

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva

Bianca Ferreira da Silva

**Filogeografia Comparada de duas espécies do gênero *Perinereis*
(Nereididae, Polychaeta) ao longo da costa brasileira**

Orientador: Paulo César de Paiva

Co-orientadora: Cinthya S.G. Santos

Rio de Janeiro

2014

Bianca Ferreira da Silva

Filogeografia Comparada de duas espécies do gênero *Perinereis*
(Nereididae, Polychaeta) ao longo da costa brasileira

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César de Paiva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Cinthya S.G. Santos

Rio de Janeiro
2014

Bianca Ferreira da Silva

Filogeografia Comparada de duas espécies do gênero *Perinereis*
(Nereididae, Polychaeta) ao longo da costa brasileira

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em de de 2014 por:

Prof. Dr. Edson Pereira da Silva
(Titular Externo)

Prof^a. Dr^a. Carla Zilberberg
(Titular Interno)

Prof^a. Dr^a. Michelle Klautau
(Titular Interno)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Leite
(Suplente Externo)

Prof^a. Dr^a. Cláudia Russo
(Suplente Interno)

Rio de Janeiro
2014

Silva, Bianca Ferreira da
Filogeografia Comparada de duas espécies do gênero *Perinereis*
(Nereididae, Polychaeta) ao longo da costa brasileira / Bianca Ferreira da Silva –
Rio de Janeiro: UFRJ, Instituto de Biologia, 2014.
xiii, 89.
Orientador: Paulo César de Paiva
Co-orientadora: Cinthya S.G. Santos
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia, Programa de pós-graduação em Biodiversidade e Biologia
Evolutiva, 2014.
1.Filogeografia comparada. 2.Genética de Populações 3. Polychaeta
4.Nereididae 5.DNA mitocondrial 6.Citocromo oxidase I 7.16S ribossomal
I.Paiva, Paulo Cesar de. II.Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva. III. Título.

Aos Ferreiras, sempre!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto, seja direta ou indiretamente.

Em primeiro lugar agradeço aos meus orientadores, “Paulinho” Cesar de Paiva e Cinthya Gomes, pelos ensinamentos, pela formação e por confiarem em mim neste projeto. A caminhada foi difícil, mas valeu a pena. O Paulinho é um profissional muito competente e que contribuiu muito para meu crescimento profissional. A Cinthya acreditou em mim desde o início e me acompanha desde a graduação. Devo muito da minha formação profissional e pessoal a ela. Muito obrigada por tudo!

Gostaria também de agradecer imensamente aos amigos dos dois Laboratórios de Polychaeta: Carlos, Elínia, Gustavo, Joana, Monique, Nury, Raquel, Victor e Viviane da UFRJ, e Antônio, Atilas, Carlos, Isabela, Marina, Vanessa e Vanessinha da UFF. Obrigada pelos momentos de descontração, tensão, PCRs que não deram certo, sequenciamentos que deram certo, Chinês e churrasco. Poliquetólogos são demais! Preciso agradecer em especial ao Victor. Foram muitos: “Victor, onde tá isso?”, “Victor, como faz aquilo?”. Esse trabalho realmente seria mais difícil se não fosse o Victor.

Não posso deixar de agradecer à minha família e amigos que me apoiaram o tempo todo, me deram força, incentivo, carinho e amor incondicional: Mãe, pai, tios, primos, irmãos e os grandes amigos Andre, Beatriz, César, Fernanda, Joana, Marina, Morena, Talita e Triciana. Em especial, ao meu companheiro Olívio, com quem compartilhei ideias, frustrações e vitórias, quem me olhava nos olhos e dizia que eu conseguiria nos momentos de fraqueza, que virou noites ao meu lado e me deu força pra ir até o final. Essa vitória é pra vocês.

Gostaria de agradecer também ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva da UFRJ, à todos os professores, funcionários e alunos.

Agradeço também as pessoas que ajudaram nas coletas e oferecerem espécimes coletados. Em especial, à Marcelli, que forneceu hospedagem em sua casa para coleta em Vitória/ES.

Por último, gostaria de agradecer à CENPES/UFRJ pela bolsa de mestrado, e a FAPERJ e o CNPq pelo financiamento do projeto.

A todos, meu muitíssimo obrigada!

**“A cura para tudo é a água salgada:
o suor, a lágrima e o mar.”
(Isak Dinesen)**

RESUMO

No ambiente marinho, barreiras ao fluxo gênico parecem ser difíceis de caracterizar. Há, entretanto, a ocorrência de eventos e fenômenos que afetem bruscamente o ambiente marinho, podendo funcionar como barreiras ao fluxo gênico entre populações. Padrões filogeográficos podem ser comparados a partir de espécies co-distribuídas, no intuito de identificar áreas geográficas onde uma comunidade possa ter sofrido processos evolutivos dependentes. De acordo com os eventos históricos que tenham ocorrido, a história biogeográfica da região pode se revelar, evidenciando eventos como processos de vicariância, dispersão e presença de barreiras biogeográficas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo definir e descrever padrões filogeográficos, de duas espécies de poliquetas pertencentes ao mesmo gênero, *Perinereis anderssoni* e *Perinereis ponteni*, ao longo da costa brasileira, através de dois marcadores moleculares mitocondriais, COI e 16S ribossomal. Este trabalho buscou também demonstrar a distinção filogenética entre as duas espécies, definindo o verdadeiro status taxonômico dessas duas espécies; inferir a história demográfica e estruturação populacional, tamanho populacional efetivo e fluxo gênico populacional das espécies, e por fim, correlacionar padrões evolutivos com a biogeografia da área de estudo. Nossos resultados mostram que as espécies *P. anderssoni* e *P. ponteni* são duas espécies filogeneticamente distintas, estando de acordo com as propostas taxonômicas mais recentes que indicam a separação dessas espécies. Além disso, essas espécies apresentam histórias evolutivas diferentes, com padrões filogeográficos incongruentes ao longo da costa brasileira: enquanto *P. ponteni* apresenta uma distribuição contínua ao longo da área estudada, *P. anderssoni* constitui, na verdade, duas espécies crípticas, com uma linhagem com distribuição no Nordeste e outra linhagem com distribuição no Sul/Sudeste do país. Essa incongruência de padrões filogeográficos não nos permite traçar eventos históricos comuns para a costa brasileira, o que sugere que os processos que originaram a atual distribuição dessas espécies na área de estudo se deram de maneira independente. Enquanto o complexo *P. anderssoni* parece ter a separação das linhagens relacionada às mudanças climáticas ocorridas durante os períodos glaciais e interglaciais, *P. ponteni* parece não ter sofrido influência dessas mudanças na sua distribuição atual. As duas linhagens do complexo *P. anderssoni* também apresentam histórias evolutivas diferentes. A linhagem do Nordeste apresenta valores de

diversidade genética maiores e haplótipos são mais numerosos. Apresentam ainda, maiores tamanhos efetivos populacionais, com tais populações parecendo estar estruturadas e demograficamente estáveis e com fluxo gênico assimétrico entre as localidades. Em relação à linhagem do Sul/Sudeste, esta apresenta valores de diversidade genética mais baixos e um haplótipo principal compartilhado por muitas populações com descendentes separados por poucos passos mutacionais, parecendo haver fluxo gênico entre as populações, principalmente a partir do Paraná para as outras localidades. Esta linhagem apresenta ainda, menores tamanhos efetivos populacionais e com indícios de expansão populacional recente. Já a espécie *P. ponteni* apresenta distribuição contínua ao longo da costa brasileira, com valores de diversidade genética não muito altos e distribuição dos haplótipos indicando expansão populacional recente. Encontramos ainda um possível intervalo de tempo decorrido após a última expansão populacional para esta espécie comparável a linhagem do Sul/Sudeste do complexo *P. anderssoni*, apesar de apresentarem histórias evolutivas distintas.

Palavras-chave: Filogeografia comparada, genética de populações, Polychaeta, Perinereis, Citocromo oxidase I, 16S ribossomal.

ABSTRACT

In the marine environment, barriers to gene flow are difficult to be characterized. Gene flow can constrain the evolutionary process, making the overall adaptation to local conditions difficult by homogenizing the genetic pool, or promoting evolution by dispersing new genes or gene combinations to the area distributional of a single species. There is, however, the occurrence of geological and climatic events, such as fresh water discharge, as well as other phenomena that abruptly affect the marine environment, acting as barriers that limit gene flow among populations. The phylogeographic patterns can be compared from co-distributed species in order to identify geographical areas where a community may have gone through dependent evolutionary processes, according to the historical events that have previously occurred, revealing the biogeographic history of the region, and the feasibility of occurrence for events such as processes of vicariance, dispersal and presence of biogeographical barriers. Thus, this study focuses to define phylogeographic patterns using two molecular mitochondrial markers, COI and ribosomal 16S, from two polychaete species belonging to the same genus, formerly considered synonymous, *Perinereis anderssoni* and *Perinereis ponteni*, along the Brazilian coast, aiming to confirm the phylogenetic distinction between the two species, analyze the true taxonomic status of these two species, understand the demographic history and populational structure of the species, and seek consistent evolutionary patterns that can describe the biogeography of the study area. Our results indicate 1) that *P. ponteni* is a phylogenetically distinct species from *P. anderssoni* and 2) the name *P. anderssoni* includes two sibling species along the Brazilian coast, with a lineage distributed along the Northeast and with another strain distributed along the South/Southeast. The incongruence between the observed phylogeographic patterns does not allow us to trace common historical events for the Brazilian coast, what suggests that the processes that led to the current distribution of *P. ponteni* and the complex *P. anderssoni* in the study area occurred independently. While the two strains of *P. anderssoni* complex seem to have their separation associated to climate changes during glacial and interglacial periods, *P. ponteni* does not seem to have been influenced by these same events in their current distribution. The two strains of *P. anderssoni* complex also have different evolutionary histories. The NE lineage presented higher genetic diversity, higher haplotype diversity and larger effective

population sizes, the populations seem to be structured and demographically stable and have asymmetric gene flow between locations. In contrast, the South/Southeast lineage presents lower values of genetic diversity, a major haplotype shared by many populations with descendants separated by few mutational steps. There seems to be gene flow between populations, mainly from Paraná to other locations with lower effective population size and evidence of recent population expansion. The *P. ponteni* species shows continuous distribution along the Brazilian coast, with values of genetic diversity that are not very high, distribution of haplotypes indicating recent population expansion, with possible time interval comparable to the South/Southeast lineage of the complex *P. anderssoni*, despite having different evolutionary histories.

Keywords: Comparative phylogeography, populational genetics, Polychaeta, *Perinereis*, cytochrome oxidase I, 16S ribosomal.

SUMÁRIO

1.Introdução.....	1
1.1.Filogeografia em ambiente marinho.....	1
1.2.Cosmopolitismo e espécies crípticas.....	5
1.3.Estudo com filogeografia de poliquetas.....	8
1.4.Família Nereididae e Gênero Perinereis.....	12
2.Objetivos.....	18
2.1.Objetivo geral.....	18
2.2.Objetivos específicos.....	18
3.Material e Métodos.....	19
3.1.Coletas.....	19
3.2.Extração de DNA.....	20
3.2.1.Kit de extração purege (gentra systems) para amostras fixadas em álcool...20	
3.2.2.Protocolo de extração de DNA de Nematoda (Floyd <i>et al.</i> , 2002).....	22
3.3.Amplificação por PCR.....	22
3.3.1. <i>Perinereis anderssoni</i>	22
3.3.2. <i>Perinereis ponteni</i>	24
3.4.Edição e alinhamento das sequências.....	24
3.5.Variabilidade e diversidade molecular.....	25
3.6.Análise filogenética.....	25
3.7.Rede de haplótipos.....	26
3.8.Demografia.....	26
3.9.Estruturação populacional.....	27
3.10. Fluxo gênico e tamanho efetivo populacional.....	30
4.Resultados.....	29
4.1. <i>Perinereis anderssoni</i>	32
4.1.1.Análise filogenética.....	32
4.1.2.Diversidade molecular.....	34

4.1.3. Rede de haplótipos.....	38
4.1.4. Testes de neutralidade.....	41
4.1.5. Estruturação populacional.....	47
4.1.6. Fluxo gênico e tamanho efetivo populacional.....	51
4.2. <i>Perinereis ponteni</i>	52
4.2.1. Análise filogenética.....	52
4.2.2. Diversidade molecular.....	55
4.2.3. Rede de haplótipos.....	57
4.2.4. Testes de neutralidade.....	59
4.2.5. Estruturação populacional.....	61
4.2.6. Fluxo gênico e tamanho efetivo populacional.....	61
5. Discussão.....	62
5.1. <i>Perinereis anderssoni</i> : complexo de espécies crípticas.....	63
5.2. <i>Perinereis ponteni</i> : ampla distribuição na costa brasileira.....	70
5.3. Filogeografia comparada: <i>P. anderssoni</i> x <i>P. ponteni</i>	73
6. Conclusões.....	74
7. Referências bibliográficas.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1.FILOGEOGRAFIA EM AMBIENTES MARINHOS

Compreender a natureza, o tempo e o contexto geográfico dos acontecimentos históricos e dos processos populacionais responsáveis pela distribuição espacial da diversidade genética é muito relevante para abordar questões relacionadas à especiação, seleção e aplicação desses conhecimentos para o controle e conservação das espécies. Nesse caso, métodos filogeográficos oferecem um modo de determinar os processos atuais e históricos que influenciaram a presente distribuição da variabilidade genética dos organismos (Avice, 2000).

A filogeografia pode ser definida como o estudo dos princípios e dos processos que delineiam a distribuição geográfica de linhagens genealógica, associando biogeografia, genética populacional e filogenia molecular no estudo dos polimorfismos de genes em populações de uma espécie ou entre espécies próximas (Avice *et al.*, 1987; Avice, 1998). Ou seja, o que se busca é avaliar se há congruência entre linhagens genéticas e sua distribuição espacial (Miyaki, 2009).

No ambiente marinho, barreiras ao fluxo gênico parecem ser difíceis de caracterizar, deixando a equivocada impressão de alto fluxo gênico entre populações de espécies marinhas. Nesse sentido, grande fluxo gênico pode restringir a evolução, dificultando a adaptação às condições locais, homogeneizando a composição genética (Futuyma, 1986; Hendry *et al.*, 2002). A aparente falta de barreiras físicas no mar e a presença de alta fecundidade e fase larval natante em muitos grupos marinhos, pode resultar em espécies com amplas distribuições geográfica, grandes tamanhos populacionais e altas taxas de fluxo gênico (Palumbi, 1992). Para Palumbi (1994), essas características parecem ser desafiadoras aos eventos de diferenciação populacional. Neste caso, a alta conectividade faz com que as populações sofram processos genéticos evolutivos interdependentes, retardando a divergência populacional (Palumbi, 1994).

Um dos modelos filogeográficos de Avice *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. Nesse sentido, a diferenciação genética em muitas espécies marinhas deve ser influenciada pela sua capacidade de dispersão larval e, com base no pressuposto citado acima,

esperaríamos baixo nível de estruturação populacional para organismos quanto maior é essa capacidade. Em geral, espécies com grande capacidade dispersiva possuem grande tamanho populacional e vasta distribuição geográfica além do alto fluxo gênico (Palumbi, 1994).

Muitos trabalhos estão de acordo com essa perspectiva. Lazoski e colaboradores (2001), por exemplo, encontraram um padrão de homogeneidade genética numa distância de 8000 km entre o litoral das Bermudas até o Brasil para a esponja *Chondrosia reniformis*. O mesmo foi observado em Nóbrega e colaboradores (2004) para a ascídea *Phallusia nigra*, que não apresentou diferenciação molecular entre a costa de Miami até a região de São Paulo. Em Nunes e colaboradores (2009), foi observada uma baixa diversidade genética na espécie *Montastrea cavernosa*, um coral, que se estende do Caribe à Abrolhos, também com padrão semelhante para as populações do Golfo da Nova Guiné, demonstrando uma alta conectividade e dispersão larval na espécie. Por outro lado, espécies que apresentam alguma restrição na dispersão, como por exemplo, fase larval curta, espera-se um baixo fluxo gênico e consequentemente alguma estruturação populacional. Como nos casos do crustáceo *Tigriopus californicus* (Burton & Lee, 1994) e do peixe *Embiotoca jacksoni* (Bernardi, 2000), ambos na Califórnia.

Durante muito tempo, persistiu a ideia de que não existiam barreiras ao fluxo gênico no mar, pela dificuldade de se caracterizar, porém elas existem. A ocorrência de eventos geológicos, eventos climáticos, canais de descarga de água doce, bem como características biológicas de cada espécie, como, por exemplo, a reprodução e recrutamento. Ou seja, qualquer fenômeno que afete bruscamente o ambiente marinho, pode funcionar como barreiras que limitam o fluxo gênico entre as populações.

Um dos principais fenômenos que limitam o fluxo gênico entre as populações diz respeito aos mecanismos de reprodução das espécies. O mecanismo de reprodução das espécies marinhas torna seu sucesso reprodutivo extremamente variável e depende de fatores físicos e químicos (Planes e Lenfant, 2002). Fatores como mudanças na salinidade, temperatura ou gradiente de nutrientes podem interferir na sobrevivência larval ou até dificultar a fixação de larvas ao substrato, afetando o recrutamento da espécie (Defeo, 1996). Nesse contexto, Palumbi (1994) afirma que não se pode generalizar quanto à raridade de especiação no mar e coloca em dúvida essa alta

capacidade dispersiva de organismos marinhos. Então, o mar pode ser compreendido como um ambiente verticalmente estruturado, geograficamente estruturado e modificado pela história geológica (Palumbi, 1994).

Os padrões filogeográficos podem ser comparados a partir de espécies co-distribuídas, com a finalidade de identificar áreas geográficas onde uma comunidade possa ter sofrido processos evolutivos dependentes, de acordo com os eventos históricos que tenham ocorrido (Bermingham & Moritz, 1998). De acordo com Plouviez e colaboradores (2010) comparar múltiplos padrões filogeográficos pode ajudar a discriminar os efeitos demográficos e os efeitos seletivos, obtendo-se assim uma melhor compreensão dos processos microevolutivos que moldam a estrutura geográfica das populações. Nesta abordagem comparativa, quando padrões evolutivos concordantes são encontrados entre diferentes espécies, revelam a história biogeográfica da região, podendo revelar eventos como processos de vicariância, dispersão e presença de barreiras biogeográficas (Avice *et al.*, 1987). Em contra partida, padrões evolutivos não congruentes podem indicar eventos de colonização independente (Bermingham & Moritz, 1998; Plouviez *et al.*, 2010)

Poucos trabalhos filogeográficos dessa natureza foram realizados para o ambiente marinho, a maioria entre espécies próximas, normalmente do mesmo gênero, como crustáceos (Audzijonyte *et al.*, 2006; Barber *et al.*, 2006) e moluscos gastrópodes (Reid *et al.*, 2006; Goldstien *et al.*, 2006). Podemos destacar o estudo de Plouviez e colaboradores (2009) que analisou seqüências de sete espécies de três diferentes grupos taxonômicos (três espécies de gastrópodes, três espécies de poliquetas e uma espécie de bivalve) com o objetivo de testar eventos evolutivos compartilhados em fontes hidrotermais ao longo da Elevação do Pacífico Leste. Os resultados revelaram separação Norte/Sul da Elevação do Pacífico, congruentes para essas espécies (com apenas uma exceção para uma espécie de poliqueta), sugerindo que a Barreira Equatorial teria promovido um evento vivariante entre as populações dessas espécies. Para o Brasil, podemos citar estudos de filogeografia comparada com peixes (Rocha *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2008)

Regiões do DNA mitocondrial são marcadores filogeográficos úteis devido à sua herança uniparental e a relativa ausência de recombinação genética molecular (Avice, 2000). Segundo Plouviez e colaboradores (2009), marcadores mitocondriais têm

grande utilidade quando usado em um conjunto de espécies que compartilham o mesmo ambiente, distribuição regional e mais ou menos a mesma história. Como o DNA mitocondrial é essencial para a cadeia respiratória, praticamente todo o genoma mitocondrial (15-20kb) é codificado, por isso na maioria dos casos não são encontrados íntrons, DNA repetitivo, pseudogenes e grandes espaçadores de genes (Freedman, 2005). Porém, sua importância fundamental como marcador molecular decorre da predominância de uma única sequência em todas as células do indivíduo, da rápida evolução nucleotídica, da transmissão matrilinear (raras exceções em moluscos) e da ausência de recombinação (Avice, 2004).

O COI é o gene mitocondrial mais comumente seqüenciado para animais invertebrados (Folmer, 1994). Substituições de nucleotídeos acumulam mais rapidamente na terceira posição do códon. Trata-se de um gene que codifica parte da cadeia transportadora de elétrons. Sua utilização mais comum tem sido para resolver problemas em níveis menos inclusivos de classificação (Black *et al.*, 1997) por mensurar substituições na terceira base dos códons, que tendem a se acumular mais rapidamente (Halanych & Janosik, 2006). Normalmente, a posição de terceiro códon é mais útil para análises intraespecíficas (por exemplo, Kojima *et al.*, 2002, 2003) e intragenéricos (Konwlton, 2000). Em contraste, mudanças na primeira e na segunda bases geralmente causam substituições de aminoácidos e, assim, acumulam mais lentamente, presumivelmente devido a restrições seletivas. Variações nas duas primeiras posições podem ser examinadas em qualquer nível, nos nucleotídeos ou aminoácidos e são úteis em elucidar de relações intergenéricas às interfamiliares (Konwlton, 2000). Um problema potencial de genes que codificam proteínas é que as alterações encontradas em terceiras posições podem ter tido múltiplas substituições obliterando o sinal filogenético (ou seja, saturação), antes de mudanças de aminoácidos ocorrerem (Russo *et al.*, 1994).

A utilização do gene 16S tem crescido nos últimos anos. Trata-se do gene codificador subunidade maior ribossomal. Costuma-se usar fragmentos que variam de 400 a 500 nucleotídeos, a partir de iniciadores desenhados por Palumbi (1991). O gene 16S tem sido utilizado para problemas intraespecíficos e até intragenérico, por ter uma taxa de evolução mais lenta do que a do COI (Halanych & Janosik, 2006).

1.2. COSMOPOLITISMO E ESPÉCIES CRÍPTICAS

O cosmopolitismo entre espécies de invertebrados marinhos bentônicos, geralmente é questionado (Knowlton, 1993). Para que uma espécie seja realmente cosmopolita ela deve manter o fluxo gênico ao longo de toda a sua distribuição (Knowlton, 1993), e para isso é preciso ter um alto poder de dispersão, que varia de acordo com fatores ambientais e caracteres intrínsecos da espécie (Russo *et al.*, 1994). Knowlton (1993) afirma que o cosmopolitismo de algumas espécies ocorre em consequência de ações antrópicas como, por exemplo, água de lastro e bioincrustação. Entretanto, em muitos casos a ampla distribuição está relacionada a estudos taxonômicos pouco precisos, se tratando na verdade de complexos de espécies crípticas (Solé-Cava *et al.*, 1991; Klautau *et al.*, 1999).

Espécies podem ser virtualmente impossíveis de separar morfologicamente, mas ainda representam linhagens evoluindo separadamente (Mayr & Ashlock, 1991). Estas espécies são chamadas espécies crípticas. Espécies crípticas podem ser organismos pouco estudados que realmente têm diferenças morfológicas, ou seja, espécies pseudo-crípticas, ou podem ser inseparáveis para o olho humano, mesmo depois de investigações aprofundadas, ou seja, verdadeiras espécies crípticas (Westheide & Hass-Cordes, 2001).

O desenvolvimento de ferramentas analíticas moleculares tornou possível avaliar o quão comum estas espécies crípticas realmente são, especialmente no mar (Knowlton, 2000). Bickford e colaboradores (2006) conceitua que “espécies crípticas são duas ou mais espécies distintas que são erroneamente classificadas sob um nome de espécie” e ““sibling species” são duas espécies que são o parente mais próximo um do outro e não foram distinguidos um do outro taxonomicamente”.

O ambiente marinho tem sido sugerido como “hot spot” para espécies crípticas (Eklof, 2010), e a implicação disso é que o número de espécies marinhas existentes é subestimado, incluindo os poliquetas (Nygren & Pleijel, 2010). Knowlton (1993) defende que o número elevado de espécies marinhas tidas como crípticas, pode estar relacionado com os métodos de preservação que danificam caracteres morfológicos importantes, com a dificuldade de estudos sobre a variabilidade morfológica intra e

interespecífica, assim como a falta de conhecimento sobre a biologia dos organismos e a dissociação das divergências morfológicas e ecológicas. Além disso, Knowlton (2000) ressalta que os taxonomistas marinhos raramente têm a oportunidade de estudar seus organismos *in vivo*, portanto, carecem de conhecimento, por exemplo, sobre o comportamento, o que torna mais difícil avaliar os limites das espécies. E finalmente, Knowlton (1993) também considera que vários taxonomistas marinhos são conservadores e consideram que grande variação intraespecífica e amplas áreas de distribuição como a norma.

A existência de espécies crípticas é um problema particularmente comum em organismos marinhos. Segundo Eklof (2010) uma das explicações para este fenômeno é que os organismos marinhos muitas vezes dependem de sinais químicos para o reconhecimento do parceiro e, assim, membros de duas espécies podem perceber-se como completamente diferentes, mas semelhantes aos olhos dos pesquisadores quando examinadas visualmente. Ao contrário do observado para a maioria dos organismos terrestres, raramente empregam pistas visuais para o reconhecimento e escolha de parceiros para reprodução (Klautau *et al.*, 1999). Na maior parte dos organismos marinhos a reprodução é feita pela liberação de gametas na água, e uma boa parte dos mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos é desempenhada pelo reconhecimento químico entre gametas (Knowlton, 1993). Como a taxonomia se baseia, principalmente, em caracteres morfológicos, acontece frequentemente que organismos marinhos morfológicamente indistinguíveis pertencem, de fato, a espécies diferentes. O não reconhecimento dessas espécies tem várias consequências, desde a subestimativa da biodiversidade real de cada local até a ameaça de extinção de espécies raras que podem não ser protegidas por serem morfológicamente iguais a outras espécies mais comuns (Galetti-Jr *et al.*, 2008).

