

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estrutura genética e demográfica do caranguejo-uçá
(*Ucides cordatus*) na costa do Brasil

Lucas Alves Vianna

Vitória, ES
Janeiro, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Estrutura genética e demográfica do caranguejo-uçá
(*Ucides cordatus*) na costa do Brasil**

Lucas Alves Vianna

Orientador(a): Valéria Fagundes

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia
Animal**

**Vitória, ES
Janeiro, 2013**

"Existe uma razão maior para se estudar zoologia além da sua possível "utilidade" e do costumeiro gosto pelos animais. Ei-la: nós, os animais, somos as máquinas mais complicadas e mais perfeitamente elaboradas em todo o universo conhecido. Se expusermos a questão por esse prisma, fica difícil entender como alguém poderia desejar estudar outra coisa!"

Richard Dawkins

AGRADECIMENTOS

A finalização desta dissertação é, sem dúvida alguma, um dos marcos mais importantes da minha vida. Todo e qualquer mérito de que este trabalho possa gozar, deve ser compartilhado entre instituições ou pessoas que, de alguma forma, me auxiliaram nesta jornada.

Primeiramente, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa no Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento deste projeto.

Agradeço, também, aos professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, por todos os conselhos proferidos durante as disciplinas de Seminários I e II.

Ao professor Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes, pela concessão de importantes amostras.

Ao pescador Chiquinho, pela coleta dos caranguejos de Barra do Say (SC).

Aos professores Drs. Albert David Ditchfield, José Francisco de Oliveira Neto, Leonora Pires Costa e Roberta Paresque, pela composição da banca avaliadora desta dissertação.

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora Dra. Valéria Fagundes, por toda dedicação oferecida a mim e aos seus outros numerosos alunos, por tanto se sacrificar, em corpo e mente, para atender às demandas de cada um de nós. Muito do que eu aprendi e do que eu sou hoje, devo aos seus ensinamentos de ciência e de história de vida.

À mestre Juliana Justino, técnica do Núcleo de Genética Aplicada a Conservação da Biodiversidade, pela amizade e por todo apoio metodológico.

A todos meus amigos do Laboratório de Genética Animal: Arturo Martinelli, Cristina Dornellas Nogueira Massariol, Eduardo Loyola Muhl, Fernanda Couto Zaidan, Gabriel Bautz Daubem, Lorena Luppe Dinelli, Mariana Azevedo, Marina Monjardim, Rosana Abrante Nunes, Silvia Ramira Lopes Caldara, Victor Colombi e Yuri Marins, que me ajudaram tanto nas partes práticas deste projeto, como em valiosas discussões de cunho filosófico.

Aos meus dedicados amigos de graduação Carina Caiado, Fabiano Honorato, Fernanda de Freitas, Joilton Tavares, Letícia Zanchetta, Marcus Vinícius Scherrer, Mariana Azevedo, Renan Vasconcelos, Thiele Arpini Gaburro e Vinicius Gama, por compartilharem de vários momentos de alegria e me animarem nos momentos de desânimo.

Ao meu mais novo amigo Eduardo Juffernbruch, por me ajudar na edição das figuras e na formatação avançada do texto.

À minha namorada, Mirella Martins Tostes, um agradecimento especial por toda paciência, atenção, amor, e por revisar gramaticalmente todos os meus textos.

À minha família pelo apoio, carinho, orgulho e incentivo durante todos esses anos. Por ser minha platéia nos meus treinos pré-seminários, mesmo sem entender muito do que eu falava. Obrigado por serem as pessoas que mais se importam com minha felicidade nesse mundo.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	I
Lista de Figuras.....	II
Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução.....	3
Materiais e Métodos	7
Resultados.....	11
Discussão.....	17
Referências.....	24

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores gerais das análises genéticas e populacionais. N=número de amostras, NH=número de haplótipos, h =diversidade haplotípica e π =diversidade nucleotídica. * indicam valores não significativos de pvalor.....	12
TABELA 2. Valores obtidos da análise de variância molecular (AMOVA) quando testados três grupos de populações diferentes ou apenas um grupo, contendo todas as populações.....	14
TABELA 3. Valores das estimativas de θ_0 , θ_1 , τ , SSD e RHarpeding obtidos através da análise de <i>mismatch distribution</i>	15

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Localidades de amostragem de *Ucides cordatus* na costa do Brasil..... **8**
- FIGURA 2.** Representação da relação hierárquica entre os haplótipos construída a partir do critério de *median-joining* no programa Network 4.6.1. As áreas dos círculos correspondem, de maneira diretamente proporcional, as frequências dos haplótipos que os representam. Os tamanhos das linhas também estão proporcionais ao número de passos mutacionais, (com exceção dos casos em que muitos passos mutacionais foram encontrados – nestes – os números abaixo das barras representam a quantidade de passos mutacionais totais) e correspondem a um único passo mutacional, em sua maioria..... **13**
- FIGURA 3.** Análise de *mismatch distributions* para cada população (em azul), assim como para todas as populações juntas (em vermelho). Colunas indicam a frequência observada e as linhas indicam a frequência esperada dos números de diferenças par-a-par..... **16**

Resumo

O caranguejo *Ucides cordatus*, popularmente conhecido no Brasil como caranguejo-uçá, é encontrado em manguezais desde o estado de Santa Catarina até a Flórida, nos Estados Unidos. No Brasil, a grande demanda por esta espécie na indústria alimentícia é a causa da cata de várias toneladas de indivíduos todos os anos. Somados a este fator, a destruição dos manguezais e o surgimento de uma doença letal vêm sendo apontados como agentes causadores de severas reduções nos estoques naturais de *U. cordatus*. Uma vez que reduções populacionais severas tendem a provocar eventos de efeito gargalo e, conseqüentemente, redução da aptidão dos indivíduos ao longo do tempo, estudos de genética de populações que se dediquem a entender o padrão da distribuição genética, quantificar o fluxo gênico e avaliar as tendências demográficas das populações, são essenciais na elaboração de estratégias de manejo e de conservação. Portanto, neste trabalho, utilizamos sequências de 568 pb da subunidade 1 do gene mitocondrial citocromo c oxidase de 181 espécimes de *U. cordatus* coletados em 15 localidades ao longo da costa brasileira, entre os estados de Santa Catarina e Maranhão, que compreendem praticamente toda a região de ocorrência da espécie no Brasil. Do total de sequências, 80 haplótipos foram revelados, caracterizando uma elevada diversidade haplotípica ($h=0,925$). Por outro lado, a diversidade nucleotídica foi baixa ($\pi =0,00462$), dada a diferença de poucos pares de bases entre os haplótipos. A relação hierárquica entre os haplótipos não demonstrou nenhuma estruturação geográfica da diversidade genética. Além disso, a análise de variância molecular e os valores da estatística- Φ ($\Phi_{st}=0,00231$) revelaram que a maior parte da variação genética em *U. cordatus* está contida no nível intrapopulacional (98,8%), e apenas uma fração sutil entre os grupos de populações (2,5%). Os valores de F_s de F_u e D de Tajima revelaram-se negativos, indicando que as populações de *U. cordatus* sofreram eventos de expansão populacional recente. Este cenário também foi confirmado através da análise de *mismatch distribution*, na qual distribuições unimodais foram encontradas para todas as populações. Nossos dados são concordantes com trabalhos prévios que indicam que o fluxo gênico em *U. cordatus* é suficientemente amplo a fim de produzir homogeneidade genética entre as populações. Este perfil é condizente com a estratégia de exportação das larvas desta espécie para alto mar, no qual fatores oceanográficos, como correntes marinhas, podem agir de forma a ampliar a dispersão destas formas imaturas.

Abstract

The crab species *Ucides cordatus*, commonly known in Brazil as caranguejo-uçá, is found in mangroves from the state of Santa Catarina, in Brazil, to Florida, in United States. In Brazil, the food industry demand on this species is the cause of the fishing of several tons of specimens each year. Moreover, the mangrove destructions and the origin of a lethal disease are other causes of severe decrease in natural stocks of *U. cordatus*. Since population reductions can produce bottleneck effects and, consequently, fitness reduction in specimens over time, population genetics studies that aim to understand the pattern of genetic distribution among populations, calculate the gene flow and evaluate the demographic trends are critical in the creation of management and conservation programs. Thus, here we used 568 bp sequences of the subunit 1 of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase of 181 *U. cordatus* specimens, collected in 15 localities over the Brazilian coast, among the states of Santa Catarina and Maranhão, which comprises almost the whole occurrence zone of this species in Brazil. From all sequences, 80 haplotypes were found, showing a high haplotype diversity ($h=0,925$). On the other hand, the nucleotide diversity was very low ($\pi=0,00462$), what is explained by the few base pairs differences among the haplotypes. The hierarchical relationship among the haplotypes did not reveal any sign of geographic structure of the genetic diversity. Besides, the analysis of molecular variance and the Φ -statistics values ($\Phi_{st}=0,00231$) revealed that major genetic divergence in *U. cordatus* is found in the intrapopulation level (98,8%), and only a minor amount of this divergence (2,5%) is due the differences among the groups of populations. The Fu's F_s and Tajima's D results were negative and indicate that the *U. cordatus* populations expanded recently. This scenario was also confirmed by the *mismatch distribution* analysis, in which unimodal distributions were found for all populations. Hence, our data are consistent with previous works that indicate that the gene flow in *U. cordatus* populations is enough to produce genetic homogeneity among them. This profile is also compatible with the strategy of larval exportation to open sea in this species, where many oceanographic agents, such as marine currents, can act in a way to amplify the larval dispersion.

Introdução

A capacidade de dispersão dos organismos desempenha um papel central nos processos evolutivos envolvendo populações e espécies, uma vez que é responsável pela redistribuição espacial dos genótipos ao longo do tempo, um fator que não pode ser separado da história de vida do grupo (Ronce 2007). Principalmente em um contexto em que a fragmentação de paisagens, a destruição de habitats, a superexploração de espécies comerciais e os efeitos intrínsecos das mudanças climáticas estão presentes, entender como, para onde e por que organismos se locomovem pode ser crucial para contribuir para a proposição de medidas conservacionistas (Gibbs *et al.* 2009).

