

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MARINHA

Padrão de Variação Gênica em Morfotipos e Populações de *Paracentrotus gaimardi* (Blainville, 1825) (Echinodermata: Echinoidea) do Litoral do Rio de Janeiro

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia Marinha, Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal Fluminense, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biologia Marinha.

MICHELLE REZENDE DUARTE

ORIENTADORES:

EDSON PEREIRA DA SILVA

CARLOS RENATO REZENDE VENTURA

Niterói, Janeiro 2005

FICHA CATALOGRÁFICA

DUARTE, MICHELLE REZENDE

Padrão de Variação Gênica em Morfotipos e Populações de *Paracentrotus gaimardi* (Blainville, 1825) (Echinodermata: Echinoidea) do Litoral do Rio de Janeiro.

Niterói – RJ – Universidade Federal Fluminense – UFF, Instituto de Biologia, 2005

Monografia: Bacharel em Biologia Marinha

- | | | |
|----------------------------------|---------------|--------------|
| 1. <i>Paracentrotus gaimardi</i> | 2. Echinoidea | 3. Taxonomia |
| 4. Genética de Populações | 5. Aloenzimas | |

MICHELLE REZENDE DUARTE

PADRÃO DE VARIAÇÃO GÊNICA EM MORFOTIPOS E POPULAÇÕES DE *PARACENTROTUS GAIMARDI* (BLAINVILLE, 1825) (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA) DO LITORAL DO RIO DE JANEIRO

Banca Examinadora:

Dr. Edson Pereira da Silva
Universidade Federal Fluminense

Dra. Michelle Klautau
Universidade Federal do Rio de Janeiro

MSc. Uâni Cerqueira Billio
Faculdade da Região dos Lagos

Dr. Aguinaldo Nepomuceno Marques Júnior
Universidade Federal Fluminense

“- *E agora estou perdido! Devo parar?*

– *Não, se páras, estás perdido.*”

Goethe, In: **Poemas**

Ao Edson

AGRADECIMENTOS

À minha amada família, por todo carinho e dedicação. À Tia Ice e à Vovó Glorinha (*In memoriam*), por terem sido minhas segundas mamães, ao meu Pai_{drasto}, Paulo Roberto, por toda força, sem ele, certamente, eu não teria saído de “Além” e ao meu irmãozinho Sávyo, por existir e trazer tanta alegria para minha vida.

À minha Mãe, a melhor mãe do mundo, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida, lutando comigo para transformar meus sonhos em realidade.

Ao meu querido Pai, Pedro Paulo, que, infelizmente, não pode me acompanhar até o final desta etapa de minha vida, agradeço por tudo que fez por mim. Sinto muito a sua falta.

À todos os amigos que passaram pela minha vida e, também, a todos da INTERAÇÃO, pelos muitos momentos agradáveis.

À Patrícia, Mari e Carol, por serem as melhores amigas de todos os planetas e por terem me aturado durante toda a faculdade.

A todos os professores da Biologia, especialmente a Charlotte e ao Luiz. À Charlotte porque além de ser uma grande professora foi a primeira a apontar o caminho (que eu custei a seguir, por causa da minha cabeça dura) e ao Luiz por ser um professor tão especial, aprendi muito com os momentos que passamos em co-deriva.

À Ada, pela grande ajuda durante as coletas e as eletroforeses e também a sua turma de Biologia Marinha Básica (UFRJ/2004-2) pela tentativa de coletar *Paracentrotus* em Angra.

A Carmen, pela acolhida no Laboratório de Genética Marinha, pela amizade, companheirismo e também por ter compartilhado as angústias deste momento.

À Rosa, pelo carinho e pelas conversas e, também, um muito obrigada por todo suporte dado na coleta em Arraial.

À Denise, por todo carinho e por ser sempre uma presença tão agradável no Laboratório de Genética Marinha.

À Nilce, pela paciência e ajuda durante a coleta em Arraial.

Ao Dr. Flávio, por ter permitido que eu utilizasse as instalações do IEAPM.

A Uâni, por tudo que me ensinou.

Ao Renato Ventura, pela oportunidade de ter realizado este trabalho.

E, finalmente, ao Edson, que foi mais que um orientador, foi um grande amigo, me deu muita força e confiou em mim - apesar de meu discurso sempre derrotista. Muito obrigada por tudo, principalmente pelas valiosas conversas.