Podemos citar alguns exemplos de trabalhos que foram desvendadas espécies crípticas onde se achava *a priori* que se trata de apenas uma espécie válida. Em Gusmão e colaboradores (2006) os camarões sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) representam o maior recurso pesqueiro de crustáceos na região sudeste do Brasil, e estudos genéticos revelaram que, na verdade, existem dois tipos de camarão sete-barbas nessa região. Uma das espécies ocorre ao longo de toda a costa Atlântica das Américas do Sul e Central, enquanto que a outra se encontra restrita ao Brasil. O mesmo foi

observado com outra espécie, o camarão-rosa (*Farfantepenaeus subtilis*), que abriga duas espécies diferentes (Gusmão *et al.*, 2005). Uma ocorre desde o Caribe até o nordeste brasileiro, e a outra ocorre do norte da América do Sul até o sudeste do Brasil, sendo as duas encontradas em simpatria entre o Maranhão e o Ceará. Mesmo nessa região de simpatria as duas formas são geneticamente muito diferentes, tanto com marcadores nucleares (alozimas) como com marcadores mitocondriais (citocromo oxidase D). Outro exemplo é o trabalho de Lazoski e colaboradores (2011) onde a ostra-do-mangue (*Crassostrea rhizophorae*) que, considerada antigamente como sendo apenas uma espécie, agregava duas espécies (*C. rhizophorae* e *C. brasiliiana*) com características biológicas, particularmente de crescimento sob cultivo, bastante diferentes. Segundo os autores, a existência dessas duas espécies explica, em parte, as grandes dificuldades que os aquicultores tinham em manter cultivos viáveis de ostras nativas, pois eles acabavam cultivando misturas de espécies, o que diminuía a eficiência reprodutiva do cultivo.

Em poliquetas, por mais de 200 anos, diferenças fenotípicas tem sido a base (porém não a única) operacional da taxonomia, em que a microscopia ótica é geralmente utilizada para detectar marcadores morfológicos espécies-específicas. Como em muitos outros táxons marinhos, isso resultou em um grande número de espécies com uma ampla variação geográfica (Knowlton, 1993).

A partir da constatação de que *Capitella capitata* tratava-se de um complexo de espécies crípticas, o *status* de outros supostos táxons cosmopolitas também foi questionado (Schulze *et al.*, 2000; Bleidorn *et al.*, 2006; Barroso *et al.*, 2010). As espécies crípticas da *Capitella* foram, primeiramente, reconhecidas em nível enzimático (Grassle e Grassle, 1976) e posteriormente foram encontradas também diferenças na sua ultraestrutura, desenvolvimento e/ou características fisiológicas e ecológicas (Eckelbarger & Grassle, 1987; Gamenick *et al.*, 1998; Linke-Gamenick *et al.*, 2000). Como resultado dessas investigações, um número considerável de *Capitella* "tipos" ou "espécies" foram distinguidos, embora não tenham sido formalmente nomeados (Mendez *et al.*, 2000).

Um número grande de investigações demonstrou, de forma convincente, que mesmo os complexos de espécies morfológicamente idênticos podem ser facilmente separados e as suas espécies crípticas identificadas com um elevado grau

de validade através de métodos com base em marcadores moleculares, tais como os gêneros *Syllis*, do Mediterrâneo (Maltagliati *et al.*, 2000); *Dipolydora*, do Mar do Japão (Manchenko & Radashevsky, 2002); *Neanthes* e *Hediste*, do Hemisfério Norte (Breton *et al.*, 2003); *Ophelina* do Mediterrâneo (Maltagliati *et al.*, 2004); e *Pectinaria* e *Owenia*, do Atlântico Nordeste (Jolly *et al.*, de 2006). Em todos os casos, espécies crípticas foram encontradas, geralmente com os níveis de divergência genética entre as espécies eram muito maiores do que as observadas entre populações coespecíficas (por exemplo, Schulze *et al.*, 2000), demonstrando o valor taxonômico de marcadores moleculares para espécies de poliquetas (Barroso *et al.*, 2010).

1.3. ESTUDOS COM FILOGEOGRAFIA DE POLIQUETAS

Nos últimos anos, com a diminuição dos custos para sequenciamento de DNA, o número de estudos com marcadores moleculares tem crescido. A seguir investigaremos com mais detalhes alguns desses estudos recentes onde marcadores moleculares são utilizados com a finalidade de estudar a distribuição geográfica de poliquetas, identificar complexos de espécies e averiguar seu verdadeiro status taxonômico.

Em Schulze *et al.* (2000) foi realizado um estudo com o poliqueta *Streblospio benedicti* Webster, 1879 família Spionidae, ao longo do Pacífico, Golfo e Costa Atlântica da América do Norte. Essa espécie tem como característica de história de vida dois ou mais modos de desenvolvimento larval e atributos reprodutivos – pecilogonia. O estudo utilizou a análise do gene mitocondrial COI, para investigar a frequência, ordem e taxa de mudanças da história de vida em populações de *Streblospio*. O complexo *Streblospio* norte-americano pôde ser separado em quatro clado distintos, cada um com alto suporte estatístico: três populações localizadas na costa leste e oeste do sul da Flórida formaram um único clado; a população do Golfo do México formou um único clado; e um clado foi formado com populações Central Atlântico/Pacífico.

Em estudo mais recente, Oyarzun *et al.* (2011) utilizou uma espécie pertencente à mesma família citada anteriormente, onde os espécimes também exibem a característica de pecilogonia, *Boccardia proboscidea* Hartman, 1940. Os autores examinaram os

papéis da história genética e plasticidade fenotípica em explicar a variação natural em *B. proboscidea* ao longo da costa do Pacífico dos Estados Unidos, usando dois marcadores mitocondriais, 16S e Cyt b. O estudo mostrou que alguns indivíduos que diferem em tipo de reprodução tinha o mesmo haplótipo, indicando independência destas características.

Jolly *et al.* (2006) usou uma abordagem de filogeografia comparada com objetivo de identificar eventos vicariantes congruentes. Com base nos resultados previamente publicados em Jolly *et al.* (2005), em que foram usados dados de sequência de COI de populações da poliqueta *Pectinaria koreni* Malmgren, 1866, amostrados em “Brittany coast” e “English Channel”: as populações formaram dois clados e não compartilharam nenhum haplótipo, sugerindo a presença de espécies crípticas. Para fazer uma análise comparativa, os autores ampliaram a área geográfica amostrada de *P. koreni* para coincidir com o padrão de distribuição de outra espécie de poliqueta, *Owenia fusiformis* Delle Chiaje, 1841, do Mediterrâneo até o Mar da Irlanda e o Mar Báltico. As análises, basedas nos genes COI e 16S, evidenciaram eventos congruentes de cladogênese entre as espécies do gênero *Pectinaria* e a espécie *O. fusiformis*, sugerindo uma história de eventos de vicariância em comum.

Bleidorn *et al.* (2006) realizou um estudo para investigar o status de uma espécie de poliqueta considerada cosmopolita *Scoloplos armiger* Müller, 1776 da família Orbiniidae. Baseados em estudos prévios com AFLP¹ e RAPD² com espécies do gênero *Scoloplos*, que sugeriram a presença de um complexo de espécies, os autores seguiram as análises com dados de sequencias do genoma mitocondrial (cox3-trnQ-nad6), de diferentes populações do Nordeste do Atlântico e Nordeste do Pacífico. As análises claramente separaram cinco espécies crípticas: três no Atlântico e dois no Pacífico. Os autores afirmam que esse resultado apoia que *S. armiger* não é uma espécie cosmopolista e sim um complexo de espécies crípticas.

Poucos trabalhos foram realizados no Hemisfério Sul. Podemos citar Barroso e colaboradores (2010), no qual foram comparados espécimes dos dois lados do Istmo do Panamá, assim como da costa do Brasil e ilhas do Atlântico Sul, da espécie *Eurythoe complanata* Pallas, 1766. Além da análise molecular com COI, foram também realizadas análises com aloenzimas e análise morfológica. As reconstruções

¹ AFLP - amplified fragment length polymorphism

² RAPD - random amplified polymorphic DNA

recuperaram três clados: um do Pacífico, do Atlântico restrito a ilhas e Atlântico costa e ilhas. A divergência encontrada entre o clados do Atlântico e o clado do Pacífico é equivalente à encontrada entre espécies do mesmo gênero. Uma análise mais detalhada da morfologia mostrou que a espécie do Atlântico restrito a ilhas pode ser diferenciada das outras duas pela ausência de notocerdas em arpão.

Além dos marcadores mitocondriais, marcadores nucleares também têm sido utilizados e demonstram bons resultados. Uma das regiões mais usadas tem sido a região correspondente aos espaçadores internos transcritos do DNA nuclear, ITS1 e ITS2, que separam os genes 18S, 5,8S e 28S, codificadores das subunidades ribossomais. Em organismos complexos, o DNA ribossomal encontra-se agrupado em arranjos de centenas a milhares de repetições que evoluem pelo mecanismo de “evolução em concerto”. A evolução em concerto atua sobre as repetições presentes em um genoma de maneira a homogeneizá-las em apenas uma sequência definida, o que facilita a utilização da região ITS.

Um estudo realizado por Patti e Gambi (2001) com poliqueta sabelídeo *Sabella spallanzanii* Gmelin, 1791, utilizou o marcador Internal transcribed spacer 2 (ITS2) do DNA ribossomal nuclear, para investigar as relações genéticas entre as populações dessa espécie, que é invasora em águas Australianas. Foram coletadas amostras de águas do sul da Austrália, o Mar Mediterrâneo e da costa atlântica francesa. Os resultados mostraram uma clara disjunção entre as populações da Austrália e do Mediterrâneo, formando dois clados bem suportados. A população do Atlântico mostrou uma diferença marcante com as populações do Mediterrâneo e da Austrália, mas segundo os autores, não permite a identificação da fonte de introdução da Europa à Austrália, indicando baixo fluxo gênico entre as populações. Os dados também sugerem a ocorrência de uma variabilidade genética reduzida das populações da Austrália, provavelmente devido ao "efeito fundador" de uma introdução, quer através das águas de lastro ou incrustação no casco de navios. Os autores sugerem que ciclo de vida e desenvolvimento larval de *S. spallanzanii* no Mar Mediterrâneo, com uma fase larval pelágica longa e um estágio de “pós-estabelecimento de metamorfose”, apóia a hipótese de introdução através de águas de lastro.

Alguns trabalhos, para uma análise mais robusta, utilizam-se de marcadores mitocondriais e nucleares. Em Iannotta *et al.* (2007), com o gênero *Lysidice*, no Mar

Mediterrâneo, foi utilizado os marcador mitocondrial COI e também o marcador nuclear ITS. Ambos os marcadores confirmaram a separação entre as duas espécies *L. collaris* e *L. ninetta*, porém com histórias evolutivas diferentes. Um baixo polimorfismo intraespecífico estava presente em *L. collaris*, juntamente com a ausência de estrutura filogeográfica. Em *L. ninetta*, em vez disso, foi recuperada a presença de linhagens crípticas e simpátricas em alguns locais.

Dando continuidade ao trabalho supracitado, Iannotta e colaboradores (2009), investigaram esses indícios de espécies crípticas em *L. ninetta*, com o marcador 16S rDNA. Esta nova análise confirmou a presença de duas espécies, onde também se observava diferenças morfológicas: um morfotipo denominado “dark” e um denominado “light”, pelo padrão de coloração escuro ou claro do prostômio e do primeiro setífero.

Outro estudo em que o padrão de coloração é indicativo da presença de complexo de espécies crípticas é Nygren e Pleijel (2010), com a espécie *Eumida sanguinea* Örsted 1843 (Phyllodocidae). Essa espécie possui seis combinações de pigmentação de branco (pigmentação no prostômio, segundo segmento, linhas transversais, linhas longitudinais e sem pigmentação) e distribuição por todo Nordeste do Atlântico. O estudo foi realizado na Europa, utilizando COI e ITS como marcadores moleculares. O estudo filogenético foi conduzido por inferência Bayesiana e recuperou 11 clados, sugerindo a presença de, pelo menos, 11 espécies crípticas, onde os padrões de pigmentação se repetiam em mais de uma espécie e apenas uma espécie apresentou dois padrões.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos com membros da família Nereididae. O estudo de Breton e colaboradores (2003) teve como objetivo de comparar a estruturação genética populacional de duas espécies com desenvolvimento diferente: *Neanthes virens* Sars, 1835 e *Hediste diversicolor* O.F. Müller, 1776, do hemisfério Norte (América do Norte, Europa e Japão para *N. virens*; e oeste do Canadá e França, para *H. diversicolor*). A primeira espécie apresenta uma fase larval pelágica que pode durar até nove dias, enquanto a segunda é incubadora. Os autores usaram dados de sequências de dois genes mitocondriais, COI e Cyt b (citocromo b). O gene COI não mostrou variação entre os espécimes das 12 localidades amostradas de *N. virens*, não sendo, portanto, examinado para *H. diversicolor*. Consequentemente, o foco das análises ficou, então, no marcador cyt b. Foram encontrados apenas três haplótipos (sendo um com 89% de frequência) em

N. virens. Em *H. diversicolor* foi encontrado 18,9% dos sítios polimórficos, sendo identificados 12 haplótipos e nenhum foi encontrado em comum nas três localidades amostradas. As árvores mais parcimoniosas mostraram dois clados para *H. diversicolor*, um com espécimes do Canadá e um com espécimes da Europa, e um clado com os espécimes de *N. virens*. De acordo com os autores, a baixa variabilidade genética encontrada nessa análise para *N. virens* é mais plausível de ser explicada por uma possível expansão populacional depois de um drástico bottleneck durante a Glaciação do Pleistoceno. Já a estruturação genética das populações de *H. diversicolor* foi a esperada para organismos que apresentam ovoviviparidade.

Podemos citar ainda mais dois trabalhos realizados com a espécie *Hediste diversicolor*: Audzijonyte e colaboradores (2008) e Virgilio e colaboradores (2009). Vários trabalhos são realizados (ver também Abbiati & Maltagliati 1996; Virgilio & Abbiati, 2004, 2006; Virgilio *et al.*, 2006) com essa espécie devido a sua importância econômica (Gambi *et al.*, 1994; Olive, 1994) e para estudos ecotoxicológicos e de bioacumulação (por exemplo Virgilio *et al.*, 2005). Cada vez mais se espera entender os padrões de distribuição geográfica e a história evolutiva desse complexo de espécies. Audzijonyte e colaboradores (2008) numa análise limitada ao Mar Báltico, recuperou dois clados, enquanto a análise de Virgilio e colaboradores (2009) em maior escala (costa da Europa, Marrocos, Mar Mediterrâneo, Mar Negro e Caspian) recuperando assim três clados e cinco subclados bem suportados.

Trabalhos com o gênero *Perinereis* são bem escassos. Podemos citar Liu e colaboradores (2012), na Península Shandong (China), com a espécie *Perinereis aibuhitensis* Grube, 1878. As quatro populações analisadas mostraram estruturação significativa, evidenciando um fluxo gênico limitado entre elas, porém todas elas pertencentes a essa mesma espécie. Os baixos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica sugerem um recente evento de “gargalo de garrafa”, sendo corroborado pelos resultados de testes de neutralidade.

1.4.FAMÍLIA NEREIDIDAE E GÊNERO PERINEREIS

O táxon Polychaeta compreende cerca de 9000 espécies reconhecidas com vários nomes em sinonímia e uma sistemática bastante instável (Rouse & Pleijel, 2001). Na

costa brasileira foram descritas cerca de 62 famílias e 800 espécies (Amaral *et al.*, 2010).

A família Nereididae Johnston, 1845 está organizada em 45 gêneros e cerca de 450 espécies (Rouse & Pleijel, 2001; Santos *et al.*, 2005, Bakken & Wilson, 2005). No entanto há pouco consenso entre os diferentes autores sobre a monofilia de alguns gêneros (Bakken & Wilson 2005; Pleijel 2001; Santos *et al.* 2005; Santos, 2007). Desse total, 91 espécies foram registradas na costa brasileira (Amaral *et al.*, 2012). Dentre os poliquetas, este é o grupo mais conhecido e amplamente distribuído sendo encontrados em vários habitats, tanto em substratos consolidados quanto inconsolidados, e desde regiões entremarés até grandes profundidades, com algumas espécies vivendo em habitats especializados como galerias e cavidades de troncos de árvores, no entanto são comumente encontrados em habitats marinhos de águas rasas.

Os caracteres morfológicos distintos da família são a presença de uma faringe eversível composta de dois anéis (o maxilar - regiões I a IV e o oral - regiões V a VIII), e um par de mandíbulas na parte distal; o peristômio e o primeiro segmento são fundidos e apresentam de dois a quatro pares de cirros tentaculares (a maioria dos gêneros apresenta quatro pares); prostômio com dois pares de olhos e um par de antenas frontais (raramente apresenta antena simples ou a antena está ausente); palpos terminais e biarticulados; parapódios são normalmente birremes, exceto os dois primeiros pares que são unirremes; notopódios e neuropódios com cerdas compostas, notocerdas e neurocerdas compostas podem ser homogonfas, heterogonfas e sesquigonfas, espiníferas e/ou falcíferas, sendo uma sinapomorfia do grupo as cerdas compostas do notopódio; um par de cirros pigidiais na região posterior (Fauchald, 1977; Santos & Steiner, 2006). Outra sinapomorfia do grupo é prostômio em forma de T-invertido (Glasby, 1993; Fauchald & Rouse, 1997; Rouse & Fauchald, 1997; Wilson, 2000; Pleijel, 2001; Santos *et al.*, 2005).

Quanto ao modo de reprodução, os nereidídeos apresentam formas muito diversas, em que a grande maioria das espécies é gonocórica, no entanto, algumas hermafroditas também ocorrem. O tipo mais comum de reprodução consiste na epigamia, o qual envolve alterações morfológicas internas e externas, tanto em machos como em fêmeas, passando a serem chamados de indivíduos epítocos (Wilson, 2000; Pleijel, 2001). Modificações epítocas incluem o aumento dos lobos parapodiais, a redução ou completa

degeneração do intestino posterior e septos (Dakhama & Dhainaut, 1985), aumento no tamanho dos olhos, substituição de cerdas por cerdas natatórias nos parapódios posteriores e reorganização muscular (Rouse & Pleijel, 2001). Em machos, pode ocorrer a formação de roseta pigidial (algumas vezes referida como roseta anal ou genital), com suposta função de liberação dos gametas e papilas serrilhadas no lado ventral do cirro dorsal, com função quimiosensorial, de forma a perceber pistas químicas das fêmeas (Baoling *et al.*, 1985).

A transformação epítoca e a gametogênese tendem a ocorrer simultaneamente, com os recursos sendo divididos entre a transformação corporal e a maturação dos gametas (Cassai & Prevedelli, 1998). As modificações parapodiais permitem que os indivíduos assumam uma curta existência pelágica para liberação dos gametas (Rouse & Pleijel, 2001). Os organismos apresentam semelparidade, ou seja, após a liberação dos gametas, os indivíduos tendem a morrer, seja por exaustão, seja pela ruptura da parede do corpo para liberação dos gametas (Fischer, 1999) e a fecundação pode ser interna ou externa. Há registros na literatura que o período reprodutivo desses organismos pode ser influenciado por estímulos ambientais, como mudanças de temperatura, o ciclo lunar, a salinidade e o fotoperíodo, e também por estímulos endógenos, como hormônios neurosecretores e a liberação sincronizada de feromônio na água (Mazurkiewicz, 1975; Fong, 1991 e 1993; Last & Olive, 1999; Wilson, 2000). O fotoperíodo parece estar relacionado com a velocidade de maturação dos ovócitos (Rees & Olive, 2000) e com o início das modificações epítocas (Lawrence & Soame, 2009).

Quanto ao desenvolvimento larval, pode variar de acordo com o habitat e os diferentes táxons, podendo a larva ficar muito ou nenhum tempo no plâncton, antes de realizar o assentamento. No geral, larvas de ambientes estuarinos ou de água doce podem apresentar desenvolvimento bentônico ou gastar pouco tempo no ambiente pelágico (Mazurkiewicz, 1975; Wilson, 2000). Segundo Rouse (2000), o único tipo de larva que a família apresenta é a lecitotrófica.

Quanto à alimentação, há uma grande diversidade de estratégias conhecidas para a família, incluindo predadores, herbívoros, depositívoros e suspensívoros, entretanto, a maioria dos organismos é onívora (Fauchald & Jumars, 1979; Wilson, 2000; Pleijel, 2001).

O gênero *Perinereis*, considerado polifilético, é composto por cerca de 60 espécies (Bakken & Wilson, 2005; Worms, 2011). Há 9 espécies registradas na costa brasileira (Tabela 1), duas delas descritas originalmente para o Rio de Janeiro, *P. ponteni* Kinberg, 1866 e *P. anderssoni* Kinberg, 1866, e *P. brevicirrata* Treadwell, 1920, para o estado de São Paulo. Embora alguns autores considerem *P. ponteni* e *P. anderssoni* como sinônimas, Ipuca e colaboradores (2007) ao realizarem um estudo citogenético de 7 espécies da família encontraram diferenças cromossômicas significativas entre as espécies. Da mesma forma, trabalhos anteriores já indicavam diferenças morfológicas (Lana, 1984; Santos & Steiner, 2006). Os dados presentes na literatura indicam que alguns membros da família Nereididae podem ter sofrido diferenciação cromossômica não acompanhada de modificação externa significativa (Ipuca *et al.*, 2007), o que acentua a necessidade de se utilizar a análise molecular como base para refinamento dos estudos taxonômicos de espécies consideradas amplamente distribuídas.

A espécie *Perinereis anderssoni* (Figura 1) pode alcançar 50 mm de comprimento e 4 mm de largura, com coloração marrom no prostômio, sendo encontrada em praias areno-lamosas e em costões rochosos, entre algas. Registros posteriores indicam a sua ocorrência ao longo da costa brasileira (Santos & Steiner, 2006; Amaral *et al.*, 2010) e também no oceano Pacífico, no Caribe (Salazar-Vallejo & Londono-Mesa, 2004), distribuição esta que lhe confere o status de espécie cosmopolita.

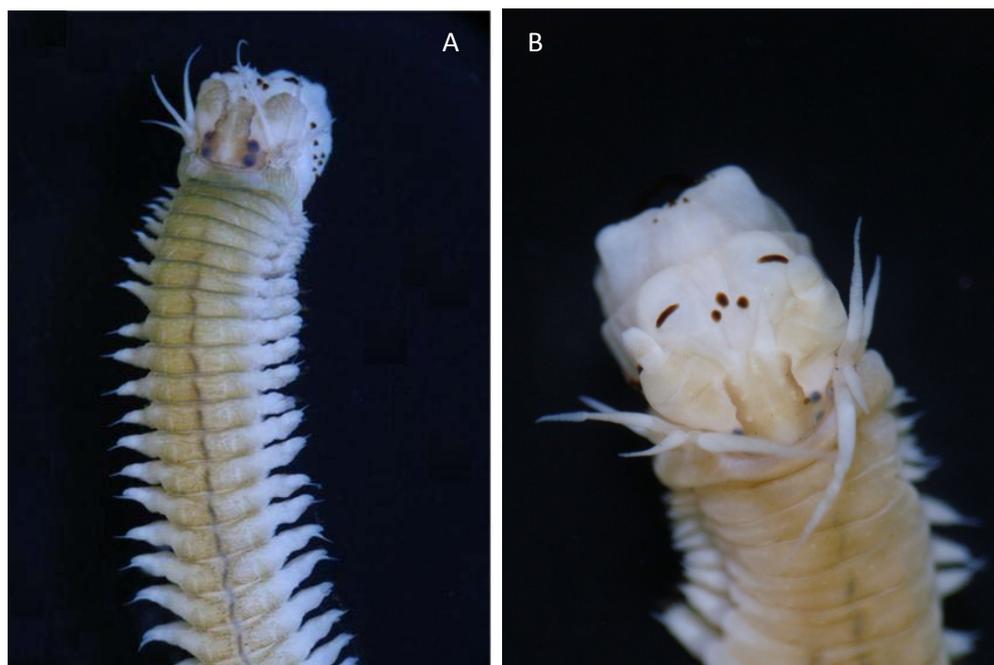


Figura 1: *Perinereis anderssoni*. A: Região anterior, vista dorsal; B: Probóscide, vista dorsal. Extraído de Coutinho (2013).

A espécie *Perinereis ponteni* (Figura 2) pode atingir 50 mm de comprimento e 4 mm de largura, com coloração uniforme marrom-esverdeada, sendo encontrado em praias com areia grossa misturada com fragmentos de rochas, bem como em costões rochosos, entre algas, podendo ser encontrado em simpatria com *P. anderssoni*. Há registros no Oceano Atlântico no México e ao longo da costa do Brasil (Santos & Stener, 2006).

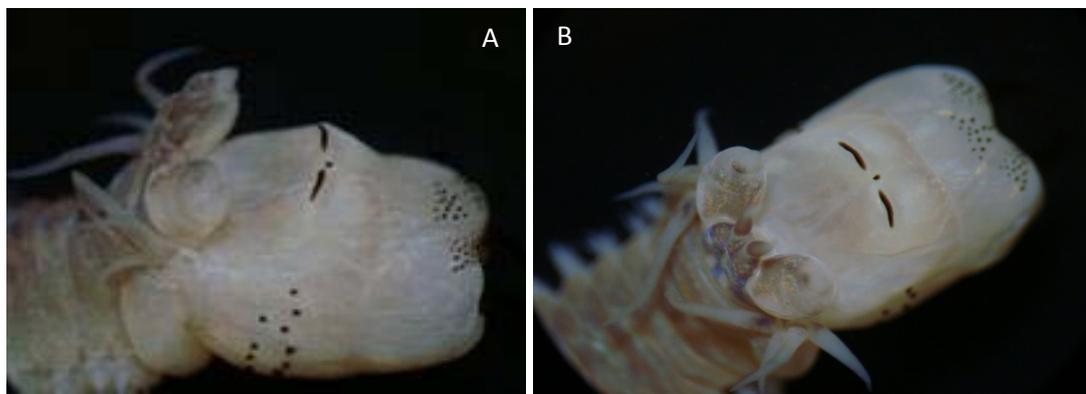


Figura 2: *Perinereis ponteni*. Probóscide. A: Vista Lateral; B: vista dorsal. Extraído de Coutinho (2013)

Segundo Lana (1984) as espécies *P. ponteni* e *P. anderssoni* podem ser consideradas distintas como base nas seguintes características morfológicas: *P. anderssoni* apresenta um menor número de paragnatas na área I da probóscide, língulas notopodiais em setíferos medianos e posteriores mais longas e largas, três paragnatas na área V, os cirros dorsais ultrapassam o ápice das língulas notopodiais na região anterior e principalmente pelo típico padrão de coloração in vivo nas regiões dorsais e laterais do corpo. Enquanto que *P. ponteni* apresenta apenas uma paragnata na área V, os cirros dorsais não ultrapassam, ou ultrapassam pouco, o ápice das língulas notopodiais na região anterior e apresentam um mesmo padrão de coloração ao longo de todo o corpo.

Pouco se sabe sobre a biologia reprodutiva e dinâmica populacional dessas espécies, porém sabe-se que várias espécies pertencentes ao gênero reproduzem-se por epitoquia, como *P. helleri*, *P. cavifrons*, *P. nigropunctata*, *P. suluana*, *P. vancaurica*, *P. variodentata*, *P. nuntia*, *P. caeruleis*, *P. macropus*, *P. aibuhitensis* e *P. weijhouensis*.