No ecossistema marinho, em particular, organismos adultos de muitas espécies exibem capacidade locomotora reduzida ou até mesmo nula em comparação às formas imaturas e, portanto, nesses casos, a dispersão é influenciada principalmente pelas atividades de estágios larvais planctônicos (Palumbi 1992). Investigações diretas da dispersão larval, contudo, são uma tarefa extremamente árdua, uma vez que requerem a marcação de uma quantidade massiva de larvas em sua origem geográfica e o subsequente monitoramento dos movimentos e recrutamentos (Gilg e Hilbish 2003). Desta forma, avaliações indiretas através de estudos de correntes marinhas e de perfis de distribuição da diversidade genética permitem identificar padrões e propor modelos de dispersão larval em organismos marinhos (Chambers *et al.* 2006).

Frequentemente, a primeira informação utilizada para se especular sobre a estrutura genética de populações em ambientes marinhos é a duração do estágio larval no plâncton, que está diretamente correlacionado com a ontogenia da espécie, pois, o tempo em que a larva se mantém a mercê das correntes marinhas influencia fortemente a distribuição genética nas populações (Bohonak 1999; Marko 2004; Dias *et al.* 2006). Larvas planctotróficas, por exemplo, possuem pouca ou nenhuma restrição nutricional, e por isso, podem permanecer por mais tempo no estágio pelágico do que as larvas lecitotróficas, que são dependentes da quantidade de nutrientes contidos no vitelo do ovo (Dias *et al.* 2006). Conseqüentemente, em espécies cuja duração do estágio larval é curta ou ausente, o fluxo gênico esperado é reduzido ou nulo, com forte estruturação genética entre populações. Este cenário tem sido frequentemente ratificado em espécies cujo estágio larval é completado em apenas algumas horas ou dias, como em alguns

invertebrados (McMillan *et al.* 1992; Hellberg 1994, 1996) e peixes (Waples 1987; Doherty *et al.* 1995; Riginos 2001; Purcell *et al.* 2006).

Outro fator relevante nos estudos populacionais de espécies de ambiente marinho é o comportamento das fases larvais quanto à forma de dispersão. Dois mecanismos de dispersão foram constatados em larvas de espécies tipicamente estuarinas: (1) retenção da larva dentro do estuário original durante todo o desenvolvimento, e (2) exportação dos estágios larvais prematuros do estuário original para águas oceânicas, com o subsequente retorno às regiões estuarinas das formas larvais mais avançadas (Sandifer 1975). A capacidade de sobrevivência em diferentes níveis de salinidade influencia o tempo e o modo de dispersão das larvas nos estuários e em alto mar. Exemplos de retenção larval têm sido relatados em numerosos táxons, como caranguejos (Cronin 1982; Morgan 1995; DiBacco e Levin 2000; Marta-Almeida *et al.* 2006; Queiroga *et al.* 2007), cracas (Bousfield 1955), ostras (Wood e Hargis 1971) e peixes (Weinstein *et al.* 1980; Wolanski *et al.* 1997). Não obstante, a exportação de larvas dos estuários confere vantagens por proporcionar maior conectividade entre as populações, favorecendo o fluxo gênico (Christy 1982; Christy e Stancyk 1982; Morgan 1987, 1990).

Apesar de componentes intrínsecos (*e.g.* tempo de vida larval e modo de dispersão) e extrínsecos (*e.g.* diferenças de salinidades e correntes marinhas) terem sido associados frequentemente como facilitadores da dispersão larval, muitos estudos têm demonstrado altos níveis de estruturação genética entre populações e evidenciado barreiras oceânicas (Barber *et al.* 2000; Patarnello *et al.* 2007). Padrões de circulação de correntes, regimes de temperatura, topografia da costa e pressões seletivas locais têm sido identificados como agentes promotores de estruturação genética em populações (*e.g.* Planes *et al.* 2001; Stepien *et al.* 2001; Rocha *et al.* 2005).

A exploração de recursos marinhos de forma sustentável requer que as consequências da pesca comercial sejam compreendidas, principalmente no que se refere à redução do tamanho das populações, perda da variabilidade genética e riscos de extinção (Moreira *et al.* 2011). Assim, estudos de genética de populações e filogeografia que visem esclarecer os padrões de estruturação populacional, identificar os estoques genéticos, testar os efeitos genéticos na taxa de crescimento e até mesmo desenvolver

novas linhagens em cativeiro são de extrema relevância para espécies com importância comercial (Thorpe *et al.* 2000).

Uma das espécies de grande importância econômica no Brasil é o caranguejo de mangue *Ucides cordatus* Linnaeus, 1763 (Decapoda, Ucridae), popularmente conhecido como caranguejo-uçá. Devido a seu grande valor na culinária brasileira (Glaser 2003), a cata de centenas de toneladas deste caranguejo é realizada todos os anos. Somente no estuário do Caeté, no estado do Pará, por exemplo, entre seis a oito toneladas de caranguejo são coletadas por km² por ano (Diele e Koch 2010), representando a fonte de renda primária para 38% das famílias deste estuário (Glaser 2003).

Em um panorama ecológico, *U. cordatus* é uma espécie-chave na reciclagem dos nutrientes dos manguezais, sendo responsável pelo consumo e degradação de mais de metade das folhas senescentes deste ecossistema (Schories *et al.* 2003). Koch (2002) estimou que cerca de 80% da biomassa da epifauna dos manguezais é constituída pelo caranguejo-uçá, que serve como recurso alimentar para muitos grupos de animais que habitam ou visitam regularmente este ecossistema.

Os indivíduos de *U. cordatus* são relativamente grandes e de crescimento lento e, em média, vivem mais de dez anos (Diele 2000). A maturidade sexual é alcançada entre os dois ou três primeiros anos de idade (Diele, 2000; Pinheiro *et al.* 2005), quando machos e fêmeas apresentam tamanhos de carapaça entre 3,5-5,2 cm e 4,0-5,6 cm, respectivamente (Vale 2003). Respeitadas as regulações de cata estipuladas pela Portaria nº 52 do IBAMA (2003), em que somente caranguejos machos e com largura de carapaça superior a 6.0 cm podem ser coletados, indivíduos maduros podem se reproduzir várias vezes até atingirem o tamanho de cata permitido (Diele 2000).

Apesar da atual exploração de pesca de *U. cordatus* não indicar ameaça às populações como um todo, algumas evidências fornecem um aviso de que os caranguejos com tamanho comercializáveis estão sobre forte pressão exploratória (Glaser e Diele 2004). A taxa de exploração (E) de um recurso pode ser estimada pela razão entre a mortalidade por pesca (F) e a mortalidade total (Z), permitindo uma avaliação preliminar da situação do estoque explorado (Sparre e Venema 1997). Quando a taxa de exploração (E) é próxima de 0.5, o estoque está em nível máximo de produção (Garcia e Le Reste 1981). Em *U. cordatus*, a taxa de exploração obtida para machos é

de 0.58, indicando que a pesca nesta espécie se encontra em um nível limite (Neto 2011).

Além da cata exploratória, o surgimento de uma doença letal desde o final dos anos 90 vem causando mortandades em várias populações de caranguejo-uçá (Boeger *et al.* 2005, 2007), reduzindo em mais de 80% o número de caranguejos coletados em alguns estuários do nordeste brasileiro (Nobrega e Nishida 2003; Schmidt 2006). No ano de 2005, na região estuarina de Caravelas/Nova Viçosa, no sul da Bahia, estima-se que para os 11.000 ha de manguezal, houve perda de aproximadamente 45 milhões de caranguejos, equivalendo a um prejuízo de cerca de sete milhões de dólares (Schmidt 2006). Apesar disso, monitoramentos realizados em Caravelas/BA vêm indicando significativa recuperação da densidade populacional de *U. cordatus*, com aumento de 0,70 (em 2006) para 1,33 ind./m² (em 2007) (Schmidt *et al.* 2008).

Vários potenciais agentes patogênicos foram indicados, incluindo vírus, bactérias, protozoários e venenos químicos, mas somente em 2005 a doença foi associada à presença do fungo ascomiceto *Exophiala cancerae* (de Hoog *et al.* 2011) como seu agente etiológico, e batizada “Doença do Caranguejo Letárgico” (DCL), uma vez que os indivíduos afetados manifestavam sinais agudos de letargia (Boeger *et al.* 2005; Boeger *et al.* 2007; Oréllis-Ribeiro *et al.* 2011). Casos de contaminação pelo *E. cancerae* também já foram relatados em humanos, em anfíbios (*Pseudepidalea viridis*), e até mesmo em fontes de água em diversos países, como Estados Unidos, Israel, Austrália, Alemanha e Países Baixos (Vicente *et al.* 2012). Tal distribuição cosmopolita sugere que o fungo já estava presente no Brasil antes do surto de 1997 e que, portanto, mudanças no hospedeiro ou das condições ambientais são mais prováveis do que o surgimento de um genótipo virulento (Vicente *et al.* 2012). Porém, relatos de pescadores brasileiros anciões, vivendo em locais distantes de mais de 1.500 km, indicam que extensivas mortalidades de caranguejos ocorreram há mais de 50 anos (Vicente *et al.* 2012).

Interessantemente, Boeger *et al.* (2007) demonstraram a presença de leveduras de *E. cancerae* em organismos saudáveis, o que pode indicar que alguns caranguejos seriam resistentes ao patógeno. A primeira ocorrência de DCL foi registrada no estado do Pernambuco, e se disseminou ao norte, até o estado do Ceará e, ao sul, até estado do Espírito Santo, no município de Aracruz. Apesar da ampla distribuição do *U. cordatus* por todo o continente americano, do sul da Flórida (EUA) até o extremo sul de Santa

Catarina, no Brasil (Melo 1996), não existem relatos da DCL em nenhum estuário ao norte do Ceará ou ao sul do Espírito Santo.

Diferenças na qualidade da resposta imunológica ao *E. cancerae* dentro das populações de caranguejo-uçá podem estar relacionadas a fatores genéticos, fisiológicos e/ou ambientais (Boeger *et al.* 2007). Uma das hipóteses que poderia, potencialmente, explicar o padrão da distribuição da DCL seria a quebra de fluxo gênico, promovendo um padrão genético distinto entre populações a sul do Espírito Santo e a norte do Ceará.

A crescente preocupação com a conservação de *U. cordatus* pode ser observada através das recentes publicações dos primeiros trabalhos de genética de população com esta espécie. Estes estudos pioneiros utilizaram as técnicas de RAPD, PCR-RFLP e sequências da região controle do DNA mitocondrial (Oliveira-Neto *et al.* 2007a, 2007b; Britto *et al.* 2011), amostrando populações dos estados do Pará, Ceará, Pernambuco, Sergipe, Bahia, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, e mostraram resultados bastante similares, com falta de estruturação geográfica de diversidade genética.

