

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Instituto de Biologia**

**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva**

**Victor Corrêa Seixas**

**Conectividade genética de duas espécies de poliqueta, *Hermodice carunculata* e *Timarete punctata*, ao longo do Atlântico Sul Ocidental e Mar do Caribe**

**Orientador: Paulo Cesar de Paiva**

**Co-orientadora: Joana Zanol Pinheiro da Silva**

**Rio de Janeiro**

**2013**

**Victor Corrêa Seixas**

**Conectividade genética de duas espécies de poliqueta, *Hermodice carunculata* e *Timarete punctata*, ao longo do Atlântico Sul Ocidental e Mar do Caribe**

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 à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

**Orientador: Paulo Cesar de Paiva**

**Co-orientadora: Joana Zanol Pinheiro da Silva**

**Rio de Janeiro**

**2013**

**Conectividade genética de duas espécies de poliqueta, *Hermodice carunculata* e *Timarete punctata*, ao longo do Atlântico Sul Ocidental e Mar do Caribe**

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado por:

Prof. \_\_\_\_\_

Dr. Paulo Cesar de Paiva (UFRJ) – Orientador

Prof. \_\_\_\_\_

Dr.<sup>a</sup>. Michelle Klautau (UFRJ) – Titular interno

Prof. \_\_\_\_\_

Dr.<sup>a</sup>. Daniela Maeda Takiya (UFRJ) – Titular interno

Prof. \_\_\_\_\_

Dr.<sup>a</sup>. Carla Zilberberg (UFRJ) – Titular externo

Prof. \_\_\_\_\_

Dr. Carlos Renato Rezende Ventura (UFRJ) – Suplente interno

Prof. \_\_\_\_\_

Dr. Edson Pereira da Silva (UFF) – Suplente externo

Rio de Janeiro

2013

SEIXAS, Victor Corrêa

Conectividade genética de duas espécies de poliqueta, *Hermodice carunculata* e *Timarete punctata*, ao longo do Atlântico Sul Ocidental e Mar do Caribe/ Victor Corrêa Seixas. Rio de Janeiro, UFRJ, Instituto de Biologia, 2013.

xi, 96 pag.

Orientador: Paulo Cesar de Paiva.

Co-orientadora: Joana Zanol Pinheiro da Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, 2013.

1. Filogeografia 2. Genética de populações 3. Polychaeta 4. Amphinomidæ 5.

Cirratulidæ 6. DNA mitocondrial 7. Citocromo oxidase I 8. 16S ribossomal

I. Paiva, Paulo Cesar de. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva. III. Título.

## **Agradecimentos**

Ao Paulo Cesar de Paiva, pela orientação acadêmica ao longo desses cinco anos de convivência que me permitiram aprender sobre diversos ramos da Biologia, e também pelo apoio e amizade.

A Prof.<sup>a</sup> Joana Zanol pelas conversas, dicas, sugestões e conselhos, que ajudaram a aumentar o meu conhecimento sobre evolução e técnicas de laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Polychaeta, Carlos, Gustavo, Rominho, Elínia, Viviane, Raquel, Ricardo, Nury, Bianca, Monique, Natália, Luciana e Dáphine pelas muitas horas de convivência como almoços, cafés, conversas, “China”, churrascos e confraternizações.

Ao Prof.<sup>o</sup> Antonio Mateo Solé-Cava, por disponibilizar reagentes e equipamentos sempre que necessário.

As pessoas (Rominho, Serginho, Paulinho, Emílio, Leandro, Fernanda, Raquel, André e outros) que coletaram os indivíduos ao longo das localidades amostradas.

A minha querida esposa, Camilly por ser uma fonte inesgotável de carinho, cuidado e amor.

A minha família, Eduardo, Dirce, Rachel e Daniela, pelo apoio e por de fato serem uma família.

A todas as pessoas e instituições que contribuem para manter a Reserva Biológica do Atol das Rocas e a ótima estrutura para a realização de pesquisas científicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

As agências financeiras, CNPq, CAPES e FAPERJ, pelo financiamento do projeto, pela bolsa de mestrado, reagentes e equipamentos.

## Resumo

A conectividade entre populações animais de diferentes regiões é fundamental não só para a manutenção das espécies, mas também das populações locais. O que viabiliza tal conexão é a capacidade intrínseca das espécies de se dispersarem juntamente com as características ambientais. Do ponto de vista genético, a constante troca gênica entre as localidades possibilita um aumento na diversidade genética e diminui os efeitos da deriva gênica. Ecologicamente, a chegada de migrantes pode contribuir para o reestabelecimento de populações que tenham passado por distúrbios ambientais. Sendo assim, a estimativa de parâmetros populacionais como o fluxo gênico, pode fornecer informações importantes para o entendimento da evolução e estruturação das populações naturais. Nos oceanos, apesar da aparente continuidade física entre as localidades, diversos processos bióticos e abióticos podem impedir que estes funcionem como sistemas abertos. Sendo assim, nos organismos marinhos bentônicos o período larval representa a principal oportunidade para dispersões de longa distância, apesar de fatores menos expressivos poderem auxiliar na dispersão. Dentre a fauna marinha bentônica da região Caribenha, da costa do Brasil e das ilhas oceânicas do oeste do Atlântico Sul, os processos oceanográficos podem afetar de diferentes formas a distribuição das espécies. Para verificar a conectividade genética entre duas ilhas oceânicas do Atlântico Sul Ocidental (Atol das Rocas e Arquipélago de São Pedro e São Paulo), a costa do Brasil (Bahia) e o Mar do Caribe (Bocas del Toro e San Blás – Panamá), foram utilizadas duas espécies de poliqueta, *Hermodice carunculata* (Amphinomidae) e *Timarete punctata* (Cirratulidae). Além disso, foi avaliado o papel de fatores ambientais como isolamento geográfico, presença de mar profundo e o padrão das correntes superficiais na conectividade e estruturação genética. Para responder estas questões foram utilizadas sequências de dois marcadores mitocondriais (COI e 16S) e um nuclear (ITS), sendo as deste último descartadas devido a presença de múltiplas cópias. Para verificar a identidade dos indivíduos e auxiliar na definição a priori das populações, os dados foram submetidos a análises filogenéticas (Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança). Após calcular os parâmetros de diversidade foram estimadas, a estruturação genética entre as populações (Rede de haplótipos,  $F_{ST}$  e AMOVA), as mudanças demográficas históricas (testes de neutralidade, análise de distribuição das diferenças e *Bayesian Skyline Plot*), o tamanho populacional efetivo atual e o fluxo gênico assimétrico. Para *T. punctata*, devido a baixa quantidade de

polimorfismo encontrada entre os indivíduos não foi possível chegar a conclusões acerca das questões levantadas. Os resultados para *H. carunculata* confirmam a sua ampla distribuição e indicam que historicamente houve um aumento populacional. Além disso, a baixa estruturação genética e os elevados valores de fluxo gênico corroboram a hipótese de que as localidades estão altamente conectadas. O isolamento geográfico não impede que as populações de *H. carunculata* amostradas mantenham um alto fluxo gênico. Já a presença do mar profundo por uma longa escala espacial, parece limitar, de forma sutil, o fluxo gênico entre as localidades, especialmente o Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Entretanto tal barreira não aparenta ser suficiente para causar a especiação por alopatria. O padrão das correntes marinhas superficiais referentes a estas regiões exercem um importante papel na determinação da direção do fluxo gênico.

Palavras-chave: Filogeografia, genética de populações, Polychaeta, Amphinomidae, Cirratulidae, Citocromo oxidase I e 16S rDNA.

## Abstract

The connectivity among animal populations from different regions is essential for the maintenance of species and local populations. It is enabled by the intrinsic ability of species to disperse in addition to environmental features. Within a genetic framework, constant gene flow between populations enables an increase in genetic diversity and decreases the effects of genetic drift. Ecologically, immigrants contribute for population re-establishment following environmental disturbances. Thus, estimations of population parameters, such as gene flow, can provide important information in order to understand evolution and natural populations structure. In oceans, despite the apparent lack of physical barriers, several biotic and abiotic processes prevent them to function as open systems. In benthic marine organisms, larval period is the main opportunity for long distances dispersal, although other factors, not as important, may also influence dispersal abilities. Among the benthic marine fauna from Caribbean region, Brazilian coast and oceanic island from western South Atlantic, oceanographic processes play different roles in species distribution. In order to verify the connectivity between two oceanic islands in western South Atlantic (Atol das Rocas e Arquipélago de São Pedro e São Paulo), the Brazilian coast (Bahia) and Caribbean Sea (Bocas del Toro e San Blás – Panama) I studied two polychaete species, *Hermodice carunculata* (Amphinomidae) e *Timarete punctata* (Cirratulidae). I also evaluated the role of environmental factors, such as geographic distance, the presence of deep sea and the pattern of superficial marine currents in genetic connectivity and population structure. To address these questions, I used sequences of two mitochondrial (COI and 16S) and one nuclear marker (ITS), however ITS sequences were discarded due to the amplification of multiples copies. Species status and *a priori* population definitions were checked in, phylogenetic trees estimated by Bayesian inference and Maximum Likelihood optimization. After estimating diversity parameters, I evaluated genetic structure between populations (Haplotype network,  $F_{ST}$  and AMOVA), changes in demographic history (neutrality test, mismatch distribution and Bayesian Skyline Plot), actual effective population size and the asymmetric gene flow. In *T. punctata*, the low amount of polymorphism between the specimens, did not allow me to take any conclusions on the proposed questions. The results for *H. carunculata* confirmed the wide spread distribution and indicated a recent occurrence of a population expansion. Moreover, the small genetic structure and the high values of gene flow observed,

corroborated the hypothesis that these regions are highly connected. Geographic distance between *H. carunculata* populations does not prevent the maintenance of a high gene flow. The presence of long stretch with deep sea seems to be a subtle limit to the connectivity between populations, in special to those in Arquipélago de São Pedro e São Paulo. However, such barrier does not appear to be enough to promote allopatric speciation. The pattern of superficial marine currents from these regions has an important role in determination of gene flow direction.

Key-words: Phylogeography, population genetics, Polychaeta, Amphinomidae, Cirratulidae, Citocromo oxidase I and 16S rDNA

## Sumário

1. Introdução .....	1
1.1. Conectividade genética e estruturação populacional.....	1
1.2. Correntes superficiais no Oceano Atlântico Sul e Mar do Caribe.....	4
1.3. Conectividade: Mar do Caribe × Atlântico Sul e Ilhas Oceânicas × Costa do Brasil .....	7
1.4. Estudos moleculares com a fauna de poliqueta.....	9
1.5. <i>Hermodice carunculata</i> (Pallas, 1766).....	10
1.6. <i>Timarete punctata</i> (Grube, 1859).....	12
2. Objetivos .....	16
2.1. Objetivos Gerais.....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. Material e Métodos .....	17
3.1. Coleta das amostras.....	17
3.2. Extração de DNA .....	18
3.3. Amplificação e sequenciamento de DNA .....	19
3.3.1. Citocromo oxidase subunidade I (COI).....	20
3.3.2. 16S ribossomal (16S) .....	20
3.3.3. Espaçadores internos transcritos (ITS).....	21
3.4. Edição e alinhamento das sequências.....	22
3.5. Análise filogenética.....	23
3.5.1. <i>Hermodice carunculata</i> .....	24
3.5.2. <i>Timarete punctata</i> .....	24
3.6. Variabilidade, diversidade molecular e rede de haplótipos.....	25
3.7. Estruturação populacional e distância geográfica .....	25
3.8. Expansão populacional.....	26
3.9. Estimativa de fluxo gênico e tamanho populacional efetivo.....	31
4. Resultados .....	33
4.1. <i>Hermodice carunculata</i> .....	33
4.1.1. Análise filogenética.....	33

4.1.2. Variabilidade, diversidade molecular e rede de haplótipos.....	36
4.1.3. Estruturação populacional.....	40
4.1.4. Expansão populacional.....	44
4.1.5. Estimativa de fluxo gênico e tamanho populacional efetivo.....	49
4.1.6. Isolamento por distância (teste de Mantel).....	51
4.2. <i>Timarete punctata</i> .....	52
4.2.1. Análise filogenética.....	52
4.2.2. Variabilidade, diversidade molecular e rede de haplótipos.....	53
4.2.3. Estruturação populacional.....	56
4.2.4. Expansão populacional.....	58
4.2.5. Estimativa de fluxo gênico e tamanho populacional efetivo.....	58
4.2.6. Isolamento por distância (teste de Mantel).....	59
5. Discussão.....	60
5.1. Marcadores moleculares.....	60
5.2. <i>Hermodice carunculata</i> .....	61
5.2.1. <i>H. carunculata</i> : uma espécie com ampla distribuição geográfica.....	61
5.2.2. Sobre a história demográfica.....	63
5.2.3. Fraca estruturação populacional como resultado da alta conectividade genética.....	69
5.2.4. Fluxo gênico e as correntes marinhas superficiais .....	73
5.3. <i>Timarete punctata</i> .....	75
5.3.1. Quanto a existência de espécies crípticas.....	75
5.3.2. Quanto aos baixos valores de variabilidade genética.....	76
5.3.3. Quanto a forma de dispersão.....	77
6. Conclusões .....	79
7. Referências bibliográficas.....	81

## 1. Introdução

### 1.1. Conectividade genética e estruturação populacional

O grau de conectividade entre diferentes populações tem papel fundamental para o entendimento da dinâmica populacional, estruturação gênica e biogeografia das espécies. Sendo assim, tem implicações profundas na gestão de recursos (e.g. estoques de peixes), planejamento de reservas e propagação de espécies invasoras (Cowen *et al.*, 2006). A conectividade também interfere nos padrões de distribuição espaço-temporal das espécies, ajuda no restabelecimento de populações locais após estas sofrerem distúrbios, possibilita as trocas genéticas e contribui para a persistência das populações, principalmente as isoladas (Trembl *et al.*, 2008). Outra vantagem é a diminuição dos efeitos da deriva gênica, pois do ponto de vista evolutivo, duas populações que mantenham um fluxo gênico constante se comportam como uma única população, ou seja, tem um tamanho populacional maior (Nunes *et al.*, 2011).

De forma geral, a conectividade pode ser definida como a extensão na qual as populações de uma determinada espécie são ligadas pela troca de larvas, recrutas, jovens ou adultos, ao longo de toda distribuição (Palumbi, 2003), ou simplesmente como a troca de indivíduos entre populações marinhas (Trembl *et al.*, 2008). Lowe & Allendorf (2010), atentam para a importância da distinção da conectividade genética (1) e demográfica (2), sendo a primeira definida como o nível em que o fluxo gênico afeta os processos evolutivos dentro das populações e a segunda como o nível em que o crescimento populacional e as taxas vitais são afetados pela migração.

O conceito de população, dentro da definição de conectividade genética, pode ser entendido evolutivamente como um conjunto de indivíduos da mesma espécie, que estão próximos o suficiente para permitir que todos do grupo tenham as mesmas chances de acasalar com qualquer outro indivíduo deste mesmo grupo (Waples &

Gaggiotti, 2006). Na definição de conectividade demográfica, o conceito pode ser entendido do ponto de vista ecológico, onde uma população seria um grupo de indivíduos da mesma espécie que coexistem no mesmo espaço e tempo e podem interagir uns com os outros (Waples & Gaggiotti, 2006). O conceito ecológico de população costuma ser utilizado para a definição *a priori* das populações em estudos genéticos, exceto nos casos onde as populações são definidas *a posteriori* utilizando métodos de agrupamento dos genótipos individuais (e.g. Pritchard *et al.*, 2000).

A avaliação da conectividade demográfica é de fundamental importância para o estudo da biologia populacional (Nichols *et al.*, 2000), porém requer a obtenção de dados que nem sempre são facilmente obtidos, como taxa de crescimento, sobrevivência, recrutamento, imigração e emigração (Lowe & Allendorf, 2010). Uma alternativa a estas dificuldades é a estimativa da conectividade genética, baseada nas informações de fluxo gênico (Awise, 2004; Freeland, 2005). Entretanto a inferência da conectividade demográfica baseada exclusivamente em padrões de conectividade genética pode gerar falsas avaliações (Lowe & Allendorf, 2010). Porém, se os limites de extrapolação estiverem bem definidos, o fluxo gênico pode dar informações importantes para o entendimento da evolução e estruturação das populações naturais (Hellberg *et al.*, 2002; Postma & Noordwijk, 2005).

Enquanto que a conectividade genética causa a homogeneização das populações, a fragmentação geográfica possibilita o acúmulo de diferenças genéticas (Schunter *et al.*, 2011), e este acúmulo pode ser percebido através de descontinuidades no padrão genético entre diferentes populações (Palumbi, 2003). O padrão geográfico de diferenciação genética pode variar de acordo com a magnitude da taxa de migração e do tamanho populacional efetivo, resultando em diferentes padrões de estruturação populacional, como: populações fechadas; com forte estruturação junto a uma barreira

geográfica; estruturadas em clines geográficos; com fluxo gênico *stepping stone*; *chaotic patchiness* (migrantes de diferentes origens ao longo do tempo); e abertas (Hellberg *et al.*, 2002).

O que viabiliza a conexão entre populações é a capacidade intrínseca das espécies de se dispersarem juntamente com as características ambientais (Cowen *et al.*, 2000). Nos oceanos, apesar da aparente continuidade física entre as localidades, um alto grau de conectividade nem sempre é encontrado, visto que diversos processos bióticos e abióticos podem impedir que estes funcionem como sistemas abertos, no qual as espécies se dispersam por longas distâncias (Palumbi, 1994; Cowen *et al.*, 2006). Ainda assim, é possível encontrar organismos marinhos bentônicos sésseis, ou com mobilidade relativamente baixa, que podem ter suas populações homogêneas ao longo de uma ampla escala espacial, como no caso dos ouriços do gênero *Tripneustes* (Lessios *et al.*, 2003), poliquetos do gênero *Eurythoe* (Barroso *et al.*, 2010), os gastrópodes *Nerita plicata* (Crandall *et al.*, 2008) e *Conus ebraeus* (Duda & Lessios, 2009), e alguns peixes recifais (Lessios & Robertson, 2006).

Dentre os organismos bentônicos com pouca mobilidade na fase adulta, o período larval representa a principal oportunidade para dispersões de longa distância (Cowen *et al.*, 2006). Entretanto, longos eventos de dispersão podem ocorrer mesmo em espécies sem o estágio larval (ou com período curto), onde o adulto é levado pelas correntes marítimas (*drifiting*) ou por substratos artificiais ou naturais (*rafting* ou *hitchhiking*) (Winston, 2012). Porém uma pequena fração dos organismos parece suportar as condições desses eventos (Cowen *et al.*, 2006) e mesmo no caso de sobreviverem, a baixa probabilidade de recrutamento e a seleção contra migrantes podem impedir a ocorrência de fluxo gênico (Palumbi, 2003). Sendo assim é comum encontrar populações relativamente próximas com um grau de estruturação elevado

(Jolly *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2005; Palumbi & Warner, 2003; Wörheide *et al.*, 2008, Virgilio *et al.*, 2009; Hoffman *et al.*, 2011; Karl & Hayes, 2012) ou até mesmo espécies irmãs (Gusmão *et al.*, 2006; Kawauchi & Giribet, 2010; Nygren *et al.*, 2010a; Xavier *et al.*, 2011; Heyden *et al.*, 2011; Boissin *et al.*, 2011; Schulze *et al.*, 2012).

## 1.2. Correntes superficiais no Oceano Atlântico Sul e Mar do Caribe

Nos ecossistemas marinhos, os processos oceanográficos afetam diretamente a conectividade e os padrões de fluxo gênico, que acabam por influenciar a estruturação genética das populações (Schunter *et al.*, 2011). Entre estes processos, os principais são os padrões predominantes de correntes costeiras e globais, a formação de vórtices e descontinuidades de circulação e as características físicas das correntes, como velocidade e direção.

Dentre as principais correntes do Atlântico Sul, se destaca a Corrente de Benguela (CBe), formada por parte da Corrente do Atlântico Sul (CAS) e giros da Corrente das Agulhas (CA) (Stramma & England, 1999). A CBe permanece constante por aproximadamente todo ano, transportando para o sudoeste do Atlântico uma vazão de água entre 12 a 15 Sv ( $1\text{Sv} = 10^6 \text{ m}^3/\text{s}$ ), que pode atingir valores maiores que 25 Sv. Esta faz com que parte das águas quentes e mais salinas do Oceano Índico sejam transferidas para o Atlântico Sul, podendo inclusive alcançar a Corrente do Brasil (CBr) (Campos *et al.*, 1999).

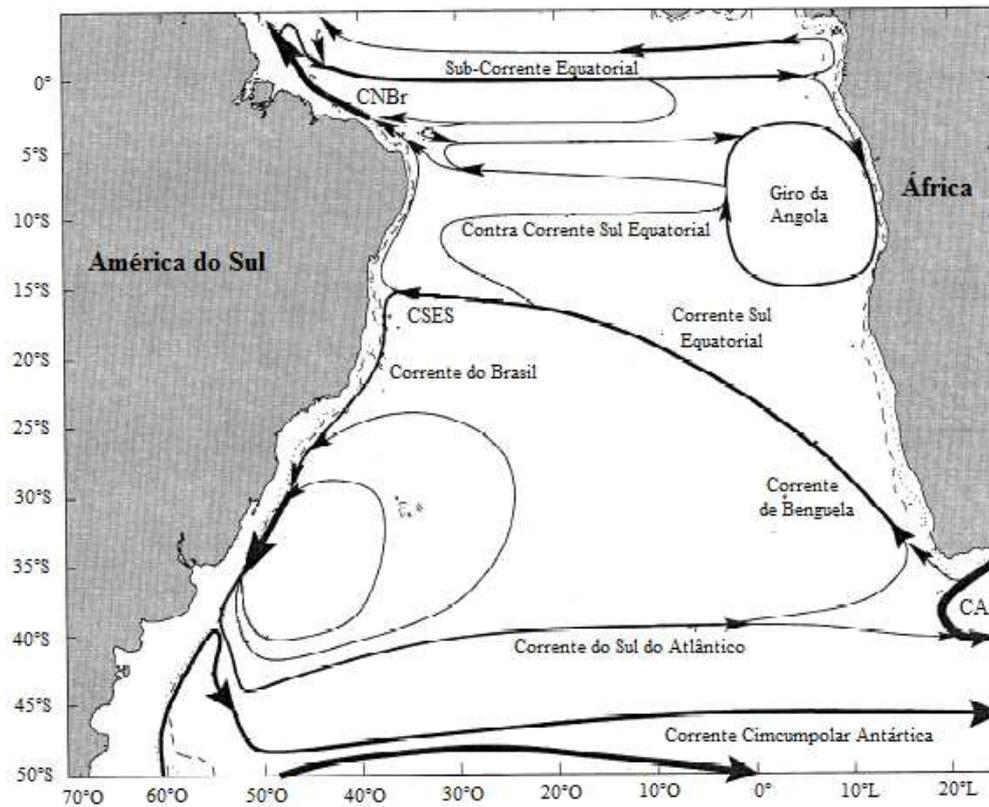
A CBe alimenta a Corrente Sul Equatorial (CSE), que durante o verão austral pode carregar aproximadamente 30 Sv (Campos *et al.*, 1999). Depois de se bifurcar próximo a  $30^\circ \text{ O}$  e  $15^\circ \text{ S}$ , a CSE forma a Contra Corrente Sul Equatorial (CCSE) e a Corrente Sul Equatorial do Sul (CSES) (Fig. 1.1). Esta segunda se divide na costa brasileira ( $\sim 10^\circ \text{ S}$ ), formando ao sul a CBr, e ao norte a Corrente Norte do Brasil

(CNBr) (Fig.1.1) (Stramma, 1991). Inicialmente com uma vazão de 4 Sv (Campos *et al.*, 1999), a CBr (Fig. 1.2A) não se mantém constante ao longo de sua área de atuação devido a presença do Banco de Abrolhos e a Cadeia Vitória-Trindade (Schmid *et al.*, 1995) e também por causa da combinação de fatores que inclui a mudança de orientação da costa a 22° S e a influência de massas de água como a Água Central do Atlântico Sul (ACAS) (Castro-Filho *et al.*, 1987).

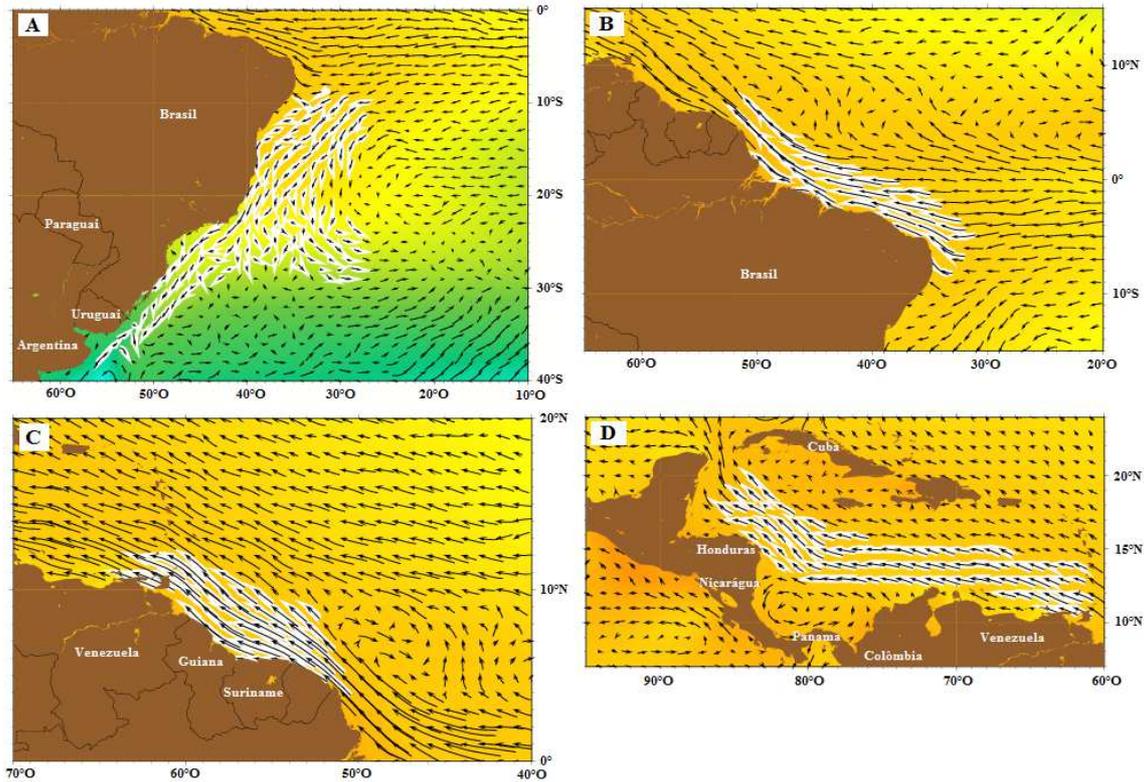
A CNBr (Fig. 1.2B) segue a costa norte do Brasil, transportando as águas quentes do Atlântico Sul para o Atlântico Norte, com uma vazão entre 13 a 36 Sv e velocidade em torno de 60-100 cm/s. Entre junho e janeiro, uma parte da CNBr se conecta com a Contra Corrente Norte Equatorial (CCNE), seguindo para o lado leste do Atlântico. No resto do ano a CNBr, junto com a Corrente Norte Equatorial, alimenta a Corrente da Guiana (CG) (Fig. 1.2C) (Bischof *et al.*, 2003). Esta por sua vez, flui com velocidade média de aproximadamente 40 cm/s, transportando uma vazão relativamente constante de 10 Sv em direção ao Mar do Caribe. Estando ao norte da foz do Rio Amazonas, algumas regiões dentro da CG, apresentam um comportamento anômalo na salinidade que pode atingir valores inferiores a 10 unidades práticas de salinidade (US) (Gyory *et al.*, 2012a).