Em trabalho recente, Peixoto (2013) demonstrou e descreveu os estágios de epitoquia em *P. anderssoni*.

Estudos filogeográficos têm se mostrado muito úteis em buscar congruência entre as histórias evolutivas, demográficas e a atual distribuição das espécies. Já a abordagem comparativa tem contribuído para descrever a história evolutiva de uma determinada região, permitindo entender os efeitos históricos nos perfis biogeográficos da comunidade ali presente. Nesse contexto, esse trabalho busca entender os padrões filogeográficos, história demográfica e evolutiva das espécies *Perinereis anderssoni* e *Perinereis ponteni*, e com isso tentar identificar padrões evolutivos concordantes que mostrem a biogeografia para a área de estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Definir padrões filogeográficos de duas espécies de poliquetas pertencentes ao mesmo gênero, *Perinereis anderssoni* e *Perinereis ponteni*, ao longo da costa brasileira, através de dois marcadores moleculares mitocondriais, COI e 16S ribossomal.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o status taxonômico destas duas espécies;
- Buscar padrões evolutivos concordantes que possam descrever a biogeografia da área de estudo;
- Correlacionar os padrões filogeográficos observados a processos históricos da região;
- Avaliar a diversidade genética das espécies
- Inferir a história demográfica das populações destas espécies;
- Estimar o tamanho populacional efetivo e fluxo gênico entre as populações.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETAS

Foram coletadas um total de 225 indivíduos ao longo da costa brasileira, em 7 localidades: Ilha do Mel - Paranaguá/PR, Praia Martin de Sá - Caraguatatuba/SP, Ilha do Boi - Vitória/ES, Praia de Itaipu - Niterói/RJ, Subaé - São Francisco do Conde/BA, Pina - Recife/PE e Praia de Paracuru – Paracuru/CE (Figura 3). Os espécimes foram coletados em costão rochoso, na região entremaré, durante maré baixa de sizígia. Foi utilizada uma pá para a raspagem da cobertura dos bancos do molusco bivalve *Brachidontes* sp. e algas (Figura 4), sob a qual são geralmente encontrados os espécimes das espécies *Perinereis anderssoni* e *Perinereis ponteni*. Os indivíduos foram fixados e conservados em álcool 92,8%, e identificados no laboratório sob microscópio estereoscópio. A tabela abaixo mostra o número de indivíduos coletados por localidade e sigla usada (Tabela 2).

Tabela 2: Pontos de coletas, siglas referentes e número de indivíduos coletados por localidade.

Ponto de coleta	Sigla	<i>P. anderssoni</i>	<i>P. ponteni</i>
Ilha do Mel – Paranaguá/PR	PR	13	3
Martin de Sá – Caraguatatuba/SP	SP	7	5
Itaipu – Niterói/RJ	RJ	50	x
Ilha do Boi – Vitória/ES	ES	50	2
Subaé – S. Francisco do Conde/BA	BA	x	17
Pina – Recife/PE	PE	8	30
Praia de Paracuru – Paracuru/CE	CE	35	5



Figura 3: Mapa do Brasil indicando os pontos de coleta. A: Praia de Paracuru – Paracuru/CE. B: Pina – Recife/PE. C: Subaé – S. Francisco do Conde/BA. D: Ilha do Boi – Vitória/ES. E: Praia de Itaipu – Niterói/RJ. F: Martin de Sá – Caraguatatuba/SP. G: Ilha do Mel – Paranaguá/PR.



Figura 4: Costão da Ilha do Boi, Vitória/ES. Cobertura de *Brachidontes sp.* e algas, sob o qual se encontram os espécimes coletados. Foto da autora.

3.2.EXTRACÇÃO DE DNA

Foram realizados dois tipos de extrações de DNA: protocolo do kit de extração Purege® (Gentra Systems) para amostras fixadas e Protocolo modificado de extração de DNA de Nematoda (Floyd et al., 2002). Em ambos os tipos de extração, o resto do corpo não utilizado dos indivíduos foram conservados para tombamento na coleção de poliquetas “Edmundo Ferraz Nonato” do Laboratório de Polychaeta da Universidade Federal do Rio de Janeiro – IBUFRJ

3.2.1. KIT DE EXTRAÇÃO PUREGE® (GENTRA SYSTEMS) PARA AMOSTRAS FIXADAS EM ÁLCOOL:

Inicialmente, um fragmento do tecido foi colocado em um tubo contendo 300 µL de tampão de lise (*Cell Lysis Solution*) e incubado a 65 °C por 15 minutos. Logo após, o tecido foi macerado e acrescido com 4 µL de proteinase K (20 mg/mL) antes de ser incubado a 55 °C até todo o tecido ser digerido. Depois desse período, foram adicionados 100 µL de solução para precipitar proteínas e restos celulares (*Protein Precipitation Solution*). A amostra foi homogeneizada em alta velocidade por 20 segundos e incubada em gelo e centrifugada a 14.000 RPM por 6 minutos, por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo tubo contendo 300 µL de Isopropanol 100% e, após ser homogeneizada, a amostra foi novamente centrifugada a 14.000 RPM por 6 minutos. Para melhorar a qualidade da extração o sobrenadante foi descartado e a pelota composto de DNA foi lavado com 300µL de Etanol 70%. Depois de uma rápida centrifugação (14.000 RPM por 1 minuto), o sobrenadante foi descartado e a pelota ficou secando por 6 minutos a temperatura ambiente. Para ressuspender o DNA foi adicionado 100 µL de solução hidratante (*DNA Hydration Solution*) por 1 hora a 65 °C. Ao final as extrações foram estocadas a temperatura de -20 °C.

3.2.2. PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE NEMATODA (FLOYD *et al.*, 2002)

Inicialmente, foi retirado um pedaço de tecido, equivalente a um segmento do animal, sem os parapódios, sob microscópio estereoscópico. O tecido foi colocado para digestão em 20µl de NaOH (0,25M) por três horas em temperatura ambiente. Após a digestão, as amostras foram encubadas a 95°C por três minutos e em seguida resfriada a temperatura ambiente. Foram adicionados 4µl de HCl (1,0M), 10ul de Tris-HCl (0,5M – pH 8,0) e 5µl de Triton X-100 (2%), seguidas de homogeneização e centrifugação rápida. Novamente as amostras foram encubadas a 95°C por três minutos, resfriadas em temperatura ambiente e armazenadas a -20°C.

3.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR

As amplificações foram feitas em termocicladores através de técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), que permite a amplificação de partes específicas do DNA a partir de pequenas amostras que podem ser amplificadas milhões de vezes. A verificação do sucesso da amplificação foi feita em eletroforese de gel de agarose 1% e tampão TBE 0,5X. O tamanho das regiões amplificadas foi estimado a partir do marcador de peso molecular Invitrogen™ 100 bp DNA *ladder*. As etapas de purificação e sequenciamento foram realizadas na empresa coreana MacroGen Inc, sendo as amostras enviadas em conformidade com a Autorização Especial de Acesso e Remessa do Patrimônio Genético n ° 03/2005 emitida pelo CGEN/IBAMA, ou pelo Laboratório de Biodiversidade Molecular do Instituto de Biologia/UFRJ utilizando-se um sequenciador automático ABI3500 da marca Applied Biosystems.

3.3.1. *Perinereis anderssoni*

Para a espécie *P. anderssoni*, na amplificação da região do COI foram utilizados os iniciadores universais LCO1490 e HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) (Tabela 3) para todas as populações. Cada reação de PCR continha 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase, 200 µM de dNTP, 0,6 µM de cada um dos iniciadores, 2 mM de cloreto de

magnésio, tampão para PCR 1X e 1 µL de DNA, em volume final de 25 µL. As reações de PCR foram feitas seguindo um ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 90 segundos a 51 °C e 1 minuto a 72 °C, e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C.

Para a amplificação do 16S ribossomal foram utilizados dois pares de iniciadores, sendo eles 16Sar-L e 16Sbr-H (Palumbi *et al.*, 1991), para as populações do PR, SP e ES, e 16Sar-L (Palumbi *et al.*, 1991) e 16SAN-R (Zanol *et al.*, 2010) para as populações RJ, PE e CE (Tabela 3). Cada reação de PCR para o par de iniciadores 16Sar-L e 16Sbr-H continha 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase, 200 µM de dNTP, 0,6 µM de cada um dos iniciadores, 2 mM de cloreto de magnésio, tampão para PCR 1X e 1 µL de DNA, em volume final de 25 µL. As reações de PCR foram feitas seguindo um ciclo inicial de 4 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 50 segundos a 94 °C, 50 segundos a 51 °C e 50 segundos a 72 °C, e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C. Para o par de iniciadores 16Sar-L e 16SANR, cada reação continha 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase, 80 µM de dNTP, 0,4 µM de cada um dos iniciadores, 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), tampão para PCR 1X, 20 µg de albumina de soro bovino e 1 µL de DNA, em volume final de 25 µL. As reações de PCR seguiram um ciclo inicial de 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C e 90 segundos a 72 °C e um ciclo final de 7 minutos a 72 °C.

Tabela 3: Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento de *P. anderssoni*.

COI		Sequências
LCO 1490	5'-GGTCAACAAATGATAAAGATATTGG-3'	<i>Forward</i>
HCO 2198	5'-TAAACTTGAGGGTGACCAAAAAATGA-3'	<i>Reverse</i>
16S		Sequências
16Sar-L	5'-CGCCTGTTTTCAAAAACAT-3'	<i>Forward</i>
16SBr-H	5'-CCGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	<i>Reverse</i>
16SAN-R	5'-GCTTACGCCGGTCTGAACTCAG-3'	<i>Reverse</i>

3.3.2. *Perinereis ponteni*

Para a espécie *P.ponteni*, na amplificação da região do COI foram utilizados os iniciadores COI-EUR e ACOI-AF (Zanol *et al.*, 2010) (Tabela 4) para todas as populações. Cada reação de PCR continha 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase, 200 µM de dNTP, 0,4 µM de cada um dos iniciadores, 2 mM de cloreto de magnésio, tampão para PCR 1X e 1 µL de DNA, em volume final de 25 µL. As reações de PCR foram feitas seguindo um ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 47 °C e 1 minuto a 72 °C, e um ciclo final de 7 minutos a 72 °C.

Para a amplificação do 16S ribossomal foram utilizados os iniciadores 16Sar-L (Palumbi *et al.*, 1991) e 16SANR (Zanol *et al.*, 2010) (Tabela 4) para todas as populações. Cada reação continha 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase, 80 µM de dNTP, 0,4 µM de cada um dos iniciadores, 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), tampão para PCR 1X, 20 µg de albumina de soro bovino e 1 µL de DNA, em volume final de 25 µL. As reações de PCR seguiram um ciclo inicial de 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C e 90 segundos a 72 °C e um ciclo final de 7 minutos a 72 °C.

Tabela 4: Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento de *P. ponteni*.

COI	Sequências	
ACOI-AF	5'-CWAATCAYAAAGATATTGGAAC-3'	<i>Forward</i>
COI-EUR	5'-TDCGGRTGDCCAAARAATCA-3'	<i>Reverse</i>
16S	Sequências	
16San-L	5'-CGCCTGTTTTCAAAAACAT-3'	<i>Forward</i>
16SAN-R	5'-GCTTACGCCGGTCTGAACTCAG-3	<i>Reverse</i>

3.4. EDIÇÃO E ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

A visualização dos eletroferogramas, a edição das sequências e a formação das sequências consenso (*contigs*) entre as sequências 5'- 3' e 3'- 5' foram realizados no programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011), assim como os alinhamentos, através da ferramenta Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Ainda neste programa foram contabilizados os números de sítios polimórficos e únicos (*singletons*).

3.5.VARIABILIDADE E DIVERSIDADE MOLECULAR

A título de comparação das distâncias genética entre populações foi efetuado o cálculo da distância par-a-par Kimura-2-parâmetros (K2P) entre as sequências utilizando-se o programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Os parâmetros de diversidade populacionais como número de haplótipos, número de sítios segregantes, diversidade haplotípica e nucleotídica foram estimados pelo programa DNAsp 5.0 (Librado & Rozas, 2009). Este programa ainda foi utilizado para definir os haplótipos pertencentes a cada uma das populações e para a criação dos arquivos de entrada do programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

3.6.ANÁLISE FILOGENÉTICA

Primeiramente, foram feitas análises filogenéticas de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana para testar a distinção filogenética das duas espécies, uma vez que alguns autores ainda as consideram como uma espécie única. Posteriormente, as análises foram feitas considerando as espécies separadas. Como grupo externo, para enraizar a árvore, foram utilizadas sequências de *Perinereis nuntia* e *Perinereis vallata*, para 16S e COI, respectivamente, retiradas do *GenBank*.

Para todas as análises os modelos de substituição dos nucleotídeos que melhor se adequavam aos dados foram verificados através da ferramenta *ModelTest* integrado ao programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

A análise de máxima verossimilhança foi efetuada com o programa PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010), com 1000 réplicas de bootstrap para suporte dos ramos. Para a inferência Bayesiana foi utilizado o programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Para ambas as espécies e marcadores, foram efetuadas 10.000.000 gerações para a cadeia de Markov-Monte Carlo (MCMC), com duas corridas simultâneas e quatro cadeias cada, sendo os parâmetros amostrados a cada 1.000 gerações e *burn-in* de 25% para checar se o descarte das primeiras gerações foi adequado e se o número de gerações foi suficiente para que as frequências convergissem foi utilizado o valor médio

do desvio padrão das frequências (valor $<0,01$) e o programa Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007).

3.7. REDE DE HAPLÓTIPOS

A rede de haplótipos foi construída pelo método de rede de parcimônia estatística (Templeton *et al.*, 1987), com o nível de 95% confiança, onde foi estimada a distribuição dos haplótipos entre as diferentes localidades e o número de mudanças entre eles, construída através do pacote pegas (Paradis, 2010), integrado ao ambiente estatístico R (R Core Team, 2012).

3.8. DEMOGRAFIA

A avaliação da história demográfica das populações foi investigada através dos testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997) realizados no programa DNAsp 5.0 (Librado & Rozas, 2009). Tais testes são utilizados com o objetivo de verificar se as populações estudadas estão evoluindo segundo o modelo neutro de evolução molecular (Kimura, 1969). Entretanto, a rejeição do modelo neutro pode ser indicadora de possíveis alterações demográficas, como expansão ou redução populacional (Aris-Brosou & Excoffier, 1996; Fu & Li, 1993; Tajima, 1996). No modelo neutro, assume-se que as mutações são constantes e ocorrem de acordo com o modelo de sítios infinitos, com ausência de seleção e recombinação, tamanho das populações constante e sem migração entre elas.

O teste D de Tajima (Tajima, 1989) compara o número de sítios segregantes (S) e o número médio de diferenças par a par entre haplótipos (π) de uma dada população. Em uma população em equilíbrio esses dois estimadores devem ser iguais, pois são gerados pelo processo da deriva gênica, o que implica no fato do valor de D ser igual a zero. Valores positivos, estatisticamente significativos, indicam que o número médio de diferenças entre os haplótipos é relativamente maior que o número de sítios segregantes, podendo isto ser causado pela presença de estruturação populacional, seleção balanceada ou um declínio do tamanho populacional (efeito gargalo ou fundador). Por

outro lado, valores significativamente negativos indicam que o número médio de diferenças entre haplótipos é menor que o número de sítios segregantes, mostrando um excesso de haplótipos raros. Este cenário pode estar relacionado com a ocorrência de seleção purificadora ou um rápido crescimento populacional (Pybus & Shapiro, 2009).

Neste programa ainda foi realizada a análise de distribuição das diferenças, através da curva de mudança de tamanho populacional, para as populações que desviaram significativamente da hipótese nula de evolução neutra. Esta análise pode ser usada para testar tanto a expansão demográfica quanto espacial, a partir da comparação e ajuste estatístico da curva esperada e observada. Em ambos os casos a construção da curva esperada assume o modelo de sítios infinitos (Excoffier *et al.*, 2005). O modelo teórico diz que uma população que sofreu uma redução no número de indivíduos ou que são estáveis demograficamente terá uma distribuição multimodal (várias ondas), enquanto que uma expansão populacional recente ou expansão da distribuição geográfica com alta taxa de migração atual entre populações próximas é representada por uma curva unimodal (uma onda) (Excoffier, 2004; Rogers & Harpending, 1992).

Através dos parâmetros τ calculados na análise de distribuição das diferenças é possível estimar o tempo decorrido desde o último evento de expansão demográfica e/ou espacial (Rogers & Harpending, 1992). Para o cálculo do tempo t decorrido desde a expansão, emprega-se a fórmula $t = \tau/2u$, onde t é o tempo decorrido desde o evento de expansão e o valor de u é a taxa de mutação por sítio por ano (μ) multiplicado pelo número de pares de bases sequenciados (pb). Para a região do COI foram consideradas as taxas de mutação (μ) de $3,5 \times 10^{-8}$, calculada para a espécie de poliqueta *Eurythoe complanata* com base no Istmo do Panamá (Barroso *et al.*, 2010) e para o 16S foram utilizadas as taxas de $1,6 \times 10^{-8}$, estimadas para invertebrados (Collado & Mendez, 2012). As curvas foram construídas no programa DNAsp 5.0 e as estimativas dos parâmetros foram calculadas no programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

3.9. ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL

Para avaliar o grau de estruturação entre as populações foi utilizado o índice de fixação par-a-par (F_{st}) (Wright, 1978) e a análise molecular da variância (AMOVA)

(Excoffier *et al.*, 1992), ambas realizados no programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) e testadas com 10.000 permutações. Essas análises medem a proporção de variação que está entre as unidades que consideramos por oposição à proporção que está dentro dessas unidades. O F_{st} representa uma medida do grau de diferenciação genética ou de subdivisões interpopulacional (Saltkin, 1993), medindo assim, o grau de isolamento das populações. A AMOVA estima índices de estruturação entre as populações, testando cenários de agrupamentos definidos *a priori*.

3.10. FLUXO GÊNICO E TAMANHO POPULACIONAL EFETIVO

A estimativa do número de migrantes efetivos por geração (N_{em}) e tamanho populacional efetivo (N_e) foi realizado através do programa Migrate 3.3.2 (Beerli & Felsenstein, 2001; Beerli, 2006), pelo método descrito por Beerli e Felsenstein (2001). Este método se baseia na teoria da coalescência para estimar os parâmetros de taxa de migração M e θ . A abordagem Bayesiana foi a utilizada para definir esses parâmetros, sendo os valores absolutos de N_{em} e N_e obtidos através das fórmulas: $N_{em} = \theta \times M$ (Wörheide *et al.*, 2008; Beerli, 2009) e $N_e = \theta / \mu$ (DNA mitocondrial), onde μ é taxa de mutação por sítio por ano. A taxa de mutação usada foi a mesma utilizada no item 3.8. deste trabalho.

Foram feitas corridas preliminares com o intuito de obter estimativas dos parâmetros θ e M (recomendado pelo manual do programa). Desta forma foram feitas duas corridas, cada uma com uma cadeia longa onde os parâmetros foram amostrados 5×10^6 de vezes. Na primeira corrida, o *prior* dos parâmetros foi uniforme. Na segunda corrida, os valores iniciais de θ variavam de 0,000005 a 0,2 e M variavam de 0,000005 a 1.500. Na segunda corrida, foram utilizadas quatro temperaturas diferentes para as cadeias (1,0, 1,5, 3,0 e 10.000). Em ambas as corridas foram descartadas 1% das amostras iniciais.

4. RESULTADOS

Os melhores modelos evolutivos de substituição de nucleotídeos encontrados para os conjuntos de dados, das duas espécies juntas, foram General Time Reversible (GTR) + distribuição gamma pra ambos marcadores (COI: $-\ln L$ 2070,1958 e 16S: $-\ln L$ 1116,2134). As análises filogenéticas realizadas com as duas espécies juntas, mostrou claramente a separação filogenética delas, com a formação de dois clados monofiléticos com alto suporte estatístico (apenas para as sequências de 16S, na análise de Máxima Verossimilhança foi de 99, as demais foram 100), para ambos marcadores. A distância gênica K2P entre os clados foi de 24,2% para COI (Figura 5) e 13% para 16S (Figura 6). Devido à similaridade entre as árvores obtidas para Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança, apenas a árvore de Inferência Bayesiana está representada, porém com os suportes estatísticos das duas análises.

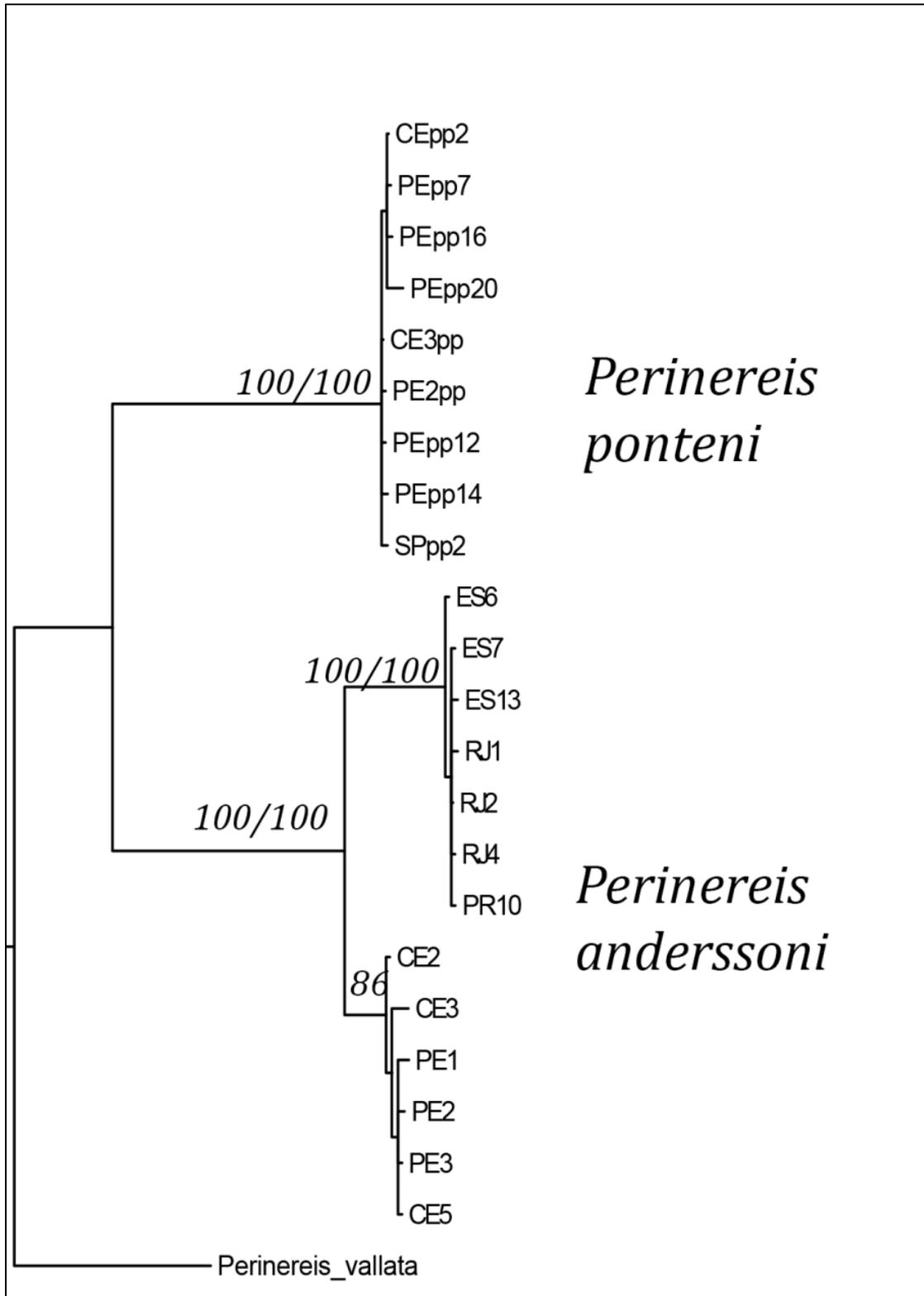


Figura 5: Árvore de Inferência Bayesiana realizadas com as espécies *P. anderssoni* e *P. ponteni* juntas, para o marcador COI. Suporte estatístico dos ramos apresentados (>70%): Inferência Bayesiana (PP) / Máxima Verossimilhança (BS). Cada indivíduo é identificado pela sigla da localidade e um número atribuído a ele. “pp” indica indivíduos da espécie *P. ponteni*.

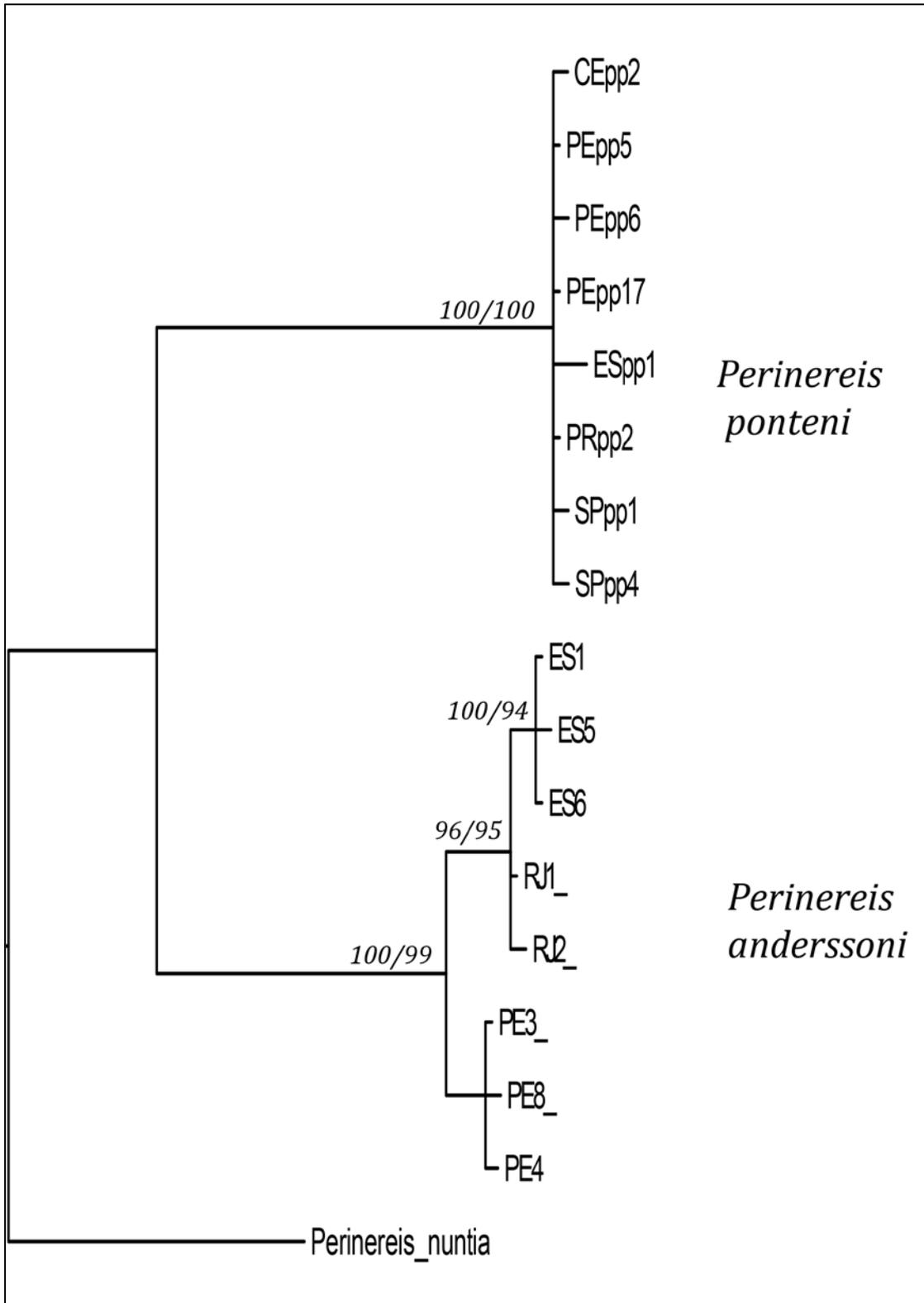


Figura 6: Árvore de Inferência Bayesiana realizadas com as espécies *P. anderssoni* e *P. ponteni* juntas, para o marcador 16S. Suporte estatístico dos ramos apresentados (>70%): Inferência Bayesiana (PP) / Máxima Verossimilhança (BS). Cada indivíduo é identificado pela sigla da localidade e um número atribuído a ele. “pp” indica um indivíduo da espécie *P. ponteni*.