Contudo, a ampliação amostral de *U. cordatus* e a utilização de um marcador molecular de evolução mais lenta podem revelar padrões da distribuição da diversidade genética no caranguejo-uçá não observados anteriormente. Deste modo, nosso objetivo foi entender como a diversidade genética do caranguejo-uçá está distribuída ao longo de suas populações; verificar a existência de quebras filogeográficas que expliquem a distribuição da ocorrência da DCL; e investigar se as populações mais afetadas pela DCL e pelo extrativismo acentuado apresentam sinais de efeito gargalo recente, visando à obtenção de dados que possam ser utilizados na elaboração de estratégias de manejo e conservação.

Materiais e Métodos

Amostragem

Nossa amostragem consistiu de 181 espécimes de *Ucides cordatus* de 15 localidades, ao longo de aproximadamente 5.000 km de costa brasileira, entre os estados do Maranhão e Santa Catarina (Figura 1). Os indivíduos foram capturados entre abril de 2011 e junho

de 2012, mantidos em etanol 70% a temperatura ambiente e tombados no Laboratório de Genética Animal (LGA), na Universidade Federal do Espírito Santo.

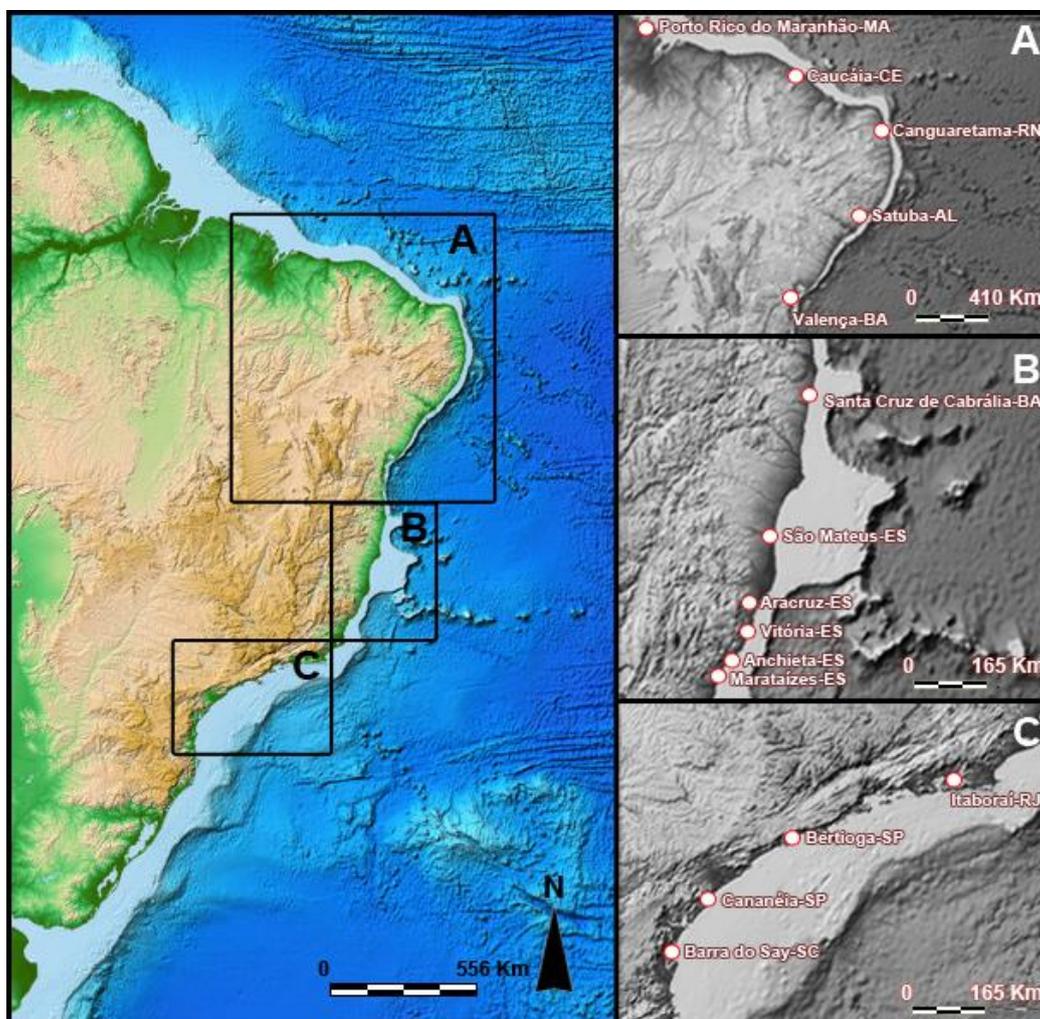


Figura 1. Localidades de amostragem de *Ucides cordatus* na costa do Brasil.

Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

Amostras de tecido muscular de pereiópode foram armazenadas em etanol absoluto à -20°C na Coleção de Tecidos Animais (CTA) da Universidade Federal do Espírito Santo. A extração de DNA total foi feita através do protocolo descrito por Bruford *et al.* (1992) com modificações. O DNA extraído foi diluído e posteriormente quantificado no espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific) e visualizado em gel de agarose 2%. A amplificação de 603 pb da sub-unidade 1 do gene mitocondrial citocromo c oxidase (COI) foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em termocicladores Perkin Elmer PCR System 2400, usando os *primers* genéricos LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') e HCO2198 (5'-TAA

ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Folmer *et al.* 1994). As reações de PCR foram feitas para um volume total de 25 μ l, incluindo 2,5 mM de cada *primer*, 75 mM de MgCl₂, 1x solução tampão, 5 mM de desoxiribonucleotídeos, 1 U de Platinum™ Taq DNA polimerase (Invitrogen, Inc) e 20-50 ng de DNA. O perfil de termociclagem consistiu de 1 min para desnaturação inicial a 95°C, 35 ciclos de 45 seg de desnaturação a 95°C, 45 seg de anelamento a 51°C e 45 seg de extensão a 72°C, seguidos por um passo de extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos de PCR foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e o tamanho e qualidade das bandas estimados com o auxílio de marcadores moleculares de 1 Kb (Invitrogen, Inc.™). Os produtos da PCR foram purificados com o kit Exo-Sap-IT™ (USB Corporation) e as sequências geradas pela empresa Macrogen Inc. (www.macrogen.com; Seul, Coréia). Como grupo externo, foram utilizadas sequências disponíveis no Genbank de *Uca lactea* (HM180935), *Uca minax* (FJ693520) e *Minuca pugnax* (FJ693647).

Análises genéticas dos dados

As sequências geradas foram alinhadas com o software ClustalX v2.0 (Larkin *et al.* 2007) utilizando-se valores padrões nos parâmetros de alinhamento. O alinhamento manual foi realizado posteriormente para a checagem de possíveis incongruências. O número de haplótipos, a diversidade haplotípica (h) e a diversidade nucleotídica (π) foram estimados para cada população, assim como para a amostra total, utilizando-se o programa DnaSP v5.0 (Librado e Rozas 2009). O modelo de evolução molecular que melhor se ajusta aos dados foi calculado pelo uso do critério de informação de Akaike, implementando no software Jmodeltest v0.1 (Posada 2008).

As hipóteses filogenéticas com base em critérios de distância (NJ) e máxima-verossimilhança (ML) foram construídas pelo programa MEGA v5.0 (Tamura *et al.* 2011). A relação filogenética entre os haplótipos foi investigada através da análise de Median-Joining (Bandelt *et al.* 1999) no programa Network v4.6.1.

A diferenciação genética entre as populações foi avaliada a partir dos cálculos de diferença par-a-par entre as sequências (estatística- Φ), utilizando-se o modelo de Tamura e Nei, com correção de gama e testada com 10.000 permutações. O número de migrantes por geração (Nm) para cada par de populações foi estimado assumindo uma

taxa de mutação insignificante, através da fórmula $Nm=(1-\Phi_{st})/2\Phi_{st}$, para genomas haplóides (Slatkin e Maddison 1989).

Adicionalmente, a existência de estruturação geográfica na variabilidade genética das populações foi testada através da Análise de Variância Molecular (AMOVA), calculada baseada em uma matriz de distância entre haplótipos, utilizando-se valores de diferenças par-a-par e 10.000 replicações.

Duas hipóteses foram testadas. Na primeira, todas as localidades de coleta foram tratadas como uma única população. Na segunda, grupos de populações foram delimitados, baseando-se na proposta de que quebras filogeográficas em *Ucides cordatus* seriam detectadas em função da distribuição da DCL: um grupo norte formado por localidades onde não há relatos da doença (Porto Rico do Maranhão), um grupo central delimitado pela ocorrência da DCL, sendo Aracruz o limite austral e Ceará o limite boreal (Caucáia a Aracruz) e um grupo sul onde também não há relatos da DCL (Vitória a Barra do Say). Tais testes foram calculados no software Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier e Lischer 2010).

A hipótese de isolamento por distância entre as populações foi avaliada através do Teste de Mantel (Mantel 1967), implementado no programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier e Lischer 2010).

Com o objetivo de se examinar a história demográfica das populações de *U. cordatus*, utilizamos os testes de neutralidade de D de Tajima (Tajima 1989) e Fs de Fu (Fu 1997). Esses testes estatísticos foram originalmente desenvolvidos para se avaliar a hipótese de neutralidade seletiva; contudo, são atualmente amplamente utilizados na detecção de mudanças no tamanho das populações (Mousset *et al.* 2004). Tais testes estimam o desvio da neutralidade, que é baseado na expectativa de populações de tamanho constante em equilíbrio entre mutação e deriva. Valores negativos de D de Tajima e Fs de Fu são indícios de expansão populacional.

Outra análise que explora a história demográfica das populações tem como critério a frequência da distribuição do número de diferenças par-a-par entre os haplótipos e é conhecida como *mismatch distribution* (Slatkin e Hudson 1991; Rogers e Harpending 1992). Três parâmetros foram estimados utilizando-se o modelo de Rogers e Harpending's (1992): $\theta_0=2N_0u$, $\theta_1=2N_1u$ e $\tau = 2ut$, em que uma população inicial de tamanho efetivo N_0 cresce rapidamente para um novo tamanho N_1 em um tempo de t gerações antes do presente, e u é a chance, por geração, de uma mutação incidir sobre um nucleotídeo dentro do fragmento estudado. Distribuições unimodais são formadas

pelo acúmulo de mutações de baixa frequência, sobretudo de *singletons*, e indicam expansão populacional recente. Nestes casos, para calcularmos o tempo em anos, desde o início da expansão populacional, utilizamos a fórmula $T=\tau/2u$, levando em consideração que em crustáceos decápodos, as taxas de mutação estimadas por nucleotídeo, no COI, são de 1,4 a 2,6% a cada milhão de anos (Schubart *et al.* 1998), e assumindo um tempo de geração de aproximadamente 3 anos (Diele 2000). Por outro lado, populações em equilíbrio demográfico contêm ramos internos longos, e as mutações presentes nestes ramos serão compartilhadas por várias linhagens, resultando em uma *mismatch distribution* irregular ou descontínua. Tal análise foi realizada no software Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier e Lischer 2010) com 10.000 replicações.