As águas do Atlântico Sul carregadas pela CG, passam pelas Antilhas e entram no Mar do Caribe, formando a Corrente do Caribe (CC) (Fig. 1.2D), que flui em direção ao Golfo do México. Esta pode atingir uma velocidade de 70 cm/s ao longo da costa da Venezuela, e de cerca de 60 cm/s próximo a Colômbia e Panamá. A circulação ao longo do Mar do Caribe sofre muitas variações espaço-temporais devido a formação de redemoinhos e meandros, que viajam pela CC podendo atingir um diâmetro de 500 km. Estes fenômenos estão diretamente relacionados com a colisão da CNBr com o arco das Antilhas (Gyory *et al.*, 2012b). Além disso, próximo ao Panamá há a formação de uma

circulação no sentido anti-horário (Kinder, 1983), chamada de Giro Panamá-Colômbia (Fig. 1.2D).



**Figura 1.1.** Esquema geral das correntes marinhas do Atlântico Sul, acima dos 100 metros de profundidade. CNBr – Corrente Norte do Brasil; CSES – Corrente Sul Equatorial do Sul; CA – Corrente das Agulhas. Modificado de Stramma & England, 1999.



**Figura 1.2.** Correntes superficiais do lado oeste do Atlântico sul e do mar do Caribe. A – Corrente do Brasil. B – Corrente Norte do Brasil. C – Corrente da Guiana. D – Corrente do Caribe. Setas destacadas em branco representam as correntes mencionadas. (<http://oceancurrents.rsmas.miami.edu/atlantic>)

### 1.3. Conectividade: Mar do Caribe × Atlântico Sul e Ilhas Oceânicas × Costa do Brasil

As propostas de divisão dos oceanos em regiões biogeográficas podem se basear no grau de endemismo, na coesão entre espécies ou então em um conjunto de características bióticas e abióticas. Sendo assim, alguns autores defendem que a fauna marinha do Caribe se assemelha com a fauna do Atlântico Sul Ocidental, formando uma única província biogeográfica (Ekman, 1953; Palácio, 1983), enquanto outros acreditam que estas duas regiões possuem faunas não muito semelhantes, e por isso devem fazer parte de províncias diferentes (Briggs, 1995; Spalding *et al.*, 2007).

Dentre os fatores que podem atuar como barreiras à conectividade entre o Atlântico Sul Ocidental e o Mar do Caribe, a foz do Rio Amazonas é considerada a principal. Suas águas podem chegar a atingir cerca de 500 km oceano adentro e empurram a água do mar para 40 m de profundidade, com isso uma enorme quantidade de água doce e sedimento lamoso são lançados no oceano (*apud* Rocha, 2003). As mudanças nas características da água diminuem as chances de sobrevivência de certas larvas e organismos, causando assim uma descontinuidade no fluxo gênico, como no caso da lagosta *Panulirus argus* (Sarver *et al.*, 1998), dos equinodermas *Echinometra lucunter* (McCartney *et al.*, 2000), *Diadema antillarum* (Lessios *et al.*, 2001) e *Tripneustes ventricosus* (Lessios *et al.*, 2003), do poliqueta *Eurythoe* (Barroso *et al.*, 2010) e de alguns peixes recifais (Rocha, 2003). Entretanto para outras espécies o Rio Amazonas não parece ser uma barreira biogeográfica, visto que algumas populações da esponja *Chondrosia reniformis* (Lazoski *et al.*, 2001), dos equinodermas *Eucidaris clavata* (Lessios *et al.*, 1999) e *Lytechinus variegatus* (Zigler & Lessios, 2004) e da ascídia *Phallusia nigra* (Nobrega *et al.*, 2004), conseguem manter uma conectividade genética ao longo do oeste do Atlântico Sul e Mar do Caribe.

Na comparação entre a fauna das ilhas oceânicas do oeste do Atlântico Sul (Arquipélago de São Pedro e São Paulo, Fernando de Noronha, Atol das Rocas e Ilha de Trindade) e da costa do Brasil, pode ser encontrado, pelo menos para peixes recifais, uma diferenciação na composição das espécies (Floeter & Gasparini, 2000). Tal diferença pode ser consequência do endemismo já relatado para essas ilhas como no caso de algumas espécies de esponjas (Moraes & Muricy, 2003 e 2007), poliquetas (Barroso *et al.*, 2010), crustáceos (Hartnoll *et al.*, 2009), e peixes (Feitoza *et al.*, 2003). Entretanto a conectividade entre essas ilhas e a costa do Brasil é ainda pouco estudada, porém sabe-se que algumas espécies conseguem manter uma coesão genética

populacional, mesmo que em menor grau, entre os dois lados do Atlântico Sul (Lessios *et al.*, 1999; McCartney *et al.*, 2000; Floeter *et al.*, 2008; Barroso *et al.*, 2010). Neste cenário, as ilhas oceânicas podem ter um papel fundamental para a dispersão em *stepping-stones*, auxiliando na manutenção de espécies que ocorrem em ambos os lados do Atlântico Sul (Palumbi, 2003).

#### **1.4. Estudos moleculares com a fauna de poliqueta**

Dentre os trabalhos de poliquetas com marcadores moleculares, muitos apresentam um enfoque filogenético e tentam esclarecer as relações de parentesco entre as espécies dentro de ordens (Struck *et al.*, 2006; Kupriyanova & Rouse, 2007; Osborn & Rouse, 2010; Struck & Halanych, 2010; Norlinder *et al.*, 2012), famílias (Eklöf *et al.*, 2007; Lehrke *et al.*, 2007; Ruta *et al.*, 2007; Bleidorn *et al.*, 2009; Ravara *et al.*, 2010; Zanol *et al.*, 2010; Aguado *et al.*, 2011; Capa *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011) ou gêneros específicos (Schulze, 2006; Heggoy *et al.*, 2007). Alguns outros utilizaram as ferramentas moleculares para auxiliar no posicionamento de espécies recém-descritas dentro de uma respectiva família (Rouse *et al.*, 2004; Osborn *et al.*, 2007; Wiklund *et al.*, 2009; Nygren *et al.*, 2010b; Pires *et al.*, 2010; Borda *et al.*, 2012) ou então na descoberta de espécies crípticas (Bastrop *et al.*, 1998; Bleidorn *et al.*, 2006; Audzijonyte *et al.*, 2008; Rice *et al.*, 2008; Iannotta *et al.*, 2009; Barroso *et al.*, 2010; Hilário *et al.*, 2010; Nygren & Pleijel, 2010; Schüller, 2011) ou pseudo-crípticas (Luttikhuizen & Dekker, 2010; Nygren *et al.*, 2009; Nygren *et al.*, 2010a).

Em menor quantidade, estão os trabalhos que possuem como um dos objetivos a verificação ou comparação de espécies com um histórico taxonômico confuso (Drake *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009; Berke *et al.*, 2010) ou então que visam esclarecer as relações filogeográficas (Schulze *et al.*, 2000; Patti & Gambi, 2001; Jolly *et al.*, 2005 e

2006; Iannotta *et al.*, 2007; Virgílio *et al.*, 2009) ou a estrutura populacional (Breton *et al.*, 2003; Glover *et al.*, 2005; Olson *et al.*, 2009; Plouviez *et al.*, 2010) de uma ou mais espécies.

Sendo assim, é notável que há uma carência de estudos populacionais que utilizam como modelo de estudo espécies de poliquetas. Ou que utilizem estas para realizar análises sobre os padrões naturais responsáveis por moldar a distribuição espacial das espécies.

### **1.5. *Hermodice carunculata* (Pallas, 1766)**

Pertencendo a família Amphinomidae, *H. carunculata* foi primeiramente descrita como *Aphrodita carunculata* Pallas, 1766. Assim como outras espécies da família, *H. carunculata* é vulgarmente conhecida como verme de fogo, e só passou a ter o nome atual quando Kinberg (1857) criou o gênero *Hermodice*, para descrever *H. striata* e incluir *A. carunculata*. Dentre as 13 espécies descritas para o gênero, seis foram posteriormente classificadas no gênero *Pherecardia*, quatro são consideradas sinônimos júnior de *H. carunculata* e uma é considerada como nome inválido (Yáñez-Riveira & Salazar-Vallejo, 2011). Já o estado taxonômico de *H. nigrolineata* é um pouco controverso, visto que alguns autores consideram a espécie como válida (Yáñez-Riveira & Salazar-Vallejo, 2011) e outros acreditam ser tratar de outro sinônimo de *H. carunculata* (Fauchald, 2012; Ahrens *et al.*, no prelo). Sendo assim, até o momento acredita-se que o gênero *Hermodice* seja constituído por duas espécies, *H. nigrolineata* e *H. carunculata*.

Reconhecida por sua coloração vibrante avermelhada (às vezes roxa) e cerdas calcárias, comumente encontrados na família Amphinomidae, *H. carunculata* pode ser cientificamente identificada devido a presença de brânquias em todo o corpo e um

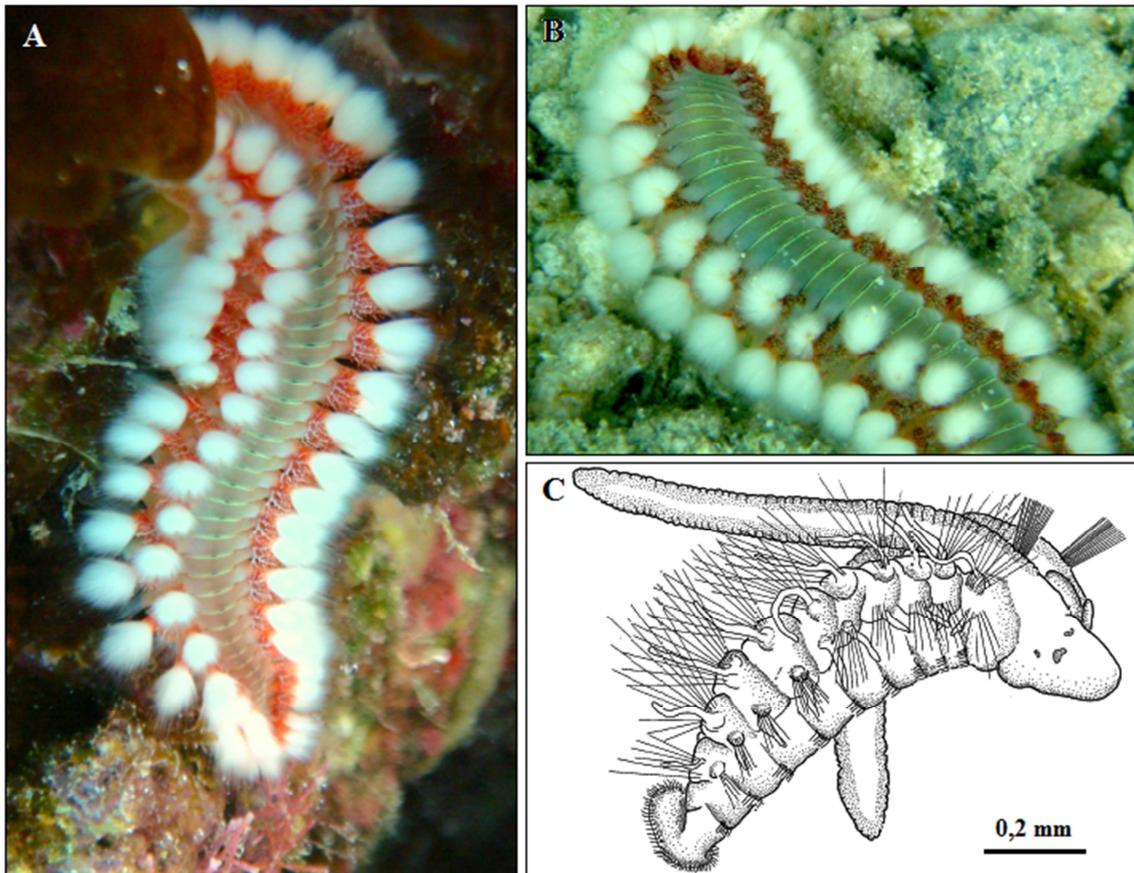
volumoso e multilobado órgão nugal (carúncula). Além disso, alcançam normalmente tamanhos maiores que 15-20 cm de comprimento (podendo chegar a medir 50 cm), o que não é usual para outros membros da família, exceto o gênero *Eurythoe* (Hutchings, 2000).

Em relação a distribuição geográfica, se estende ao longo do Atlântico Ocidental, principalmente ao longo da costa e ilhas oceânicas do Brasil (Atol das Rocas, Arquipélago de Fernando de Noronha e São Pedro e São Paulo), Mar do Caribe e Golfo do México. Caso *H. nigrolineata* seja considerada um sinônimo de *H. carunculata*, a distribuição se expande para o Atlântico Oriental, Mar Mediterrâneo e Mar Vermelho (Barroso & Paiva, 2007; Yáñez-Riveira & Salazar-Vallejo, 2011).

Geralmente a ocorrência de *H. carunculata* está fortemente associada os ambientes de corais (Fig. 1.3A), pois utilizam a forte musculatura da faringe para predação, principalmente, espécies de corais e anêmonas, porém já foram encontrados no trato digestivo pedaços de rádula de moluscos e mandíbula e cerdas de outros poliquetos (Fauchald & Jumars, 1979). Apesar disso também podem ser encontrados em menor proporção em sedimento não consolidado (Fig. 1.3B), destroços flutuantes ou nadando na coluna d'água (Barroso & Paiva, 2007). Os períodos de maior atividade são o início da manhã e o final da tarde (Hutchings, 2000).

Quanto a biologia reprodutiva de Amphinomidae, sabe-se que todas as espécies conhecidas são monoicas e com fertilização externa, sendo os gametas liberados através de poros do trato digestivo e pelo ânus (Rouse & Pleijel, 2001). As larvas possuem cílios ao longo dos tentáculos alimentares (Fig. 1.3C), indicando que durante o período em que estão no plâncton podem se alimentar, tendo assim uma suposta longevidade na coluna d'água (Bhaud, 1972). Larvas planctotróficas com alto potencial de dispersão (teleplânicas) foram encontradas em *Eurythoe complanata* e, ainda nesta espécie, foi

observada a alternância entre reprodução assexuada (fragmentação) e sexuada em ciclos anuais (Kudenov, 1974 *apud* Rouse & Pleijel, 2001). Estudos com informações específicas para *H. carunculata* não foram encontrados.



**Figura 1.3.** *Hermodice carunculata*. A – Indivíduo com cerca de 15 cm sobre recife de coral no Atol das Rocas (Victor C. Seixas). B – Indivíduo com cerca de 20 cm sobre o sedimento no Atol das Rocas (Victor C. Seixas). C – Larva de Amphinomidae (Bhaud, 1972).

#### 1.6. *Timarete punctata* (Grube, 1859)

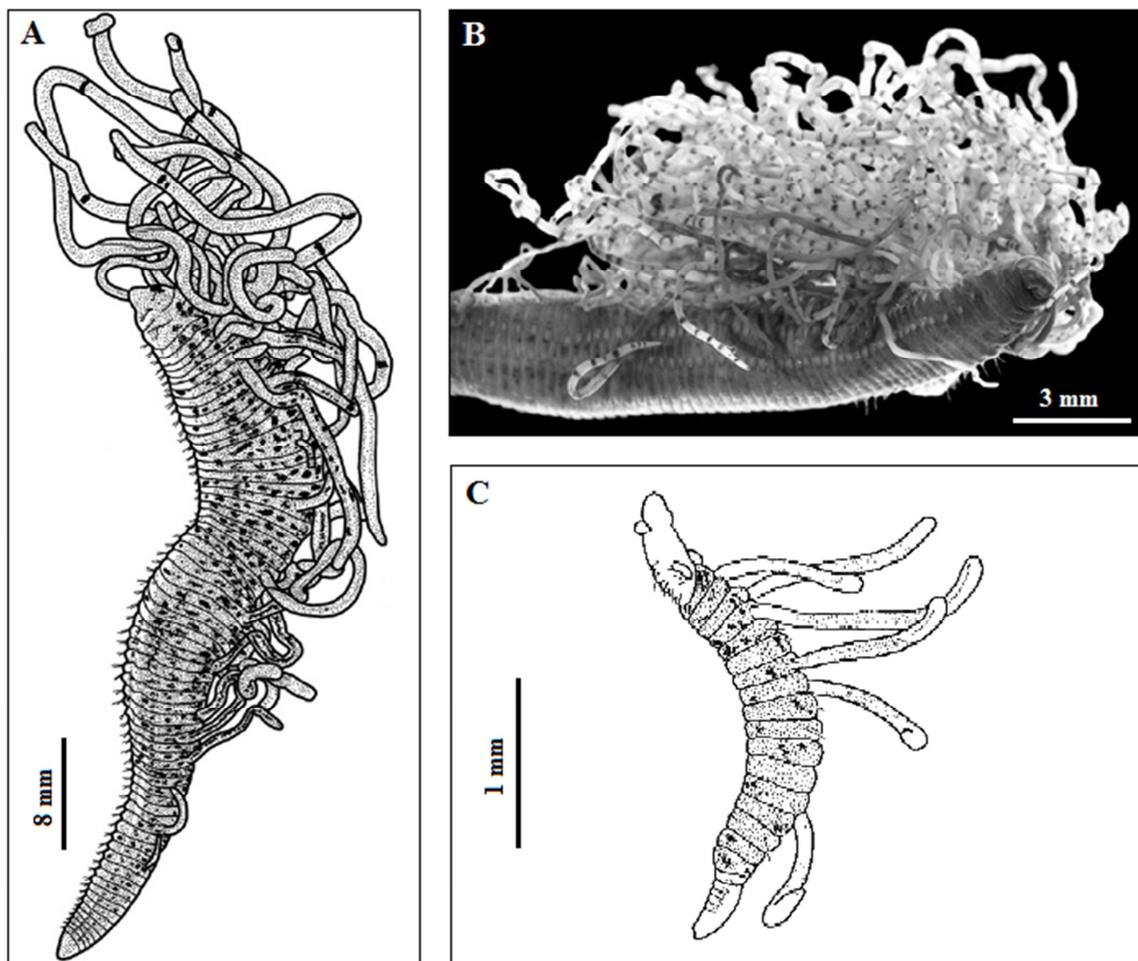
Pertencendo a família Cirratulidae, *T. punctata* foi primeiramente descrita como *Cirratulus punctata* Grube, 1859, posteriormente foi incluída nos gêneros *Audouinia* (atualmente inválido) e *Cirriformia* antes de ser classificada como *Timarete* por Petersen (1999) (Çinar, 2007). Essa confusão em relação a identificação dos gêneros, é muito comum dentro da família Cirratulidae, visto que durante um tempo a família

reunia algumas espécies de identificação e afinidade incertas (Rouse e Pleijel, 2001). *T. punctata* é facilmente reconhecida por causa da presença de pontos pretos ao longo do corpo, brânquias e filamentos tentaculares (Fig. 1.4A e B), um padrão raro nas espécies da família Cirratulidae, inclusive no gênero *Timarete* (Çinar, 2007). Podem atingir cerca de 6 cm de comprimento e terem mais de 170 setígeros.

A distribuição de *T. punctata* pode ser considerada cosmopolita, originalmente descrita no Mar do Caribe (St. Croix, Christiansted, United States Virgin Island), já foi referida para o Golfo do México, Oceano Atlântico Ocidental e Oriental, Mar Mediterrâneo, oeste do Oceano Atlântico e Oceano Pacífico (Çinar, 2007). Como boa parte dos membros do gênero *Timarete* e *Cirriformia*, esta espécie constrói um tubo mucoso, que agrega finas partículas do sedimento (Glasby, 2000). Pode ser encontrada no sedimento, em baixo de rochas, cravadas em estruturas calcárias ou rochas e associadas a macroalgas (Glasby, 2000; Çinar, 2007; Gherardi *et al.*, 2007; Emílio Lanna, com. pessoal). Como são organismos depositívoros de superfície e sésseis, *T. punctata* mantém somente os filamentos tentaculares fora do buraco, formando uma malha onde são depositadas as partículas alimentares, aparentemente sem nenhuma seleção (Fauchald & Jumars, 1979).

Não se tem informações sobre a reprodução de muitas espécies de cirratulídeos, dentre aqueles que foram estudados já foram reportados casos de epitoquia, hermafroditismo, viviparidade e partenogênese (Petersen, 1999). Além disso, a maioria dos estudos realizados indicaram a ocorrência de desenvolvimento direto, porém algumas espécies de *Cirriformia* possuem um período com larvas planctotróficas (Petersen, 1999). Para *T. punctata*, não há nenhum estudo específico até o momento, porém sabe-se que podem reproduzir assexuadamente por esquizogênese (Fig. 1.4C) (Petersen, 1999; Çinar, 2007), comportamento também encontrado em *T. filigera*

(Gherardi *et al.*, 2007). Um estudo ecológico com *T. filigera*, encontrou um alto número de indivíduos em regeneração ao longo de dois anos consecutivos, além de uma porcentagem ínfima de espécimes com gameta feminino e nenhum com gameta masculino. (Gherardi *et al.*, 2007). De acordo com as variações na abundância, Gherardi e colaboradores (2007), sugerem que os períodos de drástica redução populacional, são aqueles onde ocorre a reprodução sexuada e, após estes, a população cresce rapidamente devido a reprodução assexuada, e também alertam para a importância dos fragmentos resultantes deste tipo de reprodução para a dispersão.



**Figura 1.4.** *Timarete punctata*. A – Vista lateral de todo o corpo (Çinar, 2007). B – Vista anterior (Çinar, 2007). C – Fragmento em regeneração da parte anterior e posterior (Petersen, 1999).

Sendo assim populações destas duas espécies de poliqueta, *H. carunculata* e *T. punctata*, serão estudadas geneticamente com o intuito de avaliar o grau de conectividade entre localidades de diferentes pontos do Atlântico Sul Ocidental e do Mar do Caribe. Além disso, também será avaliado o papel das correntes marinhas superficiais, da distância geográfica e do mar profundo na dispersão e estruturação genética para estas espécies.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivos Gerais

- Avaliar, através de marcadores moleculares mitocondriais (citocromo oxidase subunidade I e 16S ribossomal) e nucleares (espaçadores internos transcritos – ITS), a conectividade e a estrutura genética populacional entre ilhas oceânicas do Atlântico Sul Ocidental, a costa do Brasil e o Mar do Caribe, utilizando como modelo duas espécies de poliqueta *Hemodice carunculata* (Amphinomidae) e *Timarete punctata* (Cirratulidae), filogeneticamente distintas.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Testar se ao longo das localidades amostradas todos os indivíduos pertencem a mesma espécie, ou se há a presença de espécies crípticas.

- Avaliar o grau de estruturação genética e estimar o fluxo gênico entre as localidades amostradas.

- Avaliar se as espécies foram submetidas a mudanças históricas no tamanho populacional procurando formular hipóteses que justifiquem tais alterações.

- Estimar a influência do padrão das correntes marinhas superficiais no fluxo gênico entre as localidades amostradas.

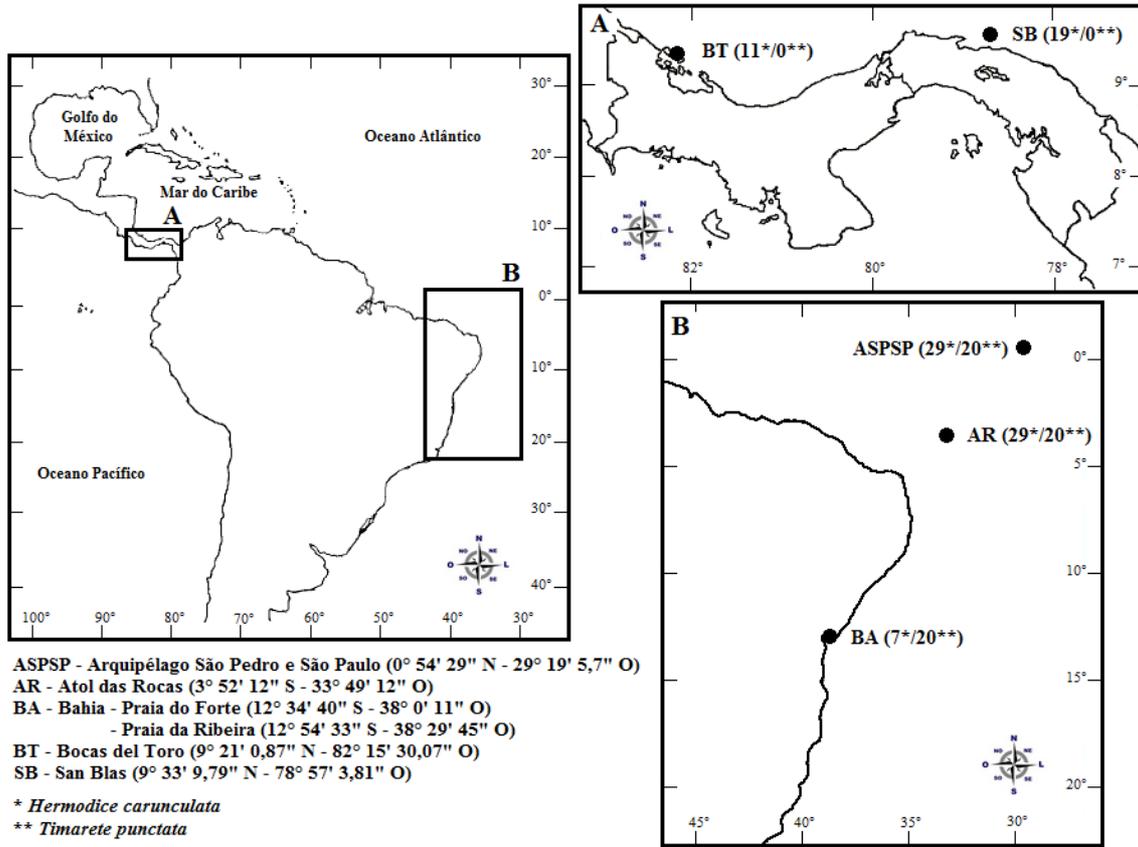
- Avaliar o papel do isolamento por distância e do mar profundo como barreira para a estruturação genética e fluxo gênico.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas em três localidades no Atlântico Sul, sendo duas em ilhas oceânicas (Atol das Rocas e Arquipélago de São Pedro e São Paulo) e uma no litoral brasileiro (Bahia). Na Bahia, as amostras de *H. carunculata* e *T. punctata* foram coletadas na Praia do Forte (Município de Mata de São João) e na Praia da Ribeira (Município de Salvador), respectivamente. Para *H. carunculata* duas localidades foram amostradas no Mar do Caribe, Bocas del Toro e San Blás - Panamá (Fig. 3.1).