4.1. *Perinereis anderssoni*

4.1.1. Diversidade molecular

Foram sequenciadas 85 espécimens, sendo descartadas nove devido à má qualidade das sequências, totalizando 76 sequências utilizadas nesse estudo, para COI e 60 sequenciadas, sendo 48 utilizadas de 16S. A tabela abaixo (tabela 5) mostra a quantidade de sequências utilizadas por localidade por marcador.

Tabela 5: Número de sequências de *P. anderssoni* utilizadas no estudo por localidade amostrada por marcador.

Localidade	Nº de sequências	
	COI	16S
PE	8	6
CE	16	0
ES	15	18
RJ	20	8
SP	6	6
PR	11	10
Total	76	48

Após edição, foram utilizados 630 pares de bases (pb), sendo contabilizados 76 sítios variáveis e 15 sítios únicos (singletons). As frequências médias das bases foram T = 32,1 , C = 23,6 , A = 27,4 e G = 16,9 e o conteúdo G+C = 0,405, para COI. Para 16S, foram utilizados 479 pares de bases (pb), sendo contabilizados 21 sítios variáveis e 9 sítios únicos (singleton) e as frequências médias das bases foram T = 28,6 , C = 20,4 , A = 32,2 e G = 18,8 e o conteúdo G+C = 0,391. A distância genética Kimura-2-Parâmetros (K2P) par-a-par média de todas as amostras de COI reunidas foi de 0,040, com valor mínimo de 0 e máximo de 0,097. Já para 16S, a distância genética K2P média para todas as amostras reunidas foi de 0,007, com o valor mínimo de 0 e o máximo de 0,03. Foi calculada também a distância genética par-a-par entre e dentro das localidades, para os dois marcadores, sendo os resultados apresentados nas tabelas abaixo (Tabela 6 e 7). Para COI, a distância genética K2P entre o clado do Nordeste e o clado do Sul/Sudeste é de 0,87 e dentro de cada clado é de 0,009 e 0,001, respectivamente. Para 16S, a distância entre o clado do Nordeste e o clado do Sul/Sudeste é de 0,022, e as distâncias médias dentro de cada clado não chegam a 0,001.

Tabela 6: Valores de distância genética Kimura-2-Parâmetros dentro de cada localidade (diagonal, em negrito) e entre as localidades para o marcador COI.

	PE	CE	ES	RJ	PR	SP
PE	0,005					
CE	0,011	0,008				
ES	0,086	0,084	0,003			
RJ	0,088	0,086	0,003	0,002		
PR	0,087	0,085	0,003	0,001	0,001	
SP	0,087	0,085	0,002	0,001	0,001	0,000

Tabela 7: Valores de distância genética Kimura-2-Parâmetros dentro de cada localidade (diagonal, em negrito) e entre as localidades para o marcador 16S.

	PE	ES	RJ	PR	SP
PE	0,003				
ES	0,023	0,001			
RJ	0,019	0,005	0,001		
PR	0,023	0,001	0,005	0,001	
SP	0,023	0,001	0,005	0,001	0,001

Os valores estimados de número de haplótipos, sítios segregantes, diversidade haplotípica e nucleotídica total e para cada localidade, para o marcador COI, estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 8). A diversidade haplotípica foi maior em PE (cada organismo amostrado possui um haplótipo único) e menor em SP (todos os organismos amostrados possuem o mesmo haplótipo), enquanto a diversidade nucleotídica foi maior CE e menor em SP.

Tabela 8: Índices de diversidade molecular para o marcador COI. h – número de haplótipos; S – sítios segregantes; H – diversidade haplotípica; π – diversidade nucleotídica.

COI	h	S	H	π
PE	8	10	1,000	0,0050
CE	7	16	0,775	0,0080
ES	6	8	0,705	0,0028
RJ	7	7	0,689	0,0017
SP	0	1	0	0
PR	3	3	0,345	0,0009
Todas NE	15	26	0,902	0,00917
Todas SSE	14	16	0,726	0,00208

Para 16S, a diversidade haplotípica também foi maior em PE, porém foi menor em PR, enquanto a diversidade nucleotídica foi maior ES e também menor em PR (Tabela 9).

Tabela 9: Índices de diversidade molecular para o marcador 16S. h – número de haplótipos; S – sítios segregantes; H – diversidade haplotípica; π – diversidade nucleotídica.

16S	h	S	H	π
PE	4	4	0,800	0,0028
ES	4	4	0,314	0,0093
RJ	2	1	0,429	0,00089
SP	3	2	0,600	0,00139
PR	2	1	0,356	0,00074
Todas SSE	9	10	0,573	0,00218

4.1.2. Análise filogenética

Os melhores modelos evolutivos de substituição de nucleotídeos encontrados para os conjuntos de dados foram o Hasegawa-Hishino-Yano (HKY) mais sítios invariáveis para COI (-lnL 1749,2847) e GTR mais sítios invariáveis para 16S (-lnL 994,9575)

Tanto a análise filogenética de Máxima Verossimilhança quanto a Bayesiana, para os dois marcadores, mostrou uma distinção filogenética entre as populações do Nordeste e Sul/Sudeste (Figura 7).

Para COI, foram recuperados dois clados monofiléticos, com alto suporte estatístico: o clado que agrupou os indivíduos das populações dos estados da região Nordeste do Brasil foi nomeado de “Clado Nordeste” e o clado que agrupou os indivíduos das populações das regiões Sul e Sudeste do Brasil foi nomeado de “Clado Sul/Sudeste”. Os valores de suporte estatístico dos clados foram de 100 de probabilidade posterior (PP) e menor que 70 de bootstrap (BS) para o clado Nordeste e PP = 100 e BS = 98, para o clado Sul/Sudeste. No clado Nordeste, há a formação de um subclado, porém com indivíduos das duas populações e baixo suporte estatístico. No clado Sul/Sudeste ocorre também a formação de dois subclados, um que mistura vários estados e um com algumas sequências do ES e espécies isoladas (ES e PR), porém com baixo suporte estatístico (<70) (Figura 7).

Já para 16S, a população do Nordeste forma um agrupamento, que para efeitos práticos, também chamaremos de “Clado Nordeste”. As populações do Sul/Sudeste

formam um clado com $PP = 100$ e $BS = 84$. No clado Sul/Sudeste, há a formação de um subclado com espécies de todas as localidades e um com espécies isoladas do RJ (Figura 8).

Devido à similaridade entre as árvores obtidas para Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança, apenas a árvore de Inferência Bayesiana está representada, porém com os suportes estatísticos das duas análises.

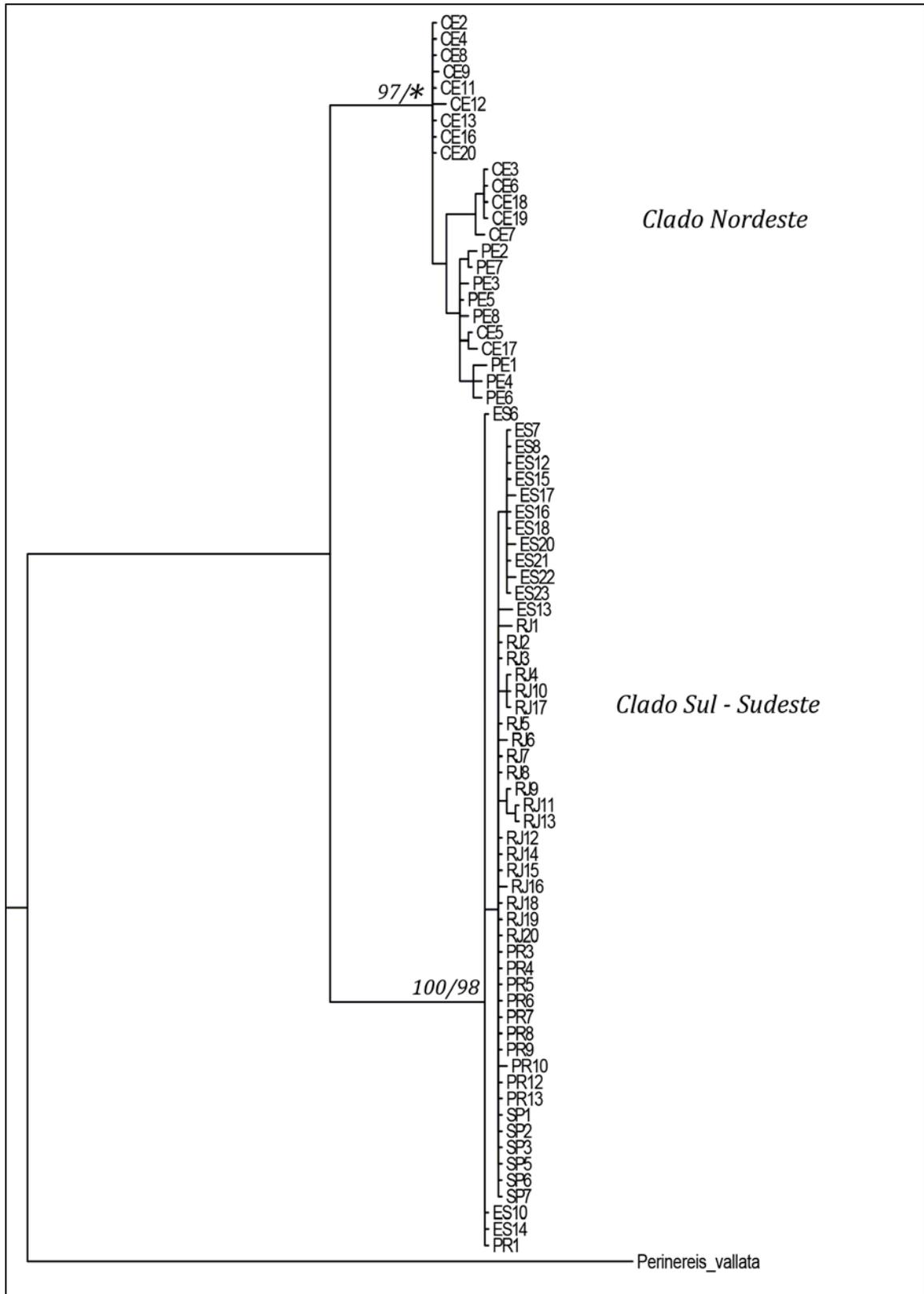


Figura 7: Árvore de Inferência Bayesiana realizadas com a espécie *P. anderssoni*, para o marcador COI. Suporte estatístico dos ramos apresentados (>70%): Inferência Bayesiana (PP) / Máxima Verossimilhança (BS). Cada indivíduo é identificado pela sigla da localidade e um número atribuído a ele.

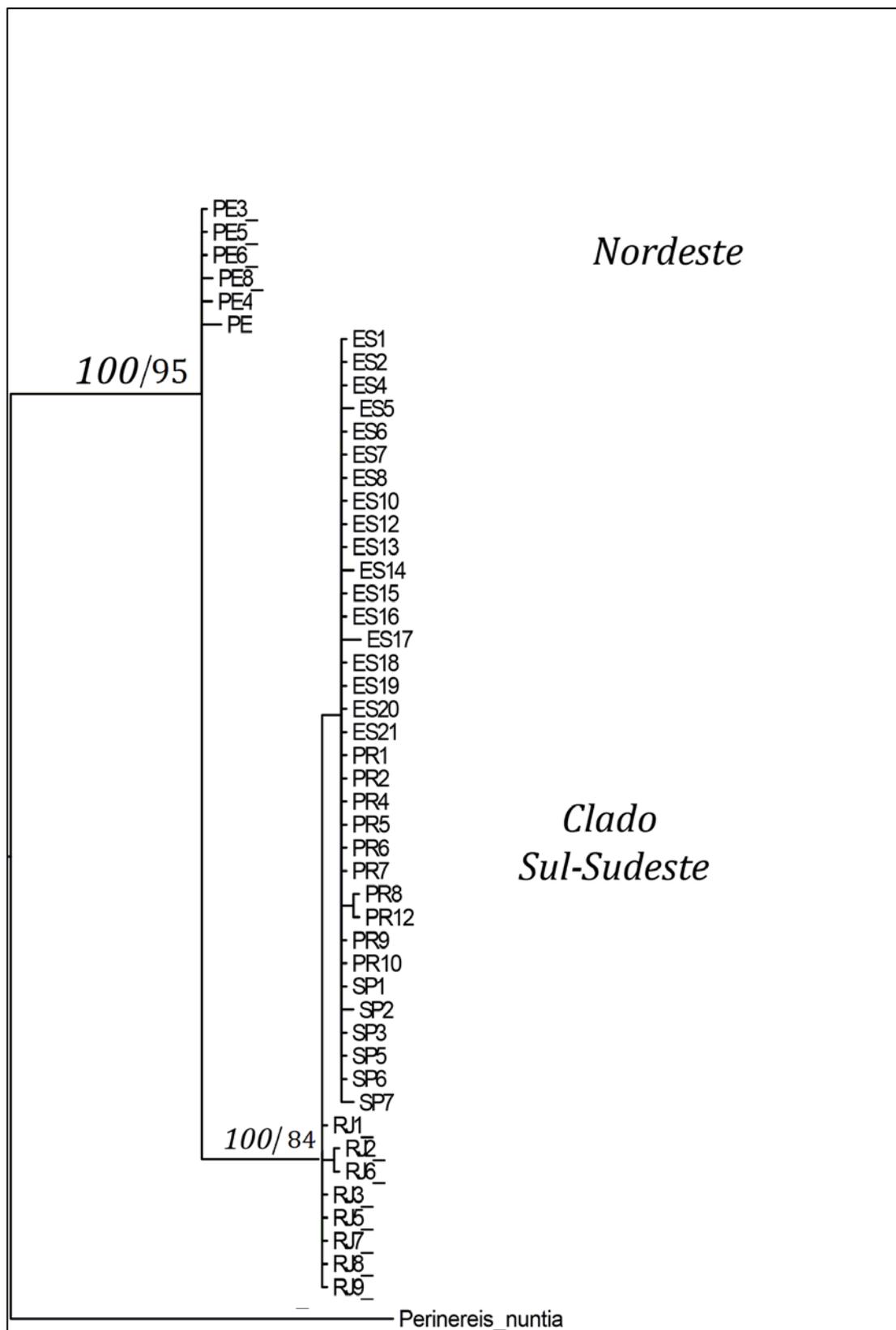


Figura 8: Árvore de Inferência Bayesiana realizadas com as espécies *P. anderssoni*, para o marcador COI. Suporte estatístico dos ramos apresentados (>70%): Inferência Bayesiana (PP) / Máxima Verossimilhança (BS). Cada indivíduo é identificado pela sigla da localidade e um número atribuído a ele.

4.1.3. Rede de Haplótipos

As redes de haplótipos foram construídas sob o modelo de rede de parcimônia estatística, com nível de confiança de 95%. Para COI, foram observados ao todo 29 haplótipos, sendo os haplótipos 9, 10, 16, 17, 23, 24 e 27 compartilhados e os demais exclusivos (Tabela 26). O haplótipo 9 foi compartilhado com 7 indivíduos e o haplótipo 10 com 4, ambos apenas com indivíduos do CE; o haplótipo 16 é compartilhado com indivíduos do ES e do PR; o haplótipo 17, é compartilhado por indivíduos apenas por indivíduos do ES; o haplótipo 23 é o que compartilha indivíduos de mais localidades, sendo eles do RJ, PR e todos os indivíduos de SP, totalizando 26 indivíduos; os haplótipos 24 e 27 são compartilhados por indivíduos do RJ.

Tabela 26: Haplótipos de COI encontrado em cada indivíduo.

Haplótipos	Indivíduos
Haplótipo 1	PE1
Haplótipo 2	PE2
Haplótipo 3	PE3
Haplótipo 4	PE4
Haplótipo 5	PE5
Haplótipo 6	PE6
Haplótipo 7	PE7
Haplótipo 8	PE8
Haplótipo 9	CE2, CE4, CE8, CE11, CE13, CE16 e CE20
Haplótipo 10	CE3, CE6, CE18 e CE19
Haplótipo 11	CE5
Haplótipo 12	CE7
Haplótipo 13	CE9
Haplótipo 14	CE12
Haplótipo 15	CE17
Haplótipo 16	ES6, ES10, ES14 e PR1
Haplótipo 17	ES7, ES8, ES12, ES15, ES16, ES18, ES21 e ES23
Haplótipo 18	ES13
Haplótipo 19	ES17
Haplótipo 20	ES20
Haplótipo 21	ES22
Haplótipo 22	RJ1
Haplótipo 23	RJ2, RJ3, RJ5, RJ7, RJ8, RJ12, RJ14, RJ15, RJ18, RJ19, RJ20, PR3, PR4, PR5, PR6, PR7, PR8, PR9, PR12, PR13, SP1, SP2, SP3, SP5, SP6, e SP7
Haplótipo 24	RJ4, RJ10 e RJ17
Haplótipo 25	RJ6
Haplótipo 26	RJ9
Haplótipo 27	RJ11 e RJ13

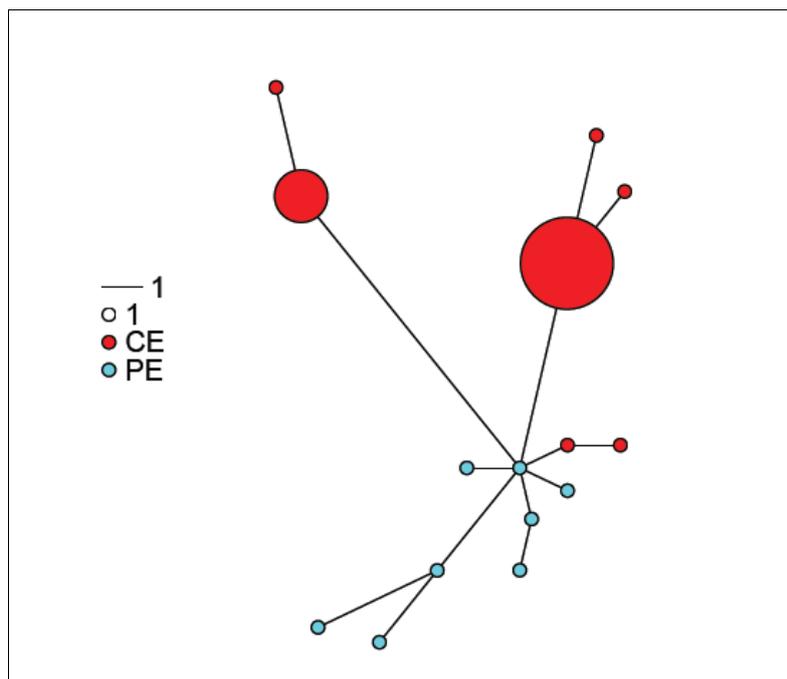


Figura 15: Rede de Haplótipos do clado Nordeste, baseado em sequências de COI.

Para 16S, foram observados ao todo 14 haplótipos, sendo os haplótipos 1, 5, 7, 10, 11 e 12 compartilhados e os demais exclusivos (Tabela 27). O haplótipo 1 é compartilhados por 3 indivíduos de PE; o haplótipo 5 é compartilhado por 23 haplótipos, de todos os estados do Sul/Sudeste, exceto RJ; o haplótipo 7 é compartilhado por indivíduos do ES e PR; os haplótipos 10 e 11 são compartilhados apenas por indivíduos do RJ e o haplótipo 12 por indivíduos do PR.

Tabela 27: Haplótipos de 16S encontrado em cada indivíduo.

Haplótipo	Indivíduo
Haplótipo 1	PE3, PE5 e PE6
Haplótipo 2	PE8
Haplótipo 3	PE4
Haplótipo 4	PE7
Haplótipo 5	ES1, ES2, ES4, ES7, ES8, ES12, ES15, ES16, ES18, ES19, ES20, ES21, PR2, PR4, PR5, PR6, PR7, PR9, PR10, SP1, SP3, SP5 e SP6
Haplótipo 6	ES5
Haplótipo 7	ES6, ES10, ES13 e PR1
Haplótipo 8	ES14
Haplótipo 9	ES17
Haplótipo 10	RJ1, RJ3, RJ5, RJ7, RJ8 e RJ9
Haplótipo 11	RJ2 e RJ6
Haplótipo 12	PR8 e PR12
Haplótipo 13	SP2
Haplótipo 14	SP7

O número de passos mutacionais que separa as populações do Nordeste e do Sul/Sudeste, baseado em sequências de 16S, é bem menor (7), portanto, as redes foram construídas juntas (Figura 16). A rede do Sul/Sudeste é formada por um haplótipo central com 23 indivíduos de todas as populações, exceto RJ, de onde saem os haplótipos descendentes, separados por um ou dois passos mutacionais. Já a rede do Nordeste não é muito informativa pelo número reduzido de populações (apenas uma) e de indivíduos (6). Porém, podemos perceber um elevado número de haplótipos (4 em 6 indivíduos), e sugere ter um central do qual os outros descendem. As duas redes estão unidas pelo haplótipo com indivíduos do RJ e o central do Nordeste.

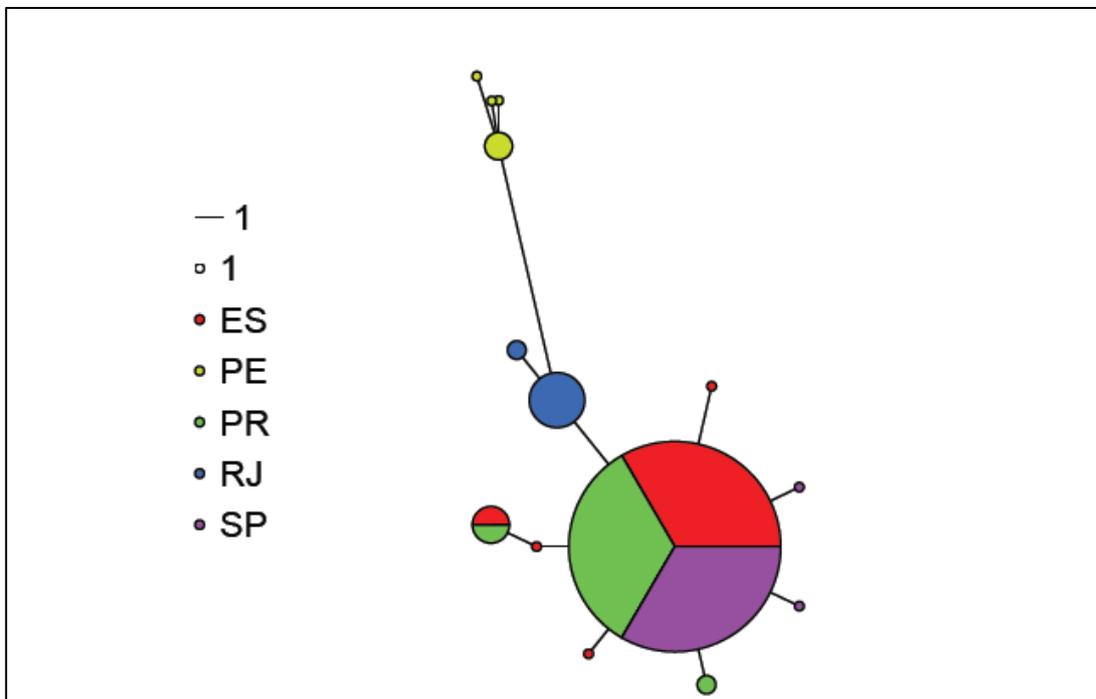


Figura 16: Redes de Haplótipos do Nordeste e Sul/Sudeste unidas, baseado em sequências de 16S.

4.1.4. Testes de Neutralidade

Foram feitos testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu tanto utilizando todas as amostras reunidas e separadas pelas localidade assim como pelos dois grandes clados obtidos (Sul/Sudeste e Nordeste) na análise filogenética, para os dois marcadores (tabelas 10 e 11). O teste D de Tajima foi estatisticamente significativo apenas para a

localidade PR e Fs de Fu foi estatisticamente significativo para a localidade PE e RJ, rejeitando a hipótese nula de evolução neutra, apenas em relação ao marcador COI. Separando as populações em dois grupos: Nordeste e Sul/Sudeste, obtivemos resultados negativos e estatisticamente significativos para ambos os testes apenas para o COI no clado Sul/Sudeste.

Tabela 10: Valores dos testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu e seus respectivos p-valores, para COI. Em negrito, valores estatisticamente significativos.

	PE	CE	ES	RJ	SP	PR	NE	S/SE
D de Tajima	-0,7788	0,20019	-1,09115	-1,41104	0,000	-1,5999	-0,6341	-1,93695
p-valor	0,2590	0,59800	0,14500	0,08600	1,000	0,0420	0,27300	0,004
Fs de Fu	-5,3254	0,98986	-1,14888	-3,10496	0,000	-0,5370	-3,9804	-9,13840
p-valor	0	0,71600	0,23800	0,01300	1,000	0,1340	0,06000	0

Tabela 11: Valores dos testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu e seus respectivos p-valores, para 16S. Em negrito, valores estatisticamente significativos.