SUMÁRIO

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Resumo	xii
Abstract	xiii
1- Introdução	1
1.1- O problema da variação	1
1.2- <i>Paracentrotus gaimardi</i>	3
1.3- Problema a ser investigado	4
2- Objetivos	5
3- Material e métodos	6
3.1- Coleta, transporte e armazenagem das amostras	6
3.2- Eletroforeses	8
3.2.1- Escolha de tecidos, enzimas e tampões	8
3.2.2- Homogeneização	12
3.2.3- Preparação dos géis	12
3.2.4- Corrida eletroforética	12
3.2.5- Revelação	13
3.2.6- Interpretação	13
3.2.7- Fixação dos géis	13
3.3- Análise de dados	15
4- Resultados	16

4.1- Os morfotipos	16
4.2- As populações	24
5- Discussão	32
5.1- Os morfotipos	32
5.3- As populações	35
6- Conclusões	38
7 – Referências Bibliográficas	39
Apêndices	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização dos pontos de coleta de <i>P. gaimardi</i>	7
Figura 2: Resumo do método de eletroforese de aloenzimas	14
Figura 3: Dendrograma de UPGMA de identidades genéticas entre os 10 morfotipos das populações de Itaipu e Prainha	23
Figura 4: Dendrograma de UPGMA de identidades genéticas para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura	31
Figura 5: Gráfico de probabilidade da distribuição da Identidade Gênica de Nei (1978) para populações coespecíficas, congêneres e gêneros de uma mesma família (retirado de Thorpe & Solé-Cava, 1994)	33

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Descrição dos pontos de coleta de <i>P. gaimardi</i> no Estado do Rio de Janeiro	6
Tabela II: Sistemas de tampão utilizados	9
Tabela III: Enzimas testadas, com abreviações, número de comissão (nº E.C.), número de subunidades, número de <i>loci</i> interpretados, tampão e tecido utilizados	10
Tabela IV: Freqüências alélicas para os 5 morfotipos nas populações de Itaipu e Prainha	17
Tabela V: Tamanho médio de amostra, número médio de alelos por <i>locus</i> , grau (%) de polimorfismo e heterozigosidades médias observadas e esperadas para cada morfotipo (Desvios-padrão entre parêntesis) nas populações de Itaipu e Prainha	19
Tabela VI: Heterozigosidades por <i>locus</i> para os 5 morfotipos nas populações de Itaipu e Prainha	20
Tabela VII: Probabilidades (P) de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Ho: união de gametas ao acaso) para os 5 morfotipos nas populações de Itaipu e Prainha	21
Tabela VIII: Índices de endocruzamento de Weir & Cockerham para todos os <i>loci</i> para os 5 morfotipos nas populações de Itaipu e Prainha	21
Tabela IX: Matriz de similaridade genética para os 5 morfotipos nas populações de Itaipu e Prainha. Acima da diagonal: identidade genética; abaixo da diagonal: distância genética entre as populações	22

Tabela X: Freqüências alélicas para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura	25
Tabela XI: Tamanho médio de amostra, número médio de alelos por <i>locus</i> , grau (%) de polimorfismo e heterozigosidades médias observadas e esperadas para cada população (Desvios-padrão entre parêntesis) para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura	27
Tabela XII: Heterozigosidades por <i>locus</i> para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura	28
Tabela XIII: Probabilidades (P) de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Ho: união de gametas ao acaso) para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura	29
Tabela XIV: Índices de endocruzamento de Weir & Cockerham para todos os <i>loci</i> para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura	30
Tabela XV: Matriz de similaridade genética para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura. Acima da diagonal: identidade genética; abaixo da diagonal: distância genética entre as populações	31

RESUMO

A comparação genética entre cinco morfotipos de *Paracentrotus gaimardi* de duas populações do litoral do Rio de Janeiro (Itaipu – Niterói e Prainha – Arraial do Cabo), bem como a análise da variação e a estruturação gênica desta espécie em três populações do litoral do Rio de Janeiro (Itaipu – Niterói, Prainha – Arraial do Cabo e Ferradura – Búzios) foram feitas utilizando-se a técnica de eletroforese de aloenzimas. No total foram analisados 219 indivíduos para 9 *loci* gênicos (α -*Est2*, α -*Est3*, *Cat*, *Mdh*, *Pep*, *Pgi*, *Pgm*, *Sod* e *Xod*) na comparação entre os morfotipos e 244 indivíduos para 10 *loci* gênicos (α -*Est1*, α -*Est2*, α -*Est3*, *Cat*, *Mdh*, *Pep*, *Pgi*, *Pgm*, *Sod* e *Xod*) na análise das populações. Os resultados da comparação entre os morfotipos evidenciaram cinco valores de Identidade gênica (IG) equivalentes aqueles encontrados para espécies congêneres quando os morfotipos amostrados se encontravam em alopatria e valores de IG muito altos quando os morfotipos se encontravam em simpatria. Não foi observado nenhum *locus* diagnóstico entre os morfotipos, indicando que as diferenças encontradas entre os morfotipos são devidas a variação intraespecífica. Na análise das populações, os resultados mostraram que as heterozigosidades observadas oscilaram entre 0,188 e 0,272. A maioria dos *loci* está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, contudo, os três desvios observados correspondem a um número maior do que se esperaria encontrar apenas por ação do acaso. A natureza deste estudo não permitiu a formulação de nenhuma hipótese a respeito das causas dos desvios encontrados. As identidades gênicas entre as populações foram todas maiores que 0,94. O índice de Weir & Cockerham encontrado para as populações foi elevado e significativo ($\theta = 0,029$), evidenciando que as populações estão estruturadas. Esta estruturação parece ser adequadamente explicada pelo modelo de isolamento por distância.