Em ambas as espécies, os indivíduos foram coletados desde poças na região entremarés até cerca de 20 metros de profundidade, através de mergulho livre ou autônomo. Os exemplares foram fixados e armazenados em álcool 92,8%. Para garantir uma melhor fixação, o álcool foi substituído duas vezes ao longo do primeiro dia após a coleta. Os exemplares que não foram totalmente utilizados para a extração de DNA serão depositados na coleção do Laboratório de Polychaeta da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IBUFRJ).



**Figura 3.1.** Mapa indicando as localidades amostradas e o número de indivíduos coletados para ambas as espécies (entre parênteses o número de indivíduos coletados para cada espécie, indicada por asterisco).

### 3.2. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras obtidas foi feita através do kit de extração Purege® (Gentra Systems), de acordo com o protocolo para amostras fixadas em álcool. Inicialmente, um fragmento ou todo o indivíduo, 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 por 2 horas. Depois desse período, com a amostra já resfriada, foram adicionados 100 µL de solução para precipitar proteínas e restos celulares (*Protein Precipitation Solution*). Antes de ser centrifugada a 14.000 RPM por 6 minutos, a amostra foi homogeneizada em alta velocidade por 20 segundos e incubada em gelo

por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo tubo contendo 300  $\mu$ L 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 o pellet composto de DNA foi lavado com 300  $\mu$ L de Etanol 70%. Depois de uma rápida centrifugação (14.000 RPM por 1 minuto), o sobrenadante foi descartado e o pellet ficou secando por 6 minutos a temperatura ambiente. Para ressuspender o DNA foi adicionado 100  $\mu$ L de solução hidratante (*DNA Hydration Solution*) por 1 hora a 65 °C. Ao final as extrações foram estocadas a temperatura de -20 °C. Para verificar a presença de DNA foi feita a eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE 0,5X, sendo as amostras coradas individualmente com Brometo de Etídeo ou GelRed<sup>TM</sup>. Por nem sempre ser possível visualizar o DNA extraído no gel de eletroforese, todas as extrações foram submetidas à etapa de amplificação.

### 3.3. Amplificação e sequenciamento de DNA

Todas as amplificações foram feitas em termocicladores através de técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*). Para todos os marcadores, as séries de amplificações foram feitas com controles negativos para a detecção de possíveis contaminações. Além disso, em todos os casos, a verificação do sucesso da amplificação foi feita em eletroforese de gel de agarose como especificado acima no item 3.2.1. O tamanho das regiões amplificadas foi estimado a partir do marcador de peso molecular Invitrogen<sup>TM</sup> 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.

### 3.3.1. Citocromo oxidase subunidade I (COI)

Para a amplificação da região do COI foram utilizados os iniciadores universais LCO1490 e HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) (Tab. 3.1). Cada reação de PCR continha 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase, 200  $\mu$ M de dNTP, 0,6  $\mu$ M de cada um dos iniciadores, 2 mM (*H. carunculata*) ou 3 mM (*T. punctata*) de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), tampão para PCR 1X, 40  $\mu$ g (*H. carunculata*) ou 50  $\mu$ g (*T. punctata*) de albumina de soro bovino e 1  $\mu$ L de DNA genômico (diluído até 1:200), em volume final de 25  $\mu$ L. Para ambas as espécies as reações de PCR foram feitas seguindo um ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, 5 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 90 segundos a 45 °C e 1 minuto a 72 °C, 35 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 45 segundos a 51 °C e 1 minuto a 72 °C e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C.

### 3.3.2. 16S ribossomal (16S)

Para a amplificação da região do 16S foram utilizados três iniciadores diferentes, um *forward* e dois *reverse* (Tab. 3.1). Para a espécie *H. carunculata* foram utilizados os iniciadores 16Sar-L e 16Sbr-H (Palumbi *et al.*, 1991). Cada reação de PCR continha 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase, 200  $\mu$ M de dNTP, 0,6  $\mu$ M de cada um dos iniciadores, 3 mM de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), tampão para PCR 1X, 50  $\mu$ g de albumina de soro bovino e 1  $\mu$ L de DNA genômico (diluído até 1:200), em volume final de 25  $\mu$ L. Para esta espécie as reações de PCR seguiram um ciclo inicial de 3 minutos a 95 °C, 5 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 45 °C e 45 segundos a 72 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 49 °C e 45 segundos a 72 °C e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C.

Para a espécie *T. punctata* foram utilizados os iniciadores 16Sar-L (Palumbi *et al.*, 1991) e 16SAN-R (Zanol *et al.*, 2010). Cada reação de PCR continha 1 unidade da

enzima Taq DNA polimerase, 80  $\mu$ M de dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada um dos iniciadores, 2 mM de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), tampão para PCR 1X, 20  $\mu$ g de albumina de soro bovino e 1  $\mu$ L de DNA genômico (diluído até 1:200), em volume final de 25  $\mu$ L. Para esta espécie as reações de PCR seguiram um ciclo inicial de 3 minutos a 95 °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.

### 3.3.3. Espaçadores internos transcritos (ITS)

Para a amplificação da região do ITS foram utilizados 3 iniciadores diferentes, um *forward* e dois *reverse* (Tab. 3.1). Para amplificar toda a região do ITS (ITS1-5,8S-ITS2) foram utilizados os iniciadores ITS18SF-poly e ITS28SR-poly e para amplificar somente a região do ITS1 foram utilizados os iniciadores ITS18SF-poly e ITS5,8SR-poly, todos desenhados por Nygren e colaboradores (2009). Em ambas as combinações, cada reação de PCR continha 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase, 200  $\mu$ M de dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada um dos iniciadores, 2 mM de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), tampão para PCR 1X, 10  $\mu$ g de albumina de soro bovino e 1  $\mu$ L de DNA genômico (diluído até 1:200), em volume final de 25  $\mu$ L. Para ambas as espécies, as reações de PCR foram feitas seguindo um ciclo inicial de 4 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 40 segundos a 48 °C (ITS1) ou 52 °C (ITS1-5,8S-ITS2) e 1 (ITS1) ou 2 (ITS1-5,8S-ITS2) minutos a 72 °C e um ciclo final de 8 minutos a 72 °C.

Por se tratar de uma região do DNA ribossomal nuclear, espera-se que as sequências amplificadas contenham múltiplas cópias (Harris & Crandall, 2000). Por isso, a utilização direta das sequências, sem a aplicação de técnicas de clonagem, pode resultar em dados ambíguos (Iannotta *et al.*, 2007). Entretanto, há casos onde a utilização direta das sequências é possível devido a ausência de picos múltiplos no

eletroferograma (Nygren & Pleijel, 2011), indicando a presença de apenas uma cópia. Sendo assim, a presença de múltiplas cópias foi primeiramente investigada a partir da eletroforese em gel de agarose. As amostras que apresentaram bandas extras em alta concentração não foram sequenciadas. Uma segunda verificação foi feita através da observação de picos múltiplos no eletroferograma.

**Tabela 3.1.** Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento. A – Folmer *et al.*, 1994; B – Palumbi *et al.*, 1991; C – Zanol *et al.*, 2010; D – Nygren *et al.*, 2009.

	Iniciadores	Sequência 5'-3'	Referência
COI	LCO 1490*	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	A
	HCO 2198**	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	A
16S	16Sar-L*	CGCCTGTTTTCAAAAACAT	B
	16Sbr-H**	CCGTCTGAACTCAGATCACGT	B
	16SAN-R**	GCTTACGCCGGTCTGAACTCAG	C
ITS	ITS18SF-poly*	GAGGAAGTAAAAGTCGTAACA	D
	ITS5,8SR-poly**	GTTCAATGTGTCCTGCAATTC	D
	ITS28SR-poly**	ATGCTTAAATTCAGCGGGT	D

\* forward

\*\* reverse

### 3.4. Edição e alinhamento das sequências

A visualização dos eletroferogramas, assim como, a formação dos *contigs* entre as sequências 5'-3' e 3'-5' foram feitas através do programa Sequencher 4.1 (Gene Codes Corporation). Os alinhamentos foram realizados no programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) através da ferramenta Clustal W. Ainda neste programa foram contabilizados os números de sítios polimórficos, informativos para parcimônia e únicos (*singletons*).

Através do eletroferograma da região do ITS1 de ambas as espécies, foi possível detectar a presença de picos duplos ao longo de diversas sequências, além disso, com o alinhamento deste mesmo marcador foi observado a presença de duas cópias distintas para *H. carunculata* e cinco para *T. punctata*. Devido à observação de picos duplos e

múltiplas cópias, a região do ITS1 não foi utilizada em nenhuma análise, para ambas as espécies.

### 3.5. Análise Filogenética

As análises filogenéticas foram efetuadas com o intuito de verificar a presença de possíveis espécies crípticas e para auxiliar na definição *a priori* das populações, sendo os marcadores analisados separadamente. Para isso foram utilizados métodos de reconstrução baseados em máxima verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana (BI). Os modelos de substituição dos nucleotídeos que melhor se adequavam aos dados foram verificados através do programa jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008), sendo a escolha dos modelos baseada no critério de informação de Akaike (*Akaike Information Criterion - AIC*). A análise de máxima verossimilhança foi feita com o programa PhyML 3.0 (Guidon *et al.*, 2010) através do servidor *online* ([www.atgc-montpellier.fr/phyml/](http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/)), com o suporte dos ramos definido por 1000 réplicas de bootstrap. Para a inferência Bayesiana foi utilizado o programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), sendo as análises realizadas pelo portal CIPRES *Science Gateway* (Miller *et al.*, 2010). 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 (três “quentes” e uma “fria”), sendo os parâmetros amostrados a cada 1.000 gerações. Para checar se o descarte das primeiras gerações (*burn-in* = 25%) 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, como recomendado pelo manual do Mr.Bayes) e o programa Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007). A qualidade da análise também foi verificada através do tamanho efetivo da amostra (*effective sample size - ESS*), que informa se o espaço

de possibilidades dos parâmetros foi explorado de forma eficiente pela MCMC. Drummond e colaboradores (2007) recomendam que os valores de ESS sejam maiores que 200, e que valores abaixo de 100 representam uma estimativa inadequada, desta forma somente os valores acima de 200 foram aceitos.

### **3.5.1. *Hermodice carunculata***

Para ambos os marcadores (COI e 16S) as análises filogenéticas foram feitas com base no modelo GTR e assumindo que a taxa de substituição varie ao longo das sequências (distribuição gamma -  $\Gamma$ ). Nas análises foram utilizados 89 indivíduos para o COI e 77 para o 16S, sendo dois destes indivíduos pertencentes a espécie *Eurythoe* sp., utilizados para enraizar as árvores (grupo externo). As sequências de COI desta espécie foram previamente utilizadas em Barroso e colaboradores (2010) e encontram-se disponíveis no GenBank (FJ429277 e FJ429279). No caso do 16S as sequências foram obtidas pelo Laboratório de Polychaeta da Universidade Federal Rio de Janeiro (UFRJ).

### **3.5.2. *Timarete punctata***

Para a região do COI as análises filogenéticas foram feitas pelo modelo de Tamura-Nei (TrN) com distribuição gamma ( $\Gamma$ ), enquanto que para o 16S o modelo evolutivo selecionado foi o GTR. Nas análises foram utilizados 54 indivíduos para o COI e 58 para o 16S. Para ambos os marcadores foram utilizados duas sequências de *Timarete* sp. para enraizar as árvores (grupo externo). Tais sequências foram obtidas pelos mesmos métodos descritos no item 3.3 desta dissertação.

### 3.6. Variabilidade, diversidade molecular e rede de haplótipos

Os valores de distância  $p$  par-a-par entre as sequências, foram realizados pelo programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Estes valores foram primeiramente calculados comparando os indivíduos dentro de cada população (intra-populacional) e depois entre as populações diferentes (inter-populacional).

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). Para tal, as estimativas foram feitas considerando cada população separadamente e também juntando todas elas. A distribuição dos haplótipos entre as diferentes localidades, assim como o número de mudanças entre eles, foi estimada através da construção de uma rede de haplótipos. A construção das redes foi feita pelo pacote pegas (Paradis, 2010), através do programa R (R Core Team, 2012).

### 3.7. Estruturação populacional e distância geográfica

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. Os arquivos de entrada para este programa foram feitos através do DNAsp 5.0.

A AMOVA foi aplicada com o intuito de testar diferentes hipóteses de estruturação entre as populações definidas *a priori*. Nesta análise, a distância genética dos haplótipos é incorporada a uma análise de variância, onde é produzida uma matriz que informa o quadrado das distâncias entre todos os pares de haplótipos. Através dessa matriz são estimados os componentes da variância, covariância e os índices de fixação

$\phi$  ( $\Phi$ ), que refletem a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis hierárquicos de divisão (Excoffier *et al.*, 1992). Sendo assim, a variância molecular é definida pela soma dos componentes da covariância devido a diferença entre os haplótipos para cada nível hierárquico (dentro das populações, entre as populações dentro dos grupos e entre os grupos) (Excoffier *et al.*, 2005).

Para a estimativa do  $F_{ST}$ , o teste de significância da hipótese de não diferenciação entre as populações é feito a partir da permutação dos haplótipos entre as populações. Na AMOVA, a forma com que as permutações são feitas varia de acordo com o número de grupos e índices de fixação ( $\Phi_{ST}$ ,  $\Phi_{SC}$  e  $\Phi_{CT}$ ). Quando há apenas um grupo a significância do  $\Phi_{ST}$  é testada da mesma forma que o  $F_{ST}$ . A partir de dois grupos o teste é feito de três formas: (1) permutando os haplótipos entre as populações entre grupos ( $\Phi_{ST}$ ); (2) permutando os haplótipos entre as populações dentro dos grupos ( $\Phi_{SC}$ ); e (3) permutando as populações entre os grupos ( $\Phi_{CT}$ ) (Excoffier *et al.*, 2005).

Com o intuito de verificar a correlação entre os valores par-a-par de  $F_{ST}$  e a distância geográfica entre as localidades, foi feito o teste de Mantel (Mantel, 1967) para comparar os elementos entre essas duas matrizes. Para isso foi utilizado o pacote ade4 (Dray *et al.*, 2007) através do programa R (R Core Team, 2012), sendo realizado 10.000 permutações para testar a significância dos valores encontrados. Os valores de distância geográfica entre as localidades foram estimados através do aplicativo Google Earth.

### **3.8. Expansão populacional**

A avaliação da história demográfica das populações foi primeiramente investigada através dos testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu, 1997). Ambos os testes assumem que as mutações são constantes e ocorrem de acordo com o modelo de sítios infinitos (Kimura, 1969), além disso, segundo o modelo

não há seleção nem recombinação, o tamanho das populações é constante e não há migração entre elas. Devido a grande chance dos pressupostos serem violados, a rejeição da hipótese de neutralidade não implica necessariamente na ocorrência de seleção natural (Pybus & Shapiro, 2009).

O teste D de Tajima é baseado na relação entre o número de sítios segregantes (S) e o número médio de diferenças nucleotídicas par-a-par ( $\pi$ ). De acordo com o modelo neutro, tanto S quanto  $\pi$  são gerados pelo processo de deriva gênica. Caso nenhum pressuposto seja violado os valores dessas estimativas serão iguais, resultando em um valor de D igual a zero. Desvios significativos com valores positivos indicam que a divergência entre os haplótipos ( $\pi$ ) é relativamente maior que o número de haplótipos (S), podendo isto ser causado pela presença de estruturação populacional, seleção balanceada ou um declínio do tamanho populacional (efeito gargalo ou fundador). No lado oposto, valores significativamente negativos indicam um excesso de haplótipos raros, ou seja, S é relativamente maior que  $\pi$ . Este cenário pode estar relacionado com a ocorrência de seleção purificadora ou um rápido crescimento populacional (Pybus & Shapiro, 2009).

No teste  $F_s$  de  $F_u$  a neutralidade é testada a partir do número de diferenças par-a-par. O teste estima a probabilidade de se obter uma população com o número de haplótipos menor ou igual ao observado. Valores significativamente positivos podem indicar uma deficiência de haplótipos, que pode ter sido causada por uma redução populacional ou efeito de seleção natural. Os valores negativos indicam um excesso de haplótipos, normalmente esperado em populações que passaram por uma expansão ou que sofreram efeito “carona” (*genetic hitchhiking*). Dentre os testes de neutralidade realizados, a ocorrência de expansão populacional é mais facilmente detectada a partir do teste de  $F_s$  de  $F_u$ , porém é recomendado que os valores de p sejam considerados

significativos somente quando menores que 0,02, ou invés de 0,05 (Fu, 1997; Excoffier *et al.*, 2005). Os dois testes foram feitos pelo programa Arlequin 3.5 e significância foi testada com 10.000 permutações.

Devido ambiguidade dos testes de neutralidade, as populações que desviaram significativamente da hipótese de neutralidade foram avaliadas através da análise de distribuição das diferenças (*mismatch distribution analyses*) (Rogers & Harpending, 1992). Esta análise pode ser usada para testar tanto a expansão demográfica (1) quanto espacial (2), a partir da comparação da curva esperada e observada. Em ambos os casos a construção da curva esperada assume o modelo de sítios infinitos. Além disso, no primeiro caso considera-se que a expansão ocorreu a partir de uma população pequena para uma população grande, ambas em equilíbrio. Este método pode ser considerado uma boa aproximação do crescimento logístico e exponencial (Excoffier & Schneider, 1999). No segundo caso, a análise se baseia no pressuposto de que uma população com um único haplótipo colonizou instantaneamente infinitas populações, sendo o tamanho das populações e o número de imigrantes entre elas constante (Excoffier, 2004). Teoricamente uma população que sofreu uma drástica redução no número de indivíduos terá uma distribuição multimodal, enquanto que uma expansão demográfica recente é representada por uma curva unimodal (Excoffier *et al.*, 2005). O comportamento da distribuição das diferenças para o modelo de expansão espacial é similar ao da expansão demográfica, desde que a taxa de migração entre as populações seja bem elevada (Ray *et al.*, 2003; Excoffier, 2004). A validade dos resultados é testada a partir da reestimativa dos parâmetros, onde a probabilidade dos valores serem diferentes, obtida a partir do número de SSD (*sum of squares deviations*) simulados que foram maiores ou iguais ao SSD observado (Schneider & Excoffier, 1999).

Os parâmetros obtidos na análise de distribuição das diferenças ( $\tau$ ,  $\theta_0$  e  $\theta_1$ ) podem ser úteis para estimar o tempo (t) decorrido desde o último evento de expansão ( $\tau$ ), assim como o tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) antes ( $\theta_0$ ) e depois ( $\theta_1$ ) da expansão demográfica. Porém, segundo Schneider & Excoffier (1999), somente  $\tau$  é adequadamente recuperado pela análise de distribuição, enquanto que os valores de  $\theta$ , principalmente  $\theta_1$ , não são confiáveis. Sendo assim, somente  $\tau$  foi utilizado para obter valores absolutos de tempo (t). Para isso foi utilizado a fórmula  $t = \tau/2u$ , onde u é taxa de mutação para todo o haplótipo. O valor de u é a taxa de mutação por sítio por ano ( $\mu$ ) multiplicado pelo número de pares de bases sequenciados (pb). Para a região do COI foram consideradas as taxas de mutação ( $\mu$ ) de  $7,0 \times 10^{-8}$ , calculada para a espécie de poliqueta *Eurythoe complanata* com base no Istmo do Panamá (Barroso *et al.*, 2010), e  $5,3 \times 10^{-8}$ , que é uma estimativa geral para o DNA mitocondrial de invertebrados (Crandall *et al.*, 2012). Enquanto que para o 16S foram utilizadas as taxas de  $1,6 \times 10^{-8}$  e  $2,2 \times 10^{-8}$ , estimadas para invertebrados (Collado & Mendez, 2012). Os gráficos de distribuição das diferenças foram feitos a partir do programa DNAsp 5.0, enquanto que os parâmetros de expansão foram estimados pelo Arlequin 3.5, sendo a significância dos resultados testados com 10.000 réplicas de bootstrap paramétrico.

As possíveis mudanças de tamanho populacional ao longo do tempo também foram investigadas a partir da análise *Bayesian Skyline Plot* (BSP) (Drummond *et al.*, 2005). O método de *Skyline Plot* (SP) (Pybus *et al.*, 2000), de uma maneira geral, estima as mudanças do tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) ao longo dos nós de uma genealogia, baseado na teoria da coalescência (Ho & Shapiro, 2011). Diferente da maioria dos métodos disponíveis, o SP não necessita da definição prévia de um modelo paramétrico de crescimento populacional (constante, logístico, exponencial ou

expansivo) (Emerson *et al.*, 2001). Além dos pressupostos de não recombinação e seleção neutra, as amostras devem ser obtidas de uma população sem estruturação (panmítica). No caso de espécies com estruturação genética populacional evidente é recomendada a análise separada das subpopulações (Ho & Shapiro, 2011). Dentre os diferentes tipos de SP, o BSP minimiza os erros associados à inferência filogenética, pois consegue em uma única análise estimar a genealogia, a história demográfica e os parâmetros do modelo de substituição. Além disso, calcula o intervalo de confiança associado as incertezas filogenéticas e do processo de coalescência (Drummond *et al.*, 2005).

As análises de BSP foram feitas com o pacote BEAUti/BEAST 1.7 (Drummond *et al.*, 2012). A escolha do modelo de substituição para os marcadores foi feita através do programa jModelTest 0.1.1, como descrito no item 3.5. Sendo assim foram selecionados os modelos de GTR + I (COI) e HKY +  $\Gamma$  (16S) para *H. carunculata* e HKY (COI e 16S) para *T. punctata*. Para cada corrida o tamanho da cadeia de MCMC foi de  $30 \times 10^6$ , sendo 10% das gerações iniciais descartadas (burn-in). As genealogias e os parâmetros dos modelos foram amostrados a cada 3.000 gerações. O *prior*, *Coalescent Bayesian Skyline*, foi selecionado como modelo para as árvores e o número de grupos foi igual a 10. Em relação ao relógio molecular, foi utilizado o modelo estrito com a taxa de mutação fixada (7,0 e  $5,3 \times 10^{-8}$  para o COI e 1,6 e  $2,2 \times 10^{-8}$  para o 16S). A forma com que novos estados eram selecionados pela cadeia de MCMC (*tuning* e *weight*) foram primeiramente otimizados pelo próprio programa. Os valores de *tuning* estimados na primeira análise foram guardados para se houvesse a necessidade (ESS < 200) de fazer uma segunda análise com o mesmo grupo de dados. O programa Tracer 1.5 foi utilizado para a construção dos gráficos do BSP e também para avaliar a

eficiência das análises, sendo esta julgada de acordo com os valores de ESS como especificado no item 3.5.

### 3.9. Estimativa de 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 método descrito por Beerli e Felsenstein (2001), onde, ao contrário das abordagens que utilizam o  $F_{ST}$ , o tamanho das populações e o fluxo gênico entre elas não são considerados iguais (Beerli, 1998). Este método se baseia na teoria da coalescência para estimar os parâmetros de taxa de migração ( $M$ ) e  $\theta$ , através de informações genealógicas inferidas por máxima verossimilhança ou inferência Bayesiana (Beerli, 2006). 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  $N_e = \theta \times \mu$  (DNA mitocondrial), respectivamente, onde  $\mu$  é taxa de mutação por sítio por ano. Apesar das vantagens, alguns pressupostos são assumidos: tamanho populacional constante ao longo do tempo; acasalamentos ao acaso; não há seleção natural; taxa de mutação e migração constantes ao longo do tempo; toda a genealogia possui a mesma taxa de mutação; e trocas gênicas só ocorrem através de migrantes (Beerli, 2009).

Sendo assim, a abordagem Bayesiana foi utilizada através do programa Migrate 3.3.2 (Beerli & Felsenstein, 2001; Beerli, 2006) para definir os parâmetros  $\theta$  e  $M$ . De acordo com Felsenstein (2006), boas estimativas de  $\theta$  podem ser feitas com oito indivíduos por população/localidade. Já para estimar o parâmetro  $M$  com confiança é preciso utilizar cerca de 10-20 indivíduos, além disso, é essencial que as sequências sejam longas o suficientes para conter ao menos 10 sítios variáveis (Kuhner, 2006).

Para fazer as estimativas os dois marcadores (COI e 16S) foram incluídos dentro do mesmo arquivo de entrada e considerados como dois loci. Como recomendado pelo manual do programa, foram feitas corridas preliminares com o intuito de obter estimativas dos parâmetros  $\theta$  e  $M$ . Desta forma foram feitas duas corridas, cada uma com uma cadeia longa onde os parâmetros foram amostrados  $5 \times 10^6$  de vezes (50.000 genealogias amostradas (a) com incremento de 100 vezes (b)), sendo este processo replicado por 10 (c) (totalizando  $5 \times 10^7$  genealogias ( $a \times b \times c$ )). Na primeira corrida (1) o *prior* dos parâmetros foram uniformes, com os valores podendo variar de 0 a 0,1 para  $\theta$  e de 0 a 1.000 para  $M$ . Na segunda corrida (2), os valores iniciais de  $\theta$  e  $M$  foram inseridos e o *prior* alterado para variar de 0,000005 a 0,2 em  $\theta$  e 0,000005 a 1.500 em  $M$ . Nesta, 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 em relação ao total de genealogias visitadas ( $a \times b \times c$ ).

Para avaliar a correlação entre os valores finais de  $M$  com as distâncias geográficas, foi feito novamente o teste de Mantel, como descrito no item 3.7.

## 4. Resultados

Os resultados das análises apresentados nesta sessão são referentes somente aos marcadores mitocondriais, COI e 16S. Quanto ao marcador nuclear (ITS) nenhuma análise foi realizada devido a presença de múltiplas cópias por indivíduo, detectadas a partir da presença de diversos picos duplos nos eletroferogramas.