Resultados

Variabilidade do COI

Após eliminação das posições de alinhamento ambíguo (dados perdidos/gaps) obtivemos 181 sequências de 568-pb do gene mitocondrial COI, que revelaram 80 haplótipos definidos por 490 sítios invariáveis e 78 sítios polimórficos, dos quais 40 (51%) foram *singletons* e 38 (49%) informativos (Tabela 1). O modelo evolutivo que mais se adequou aos dados foi GTR + I +G (frequência das bases: A = 0.29, C = 0.21, G = 0.16 e T = 0.32; taxas de substituição: A-C = 0.11, A-G = 3.54, A-T = 0.05, C-G = 0.00, C-T = 3.88 e G-T = 1.00; e razão entre transições e transversões de aprox. 21:1).

Os valores de diversidade haplotípica foram altos ($h=0,925$, variando entre 0,872 e 1,00), enquanto os índices de diversidade nucleotídica se mantiveram próximos de zero ($\pi =0,004$, variando entre 0,004 e 0,014).

A distribuição dos haplótipos não variou em função da latitude, sendo aleatória entre as localidades. Dentre os 80 haplótipos, 65 (81% dos haplótipos) ocorreram em apenas um indivíduo de uma única localidade e, portanto, não foram compartilhados. Em contrapartida, o haplótipo mais comum (H1) foi observado em 45 espécimes (25% da amostra) de todas as 15 localidades, seguido pelos haplótipos H4 (n=13; 16,25%), H16 (n=11; 13,75%) e H8 (n=10; 12,5%) que ocorreram em indivíduos oriundos de populações geograficamente distantes, representadas, inclusive, pelos limites amostrais aboral e austral com aproximadamente 5.000 km.

Tabela 1. Valores gerais das análises genéticas e populacionais. N=número de amostras, NH=número de haplótipos, h =diversidade haplotípica e π =diversidade nucleotídica. * indicam valores não significativos de pvalor

Localidade	Estado	N	NH	Média Dif, Par-Par	N sítios polimórficos	Φ_{st}	h	π	Fs de Fu	P_{FsFu}	D de Tajima	$P_{D_{Taj}}$
P. R. do Maranhão	MA	17	13	8,897	43	-0.13312	0,926	0,01480	-10,12825	0,00000	-1,24660	0,10200*
Caucáia	CE	20	14	2,974	19	0.02194	0,916	0,00494	-25,45976	0,00000	-1,68195	0,02300
Canguaretama	RN	11	10	3,200	16	0.02019	0,982	0,00531	-9,39407	0,00000	-1,84622	0,02000
Satuba	AL	8	8	3,643	13	0.01403	1,000	0,00608	-4,92425	0,00200	-1,38457	0,07900*
Valença	BA	10	9	4,422	19	-0.01034	0,978	0,00748	-6,44322	0,00100	-1,60038	0,04900
S. C. de Cabralia	BA	10	8	2,622	11	0.03276	0,956	0,00435	-9,02415	0,00000	-1,45806	0,06700*
São Mateus	ES	9	9	3,167	12	0.02228	1,000	0,00525	-6,68294	0,00000	-1,33984	0,09900*
Aracruz	ES	10	8	2,422	10	0.03666	0,956	0,00402	-9,46288	0,00000	-1,39515	0,09600*
Vitória	ES	17	14	3,809	25	0.00402	0,956	0,00632	-17,46755	0,00000	-1,95225	0,01100
Anchieta	ES	16	12	3,100	19	0.01405	0,958	0,00519	-17,79754	0,00000	-1,83689	0,01600
Marataízes	ES	10	10	3,422	13	0.01616	1,000	0,00568	-7,64123	0,00000	-1,16164	0,11300*
Itaboraí	RJ	13	9	3,077	16	0.02154	0,872	0,00510	-12,73393	0,00000	-1,69412	0,03100
Bertioga	SP	10	8	2,956	11	0.01812	0,933	0,00490	-7,77168	0,00000	-0,63915	0,27900*
Cananéia	SP	10	10	3,867	16	0.00727	1,000	0,00642	-7,05414	0,00000	-1,46436	0,05200*
Barra da Say	SC	10	9	3,556	17	0.01277	0,978	0,00604	-7,45425	0,00000	-1,89865	0,01300
Total	-	181	80	2,622	78	0.00231	0,925	0,00462	-25,71878	0,00000	-2,40841	0,00000

Os cladogramas gerados através das inferências de NJ e MP agruparam todos os espécimes em um mesmo clado, sem distinção de localidade. Em resumo, a topologia mostrada por ambas às análises foi uma extensa politomia (dados não mostrados). Similarmente, a rede de haplótipos (Figura 2) não mostrou estruturação geográfica da diversidade genética, tendo indicado uma topologia em forma de estrela, com um haplótipo mais frequente que se conecta aos demais por meio de um ou poucos passos mutacionais.

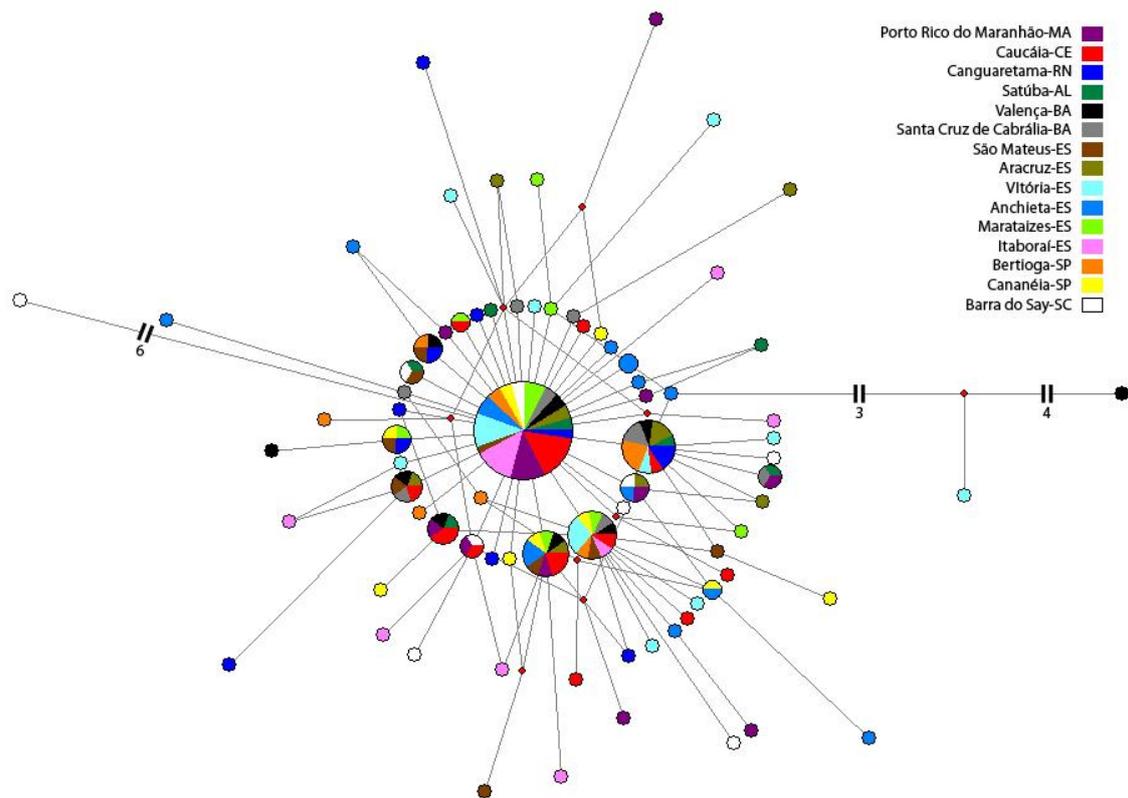


Figura 2. Representação da relação hierárquica entre os haplótipos construída a partir do critério de *median-joining* no programa Network 4.6.1. As áreas dos círculos correspondem, de maneira diretamente proporcional, as frequências dos haplótipos que os representam. Os tamanhos das linhas também estão proporcionais ao número de passos mutacionais, (com exceção dos casos em que muitos passos mutacionais foram encontrados, nestes, os números abaixo das barras representam a quantidade de passos mutacionais totais) e correspondem, em sua maioria, a um único passo mutacional.

Diferenciação genética entre as populações

A diferenciação genética entre todas as populações foi baixa ($\Phi_{st} = 0.012$). Comparações par-a-par dos valores de Φ_{st} não revelaram diferenciação genética entre as populações, com exceção de cinco pares de populações (p -valor $< 0,05$), todas comparadas com Aracruz/ES: Valença/BA ($\Phi_{st} = 0.0752$), Marataízes/ES ($\Phi_{st} = 0.0890$), Itaboraí/RJ ($\Phi_{st} = 0.0630$), Bertioga/SP ($\Phi_{st} = 0.0862$) e Cananéia/SP ($\Phi_{st} = 0.0646$).

A análise de variância molecular (Tabela 2) mostrou maior diferenciação genética dentro das populações do que entre os grupos nas duas hipóteses testadas (98,84%, $\Phi_{ct}=0.04$, $\Phi_{sc}=0.21$, $\Phi_{st}=99.75$), revelando que os três grupos propostos pela ocorrência da DCL são artificiais. Além disso, somente 2,49% de toda variação foi proveniente da divergência entre os grupos formados sobre a hipótese de quebra filogeográfica. Esse padrão é comum quando se observa uma grande diversidade haplotípica dentro das populações. O número de migrantes estimado por geração entre as populações variou de cinco a infinitos. Dos 105 pares de populações, em 51 (48%) foram estimados infinitos número de migrantes.

Tabela 2. Valores obtidos da Análise de Variância Molecular (AMOVA) quando testados três grupos de populações diferentes ou apenas um grupo, contendo todas as populações.