	PE	ES	RJ	SP	PR	S/SE
D de Tajima	-1,29503	-1,85306	0,33350	-1,13197	0,01499	-1,55163
p-valor	0,06500	0,09000	0,80300	0,15000	0,73000	0,03600
Fs de Fu	-1,25217	-1,61766	0,53626	-0,85842	-0,59381	-3,63985
p-valor	0,07100	0,07700	0,40300	0,08400	0,13100	0,01700

Para aquelas populações onde a hipótese nula de evolução neutra foi rejeitada foram realizadas as análises de distribuição das diferenças (mismatch distribution). Os gráficos foram construídos no programa DNAsp, apenas sob cenário de expansão demográfica (default do programa) e estão representados nas figuras 9, 10, 11 e 12 para aquelas populações que desviaram da hipótese nula de neutralidade baseados nas sequências de COI, e na figura 13 para a população que desviou da hipótese nula de neutralidade baseados nas sequências de 16S.

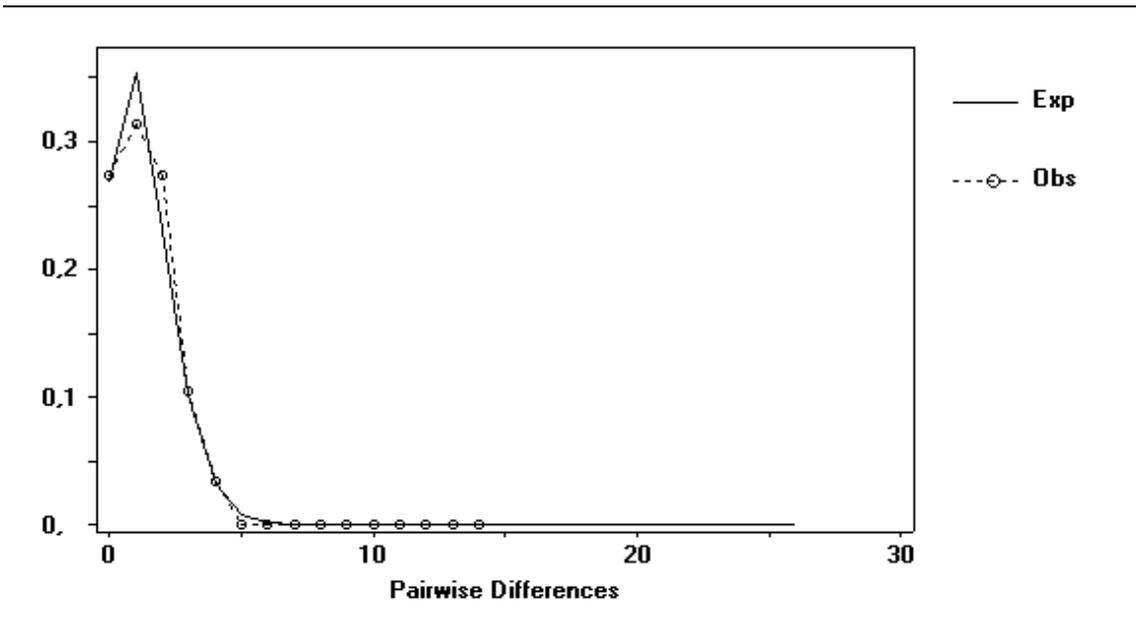


Figura 9: Análise da distribuição das diferenças para o clado do Sudeste, marcador COI. No eixo x o número de diferenças par-a-par e no eixo y a frequência das diferenças. Exp – curva esperada para expansão populacional; Obs – curva observada.

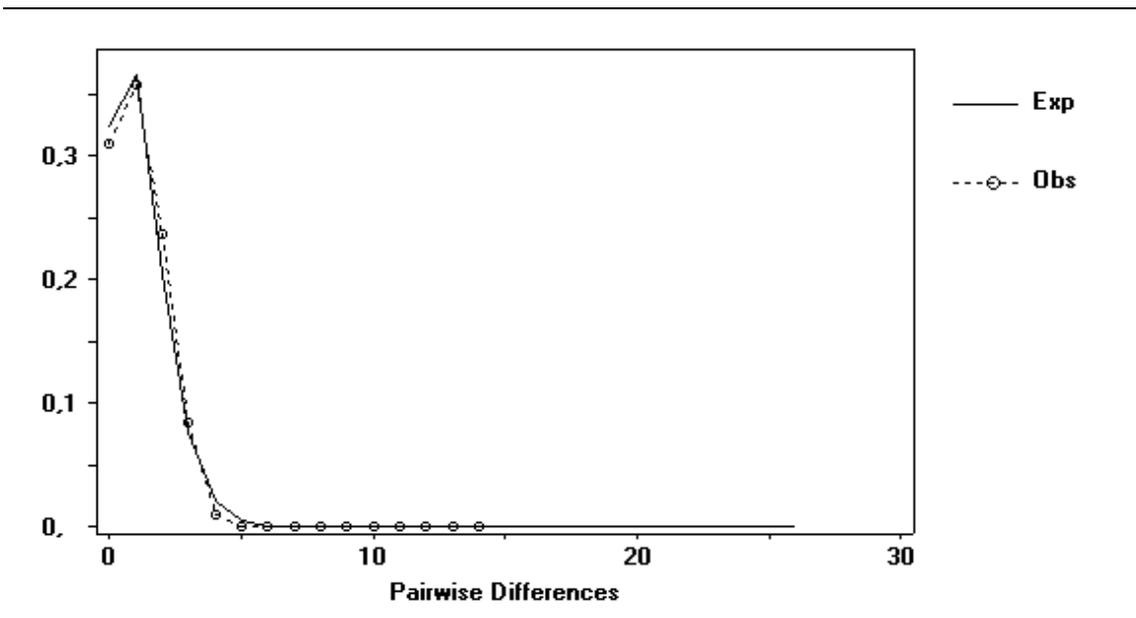


Figura 10: Análise da distribuição das diferenças para a localidade RJ, marcador COI. No eixo x o número de diferenças par-a-par e no eixo y a frequência das diferenças. Exp – curva esperada para expansão populacional; Obs – curva observada.

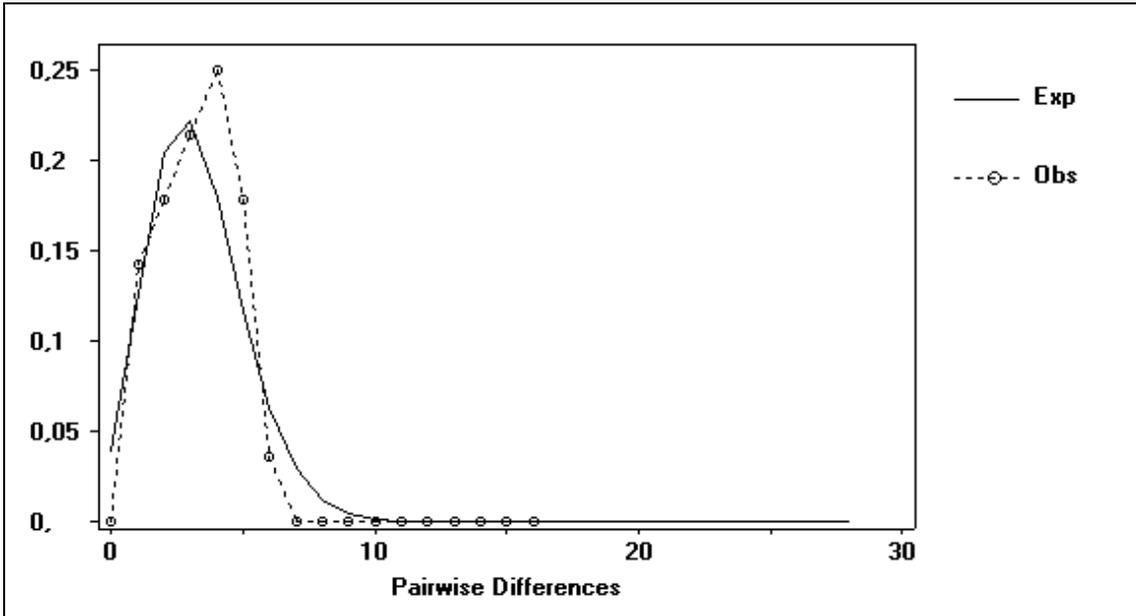


Figura 11: Análise da distribuição das diferenças para a localidade PE, marcador COI. No eixo x o número de diferenças par-a-par e no eixo y a frequência das diferenças. Exp – curva esperada para expansão populacional; Obs – curva observada.

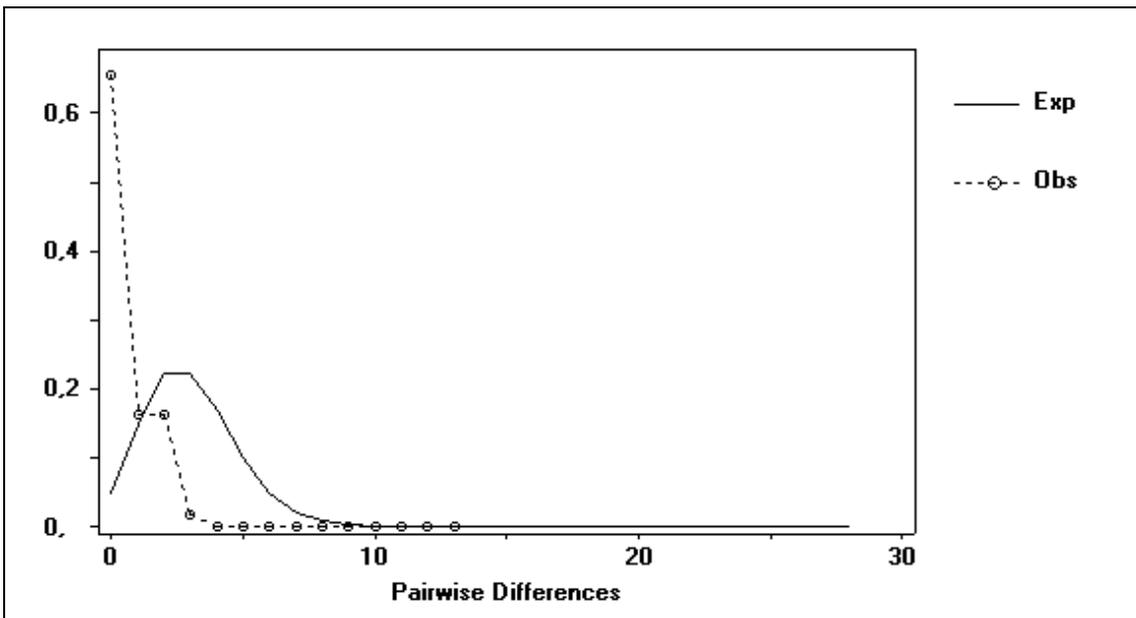


Figura 12: Análise da distribuição das diferenças para a localidade PR, marcador COI. No eixo x o número de diferenças par-a-par e no eixo y a frequência das diferenças. Exp – curva esperada para expansão populacional; Obs – curva observada.

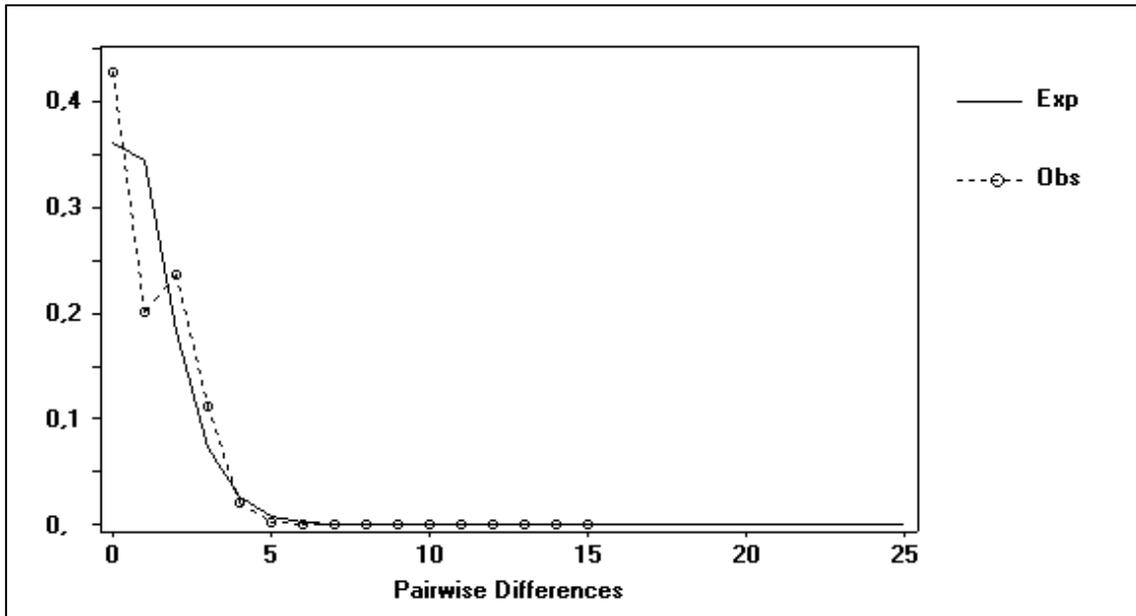


Figura 13: Análise da distribuição das diferenças para o clado Sudeste, marcador 16S. No eixo x o número de diferenças par-a-par e no eixo y a frequência das diferenças. Exp – curva esperada para expansão populacional; Obs – curva observada.

Já os parâmetros da análise da distribuição das diferenças (parâmetro τ , SSD e Índice de Raggedness) foram calculados no programa arlequin 3.5. Este programa calcula os parâmetros sob dois modelos de expansão: demográfica e espacial. Os parâmetros obtidos para COI, sob modelo de expansão demográfica e sob modelo de expansão espacial estão representados nas tabelas 12 e 13, respectivamente. Os parâmetros obtidos para 16S, sob os dois cenários de expansão estão representados na tabela 14.

Os valores de SSD (*sum of squares deviations* – Soma dos quadrados dos desvios), que testa a validade dos resultados reestimando os parâmetros (Slatkin and Hudson, 1991; Rogers and Harpending, 1992), tiveram seus p-valores maiores que 0,05, não rejeitando a hipótese de expansão populacional. Os Índices de Raggedness, que testa a variância em torno da curva de distribuição das diferenças (Harpending, 1994), também apresentaram p-valores maiores que 0,05, não rejeitando a hipótese de que os valores estão adequados à curva do modelo de expansão. A partir do τ foi estimado o tempo decorrido após a última expansão. Em todos os casos as análises de distribuição das diferenças (mismatch), tanto os gráficos quanto os parâmetros, não desviaram da hipótese nula de expansão populacional.

Tabela 12: Valores do parâmetro τ e tempo decorrido (em anos) após a expansão estimados para a análise de distribuição das diferenças, sob cenário de expansão demográfica, para COI. SSD – soma dos quadrados dos desvios; P-ssd – p-valor associado ao SSD; IR – Índice de Ruggedness; P-ir – p-valor associado ao IR.

Parâmetros	PE	RJ	PR	Sudeste
τ	3,527	1,150	1,156	1,500
SSD	0,00993	0,00100	0,01124	0,00205
P-ssd	0,72320	0,90330	0,46670	0,54750
IR	0,05102	0,04573	0,26248	0,03791
P-ir	0,79080	0,83750	0,52560	0,85100
Tempo (anos)	79.977	26.077	26.213	34.013

Tabela 13: Valores do parâmetro τ e tempo decorrido (em anos) após a expansão estimados para a análise de distribuição das diferenças sob cenário de expansão espacial, para COI. SSD – soma dos quadrados dos desvios; P-ssd – p-valor associado ao SSD; IR – Índice de Ruggedness; P-ir – p-valor associado ao IR.

Parâmetros	PE	RJ	PR	Sudeste
τ	3,526	1,165	1,331	1,500
SSD	0,00993	0,00072	0,00372	0,00169
P-ssd	0,70800	0,84700	0,63400	0,70400
IR	0,05102	0,04573	0,26248	0,03791
P-ir	0,79900	0,83700	0,65900	0,83300
Tempo (anos)	79.954	26.417	30.181	34.013

Tabela 14: Valores do parâmetro τ e tempo decorrido (em anos) após a expansão estimados para a análise de distribuição das diferenças, sob cenário de expansão demográfica e expansão espacial, para as populações do Sudeste reunidas, para o marcador 16S. SSD – soma dos quadrados dos desvios; P-ssd – p-valor associado ao SSD; IR – Índice de Ruggedness; P-ir – p-valor associado ao IR.

Índices	Expansão demográfica	Expansão espacial
τ	2,7	2,0
SSD	0,03090	0,01474
P-ssd	0,31800	0,60100
IR	0,14540	0,14540
P-ir	0,42100	0,64300
Tempo (anos)	176.148	130.480

4.1.5. Estruturação populacional

A análise de estruturação populacional realizada através da estimativa de FST mostrou-se significativa quando comparadas as populações do Nordeste com as demais populações, para ambos marcadores, inclusive quando comparadas entre elas, para COI. Já entre as populações do Sul/Sudeste, apenas para a comparação ES com as demais populações foi rejeitada a hipótese nula de não estruturação populacional, para COI, e a comparação do RJ com as demais populações, para 16S. Em relação às outras comparações não foi possível rejeitar a hipótese nula de não estruturação populacional, para ambos marcadores. As tabelas 15 e 16 mostram as estimativas de Fst e significância estatística para COI, enquanto as tabelas 17 e 18, mostram esses resultados para 16S,

Tabela 15: Matriz de comparação de estimativa de Fst, para COI.

	PE	CE	ES	RJ	PR	SP
PE						
CE	0,38266					
ES	0,95549	0,93057				
RJ	0,96784	0,94367	0,30807			
PR	0,96717	0,93625	0,28103	0,02583		
SP	0,96359	0,92664	0,27202	-0,03674	-0,06452	

Tabela 16: Matriz de Estatística p-valor (diagonal inferior) e significância estatística (diagonal superior) do Fst, para COI.

	PE	CE	ES	RJ	PR	SP
PE		+	+	+	+	+
CE	0		+	+	+	+
ES	0	0		+	+	+
RJ	0	0	0		-	-
PR	0	0	0,00195	0,17383		-
SP	0	0	0,00293	0,70215	0,99902	

Tabela 17: Matriz de comparação de estimativa de Fst, para 16S.

	PE	ES	RJ	PR	SP
PE					
ES	0,92540				
RJ	0,92584	0,73787			
PR	0,93532	0,03156	0,80440		
SP	0,92208	0,06112	0,79455	0,04215	

Tabela 18: Matriz de Estatística p-valor (diagonal inferior) e significância estatística (diagonal superior) do Fst, para 16S.

	PE	ES	RJ	PR	SP
PE		+	+	+	+
ES	0		+	-	-
RJ	0	0		+	+
PR	0	0,15315	0		-
SP	0	0,22523	0	0,16216	

Para testar as hipóteses de estruturação através da AMOVA, a definição *a priori* das populações foi feita considerando os resultados da análise de Fst. Para COI, foram definidos quatro cenários: 1) um grupo com as populações do Nordeste e um com as populações do Sul/Sudeste (Tabela 19); 2) um grupo com a população do CE, um com a população do PE e um grupo com as populações do Sul/Sudeste (Tabela 20); 3) um grupo com as populações do Nordeste, um grupo com a população do Sul e um grupo com as populações do Sudeste (Tabela 21) e 4) um grupo com a população de PE e um grupo com as demais populações (Tabela 22). As porcentagens de variação referente a cada nível hierárquico e os valores dos índices de fixação Φ_{ct} podem ser visualizados nas tabelas abaixo (Tabelas 19 a 22).

Tabela 19: Análise Molecular da Variância (AMOVA), para COI, sob o cenário 1.

PE + CE/ES+RJ+SP+PR	G.L.	% da variação
Entre grupos	1	94,1
Entre populações dentro dos grupos	4	1,71
Dentro das populações	70	4,28
Índice de fixação Φ_{ct} (p-valor)	0,94011 (0,04234)	

Tabela 20: Análise Molecular da Variância (AMOVA), para COI, sob o cenário 2.

PE / CE / ES+RJ+SP+PR	GL	% da variação
Entre grupos	2	94,84
Entre populações dentro dos grupos	3	0,51
Dentro das populações	70	4,65
Índice de fixação Φ_{ct} (p-valor)	0,94837 (0,03767)	

Tabela 21: Análise Molecular da Variância (AMOVA), para COI, sob o cenário 3.

PE + CE / ES+RJ+SP / PR	GL	% da variação
Entre grupos	2	91,19
Entre populações dentro dos grupos	3	3,09
Dentro das populações	70	5,72
Índice de fixação Φ_{ct} (p-valor)	0,91187 (0,03715)	

Tabela 22: Análise Molecular da Variância (AMOVA), para COI, sob o cenário 4.

PE / CE+ES+RJ+SP+PR	GL	% da variação
Entre grupos	2	40,20
Entre populações dentro dos grupos	3	54,53
Dentro das populações	70	5,27
Índice de fixação Φ_{ct} (p-valor)	0,49294 (0,34800)	

Para 16S, foram definidos três cenários: 1) um grupo com PE (Nordeste) e um grupo das populações do Sul/Sudeste (Tabela 23); 2) um grupo com PE, um grupo com RJ e outro grupo com as demais populações (Tabela 24) e 3) um grupo juntando PE e RJ e um grupo com as demais populações (Tabela 25). As porcentagens de variação referente a cada nível hierárquico e os valores dos índices de fixação Φ_{ct} podem ser visualizados nas tabelas abaixo (Tabelas 23 a 25).

Tabela 23: Análise Molecular da Variância (AMOVA), para 16S, sob o cenário 1.

PE /ES+RJ+SP+PR	GL	% da variação
Entre grupos	1	86,49
Entre populações dentro dos grupos	3	7,39
Dentro das populações	43	6,13
Índice de fixação Φ_{ct} (p-valor)	0,86486 (0,01371)	

Tabela 24: Análise Molecular da Variância (AMOVA), para 16S, sob o cenário 2.

PE / RJ /ES+SP+PR	GL	% da variação
Entre grupos	2	89,33
Entre populações dentro dos grupos	2	0,43
Dentro das populações	43	10,24
Índice de fixação Φ_{ct} (p-valor)	0,89327 (0,00865)	

Tabela 25: Análise Molecular da Variância (AMOVA), para 16S, sob o cenário 3.

PE+RJ/ES+SP+PR	GL	% da variação
Entre grupos	1	45,00
Entre populações dentro dos grupos	3	42,34
Dentro das populações	43	12,66
Índice de fixação Φ_{ct} (p-valor)	0,44997 (0,11140)	

4.1.6. Fluxo gênico e tamanho efetivo populacional

As análises de estimativa de tamanho efetivo populacional e fluxo gênico realizadas no programa Migrate 3.3.2 foram conduzidas utilizando apenas sequências do marcador COI, devido ao número restrito de sequências do marcador 16S da população do CE.

As análises foram realizadas para cada clado separadamente, porém, os valores estão representados juntos para uma melhor visualização. Os valores do parâmetro θ e os tamanhos efetivos populacionais (N_e) para cada população estão apresentados na tabela 28 e os valores do parâmetro M e o número de migrantes efetivos por geração (N_{em}) estão apresentados na tabela 29.

As estimativas de tamanho populacional efetivo e fluxo gênico apontam que as populações da linhagem Nordeste possuem maior tamanho populacional efetivo ($PE=310.571$ e $CE=181.147$) comparado com as populações da linhagem Sul/Sudeste ($ES= 97.142$, $RJ= 139.142$, $PR= 78.285$ e $SP=70.571$) e que o fluxo gênico entre as duas populações estudadas é assimétrico, com número de migrantes efetivos por geração maior no sentido do Ceará para Pernambuco ($N_{em}=1,968$) do que no sentido contrário ($N_{em}=0,59$). Já na linhagem Sul/Sudeste, os valores de migrantes efetivos por geração são mais baixos. Porém, esses valores podem estar mal estimados devido ao baixo número de indivíduos do Paraná e de São Paulo. Todavia, os resultados mostram um maior fluxo do Paraná para as outras localidades ($N_{em PR \rightarrow RJ} = 0,154$, $N_{em PR \rightarrow SP} = 0,042$), exceto em relação ao Espírito Santo, que o fluxo maior é no sentido contrário ($N_{em ES \rightarrow PR} = 0,246$).

Tabela 28: Moda do Parâmetro θ e tamanho populacional efetivo por população (N_e)

Parâmetro θ	Moda	N_e
θ_{PE}	0,01087	310.571
θ_{CE}	0,00634	181.142
θ_{ES}	0,00340	97.142
θ_{RJ}	0,00487	139.142
θ_{PR}	0,00274	78.285
θ_{SP}	0,00247	70.571

Tabela 29: Moda do Parâmetro M e migrante efetivo por geração entre as localidades.

Parâmetro M	Moda	Nem
MPE→CE	54,5	0,59
MCE→PE	310,5	1,968
MES→RJ	0,5	0,0017
MES→PR	72,5	0,246
MES→SP	0,5	0,0017
MRJ→ES	9,5	0,046
MRJ→PR	0,5	0,0024
MRJ→SP	0,5	0,0024
MPR→ES	0,5	0,0013
MPR→RJ	56,5	0,154
MPR→SP	15,5	0,042
MSP→ES	0,5	0,0012
MSP→RJ	0,5	0,0012
MSP→PR	0,5	0,0012

4.2. Perinereis ponteni

4.2.1. Análise filogenética

Os melhores modelos evolutivos de substituição de nucleotídeos encontrados para os conjuntos de dados foi o HKY mais distribuição gamma para COI (-lnL 1389,2804) e GTR para 16S (-lnL 952,2196).

Para COI, nas duas topologias, todos os indivíduos agrupam em um único clado. Apesar de haver a formação de outros cladogramas internos, estes contêm indivíduos do Nordeste e Sul/Sudeste misturados (Figura 17).

Para 16S, ocorre o mesmo cenário, entretanto, ocorre também a formação de outro clado interno, com alto suporte estatístico (PP = 98 e BS= 66), porém, este é formado por apenas três indivíduos de duas localidades (Figura 18).