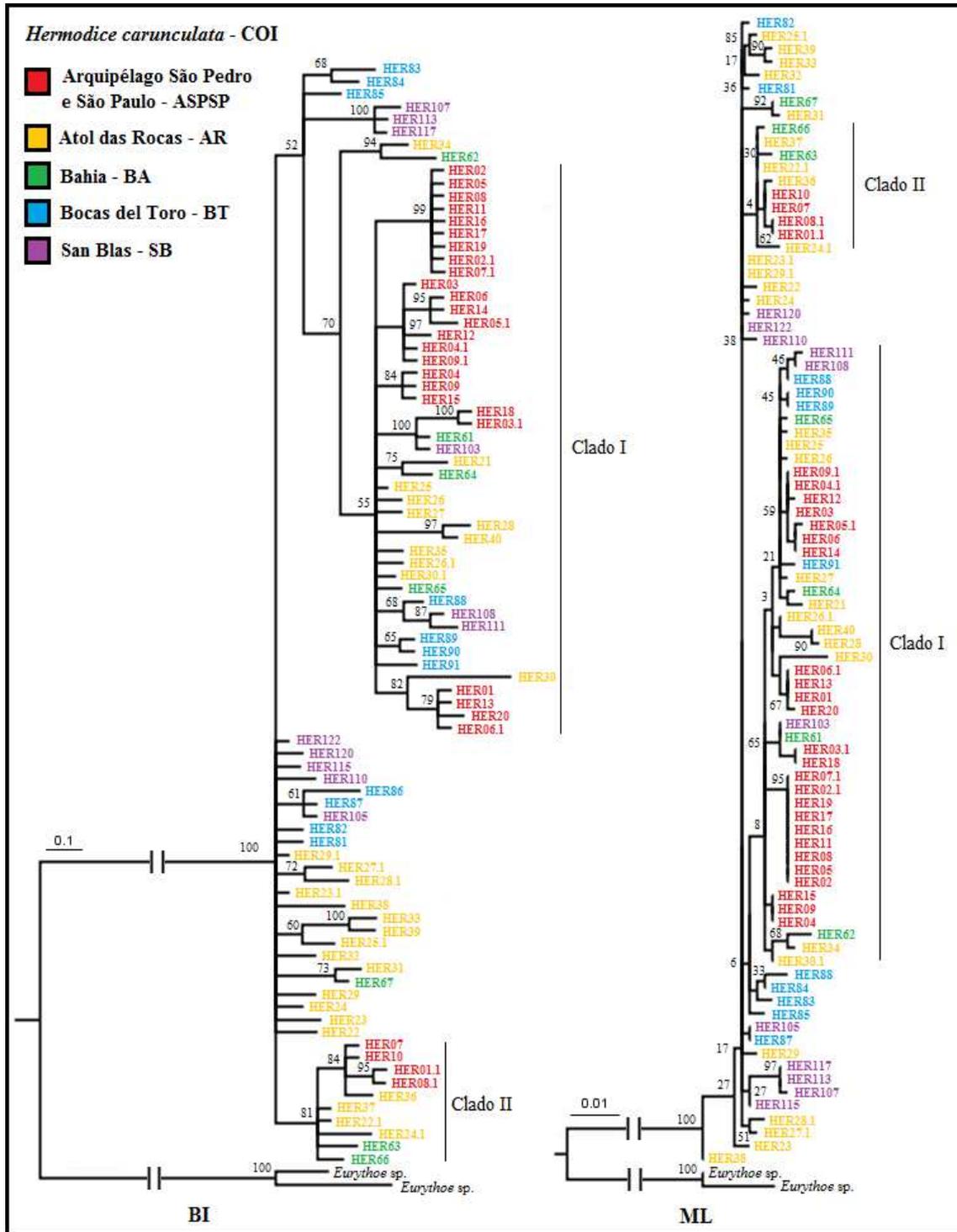
### 4.1. *Hermodice carunculata*

Dentre as amostras sequenciadas para *H. carunculata*, 10 referentes ao COI e duas ao 16S foram descartadas devido a baixa qualidade do sequenciamento. Na região do COI foram utilizados 636 pares de bases (pb), sendo contabilizado 72 sítios polimórficos, 36 sítios informativos para parcimônia e 33 sítios onde apenas um indivíduo apresentou uma mudança (sítios únicos). No 16S foram aproveitados 513 pb, sendo 31 sítios polimórficos, 10 informativos para parcimônia e 21 sítios únicos.

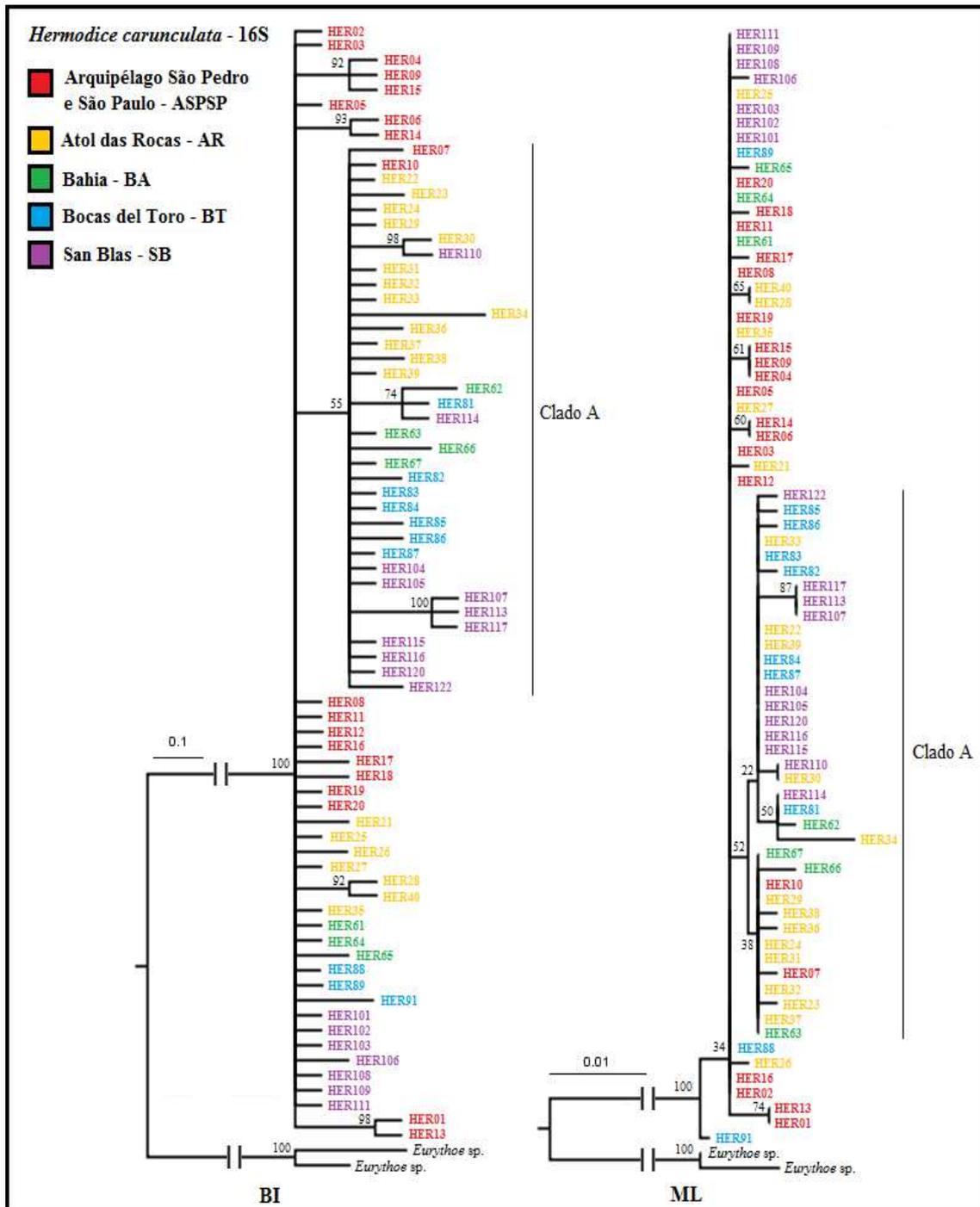
#### 4.1.1. Análise filogenética

Em ambos os marcadores e topologias (Bayesiana e máxima verossimilhança), não houve a formação de nenhum grupo monofilético que fosse composto por todos os indivíduos de uma única localidade (Fig. 4.1 e 4.2). Além disso, o reduzido comprimento dos ramos e os baixos valores de suporte dos nós, demonstram que apesar das diferenças individuais não é possível recuperar clados robustos. Dentre os clados formados nas topologias baseadas no COI (Fig.4.1), somente dois (I e II) continham 10 ou mais indivíduos. No primeiro clado foram agrupados a maioria dos indivíduos do ASPSP, além de indivíduos das quatro outras localidades (probabilidade posterior, PP, e bootstrap, BS, < 70), enquanto que o segundo agrupou indivíduos das três localidades brasileiras amostradas (PP = 81 e BS < 70). Nas árvores de 16S somente um clado com

mais de 10 indivíduos (A) foi formado (PB e BS < 70), contendo amostras de todas as localidades, sendo ASPSP representado por apenas dois indivíduos.



**Figura 4.1.** Árvores filogenéticas de *H. carunculata* baseadas em sequências de COI e recuperadas por inferência Bayesiana (BI) e máxima verossimilhança (ML). Os números representam o suporte dos ramos para as respectivas análises.



**Figura 4.2.** Árvores filogenéticas de *H. carunculata* baseadas em sequências de 16S e recuperadas por inferência Bayesiana (BI) e máxima verossimilhança (ML). Os números representam o suporte dos ramos para as respectivas análises.

#### 4.1.2. Variabilidade, diversidade molecular e rede de haplótipos

A média da distância  $p$  para todos os indivíduos de *H. carunculata* foi 1,1% para o COI e 0,4% para o 16S, com os valores variando entre 0,0% a 2,5% e 0,0% a 1,4%, respectivamente. Para ambos os marcadores, os valores médios de distância  $p$  dentro e entre as localidades estão representados nas tabelas 4.1 (COI) e 4.2 (16S), respectivamente.

Os valores referentes ao número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (h) e nucleotídica ( $\pi$ ), para as 87 sequências de COI e 75 de 16S, podem ser visualizados nas tabelas 4.3 e 4.4, respectivamente.

A relação dos haplótipos de *H. carunculata*, assim como a distribuição ao longo das localidades, pode ser observada através da rede de haplótipos (Fig. 4.3 e 4.4). Para o COI foram observados a presença de dois haplótipos principais, que apesar de não serem muito frequentes, representam o centro da topologia em formato de estrela. Além da grande quantidade de haplótipos não amostrados, somente três foram compartilhados entre duas localidades (Fig. 4.3). No 16S foram observados três haplótipos principais que estão presentes em pelo menos três localidades. O número de haplótipos não amostrados foi bem inferior em relação ao COI, assim como a quantidade de haplótipos exclusivos (Fig. 4.4).

**Tabela 4.1.** Valores de distância  $p$  par-a-par (%) dentro das localidades de *H. carunculata*. Min. (menor valor); Max. (maior valor); Parênteses com os valores de desvio padrão. ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

	COI		16S	
	Média (%)	Min. - Máx. (%)	Média (%)	Min. - Máx. (%)
ASPSP	0,9 (0,2)	0,0 - 1,9	0,3 (0,1)	0,0 - 0,8
AR	1,1 (0,2)	0,0 - 2,5	0,4 (0,1)	0,0 - 1,2
BA	1,3 (0,3)	0,5 - 1,7	0,4 (0,2)	0,0 - 1,0
BT	0,8 (0,2)	0,0 - 1,3	0,3 (0,1)	0,0 - 0,8
SB	0,9 (0,2)	0,0 - 1,7	0,3 (0,1)	0,0 - 1,0

**Tabela 4.2.** Valores médios de distância  $p$  par-a-par (%) entre as localidades de *H. carunculata*, para a região do COI (diagonal inferior) e 16S (diagonal superior), com os respectivos desvios padrões entre parênteses. ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

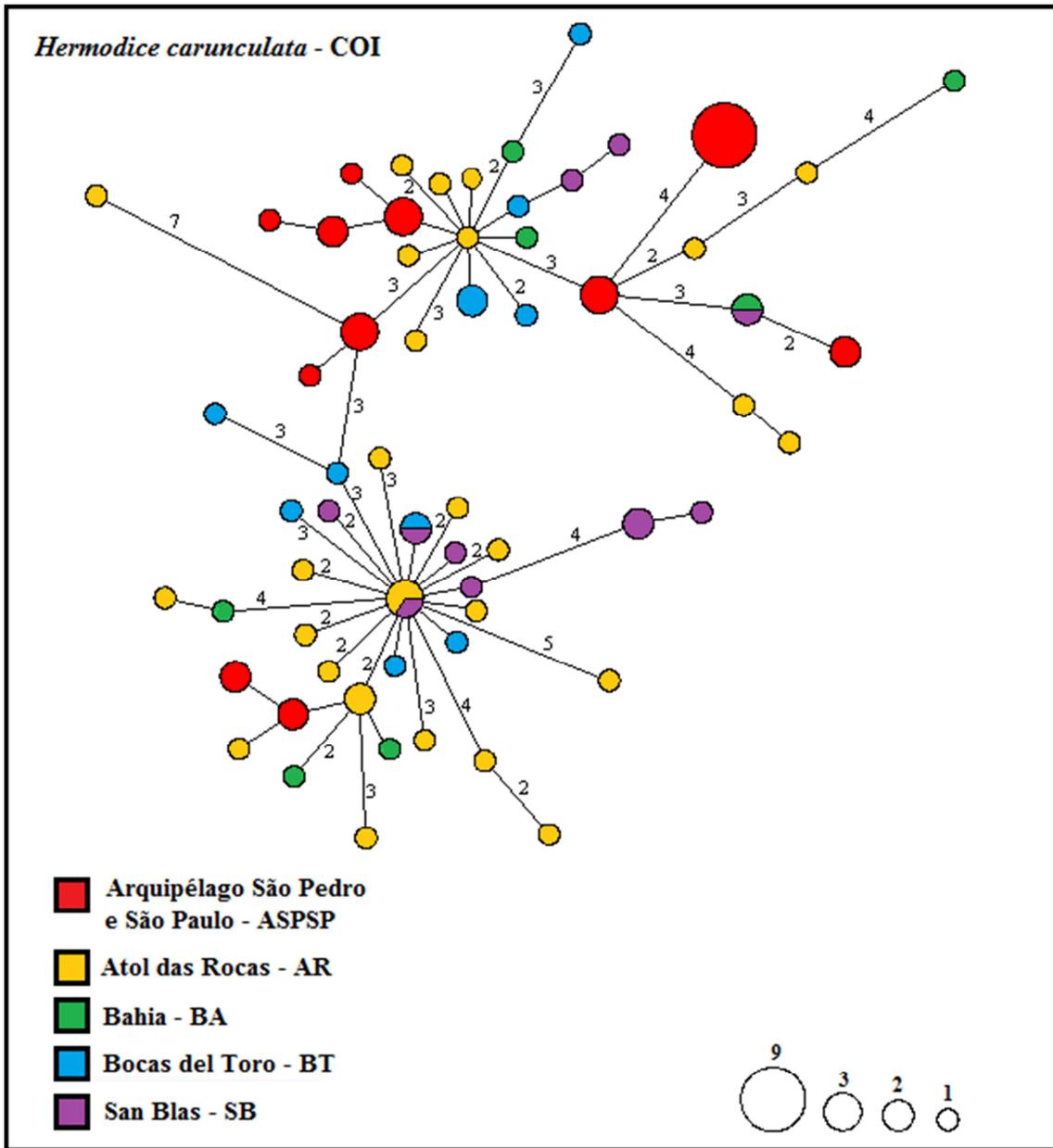
	ASPSP	AR	BA	BT	SB
ASPSP	----	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	0,4 (0,2)	0,4 (0,1)
AR	1,2 (0,2)	----	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)
BA	1,2 (0,2)	1,2 (0,2)	----	0,4 (0,2)	0,4 (0,2)
BT	1,0 (0,2)	1,0 (0,2)	1,0 (0,2)	----	0,3 (0,1)
SB	1,1 (0,2)	1,1 (0,2)	1,1 (0,2)	0,9 (0,2)	----

**Tabela 4.3.** Índices de diversidade molecular para *H. carunculata* com base nas sequências de COI. n – número de amostras; H – número de haplótipos; S – sítios segregantes; h - diversidade haplotípica;  $\pi$  - diversidade nucleotídica. ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

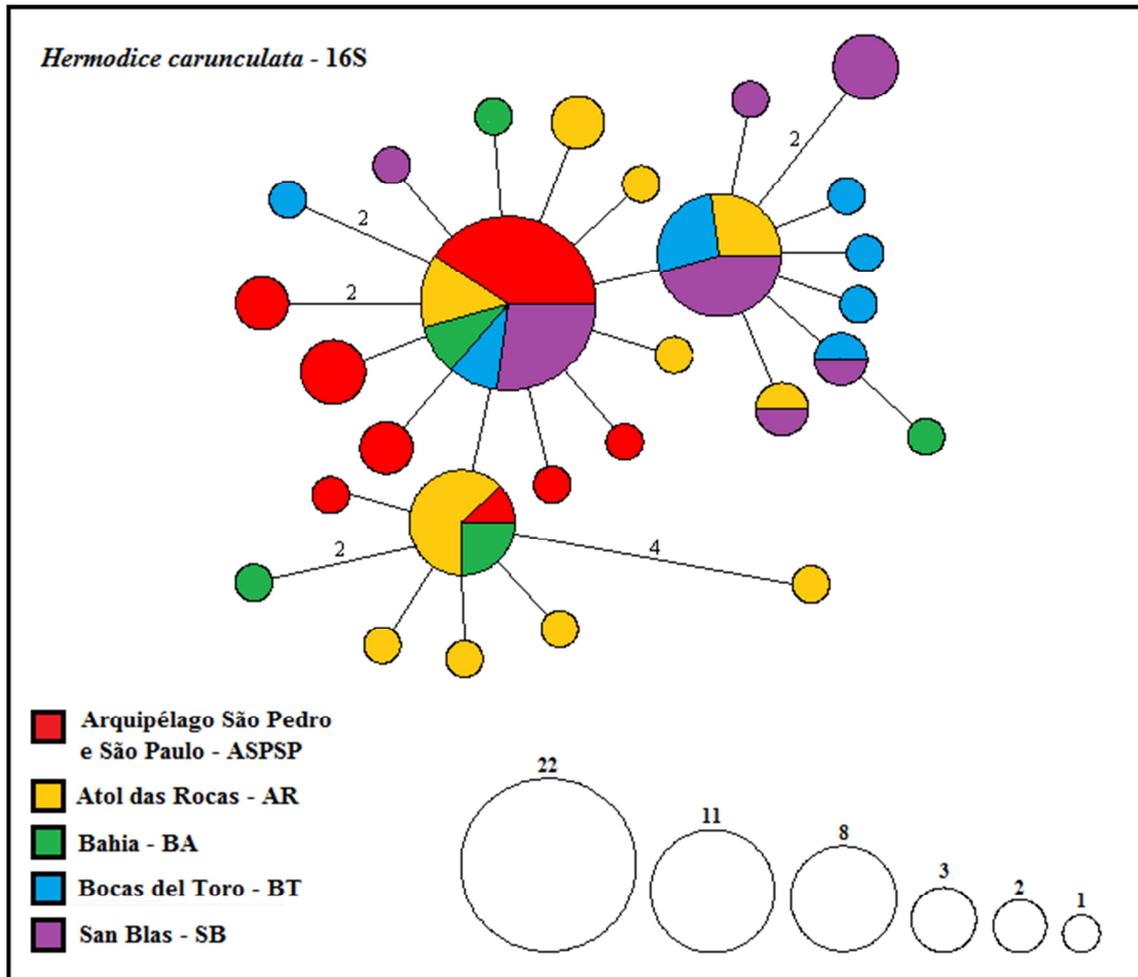
COI	n	H	S	h	$\pi$
ASPSP	29	11	21	0,879 (0,043)	0,00882 (0,00080)
AR	29	27	52	0,995 (0,011)	0,01110 (0,00094)
BA	7	7	23	1,000 (0,076)	0,01288 (0,00145)
BT	11	10	16	0,982 (0,046)	0,00792 (0,00063)
SB	11	10	16	0,982 (0,046)	0,00909 (0,00118)
Total	87	62	72	0,985 (0,006)	0,01069 (0,00004)

**Tabela 4.4.** Índices de diversidade molecular para *H. carunculata* com base nas sequências de 16S. n – número de amostras; H – número de haplótipos; S – sítios segregantes; h - diversidade haplotípica;  $\pi$  - diversidade nucleotídica. ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

16S	n	H	S	h	$\pi$
ASPSP	20	8	8	0,784 (0,084)	0,00259 (0,00051)
AR	20	11	12	0,911 (0,042)	0,00362 (0,00071)
BA	7	5	6	0,905 (0,103)	0,00418 (0,00111)
BT	10	7	7	0,911 (0,077)	0,00325 (0,00074)
SB	18	7	7	0,817 (0,060)	0,00299 (0,00048)
Total	75	28	31	0,883 (0,027)	0,00352 (0,00035)



**Figura 4.3.** Rede de haplótipos para *H. carunculata* baseada nas sequências de COI. Os círculos representam os haplótipos e o seu tamanho é proporcional a frequência dos mesmos. As cores indicam as localidades e os números ao lado dos ramos indicam a quantidade de passos mutacionais entre dois haplótipos, ramos sem número significam uma única mutação.



**Figura 4.4.** Rede de haplótipos para *H. carunculata* baseada nas sequências de 16S. Os círculos representam os haplótipos e o seu tamanho é proporcional a frequência dos mesmos. As cores indicam as localidades e os números ao lado dos ramos indicam a quantidade de passos mutacionais entre dois haplótipos, ramos sem número significam uma única mutação.

#### 4.1.3. Estruturação populacional

Na estimativa do grau de estruturação entre as populações de *H. carunculata*, a análise de  $F_{ST}$  (Tab. 4.5) apresentou valores significativos para todas as comparações com o ASPSP, em ambos os marcadores. As comparações entre AR  $\times$  BT, AR  $\times$  SB e BA  $\times$  SB, também foram significativas para a região do 16S. Os maiores valores de  $F_{ST}$  também estiveram associados as análises par-a-par envolvendo o ASPSP.

Para testar as hipóteses de estruturação através da AMOVA, a definição *a priori* das populações foi feita considerando os resultados da análise de  $F_{ST}$ , a ausência de estruturação (panmixia), a divisão entre costa e ilhas oceânicas e entre Atlântico Sul e Mar do Caribe. A porcentagem de variação referente a cada nível hierárquico e os valores dos índices de fixação podem ser visualizados na tabela 4.6.

