encontradas (Alberto, 1995; Silveira, 1998; Bergonci, 2005; Gil, 2005). Sendo assim, a dispersão larval destas espécies pode ser proporcionada por efeito tanto das correntes marinhas quanto dos ventos litorâneos.

Não existem estudos sobre a dinâmica da dispersão larval na natureza para estas quatro espécies. Em condições de laboratório as larvas de *D. hanleyanus* podem viver até 30 dias antes de se fixar no substrato para se desenvolver (Gil, 2005), e para as demais espécies há registros de apresentarem um período larval entre 60 e 90 dias (Alberto, 1995; Silveira, 1998; Bergonci, 2005), porém as larvas devem se comportar de maneira muito mais dinâmica em campo, como já citado (Cowen *et al.*, 2000; Lazoski *et al.*, 2001). Neste

sentido, se torna extremamente difícil estabelecer qualquer relação entre a dispersão larval proporcionada pelos ventos e pelas correntes marinhas, e a estruturação populacional encontrada para duas das quatro espécies aqui estudadas, já que o período de dispersão para cada uma delas pode variar significativamente.

Santos *et al.* (2006) atribuíram a alta estruturação populacional encontrada para o peixe *Macrodon ancylodon* na costa brasileira à presença de correntes marinhas frias e quentes, interferindo na dispersão da espécie, dividindo-a em um grupo compreendendo a região Espírito Santo - Argentina, denominado subtropical, e outro denominado tropical, compreendendo Venezuela - Bahia. Porém para o camarão *Litopenaeus schmitti* coletado em quase toda costa brasileira, cinco de um total de seis loci de microsátélites sugeriram que as correntes marinhas tenham agido como fator homogeneizador nesta espécie (Maggioni *et al.*, 2003).

Para a área de divisão populacional encontrada para as espécies aqui estudadas, não há ocorrência de encontro entre correntes, além da Convergência do Atlântico Sul. Entretanto esta convergência não sendo fixa, podendo flutuar sazonalmente, impossibilita a sua relação com a separação de *M. mactroides* e *E. brasiliensis* ao norte de SP e sul do RJ.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'Sáber AN (2001) Litoral do Brasil. Metalivros, São Paulo, 252 pp.
- Alberto RMF (1995) Distribuição e estrutura etária de *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) em praia arenosa do litoral sul do Brasil (Crustácea, Decapoda, Ocypodae). Dissertação de Mestrado, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Andrade SCS, Magalhães CA e Solferini VN (2003) Patterns of genetic variability in Brazilian Littorinids (Mollusca): a macrogeographic approach. *J Zool Syst Evol Research* 41: 249-255.
- Ansell AD (1983) The biology of genus *Donax*. In: *Sandy beach as ecosystems* (A. McLachlan & T. Erasmus, eds), 607-635. W. Junk, The Hague.
- Araki H, Waples RS, Ardren WR, Cooper B e Blouin MS (2007) Effective population size of steelhead trout: influence of variance in reproductive success, hatchery programs, and genetic compensation between life-history forms. *Mol Ecol* 16: 953-966.
- Audzijonyte A e Väinölä R (2006) Phylogeographic analyses of a circumarctic coastal and a boreal lacustrine mysid crustacean, and evidence of fast postglacial mtDNA rates. *Mol Ecol* 15: 3287-3301.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA e Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University press, Cambridge. 447pp.
- Bandelt HJ, Forster P e Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Barber PH, Palumbi SR, Erdmann V e Moosa MK (2002) Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopoda) indicate limits to larval transport: patterns, causes, and consequences. *Mol Ecol* 11: 659-674.
- Becker BJ, Levin LA, Fodrie FJ e McMillan PA (2007) Complex larval connectivity patterns among marine invertebrate populations. *Proc Nat Acad Sci USA* 27: 3267-3272.
- Bergonci PEA (2005) Aspectos da dinâmica populacional do marisco branco *Mesodesma mactroides* Deshayes, 1854 (Mollusca, Bivalvia) em praia arenosa exposta do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