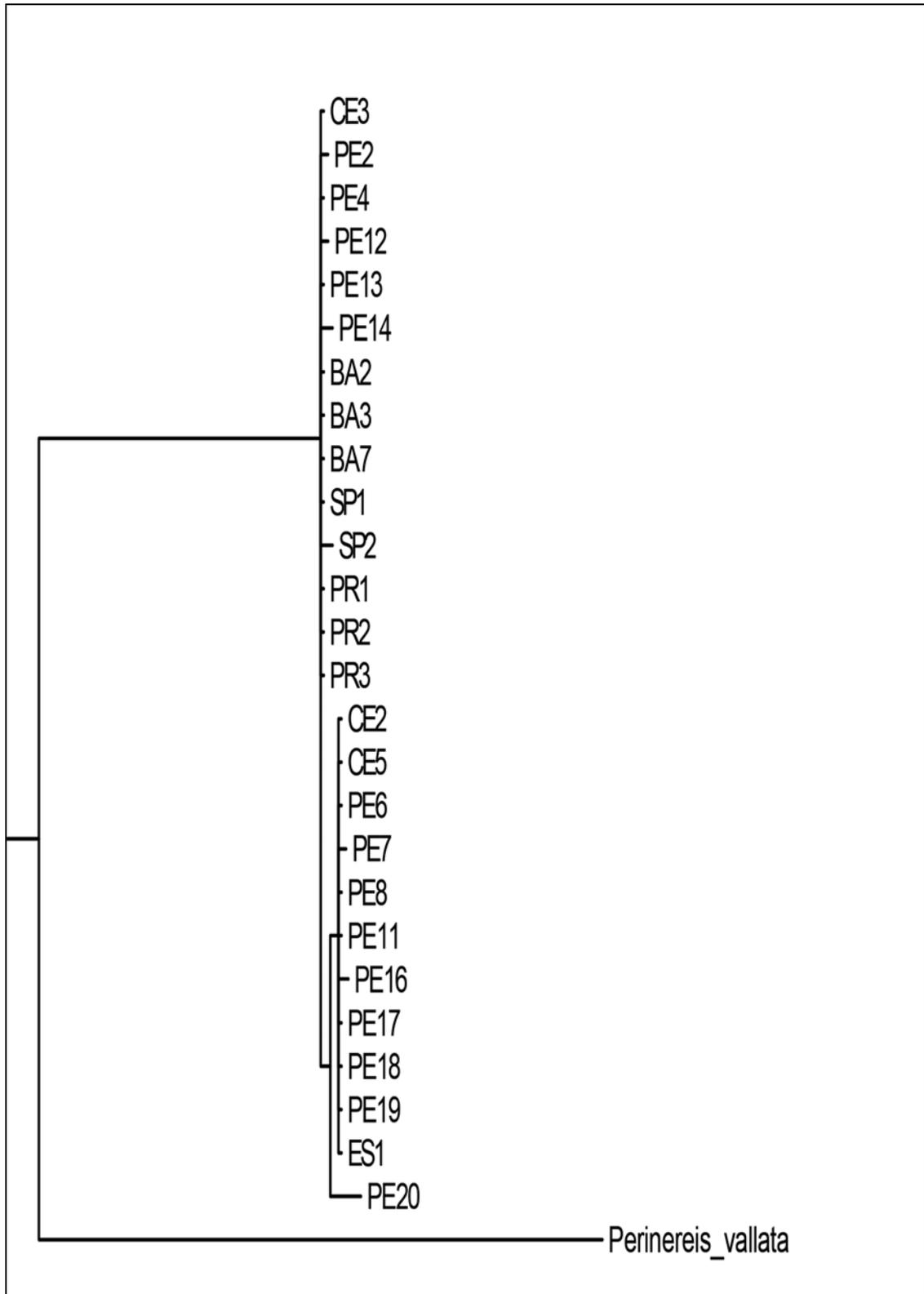


Figura 17: Árvore de Inferência Bayesiana realizadas com a espécie *P. ponteni*, para o marcador COI. Suporte estatístico dos ramos apresentados (>70%): Inferência Bayesiana (PP) / Máxima Verossimilhança (BS). Cada indivíduo é identificado pela sigla da localidade e um número atribuído a ele.

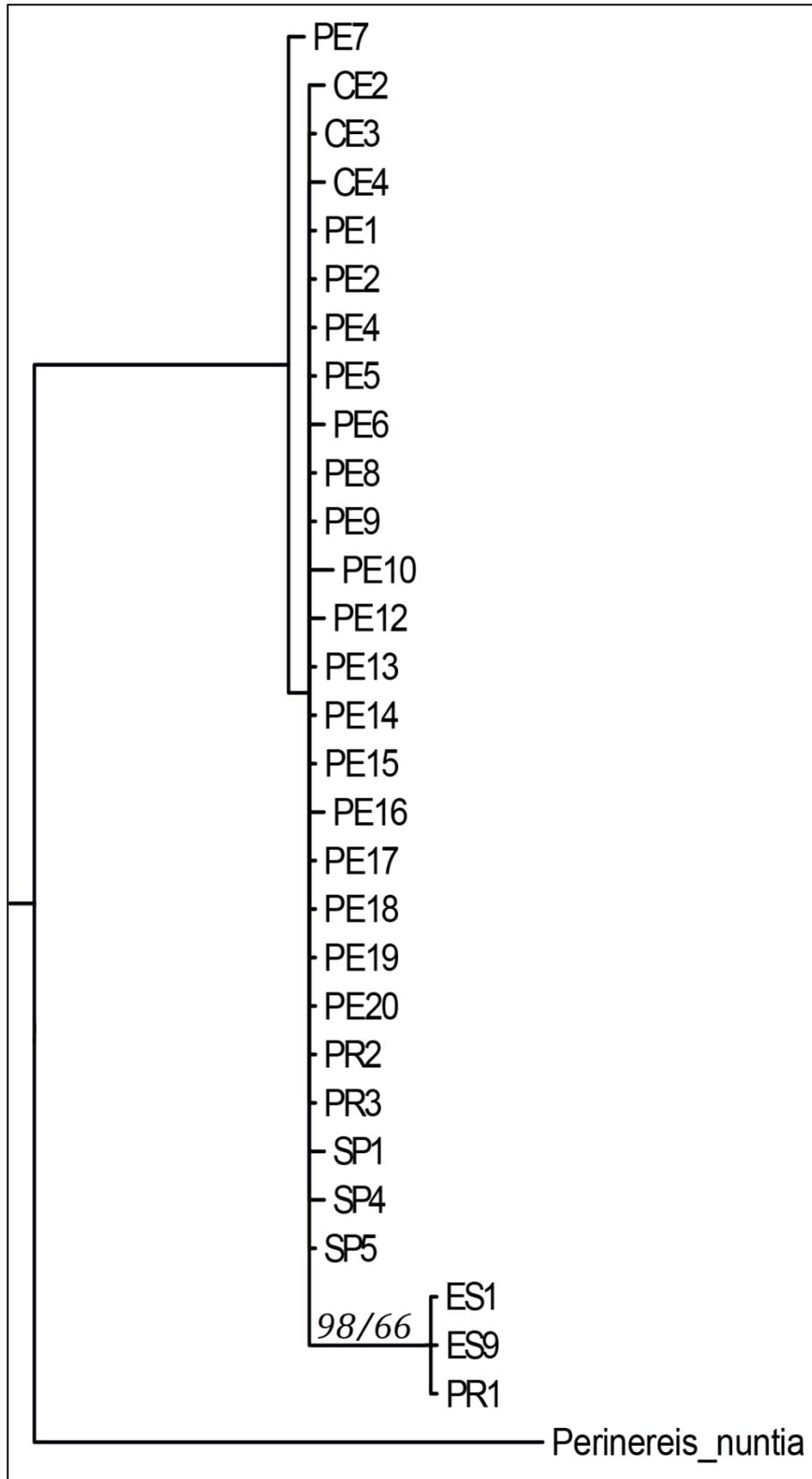


Figura 18: Árvore de Inferência Bayesiana realizadas com a espécie *P. ponteni*, para o marcador 16S. Suporte estatístico dos ramos apresentados (<70%): Inferência Bayesiana (PP) / Máxima Verossimilhança (BS). Cada indivíduo é identificado pela sigla da localidade e um número atribuído a ele.

4.2.2. Diversidade molecular

Foram sequenciadas 36 amostras, sendo descartadas 10 devido à má qualidade das sequências, totalizando 26 sequências utilizadas nesse estudo, para COI e para 16S foram 29 sequenciadas, sendo todas utilizadas. A tabela 28 mostra a quantidade de sequências utilizadas por localidade por marcador.

Tabela 28: Número de sequências de *P. ponteni* utilizadas no estudo por localidade amostrada por marcador.

Localidade	Nº de sequências	
	COI	16S
PE	14	18
CE	3	3
BA	3	0
ES	1	2
SP	2	3
PR	3	3
Total	26	29

Após edição, foram utilizados 671 pares de bases (pb), sendo contabilizados 15 sítios variáveis e 11 sítios únicos (singletons). As frequências médias das bases foram T = 29,4 , C = 25,9 , A = 27,6 e G = 17,1 e o conteúdo G+C = 0,43, para COI. Para 16S, foram utilizados 490 pares de bases (pb), sendo contabilizados 14 sítios variáveis e 11 sítios únicos (singleton) e as frequências médias das bases foram T = 32,2 , C = 19,0 , A = 27,9 e G = 20,9 e o conteúdo G+C = 0,39.

A distância genética Kimura-2-Parâmetros (K2P) par-a-par média de todas as amostras reunidas, tanto para COI quando para 16S, foi de 0,003, com valor mínimo de 0 e máximo de 0,014 para COI e o valor mínimo de 0 e o máximo de 0,010 para 16S. Foi calculada também a distância genética entre e dentro das localidades, para ambos marcadores (Tabelas 29 e 30).

Tabela 29: Valores de distância genética Kimura-2-Parâmetros dentro de cada localidade (diagonal, em negrito) e entre as localidades para o marcador COI.

	PE	CE	BA	ES	PR	SP
PE	0,004					
CE	0,003	0,002				
BA	0,003	0,002	0			
ES	0,003	0,001	0,003	*		
PR	0,003	0,003	0,001	0,003	0	
SP	0,005	0,003	0	0,004	0,001	0,003

*não foi possível calcular por só ter uma sequência dessa localidade.

Tabela 30: Valores de distância genética Kimura-2-Parâmetros dentro de cada localidade (diagonal, em negrito) e entre as localidades para o marcador 16S.

	PE	CE	ES	PR	SP
PE	0,002				
CE	0,002	0,003			
ES	0,007	0,008	0,000		
PR	0,003	0,003	0,003	0,004	
SP	0,002	0,003	0,002	0,003	0,003

Devido à quantidade limitada de indivíduos por localidade, aliado com os resultados da análise filogenética e aos baixos valores de distância genética, os valores estimados de número de haplótipos, sítios segregantes, diversidade haplotípica e nucleotídica foram calculados considerando os indivíduos como pertencentes a uma só população panmítica, com os valores obtidos apresentados na tabela abaixo (tabela 31).

Tabela 31: Índices de diversidade molecular para ambos marcadores. h – número de haplótipos; S – sítios segregantes; H – diversidade haplotípica; π – diversidade nucleotídica.

Índices	COI	16S
h	9	11
S	15	14
H	0,751	0,658
π	0,00586	0,00984

4.2.3 Rede de Haplótipos

As redes de haplótipos foram construídas sob o modelo de rede de parcimônia estatística, com nível de confiança de 95%. Para COI, foram observados ao todo 9 haplótipos, sendo os haplótipos 1 e 2 compartilhados e todos os demais exclusivos (Tabela 33). O haplótipo 1 foi compartilhado com 9 indivíduos do CE, PE e ES; o haplótipo 2 com 10 indivíduos compartilhado por todas as localidades, exceto ES; os haplótipos únicos são, na maioria do PE, com apenas um do SP.

Tabela 33: Haplótipos de COI encontrado em cada indivíduo de *P. ponteni*.

Haplótipos	Indivíduos
Haplótipo 1	CE2, CE5, PE6, PE8, PE11, PE17, PE18, PE19 e ES1
Haplótipo 2	CE3, PE4, PE13, BA2, BA3, BA7, SP1, PR1, PR2 e PR3
Haplótipo 3	PE2
Haplótipo 4	PE7
Haplótipo 5	PE12
Haplótipo 6	PE14
Haplótipo 7	PE16
Haplótipo 8	PE20
Haplótipo 9	SP2

A rede de haplótipo baseada em COI (Figura 20) é formada por dois haplótipos centrais (com dois passos mutacionais entre eles), correspondentes aos dois haplótipos que mais compartilham indivíduos (haplótipos 1 e 2), e os haplótipos únicos descendem deles.

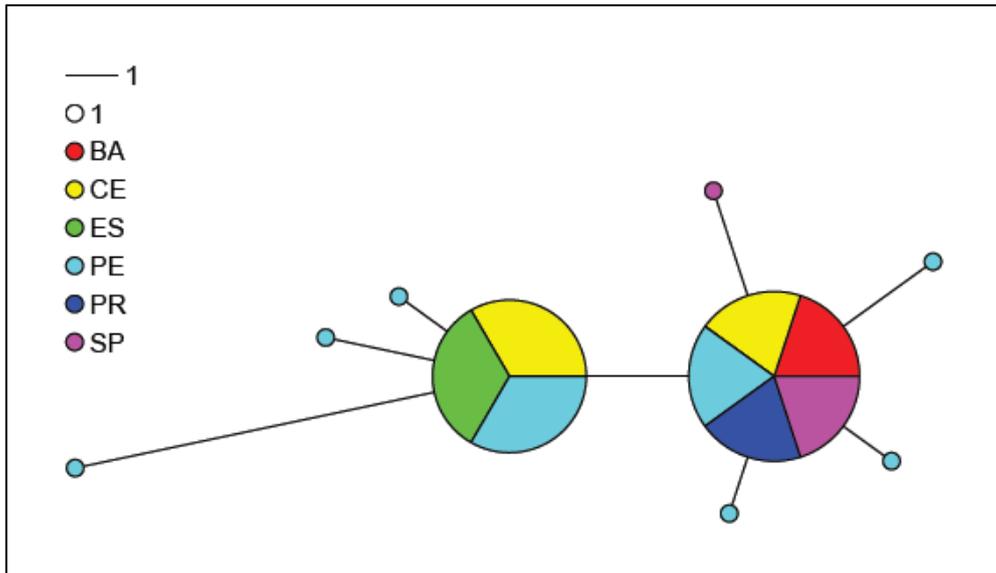


Figura 20: Redes de Haplótipos de *P. ponteni* baseado em sequências de COI.

Para 16S, foram observados ao todo 11 haplótipos, sendo os haplótipos 2 e 9 compartilhados e os demais exclusivos (Tabela 34). O haplótipo 2 foi compartilhado por mais indivíduos, 16, de todas as localidades, exceto ES; o haplótipo 9 foi compartilhado com 3 indivíduos, 2 do ES e 1 do PR.

Tabela 34: Haplótipos de 16S encontrado em cada indivíduo da espécie *P. ponteni*.

Haplótipos	Indivíduos
Haplótipo 1	CE2
Haplótipo 2	CE3, PE1, PE2, PE4, PE8, PE9, PE13, PE14, PE15, PE17, PE18, PE19, PE20, PR1, PR2 e SP5.
Haplótipo 3	CE4
Haplótipo 4	PE6
Haplótipo 5	PE7
Haplótipo 6	PE10
Haplótipo 7	PE12
Haplótipo 8	PE16
Haplótipo 9	ES1, ES9 e PR1
Haplótipo 10	SP1
Haplótipo 11	SP4

A rede baseada em 16S (Figura 21) é formada por um haplótipo central correspondente ao haplótipo que mais compartilha indivíduos (haplótipo 2), e os demais haplótipos descendem dele.

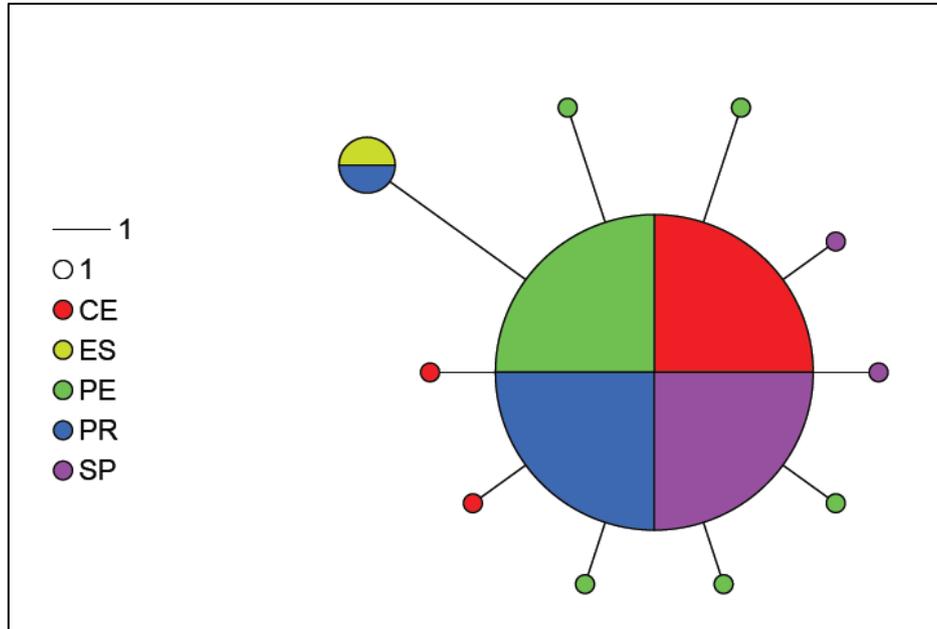


Figura 15: Redes de Haplótipos de *P. ponteni* baseado em sequências de 16S.

4.2.4. Testes de Neutralidade

Pelas mesmas razões expostas no subitem 4.2.3. os testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu foram realizados considerando os indivíduos como pertencentes a uma só população panmítica. Os resultados para COI não foram significativos estatisticamente ($p > 0,05$), com os valores dos testes de -1,5538 e -2,217, para D de Tajima e F_s de Fu, respectivamente. Já para 16S, ambos os testes deram valores negativos e estatisticamente significativos (D de Tajima = -2,10224, p-valor = 0,0200; F_s de Fu = -6,80980, p-valor = 0,000), rejeitando a hipótese nula de evolução neutra. Para esse marcador, foi realizada também a análise de distribuição das diferenças (mismatch distribution), apresentando resultado compatível com o cenário de expansão populacional. Como já foi dito na sessão 4.1.3., o gráfico foi construído sob cenário de expansão demográfica e está representado na figura 19, já os parâmetros são calculados sob cenários de expansão demográfica e espacial, e estão representados na tabela 32.

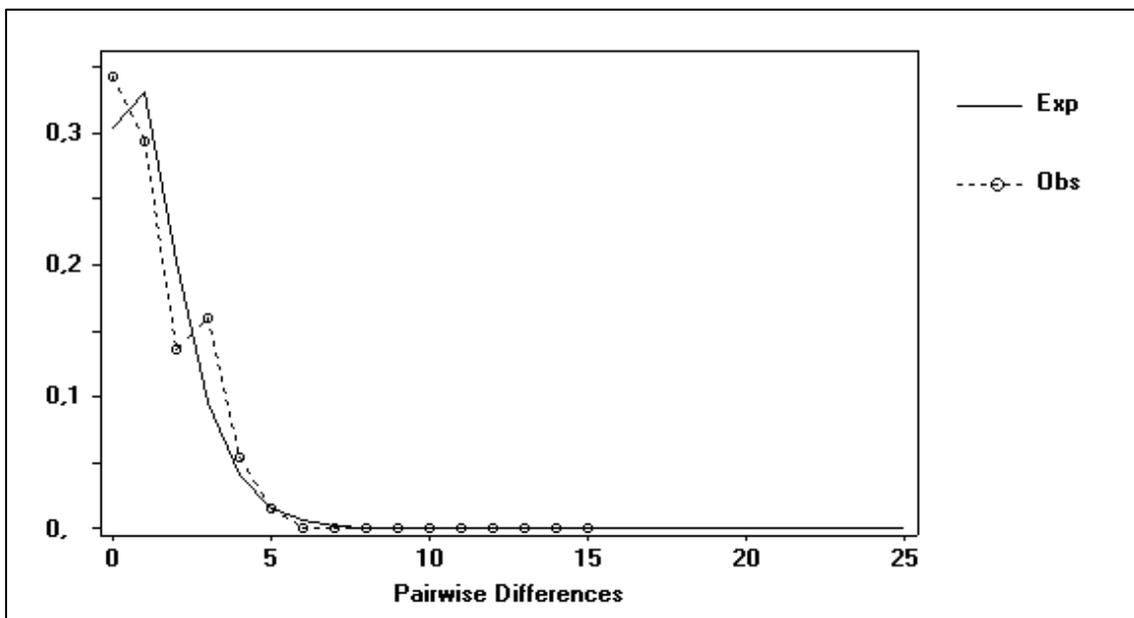


Figura 19: Análise da distribuição das diferenças, marcador 16S. No eixo x o número de diferenças par-a-par e no eixo y a frequência das diferenças. Exp – curva esperada para expansão populacional; Obs – curva observada.

Tabela 32: Valores do parâmetro τ e tempo decorrido (em anos) após a expansão estimados para a análise de distribuição das diferenças sob cenários de expansão espacial e expansão demográfica, Para 16S. SSD – soma dos quadrados dos desvios; P-ssd – p-valor associado ao SSD; IR – Índice de Raggedness; P-ir – p-valor associado ao IR.

Parâmetros	Expansão Espacial	Expansão Demográfica
τ	0,25996	2,02148
SSD	0,00574	0,00585
P-ssd	0,60000	0,90000
IR	0,04087	0,04087
P-ir	0,86000	0,95000
Tempo (anos)	12.755	128.826

4.2.5. Estruturação Populacional

Pelas mesmas razões expostas no subitem 4.2.3., a AMOVA e o cálculo de F_{ST} não foram realizados.

4.2.6. Fluxo gênico e tamanho populacional efetivo

As estimativas de fluxo gênico e tamanho populacional efetivo não foram realizadas para *P. ponteni* pelo baixo número de espécimes por localidade. De acordo com Felsenstein (2006), boas estimativas de θ necessitam de, no mínimo, oito indivíduos por população/localidade e para estimar o parâmetro M com confiança é preciso utilizar cerca de 10-20 indivíduos.

5. DISCUSSÃO

Estudos filogeográficos têm se mostrado muito relevante não só para a descrição de padrões geográficos e história evolutiva das populações, como também pode auxiliar a desvendar o verdadeiro status de complexos de espécies. Para muitas espécies de invertebrados marinhos tem sido relatada uma ampla distribuição. Segundo Bleidorn e colaboradores (2006), pelo menos quatro hipóteses podem razoavelmente explicar esse padrão de distribuição: (1) espécies verdadeiramente com ampla distribuição; (2) morfoespécies cosmopolitas que correspondem às espécies geneticamente distintas; (3) conhecimento taxonômico restrito; e (4) espécies cosmopolitas na qual a distribuição atual é resultado de introduções humanas. O presente estudo parece corresponder a duas dessas hipóteses: a hipótese 1 para *Perinereis ponteni* e a hipótese 2 para *Perinereis anderssoni*.

Nossos dados demonstram, com o auxílio da ferramenta molecular e baseado em dois marcadores, que as espécies *P. anderssoni* e *P. ponteni* são duas espécies filogeneticamente distintas, assim como já fora sugerido anteriormente, através de análises morfológicas (Santos e Steiner, 2006), citogenética (Ipucha et al, 2007) e morfométricas (Coutinho, 2013). Portanto, nossos resultados suportam as propostas taxonômicas mais recentes que indicam a separação dessas espécies.

P. anderssoni e *P. ponteni* não só são espécies filogeneticamente separadas, como apresentam histórias evolutivas diferentes, com padrões filogeográficos incongruentes ao longo da costa brasileira. Nossos resultados apontam que, enquanto *P. ponteni* apresenta uma distribuição contínua ao longo da costa brasileira, *P. anderssoni* constitui, na verdade, duas espécies crípticas, com uma linhagem com distribuição no Nordeste e outra linhagem com distribuição no Sul/Sudeste do país. Essa incongruência de padrões filogeográficos não nos permite traçar eventos históricos comuns para a costa brasileira, o que sugere que os processos que originaram a atual distribuição de *P. anderssoni* e *P. ponteni* na área de estudo se deram de maneira independente (Bermingham & Moritz, 1998).

5.1. *Perinereis anderssoni*: complexo de espécies crípticas

As análises filogenéticas indicam a presença de duas espécies crípticas dentro de *Perinereis anderssoni*, com separação latitudinal norte/sul (clado Nordeste e clado Sul/Sudeste), mostrando que esta não está distribuída por toda costa do Brasil, como então se supunha através de análise baseadas em morfologia.

Os valores de distância gênica, aqui encontrados, entre o clado do Nordeste e do Sul/Sudeste corroboram esta hipótese. Para COI, encontramos esse valor igual a 8,7% (K2P). Outros trabalhos também encontraram valores similares discriminando espécies crípticas. Nygren e Pleijel (2010), no complexo de espécies *Eumida sanguinea*, encontraram distâncias gênicas variando de 6,5% a 18,5% entre as espécies do complexo. Para a costa do Atlântico, Barroso e colaboradores (2010) diferenciaram espécies crípticas de *Eurytoe complanata* com distância de 10%. Utilizando-se de outro modelo para calcular as distâncias gênicas (HKY), Schulze e colaboradores (2000), encontraram distâncias gênicas de 4% e 5% separando clados em *Streblospio*. Especificamente para o litoral brasileiro, porém, com grupo diferente do estudado aqui, Gusmão e colaboradores (2006), estudando uma espécie de camarão *Xiphopenaeus kroyeri*, presente em toda costa, encontraram duas espécies crípticas, com distâncias gênicas (K2P) de 10,6%, porém, não separando populações latitudinalmente.

Já para 16S, a distância gênica K2P entre o clados Nordeste e Sul/Sudeste foi de 2,2%. Esse valor é superior ao encontrado para separar espécies de *Marenzelleria* (Spionidae) (Nei 1,5%) (Bastrop *et al.*, 1998) e *Diopatra* (Onuphidae) (1%) (Rodrigues, *et al.*, 2009). Em relação às distâncias entre as localidades dentro dos dois clados, os resultados foram compatíveis com os encontrados como distância intra-específica em outras espécies de poliqueta. Para COI (Nordeste 1,1% e Sul/Sudeste 0,3%), por exemplo, em Jolly e colaboradores (2005): 0,3 e 0,7%, (distância K2P média em cada um dos clados); em Nygren e Pleijel (2010): K2P entre 0,2 a 2,1%; em Schulze e colaboradores (2000): distância HKY entre 1 e 5%; em Drake e colaboradores (2007): distância TVM entre 0,2 e 2%. Um trabalho envolvendo espécies da mesma família (gênero *Hediste*) do presente estudo encontrou valores intra-específicos bem superiores aos aqui encontrados, para o Mar Báltico, sendo justificados pelos autores pela forte estruturação populacional entre regiões (Audzijonyte *et al.*, 2008).