**Tabela 4.5.** Valores de  $F_{ST}$  par a par entre as localidades de *H. carunculata* na região do COI (diagonal inferior) e 16S (diagonal superior). Os valores em negrito foram significativos ( $p < 0,05$ ). ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

	ASPSP	AR	BA	BT	SB
ASPSP	----	<b>0,135</b>	<b>0,111</b>	<b>0,236</b>	<b>0,208</b>
AR	<b>0,151</b>	----	-0,031	<b>0,088</b>	<b>0,099</b>
BA	<b>0,110</b>	-0,031	----	0,081	<b>0,100</b>
BT	<b>0,159</b>	0,026	0,009	----	-0,002
SB	<b>0,210</b>	0,036	0,030	0,064	----

**Tabela 4.6.** Valores da análise molecular da variância (AMOVA) para diferentes cenários de estruturação populacional em *H. carunculata*. Os valores em negrito foram significativos ( $p < 0,05$ ). ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

		g.l.	% de variação	Índices de fixação		
				$\Phi_{ST}$	$\Phi_{SC}$	$\Phi_{CT}$
<b>1. ASPSP + AR + BA + BT + SB</b>						
COI	Entre populações	4	10,59			
	Dentro das populações	82	89,41	<b>0,106</b>	----	----
	Total	86		$p < 0,001$		
16S	Entre populações	4	11,85			
	Dentro das populações	70	88,15	<b>0,118</b>	----	----
	Total	74		$p < 0,001$		
<b>2. ASPSP + AR / BA + BT + SB</b>						
COI	Entre grupos	1	-0,74			
	Entre populações dentro de grupos	3	11,07			
	Dentro das populações	82	89,67	<b>0,103</b>	<b>0,110</b>	-0,007
	Total	86		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,80$
16S	Entre grupos	1	4,23			
	Entre populações dentro de grupos	3	8,95			
	Dentro das populações	70	86,82	<b>0,132</b>	<b>0,093</b>	0,042
	Total	74		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,30$
<b>3. ASPSP + AR + BA / BT + SB</b>						
COI	Entre grupos	1	0,11			
	Entre populações dentro de grupos	3	10,53			
	Dentro das populações	82	89,36	<b>0,106</b>	<b>0,105</b>	0,001
	Total	86		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,60$
16S	Entre grupos	1	8,68			
	Entre populações dentro de grupos	3	6,19			
	Dentro das populações	70	85,13	<b>0,149</b>	<b>0,068</b>	0,087
	Total	74		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,10$
<b>4. ASPSP / AR + BA + BT + SB</b>						
COI	Entre grupos	1	12,94			
	Entre populações dentro de grupos	3	2,27			
	Dentro das populações	82	84,80	<b>0,152</b>	0,026	0,129
	Total	86		$p < 0,001$	$p = 0,12$	$p = 0,20$
16S	Entre grupos	1	9,29			
	Entre populações dentro de grupos	3	6,61			
	Dentro das populações	70	84,11	<b>0,159</b>	<b>0,078</b>	0,093
	Total	74		$p < 0,001$	$p = 0,01$	$p = 0,20$

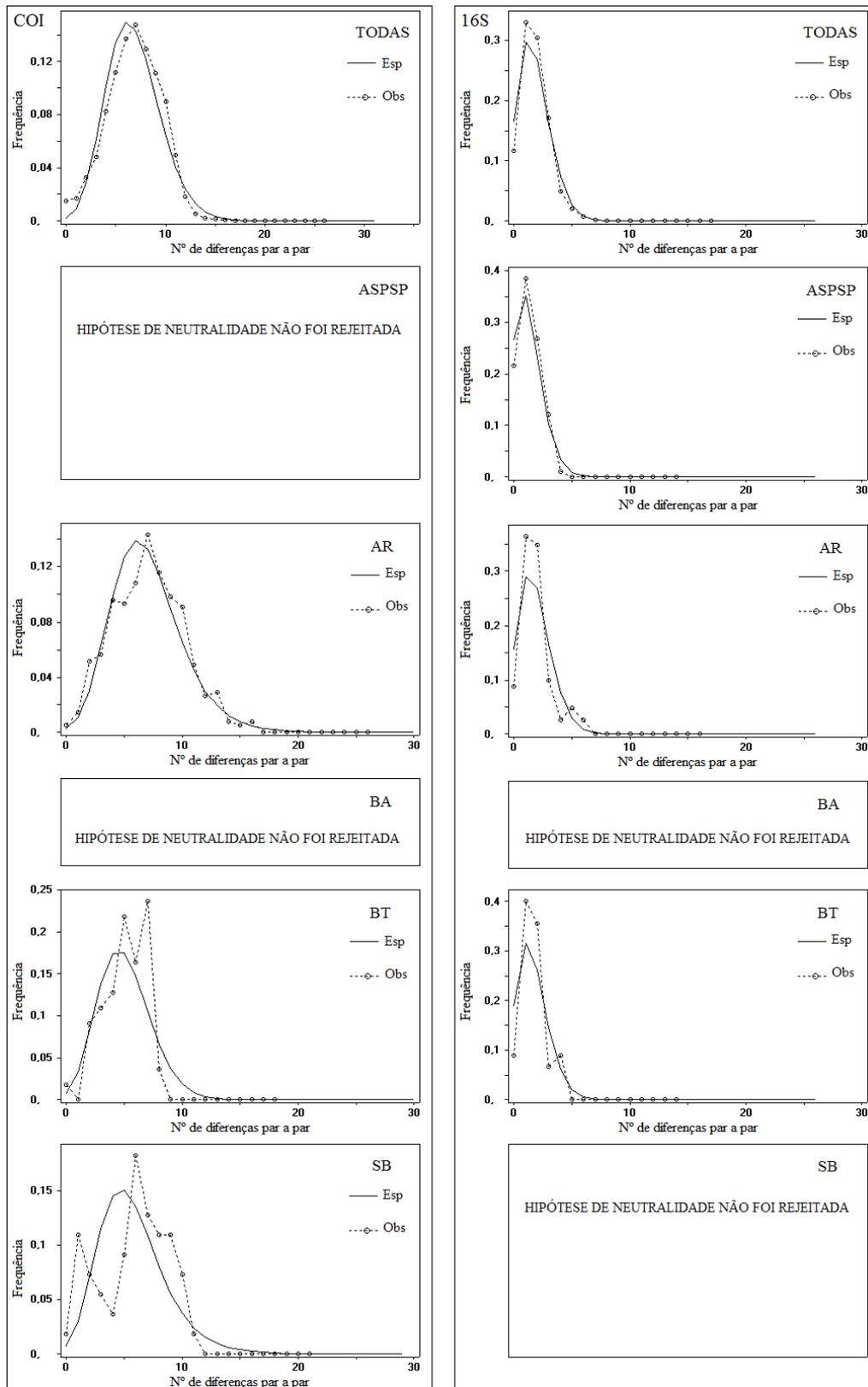
<b>5. ASPSP / AR + BA / BT + SB</b>						
<b>COI</b>	Entre grupos	2	10,56			
	Entre populações dentro de grupos	2	1,12			
	Dentro das populações	82	88,32	<b>0,117</b>	0,013	0,106
	Total	86		p<0,001	p=0,29	p=0,06
<b>16S</b>	Entre grupos	2	14,69			
	Entre populações dentro de grupos	2	-0,94			
	Dentro das populações	70	86,25	<b>0,138</b>	-0,011	0,147
	Total	74		p<0,001	p=0,68	p=0,07
<b>6. ASPSP / AR / BA + BT + SB</b>						
<b>COI</b>	Entre grupos	2	8,23			
	Entre populações dentro de grupos	2	3,08			
	Dentro das populações	82	88,69	<b>0,113</b>	0,034	0,082
	Total	86		p<0,001	p=0,13	p=0,39
<b>16S</b>	Entre grupos	2	7,92			
	Entre populações dentro de grupos	2	5,14			
	Dentro das populações	70	86,95	<b>0,131</b>	0,056	0,079
	Total	74		p<0,001	p=0,07	p=0,10
<b>7. ASPSP / AR + BA + BT / SB</b>						
<b>COI</b>	Entre grupos	2	11,93			
	Entre populações dentro de grupos	2	0,94			
	Dentro das populações	82	87,13	<b>0,129</b>	0,011	0,119
	Total	86		p<0,001	p=0,35	p=0,10
<b>16S</b>	Entre grupos	2	7,03			
	Entre populações dentro de grupos	2	5,98			
	Dentro das populações	70	86,99	<b>0,130</b>	<b>0,064</b>	0,070
	Total	74		p<0,001	p=0,05	p=0,20
<b>8. ASPSP / AR / BA + BT / SB</b>						
<b>COI</b>	Entre grupos	3	10,05			
	Entre populações dentro de grupos	1	0,79			
	Dentro das populações	82	89,16	<b>0,108</b>	0,009	0,101
	Total	86		p<0,001	p=0,30	p=0,19
<b>16S</b>	Entre grupos	3	1,64			
	Entre populações dentro de grupos	1	10,25			
	Dentro das populações	70	88,11	0,119	0,104	0,016
	Total	74		p<0,001	p=0,06	p=0,60

#### 4.1.4. Expansão populacional

A primeira etapa para determinar a ocorrência de eventos de expansão/redução populacional em *H. carunculata* foi feita através dos testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu (Tab. 4.7). As populações que desviaram significativamente da hipótese de seleção neutra foram submetidas a análise de distribuição das diferenças. Em todos os casos desta última análise, o comportamento observado das curvas não foi significativamente diferente do comportamento esperado para a expansão demográfica e espacial (Fig. 4.5; Tab. 4.8 e 4.9). Além disso, os gráficos do *Bayesian Skyline Plot* apontam um aumento no tamanho populacional efetivo ao longo do tempo (Fig. 4.6).

**Tabela 4.7.** Valores dos testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu das localidades de *H. carunculata* para a região do COI e 16S. Os valores em negrito foram significativos ( $p < 0,05$ ). ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

<b>COI</b>	Tajima D	p	Fs de Fu	p
ASPSP	0,17206	0,631	0,06269	0,557
AR	-1,75289	<b>0,020</b>	-21,54789	<b>0,000</b>
BA	-0,72052	0,272	-1,93462	0,080
BT	-0,34785	0,404	-4,49310	<b>0,006</b>
SB	0,26040	0,652	-3,96882	<b>0,020</b>
Todas	-1,72679	<b>0,015</b>	-25,02013	<b>0,000</b>
<b>16S</b>	Tajima D	p	Fs de Fu	p
ASPSP	-1,38798	0,083	-3,77815	<b>0,003</b>
AR	-1,61796	<b>0,042</b>	-6,52799	<b>0,001</b>
BA	-0,63505	0,309	-1,39926	0,100
BT	-1,38265	0,093	-3,89094	<b>0,000</b>
SB	-0,83237	0,223	-2,27071	0,039
Todas	-2,25909	<b>0,000</b>	-27,18082	<b>0,000</b>



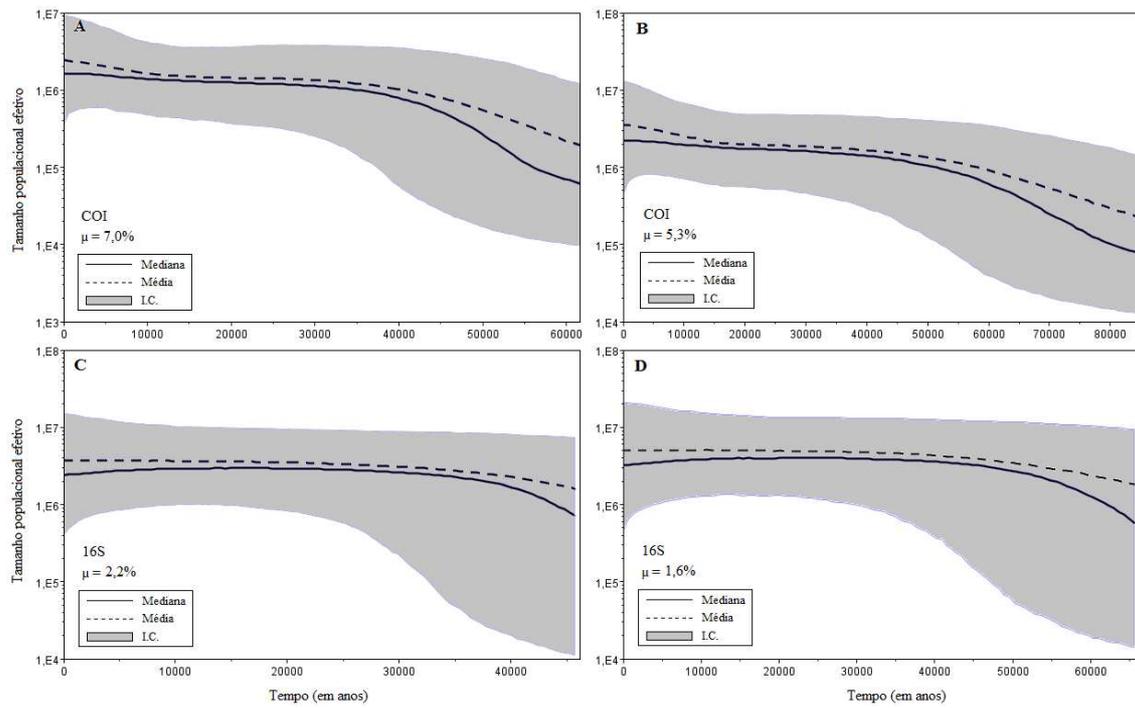
**Figura 4.5.** Análise de distribuição das diferenças das populações de *H. carunculata* para a região do COI (esquerda) e 16S (direita). Esp – curva esperada para expansão populacional; Obs – curva observada. ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

**Tabela 4.8.** Parâmetros estimados para a análise de distribuição das diferenças em *H. carunculata* sob um cenário de expansão demográfica. I.C. – intervalo de confiança para os parâmetros  $\tau$ ,  $\theta_0$  e  $\theta_1$ ; T – tempo em anos decorrido desde a expansão; tx – taxa de mutação; SSD – soma dos quadrados dos desvios;  $p_{SSD}$  – valor de p associado; r – índice de *raggedness*;  $p_r$  – valor de p associado; ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

		$\tau$	$\theta_0$	$\theta_1$	T (tx)	SSD	r
		I.C.	I.C.	I.C.	(anos)	$p_{SSD}$	$p_r$
COI	<b>Todas</b>	7,3	0,004	92,344	81.985 (7,0%)	0,001	0,007
		(4,08 - 9,25)	(0 - 3,12)	(29,57 - 99999)	108.282 (5,3%)	0,665	0,737
16S		1,8	0	99999	79.744 (2,2%)	0,005	0,079
		(1,34 - 2,46)	(0 - 0,21)	(6,18 - 99999)	109.649 (1,6%)	0,115	0,046
COI	<b>ASPSP</b>	----	----	----	----	----	----
16S		1,4	0	99999	62.023 (2,2%)	0,004	0,076
		(0,00 - 2,50)	(0 - 0,73)	(1,91 - 99999)	85.282 (1,6%)	0,628	0,432
COI	<b>AR</b>	6,4	1,183	57,637	71.877 (7,0%)	0,002	0,008
16S		(3,94 - 10,65)	(0 - 4,18)	(24,04 - 99999)	94.932 (5,3%)	0,814	0,869
		1,8	0	99999	79.744 (2,2%)	0,023	0,143
16S		(0,39 - 3,12)	(0 - 1,02)	(2,06 - 99999)	109.649 (1,6%)	0,114	0,069
		----	----	----	----	----	----
COI	<b>BA</b>	----	----	----	----	----	----
COI	<b>BT</b>	5,7	0,007	99999	64.016 (7,0%)	0,019	0,067
		(2,21 - 8,46)	(0 - 3,97)	(17,52 - 99999)	84.549 (5,3%)	0,286	0,295
16S		1,7	0	99999	75.314 (2,2%)	0,033	0,191
		(0,00 - 3,80)	(0 - 1,86)	(1,32 - 99999)	103.557 (1,6%)	0,208	0,166
COI	<b>SB</b>	7,5	0,004	21,680	84.231 (7,0%)	0,013	0,029
16S		(1,43 - 12,66)	(0 - 4,58)	(5,97 - 99999)	111.249 (5,3%)	0,733	0,846
		----	----	----	----	----	----

**Tabela 4.9.** Parâmetros estimados para a análise de distribuição das diferenças em *H. carunculata* sob um cenário de expansão espacial. I.C. – intervalo de confiança para os parâmetros  $\tau$ ,  $\theta$  e  $M$ ;  $T$  – tempo em anos decorrido desde a expansão;  $tx$  – taxa de mutação;  $SSD$  – soma dos quadrados dos desvios;  $p_{SSD}$  – valor de  $p$  associado;  $r$  – índice de *raggedness*;  $p_r$  – valor de  $p$  associado; ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

		$\tau$	$\theta$	$M$	$T (tx)$	$SSD$	$r$
		I.C.	I.C.	I.C.	(anos)	$p_{SSD}$	$p_r$
COI	<b>Todas</b>	7,2	0,008	67,461	80.863 (7,0%)	0,001	0,007
		(4,50 - 8,31)	(0 - 2,20)	(42,02 - 2197)	106.800 (5,3%)	0,677	0,888
16S		1,8	0,001	99999	79.744 (2,2%)	0,005	0,079
		(0,99 - 2,31)	(0 - 0,86)	(10,54 - 99999)	109.649 (1,6%)	0,073	0,059
COI	<b>ASPSP</b>	----	----	----	----	----	----
16S		1,4	0,003	99999	62.023 (2,2%)	0,004	0,076
		(0,41 - 2,40)	(0 - 1,15)	(2,42 - 99999)	85.282 (1,6%)	0,490	0,445
COI	<b>AR</b>	5,6	1,936	239,731	62.893 (7,0%)	0,003	0,008
16S		(3,54 - 8,82)	(0 - 6,81)	(73,05 - 99999)	83.066 (5,3%)	0,590	0,814
		1,8	0,001	99999	79.744 (2,2%)	0,023	0,143
		(0,59 - 2,65)	(0 - 1,28)	(3,78 - 99999)	109.649 (1,6%)	0,082	0,075
	<b>BA</b>	----	----	----	----	----	----
COI	<b>BT</b>	5,7	0,003	99999	64.016 (7,0%)	0,019	0,067
16S		(2,57 - 7,79)	(0 - 3,22)	(62,87 - 99999)	84.549 (5,3%)	0,255	0,269
		1,7	0,003	99999	75.314 (2,2%)	0,033	0,191
		(0,68 - 3,24)	(0 - 1,28)	(1,57 - 99999)	103.557 (1,6%)	0,222	0,200
COI	<b>SB</b>	5,9	1,324	37,041	66.262 (7,0%)	0,020	0,029
16S		(3,24 - 10,01)	(0 - 5,12)	(9,38 - 99999)	87.516 (5,3%)	0,406	0,797
		----	----	----	----	----	----



**Figura 4.6.** Resultados do *Bayesian Skyline Plot* de *H. carunculata* para a região do COI (A e B) e 16S (C e D). Os gráficos foram obtidos através das taxas de mutação de 7,0 e 5,3% para o COI e 2,2 e 1,6% para o 16S. Linha sólida – mediana; Linha pontilhada – média; área em cinza – intervalo de confiança de 95%.

**4.1.5. Estimativa de fluxo gênico e tamanho populacional efetivo**

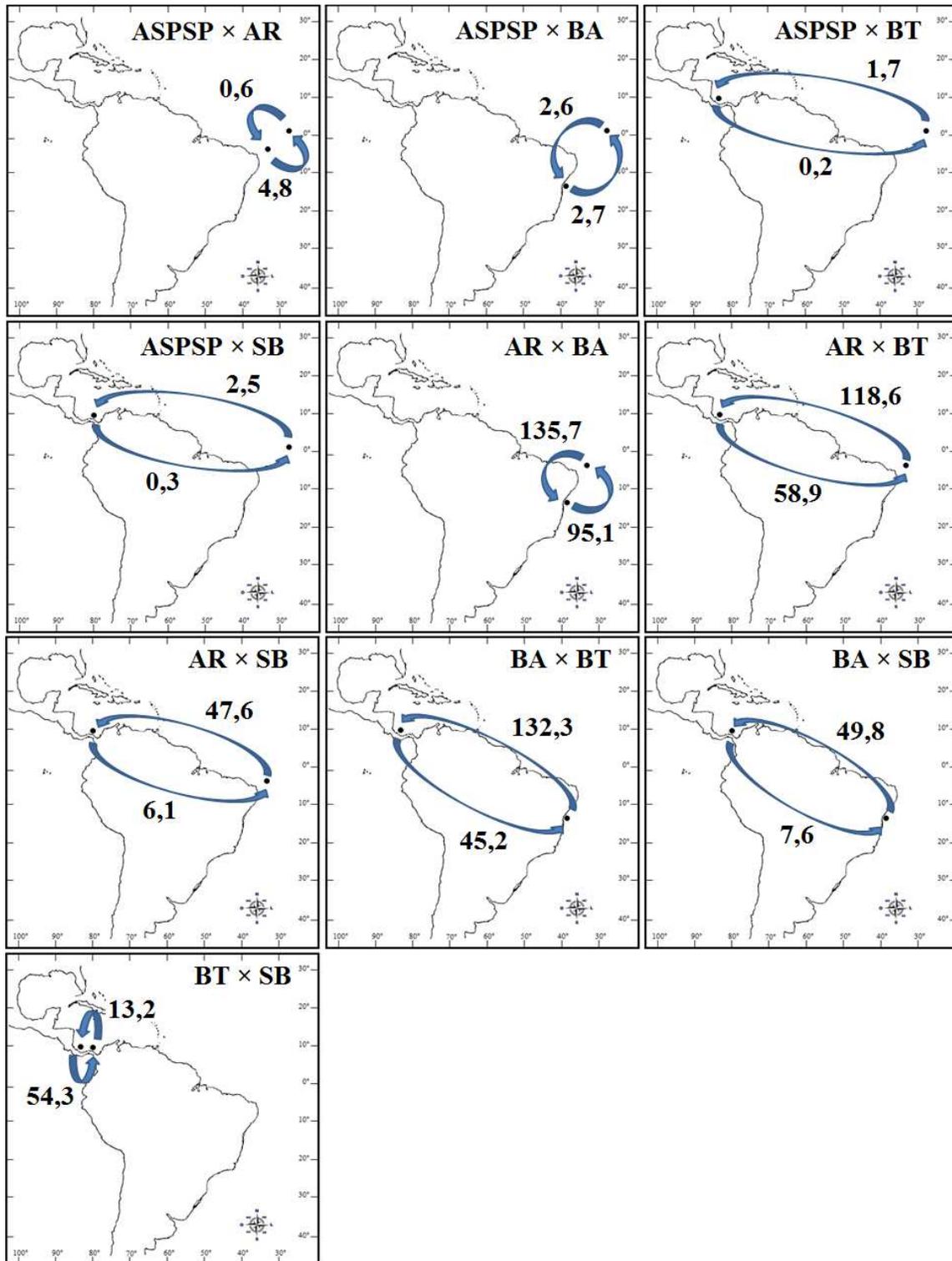
Os valores de  $\theta$ ,  $M$  e o número de migrantes efetivos por geração ( $N_{em}$ ) entre as localidades podem ser visualizados na tabela 4.10 e figura 4.7. O resultado da estimativa do tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) para cada localidade está representado na tabela 4.11.

**Tabela 4.10.** Valores estimados de  $\theta$ , número de migrantes efetivos por geração ( $N_{em}$ ) e taxa de migração ( $M$ ) para *H. carunculata*. Os valores de  $\theta$  estão representados na diagonal. Nas outras células estão os valores de  $N_{em}$  e  $M$  (entre parênteses). A primeira linha representa as localidades doadoras, enquanto que a primeira coluna indica as localidades receptoras. ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

	<b>ASPSP</b>	<b>AR</b>	<b>BA</b>	<b>BT</b>	<b>SB</b>
<b>ASPSP</b>	0,00207	4,8 (25,5)	2,7 (23,5)	0,2 (2,5)	0,3 (35,5)
<b>AR</b>	0,6 (297,5)	0,18993	95,1 (831,5)	58,9 (721,5)	6,1 (675,5)
<b>BA</b>	2,6 (1.239,5)	135,7 (714,5)	0,11434	45,2 (553,5)	7,6 (850,3)
<b>BT</b>	1,7 (838,5)	118,6 (624,5)	132,3 (1.157,5)	0,08167	13,2 (1.470,5)
<b>SB</b>	2,5 (1.189,5)	47,6 (250,5)	49,8 (435,5)	54,3 (665,5)	0,009

**Tabela 4.11.** Valores estimados para o tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) para as localidades de *H. carunculata*. Resultados baseados nas estimativas de  $\theta$ , demonstrados na tabela 4.10, levando em conta diferentes taxas de mutação ( $\mu$ ) para o COI e 16S. ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

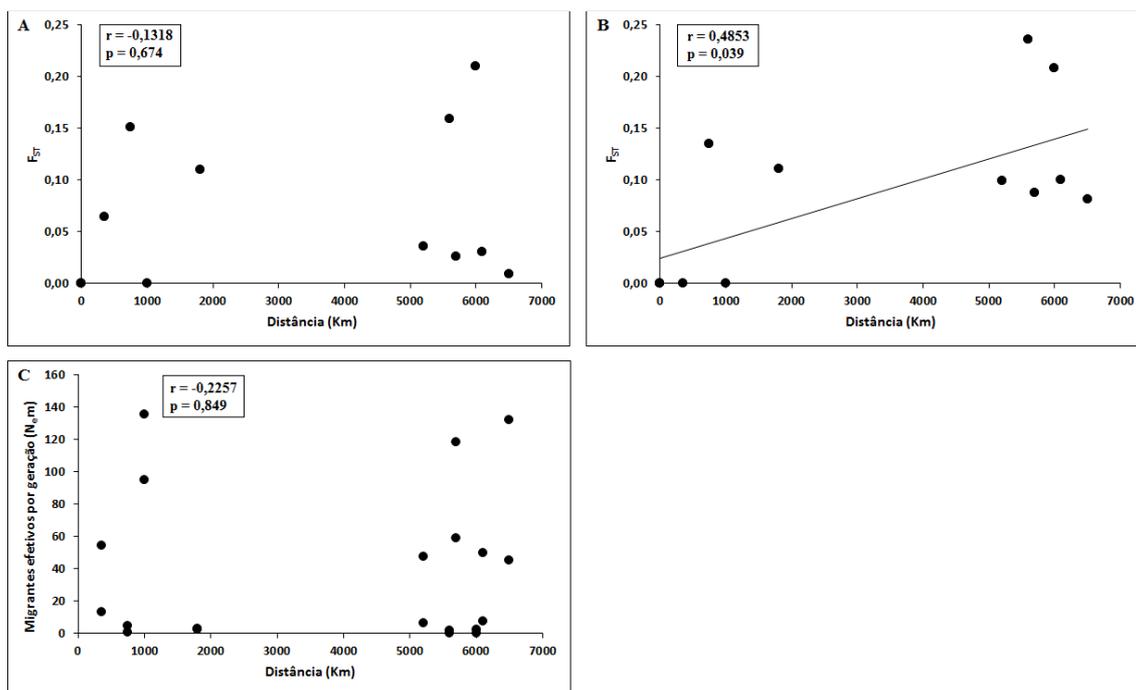
	<b>COI</b>		<b>16S</b>	
$\mu$	$7,0 \times 10^{-8}$	$5,3 \times 10^{-8}$	$2,2 \times 10^{-8}$	$1,6 \times 10^{-8}$
<b>ASPSP</b>	29.571	39.057	94.091	129.375
<b>AR</b>	2.713.286	3.583.585	8.633.182	11.870.625
<b>BA</b>	1.633.429	2.157.358	5.197.273	7.146.250
<b>BT</b>	1.166.714	1.540.943	3.712.273	5.104.375
<b>SB</b>	128.571	169.811	409.091	562.500



**Figura 4.7.** Mapas representando os valores de fluxo gênico assimétrico entre as localidades de *H. carunculata*. Os valores representam o número de migrantes efetivos por geração. ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia; BT – Bocas del Toro; SB – San Blás.

#### 4.1.6. Isolamento por distância (teste de Mantel)

O teste de Mantel comparando os valores de  $F_{ST}$  (Fig. 4.8A e B) e o número de migrantes efetivos por geração (Fig. 4.8C) com a distância geográfica, teve uma correlação estatisticamente significativa apenas para a relação entre os valores de  $F_{ST}$  para as sequências de 16S e distância geográfica (Fig. 4.8B).



**Figura 4.8.** Teste de Mantel comparando os valores de  $F_{ST}$  (A – COI e B – 16S) e número de migrantes efetivos por geração (C) com a distância geográfica entre as localidades de *H. carunculata*.