- Bernardi G (2000) Barriers to gene flow in *Embiotoca jacksoni*, a marine fish lacking a pelagic larval stage. *Evolution* 54: 226–237.
- Bilodeau AL, Felder DL e Neigel JE (2005) Population structure at two geographic scales in the burrowing crustacean *Callichirus islagrande* (Decapoda, Thalassinidea): historical and contemporary barriers to planktonic dispersal. *Evolution* 59: 2125-2138.
- Bilton DT, Paula J e Bishop JDD (2002) Dispersal, genetic differentiation and speciation in estuarine organisms. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 55: 937-952.
- Blankensteyn, A (2006) The use of the ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius) (Crustacea, Ocypodidae) as an indicator of anthropogenic impacts in the sandy beaches of Santa Catarina island, southern Brazil. *Rev Bras Zool* 23: 870-876.
- Bond-Buckup G e Buckup L (1999) Os Crustáceos do Rio Grande do Sul. Editora da Universidade, Porto Alegre. 412pp.
- Boudry P, Collet B, Cornette F, Hervouet V e Bonhomme F (2002) High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture* 204: 283-296.
- Bucklin A e Wiebe PH (1998) Low mitochondrial diversity and small effective population sizes of the copepods *Calanus finmarchicus* and *Nannocalanus minor*: possible impact of climatic variation during recent glaciation. *The Journal of Heredity* 89: 383-392.
- Burton RS e Lee BN (1994) Nuclear and mitochondrial gene genealogies and allozyme polymorphism across a major phylogeographic break in the copepod *Tigriopus californicus*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 91: 5197–5201.
- Castellanos ZA e Fernandez D (1965) Sobre la presencia de *Donax hanleyanus* em la costa Argentina. *Neotropica* 11: 58-60.
- Castello JP, Odebrecht C and Seeliger EU (1998) Os Ecosistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Editora Ecoscientia, Rio Grande, 326pp.
- Cardoso A e Vogler AP (2005) DNA taxonomy, phylogeny and Pleistocene diversification of the *Cicindela hybrida* species group (Coleoptera: Cicindelidae) *Mol Ecol* 14: 3531-3546.
- Cavallotto JL, Violante RA e Parker G (2004) Sea-level fluctuations during the last 8600 years in the de la Plata river (Argentina). *Quaternary International* 114: 155–165.
- Chambers MD, VanBlaricom GR, Hauser L, Utter F e Friedman CS (2006) Genetic structure of black abalone (*Haliotis cracherodii*) populations in the California islands and central California coast: Impacts of larval dispersal and decimation from withering syndrome. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 331: 173–185.

- Collin R (2001) The effects of mode of development on phylogeography and population structure of North Atlantic *Crepidula* (Gastropoda: Calyptraeidae). *Mol Ecol* 10: 2249-2262.
- Cowen RK, Lwiza MM, Sponaugle S, Paris CB e Olson DB (2000). Connectivity of Marine Populations: Open or Closed? *Science* 287:857-859.
- Dawson MN (2001) Phylogeography in coastal marine animals: a solution from California? *Journal of Biogeography* 28: 723-736.
- Dawson MN, Louie KD, Barlow M. et al. (2002) Comparative phylogeography of sympatric sister species, *Clevelandia ios* and *Eucyclogobius newberryi* (Teleostei, Gobiidae), across the California Transition Zone. *Mol Ecol* 11:1065-1075.
- Defeo O e Alava A (1995) Effects of human activities on long term trends in sandy beach populations: the wedge clam *Donax hanleyanus* in Uruguay. *Marine Ecology Progress Series* 123: 73-82.
- Defeo O (1996) Recruitment variability in sandy beach macrofauna: much to learn yet. *Revista Chilena de Historia Natural* 69: 615–630.
- Defeo O e Cardoso RS (2004) Latitudinal patterns in abundance and life-history traits of the mole crab *Emerita brasiliensis* on South American sandy beaches. *Diversity Distrib* 10: 89–98.
- Dias GTM (1999) Levantamento dos dados pretéritos de oceanografia geológica do programa REVIZEE. Mimeo. 156pp.
- Dooh RT, Adamowicz J e Hegert DN (2006) Comparative phylogeography of two North American 'glacial relict' crustaceans. *Mol Ecol* 15: 4459-4475.
- Doyle and Doyle (1987) A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Drummond AJ e Rambaut A (2003) BEAST version 1.0, Available from <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/beast/>.
- Etter RJ, Rex MA, Chase MR, e Quattro JM (2005) Population differentiation decreases with depth in deep-sea bivalves. *Evolution* 59: 1479–1491.
- Excoffier L, Smouse PE (1994) Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene tree within a species: molecular variance parsimony. *Genetics* 136: 343-359.
- Figueiredo Jr. AG e Madureira LSP (2004) Topografia, composição, refletividade do substrato marinho e identificação de províncias sedimentares na região Sudeste-Sul do Brasil. São Paulo, Instituto Oceanográfico. USP. 64pp.

- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R e Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294–299.
- Fu YX e Li WH (1993) Statistical tests of neutrality mutations. *Genetics* 133: 693–709.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Fucks E, Aguirre M, Deschamps C. M. (2005) Late Quaternary continental and marine sediments of northeastern Buenos Aires province (Argentina): Fossil content and paleoenvironmental interpretation. *Journal of South American Earth Sciences* 20: 45–56
- Gianuca NM (1983) A preliminary account of the ecology of the sandy beaches in southern Brazil. In: McLachlan A e Erasmus T (ed). *Sandy beaches as ecosystems*. Junk Publishers, The Hague, pp 413-419.
- Gianuca NM (1985) The ecology of a sandy beaches in southern Brazil. Tese de Doutorado, Southampton University, pp 330.
- Gianuca NM (1987) Zonação e produção nas praias arenosas do litoral sul e sudeste do Brasil: síntese dos conhecimentos. Simpósio sobre ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira. *Academia de Ciências de São Paulo* 1: 313-332.
- Gil GM (2005) Zonação por tamanho, estabilização da forma da concha e atividade reprodutiva em espécies do gênero *Donax* (Mollusca, Bivalvia, Donacidae). Tese de doutorado, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Gil GM e Thomé W (2001) Distribuição vertical de *Donax hanleyanus* Philippi, 1847 (Mollusca, Bivalvia, Donacidae) em uma praia arenosa do Rio Grande do Sul. *Biociências* 9: 33-44.
- Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S e Bonatto SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol Ecol* 15: 3969-3982.
- Guimaraens MA e Coutinho R (1995) Spatial and temporal variation of benthic marine algae at the Cabo Frio upwelling region, Rio de Janeiro, Brazil. *Aquatic Botany* 52: 283-299.
- Gittenberger E, Piel WH e Groenenberg DSJ (2004) The Pleistocene glaciations and the evolutionary history of the polytypic snail species *Arianta arbustorum* (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae). *Mol Phylogenet Evol* 30: 01-10.

- Guralnick R (2006) The legacy of past climate and landscape change on species current experienced climate and elevation ranges across latitude: a multispecies study utilizing mammals in western North America. *Global Ecol. Biogeogr.* 15: 505-518.
- Hamm DE, Burton RS (2000) Population genetics of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the central California coast. 254: 235–247.
- Hedgecock D (1986) Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bull Mar Sci* 39: 550–564.
- Hedrick P (2005) Large variance in reproductive success and the N_e/N ratio. *Evolution In J Org Evolution* 59: 1596-1599.
- Hellberg ME e Vacquier VD (1999) Rapid evolution of fertilization selectivity and lysine cDNA sequences in teguline gastropods. *Mol Biol Evol* 16: 839-848.
- Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography-or seeing genes in space and time. *Mol Ecol* 10: 537-549.
- Hickerson MJ e Cunningham CW (2005) Contrasting quaternary histories in an ecologically divergent sister pair of low-dispersing intertidal fish (*Xiphister*) revealed by multilocus DNA analysis. *Evolution* 59: 344-360.
- Hoffman FG e Baker RJ (2003) Comparative phylogeography of short-tailed bats (*Carollia*: Phyllostomidae). *Mol Ecol* 12: 3403- 3414.
- Hugall A, Moritz C, Moussalli A e Stanisic J (2002) Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosiphia bellendenkerensis* (Brazier 1875). *Proc Nat Acad Sci USA* 99: 6112-6117.
- Ignacio BL, Absher TM, Lazoski C e Sole-Cava AM (2000) Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. *Marine Biology* 136: 987-991.
- Imron, Jeffrey B, Hale P, Degnan BM e Degnan SM (2007) Pleistocene isolation and recent gene flow in *Haliotis asinina*, an Indo-Pacific vetigastropod with limited dispersal capacity. *Mol Ecol* 16: 289-304.
- Jolly MT, Viard F, Gentil F, Thiébaud E e Jollivet D (2006) Comparative phylogeography of two coastal polychaete tubeworms in the Northeast Atlantic supports shared history and vicariant events. *Mol Ecol* 15: 1841-1855.
- Jouzel J, Masson-Delmotte, Cattani O et al., (2007) Orbital and Millennial Antarctic Climate Variability over the Past 800,000 Years. *Science* 317: 793-796.
- Kelly DW, MacIsaac HJ e Heath DD (2006) Vicariance and dispersal effects on phylogeographic structure and speciation in a widespread estuarine invertebrate. *Evolution* 60: 257-267.