Amova				
Hipótese	Percentual de Variação			Fst
	Entre grupos	Entre pop. dentro dos grupos	Dentro de Populações	
1 grupo	–	0,23	99,77	0.00231
3 grupos	2,49	-1,33	98,84	0.01163

A correlação entre a divergência genética e a distância geográfica entre as populações foi confirmada através do teste de Mantel (p-valor = 0.0302, 10.000 randomizações, coeficiente de correlação $r = 0.4515$).

Mismatch distribution e testes de neutralidade

Os índices de F_s de F_u e D de Tajima foram negativos para cada população, caracterizando um padrão de expansão populacional recente. Os valores de F_s de F_u foram significantes para todas as populações, enquanto somente sete populações (46%) apresentaram valores significativos de D de Tajima. Quando todas as amostras foram analisadas, valores negativos significativos para ambos os testes foram encontrados (Tabela 1).

Com exceção de Porto Rico do Maranhão/MA, Valença/BA e São Mateus/ES, todas as populações exibiram um padrão de distribuição *mismatch* unimodal, sugerindo

expansão populacional súbita (Figura 3). Os valores da soma do desvio dos quadrados (SSD) (Tabela 3) da distribuição de *mismatch* foram não-significativos para todas as populações, indicando que o modo pelo qual as populações expandiram segue o padrão segundo a curva de distribuição de *mismatch* esperada, e não a observada. Apesar de não significantes, os valores de rHarpending foram baixos, corroborando com o cenário de expansão populacional recente. Os índices de θ_0 e θ_1 apontaram que as populações expandiram de um tamanho reduzido para um tamanho tendendo a infinito. Os valores de τ oscilaram entre as populações, não demonstrando um padrão de variação em relação ao tempo de expansão ou posição latitudinal das populações. Embora Porto Rico do Maranhão tenha apresentado o maior valor de τ (8,392), todas as outras populações demonstraram valores próximos de 5. O tempo de expansão estimado para todas as populações agregadas foi de 145.381 anos quando utilizado o valor mínimo de taxa de mutação de 1,4% e de 269.994 anos quando utilizado seu valor máximo de 2,6%. Estes valores indicam que as expansões populacionais em *U. cordatus* são um evento antigo, que remonta o Pleistoceno.

Tabela 3. Valores das estimativas de θ_0 , θ_1 , τ , SSD e RHarpending obtidos através da análise de *mismatch distribution*.

Populações	θ_0 (95% IC)	θ_1 (95% IC)	τ (95% IC)	SSD	P _{SSD}	RHarp.	P _{RHarp.}
Porto Rico do Maranhão	2.692 (0-4.952)	∞ (5.098- ∞)	8.392 (0.451-9.904)	0,014	0,504	0,016	0,960
Caucáia	1.297 (0-2.034)	∞ (5.591- ∞)	4.996 (0.816-5.785)	0,002	0,861	0,022	0,890
Canguaretama	0.766 (0- 1.575)	∞ (10- ∞)	5.021 (1.418-5.30)	0,010	0,524	0,056	0,511
Satuba	1.332 (0-2.152)	∞ (12.809- ∞)	5.783 (1.654-6.125)	0,029	0,341	0,074	0,570
Valença	0.502 (0- 1.292)	∞ (7.130- ∞)	4.210 (0.980-4.498)	0,027	0,319	0,072	0,463
S. C. de Cabralia	0.620 (0-1.463)	∞ (7.691- ∞)	4.410 (0.980-4.676)	0,002	0,926	0,046	0,811
São Mateus	0.574 (0-1.218)	∞ (5.167- ∞)	4.007 (0.719-4.314)	0,057	0,144	0,165	0,181
Aracruz	0.667 (0- 1.2)	∞ (5.6- ∞)	4.013 (0.7-4.3)	0,004	0,814	0,060	0,659
Vitória	1.119 (0-1.496)	∞ (8.218- ∞)	4.337 (1.371-4.590)	0,008	0,413	0,037	0,609
Anchieta	0.622 (0-1.254)	∞ (8.248- ∞)	4.197 (1.469-4.406)	0,004	0,715	0,039	0,618
Marataizes	0.996 (0-1.679)	∞ (8.512- ∞)	5.015(1.324-5.342)	0,003	0,912	0,038	0,791
Itaboraí	1.304 (0-1.886)	∞ (5.918- ∞)	5.781 (1.229-6.301)	0,012	0,506	0,039	0,716
Bertioga	4.29 (0-6.347)	∞ (10.182- ∞)	5.802 (0.459-6.475)	0,012	0,592	0,046	0,733
Cananéia	1.08 (0- 1.949)	∞ (12.887- ∞)	5.734 (1.732-6.098)	0,060	0,074	0,166	0,081
Barra do Say	0.733 (0-1.222)	∞ (6.412- ∞)	4.486(1.199-4.793)	0,018	0,580	0,044	0,764
Total	0.922(0-1.269)	∞ (16.504- ∞)	4.294(1.811- 4.668)	0.000	0.660	0.021	0.700

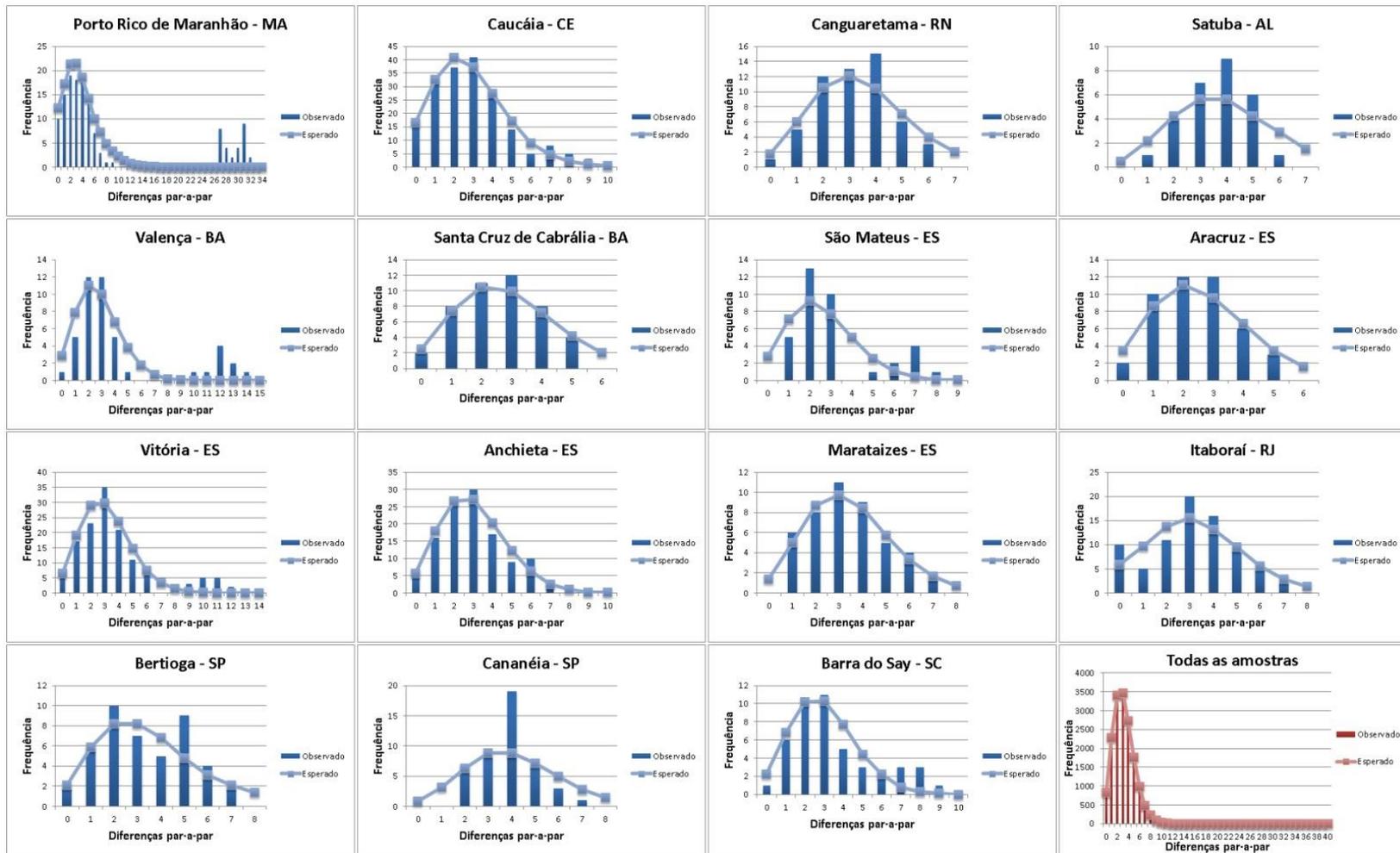


Figura 3. Análise de *mismatch distributions* para cada população (em azul), assim como para todas as populações juntas (em vermelho). Colunas indicam a frequência observada e as linhas indicam a frequência esperada dos números de diferenças par-a-par.

Discussão

Distribuição da variabilidade genética

Todas as análises populacionais apresentadas no presente estudo apontam para um cenário de baixa divergência interpopulacional e alta divergência intrapopulacional, com ausência de estruturação genética entre as populações de *U. cordatus*. A topologia em forma-de-estrela da rede de haplótipos, associada a um grande número de *singletons*, e os sinais de expansão recente são congruentes com esse cenário. O haplótipo mais frequente (H1) foi observado em espécimes de todas as populações, desde Porto Rico do Maranhão (MA) até Barra do Say (SC), distantes por aproximadamente 5.000 km. Os outros haplótipos também foram compartilhados entre várias populações, incluindo aquelas distantes por milhares de quilômetros e, portanto, nossos resultados indicam que não é possível identificar a localidade de origem de um caranguejo através de dados haplotípicos. Além disso, os valores de AMOVA e dos índices da estatística- Φ corroboram com a ausência de estruturação geográfica da diversidade genética no caranguejo-uçá.

Analogamente, esse mesmo cenário foi identificado em outras espécies de caranguejos com extensa distribuição geográfica, tais como *Uca annulipes* (Silva *et al.* 2010) e *Cardisoma guanhumí*, popularmente conhecido como guaiamum, o qual apresenta distribuição simpátrica com *U. cordatus* (Oliveira-Neto *et al.* 2008). Contudo, elevada estruturação genética já foi relatada entre populações geograficamente próximas em alguns caranguejos, como por exemplo, *Callinectes danae* (Weber e Levy 2000). Diferentemente dos casos de *U. annulipes* e *C. guanhumí*, cujos métodos de dispersão consistem em mecanismos de exportação larval para alto-mar (Oliveira-Neto *et al.* 2008; Silva *et al.* 2010), em *C. danae* tem sido demonstrado padrões de retenção larval (Weber e Levy 2000), o que explicaria tais diferenças.