Dentro das localidades, as distâncias gênicas intrapopulacional para COI (0,0 – 0,8%) foram similares às encontradas para uma espécie do mesmo gênero, *P. aibuhitensis*, (0,1 – 1,4%), na costa da China (Liu et al, 2012). Esses valores também foram encontrados para *P. ponteni* neste trabalho (0,1 – 0,5%), sugerindo que esses sejam os intervalos de valores de distância genética esperado para espécies pertencentes ao gênero *Perinereis*. Para 16S (0,3 %), o valor foi similar ao intraespecífico para *Paranaitis* (Phyllococidae) (K2P=1,5%) (Nygren et al., 2009).

Entre as populações do Nordeste as distâncias genéticas mostram maior diferença interpopulacional do que intrapopulacional, ao passo que nas populações do Sul/Sudeste as diferenças inter e intrapopulacionais são praticamente iguais. Esses valores estão de acordo com os índices de FST, que se mostram alto e estatisticamente significativo entre as populações do Nordeste, rejeitando a hipótese de não estruturação entre essas populações. Já os índices de FST entre as populações do Sudeste são baixos e não estatisticamente significativa, não podendo rejeitar a hipótese nula de não estruturação entre as populações. A única exceção está no conflito entre os resultados dos dois marcadores. Com base no COI, a população do ES apresenta estruturação em relação às demais, e com base em 16S, a estruturação é em relação à população do RJ com as outras. Provavelmente essa variação está associada às respectivas taxas de mutação, visto que, geralmente, o COI evolui mais rápido que o 16S. Portanto, ao considerar os valores de COI, estaríamos diante de um evento mais recente, enquanto os valores de 16S nos indicam um evento mais antigo. Essas estruturações também são evidenciadas pelas análises filogenéticas, com formação de clados contendo essas populações, para cada um dos marcadores correspondentes.

Os valores e padrões encontrados de AMOVA também apontam para forte separação entre populações do Nordeste e do Sudeste. Os resultados demonstram que parece haver uma forte estruturação entre as populações do Nordeste separadas das populações do Sul/Sudeste. Nos cenários descritos para COI – 1) um grupo com as populações do Nordeste e um com as populações do Sul/Sudeste; 2) um grupo com a população do CE, um com a população do PE e um grupo com as populações do Sul/Sudeste; 3) um grupo com as populações do Nordeste, um grupo com a população do Sul e um grupo com as populações do Sudeste e 4) um grupo com a população de PE

e um grupo com as demais populações – a maior porcentagem das diferenças é explicada dentro de cada grupo, rejeitando a hipótese nula de não haver estruturação populacional ($p < 0,05$). No cenário 2 (CE/PE/ES+RJ+PR+SP), quando separadas as duas populações do Nordeste, a porcentagem entre populações dentro do grupo diminui (de 1,71% para 0,51 %), mostrando que deve haver alguma estruturação entre essas duas populações. Quando, no cenário 4 (PE/CE+ES+RJ+SP+PR), juntamos CE com as populações do Sul/Sudeste, a porcentagem das diferenças entre populações dentro dos grupos cresce consideravelmente (de 1,71% para 54,53%), não podendo rejeitar a hipótese nula que não há estruturação populacional entre as populações ($p = 0,348$).

Os resultados para 16S estão de acordo com os resultados para COI. Cenários ligeiramente diferentes foram sugeridos para 16S, pela falta de espécimes do CE e resultados de Fst: 1) um grupo com PE (Nordeste) e um grupo das populações do Sul/Sudeste; 2) um grupo com PE, um grupo com RJ e outro grupo com as demais populações e 3) um grupo juntando PE e RJ e um grupo com as demais populações. No cenário 1 (PE/ES+RJ+SP+PR) a maior porcentagem da variação (86,46%) está entre os grupos. O cenário 2 (PE/RJ/ES+SP+PR) mostra que parece haver estruturação populacional com a população do RJ em relação às demais do clado Sul/Sudeste, pois a porcentagem da variação entre as populações dentro dos grupos diminui (de 7,39% para 0,43%) quando separamos RJ do restante das populações do Sul/Sudeste. Já quando juntamos uma população do Sul/Sudeste, no cenário 3, com a população do Nordeste (PE+RJ/ES+SP+PR), a porcentagem da variação entre grupos diminui (de 86,49% para 45%) e entre populações dentro dos grupos aumenta consideravelmente (de 7,39% para 42,34%).

A composição nucleotídica das sequências encontrada no presente estudo é comparável com a maioria encontrada para DNA mitocondrial de invertebrados (Simon *et al.*, 1994) e os índices de diversidade molecular apontam diferentes histórias evolutivas para os dois clados. No clado Nordeste encontramos altos índices de diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica, enquanto no clado Sul/Sudeste esses valores são relativamente baixos. Valores similares aos encontrados podem ser vistos em outros trabalhos com poliqueta. Valores como o do clado Nordeste são encontrados em espécie pertencente à mesma família das espécies estudadas (Nereididae) *Hediste*

diversicolor (Audzijonyte *et al.*, 2008; Virgílio *et al.*, 2009). Já valores mais baixos como encontrados no clado Sul/Sudeste pode ser encontrado em *Perinereis aibuhitensis*. Segundo Grant e Bowen (1998) a ocorrência de uma variabilidade genética reduzida, com baixos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica, sugere a ocorrência de “efeito gargalo” ou “efeito fundador”.

Quanto à demografia, os testes de neutralidade apontam para cenários diferentes nos clados Nordeste e Sul/Sudeste. Os resultados dos testes para as populações reunidas do clado Nordeste sugere que as populações dessa linhagem estejam mais estáveis. Porém, avaliando as populações separadamente, os resultados para COI indicam expansão populacional para a população PE. Já os resultados dos testes para as populações do Sul/Sudeste mostram que estas parecem ter sofrido uma expansão recente, tanto quando avaliamos conjuntamente como quando avaliadas separadamente em populações. Para as populações reunidas, ambos os marcadores rejeitaram a hipótese nula de evolução neutra. Para as populações separadas, apenas para COI foi rejeitada a hipótese nula de evolução neutra, para as populações do RJ e PR.

Esse cenário de expansão populacional para o clado Sul/Sudeste sugerido pelos testes de neutralidade é corroborado pelas análises de distribuição das diferenças (mismatch distribution) e também pela estrutura das redes de haplótipo.

As redes de haplótipos do Nordeste e Sul/Sudeste sugerem histórias demográficas diferentes. A teoria da coalescência (Kingman, 1982) prediz que os haplótipos mais antigos são aqueles que possuem maior frequência, tem amplas distribuições geográficas e estão no centro das redes de haplótipos (Freeland, 2005). Na rede de haplótipos do Nordeste, o haplótipo central não é o mais frequente (apenas 1 indivíduo) e também não está amplamente distribuído, porém, devido ao número de haplótipos que dele descende, provavelmente é o mais antigo. O número de passos mutacionais entre os haplótipos pode indicar uma grande quantidade de haplótipos intermediários não amostrados, indicando que a diversidade genética possa estar subestimada, seja pela baixa amostragem nas localidades, seja pela distância geográfica entre os locais de amostragem. Por esse haplótipo central ser de Pernambuco e os que diferem com mais passos mutacionais serem do Ceará, é plausível de encontrarmos os haplótipos

intermediários nos estados do Rio Grande do Norte e Paraíba. Vale a pena ressaltar que coletas foram feitas nesse dois estados, não sendo encontrados espécimes, apesar de haver registros da espécie para essas localidades (Amaral *et al.*, 2012).

Na rede de haplótipos do Sul/Sudeste, o haplótipo mais frequente está distribuído por quase todas as localidades (exceto ES) e se encontra no meio da topologia em estrela. Além de ser o haplótipo mais frequente, é também o que apresenta o maior número de haplótipos descendentes, indicando que este deva ser o haplótipo mais antigo e que, a princípio, há fluxo gênico entre essas localidades. Essa estrutura em formato de estrela, com diversos haplótipos de origem mais recente conectados por poucos passos mutacionais, também pode indicar a provável ocorrência de um evento de expansão populacional (Slatkin & Hudson, 1991).

Nossos resultados sugerem que o clado do Nordeste seja mais antigo, pois apresentou um maior número de haplótipos. De acordo com Freeland (2005), populações com elevado número de haplótipos tendem a serem as mais antigas, visto que os indivíduos ali presentes tiveram mais tempo para acumular mutações. O tempo estimado após a última expansão a partir do valor do parâmetro τ das análises de distribuição das diferenças corrobora com esta hipótese. O tempo estimado para a população de Pernambuco é de quase 80 mil anos, enquanto para as populações do Sul/Sudeste estão na casa dos 30 mil anos (baseados em sequências de COI).

As estimativas de tamanho populacional efetivo apontam que as populações da linhagem Nordeste possuem maior tamanho efetivo comparado com as populações da linhagem Sul/Sudeste. Esses resultados corroboram com os dados demográficos, onde a linhagem do Nordeste seja mais antiga e estável e a linhagem do Sul/Sudeste está sofrendo expansão populacional. Apesar das indicações de falta de estruturação populacional entre as localidades da linhagem Sul/Sudeste, os valores de migrantes efetivos por geração são mais baixos. Porém, esses valores podem estar mal estimados devido ao baixo número de indivíduos do Paraná e de São Paulo. Já em relação ao fluxo gênico entre as populações estudadas dentro de cada linhagem, esses se mostram assimétrico para ambas as linhagens, com número de migrantes efetivos por geração maior no sentido do Ceará para Pernambuco do que no sentido contrário, no Nordeste, e um maior fluxo do Paraná para as outras localidades, exceto em relação ao Espírito

Santo, que o fluxo maior é no sentido contrário. Esses resultados não estão de acordo com o padrão de circulação de correntes na costa brasileira, aonde a Corrente Equatorial Sul chega à costa e se bifurca entre Corrente Norte do Brasil (que segue a costa norte do Brasil, transportando as águas quentes do Atlântico Sul para o Atlântico Norte) e Corrente do Brasil (que segue pela costa em direção ao Sul) (Palacio, 1982). Isso sugere as correntes marinhas não seja o principal responsável pela dispersão nessas linhagens.

De acordo com as evidências de expansão populacional e do tempo calculado após a última expansão, é possível que as variações das condições climáticas causadas pelos períodos de glaciação e interglaciação do Pleistoceno tenham influenciado no padrão filogeográfico do complexo *P. anderssoni*.

Podemos sugerir dois cenários hipotéticos para explicar esse padrão filogeográfico do complexo *P. anderssoni* aqui encontrado. 1) Primeiro a colonização da espécie ocorreu no Nordeste, tendo dispersão pós-glaciação, com uma pequena população dando origem a linhagem do Sul/Sudeste (efeito fundador). 2) A espécie apresentava uma distribuição ao longo da costa e com a glaciação se refugiaram ao norte e ao sul, assim as duas linhagens evoluíram de forma independente.

As glaciações do Pleistoceno reduziram drasticamente a distribuição das espécies, que se refugiavam em latitudes menores e se expandiram no período pós-glaciação. Os efeitos da glaciação parecem ser mais extremos nas regiões temperadas e/ou estuarinas do que nas regiões tropicais e/ou em grandes oceanos (Hewitt, 2000). Para o hemisfério norte esse fenômeno é bem documentado para poliquetas, como por exemplo, em Jolly e colaboradores (2006) e Virgílio e colaboradores (2009). Para o hemisfério sul, as consequências são pouco conhecidas e muito debatidas (Lessa *et al.*, 2003). Nas espécies que estão distribuídas em regiões tropicais marinhas a redução do nível do mar, causada pelo período de glaciação, faria com que as populações migrassem latitudinalmente. Esse efeito pôde ser observado na Austrália e Nova Zelândia, com a estrela-do-mar *Coscinasterias muricata* (Waters e Roy, 2003) e o gastrópode *Potamopyrgus antipodarum* (Neiman e Lively, 2004), ambos com padrão filogeográfico de diferenciação populacional norte/sul.

Em relação a costa brasileira, em consequência do resfriamento da Terra, ocorreu uma diminuição do nível dos mares e boa parte da plataforma continental brasileira

virou ambiente terrestre, sendo possível que partes da Cadeia Vitória-Trindade também tenham ficado expostas (Ferrari & Riccomini, 1999). De acordo com Jouzel *et al.*, 2007, acredita-se que o mar estava cerca de 100-150 metros abaixo do nível atual. Essa diminuição pode ter acarretado mudanças nas características das correntes e massas d'água que agem a oeste do Atlântico Sul, de modo a restringir o fluxo gênico entre as populações localizadas a Norte e Sul da Cadeia Vitória-Trindade. No caso do clado Nordeste e clado Sul/Sudeste só existiria uma espécie distribuída ao longo da costa brasileira, porém com a restrição do fluxo gênico, durante a regressão marinha, as populações do Norte e do Sul da Cadeia passaram a evoluir independentemente. Quando o nível do mar voltou a subir as populações já teriam adquirido a condição de espécies diferentes.

Outro fator que poderia ajudar a manter a restrição ao fluxo gênico entre as linhagens após a transgressão marinha, no período pós-glaciação é o predomínio de diferentes massas d'água na costa brasileira. Na costa Leste e Nordeste do Brasil há o predomínio de águas mais quentes e com poucos nutrientes e águas mais frias, enriquecida com nutrientes por fenômenos sazonais, na costa Sudeste e Sul (Floeter *et al.*, 2001). Dentro das propostas de divisões biogeográficas para a costa brasileira, Spalding *et al.* (2007), sugere a divisão em três províncias: Plataforma norte do Brasil, Sudoeste do Atlântico tropical e Sudoeste do Atlântico temperado. Apesar de alguns pontos contrastantes com Spalding e colaboradores (2007), a visão de Palacio (1982) também propõe a existência de três províncias: uma zona tropical (Caribenha), uma subtropical (Patagônica), além da Província Paulistana, que seria uma área de endemismo e/ou transição. De maneira geral, o clado Nordeste estaria dentro da província Sudoeste do Atlântico tropical (Spalding *et al.*, 2007) e da zona tropical (Palacio, 1982), enquanto o clado Sul/Sudeste estaria na província Sudoeste Atlântico temperado (Spalding *et al.*, 2007) e na zona Paulistana (Palacio, 1982). Portanto, essas linhagens estariam em unidades biogeográficas diferentes, com características de biotas, temperatura da água e história geológica diferentes.

Pouco se sabe sobre a biologia reprodutiva de *P. anderssoni*. Peixoto (2013) sugere que é provável que as larvas sejam lecitotróficas, assim como encontradas em outras espécies do gênero (Prevedelli & Simonini, 2003). Esse tipo de larva teria um menor

potencial dispersivo, sendo difícil manter o fluxo gênico em uma distribuição ampla, sendo contrário ao cenário hipotético 2. Além disso, a recolonização pós-período glacial ocorreria a partir dos refúgios, que são zonas de grande diversidade genética, o que não é compatível com a baixa diversidade nas populações do clado Sul/Sudeste.

Em contra partida, a baixa diversidade na linhagem do Sul/Sudeste e a linhagem do Nordeste ter haplótipos mais antigos e mais numerosos, além das larvas lecitotróficas supracitada, sustentam a hipótese do cenário hipotético 1, na qual a espécie teria primeiramente surgido na região Nordeste do Brasil, e teria sofrido dispersão para o Sudeste com a transgressão marinha pós-glaciação, colonizando o Sul/Sudeste a partir de um pequeno *pool* genético.

Entre os diferentes trabalhos que descrevem morfologicamente a espécie *P. anderssoni* (Lana, 1984; Santos & Steiner, 2006; León-González & Solís-Weiss, 1998; Coutinho, 2013), encontramos algumas variações, que podem estar relacionadas há diferenças morfológicas nas duas linhagens encontradas para a costa brasileira, como número de paragnatas, tamanho e/ou forma dos cirros notopodiais e ventrais, número de setígeros, comprimento total, largura e número de dentes maxilares.

5.2. *Perinereis ponteni*: ampla distribuição na costa brasileira

Bem diferente do que encontramos para o *P. anderssoni*, *P. ponteni* parece corresponder a uma espécie com ampla distribuição, que mantém o fluxo gênico ao longo de toda a costa brasileira, sem estruturação aparente. Os resultados obtidos nas análises filogenéticas, rede de haplótipos e nos valores de distância genética indicam claramente que os indivíduos amostrados, ao longo da costa brasileira, pertencem à mesma espécie.

Nas análises filogenéticas, ambas as inferências e marcadores, *P. ponteni* formou um clado monofilético, com distâncias gênicas baixas, entre 0 e 1,4% para COI e 0 e 1% em 16S, sem a formação de clados internos que mostrassem estruturação populacional. Apesar de não serem realizadas as análises de estruturação populacional, as distâncias genéticas K2P intra e interpopulacional, para ambos marcadores, foram

similares, indicando fluxo gênico entre toda distribuição amostrada. A baixa estruturação populacional pode ser vista como uma consequência do elevado grau de fluxo gênico entre as localidades. De acordo com Slatkin (1987), um migrante efetivo por geração é suficiente para manter a homogeneização entre diferentes populações, visto que impede que as diferenças genéticas se acumulem.

O cenário de homogeneidade pode ser visto também na estrutura da rede de haplótipos. A rede baseada em COI apresenta um formato estrela, com dois haplótipos centrais ancestrais com maior frequência e amplas distribuições geográficas, de onde descendem os outros haplótipos com poucos passos mutacionais (com a exceção de um haplótipo do PE). Já a rede baseada em 16S, também apresenta o formato estrela, porém, com um único haplótipo central, com maior frequência e presente em todas as localidades, exceto ES, de onde descendem todos os haplótipos, com poucos pontos mutacionais. Esse padrão de poucos haplótipos centrais com muitos haplótipos descendentes com poucos passos mutacionais pode indicar expansão populacional a partir de um pequeno *pool* genético.

Os valores de diversidade molecular e os testes de neutralidade também apontam para essa direção. Assim como encontrado no clado Sul/Sudeste, a espécie *P. ponteni* apresenta baixos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica, sugerindo ocorrência de “efeito gargalo” ou “efeito fundador” (Grant e Bowen, 1998). Já os resultados dos testes de neutralidade apontam para expansão populacional, porém, apenas para 16S, em ambos os testes. Os gráficos e os parâmetros da análise da distribuição das diferenças estão de acordo com esse cenário de expansão populacional.

Não há dados na literatura sobre o ciclo reprodutivo e fase larval de *P. ponteni*. Contudo, nossos dados sugerem uma fase larval com alto potencial dispersivo, para manter fluxo gênico entre distâncias amplas como entre o Paraná e Pernambuco (~3380 km), como ocorre com espécies que têm larvas planctotróficas. Wilson (1991) e Schüller (2007) registraram larvas planctotróficas para *Perinereis cultrifera*, apesar de Rouse (2000) afirmar que o único tipo de larva encontrado na família Nereididae é a lecitotrófica.

As variações climáticas causadas pelos períodos de glaciação e interglaciação do Pleistoceno, parecem não ter influenciado na história evolutiva das populações analisadas de *P. ponteni* ou a colonização dessa espécie se deu após esse período. Os valores do tempo estimado após expansão não foram conclusivos, pois os valores de τ , variaram entre a análise de expansão demográfica (12.755 anos) e expansão espacial (128.826 anos). De acordo com o tempo estimado sob cenário de expansão espacial, a espécie já teria colonizado a área de distribuição atual durante o período da última glaciação do Pleistoceno (entre 100 mil e 10 mil anos atrás). Além disso, a possessão de larvas com grande potencial dispersivo como sugerido por nós nesse trabalho, poderia ter sido capaz de manter o fluxo gênico durante a glaciação.

5.3. Filogeografia comparada: *P. anderssoni* x *P. ponteni*

Avise e colaboradores (2000) resumem os possíveis padrões filogeográficos em cinco, de acordo com a magnitude da divergência genética encontrada entre as linhagens e o grau de localização geográfica delas. No presente estudo podemos classificar os padrões encontrados para *P. anderssoni* e *P. ponteni* como “padrão tipo I” e “padrão tipo IV”, respectivamente. O “padrão tipo I” (alta divergência genética e linhagens alopátricas) é caracterizado por clados geograficamente circunscritos separados por grande número de mutação. O cenário histórico responsável por esse padrão é provavelmente a presença de uma conspícua barreira ao fluxo gênico separando as populações. Já o “padrão tipo IV” (baixa divergência genéticas e linhagens simpátricas) é atribuído a espécies com grande capacidade de dispersão, ou seja, em sua distribuição não há barreiras ao fluxo gênico entre os indivíduos provenientes de diferentes localidades. A livre movimentação dos indivíduos ao longo da distribuição e o efeito homogeneizante do fluxo gênico impedem o surgimento de linhagens muito divergentes (Martin e Domingues, 2011).

Em trabalho comparando as mesmas duas espécies deste trabalho, através de análises morfológicas e morfométricas, Coutinho (2013) afirma que as características comprimento dos cirros dorsais, o padrão de pigmentação do prostômio com ou sem as áreas ovaladas não pigmentadas, o número de paragnatas das áreas da probóscide,

presença ou ausência de aglomerados glandulares nas língulas notopodiais medianas e posteriores foram os caracteres morfológicos que apresentaram clara distinção na análise morfológica entre as duas espécies, demonstrando que eles podem ser utilizados com caracteres discriminantes na diagnose das espécies *P. anderssoni* e *P. ponteni*. A autora destaca a importância do número de paragnatas das áreas da probóscide não só para a diferenciação entre as duas espécies, como para investigar padrões intraespecíficos. Seus resultados sugerem uma ligeira separação geográfica Norte/Sul para *P. anderssoni*, porém, não para *P. ponteni*, estando de acordo com os resultados aqui encontrados.

Como perspectivas futuras, para melhor entender o complexo *P. anderssoni*, amostras de toda a sua distribuição, incluindo espécimes do Chile (oceano Pacífico), são necessárias para complementar as análises e compreendermos a história e os eventos evolutivos que deram origem aos padrões filogeográficos encontrados atualmente, e esclarecermos o verdadeiro status taxonômico de cada linhagem. Entretanto, com os resultados obtidos aqui, sugerimos que uma revisão da espécie seja feita, em busca de marcadores morfológicos que acompanhem a distinção molecular entre as linhagens. Em relação à espécie *P. ponteni*, são necessários mais espécimes de cada localidade para melhor elucidar questões como a história demográfica e a estruturação populacional desta espécie, a fim de tentar entender melhor a história evolutiva da espécie.

6. CONCLUSÕES

- Nossos dados demonstram claramente que as espécies *Perineireis anderssoni* e *Perinereis ponteni* são duas espécies filogeneticamente distintas, com distâncias gênicas K2P de 22,4% para COI e 13% para 16S entre elas, suportando as propostas taxonômicas mais recentes que indicam a separação dessas espécies.
- Nossos resultados apontam que, enquanto *P. ponteni* apresenta uma distribuição contínua ao longo da costa brasileira, *P. anderssoni* constitui, na verdade, duas espécies crípticas na área estudada, com separação latitudinal norte/sul, apresentando uma linhagem com distribuição no Nordeste e outra linhagem com distribuição no Sul/Sudeste do país, com distâncias gênicas K2P de 8,7% para COI e 2,2% para 16S entre elas.
- Na linhagem do Nordeste do complexo *P. anderssoni*, as populações parecem estar estáveis demograficamente e estruturadas entre elas, apresentando os haplótipos mais antigos e numerosos, enquanto na linhagem do Sul/Sudeste do complexo *P. anderssoni* apresenta uma falta de estruturação populacional, com aparente fluxo gênico entre as populações e apresentando uma distribuição dos haplótipos que sugerem um cenário de expansão populacional, corroborado pelos testes de neutralidade e análise da distribuição das diferenças. Já a espécie *P. ponteni*, o cenário se assemelha a linhagem Sul/Sudeste do complexo *P. anderssoni*.
- Como *P. anderssoni* e *P. ponteni* apresentam padrões filogeográficos incongruente, não foi possível traçar eventos históricos comuns para a costa brasileira, o que sugere que os processos que originaram a atual distribuição de *P. anderssoni* e *P. ponteni* na área de estudo se deram de maneira independente. Enquanto o complexo *P. anderssoni* parece ter a separação das linhagens relacionada às mudanças climáticas ocorridas durante os períodos glaciais e

interglaciais, *P. ponteni* parece não ter sofrido influência dessas mudanças na sua distribuição atual.

- Dentro dos padrões filogeográficos propostos por Avise e colaboradores (2000), o complexo *Perinereis anderssoni* enquadra-se no “padrão tipo I”: alta divergência genética e linhagens alopátricas. Esse padrão é compatível com distribuição de espécies que apresentam larvas lecitotróficas. Enquanto a espécie *Perinereis ponteni* enquadra-se no “padrão tipo IV”: baixa divergência genética e linhagens simpátricas. Esse padrão é compatível com a distribuição de espécies que apresentam larvas planctotróficas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbiati, M. & Maltagliati, F. (1996) Allozyme evidence of genetic differentiation between populations of *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae) from the western Mediterranean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 76, 637–647.
- Amaral, A.C.Z., Nallin, S.A.H., Steiner, T.M. (2010) Catálogo das espécies de Annelida Polychaeta do Brasil.
- Amaral, A.C.Z., Nallin, S.A.H., Steiner, T.M., Forroni, T.O., Gomes-Filho, D. (2012) *Catálogo das espécies de Annelida Polychaeta do Brasil*. http://www.ib.unicamp.br/museu_zoologia/files/lab_museu_zoologia/Catalogo_Polychaeta_Amaral_et_al_2012_0.pdf. Data de consulta: 10.09. 12.
- Aris-Brosou S., Excoffier L., (1996) The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology and Evolution*. 13: 494-504.
- Avise, J.C. (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution. *Chapman & Hall*, New York. 685p.
- Avise, J.C. (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7, 371-379.
- Avise, J.C. (2000) Phylogeography: the history and formation of species. *Harvard University press*, Cambridge. 447p.
- Avise, J.C. (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2nd Ed. *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts, EUA.
- Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball, R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A.; Saunders, N.C. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489-522.
- Audzijonyte, A., Daneliya, M.E., Väinölä, R. (2006) Comparative phylogeography of Ponto-Caspian mysid crustaceans: isolation and exchange among dynamic inland sea basins. *Molecular Ecology*, 15, 2969–2984.
- Audzijonyte, A., Ovcarenko, I., Bastrop, R., Väinölä, R. (2008) Two cryptic species of the *Hediste diversicolor* group (Polychaeta, Nereididae) in the Baltic Sea, with mitochondrial signatures of different population histories. *Marine Biology*, 155, 599–612.