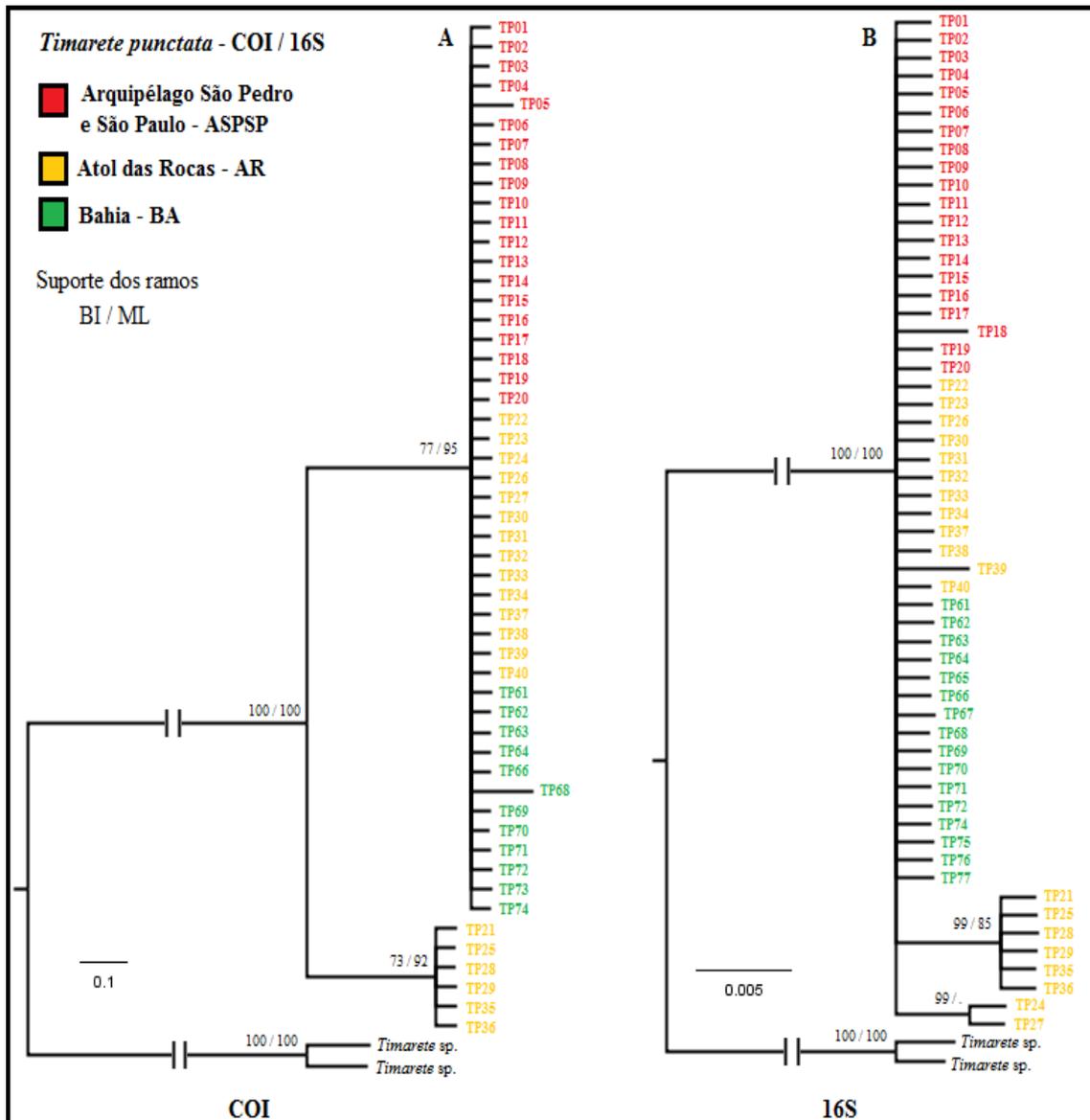
## 4.2. *Timarete punctata*

Dentre as sequências de *T. punctata* obtidas, três indivíduos da Bahia pertenciam a uma espécie geneticamente diferente, com valores de distância  $p$  maiores que 17%, para COI, e 12%, para 16S (resultados não apresentados). Com isso o total de sequências analisadas para a Bahia passou de 20 para 17. Além destas, cinco sequências de COI e uma de 16S foram descartadas devido a baixa qualidade do sequenciamento. Na região do COI, foram utilizados 632 pb, sendo contabilizados 12 sítios polimórficos, nove sítios informativos para a parcimônia e três sítios únicos. No 16S foram aproveitados 540 pb, sendo 5 sítios polimórficos, 3 informativos para a parcimônia e 2 sítios únicos.

### 4.2.1. Análise filogenética

Ambas as topologias para o COI (Fig. 4.9A) recuperaram dois grupos reciprocamente monofiléticos, sendo um deles formado por indivíduos de todas as localidades (PP = 77; BS = 95) e o outro por apenas seis do AR (PP = 73; BS = 92). Nas topologias de 16S (Fig. 4.9B) os mesmos seis indivíduos do AR foram agrupados em um clado (PP = 99; BS = 85), enquanto que o restante formou basicamente uma politomia, diferentemente do observado para o COI. Em ambos os marcadores e topologias o comprimento dos ramos entre a maioria das amostras dentro de cada grupo foi igual zero, indicando uma grande homogeneidade entre as sequências.

A formação de um clado com alguns indivíduos (6) do AR pode indicar uma forte estruturação populacional ou a presença de outra espécie proximalmente relacionada. Sendo assim, para o restante das análises a população do AR foi dividida em duas (AR1 e AR2).



**Figura 4.9.** Árvores filogenéticas de *H. carunculata* baseadas em sequências de COI (A) e 16S (B), recuperadas por inferência Bayesiana (BI). Os números representam o suporte dos ramos para a inferência Bayesiana e máxima verossimilhança (ML). Apenas valores acima de 70 estão demonstrados.

#### 4.2.2. Variabilidade, diversidade molecular e rede de haplótipos

A média da distância  $p$  para todos os indivíduos de *T. punctata* foi 0,3% para o COI e 0,1% para o 16S, com os valores variando entre 0,0% a 1,7% e 0,0% a 0,6%, respectivamente. Para ambos os marcadores, os valores médios de distância  $p$  dentro e entre as localidades estão representados nas tabelas 4.12 e 4.13, respectivamente.

Os valores referentes ao número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (h) e nucleotídica ( $\pi$ ), para as 52 sequências de COI e 56 de 16S, podem ser visualizados nas tabelas 4.14 e 4.15, respectivamente.

A relação dos haplótipos de *T. punctata*, assim como a distribuição ao longo das localidades, pode ser observada através da rede de haplótipos (Fig. 4.10). Ambos os marcadores foram caracterizados pela presença de um haplótipo principal, que está presente na maioria dos indivíduos.

**Tabela 4.12.** Valores de distância *p* par-a-par (%) dentro das localidades de *T. punctata*. Min. (menor valor); Max. (maior valor); Parênteses com os valores de desvio padrão. ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia.

	COI		16S	
	Média (%)	Min. - Máx. (%)	Média (%)	Min. - Máx. (%)
ASPSP	0,02 (0,0)	0,0 - 0,2	0,02 (0,0)	0,0 - 0,2
AR1	0,00 (0,0)	0,0 - 0,0	0,08 (0,0)	0,0 - 0,4
AR2	0,00 (0,0)	0,0 - 0,0	0,00 (0,0)	0,0 - 0,0
BA	0,05 (0,0)	0,0 - 0,3	0,00 (0,0)	0,0 - 0,0

**Tabela 4.13.** Valores médios de distância *p* par-a-par (%) entre as localidades de *T. punctata*, para a região do COI (diagonal inferior) e 16S (diagonal superior). Parênteses com os valores de desvio padrão. ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia.

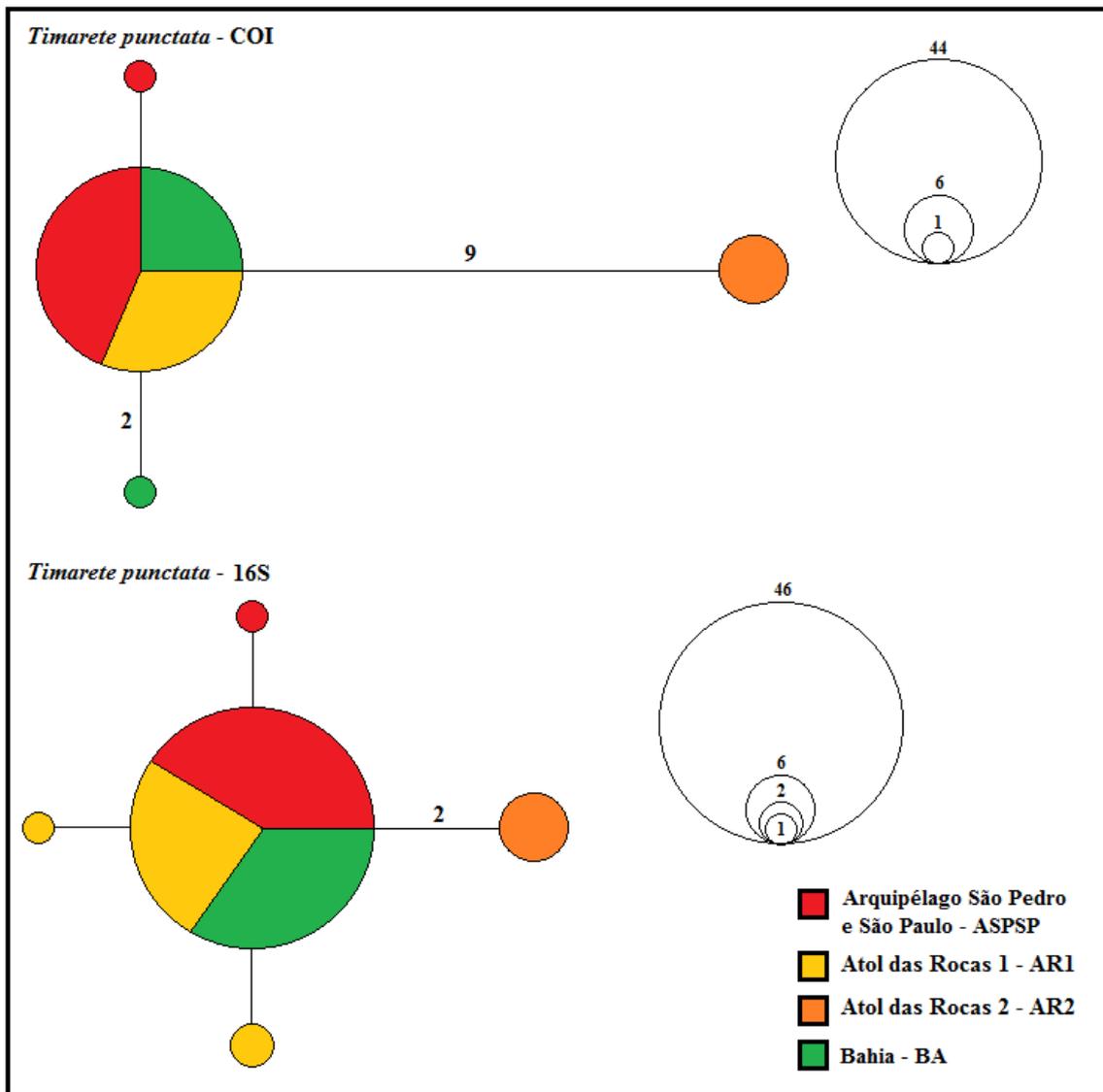
	ASPSP	AR1	AR2	BA
ASPSP	----	0,05 (0,0)	0,38 (0,3)	0,01 (0,0)
AR1	0,01 (0,0)	----	0,41 (0,3)	0,04 (0,0)
AR2	1,43 (0,4)	1,42 (0,4)	----	0,37 (0,3)
BA	0,03 (0,0)	0,03 (0,0)	1,45 (0,4)	----

**Tabela 4.14.** Índices de diversidade molecular para *T. punctata* com base nas sequências de COI. n – número de amostras; H – número de haplótipos; S – sítios segregantes; h - diversidade haplotípica;  $\pi$  - diversidade nucleotídica. ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia.

COI	n	H	S	h	$\pi$
ASPSP	20	2	1	0,100 (0,088)	0,00016 (0,00014)
AR1	14	1	0	0	0
AR2	6	1	0	0	0
BA	12	2	2	0,167 (0,134)	0,00053 (0,00042)
Total	52	4	12	0,275 (0,076)	0,00315 (0,00097)

**Tabela 4.15.** Índices de diversidade molecular para *T. punctata* com base nas sequências de 16S. n – número de amostras; H – número de haplótipos; S – sítios segregantes; h - diversidade haplotípica;  $\pi$  - diversidade nucleotídica. ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia.

16S	n	H	S	h	$\pi$
ASPSP	20	2	1	0,100 (0,088)	0,00019 (0,00016)
AR1	14	3	2	0,385 (0,149)	0,00075 (0,00032)
AR2	6	1	0	0	0
BA	16	1	0	0	0
Total	56	5	5	0,318 (0,077)	0,00098 (0,00026)



**Figura 4.10.** Rede de haplótipos para *T. punctata* baseada nas sequências de COI e 16S. Os círculos representam os haplótipos e o seu tamanho é proporcional a frequência dos mesmos. As cores indicam as localidades e os números ao lado dos ramos indicam a quantidade de passos mutacionais entre dois haplótipos, ramos sem número significam uma única mutação.

#### 4.2.3. Estruturação populacional

Na estimativa do grau de estruturação entre as populações de *T. punctata*, a análise de  $F_{ST}$  (Tab. 4.16), apresentou valores altos e significativos somente para as comparações envolvendo os indivíduos de AR2, em ambos os marcadores. No restante das comparações os valores foram baixos e não significativos.

Para testar as hipóteses de estruturação através da AMOVA, a definição *a priori* das populações foi feita considerando os resultados da análise de  $F_{ST}$  e a ausência de estruturação (panmixia). A porcentagem de variação referente a cada nível hierárquico e os valores dos índices de fixação podem ser visualizados na tabela 4.17.

**Tabela 4.16.** Valores de  $F_{ST}$  par a par entre as localidades de *T. punctata* na região do COI (diagonal inferior) e 16S (diagonal superior). Os valores em negrito foram significativos ( $p < 0,05$ ). ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia.

	ASPSP	AR1	AR2	BA
ASPSP	----	0,060	<b>0,962</b>	-0,012
AR1	-0,019	----	<b>0,871</b>	0,064
AR2	<b>0,991</b>	<b>1,000</b>	----	<b>1,000</b>
BA	0,021	0,013	<b>0,975</b>	----

**Tabela 4.17.** Valores da análise molecular da variância (AMOVA) para dois cenários de estruturação populacional em *T. punctata*. Os valores em negrito foram significativos ( $p < 0,05$ ). ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia.

		g.l.	% de variação	Índices de fixação		
				$\Phi_{ST}$	$\Phi_{SC}$	$\Phi_{CT}$
<b>1. ASPSP + AR1 + AR2 + BA</b>						
<b>COI</b>	Entre populações	3	95,69			
	Dentro das populações	48	4,31	<b>0,957</b>	----	----
	Total	51		$p < 0,001$		
<b>16S</b>	Entre populações	3	79,58			
	Dentro das populações	52	20,42	<b>0,796</b>	----	----
	Total	55		$p < 0,001$		
<b>2. ASPSP + AR1 + BA / AR2</b>						
<b>COI</b>	Entre grupos	1	98,70			
	Entre populações dentro de grupos	2	0,03			
	Dentro das populações	48	1,27	<b>0,987</b>	0,020	0,987
	Total	51		$p < 0,001$	$p = 0,35$	$p = 0,25$
<b>16S</b>	Entre grupos	1	93,09			
	Entre populações dentro de grupos	2	0,42			
	Dentro das populações	52	6,49	<b>0,935</b>	<b>0,061</b>	0,931
	Total	55		$p < 0,001$	$p = 0,04$	$p = 0,25$

#### 4.2.4. Expansão populacional

A primeira etapa para determinar a ocorrência de eventos de expansão/redução populacional em *T. punctata* foi feita através dos testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu (Tab. 4.18). Como nenhum valor desviou significativamente da hipótese de neutralidade, a análise de distribuição das diferenças não foi realizada para testar possíveis eventos de expansão populacional. Os gráficos do *Bayesian Skyline Plot* também não foram realizados devido a baixa quantidade de informação genética contida nas sequências de *T. punctata*.

**Tabela 4.18.** Valores dos testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu das localidades de *T. punctata* para a região do COI e 16S. Nenhum valor foi significativo ( $p < 0,05$ ). ASPSP – Arquipélago de São Pedro e São Paulo; AR – Atol das Rocas; BA – Bahia.

<b>COI</b>	Tajima D	p	Fs de Fu	p
ASPSP	-1,16439	0,147	-0,87930	0,071
AR1	0	1,000	0	----
AR2	0	1,000	0	----
BA	-1,45138	0,081	0,43183	0,356
Todas	-0,73773	0,260	3,30437	0,918
<b>16S</b>	Tajima D	p	Fs de Fu	p
ASPSP	-1,16439	0,159	-0,87930	0,069
AR1	-0,95919	0,253	-0,85452	0,089
AR2	0	1,000	0	----
BA	0	1,000	0	----
Todas	-1,21222	0,114	-1,73661	0,102

#### 4.2.5. Estimativa de fluxo gênico e tamanho populacional efetivo

As estimativas de  $\theta$ , M, número de migrantes efetivos por geração ( $N_e m$ ) e tamanho populacional efetivo não foram realizadas para *T. punctata* devido a baixa quantidade de polimorfismo encontradas nas sequências.

#### **4.2.6. Isolamento por distância (teste de Mantel)**

O teste de Mantel para testar a hipótese de isolamento por distância não foi realizado devido a baixa quantidade de polimorfismo e aos elevados valores de  $F_{ST}$  encontrados nas comparações com os indivíduos de AR2.

## 5. Discussão

### 5.1. Marcadores moleculares

Apesar dos esforços para obter diferentes respostas ao processo evolutivo, só foi possível a utilização dos marcadores mitocondriais (COI e 16S), visto que o marcador nuclear aqui utilizado (ITS) não foi considerado confiável devido a presença de múltiplas cópias. Sendo assim, os resultados aqui obtidos remontam processos evolutivos históricos, a princípio, contados a partir das linhagens maternas (Avise, 2004).

Devido a estrutura circular do DNA mitocondrial, os genes que nele se encontram podem ser vistos como tendo certa dependência, porém sabe-se que diferentes regiões (e genes) sofrem diferentes pressões seletivas devido as diferentes funções biológicas que exercem (Avise, 2004). Desta forma, os marcadores mitocondriais utilizados nesta dissertação foram analisados separadamente, possibilitando a detecção de diferentes histórias evolutivas, caso houvesse (Knowles, 2009). Os padrões gerais aqui observados entre os diferentes marcadores não foram contrastantes, sendo as pequenas diferenças provavelmente associadas as respectivas taxas de mutação, visto que, geralmente, o COI evolui mais rápido que o 16S. Como esperado, a quantidade de variação aqui observada para o COI foi maior do que a do 16S.

## 5.2. *Hermodice carunculata*

### 5.2.1. *H. carunculata*: uma espécie com ampla distribuição geográfica

Os resultados obtidos nas análises filogenéticas (COI - Fig. 4.1 e 16S - 4.2) e nos valores de distância genética (Tab. 4.1 e 4.2) indicam claramente que os indivíduos de *H. carunculata* amostrados, ao longo de todas as localidades, pertencem a mesma espécie.

Nas árvores filogenéticas (Fig. 4.1 e 4.2), apesar da recuperação de alguns grupos monofiléticos, estes apresentam ramos curtos e suportes estatísticos pouco confiáveis. Além disso, tais grupos não são formados preferencialmente por indivíduos de uma única localidade e sim de todas elas. Quanto a distância genética, às comparações individuais não apresentaram um grande intervalo entre os valores e sim um gradiente, com os valores variando de 0 até 2,5% de distância *p*. Além disso, as médias das distâncias genéticas demonstram que a variabilidade presente dentro das localidades é praticamente igual a variabilidade entre as localidades (Tab. 4.1 e 4.2), padrão semelhante ao encontrado para *Harmothoe imbricata* (Polynoidae) (Nygren *et al.*, 2011). Tais resultados reforçam a hipótese de que *H. carunculata* é naturalmente uma espécie amplamente distribuída.

Em relação ao COI, os valores médios encontrados dentro das localidades (Tab. 4.1 -  $0,8\% < p < 1,3\%$ ), são de forma geral um pouco maiores que os encontrados para outras espécies de poliqueta (Schulze *et al.*, 2000; Jolly *et al.*, 2005; Drake *et al.*, 2007; Nygren *et al.*, 2009), apesar dos modelos utilizados para o cálculo não serem os mesmos (K2P, HKY e TVM). Valores superiores aos aqui encontrados foram observados dentro de duas espécies de *Hediste* (Nereididae) presentes no Mar Báltico, aonde os valores mais altos de distância *p* foram 3,9% e 7,3%, sendo este segundo explicado pela estruturação populacional entre regiões (Audzijonyte *et al.*, 2008). No trabalho de

Barroso e colaboradores (2010) com *Eurythoe* (Amphinomidae), também foram observados valores de distância genética superiores ( $K2P = 2,0\%$ ), porém estes foram associados a distâncias geográficas mais amplas. Quanto ao 16S, os valores médios dentro das localidades ( $0,3\% < p < 0,4\%$ ) foram maiores do que os encontrados para duas espécies de *Paranaitis* (Phyllodocidae) ( $0,06\% - K2P$ ) (Nygren *et al.*, 2009), porém semelhantes se comparados com os valores mínimos e máximos (distância  $p$ ) dentro de três linhagens de *Marenzelleria* (Spionidae) (Bastrop *et al.*, 1998).

Entre as localidades, os valores médios de distância genética para o COI (Tab. 4.2 -  $0,9\% < p < 1,2\%$ ) foram ligeiramente menores aos encontrados para *H. imbricata* (Polynoidae) de diferentes localidades dos Mares do Norte e da Groelândia ( $1,43\% < K2P < 1,74\%$ ) (Nygren *et al.*, 2011). Apesar das suspeitas sobre a existência de espécies crípticas, devido a grande variação na coloração, Nygren e colaboradores (2011) consideraram todos os indivíduos como sendo da mesma espécie. Em *H. carunculata* certa plasticidade na coloração foi ressaltada por Barroso & Paiva (2007) e, apesar destes autores acharem pouco provável, a presença de espécies crípticas não foi totalmente descartada. Entretanto, a partir dos resultados moleculares aqui encontrados, juntamente com a observação *a posteriori* da coloração dos indivíduos, fica evidente que tais diferenças são apenas variações morfológicas intraespecíficas, como observado para *H. imbricata* (Nygren *et al.*, 2011).

Um trabalho semelhante ao desenvolvido aqui, analisou indivíduos de *Eurythoe complanata* amostrados no Oceano Pacífico, Mar do Caribe, costa do Brasil e ilhas oceânicas do Atlântico Sul (Barroso *et al.*, 2010). Entretanto, diferentemente de *H. carunculata*, Barroso e colaboradores (2010), encontraram três espécies crípticas: (1) uma no Pacífico; (2) uma restrita as Ilhas Oceânicas; e (3) outra ocorrendo nas Ilhas e

na costa, como observado em *H. carunculata*. Além deste, muitos trabalhos moleculares envolvendo espécies de poliqueta tem observado, mesmo entre regiões geograficamente próximas, a existência de espécies crípticas (Bastrop *et al.*, 1998; Bleidorn *et al.*, 2006; Audzijonyte *et al.*, 2008; Rice *et al.*, 2008; Iannotta *et al.*, 2009; Barroso *et al.*, 2010; Hilário *et al.*, 2010; Nygren & Pleijel, 2010; Schüller, 2011) ou pseudo-crípticas (Nygren *et al.*, 2009 e 2010a; Luttikhuisen & Dekker, 2010).

Em oposição a estes trabalhos, alguns poucos relatam a continuidade espacial de uma única espécie ao longo de uma ampla região geográfica, como no caso das espécies de poliqueta, *Proscoloplos cygnochaetus* (Orbiniidae), que pode ser encontrada na França, África do Sul e Austrália (Meyer *et al.*, 2008), e *Sabella spallanzanii* (Sabellidae), encontrada nas localidades citadas anteriormente e também no Mar Mediterrâneo (Patti & Gambi, 2001). Entretanto, nessas espécies o cosmopolitismo tem sido associado a invasões causadas pelas atividades antrópicas e, mesmo que tenham um alto potencial de dispersão, as condições ambientais (e.g. correntes marinhas superficiais) não favorecem tal dispersão. Em *H. carunculata* a ocorrência de invasões não parece ter ocorrido, visto que a variabilidade genética encontrada nesta espécie é alta e em populações de espécies invasoras costuma ser relativamente baixa (Patti & Gambi, 2001; Dlugosch & Parker, 2008; Melo *et al.*, 2010).

### 5.2.2. Sobre a história demográfica

Os valores de diversidade haplotípica observados para o COI (Tab. 4.3 -  $0,879 < h < 1,000$ ) indicam que na maioria das localidades o número de haplótipos era praticamente igual ao de indivíduos representados, com exceção dos indivíduos amostrados no Arquipélago de São Pedro e São Paulo ( $h = 0,879$ ). Apesar dos valores aqui encontrados serem altos, em outras espécies de poliqueta também é possível

observar valores semelhantes, como no caso de *Branchipolynoe symmytilida* (Polynoidae), *Alvinella pompejana* (Alvinellidae) (Plouviez *et al.*, 2009), *Hediste diversicolor* (Nereididae) (Audzijonyte *et al.*, 2008; Virgílio *et al.*, 2009), *Pectinaria koreni* (Pectinariidae) (Jolly *et al.*, 2005), *P. auricoma*, *Owenia fusiformis* (Oweniidae) (Jolly *et al.*, 2006) e *Palola* spp. (Eunicidae) (Schulze, 2006). Entretanto valores relativamente baixos também podem ser observados em algumas espécies como, *Hesiolyra bergi* (Hesionidae) (Plouviez *et al.*, 2009), *Hobsonia florida* (Ampharetidae) (Olson *et al.*, 2009), *Bathykurila guaymasensis* (Polynoidae) (Glover *et al.*, 2005) e *Diopatra* spp. (Onuphidae) (Seixas *et al.*, in prep.). Devido ao caráter mais conservativo da região do 16S, os valores foram inferiores ao COI (Tab. 4.4 –  $0,784 < h < 0,911$ ), porem igualmente altos se comparados com a mesma região de *Palola* spp. (Schulze, 2006). Baseado nesses trabalhos, os valores de diversidade nucleotídica também podem ser considerados elevados, principalmente para o COI (Tab. 4.3 –  $0,00792 < \pi < 0,01288$ ), visto que poucos trabalhos utilizaram o 16S como marcador.

Embora a relação entre diversidade genética e tamanho populacional efetivo aparente ser diretamente proporcional, fatores como, estruturação genética, efeito gargalo, seleção natural, ciclo de vida e tipo de reprodução afetam de diferentes formas esta relação (Bazin *et al.*, 2006). Tal comportamento limita o poder de extrapolação acerca das estimativas de diversidade genética. Entretanto do ponto de vista da genética da conservação, esta medida é importante para analisar os riscos de extinção de uma determinada espécie ou população, visto que tal diversidade está associada com a capacidade das espécies evoluírem em resposta a mudanças ambientais (Reed & Frankham, 2003). Desta forma, os resultados aqui obtidos para diversidade genética, assim como as estimativas de tamanho populacional efetivo (Tab. 4.11), apontam que a

espécie *H. carunculata* aparentemente não sofre riscos do ponto de vista da genética da conservação.

Na rede de haplótipos para o COI (Fig. 4.3) a maioria dos haplótipos foram exclusivos de uma determinada localidade, não contribuindo muito para a inferência de padrões de conectividade. Entretanto, os únicos haplótipos compartilhados entre duas populações demonstram que entre Bahia e San Blás, Atol das Rocas e San Blás e Bocas del Toro e San Blás ocorre algum fluxo gênico. Quanto a idade dos haplótipos, 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). Baseado no COI, os dois haplótipos que se encontram no centro da topologia em formato de estrela, não são os mais frequentes (1 e 3 ind.) e também não estão amplamente distribuídos, porém devido ao número de haplótipos que deles descendem (13 e 20 hapl.), provavelmente são os mais antigos. Ainda neste marcador é possível observar uma grande quantidade de haplótipos intermediários não amostrados, indicando que a diversidade genética possa estar subestimada.