Nossos dados, embora com ampliação do número de populações e com o uso de um novo marcador genético, são concordantes com os trabalhos prévios com *U. cordatus* (Oliveira-Neto *et al.* 2007a; 2007b; Britto *et al.* 2011), nos quais nenhuma estruturação geográfica da diversidade genética foi encontrada. Através de sequências da região controle do DNA mitocondrial (RC), Oliveira-Neto *et al.* (2007b) encontraram o mesmo padrão de elevada diversidade haplotípica e reduzida diversidade nucleotídica. Entretanto, os valores de diversidade nucleotídica encontrados por estes

autores ($\pi=0,035$) foram maiores do que os encontrados aqui ($\pi=0,00462$), dados não surpreendentes uma vez que a velocidade evolutiva da RC e do COI são distintas. Enquanto o COI é considerado um gene de evolução neutra, a RC, por não ser responsável pela transcrição de proteínas, apresenta regiões hipervariáveis (Wan *et al.* 2004) em decorrência de reduzida pressão seletiva em partes desse marcador.

De forma equivalente, tanto as análises de RFLP e RAPD de Oliveira-Neto *et al.* (2007a), quanto a análise de RAPD de Britto *et al.* (2011) demonstraram elevados graus de polimorfismo. A maior parte desta variação, contudo, foi verificada entre indivíduos dentro de populações. Assim como neste trabalho, os valores obtidos de Φ_{st} , em ambos os estudos, foram próximos de zero ($\Phi_{st} = 0,0780$, Britto *et al.* 2011; Φ_{st} entre $-0,00926$ e $0,03072$, Oliveira-Neto *et al.* 2007a).

A concordância dos resultados entre marcadores moleculares de evolução distinta agrega força ao panorama de amplo fluxo gênico e ausência de estruturação genética em *U. cordatus*. Aqui, basicamente a maior fração da variação genética encontrada em *U. cordatus* foi oriunda da diferença genética entre espécimes da mesma população, e apenas uma parte sutil dessa variação foi proveniente da diferença entre os grupos hipotéticos baseados na proposta de quebra filogeográfica sugerida pela distribuição da DCL. Além disso, Wright (1978) indicou que valores de Φ_{st} próximos de zero podem ser indicativos de pouca diferenciação genética, o que possivelmente se aplica no caso de *U. cordatus*.

Uma vez que nossos dados não são concordantes com a nossa hipótese de quebra filogeográfica em *U. cordatus*, os grupos testados se mostraram artificiais e, portanto, o padrão de distribuição da diversidade genética não se sobrepõe à distribuição da DCL. Assim, a ausência de relatos de caranguejos afetados pelo *E. cancerae* em manguezais ao sul do Espírito Santo e ao norte do Ceará provavelmente não é devida a uma exibição de genes de resistência exclusivos a estas populações, uma vez que os dados aqui observados, tais como o compartilhamento de haplótipos entre todas as populações, os elevados números de migrante e a falta de divergência genética entre as regiões saudáveis e afetadas, são fatores que demonstram amplo fluxo gênico e que, portanto, os possíveis genes de resistência deveriam, também, ser compartilhados entre as populações.

A DCL tem sido palco de diversos estudos e, apesar dos recentes progressos acerca do entendimento de seu agente patogênico, muitas respostas permanecem

incógnitas (Boeger *et al.* 2007). Entender o motivo da restrição geográfica da DCL pode ser essencial na prevenção ou eliminação de novos surtos e, conseqüentemente, dos preocupantes gargalos populacionais e genéticos em *U. cordatus*. Para tal, são necessários trabalhos que identifiquem alterações ambientais, genéticas ou fisiológicas tanto do agente patogênico quanto do organismo afetado ao longo da costa brasileira.

Demografia populacional

A oscilação no tamanho das populações provoca traços particulares que podem, casualmente, ser detectados em dados de sequências de DNA (Slatkin e Hudson 1991; Rogers e Harpending 1992). Por exemplo, o cenário de alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica – como o encontrado em *U. cordatus* – está geralmente associado à ausência parcial ou total de estruturação populacional (Patarnello *et al.* 2007; von der Heyden *et al.* 2007), e é típico de populações que sofreram eventos de expansão após episódios de efeito gargalo ou efeito fundador (Grant e Bowen 1998; Waples 1998; Zhang *et al.* 2006). Isso se deve à tendência à retenção de novas mutações em eventos de expansão populacional repentina (Fu 1997), explicada pelo alto número de *singletons* em nossas amostras e elevada diversidade haplotípica. Acredita-se que em tais eventos o número de haplótipos gerados por mutações é maior do que o perdido por deriva genética (Avise *et al.* 1984).

Slatkin e Hudson (1991) revelaram que relações filogenéticas entre haplótipos que definem uma topologia em forma de estrela, como a que foi observada para *U. cordatus*, são indicativos de que a população se expandiu recentemente em tamanho, após um evento de efeito gargalo.

Somados à topologia da rede de haplótipos, a alta diversidade haplotípica e a reduzida diversidade nucleotídica, os valores negativos das análises de D de Tajima e F_s de Fu também fortalecem o sinal de expansão populacional. Por último, a distribuição unimodal verificada na análise de *mismatch distribution* reforça a hipótese de um fenômeno de expansão populacional em *U. cordatus* (Slatkin e Hudson 1991; Rogers e Harpending 1992).

Indicações de expansão populacional são encontradas em diversos outros caranguejos, como por exemplo: *U. annulipes*, ao longo da costa leste da África (Silva *et al.* 2010), e *C. guanhumi*, ao longo da costa do Brasil (Oliveira-Neto *et al.* 2008).

Nossos resultados também foram concordantes com as análises de *mismatch distribution* realizadas com *U. cordatus* por Oliveira-Neto *et al.* (2007b), com dados de sequências da região controle do DNA mitocondrial, caracterizando a expansão populacional recente. Oliveira-Neto *et al.* (2007b) mostraram que os valores de τ estão correlacionados com as coordenadas latitudinais das populações, de modo que quanto mais ao sul as populações se localizavam, menores eram os valores de τ , apontando que a expansão teria acontecido do norte para o sul. Desta forma, Oliveira-Neto *et al.* (2007b) sugeriram que a expansão populacional no caranguejo-uçá ocorreu em concomitância com a expansão dos mangues, nos períodos de transgressão marinha.

Contudo, os valores populacionais de τ apresentados no presente estudo, originados a partir de sequências do COI, não são condizentes com este cenário. Aqui, os valores de τ oscilam aleatoriamente entre as populações, não demonstrando correlação entre a data das expansões com posição geográfica das populações. Com exceção de Porto Rico do Maranhão, todas as populações apresentaram valores de τ próximos de 5, indicando que as expansões ocorreram, basicamente, na mesma época em diferentes manguezais. Nossas estimativas indicam que a expansão populacional em *U. cordatus* aconteceu entre 145 e 270 mil anos atrás, na época do Pleistoceno. Porém, um conhecimento detalhado acerca dos eventos geológicos e biológicos que ocorreram nesta época é essencial para o entendimento das causas de tais expansões.

Dispersão larval e fluxo gênico

A distribuição dos ecossistemas de manguezais na costa brasileira está diretamente associada a regiões estuarinas, as quais estão localizadas a distâncias variáveis umas das outras (Pil *et al.* 2011). Entre os manguezais são encontradas extensas regiões de praias, restinga e dunas, que potencialmente podem agir como barreiras ecológicas de dispersão para caranguejos-uçá adultos, uma vez que apresentam pouca mobilidade nesta fase de vida e permanecem grande parte do dia enterrados em tocas. Desta forma, a dispersão de *U. cordatus* é realizada, quase que exclusivamente pela sua forma de vida larval.

Um dos mais proeminentes fatores que interfere diretamente sobre o mecanismo de dispersão larval é a tolerância às diferenças de salinidade. *U. cordatus* exhibe de cinco a seis estágios de zoé e de um estágio de megalopa (Rodrigues 1982;

Rodrigues e Hebling 1989). Os dois primeiros estágios larvais (ZI e ZII) são extremamente eurialinos (ZI consegue sobreviver durante até seis dias em água fresca enquanto cerca de 80% das ZII estão aptas a sobreviverem a salinidades mínimas de T10). Por outro lado, os estágios remanescentes são estenoalinos, necessitando de salinidades mínimas de T15 para sobreviverem (Diele e Simith 2006). Uma vez que a reprodução dessa espécie ocorre, primordialmente, nos meses de maior índice de precipitação (janeiro-junho), as larvas são liberadas em ambientes de baixa salinidade (<T10). Enquanto os estágios de ZI e ZII são viáveis em tais ambientes, a exportação larval para alto mar – onde a salinidade é mais elevada – é necessária para o desenvolvimento dos estágios larvais seguintes (Diele e Simith 2006). Como exemplo, trabalhos de campo em Furo Grande, no estado do Pará, detectaram liberações massivas e sincronizadas de larvas de *U. cordatus* que foram exportadas para 200 km de distância da costa, em direção ao mar aberto (Diele 2000).

Apesar de as conjecturas dos modelos de fluxo gênico entre populações variarem grandemente entre si, conclusões comuns e quase que independentes, são de que, na ausência de pressões seletivas, a migração de um único indivíduo seria suficiente para homogeneizar as populações (Thorpe *et al.* 2000).

Uma vez que a dispersão das formas imaturas é maior em espécies que demonstram dispersão larval para alto mar, devido à maior atuação das correntes marinhas na movimentação das larvas, elevados níveis de fluxo gênico são esperados em *U. cordatus*. Aqui, nossos dados apoiam fortemente este cenário. O número de migrantes estimados nas análises tendeu a infinito, o que potencialmente explica a ausência de estruturação geográfica da diversidade genética.