- Bakken, T. & Wilson, R.S. (2005) Phylogeny of nereidids (Polychaeta, Nereididae) with paragnaths. *Zoologica Scripta*, 34(5), 507–547.
- Baoling, W., Ruiping, S. & Yang, D.J. (1985) The Nereidae (*Polychaetous Annelids*) of The Chinese Coast. *China Ocean Press*, Beijing, 234p.
- Barber, P.H., Erdmann, M.V., Palumbi, S.R. (2006) Comparative phylogeography of three co-distributed stomatopods: origins and timing of regional lineage diversification in the coral triangle. *Evolution*, 60, 1825–1839.
- Barroso, R., Klautau, M., Solé-Cava, A.M. & Paiva, P.C. (2010) *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae), the ‘cosmopolitan’ fireworm, consists of at least three cryptic species. *Marine Biology*, 157(1), 69-80.
- Bastrop, R., Jürss, K., Sturmbauer, C. (1998) Cryptic species in a marine polychaete and their independent introduction from North America to Europe. *Molecular Biology and Evolution* 15(2), 97-103.
- Beerli, P. (2006) Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics* 22(3), 341-345.
- Beerli, P. (2009) How to use Migrate or why are Markov chain Monte Carlo programs difficult to use? 39-70 pp. In: Bertorelle, G., Bruford, M.W., Hauffe, H.C., Rizzoli, A. & Vernesi, C. (eds) *Population Genetics for Animal Conservation*, Cambridge University Press.
- Beerli, P. & Felsenstein, J. (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(8), 4563-4568.
- Bermingham, E., Moritz, C. (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7, 367-369.
- Bernardi, G. (2000) Barriers to gene flow in *Embiotoca jacksoni*, a marine fish lacking a pelagic larval stage. *Evolution*, 54, 226-237.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N. S., Peter, K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram K. K. and Das, I. (2006) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 148-155.
- Black, M.B., Halanych, K.M., Maas, P.A.Y., Hoeh, W.R., Hashimoto, J., Desbruyere, D., Lutz, R.A., Vrijenhoek, R.C. (1997) Molecular systematics of vestimentiferan tubeworms from hydrothermal vents and cold-water seeps. *Marine Biology* 130,141–149.
- Bleidorn, C., Kruse, I., Albrecht, S. & Bartolomaeus, T. (2006) Mitochondrial sequence data expose the putative cosmopolitan polychaete *Scoloplos armiger* (Annelida, Orbiniidae) as a species complex. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 47-59.

- Breton, S.; Dufresne, F.; Desrosiers, G.; Blier, P.U. 2003. Population structure of two northern hemisphere polychaetes, *Neanthes virens* and *Hediste diversicolor* (Nereididae), with different life-history traits. *Marine Biology*, 142, 707–715.
- Burton, R.S. & Lee, B.N. (1994) Nuclear and mitochondrial gene genealogies and allozyme polymorphism across a major phylogeography break in the copepod *Tigriopus californicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 5197-5201.
- Cassai, C., Prevedelli, D. (1998) Reproductive effort, fecundity and energy allocation in two species of the genus *Perinereis* (Polychaeta : Nereididae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 34 (2-3), 125-131.
- Collado, G.A. & Mendez, M.A. (2012) Phylogenetic relationships and taxonomy of Altiplano populations of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae): inference from a multilocus approach. *Zoological Journal of the Linnean Society* 165, 795-808.
- Coutinho, M.C.L. (2013) Análises morfométrica e morfológica de *Perinereis anderssoni* Kinberg, 1866 e *Perinereis ponteni* Kinberg, 1866 (Polychaeta: Nereididae) na costa brasileira. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense, 119 p.
- Dakhama, A. & Dhainaut, A. (1985) Dégénérescence cellulaire intestinale chez l'Annélide Polychète *Perinereis cultrifera* au cours de l'épitoquie et après ablation du cerveau. *Reproduction Nutrition Development*, 25(3), 555-566.
- De León-González JA & Solís-Weiss V (1998) The genus *Perinereis* (Polychaeta: Nereididae) from Mexican littoral waters, including the description of three new species and the redescription of *P. anderssoni* and *P. elenacasoae*. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 111(3), 674-693.
- Defeo, O. (1996) Recruitment variability in sandy beach macrofauna: much to learn yet. *Revista Chilena de Historia Natural*, 69, 615-630.
- Drake, C.A., McCarthy, D.A. & von Dohlen, C.D. (2007) Molecular relationship and species divergence among *Phragmatopoma* spp. (Polychaeta: Sabellaridae) in the Americas. *Marine Biology* 150, 345-358.
- Eckelbarger, K.J., Grassle, J.P. (1987) Spermatogenesis, sperm storage and the systematic importance of comparative sperm morphology in nine species of *Capitella*, *Capitomastus* and *Capitellides* (Polychaeta: Capitellidae). *Marine Biology* 95, 415–429.
- Eklöf, J. (2010) Taxonomy and phylogeny of polychaetes. University of Gothenburg, Department of Zoology, PO Box 463, SE- 405 30 Göteborg, Sweden.

- Excoffier L. (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*. 13, 853-864.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- Excoffier L. & Lischer H. E. L., (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10, 564-567.
- Excoffier L.; Smouse P. E.; Quattro J. M., (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131:479– 491.
- Fauchald, K. (1977) The polychaete worms, definitions and keys to the orders, families and genera. Natural History Museum of Los Angeles County: Los Angeles, CA (USA) Science Series 28,1-188.
- Fauchald, K. & Jumars, P.A. (1979) The diet of worms: a study of Polychaete feeding guilds. *Oceanography and Marine Biology - An Annual Review*, 17, 193-284.
- Fauchald K & Rouse GW (1997) Polychaete systematics: Past and present. *Zoologica Scripta*, 26 (2): 71-138.
- Ferrari, A.L. & Riccomini, C. (1999) Campo de esforços Plio-Pleistocênico na Ilha de Trindade (Oceano Atlântico Sul, Brasil) e sua relação com a tectônica regional. *Revista Brasileira de Geociências*, 29(2), 195-202.
- Fischer, A. (1999) Reproductive and developmental phenomena in annelids: a source of exemplary research problems. *Hydrobiologia*, 402(1), 1-20.
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., Blaxter, M. (2002) Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11, 839-850
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5), 294-299.
- Fong, P.P. (1991) The effects of salinity, temperature and photoperiod on epitokal metamorphosis in *Neanthes succinea* (Frey-et-Leuckart) from San-Francisco Bay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 149(2), 177-190.

- Fong, P.P. (1993) Lunar control of epitokal swarming in the polychaete *Platynereis bicanaliculata* (Baird) from Central California. *Bulletin of Marine Science*, 52(3), 911-924.
- Freeland, J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutation against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915-925.
- Fu Y.X. & Li W.H. (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693-709.
- Futuyma, D. (1986) *Evolutionary biology*. 2^a ed. Sinauer Associates, Inc.
- Galetti Jr, P.M., Rodrigues, F.P., Solé-Cava, A.M., Miyaki, C.Y., Carvalho, D., Eizirik, E., Veasey, E.A., Santos, F.R., Farias, I.P., Vianna, J.A., Oliveira, L.R., Weber, L.I., Almeida-Toledo, L.F., Francisco, M.R., Redondo, R.A.F., Siciliano, S., Del Lama, S.N., Freitas, T.R.O., Hrbek, T., Molina, W.F. (2008) Genética da conservação brasileira. 244-274 pp. In: *Fundamentos de Genética da Conservação*. Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., Ribeirão Preto, SP, Editora SBG, 290p.
- Gambi, M.C., Castelli, A., Giangrande, A., Lanera, P., Prevedelli, D., Zunarelli, V.R. (1994) Polychaetes of commercial and applied interest in Italy: an overview. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle (France) Nouvelle Serie. Serie A. Zoologie*, 162, 593-601.
- Gamenick, I., Vismann, B., Grieshaber, M.K., Giere, O. (1998) Ecophysiological differentiation of *Capitella capitata* (Polychaeta). Sibling species from different sulfidic habitats. *Marine Ecology Progress Series* 175, 155-166.
- Glasby, C. (1993) Family revision and cladistic analysis of the Nereidoidea (Polychaeta: Phyllococida). *Invertebrate Taxonomy*, 7, 1551-1573.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate Maximum-Likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59(3), 307-321.
- Grant, W.S. & Bowen, B.W. (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89(5), 415-426.
- Grassle, J.F., Grassle, J.P. (1976) Sibling species in the marine pollution indicator *Capitella* (Polychaeta). *Science* 192,567-569.

- Goldstien, S.J., Schiel, D.R., Gemmell, N.J. (2006) Comparative phylogeography of coastal limpets across a marine disjunction in New Zealand. *Molecular Ecology*, 15, 3259-3268.
- Gusmão, J., Lazoski, C., Solé-Cava, A.M. (2005) Populations genetic structure of Brazilian shrimp species (*Farfantepenaeus* sp., *F. brasiliensis*, *F. paulensis* and *Litopenaeus schimitti*: Decapoda: Penaeidae). *Genetics and Molecular Biology*, 28(1), 165-171.
- Gusmão, J., Lazoski, C., Monteiro, F.A & Solé-Cava, A.M. (2006) Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. *Marine Biology* 149, 491-502.
- Halanych K.M. & Janosik, A.M. (2006) A review of molecular markers used for Annelid phylogenetics. *Integrative and Comparative Biology*, pp. 1–11. From the symposium “WormNet: Recent Advances in Annelid Systematics, Development, and Evolution”
- Harpending, H.C. (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66, 591-600.
- Hendry, A., Taylor, E., McPhail, J. (2002) Adaptive divergence and the balance between selection and gene flow: Lake and stream stickleback in the misty system. *Evolution* 56, 1199-1216.
- Hewitt, G. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907-913.
- Iannotta, M.A., Gambi, M.C. & Patti, F.P. (2009) Molecular evidence of intraspecific variability in *Lysidice ninetta* (Polychaeta: Eunicidae) in the Mediterranean Sea. *Aquatic Biology*, 6: 121-132.
- Iannotta, M.A., Patti, F.P., Ambrosino, M., Procaccini, G. & Gambi, M.C. (2007) Phylogeography of two species of *Lysidice* (Polychaeta, Eunicidae) associated to the seagrass *Posidonia oceanica* in the Mediterranean Sea. *Marine Biology*, 150: 1115-1126.
- Ipucha, M.C.; Santos, C.S.G.; Lana, P.C; Sbalqueiro, I.J. (2007) Cytogenetic characterization of seven South American species of Nereididae (Annelida: Polychaeta): implications for the karyotypic evolution. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 18(1), 27-38
- Jolly, M.T., Jollivet, D., Gentil, F., Thiébaud, E., Viard, F. (2005) Sharp genetic break between Atlantic and English Channel populations of the polychaete *Pectinaria koreni*, along the north coast of France. *Heredity*, 94, 23–32.
- Jolly, M.T., Viard, F., Gentil, F., Thiébaud, E. & Jollivet, D. (2006) Comparative phylogeography of two coastal polychaete tubeworms in the Northeast Atlantic supports shared history and vicariant events. *Molecular Ecology*, 15, 1841-1855.

- Jouzel, J., Masson-Delmotte, V., Cattani, O., Dreyfus, G., Falourd, S., Hoffmann, G., Minster, B., Nouet, J., Barnola, J.M., Chappellaz, J., Fischer, H., Gallet, J.C., Johnsen, S., Leuenberger, M., Loulergue, L., Luethi, D., Oerter, H., Parrenin, F., Raisbeck, G., Raynaud, D., Schilt, A., Schwander, J., Selmo, E., Souchez, R., Spahni, R., Stauffer, B., Steffensen, J.P., Stenni, B., Stocker, T.F., Tison, J.L., Werner, M., Wolff, E.W. (2007) Orbital and millennial Antarctic climate variability over the past 800.000 years. *Science*, 317, 739-796.
- Kingman, J. F. C. (1982) The coalescent. *Stochastic Processes and Their Applications* 13: 235–248.
- Kimura, M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626
- Kimura, M. (1969) The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to steady flux of mutations. *Genetics* 61, 893-903.
- Klautau, M., Russo, C.A.M., Lazoski, C., Boury-Esnault, N., Thorpe, J.P., Solé-Cava, A.M. (1999) Does cosmopolitanism result from over conservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla núcula*. *Evolution*, 53(5), 1414-1422.
- Knowlton, N. (1993) Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 189–216
- Knowlton, N. (2000) Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420, 73–90
- Kojima, S., Ohta, S., Yamamoto, T., Miura, T., Fujiwara, Y., Fujikura, K., Hashimoto, J. (2002) Molecular taxonomy of vestimentiferans of the western Pacific and their phylogenetic relationship to species of the eastern Pacific: II. Families Escarpiidae and Arcovestiidae. *Marine Biology*, 141, 57–64.
- Kojima, S., Ohta S, Yamamoto T, Yamaguichi T, Miura T, Fujiwara Y, Fujikura K, Hashimoto J. (2003) Molecular taxonomy of vestimentiferans of the western Pacific, and their phylogenetic relationship to species of the eastern Pacific III. Alasia-like vestimentiferans and relationships among families. *Marine Biology*, 142, 625–35.
- Last, K.S. & Olive, P.J.W. (1999) Photoperiodic Control of Growth and Segment Proliferation by *Nereis (Neanthes) virens* in Relation to State of Maturity and Season. *Marine Biology*, 227(1), 1-9.
- Lana, P.C. (1984) Anelídeos Poliquetas Errantes do Litoral do Estado do Paraná. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 274 p.
- Lawrence, A.J. & Soame, J.M. (2009) The endocrine control of reproduction in Nereidae: a new multi-hormonal model with implications for their functional role

in a changing environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society – Series B*, 364(1534), 3363-3376.

- Lazoski, C., Solé-Cava, A.M., Boury-Esnault, N., Klautau, M., Russo, C.A.M. (2001) Cryptic speciation in a high gene flow scenario in the oviparous marine sponge *Chondrosia reniformis*. *Marine Biology*, 139, 421-429.
- Lazoski, C., Gusmão, J., Boudry, P., Solé-Cava, A.M. (2011) Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. *Marine Ecology Progress Series* 426, 197–212.
- Lessa, E.P., Cook, J.A., Patton, J.L. (2003) Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 10331-10334.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Linke-Gamenick, I., Vismann, B., Forbes, V.E. (2000) Effects of fluoranthene and ambient oxygen levels on survival and metabolism in three sibling species of *Capitella* (Polychaeta). *Marine Ecology Progress Series*, 194,169–177.
- Liu, H., Liu, M., Ge, S. Wang, Q., Yu, D., Guan, S. (2012) Population structuring and historical demography of a common clam worm *Perinereis aibuhitensis* near the coasts of Shandong Peninsula. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44, 70-78.
- Maltagliati, F., Casu, M., Castelli, A. (2004) Morphological and genetic evidence supports the existence of two species in the genus *Ophelia* (Annelida, Polychaeta) from the Western Mediterranean. *Biological Journal of the Linnean Society*, 83,101–113.
- Maltagliati, F., Peru, A.P., Casu, M., Rossi, F., Lardicci, C., Curini-Galletti, M., Castelli, A. (2000) Is *Syllis gracilis* (Polychaeta: Syllidae) a species complex? An allozyme perspective. *Marine Biology*, 136, 871–879.
- Manchenko, G.P., Radashevsky, V.I. (2002) Genetic differences between two sibling sympatric *Dipolydora species* (Polychaeta: Spionidae) from the Sea of Japan, and a new species description. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 82,193–199.
- Martins, F.M. & Domingues, M.V. (2011) Filogeografia, p. 137-150. In: Carvalho, C. J. B. & E. A. B. Almeida (Orgs). Biogeografia da América do Sul - Padrões & Processos. Roca, São Paulo.

- Mayr, E. & Ashlock, P.D. (1991) Principles of Systematic Zoology. New York: McGraw-Hill. 2nd ed.
- Mazurkiewicz, M. (1975) Larval Development and habitats of *Laeonereis culveri* (Webster) (Polychaeta: Nereidae). *Biological Bulletin*, 149 (1), 186-204.
- Mendez, N., Linke-Gamenick, I., Forbes, V.E. (2000) Variability in reproductive mode and larval development within the *Capitella capitata* species complex. *Invertebrates Reproduction & Development*, 38, 131–142.
- Miyaki, C. Y. (2009) Filogeografia e a descrição da diversidade genética da fauna brasileira. Megadiversidade Vol 5 N° 1-2 Dez.
- Neiman, M. & Lively, C.M. (2004) Pleistocene glaciation is implicated in the phylogeographical structure of *Potamopyrgus antipodarum*, a New Zealand snail. *Molecular Ecology*, 13, 3085-3089.
- Nóbrega, R., Solé-Cava, A.M., Russo, C.A.M. (2004) High genetic homogeneity of an intertidal marine invertebrate along 8000 km of the Atlantic coast of the Americas. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 303, 173-181.
- Nunes, F., Norris, R.D., Knowlton, N. (2009) Implications of isolation and low genetic diversity in peripheral populations of an amph-Atlantic coral. *Molecular Ecology*. 18, 4283-4297.
- Nygren, A., Eklöf, J. & Pleijel, F. (2009) Artic-boreal sibling species of *Paranaitis* (Polychaeta, Phyllodocidae). *Marine Biology Research* 5(4), 315-327.
- Nygren, A., Pleijel, F. (2010) From one to ten in a single stroke – resolving the European *Eumida sanguinea* (Phyllodocidae, Annelida) species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. In Press.
- Olive, P.J.W. (1994) Polychaeta as a world resource: a review of patterns of exploitation as sea angling baits and the potential for aquaculture based production. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle (France) Nouvelle Serie. Serie A. Zoologie, 162, 603–610.
- Oyarzun, F.X., Mahon, A.R., Swalla, B.J. (2010) Phylogeography and reproductive variation of the poecilogonous polychaete *Boccardia proboscidea* (Annelida: Spionidae) along the West Coast of North America. *Evolution & Development*, 13,489-503.
- Palacio, F. J., (1982) Revisión Zoogeográfica marina del sur del Brasil. *Boletim do Instituto Oceanografico*. 31(1), 69-92.
- Palumbi, S.R. (1992) Marine Speciation on a small planet. *Tree*, 7, 114-118.
- Palumbi, S.R. (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics*, 25, 547-572.

- Palumbi, S.R., Martin, A.P., Romano, S., Mcmillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G. (1991) The simple fool's guide to PCR. *Department of Zoology Special Publication*, University of Hawaii, Honolulu, HI.
- Paradis, E. (2010) Pegas: an R package for populations genetics with an integrated modular approach. *Bioinformatics* 26(3), 419-420.
- Patti, F.P. & Gambi, M.C. (2001) Phylogeography of the invasive polychaete *Sabella spallanzanii* (Sabellidae) based on the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 2 (ITS2) of nuclear rDNA. *Marine Ecology Progress Series*, 215: 169-177.
- Peixoto, A.J.M. (2013) Biologia reprodutiva e dinâmica populacional de *Perinereis anderssoni* Kinberg, 1866, na região entremarés da Praia de Itaipu, Niterói, RJ. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense, 78p.
- Plane, S. & 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. *Molecular Ecology* 11, 1616-1524.
- Pleijel, F. (2001) *Nereididae Johnston, 1865*. In "Polychaetes" (Eds) Rouse GW & Pleijel F, Oxford University Press: Oxford, UK, 96-98p.
- Plouviez, S., Shank, T.M., Faure, B. (2009) Comparative phylogeography among hydrothermal vent species along the East Pacific Rise reveals vicariant processes and population expansion in the South. *Molecular Ecology*, 18, 3903-3917.
- Plouviez, S., Guen, D.L., Lecompte, O., Lallier, F.H., Jolliver, D. (2010) Determining gene flow and the influence of selection across the equatorial barriers of the East Pacific Rise in the tube-dwelling polychaete *Alvinella pompejana*. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 220.
- Prevedelli, D. & Simonini, R. (2003) Life cycles in brackish habitats: adaptive strategies of some polychaetes from the Venice lagoon. *Oceanologica Acta*, 26(1), 76-84.
- Pybus, O.G. & Shapiro, B. (2009) Natural selection and adaptation of molecular sequences. 407-418 pp. In: Lemey, P., Salemi, M. & Vandamme, A. (eds). *The Phylogenetics Handbook*. Cambridge: Cambridge University Press, 723 p.
- R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing [computer program]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2007) Tracer v1.4. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

- Rees, S.W. & Olive, P.J.W. (2000) Manipulating the Time of Maturation and Competence for Fertilization and Development of Oocytes from the Semelparous Polychaete *Nereis (Neanthes) virens* Sars. *Invertebrate Reproduction and Development*, 38(2), 81-84.
- Reid DG, Lal K, Mackenzie-Dodds J *et al.* (2006) Comparative phylogeography and species boundaries in *Echinolittorina* snails in the central Indo-West Pacific. *Journal of Biogeography*, 33, 990–1006.
- Rocha, L.A., Bass, A.L., Robertson, R., Bowen, B.W. (2002) Adult habitat preferences, larval dispersal, and the comparative phylogeography of three Atlantic surgeonfishes (Teleostei: Acanthuridae). *Molecular Ecology*, 11, 234-252.
- Rocha, L.A., Rocha, C.R., Robertson, D.R., Bowen, B.W. (2008) Comparative phylogeography of Atlantic reef fishes indicates both origin and accumulation of diversity in the Caribbean. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 157.
- Rodrigues, A.M., Pires, A., Mendo, S. & Quintino, V. 2009. *Diopatra neapolitana* and *Diopatra marocensis* from the Portuguese coast: morphological and genetic comparison. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 85: 609-617.
- Rogers, A. R., & Harpending, H. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9(3), 552-69.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- Rouse, G.W. (2000). Bias? What bias? The evolution of downstream larval-feeding in animals. *Zoologica Scripta*, 29(3), 213-236.
- Rouse, G.W., Pleijel, F. (2001) Polychaetes. Oxford University Press, London.
- Russo, C. A. M., A. M. Solé-Cava & J. P. Thorpe, 1994. Population structure and genetic variation in two tropical sea anemones (Cnidaria, Actinidae) with different reproductive strategies. *Mar. Biol.* 119: 267–276.
- Salazar-Vallejo, S.I., Londoño-Mesa, M.H. (2004) Lista de especies y bibliografía de poliquetos (Polychaeta) del Pacífico Oriental Tropical. *Anales del Instituto de Biología*, 75(1), 9-97.
- Santos, C.S.G. (2007). Nereididae from Rocas Atoll (North-East, Brazil). *Arquivos do Museu Nacional*, 65(3), 369-380.
- Santos, C.S.G.; Pleijel, F.; Lana, P.; Rouse, G.W. (2005) Phylogenetic relationships within Nereididae (Annelida: Phyllodocta). *Invertebrates Systematics*, 19, 557-576.

- Santos, C.S.G; Steiner, T.M (2006) Família Nereididae. pp. 121-133. In: Amaral, A. C. Z., Rizzo, A.E. & Arruda, E.P. Manual de Identificação dos Invertebrados Marinhos da Região Sudeste-Sul do Brasil-vol1. Edusp. 287p
- Schüller, M. (2007). Biodiversity and Zoogeography of the Polychaeta (Annelida) in the deep Weddell Sea (Southern Ocean, Antarctica) and adjacent deep-sea basins. Dissertation on Evolutionary Ecology and Biodiversity of Animals. Ruhr-University, Bochum, Germany, 257 p.
- Schulze, S.R., Rice, S.A., Simon, J.L., Karl, S.A. (2000) Evolution of poecilogony and the biogeography of North American populations of the polychaete *Streblospio*. *Evolution* 54, 1247–1259.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651–701.
- Solé-Cava, A.M., Klautau, M., Boury-Esnault, N., Borojecic, R., Thorpe, J.P. (1991) Genetic evidence for cryptic speciation in allopatric populations of two cosmopolitan species of the calcareous sponge genus *Clathrina*. *Marine Biology*, 111, 381-386.
- Slaktin, M. (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236, 787-792.
- Slatkin, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 47, 264-279.
- Slatkin, M. & Hudson. R.R. (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129, 555-562.
- Spalding, M.D., Fox, H.E., Allen, G.R., Davidson, N., Ferdaña, Z.A., Finlayson, M., Halpern, B.S., Jorge, M. A., Lombana, A., Lourie, S. A., Martin, K. D., McManus, E., Molnar, J., Recchia, C. A., Robertson, J. (2007) Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience* 57 (7), 573-583.
- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Tajima F., (1996) The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics* 143: 1457-1465.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,

evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.

Templeton, A.R., Boerwinkle, E., Sing, C.F. (1987) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117, 343-351.

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673- 4680.

Waters, J.M. & Roy, M.S. (2003) Marine biogeography of southern Australia: phylogeographical structure in a temperate sea-star. *Journal of biogeography*, 30, 1787-1296.

Westheide, W. & Hass-Cordes, E. (2001) Molecular taxonomydescription of a cryptic *Petitia* species (Polychaeta: Syllidae) from the island of Mahé (Seychelles, Indian Ocean) using RAPD markers and ITS2 sequences. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 39, 103–111.

Wilson, R.S. (2000) Family Nereididae. In: Beesley, P.L., Ross, G.J.B., Glasby, C.J. (eds). *Polychaetes & Allies: The Southern Synthesis*. Fauna of Australia. Vol. 4A Polychaeta, Myzostomida, Pogonophora, Echiura & Sipuncula. CSIRO Publishing, Melbourne, 138-141.

Wilson, W.H. (1991) Sexual Reproductive modes in polychaetes: classification and diversity. *Bulletin of Marine Science*, 48(2), 500-516.

Wörheide, G., Epp, L.S., Macis, L. (2008) Deep genetic divergences among Indo-Pacific populations of the coral reef sponge *Leucetta chagosensis* (Leucettidae): Founder effects, vicariance, or both? *BMC Evolutionary Biology*, 8(24).

Worms (2011) World Polychaeta database. Accessed through: World Register of Marine Species <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=339204> on 2011-04-03.

Wright S. (1978) Evolution and the genetics of populations. *The University of Chicago Press*, London.

Virgilio, M., Abbiati, M. (2004) Habitat discontinuity and genetic structure in populations of the estuarine species *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 61, 361–367.

- Virgilio M, Maci S, Abbiati M (2005) Comparisons of genotypetolerance responses in populations of *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae) exposed to copper stress. *Marine Biology*, 147, 1305–1312.
- Virgilio, M. & Abbiati, M. (2006) Temporal changes in the genetic structure of intertidal populations of *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae). *Journal of Sea Research*, 56, 53–58.
- Virgilio, M., Backeljau, T., Abbiati, M. (2006) Mitochondrial DNA and allozyme patterns of *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae): the importance of small scale genetic structuring. *Marine Ecology Progress Series*, 326, 157–165.
- Virgilio, M., Fauvelot, C., Costantini, F., Abbiati, M. & Backeljau, T. (2009) Phylogeography of the common ragworm *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae) reveals cryptic diversity and multiple colonization events across its distributions. *Molecular Ecology*, 18, 1980-1994.
- Zanol, J., Halanych, K.M., Struck, T.H., Fauchald, K. (2010) Phylogeny of the bristle worm family Eunicidae (Eunicida: Annelida) and the phylogenetic utility of noncongruent 16S, COI and 18S in combined analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55(2), 660-676.