O fato do 16S ser mais conservado fez com que a rede de haplótipos seja mais informativa quanto as questões de conectividade (Fig. 4.4). Através dela podemos ver que o haplótipo mais frequente (22 ind.) está distribuído por todas as localidades e se encontra no meio da topologia em estrela, com maior número de haplótipos descendentes (13 hapl.). Tais características indicam que este seja o haplótipo mais antigo e que a princípio há fluxo gênico entre todas as localidades amostradas. Além deste, outros dois haplótipos se destacam devido a sua frequência (8 e 11 ind.) e número de haplótipos descendentes (6 e 7 hapl.), sendo que o primeiro reforça a ocorrência de

trocas gênicas entre Atol das Rocas, Arquipélago de São Pedro e São Paulo e Bahia, e o segundo as trocas entre Atol das Rocas, Bocas del Toro e San Blás (Fig. 4.4).

Em ambos os marcadores, os haplótipos considerados mais antigos sempre estiveram presentes no Atol das Rocas. Tal resultado faz com que a população desta localidade seja interpretada como a mais antiga dentre as amostradas. Além disso, de acordo com Freeland (2005), as populações com elevado número de haplótipos tendem a ser as mais antigas, visto que os indivíduos ali presentes tiveram mais tempo para acumular mutações. Entretanto, devido a desproporção dos indivíduos amostrados entre as localidades e as semelhanças na diversidade haplotípicas, fica difícil inferir se o Atol das Rocas realmente é mais diverso em haplótipos (Tab 4.3 e 4.4) ou se esta superioridade reflete tal desproporção amostral.

A ocorrência recente de efeito gargalo ou efeito fundador podem deixar marcas no padrão de diversidade genética e na rede de haplótipos, pois em ambos os efeitos as populações crescem a partir de um reduzido número de linhagens mitocondriais. Embora para poliqueta não se tenha um valor limítrofe de diversidade genética que revele a provável ocorrência de tais processos, Grant & Bowen (1998), consideram que, para peixes marinhos, tais valores de diversidade haplotípica ( $h$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) sejam inferiores a 0,5 e 0,005, respectivamente. Além disso, estes autores criaram uma classificação baseada nos valores de  $h$  e  $\pi$  (pequeno ou grande), para inferir a história evolutiva das populações. De acordo com esta classificação, as populações de *H. carunculata* (valores de  $h$  e  $\pi$  elevados; Tab. 4.3 e 4.4) podem se encaixar dentro de três cenários: (1) as populações passaram por um efeito gargalo ou fundador seguido de rápido crescimento populacional; (2) as populações são amplas e estáveis com uma

longa história evolutiva; ou (3) ao longo das populações e localidades ocorrem contatos secundários entre as diferentes linhagens.

Quanto a esses cenários, a rede de haplótipos em formato de estrela (Fig. 4.3 e 4.4), com diversos haplótipos de origem mais recente conectados por poucos passos mutacionais, pode indicar a provável ocorrência de um evento de expansão populacional (Slatkin & Hudson, 1991). Além disto, os resultados dos testes de neutralidade (Tab. 4.7) juntamente com as análises de distribuição das diferenças (Fig. 4.5, Tab. 4.8 e 4.9) e o *Bayesian Skyline Plot* (Fig. 4.6), também corroboram a hipótese desta expansão. De acordo com os parâmetros estimados na análise de distribuição das diferenças, o aumento do número de indivíduos ocorreu praticamente ao mesmo tempo em que a expansão espacial (Tab. 4.8 e 4.9).

Embora haja evidências de expansão populacional, como sugerido pelo primeiro cenário proposto (1) por Grant & Bowen (1998), não há nada que corrobore que tal evento tenha ocorrido após um efeito gargalo ou fundador. Tal expansão pode ter sido causada por alguma alteração ambiental que passou a favorecer a espécie, porém isso não significa que o tamanho populacional fosse reduzido, e sim que atualmente ele é maior do que era antigamente. Com base no *Bayesian Skyline Plot* (Fig. 4.6), o tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) aumentou cerca de 10 vezes, sendo as estimativas para  $N_e$  atual maiores que 1.000.000. Tal valor é condizente com os valores obtidos a partir dos parâmetros estimados pelo programa Migrate (Tab. 4.11).

Quanto a ocorrência de eventos de “colonização” (efeito fundador), estes deixam de ser percebidos a partir do momento em que as migrações efetivas passam a ocorrer com certa frequência, ao longo de diferentes épocas e a partir de diferentes linhagens, como parece ser o caso de *H. carunculata*, visto que as estimativas de fluxo gênico entre as populações são elevadas (Fig. 4.7). A não ser que a taxa de mutação desta

espécie seja muito elevada, a alta variabilidade genética encontrada dentro de *H. carunculata* pode ser explicada pelo elevado tamanho populacional, uma longa história evolutiva (longo período desde o ancestral comum mais recente das linhagens) e altas taxas de migração (cenários 2 e 3 propostos acima).

As variações das condições climáticas causadas pelos períodos de glaciação e interglaciação do Pleistoceno, parecem não ter influenciado a história evolutiva das populações analisadas de *H. carunculata*, diferentemente do que parece ter ocorrido em diversas espécies de invertebrados e peixes marinhos ou estuarinos (Wares, 2002; Peijnenburg *et al.*, 2004; Jolly *et al.*, 2006; Iannotta *et al.*, 2007; Olson *et al.*, 2009; Virgílio *et al.*, 2009). A explicação para isso pode ser as diferentes regiões geográficas (temperada × tropical) onde as populações ocorrem, visto que tanto no mar quanto no continente as mudanças causadas pelas glaciações parecem ser mais extremas nas regiões temperadas e/ou estuarinas do que nas regiões tropicais e/ou em grandes oceanos (Hewitt, 2000).

Nas regiões temperadas, o avanço do gelo em direção ao mar faz com que haja uma contração da distribuição das espécies, devido a ocorrência de fortes declínios populacionais ou até mesmo extinções locais (Hewitt, 2004; Larmuseau *et al.*, 2009). Além disso, tais mudanças podem levar à formação de barreiras geográficas, que impedem a ocorrência de trocas gênicas, como sugerido para o Mar Mediterrâneo (Pannacciulli *et al.*, 1997; Bianchi & Morri, 2000; Iannotta *et al.*, 2007). Sendo assim, ao final do período de glaciação as regiões onde tais espécies ocorriam serão recolonizadas a partir de um reduzido *pool* gênico (Hewitt, 2004). 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 verticalmente (para o

“fundo”), desta forma haveria uma menor chance de que estas deixassem de existir. Além disso, é menos provável que ocorra a formação de barreiras geográficas que restrinjam o fluxo gênico entre as populações, visto as maiores profundidades nos oceanos. Desta forma, a recolonização pós-período glacial ocorreria a partir de um *pool* gênico relativamente alto se comparado com as regiões temperadas.

### **5.2.3. Fraca estruturação populacional como resultado da alta conectividade genética**

Em virtude do que foi exposto até o momento, são fortes os indícios de que, dentro de *H. carunculata* não há estruturação populacional ou, se existe, esta é muito pequena. Através das análises de índice de fixação ( $F_{ST}$ ) (Tab. 4.5), AMOVA (Tab. 4.6) e fluxo gênico (Fig. 4.7), foi possível comprovar a alta conectividade genética entre as localidades e detectar uma estruturação muito fraca por parte do Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

O isolamento geográfico deste Arquipélago foi refletido nos resultados do índice de fixação ( $F_{ST}$ ) (Tab. 4.5), visto que as comparações envolvendo tal localidade apresentaram os maiores valores significativos, indicando um maior nível de endocruzamento. Nas outras localidades, as comparações par a par com base no COI não apresentaram valores significativos, indicando certa homogeneidade entre tais localidades. Já com o 16S, apesar dos baixos valores, as comparações entre Atol das Rocas × Bocas del Toro, Atol das Rocas × San Blás e Bahia × San Blás, foram significativas (Tab. 4.5), indicando uma pequena diferenciação por parte deste marcador molecular.

Tendo em vista as distâncias geográficas entre as localidades (variando de ~750 km a ~6.800km) era esperado que os valores de  $F_{ST}$  fossem maiores. Em um estudo com

cinco populações do poliqueta estuarino *Hobsonia florida*, todas localizadas ao longo de 200 km de costa, foram observados valores mais elevados ( $COI - 0,18 < F_{ST} < 0,74$ ) (Olson *et al.*, 2009). Entretanto a diferença entre os resultados de *H. florida* e *H. carunculata* podem ser explicados pelas diferenças intrínsecas, como resistência a variações ambientais e capacidade de dispersão (larva não planctotrófica  $\times$  larva planctotrófica), e também pelo tipo de ecossistemas em que habitam (região estuarina  $\times$  região marinha e oceânica).

Dentre os diferentes cenários de estruturação populacionais testados na AMOVA (Tab. 4.6), a quantidade de variação dentro das populações foi sempre maior em relação aos outros grupos hierárquicos ( $84,11\% < \% \text{ variação} < 89,67\%$ ). Embora a hipótese de panmixia tenha sido rejeitada (1º cenário), indicando a existência de estruturação, nenhum cenário testado posteriormente conseguiu captar tal estruturação, visto que a hipótese nula de não diferenciação entre os grupos ( $\Phi_{CT}$ ) não pode ser rejeitada em todos os casos (para ambos os marcadores).

Entretanto, os resultados dos testes estatísticos referentes ao índice de fixação  $\Phi_{SC}$ , demonstram um pequeno grau de isolamento por parte dos indivíduos do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Para o COI e 16S todas as vezes que o Arquipélago foi agrupado com outra localidade (2º e 3º cenários), a hipótese de não diferenciação entre as populações dentro dos grupos ( $\Phi_{SC}$ ) foi rejeitada, indicando que há alguma diferenciação (Tab. 4.6). Por outro lado todos os cenários restantes, onde o Arquipélago foi mantido separado, a hipótese nula para o mesmo grupo hierárquico ( $\Phi_{SC}$ ) não pode ser rejeitada para ambos os marcadores, com exceção do 4º e 7º cenários para o 16S. Com base no 16S houve também um leve indício de que Bocas del Toro e San Blás estivessem mais relacionados (5º cenário). Dentre os cenários testados aqueles

que explicaram uma maior parte da variação entre os grupos foram o 4º (ASPSP/AR+BA+BT+SB), para o COI (12,94%), e o 5º (ASPSP/AR+BA/BT+SB), para o 16S (14,69) (Tab. 4.6). Entretanto estes valores são bem inferiores a variação associada aos indivíduos dentro das populações e, além disso, não desviaram significativamente da hipótese nula.

A baixa estruturação populacional pode ser vista como uma consequência do elevado grau de fluxo gênico entre as localidades (Fig. 4.7). 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. Sendo assim, os valores observados para o número de migrantes efetivos por geração (Fig. 4.7) são suficientes para manter as localidades geneticamente conectadas, com exceção de algumas comparações envolvendo o Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Tais resultados corroboram que, apesar de pouco conhecimento acerca da biologia reprodutiva, as larvas de *H. carunculata* provavelmente tem um alto potencial de dispersão, como também sugerido para outra espécie da mesma família, *Eurythoe complanata* (Barroso *et al.*, 2010). A dispersão de indivíduos adultos também pode ajudar nessa homogeneização, visto que já foram relatados casos de adultos nadando na coluna d'água e presentes em destroços flutuantes (Barroso & Paiva, 2007).

O maior grau de estruturação por parte do Arquipélago de São Pedro e São Paulo reflete o seu isolamento geográfico, entretanto não é só o fator, distância geográfica, que parece estar causando tal padrão. Tanto os lugares mais distantes (Bocas del Toro e Sán Blás) quanto os mais próximos (Atol das Rocas e Bahia) do Arquipélago, apresentaram valores similares de  $F_{ST}$  (Tab. 4.5). Além disso, a hipótese de isolamento por distância ( $F_{ST} \times$  distância geográfica) foi rejeitada no teste de Mantel

para o COI (Fig. 4.8A), embora tenha apresentado uma correlação significativa para o 16S ( $r = 0,48$ ,  $p = 0,039$ ) (Fig. 4.8B). A correlação entre o número de migrantes efetivos ( $N_{em}$ ) e a distância geográfica também não foi significativa (Fig. 4.8C).

A ausência de continuidade de costa pode ter um papel importante na conectividade das populações, visto a ausência de populações intermediárias que podem funcionar de forma parecida com em um modelo de *stepping-stones* (Gold & Turner, 2002). Outro fator que se complementa a ausência de continuidade da costa é o longo trecho de mar profundo ao redor do Arquipélago, que se estende praticamente até a plataforma continental. Sendo assim, as larvas ou adultos que se dispersam a partir do Arquipélago provavelmente possuem uma menor chance de sobreviver até conseguirem assentar em outra região, e o mesmo se aplica para a chegada de migrantes.

Os valores observados no índice de fixação  $F_{ST}$  (Tab. 4.5) apontam para o maior grau de endocruzamento nos espécimes coletados no Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Tais valores indicam que a maior parte dos indivíduos recrutados estejam sendo originados a partir de indivíduos do próprio Arquipélago (auto recrutamento), como previsto no modelo de estruturação em ilhas, onde a probabilidade dos indivíduos do mesmo local se reproduzirem é muito maior do que estes se reproduzam com indivíduos de outras localidades.

Sendo assim, a foz dos rios Amazonas e Orinoco (1) e o longo trecho de mar profundo (2) são vistos como as principais barreiras à conectividade genética entre a fauna do Atlântico Sul e do Mar do Caribe (1) e também entre as faunas dos diferentes lados do Atlântico Sul (2), respectivamente (Lessios *et al.*, 2003). Para *H. carunculata*, as alterações das condições físico-químicas causadas pelo imenso aporte de água doce dos rios amazônicos parece não interferir na conectividade entre as diferentes populações, diferente do que ocorre, mesmo que de forma sucinta, quando há a presença

de um longo trecho de mar profundo, que não chega a funcionar como uma barreira para a especiação alopátrica.

#### 5.2.4. Fluxo gênico e as correntes marinhas superficiais

O fluxo gênico do Atol das Rocas e Bahia para as outras localidades foram de forma geral os maiores (Fig. 4.7), tal observação pode estar associada as elevadas estimativas de  $\theta$  (Tab. 4.10) e, conseqüentemente, do tamanho populacional efetivo (Tab. 4.11). Além disso, através das comparações par a par entre as localidades, pode-se observar que os maiores valores de fluxo gênico (Fig. 4.7) são aqueles que estão na mesma direção que as correntes marinhas superficiais (Fig. 1.1 e 1.2).

No caso das comparações entre Atlântico Sul Ocidental e Mar do Caribe, a direção das Correntes do Norte do Brasil, da Guiana e do Caribe parece ter bastante influência nos padrões observados de fluxo gênico, visto a superioridade de migrantes por geração nesta direção (Atlântico Sul para o mar do Caribe, Fig. 4.7). A superioridade de migrantes de Bocas del Toro para San Blás, também reflete a padrão predominante das correntes superficiais desta região (giro Panamá-Colômbia). Dentre as localidades do Atlântico Sul, a Corrente Sul Equatorial (que flui para a costa Norte do Brasil), a Contra Corrente Norte Equatorial e a Sub Corrente Equatorial (que fluem para a costa da África) (Fig. 1.1 e 1.2), parecem explicar bem a relação assimétrica de migrantes entre Atol das Rocas e Arquipélago de São Pedro e São Paulo ( $AR \rightarrow ASPSP = 4,8$  e  $ASPSP \rightarrow AR = 0,6$ ). Já na relação de migrantes entre Bahia  $\times$  Atol das Rocas ( $AR \rightarrow BA = 135,7$  e  $BA \rightarrow AR = 95,1$ ) e Bahia  $\times$  Arquipélago de São Pedro e São Paulo ( $ASPSP \rightarrow BA = 2,6$  e  $BA \rightarrow ASPSP = 2,7$ ) parece que a variação dos diferentes pontos aonde a Corrente Sul Equatorial se bifurca na costa do Brasil, estão influenciando estas relações. Tal variação pode definir se uma parte da Corrente Sul Equatorial vai seguir

da Bahia para o Rio Grande do Norte e outra para o Sul do Brasil, ou se uma parte vai descer do Rio Grande do Norte até a região Sul do Brasil e a outra vai seguir pela costa Norte do Brasil (Campos *et al.*, 1999; Stramma & England, 1999).

Mesmo para espécies que possuem um alto potencial de dispersão, como *H. carunculata*, a presença de pontos intermediários entre as localidades é fundamental para manter a conectividade entre populações muito distantes, como a fauna bentônica rasa entre a costa africana e brasileira. Apesar do presente trabalho não ter avaliado nenhuma população da costa africana, é pouco provável que haja uma grande estruturação populacional entre os diferentes lados do Atlântico (Ahrens *et al.*, no prelo). Sendo assim, os resultados aqui obtidos demonstram que as ilhas oceânicas, como o Arquipélago de São Pedro e São Paulo, podem ter papel fundamental na homogeneização de populações distantes geograficamente.

Além disso, a escolha de locais para a criação de reservas marinhas, pode ser melhor direcionada se soubermos a influência das correntes marinhas superficiais sobre a dispersão das larvas, visto que tais reservas podem servir de pontos intermediários entre a conectividade de populações distantes e também como reservatório e fonte de diversidade genética (Palumbi *et al.*, 2003). Sendo assim, a manutenção do Atol das Rocas como uma reserva biológica é uma decisão acertada, visto que sua localização em relação as correntes superficiais permite que uma grande quantidade de emigrantes se dispersem para a costa norte e nordeste do Brasil e também para o Mar do Caribe e, além disso, recebe um número de migrantes elevado. Tais eventos podem ocorrer não só em *H. carunculata*, mas em qualquer outra espécie que tenha uma boa capacidade de dispersão e que consiga colonizar locais não nativos.

### 5.3. *Timarete punctata*

#### 5.3.1. Quanto a existência de espécies crípticas

As análises filogenéticas (Fig. 4.9) demonstraram a ocorrência de dois grupos, um com os indivíduos distribuídos ao longo do Arquipélago São Pedro e São Paulo, Atol das Rocas e Bahia (grupo1) e outro ocorrendo em simpatria no Atol das Rocas (grupo2). Tais resultados apontam para a existência de duas espécies sob o nome de *T. punctata*, que aparentemente são indistinguíveis morfologicamente.

Os valores de distância  $p$  entre os indivíduos dos dois grupos (Tab. 4.13) são relativamente baixos (~1,4% no COI e ~0,4% no 16S) para definir com certeza a existência de duas espécies, porém se compararmos os valores encontrados dentro das localidades do grupo 1 (ASPSP, AR1 e BA) e do grupo 2 (AR2), vemos que praticamente não há variação intra-populacional (Tab. 4.12). Outro resultado a favor da existência de duas espécies pode ser observado nos valores do índice de fixação  $F_{ST}$  (Tab. 4.16). Dentre as comparações envolvendo o grupo 2 com os indivíduos do grupo 1 foram obtidos valores iguais ou bem próximos de um, o que é compatível com valores encontrados entre espécies diferentes. Além disso, na AMOVA (Tab. 4.17), a variação explicada por causa da separação entre grupo 1 e grupo 2 foi extremamente alta (98,70% no COI e 93,09% no 16S), indicando a presença de duas espécies ou então uma forte estruturação que ocorre em simpatria.

Apesar dos resultados apontarem para a existência de duas espécies, a presença de duas linhagens bem distintas no Atol das Rocas pode ter sido consequência de dois eventos independentes de colonização, que ocorreram em diferentes momentos e/ou a partir de poucos indivíduos bem distintos. Como a princípio o DNA mitocondrial é transmitido somente pelas linhagens maternas e não sofre recombinação (Avice, 2004), mesmo que ocorra reprodução sexuada (pouco observada para o gênero *Timarete*), as

linhagens irão manter sua independência. Por causa da deriva gênica, os haplótipos mais novos na população (colonização recente) possuem maiores chances de desaparecerem em relação aos mais antigos, desta forma se não houver um fluxo gênico constante, tal população manterá uma baixa variabilidade, só aumentando através de mutações no DNA.

### **5.3.2. Quanto aos baixos valores de variabilidade genética**

Os valores de diversidade genética (Tab. 4.14 e 4.15) e a rede de haplótipos (Fig. 4.10) refletem a reduzida quantidade de polimorfismo encontrada na espécie, e podem ser interpretados como a ocorrência recente de um efeito gargalo ou fundador, entretanto outras hipóteses podem ser consideradas para explicar tal padrão. Valores igualmente baixos nunca foram relatados para outras espécies de poliqueta.

Na primeira hipótese (1), as populações de *T. punctata* teriam passado recentemente por um forte gargalo populacional, sendo tal diminuição no tamanho populacional responsável pela drástica redução na variabilidade genética. Entretanto a presença de praticamente o mesmo haplótipo em todas as localidades pode indicar que tal gargalo tenha ocorrido antes da espécie ter colonizado estas regiões, caso contrário nem todas as localidades teriam uma baixa variabilidade. Em populações de espécies invasoras ou recém-colonizadas é comum observar uma baixa diversidade genética, podendo o aumento da diversidade genética ser causado por introduções múltiplas ou evento migratórios, onde a variabilidade existente na população nativa (mais antiga) é transferida para a não-nativa (mais nova) (Dlugosch & Parker, 2008). No caso desta hipótese estar correta as três populações aqui amostradas teriam sido colonizadas basicamente pelo mesmo haplótipo.

Na segunda hipótese (2), a redução populacional estaria afetando de forma não aleatória todas as populações, que já estariam presentes em tais localidades, e por isso basicamente o mesmo haplótipo estaria presente em todas as localidades. Tal hipótese poderia ser explicada pela forte ação de uma pressão seletiva sobre o DNA mitocondrial desta espécie, que estaria agindo em uma ampla escala espacial. Numa terceira hipótese (3), o padrão de diversidade genética poderia ser explicado pela existência de uma maquinaria de reparo no DNA mitocondrial. Apesar de ter sido comprovado a existência de genes com essa função em cnidários (Pont-Kingdon *et al.*, 1998), nada se sabe quando a presença destes em anelídeos.

Devido a espécie aparentemente se reproduzir por esquizogênese (Petersen, 1999), a hipótese de que a maioria dos indivíduos coletados sejam clones, não pode ser descartada. Porém, devido as características do DNA mitocondrial como herança uniparental e não recombinação, não é possível fazer nenhuma afirmação quanto a isso. O uso de outros marcadores moleculares, adequados para avaliar a clonalidade, seria fundamental para investigar esta questão.

### **5.3.3. Quanto a forma de dispersão**

A causa da baixa variabilidade genética não pode ser respondida a partir dos resultados aqui obtidos, entretanto se desconsiderarmos a 2<sup>a</sup> e a 3<sup>a</sup> hipóteses, as localidades amostradas de *T. punctata* possuem um grau de conectividade extremamente alto. Apesar das análises de fluxo gênico não terem sido realizadas, devido ao reduzido polimorfismo, tal conclusão pode ser tirada a partir da rede de haplótipos (Fig. 4.10) e dos valores de  $F_{ST}$  (Tab. 4.16). As causas desse aparente grau de conectividade também são incertas, visto que até o momento poucos são os registros da

presença de gametas (Çinar, 2007) e, além disso, a presença de larvas nunca foi reportada. Desta forma a principal forma de reprodução citada para *T. punctata* e outras espécies do gênero é a esquizogênese (Fig. 1.4C) (Petersen, 1999). Entretanto, a fragmentação pode ter um importante papel na dispersão dessa espécie, assim como sugerido para *T. filigera* (Gherardi *et al.*, 2007). Embora pareça pouco provável que um pequeno fragmento seja capaz de se dispersar por longas distâncias, a ocorrência em si de *T. punctata* em ilhas oceânicas (de onde provem o material tipo) sugere que tal processo seja possível (se não considerarmos que o transporte esteja sendo feito por atividades antrópicas). Além disso, a partir do momento que um número reduzido de indivíduos alcance uma determinada região, esta pode ser rapidamente povoada devido a ocorrência da reprodução assexuada, como observado na dinâmica populacional de *T. filigera* (Gherardi *et al.*, 2007).

## 6. Conclusões

- Com base em *T. punctata* não foi possível chegar a conclusões acerca das questões levantadas. Visto a baixa quantidade de polimorfismo encontrado entre os indivíduos, os resultados obtidos são ambíguos, não auxiliando na corroboração de uma hipótese em particular. Desde a definição da presença de uma ou duas espécies até as estimativas sobre genética de populações, filogeografia e o papel dos fatores ambientais na conectividade genética (isolamento geográfico, mar profundo e padrão das correntes superficiais), fica claro que são necessários estudos que utilizem outros marcadores moleculares (nucleares principalmente) e/ou que tenham uma maior amplitude espacial.

- Com base na ampla distribuição geográfica de *H. carunculata* foi possível observar um alto grau de conectividade genética entre as ilhas oceânicas do Atlântico Sul Ocidental, a costa do Brasil e o Mar do Caribe. Tal conectividade explica a baixa estruturação genética populacional e sugere que as larvas e/ou adultos desta espécie podem se dispersar por longas distâncias e suportar mudanças nas características ambientais, como as causadas pelo aporte de água doce vinda dos rios amazônicos.

- Apesar de *H. carunculata* ter um tamanho populacional efetivo elevado, parece não haver um motivo claro que explique tal expansão. As alterações ambientais causadas por eventos geológicos, que comumente são associados a mudanças na história demográfica das espécies, parecem não ter deixado marcas no DNA mitocondrial ou então estas foram apagadas devido a altas taxas de migração.

- O isolamento geográfico não impede que as populações de *H. carunculata*, distribuídas ao longo do Atlântico Sul Ocidental e Mar do Caribe, mantenham um alto

fluxo gênico. Já a presença do mar profundo por uma longa escala espacial, parece limitar, de forma sutil, o fluxo gênico entre as localidades, entretanto tal barreira não aparenta ser suficiente para causar a especiação por alopatria.

- Para espécies que tenha um alto potencial de dispersão, assim como *H. carunculata*, os padrões das correntes marinhas superficiais, observados para o Atlântico Sul Ocidental e o Mar do Caribe, exercem um importante papel na determinação da direção do fluxo gênico entre as populações dessas regiões.