- Klautau M, Russo CAM, Lazoski C, Boury-Esnault N, Thorpe JP e Sole-Cava AM (1999) Does Cosmopolitanism result from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Evolution* 53: 1414-1422.
- Knowlton N, Weigt LA, Solorzano LA, Mills DK e Birmingham E (1993) Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science* 260: 1629-1632.
- Kuhner MK (2006) Lamarc 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22: 768–770.
- Kumar S., Tamura K e Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 2.
- Lamparelli CC and Moura DO (1999) Mapeamento dos Ecossistemas Costeiros do Estado de São Paulo. CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 64p.
- Lazoski C, Sole-Cava AM, Boury-Esnault N, Klautau M e Russo CAM (2001) Cryptic speciation in a high gene flow scenario in the oviparous marine sponge *Chondrosia reniformis*. *Marine Biology* 139: 421-429.
- Lercari D and Defeo O (1999) Effects of freshwater discharge in sandy beach populations: the mole crab *Emerita brasiliensis* in Uruguay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 49: 457-468.
- Lercari D, Defeo O e Celentano E (2002) Consequences of a freshwater canal discharge on the benthic community and its habitat on an exposed sandy beach. *Marine Pollution Bulletin*. 44: 1397-1404.
- Lessa EP, Cook JA e Patton JL (2003) Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. *PNAS* 100: 10331-10334.
- Li G e Hedgecock D (1998) Genetic heterogeneity, detected by PCR-SSCP, among samples of larval pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55: 1025–1033.
- Lourie SA, Green DM e Vincent CJ (2005) Dispersal, habitat differences, and comparative phylogeography of Southeast Asian seahorses (Syngnathidae: *Hippocampus*) *Mol Ecol* 14: 1073-1094.
- Lucas AJ, Guerrero RA, Mianzán HW, Acha EM e Lasta CA (2005) Coastal oceanographic regimes of the Northern Argentine Continental Shelf (34-43° S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65. 405-420.

- Luttikhuisen PC, Drent J e Baker AJ (2003) Disjunct distribution of highly diverged mitochondrial lineage clade and population subdivision in a marine bivalve with pelagic larval dispersal. *Mol Ecol* 12: 2215-2229.
- Maggioni R, Rogers AD e Maclean N (2003) Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Mol Ecol* 12: 3213-3217.
- Manni F, Guérard E e Heyer E (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by “Monmonier’s Algorithm”. *Human Biology* 76: 173-190.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209–220.
- Marins LF, Levy JA (2000) Análise do fluxo gênico de *Mesodesma mactroides* Deshayes, 1854 (BIVALVIA, MESODESMATIDAE) na zona costeira adjacente à saída do estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande – RS). *Atlântica* 22: 13-26.
- Marko PB (2004) ‘What’s larvae got to do with it?’ Disparate patterns of post-glacial population structure in two benthic marine gastropods with identical dispersal potential. *Mol Ecol* 13: 597-611.
- Mathews LM, Schubart CD, Neigel JE e Felder DL (2002) Genetic, ecological, and behavioural divergence between two sibling snapping shrimp species (Crustacea: Decapoda: *Alpheus*). *Mol Ecol* 11: 1427-1437.
- McLachlan A (1990) Dissipative beaches and macrofauna communities on exposed intertidal sands. *Journal of Coastal Research* 6: 57-72.
- Miller MP (2005) Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.
- Monmonier MS (1973) Maximum-difference barriers: an alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis* 5: 245-261.
- Moritz C e Faith DP (1998) Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Mol Ecol* 7: 419-429.
- Murray-Jones SE e Ayre DJ (1997) High levels of gene flow in the surf bivalve *Donax deltoids* (Bivalvia: Donacidae) on the east coast of Australia. *Marine Biology* 128: 83-89.
- Narchi W (1974) Aspectos ecológicos e adaptativos de alguns bivalves do litoral paulista. *Papéis Avulsos de Zoologia* 27: 235-262.
- Narchi W (1978) Functional anatomy of *Donax hanleyanus* Philippi, 1847 (Donacidae - Bivalvia). *Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo* 3: 121-142.