Enquanto o padrão de circulação das correntes marinhas tem sido apontado como causador de quebras filogeográficas em alguns táxons (e.g. Buonaccorsi *et al.* 2005; Sotka *et al.* 2004; Chambers *et al.* 2006), em *U. cordatus* as correntes marinhas parecem favorecer a dispersão de larvas. A aproximadamente 15°S, o ramo sul da Corrente Sul-Equatorial se bifurca dando origem as duas principais correntes atuantes no litoral brasileiro: a Corrente do Norte do Brasil e a Corrente do Brasil (Peterson e Stramma 1991). A maior parte da vazão da Corrente Sul-Equatorial alimenta a Corrente do Norte do Brasil, que flui em direção ao hemisfério norte, com velocidade média de 0.6-1.0 m/s (Arnault *et al.* 1999), enquanto uma fração menor origina a Corrente do Brasil, cuja velocidade varia, em média, entre 0.5 a 0.6 m/s.

Uma vez que os estágios larvais em *U. cordatus* duram aproximadamente 21 dias (Diele e Simith 2006), larvas sobre influência da Corrente do Norte do Brasil e da Corrente do Brasil poderiam, potencialmente, migrar a distâncias de 1088 e 1814 km, respectivamente. Contudo, mesmo em espécies cujo potencial de dispersão larval é amplo, sucessivas migrações entre estuários adjacentes seriam suficientes na manutenção do fluxo gênico entre as populações (e.g. *C. guanhumi*, Oliveira-Neto *et al.* 2008). Em ambos os casos, um elevado fluxo gênico é esperado.

Contribuições para estratégias de manejo e conservação

Atualmente, o preocupante cenário de sobrepesca em muitas espécies de vertebrados e invertebrados marinhos, e a destruição de seus habitats naturais trazem um senso de urgência na identificação de grupos reprodutivos. – unidades de cruzamento conhecidas por biólogos da pesca como “estoques” e que são equivalentes ao conceito de populações ou demes para geneticistas (Thorpe *et al.* 2000). O entendimento da variação genética intra e inter-estoques é essencial não somente na criação de estratégias de manejo pesqueiro, como também em programas de conservação (Okumus e Çiftci 2003).

Os estoques marinhos podem agir como populações parcialmente ou completamente fragmentadas e, portanto, apresentando fluxo gênico reduzido ou nulo. Na completa ausência de fluxo gênico, cada estoque possui um tamanho populacional reduzido quando comparado com uma única e larga população não fragmentada. Tais isolamentos podem ocasionar efeitos deletérios severos, como elevados níveis de endogamia, perda da diversidade genética por deriva e aumento do risco de extinção (Frankham *et al.* 2002). Desta forma, enquanto estoques marinhos de tamanho demográfico reduzido estão muito vulneráveis à sobrepesca (Thorpe *et al.* 2000), espécies com amplos estoques ou com grande conectividade genética entre eles estão menos susceptíveis à extinção.

Entretanto, embora os estoques naturais de *U. cordatus* venham sendo alvo de drásticas reduções, causadas principalmente pela superexploração comercial, DCL e destruição dos manguezais (Ventura *et al.* 2010), este cenário não parece ser preocupante, uma vez que os altos índices de diversidade haplotípica e os valores de Φ_{st} , não indicam erosão genética.

A elevada homogeneidade genética e fluxo gênico revelam que, na prática, as populações de *U. cordatus* se comportam como uma grande metapopulação, e que as subpopulações trocam livremente quantidades consideráveis de formas juvenis. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva *et al.* (2010) com *U. annulipes* e por Oliveira-Neto *et al.* (2007a, 2007b) com *U. cordatus*. Em acordo com estes autores, propriedades como essas podem facilitar a criação de estratégias de manejo, uma vez que estuários bem preservados podem atuar como fornecedores de larvas para áreas intensamente exploradas, permitindo uma aceleração da recuperação genética e demográfica.

Medidas corretivas como essas, visam desacelerar ou interromper o declínio populacional em organismos marinhos, e frequentemente envolvem programas de aprimoramento de estoques, através da introdução de organismos criados em cativeiro em populações naturais (Freeland 2005). O sucesso de programas como estes depende em parte da taxa de sobrevivência dos organismos introduzidos na natureza oriundos de cruzamentos em cativeiro.

Uma maneira de se medir o sucesso dos programas de aprimoramento de estoque pode ser feito através do monitoramento de haplótipos ou aloenzimas que são raros na natureza. Se a frequência destes marcadores raros aumentar durante o tempo, então os programas são considerados bem sucedidos, uma vez que é evidenciado que o as proles híbridas estão bem adaptadas ao meio (Hansen *et al.* 1995).

Trabalhos de manejo com *U. cordatus* já vêm sendo conduzidos desde 2001 pelo Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), que a cada temporada reprodutiva produz mais de 1.000.000 de megalopas em laboratório (Silva *et al.* 2006, 2009) com o objetivo de reestocar populações vítimas de reduções demográficas. Contudo, levando em consideração que a criação de organismos em cativeiro tende a promover a endogamia, e que o cultivo de larvas em laboratório, por relaxar as pressões seletivas naturais, podem originar linhagens genéticas pouco adaptadas ao meio natural, tais estratégias devem ser realizadas com cautela.

Referências

- Arnault S, Bourles B, Gouriou Y, Chuchla R (1999) Intercomparison of upper layer circulation of the western equatorial Atlantic Ocean: In situ and satellite data. *J Geophys Res* 104(C9):21171–21194
- Avise JC, Neigel JE, Arnold J (1984) Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *J Mol Evol* 20:99–105
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48
- Barber PH, Palumbi SR, Erdmann MV, Moosa KM (2000) A marine Wallace's line? *Nature* 406:692–693
- Boeger WA, Pie RM, Ostrensky A, Patella L (2005) Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. *Mem I Oswaldo Cruz* 100:161–167
- Boeger WA, Pie MR., Vicente V, Ostrensky A, Hungria D, Castilho GG (2007) Histopathology of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) affected by lethargic crab disease. *Dis of Aquat Organ* 78:73–81
- Bohonak AJ (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *Q Rev Biol* 74:21–45
- Bousfield EL (1955) Ecological control of the occurrence of barnacles in the Miramichi Estuary. *Natl Mus Can Bull* 137:1–69
- Britto FB, Mendes DSF, Ogawa M, Cintra IHA, Diniz FM (2011) Single primer-based DNA amplification as a suitable and low-cost tool for assessing genetic diversity in mangrove crabs. *Gen Mol Res* 10(4):4084–4092
- Bruford M, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T (1992) Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel AR (ed) *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp 225–269
- Buonaccorsi VP, Kimbrell CA, Lynn EA, Vetter RD (2005) Limited realized dispersal and introgressive hybridization influence genetic structure and conservation strategies for brown rock-fish, *Sebastes auriculatus*. *Con Gen* 6(5):697–713

- Chambers MD, VanBlaricom GR, Hauser L, Utter F, Friedman CS (2006) Genetic structure of black abalone (*Haliotis cracherodii*) populations in the California islands and central California coast: Impacts of larval dispersal and decimation from withering syndrome. *J Exp Mar Biol Ecol* 331:173–185
- Christy JH (1982) Adaptive significance of semilunar cycles of larval release in fiddler crabs (genus *Uca*): test of a hypothesis. *Biol Bull* 163:251–263
- Christy JH, Stancyk SE (1982) Timing of larval production and flux invertebrate larvae in a well-mixed estuary. In: Kennedy VS (ed) *Estuarine Comparisons*. Academic Press, New York, pp 489–503
- Cronin TW (1982) Estuarine retention of larvae of crab *Rhithropanopeus harrisi*. *Estuar Coast Shelf Sci* 15(2):207–220
- de Hoog GS, Vicente VA, Najafzadeh MJ, Harrak MJ, Seyedmousavi S (2011) Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. *Stud Mycol* 20:1–20
- Dias GM, Duarte LFL, Solferini VN (2006) Low genetic differentiation between isolated populations of the colonial ascidian *Symplegma rubra* Monniot, C. 1972. *Mar Biol* 148:807–815
- DiBacco C, Levin LA (2000) Development and application of elemental fingerprinting to track the dispersal of marine invertebrate larvae. *Limnol Oceanogr* 45:871–880
- Diele K. (2000) Life history and population structure of the exploited mangrove crab *Ucides cordatus cordatus* (L.1763) (Crustacea:Decapoda) in the Caeté estuary, North Brazil. Thesis, University of Bremen
- Diele K, Koch V (2010) Growth and mortality of the exploited mangrove crab *Ucides cordatus* (Ucididae) in N-Brazil. *J Exp Mar Biol Ecol* 395:171–180
- Diele K, Simith DJB (2006) Salinity tolerance of northern Brazilian mangrove crab larvae, *Ucides cordatus* (Ocypodidae): Necessity for larval export? *Estuar Coast Shelf Sci* 68:600–608
- Doherty PJ, Planes S, Mather P (1995) Gene flow and larval duration in seven species of fish from the Great Barrier Reef. *Ecology* 76:2373–2391

- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564–567
- 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. *Mol Mar Biol Biotech* 3:294–297
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge
- Freeland JR. (2005) Molecular Ecology. John Wiley & Sons, Chichester
- Fu Y (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925
- Garcia S, Le Reste L (1981) Life cycles, dynamics, exploitation and management of coast penaeid shrimp stocks. *Fisher Tech Paper* 203:1–215
- Gibbs M, Saastamoinen M, Coulon A, Stevens VM (2009) Organisms on the move: ecology and evolution of dispersal. *Bio Lett* 6(2):146–148
- Gilg MR, Hilbish TJ (2003) The geography of marine larval dispersal: coupling genetics with fine-scale physical oceanography. *Ecology* 84:2989–2998
- Glaser M (2003) Ecosystem, local economy and social sustainability: a case study of Caeté estuary, North Brazil. *Wetl Ecol Manag* 11:265–272
- Glaser M, Diele K (2004) Asymmetric outcomes: assessing central aspects of the biological, economic and social sustainability of a mangrove crab fishery, *Ucides cordatus* (Ocypodidae), in North Brazil. *Ecol Econ* 49:361–373
- Grant WS, Bowen BW (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J Hered* 89:415–426
- Hansen MM, Hynes RA, Loeschcke V, Rasmusen G (1995) Assessment of the stocked or wild origin of anadromous brown trout (*Salmo trutta* L.) in a Danish river system, using mitochondrial DNA RFLP analysis. *Mol Ecol* 4:189–198
- Hellberg ME (1994) Relationships between inferred levels of gene flow and geographic distance in a philopatric coral, *Balanophyllia elegans*. *Evolution* 48:1829–1854