## 7. Referências bibliográficas

- Aguado, M.T., Martín, G.S. & Siddall, M.E. Systematics and evolution of syllids (Annelida, Syllidae). *Cladistics* 27, 1-17.
- 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 populations histories. *Marine Biology* 155, 599-612.
- Avise, J.C. (2004) *Molecular markers, natural history and evolution*. 2<sup>nd</sup> edn. Chapman & Hall, London.
- Barroso, R. & Paiva, P.C. (2007) Amphinomidae (Annelida: Polychaeta) from Rocas Atoll, northeastern Brazil. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro* 65(3), 357-362.
- 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.
- Bazin, E., Glémin, S. & Galtier, N. (2006) Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312, 570-572.
- Berli, P. (1998) Estimation of migration rates and populations sizes in geographically structured populations. Pp. 39-53. In: Carvalho, G. *Advances in Molecular Ecology; NATO-ASI Workshop Series*, IOS Press, Amsterdam.
- Berli, P. (2006) Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics* 22(3), 341-345.
- Berli, P. (2009) How to use Migrate or why are Markov chain Monte Carlo programs difficult to use? Pp. 39-70. In: Bertorelle, G., Bruford, M.W., Hauffe, H.C., Rizzoli, A. & Vernesi, C. (eds) *Population Genetics for Animal Conservation*, Cambridge University Press.
- Berli, 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.

- Berke, S.K., Mahon, A. R., Lima, F.P., Halanych, K.M., Wetthey, D.S. & Woodin, S.A. (2010) Range shifts and species diversity in marine ecosystem engineers: patterns and predictions for European sedimentary habitats. *Global Ecology and Biogeography* 19, 223-232.
- Bhaud, M. (1972) Identification des larves d'Amphinomidae (Annelides Polychetes) Recueillies près de nosy-bé (Madagascar) et problèmes biologiques connexes. *Cahiers ORSTOM sér Océanographie* 10, 203-216.
- Bianchi, C.N. & Morri, C. (2000) Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for nature research. *Marine Pollution Bulletin* 40(5), 367-376.
- Bischof, B., Mariano, A.J. & Ryan, E.H. (2003) "The North Brazil Current". Ocean Surface Currents. <http://oceancurrents.rsmas.miami.edu/atlantic/north-brazil.html>.
- Bleidorn, C., Hill, H., Erséus, C. & Tiedmann, R. (2009) On the role of character loss in orbiniid phylogeny (Annelida): Molecular vs. morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52, 57-69.
- Bleidorn, C., Kruse, I., Albrecht, S. & Bartolomaeus, T. (2006) Mitochondrial sequence data expose the putative cosmopolitan polychaeta *Scoloplos armiger* (Annelida, Orbiniidae) as a species complex. *BMC Evolutionary Biology* 6(47), doi:10.1186.
- Boissin, E., Stöhri, S. & Chenuil, A. (2011) Did vicariance and adaptation drive cryptic speciation and evolution of brooding in *Ophioderma longicauda* (Echinodermata: Ophiuroidea), a common Atlanto-Mediterranean ophiuroid? *Molecular Ecology* 20(22), 4737-4755.
- Borda, E., Kudenov, J.D., Bienhold, C. & Rouse, G.W. (2012) Towards a revised Amphinomidae (Annelida, Amphinomida): description and affinities of a new genus and species from the Nile Deep sea Fan, Mediterranean Sea. *Zoologica Scripta* 41, 307-325.
- 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.
- Briggs, J.C. (1995) *Global Biogeography*. Amsterdam: Elsevier.
- Campos, E., Busalacchi, A., Garzoli, S., Lutjeharms, J., Matano, R., Nobre, P., Olson, D., Piola, A., Tanajura, C., Wainer, I. (1999) The South Atlantic and the

- Climate. In: *The Ocean Observing System for Climate*, St. Raphael, France. OCEANOBS99, 1999.
- Capa, M., Hutchings, P., Aguado, M.T. & Bott, N.J. (2011) Phylogeny of Sabellidae (annelida) and relationships with other taxa inferred from morphology and multiple genes. *Cladistics* 27, 449-469.
- Castro-Filho, B.M., Miranda, L.B. & Myao, S.Y. 1987. Condições hidrográficas na plataforma continental ao longo de Ubatuba: variações sazonais e em média escala. *Boletim do Instituto Oceanográfico* 35(2), 103-168.
- 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.
- Cowen, R.K., Lwiza, K.M.M., Sponaugle, S., Paris, C.B. & Olson, D.B. (2000) Connectivity of marine populations: open or closed? *Science* 287, 857-859.
- Cowen, R.K., Paris, C.B. & Srinivasan, A. (2006) Scaling of connectivity in marine populations. *Science* 311, 522-527.
- Crandall, E.D., Frey, M.A., Grosberg, R.K. & Barber, P.H. (2008) Contrasting demographic history and phylogeographical patterns in two Indo-Pacific gastropods. *Molecular Ecology* 17, 611-626.
- Crandall, E.D., Sbrocco, E.J., DeBoer, T.S., Barber, P.H. & Carpenter, K.E. (2012) Expansion dating: calibrating molecular clocks in marine species from expansions onto the Sunda Shelf following the Last Glacial Maximum. *Molecular Biology and Evolution* 29(2), 707-719.
- Çinar, M.E. (2007) Re-description of *Timarete punctata* (Polychaeta: Cirratulidae) and its occurrence in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina* 71(4), 755-764.
- Dlugosch, K.M. & Parker, M. (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17, 431-449.
- 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.
- Dray, S., Dufour, A.B. & Chessel, D. (2007) The ade4 package – II: Two-table and K-table methods. *R News* 7(2), 47-52.

- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O.G. (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22(5), 1185-1192.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29(8), 1969-1973.
- Duda, T.F. & Lessios, H.A. (2009) Connectivity of populations within and between major biogeographic regions of the tropical Pacific in *Conus ebraeus*, a widespread marine gastropod. *Coral Reefs* 28, 651-659.
- Eklöf, J., Pleijel, F. & Sundberg, P. (2007) Phylogeny of benthic Phyllodoceidae (Polychaeta) based on morphological and molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45, 261-271.
- Ekman, S. (1953) *Zoogeography of the Sea*. London, Sidwick & Jackson (Publishers). 417p.
- Emerson, B.C., Paradis, E. & Thébaud, C. (2001) Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends in Ecology and Evolution* 16(12), 707-716.
- 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 populations genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10(3), 564-567.
- Excoffier, L. & Schneider, S. (1999) Why hunter-gatherer populations do not show signs of Pleistocene demographic expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 10597-10602.
- 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. & Bellan, G. (2012). *Hermodice* Kinberg, 1857. In: Read, G. & Fauchald, K. (2012). World Polychaeta database. Accessed through: World Register of

- Marine Species at <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=129187> on 2013-01-30.
- Fauchald, K. & Jumars, P.A. (1979) The diet of worms: a study of polychaete feeding guilds. *Oceanography and Marine Biology Annual Reviews* 17, 193-284.
- Felsenstein, J. (2006) Accuracy of coalescent likelihood estimates: Do we need more sites, more sequences, or more loci? *Molecular Biology and Evolution* 23(3), 691-700.
- Feitoza, B.M., Rocha, L.A., Luiz-Júnior, O.J., Floeter, S.R. & Gasparini, J.L. (2003) Reef fishes of St. Paul's Rocks: new records and notes on biology and zoogeography. *Journal of Ichthyology and Aquatic Biology* 7(2), 61-82.
- Floeter, S.R. & Gasparini, J.L. (2000) The southwestern Atlantic reef fish fauna: composition and zoogeographic patterns. *Journal of Fish Biology* 56, 1099-1114.
- Floeter, S.R., Rocha, L.A., Robertson, D.R., Joyeux, J.C., Smith-Vaniz, W.F., Wirtz, P., Edwards, A., Barreiros, J.P., Ferreira, C.E.L., Gasparini, J.L., Brito, A., Falcon, J.M., Bowen, B.W. & Bernardi, G. (2007) Atlantic reef fish biogeography and evolution. *Journal of Biogeography* 35, 22-47.
- 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.
- Freeland, J.R. (2005) *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd. The Open University, Milton Keynes, England.
- Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutation against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915-925.
- Gherardi, M., Sciscioli, M., Lepore, E., Todisco, G. & Giangrande, A. (2007) The role of schizogenesis in population dynamics of *Timarete filigera* (Polychaeta: Cirratulidae): 2-years observations in the Porto f Bari (South Adriatic Sea). *Marine Ecology* 28, 306-314.
- Glasby, C.J. (2000) Family Cirratulidae. Pp. 208-211 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 xii, 465 pp.

- Glover, A.G., Goetze, E., Dahlgren, T.G. & Smith, C.R. (2005) Morphology, reproductive biology and genetic structure of the whale-fall and hydrothermal vent specialist *Bathypurila guaymasensis* Pettibone, 1989 (Annelida: Polynoida). *Marine Ecology* 26, 223-234.
- Gold, J.R. & Turner, T.F. (2002) Population structure of red drum (*Sciaenops ocellatus*) in the northern Gulf of Mexico, as inferred from variation in nuclear-encoded microsatellites. *Marine Biology* 140, 249-265.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gyory, J., Mariano, A.J. & Ryan, E.H. (2012a) "The Guiana Current". Ocean Surface Currents. <http://oceancurrents.rsmas.miami.edu/atlantic/guiana.html>.
- Gyory, J., Mariano, A.J. & Ryan, E.H. (2012b) "The Caribbean Current". Ocean Surface Currents. <http://oceancurrents.rsmas.miami.edu/caribbean/caribbean.html>.
- Harris, D.J. & Crandall, K.A. (2000) Intra-genomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Molecular Biology and Evolution* 17(2), 284-291.
- Hartnoll, R.G., Broderick, A.C., Godley, B.J. & Saunders, K.E. (2009) Population structure of the land crab *Johngarthia lagostoma* on ascension island. *Journal of Crustacean Biology* 29(1), 57-61.
- Heggoy, K.K., Schander, C. & Akesson, B. (2007) The phylogeny of the annelid genus *Ophryotrocha* (Dorvilleidae). *Marine Biology Research* 3(6), 412-420.
- Hellberg, M.E., Burton, R.S., Neigel, J.E. & Palumbi, S.R. (2002) Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science* 70(1), 273-290.
- Hewitt, G. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907-913.

- Hewitt, G. (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 359, 183-195.
- Hilário, A., Johnson, S.B., Cunha, M.R. & Vrijenhoek, R.C. (2010) High diversity of frenulates (Polychaeta: Siboglinidae) in the Gulf of Cadiz mud volcanoes: a DNA taxonomy analysis. *Deep-Sea Research I* 57, 143-150.
- Ho, S.Y.W. & Shapiro, B. (2011) Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources* 11, 423-434.
- Hoffman, J.I., Peck, L.S., Linse, K. & Clarke, A. (2011) Strong population genetic structure in a broadcast-spawning Antarctic marine invertebrate. *Journal of Heredity* 102(1), 55-66.
- Huang, D., Fitzhugh, K. & Rouse, G.W. (2011) Inference of phylogenetic relationships within Fabriciidae (Sabellida, Annelida) using molecular and morphological data. *Cladistics* 27, 356-379.
- Hutchins, P. A. (2000) Family Amphinomidae. Pp. 107-110 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 xii, 465 pp.
- Iannotta, M.A., Gambi, M.C. & Patti, F.P. (2009) Molecular evidence of intraspecific variability in *Lysidice ninetta* (Polychaeta: Eunicida) 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.
- Jolly, M.T., Lollive, 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 vicariance events. *Molecular Ecology* 15, 1841-1855.
- Jones, G.P., Planes, S. & Thorrold, R. (2005) Coral reef fish larvae settle close to home. *Current Biology* 15, 1314-1318.

- Karl, S.A. & Hayes, K.A. (2012) Extreme populations subdivision in the crown conch (*Melongena corona*): historical and contemporary influences. *Journal of Heredity* 103(4), 523-532.
- Kawauchi, G.Y. & Giribet, G. (2010) Are there true cosmopolitan sipunculan worms? A genetic variation study within *Phascolosoma perlucens* (Sipuncula, Phascolosomatidae). *Marine Biology* 157, 1417-1431.
- Kimura, M. (1969) The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to steady flux of mutations. *Genetics* 61, 893-903.
- Kinder, T.H. (1983) Shallow currents in the Caribbean Sea and Gulf of Mexico as observed with satellite-tracked drifters. *Bulletin of Marine Science* 33, 239-246.
- Kingman, J.F.C. (1982) On the genealogy of large populations. *Journal of Applied Probability* 19, 27-43.
- Knowles L.L. (2009) Statistical phylogeography. *Annual Reviews of Ecology, Evolution, and Systematics* 40, 593-612.
- Kudenov, J.D. (1974) *The reproductive biology of Eurythoe complanata (Pallas, 1766) (Polychaeta: Amphinomidae)*. Tese PhD, University of Arizona.
- Kuhner, M.K. (2006) LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22(6), 768-770.
- Kupriyanova, E.K. & Rouse, G.W. (2008) Yet another example of parphyly in Annelida: Molecular evidence that Sabellidae contains Serpulidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46, 1174-1181.
- Larmuseau, M.H.D., Van Houdt, J.K.J., Guelinckx, J., Hellmans, B., Volckaert, F.A.M. (2009) Distributional and demographic consequences of Pleistocene climate fluctuations for a marine demersal fish in the north-eastern Atlantic. *Journal of Biogeography* 36, 1138-1151.
- 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.
- Lehrke, J., ten Hove, H.A., Macdonald, T.A., Bartolomaeus, T. & Bleidorn, C. (2007) Phylogenetic relationships of Serpulidae (Annelida: Polychaeta) based on 18S rDNA sequence data, and implications for opercular evolution. *Organism Diversity and Evolution* 7, 195-206.

- Lessios, H.A. & Robertson, D.R. (2006) Crossing the impassable: genetic connections in 20 reef fishes across the eastern Pacific barrier. *Proceedings of the Royal Society* 273, 2201-2208.
- Lessios, H.A., Kane, J. & Robertson, D.R. (2003) Phylogeography of the pantropical sea urchin *Tripneustes*: contrasting patterns of population structure between oceans. *Evolution* 57(9), 2026-2036.
- Lessios, H.A., Kessing, B.D. & Pearse, J.S. (2001) Population structure and speciation in tropical seas: global phylogeography of the sea urchin *Diadema*. *Evolution* 55(5), 955-975.
- Lessios, H.A., Kessing, B.D., Robertson, D.R. & Paulay, G. (1999) Phylogeography of the pantropical sea urchin *Eucidaris* in relation to land barriers and ocean currents. *Evolution* 53, 806-817.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lowe, W.H. & Allendorf, F.R. (2010) What can genetics tell us about population connectivity? *Molecular Ecology* 19, 3038-3051.
- Luttikhuisen, P.C. & Dekker, R. (2010) Pseudo-cryptic species *Arenicola defodiens* and *Arenicola marina* (Polychaeta: Arenicolidae) in Wadden Sea, North Sea and Skagerrak: Morphological and molecular variation. *Journal of Sea Research* 63, 17-23.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220.
- McCartney, M.A., Keller, G. & Lessios, H.A. (2000) Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchins of the genus *Echinometra*. *Molecular Ecology* 9, 1391-1400.
- Melo, C.M.R., Silva, F.C., Gomes, C.H.A.M., Solé-Cava, A.M. & Lazoski, C. (2010) *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in Southern Brazil. *Biological Invasions* 12, 441-449.
- Meyer, A., Bleidorn, C., Rouse, G.W. & Hausen, H. (2008) Morphological and molecular data suggest a cosmopolitan distribution of the polychaeta *Proscoloplos cynochaetus* Day, 1954 (Annelida, Orbiniidae). *Marine Biology* 153, 879-889.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway*

- Computing environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA, 1-8.
- Moraes, F.C. & Muricy, G.R. (2007) A new species of *Stoeba* (Demospongiae: Astrophorida) from oceanic islands off north-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 87, 1387-1393.
- Moraes, F.C. & Muricy, G.R. (2003) Taxonomy of *Plakortis* and *Plakinastrella* (Demospongiae: Plakinidae) from oceanic islands off north-eastern Brazil, with description of three new species. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 83, 4121/1-13.
- Nichols, J.D., Hines, J.E., Lebreton, J. & Pradel, R. (2000) Estimation of contributions to population growth: a reverse-time capture-recapture approach. *Ecology* 81(12), 3362-3376.
- Nóbrega, R., Solé-Cava, A.M. & Russo, C.A.M. (2004) High genetic homogeneity of an intertidal marine invertebrate along 8000km of the Atlantic coast of the Americas. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 303, 173-181.
- Norlinder, E., Nygren, A., Wiklund, H. & Pleijel, F. (2012) Phylogeny of scale-worms (Aphroditiformia, Annelida), assessed from 18SrRNA, 28SrRNA, 16SrRNA, mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI), and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65, 490-500.
- Nunes, F.L.D., Norris, R.D. & Knowlton, N. (2011) Long distance dispersal and connectivity in amphi-atlantic corals at regional and basin scales. *PLoS ONE* 6(7), doi:10.1371.
- Nygren, A., Eklöf, J. & Pleijel, F. (2009) Artic-boreal sibling species of *Paranaitis* (Polychaeta, Phyllodocidae). *Marine Biology Research* 5(4), 315-327.
- Nygren, A., Eklöf, J. & Pleijel, F. (2010a) Cryptic species of *Notophyllum* (Polychaeta: Phyllodocidae) in Scandinavian waters. *Organisms Diversity and Evolution* 10, 193-204.
- Nygren, A., Norlinder, E., Panova, M. & Pleijel, F. (2011) Colour polymorphism in the polychaete *Harmothoe imbricate* (Linnaeus, 1767). *Marine Biology Research* 7(1), 54-62.
- Nygren, A. & Pleijel, F. (2011) From one to ten in a single stroke – resolving the European *Eumida sanguinea* (Phyllodocidae, Annelida) species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 58, 132-141.

- Nygren A., Sundkvist A., Mikac B. & Pleijel F. (2010b) Two new and two poorly known autolytines (Polychaeta: Syllidae) from Madeira and the Mediterranean Sea. *Zootaxa* 2640, 35-52.
- Olson, M.A., Zajac, R.N. & Russello, M.A. (2009) Estuarine-scale genetic variation in the polychaete *Hobsonia florida* (ampharetidae; Annelida) in Long Island Sound and relationship to Pleistocene glaciations. *Biological Bulletin* 217, 86-94.
- Osborn, K.J. & Rouse, G.W. (2010) Phylogenetics of Acrocirridae and Flabelligeridae (Cirratuliformia, Annelida). *Zoologica Scripta* 40, 204-219.
- Osborn, K.J., Rouse, G.W., Goffredi, S.K., Robison, A.B.H. (2007) Description and relationship of *Chaetopterus pugaporcinus*, an unusual pelagic Polychaeta (Annelida, Chaetopteridae). *Biological Bulletin* 212, 40-54.
- Palacio, F.J. 1983. Revisión zoogeográfica marina del sur del Brasil. *Boletim do Instituto Oceanográfico* 31(1), 69-92.
- Palumbi, S.R. (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25, 547-572.
- Palumbi, S.R. (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* 13(1), 146-158.
- 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.
- Palumbi, S.R. & Warner, R.R. (2003) Why gobies are like hobbits? *Science* 299, 51-52.
- Pannacciulli, F.C., Bishop, J.D.D. & Hawkins, S.J. (1997) Genetic structure of populations of two species of *Chtamalus* (Crustacea: Cirripedia) in the north-east Atlantic and Mediterranean. *Marine Biology* 128, 73-82.
- 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.
- Peijnenburg, K.T.C.A., Breeuwer, J.A.J., Pierrot-Bults, A.C. & Menken, S.B.J. (2004) Phylogeography of the planktonic chaetognath *Sagitta setosa* reveals isolation in European seas. *Evolution* 58, 1472-1487.

- Petersen, M.E. (1999) Reproduction and development in Cirratulidae (Annelida: Polychaeta). *Hydrobiologia* 402, 107-128.
- Pires, A., Paxton, H., Quintino, V., Rodrigues, A.M. (2010) *Diopatra* (Annelida: Onuphidae) diversity in European waters with the description of *Diopatra micrura*, new species. *Zootaxa* 2395, 17-33.
- 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.
- Plouviez, S., Shank, T.M., Faure, B., Daguin-Thoebaut, C., Viard, F., Lallier, F.H. & Jollivet, D. (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.
- Pont-Kingdom, G., Okada, N.A., Macfarlane, J.L., Beagley, C.T., Watkins-Sims, C.D., Cavalier-Smith, T., Clark-Walter, G.D. & Wolstenholme, D.R. (1998) Mitochondrial DNA of the coral *Sarcophyton glaucum* contains a gene for a homologue of bacterial MutS: a possible case of gene transfer from the nucleus to the mitochondrion. *Journal of Molecular Evolution* 46, 419-431.
- Posada, D. (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1253-1256.
- Postma, E. & van Noordwijk, A.J. (2005) Gene flow maintains a large genetic difference in clutch size at a small spatial scale. *Nature* 433, 65-68.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Pybus, O.G., Rambaut, A. & Harvey, P.H. (2000) An integrated framework for the inference of viral population history from reconstructed genealogies. *Genetics* 155, 1429-1437.
- Pybus, O.G. & Shapiro, B. (2009) Natural selection and adaptation of molecular sequences. Pp 407-418. In: Lemey, P., Salemi, M. & Vandamme, A. (eds). *The Phylogenetics Handbook*. Cambridge: Cambridge University Press, 723 pp.
- 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>.
- Ravara, A., Wiklund, H., Cunha, M.R. & Pleijel, F. (2010) Phylogenetic relationships within Nephytyidae (Polychaeta, Annelida). *Zoologica Scripta* 39, 394-405.
- Ray, N., Currat, M. & Excoffier, L. (2003) Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution* 20(1), 76-86.
- Reed, D.H. & Frankham, R. (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17(1), 230-237.
- Rice, S.A., Karl, S. & Rice, K.A. (2008) The *Polydora cornuta* complex (Annelida: Polychaeta) contains populations that are reproductively isolated and genetically distinct. *Invertebrate Biology* 127(1), 45-64.
- Rocha, L.A. (2003) Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. *Journal of Biogeography* 30, 1161-1171.
- 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. & Harpendings, H. (1992) Population growth makes waves in the distributions of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9, 552-569.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- Rouse, G.W., Goffredi, S.K. & Vrijenhoek, R.C. (2004) *Osedax*: Bone-eating marine worms with dwarf males. *Science* 305, 668-671.
- Rouse, G.W. & Pleijel, F. (2001) *Polychaetes*. Oxford, University Press, 354 pp.
- Ruta, C., Nygren, A., Rousset, V., Sundberg, P., Tillier, Annie, Wiklund, H. & Pleijel, F. (2007) Phylogeny of Hesionidae (aciculate, Polychaeta), assessed from morphology, 18S rDNA, 28S rDNA, 16S rDNA and COI. *Zoologica Scripta* 36, 99-107.
- Sarver, S.K., Silberman, J.D. & Walsh, P.J. (1998) Mitochondrial DNA sequence evidence supporting the recognition of two subspecies of the Florida spiny lobster *Panulirus argus*. *Journal of Crustacean Biology* 18, 177-186.
- Schmid, C., Schafer, H., Podestá, G. & Zenk, W. (1995) The Vitória Eddy and its relation to the Brazil Current. *Journal of Physical Oceanography* 25, 2532-2546.

- Schneider, S. & Excoffier, L. (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152, 1079-1089.
- Schüller, M. (2011) Evidence for a role of bathymetry and emergence in speciation in the genus *Glycera* (Glyceridae, Polychaeta) from the deep Eastern Weddell Sea. *Polar Biology* 34, 549-564.
- Schulze, A. (2006) Phylogeny and genetic diversity of Palolo worms (*Palola*, Eunicidae) from tropical north Pacific and the Caribbean. *Biological Bulletin* 210, 25-37.
- 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(4), 1247-1259.
- Schulze, A., Maiorova, A., Timm, L.E. & Rice, M.E. (2012) Sipunculan larvae and “cosmopolitan” species. *Integrative and Comparative Biology* 52(4), 497-510.
- Schunter, C., Carreras-Carbonell, J., Macpherson, E., Tintoré, J., Vidal-Vijande, E., Pascual, A., Guidetti, P. & Pascual, M. (2011) Matching genetics with oceanography: directional gene flow in a Mediterranean fish species. *Molecular Ecology* 20(24), 5167-5181.
- Slaktin, M. (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236, 787-792.
- 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, A., Finlayson, M., Halpern, H., 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.
- Stramma, L. (1991) Geostrophic transport of the South Equatorial Current in the Atlantic. *Journal of Marine Research* 49, 281-294.
- Stramma, L. & England, M. (1999) On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. *Journal of Geophysical Research* 104(9) 20.863-20.883.
- Struck, T.H. & Halanych, K.M. (2010) Origins of holopelagic Typhloscolecidae and Lopadorhynchidae within Phyllodocidae (Phyllodocida, Annelida). *Zoologica Scripta* 39(3), 269-275.

- Struck, T.H., Purschke, G. & Halanych, K.M. (2006) Phylogeny of Eunicida (Annelida) and exploring data congruence using a partition addition bootstrap alteration (PABA) approach. *Systematic Biology* 55(1), 1-20.
- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- 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.
- Treml, E.A., Halpim, P.N., Urban, D.L. & Pratson, L.F. (2008) Modeling population connectivity by ocean currents, a graph-theoretic approach for marine conservation. *Landscape Ecology* 23, 19-36.
- Virgílio, 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.
- von der Heyden, Bowie, R.C.K., Prochazka, K., Bloomers, P., Crane, N.L. & Bernardi, G. (2011) Phylogeography patterns and cryptic speciation across oceanographic barriers in South African intertidal fishes. *Journal of Evolutionary Biology* 24, 2505-2519.
- Waples, R.S. & Gaggiotti, O. (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* 15, 1419-1439.
- Wares, J.P. (2002) Community genetics in the Northwestern Atlantic intertidal. *Molecular Ecology* 11, 1131-1144.
- Wiklund, H., Glover, A.G. & Dahlgren, T.G. (2009) Three new species of *Ophryotrocha* (Annelida: Dorvilleidae) from a whale-fall in the North-East Atlantic. *Zootaxa* 2228, 43-56.
- Winston, J.E. (2012) Dispersal in marine organisms without a pelagic larval phase. *Integrative and Comparative Biology* 52(4), 447-457.
- 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), doi: 10.1186.

- Wright, S. (1978) *Evolution and the genetics of populations*. The University of Chicago Press, London.
- Xavier, R., Zenboudji, S., Lima, F.P., Harris, D.J., Santos, A.M. & Branco, M. (2011) Phylogeography of the marine isopod *Stenosoma nadejda* (Rezig, 1989) in North African Atlantic and western Mediterranean coasts reveals complex differentiation patterns and a new species. *Biological Journal of the Linnean Society* 104, 419-431.
- Yáñez-Rivera, B. & Salazar-Vallejo, S.I. (2011) Revision of *Hermodice* Kinberg, 1857 (Polychaeta: Amphinomidae). *Scientia Marina* 75(2), 251-262.
- 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.
- Zigler, K.S. & Lessios, H.A. (2004) Speciation on the coasts of the new world: phylogeography and the evolution of bindin in the sea urchin genus *Lytechinus*. *Evolution* 58(6), 1225-1241.