- Neiman M e Lively CM (2004) Pleistocene glaciation is implicated in the phylogeographical structure of *Potamopyrgus antipodarum*, a New Zealand snail. *Mol Ecol* 13: 3085-3089.
- Neves FM e Bemvenuti CE (2006) The ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) as a potential indicator of anthropic impact along the Rio Grande do Sul coast, Brazil. *Biological Conservation* 133: 431-435.
- Palumbi SR (1992) Marine Speciation on a small planet. *Tree* 7: 114-118.
- Penchaszadeh PE e Olivier SR (1975) Ecología de una población de “berberecho” (*Donax hanleyanus*) en Villa Gesell, Argentina. *Malacologia, Ann Arbor* 15: 133-146.
- Perrin C, Wing SR e Roy MS (2004) Effects of hydrographic barriers on population genetic structure of the sea star *Coscinasterias muricata* (Echinodermata, Asteroidea) in the New Zealand fiords. *Mol Ecol* 13: 2183-2195.
- Pfenninger M, Posada D e Magnin F (2003) Evidence for survival of Pleistocene climatic changes in Northern refugia by the land snail *Trochoidea geyeri* (Soós 1926) (Helicellinae, Stylommatophora). *BMC Evolutionary Biology* 3:1-14.
- Planes S e Lenfant P (2002) Temporal change in the genetic structure between and within cohorts of a marine fish, *Diplodus sargus*, induced by a large variance in individual reproductive success. *Mol Ecol* 11: 1515–1524.
- Porter SC (2000) Snowline depression in the tropics during the Last Glaciation. *Quaternary Science Reviews*. 19: 1067-1091.
- Posada D and Crandall KA (1998) MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Richards VP, Thomas JD, Stanhope MJ e Shivji MS (2007) Genetic connectivity in the Florida reef system: comparative phylogeography of commensal invertebrates with contrasting reproductive strategies. *Mol Ecol* 16: 139-157.
- Rios EC (1994) Seashells of Brazil. Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande. 368 pp.
- Rocha-Olivares A, Fleeger JW e Foltz DW (2001) Decoupling of Molecular and Morphological Evolution in Deep Lineages of a Meiobenthic Harpacticoid Copepod. *Mol Biol Evol* 18: 1088-1102.
- Rocha LA, Bass AL, Robertson R e Bowen BW (2002) Adult habitat preferences, larval dispersal, and the comparative phylogeography of three Atlantic surgeonfishes (Teleostei: Acanthuridae). *Mol Ecol* 11: 243–252.

- Rogers A R e Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552–569.
- Rozas J, Sanchez-Delbarrio JC, Messeguer X and Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular Cloning-Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Santos S, Schneider H e Sampaio I (2003) Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of south America as revealed by mtDNA analysis. *Genetics and Molecular Biology* 26: 151-161.
- Santos S, Hrbek T, Farias IP, Schneider H e Sampaio I (2006). Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Mol Ecol* 15: 4361-4373.
- Satoh A, Sota T, Uéda T, Enokido Y, Paik JC e Hori M (2004) Evolutionary history of coastal tiger beetles in Japan based on a comparative phylogeography of four species. *Mol Ecol* 13: 3057-3069.
- Schlacher TA, Thompson L e Price S (2007) Vehicles versus conservation of invertebrates on sandy beaches: mortalities inflicted by off-road vehicles on ghost crabs. *Marine Ecology- an Evolutionary Perspective* 28:354-367.
- Schneider S, Roessli D and Excoffier L (2000) Arlequin ver. 2000. A Software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. Dept. of Anthropology and Ecology, University of Geneve, Geneve, Switzerland.
- Seeliger U, Odebrecht C e Castello JP (1998) Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. Editora Ecoscientia. Rio Grande 341pp.
- Silveira EF (1998) Dinâmica populacional de *Emerita brasiliensis* Schmitt, 1935 em praia arenosa do litoral sul do Brasil (Crustacea, Decapoda, Hippidae). Dissertação de Mestrado, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Siqueira GW, Pereira SFP e Aprile FM (2006) Determinação dos elementos-traço (Zn, Co e Ni) em sedimentos da Plataforma Continental Amazônica sob influência da descarga do rio Amazonas. *Acta Amazonica* 36: 321-326.
- Smith JA, Seltzer GO, Farber DL, Rodbell DT e Finkel RC (2005) Early Local Last Glacial Maximum in the Tropical Andes. *Science* 308: 678-681.
- Souza CRG, Suguio K, Oliveira AMS e Oliveira PE (2005) Quaternário do Brasil. Ribeirão Preto. Holos Editora. 382 pp.