- Hellberg ME (1996) Dependence of gene flow on geographic distance in two solitary corals with different larval dispersal capabilities. *Evolution* 50:1167–1175
- Koch V, Wolff M (2002) Energy budget and ecological role of mangrove epibenthos in the Caeté estuary, North Brazil. *Mar Ecol Prog Ser* 228:119–130
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21):2947–2948
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452
- Mantel NA (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27:209–220
- Marko PB (2004) ‘What’s larvae got to do with it?’ Contrasting patterns of post-glacial population structure in two benthic marine gastropods with identical larval dispersal capabilities. *Mol Ecol* 13:597–611
- Marta-Almeida M, Dubert J, Peliz A, Queiroga H (2006) Influence of vertical migration pattern on retention of crab larvae in a seasonal upwelling system. *Mar Ecol Prog Ser* 307:1–19
- McMillan WO, Raff RA, Palumbi SR (1992) Population genetic consequences of developmental evolution in sea urchin (genus *Heliocidaris*). *Evolution* 46:1299–1312
- Melo GAS (1996) Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. Editora Plêiade, São Paulo
- Moreira AA, Tomás ARG, Hilsdorf AWS (2011) Evidence for genetic differentiation of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) fishery populations from the southern coast of Brazil as revealed by microsatellites. *J Exp Mar Biol Ecol* 407:34–40
- Morgan SG (1987) Adaptive significance of hatching rhythms and dispersal patterns of estuarine crab larvae: avoidance of physiological stress by larval export. *J Exp Mar Biol Ecol* 113:71–78.
- Morgan SG (1990) Impact of planktivorous fishes on dispersal, hatching and morphology of estuarine crab larvae. *Ecology* 71:1639–1652

- Morgan S (1995) Life and death in the plankton: larval mortality and adaptation. In: McEdward L (ed) Ecology of Marine Invertebrate Larvae. CRC Press Inc, Florida, pp 279–321
- Mousset S, Derome N, Veuille M (2004) A test of neutrality and constant population size based on the mismatch distribution. *Mol Biol Evol* 21:724–731
- Neto JD (2011) Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável do Caranguejo-uçá, do Guaíamum e do Siri-azul. Ed. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília
- Nóbrega RR, Nishida AK (2003) Aspectos socioeconômicos e percepção ambiental dos catadores de caranguejo uçá, *Ucides cordatus* (L. 1763) (Decapoda:Brachyura) do estuário do rio Mamanguape, Nordeste do Brasil. *Interciência* 28:36–43
- Okumus I, Çiftçi Y (2003) Fish population genetics and molecular markers: II-molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Turk J Fish Aquat Sci* 3:51–79
- Oliveira-Neto JF, Boeger WA, Pie MR, Ostrensky A (2007) Genetic structure of populations of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda:Ocypodidae) at local and regional scales. *Hydrobiologia* 583:69–76
- Oliveira-Neto JF, Pie MR, Boeger WA, Ostrensky A (2007) Population genetics and evolutionary demography of *Ucides cordatus* (Decapoda:Ocypodidae). *Mar Ecol* 28:460–469.
- Oliveira-Neto JF, Pie MR, Chammas MA, Ostrensky A, Boeger WA (2008) Phylogeography of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* (Decapoda:Gecarcinidae) along the Brazilian coast. *J Mar Biol Assoc UK* 88(7):1417–1423
- Oréllis-Ribeiro R, Boeger WA, Vicente VA, Chammas M, Ostrensky A (2011) Fulfilling Koch's postulates confirms the mycotic origin of Lethargic Crab Disease. *Anton Van Lee* 99:601–608
- Palumbi SR (1992) Marine speciation on a small planet. *Trends Ecol Evol* 7(4):114–118
- Patarnello T, Volckaert FAMJ, Castilho R (2007) Is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? *Mol Ecol* 16:4426–4444

- Peterson R, Stramma L (1991) Upper-level circulation in the South Atlantic Ocean. *Progr. Oceanogr.* 26(1):1–73
- Pil MW, Boeger MRT, Muschner VC, Pie MR, Ostrensky A, Boeger WA (2011) Postglacial north–south expansion of populations of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) along the Brazilian coast revealed by microsatellite analysis. *Am J Bot* 98(6):1031–1039
- Pinheiro MA, Fiscarelli AG, Hattori GY (2005) Growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura:Ocypodidae). *J Crustacean Biol* 25(2):293–301
- Planes S, Doherty PJ, Bernardi G (2001) Strong genetic divergence among populations of a marine fish with limited dispersal, *Acanthochromis polyacanthus*, within the Great Barrier Reef and the Coral Sea. *Evolution* 55:2263–2273
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol* 25:1253–1256
- Purcell JFH, Cowen RK, Hughes CR, Williams DA (2006) Weak genetic structure indicates strong dispersal limits: a tale of two coral reef fish. *Proc R Soc B Biol Sci* 273:1483–1490
- Queiroga H, Cruz T, dos Santos A, Dubert J, Gonzalez-Gordillo JI, Paula J, Peliz A, Santos AMP (2007) Oceanographic and behavioural processes affecting invertebrate larval dispersal and supply in the western Iberia upwelling ecosystem. *Prog Oceanogr* 74:174–191
- Riginos C, Nachman MW (2001) Population subdivision in the marine environments: the contribution of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Mol Ecol* 10:1439–1453
- Rocha LA, Robertson DR, Roman J, Bowen BW (2005) Ecological speciation in tropical reef fishes. *Proc R Soc Lond B* 272:573–579
- Rodrigues MD (1982) Desenvolvimento pós-embrionário de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustácea, Decapoda, Gecarcinidae). Dissertation, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

- Rodrigues MD, Hebling NJ (1989) *U. cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda). Complete larval development under laboratory conditions and its systematic position. *Rev Bras Zool* 6(1):147–166
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9:552–569
- Ronce O (2007) How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. *Ann Rev Ecol Evol* 38:231–253
- Sandifer PA (1975) The role of pelagic larvae in recruitment of populations of adult decapod crustaceans in the York River Estuary and adjacent lower Chesapeake Bay. *Estuar Coast Mar Sci* 3:269–279
- Schmidt AJ (2006) Estudo da dinâmica populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus cordatus* e dos efeitos de uma mortalidade em massa desta espécie em manguezais do Sul da Bahia. Dissertation, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
- Schmidt AJ, Bemvenuti CE, Theil, CMI, Jesus JBG, Serafim, KB, Galli OBS (2008) Dinâmica populacional e distribuição espacial do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* em manguezal do Rio Jaburuna, Caravelas/BA, afetado por mortalidade em massa. *Congresso Brasileiro Sobre Crustáceos* 5:53-53.
- Schories D, Barletta-Bergan A, Barletta M, Krumme U, Mehlig U, Rademaker V (2003) The keystone role of leaf-removing crabs in mangrove forests of North Brazil. *Wetl Ecol Manag* 11:243–255
- Schubert CD, Diesel R, Hedges SB (1998). Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature* 393:363–365
- Silva UAT, Menezes FR, Souza RV, Coelho Neto A, Boeger WA, Ostrensky A (2009) A aquicultura a serviço da conservação: A produção de larvas de caranguejo-uçá em sistema de cultivo em mesocosmos. *Panor Aqüicult* 113:24–31
- Silva IC, Mesquita N, Paula J (2010). Lack of population structure in the fiddler crab *Uca annulipes* along an East African latitudinal gradient: genetic and morphometric evidence. *Mar Biol* 157:1113–1126
- Silva UAT, Ostrensky A, Ventura R, Santos AF, Boeger WA (2006) A produção de caranguejo-uçá em laboratório. *Panor Aqüicult* 16(94):15–21

- Slatkin M, Hudson RR (1991) Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Populations. *Genetics* 129:555–562
- Slatkin M, Maddison WP (1989) A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics* 123:603–613
- Sotka EE, Wares JP, Grosberg RK, Palumbi SR (2004) Strong genetic clines in intertidal barnacles demonstrate limited dispersal along rocky shores. *Mol Ecol* 13: 2143–2156
- Sparre P, Venema SC (1997) Fisheries technical paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Stepien CA, Rosenblatt RH, Bargmeyer BA (2001) Phylogeography of the spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*: divergence of Gulf of California and Pacific coast populations. *Evolution* 55:1852–1862
- Tajima F (1989) Statistical Methods 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. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Thorpe JP, Solé-Cava AM, Watts PC (2000) Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia* 420:165–184
- Wan Q-H, Wu H, Fujihara T, Fang S-G (2004) Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* 25:2165–2176
- Waples RS (1987) A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. *Evolution* 4:385–400
- Waples RS (1998) Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J Hered* 89:438–450
- Weber LI, Levy JA (2000) Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea:Decapoda) in southern Brazil. *Hydrobiologia* 420:203–210
- Weinstein MP, Weiss SL, Hodson RG, Gerry LR (1980) Retention of three taxa of post larval fishes in an intensively flushed tidal estuary, Cape Fear River. *Fish Bull* 78(2): 419–436

- Wolanski E, Doherty P, Carleton J (1997) Directional swimming of fish larvae determines connectivity of fish populations on the Great Barrier Reef. *Naturwissenschaften* 84:262–268
- Wood L, Hargis Jr WJ (1971) Transport of bivalve larvae in a tidal estuary. In: Crisp DJ (ed) Fourth European Marine Biology Symposium. Bangor, Wales, pp 29–44
- Wright S (1978) Evolution and the genetics of populations variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago
- Vale PAA (2003) Biologia reprodutiva do caranguejo *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus 1763), num manguezal do estuário do rio Caeté. Thesis, Universidade Federal do Pará
- Ventura R, da Silva UAT, Cottens K, Boeger WA, Ostrensky A (2010) Restocking *Ucides cordatus* (Decapoda:Ocypodidae): interespecific associations as a limiting factor to the survival of released recruits Brazilian. *J Oceanogr* 58(3):207–212
- Vicente VA, Oréelis-Ribeiro R, Najafzadeh MJ, Sun J, Guerra RS, Miesch S, Ostrensky A, Meis JF, Klaassen CH, de Hoog GS, Boeger WA (2012) Black yeast-like fungi associated with Lethargic Crab Disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae) *Vet Microbiol* 158:109–122
- von der Heyden S, Lipinski MR, Matthee CA (2007) Mitochondrial DNA analyses of the Cape hakes reveal an expanding population for *Merluccius capensis* and population structuring for mature fish in *Merluccius paradoxus*. *Mol Phyl Evol* 42:517–527
- Zhang J, Cai Z, Huang L (2006) Population genetic structure of crimson snapper *Lutjanus erythropterus* in East Asia, revealed by analysis of the mitochondrial control region. *J Mar Sci* 63:693–704