- Stevens MI and Hogg ID (2003) Long-term isolation and recent range expansion from glacial refugia revealed for the endemic springtail *Gomphiocephalus hodgsoni* from Victoria Land, Antarctica. *Mol Ecol* 12: 2357-2369.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1997) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Trewick SA, Morgan-Richards M, Russell SJ et al., (2003) Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA. *Mol Ecol* 11: 2003-2012.
- Urien CM (1972) Rio de La Plata Estuary Environments. The Geological Society of America 133: 213-234.
- Uthicke S e Benzie AH (2003) Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific. *Mol Ecol* 12: 2635-2648.
- Valero-Oacheco E, Alvarez F, Abarca-Arenas LG e Escobar M (2007) Population density and activity pattern of the ghost crab, *Ocypode quadrata*, in Veracruz, Mexico. *Crustaceana* 80: 313-325.
- Veloso VG e Valentin JL (1993) Larval distribution and seasonal abundance of *Emerita brasiliensis* Schmitt, 1935 (Decapoda, Hippidae) in southern Brazil. *Rev. Bras. Biol.* 53:131-141.
- Verovnik R, Sket B e Trontelj (2005) The colonization of Europe by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) proceed from ancient refugia and was directed by habitat connectivity. *Mol Ecol* 14: 4355-4369.
- Vieira EF, Rangel SRS (1988) Planície Costeira do Rio Grande do Sul: Geografia física, vegetação e dinâmica sócio-demográfica. Porto Alegre. Sagra. 256 pp.
- Villwock, J.A. (1994) A costa brasileira: Geologia e evolução. *Notas Tecnicas CECO/UFRGS* 7:38-49.
- Vinagre AS, Amaral APN, Ribarcki FP, Silveira EF e Périgo E (2007) Seasonal variation of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146: 514-519.
- Walker D e Avise J (1998) Principles of phylogeography as illustrated by freshwater and terrestrial turtles in the southeastern United States. *Annu Rev Ecol Syst* 29: 23-58.

- Wares JP, Gaines SD e Cunningham CW (2001) A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary. *Evolution*. 55: 295-306.
- Wares J P (2002) Community genetics in the northwest Atlantic intertidal. *Mol Ecol* 11: 1131–1144.
- Waters JM e Roy MS (2003) Marine biogeography of southern Australia: phylogeographical structure in a temperate sea-star. *Journal of Biogeography* 30: 1787–1796.
- Waters JM, McCulloch GA e Eason JA (2007) Marine biogeographical structure in two highly dispersive gastropods: implications for trans-Tasman dispersal. *J. Biogeogr.* 34: 678-687.
- Wells SM (1995) Molluscs and the conservation of biodiversity Pp. 21-35 In: A.C.van Bruggen, S. M. Wells e T. C. M. Kemperman, eds. *Biodiversity and conservation and conservation of the Mollusca*. Netherlands.
- Wilson AB (2006) Genetic signature of recent glaciation on populations of a near-shore marine fish species (*Syngnathus leptorhynchus*). *Mol Ecol* 15: 1857-1871.
- Wright S (1978) *Evolution and the genetics of populations*. The University of Chicago Press, London.
- Zardus JD, Etter RJ, Chase MR, Rex MA e Boyle EE (2006) Bathymetric and geographic population structure in the pan-Atlantic deep-sea bivalve *Deminucula atacellana* (Schenck, 1939). *Mol Ecol* 15: 639-651.