ABSTRACT

The genetic comparison in five morphs of *Paracentrotus gaimardi*, between two populations from Rio de Janeiro coast (Itaipu – Niterói and Prainha – Arraial do Cabo), as well as the analysis of genetic variation and structure of three populations from Rio de Janeiro coast (Itaipu – Niterói, Prainha – Arraial do Cabo and Ferradura – Búzios) were done using allozyme electrophoresis technique. A total of 219 individuals were analyzed for 9 *loci* (α -*Est2*, α -*Est3*, *Cat*, *Mdh*, *Pep*, *Pgi*, *Pgm*, *Sod* e *Xod*) for the morphs analysis and 244 individuals for 10 *loci* (α -*Est1*, α -*Est2*, α -*Est3*, *Cat*, *Mdh*, *Pep*, *Pgi*, *Pgm*, *Sod* e *Xod*) for the population analysis. The results showed low genetic identities for allopatric morphs similar to those found for congener species. However, it was not observed any diagnosis *locus* among the morphs, showing that the differences found are intraspecific variation. For the population, the observed heterozygosities varied between 0,188 and 0,272. The majority of *loci* was in Hard-Weinberg equilibrium, however, the three found deviations are a number higher than what you expected to found just by chance. This study was not able to reveals any cause which could explain the observed deviations. Genetic identities between populations were higher than 0,94, but the populations were structured as shown by the high and significant Weir & Cockerhan's index ($\theta = 0,029$). This population structure seems to be suitable explained by the isolation by distance model.

1- INTRODUÇÃO

1.1- O problema da variação

Uma coisa muito importante no trabalho de Darwin é que ele rompe com uma visão tipológica das espécies. Esta ruptura se dá quando ele demonstra que a variação morfológica existente nas populações naturais é um dado comum (Darwin, 1859). A variação pode se dar em diversas características tais como taxa de crescimento, tamanho do corpo, estruturas reprodutivas, entre muitas outras. Estas variações são geradas por uma relação entre o genótipo e o ambiente, determinando aquilo que conhecemos como fenótipo (Vadas *et al.*, 2002).

A extensão da variação observada intra ou inter populacionalmente resulta de um balanço de forças que produzem uma variação gênica local e forças que tendem a produzir uma homogeneidade gênica. Mutação e deriva gênica, em populações de tamanho finito, e seleção natural, favorecendo adaptações às condições ambientais locais, são exemplos de forças evolutivas que levam à diferenciação das populações. Já o movimento dos gametas e migração, favorecendo o chamado fluxo gênico, se opõe à diferenciação (Slatkin, 1987).

A caracterização da constituição e mudança da variabilidade gênica presente nas populações naturais, bem como o entendimento das forças que atuam sobre ela ao longo das gerações é objeto de estudo da genética de populações (Silva, 2002a). Marcadores moleculares são muito utilizados para caracterizar a quantidade de variação genética presente nas populações naturais, bem como estimar o nível de estruturação das mesmas. Com estas ferramentas podem ser estimados vários parâmetros populacionais como grau de endogamia, estratégia reprodutiva predominante e grau de estruturação, todos relevantes para entender o padrão de variação gênica presente nas populações e para definir estratégias de conservação da variabilidade gênica na natureza (Carlini-Garcia *et al.*, 2001). As aloenzimas são marcadores moleculares muito eficientes nesses estudos.

A técnica de eletroforese de aloenzimas pode ser definida como a migração de partículas carregadas sob a ação de uma corrente elétrica e foi introduzida para o estudo da variação gênica em populações com os trabalhos de Harris (1966), com a espécie humana, e de Lewontin e Hubby (Hubby & Lewontin, 1966; Lewontin &

Hubby, 1966), com a espécie *Drosophila pseudoobscura*. Um campo que foi muito enriquecido com o desenvolvimento da técnica de eletroforese de aloenzimas foi a Taxonomia.

O método usual adotado pela Taxonomia para classificar os organismos vivos era apenas o estudo da diversidade fenotípica. Em muitos casos, apenas um aspecto fenotípico pré-selecionado (considerado diagnóstico ou importante para o *taxon*) era estudado detalhadamente pelos sistematas. Este procedimento, algumas vezes, levava a conclusões subjetivas, pois, subseqüentemente, outros sistematas davam ênfase a outra característica (Thorpe & Solé-Cava, 1994). Uma das soluções para esse problema seria a utilização de um método menos subjetivo para a classificação dos seres vivos. Desse modo, a eletroforese de aloenzimas demonstrou ser uma ferramenta importante para os sistematas.

A eletroforese de aloenzimas é eficaz na distinção de espécies de vários organismos morfologicamente similares que vivem em simpatria (Thorpe & Solé-Cava, 1994; Manchenko *et al.*, 2000). Assumindo-se o conceito biológico de espécie, aqueles grupos semelhantes morfologicamente podem ser definidos como espécies diferentes toda vez que apresentarem diferentes freqüências alélicas ou diferentes alelos fixados em pelo menos algum *locus* gênico, evidenciando, assim, que estes grupos estão em isolamento reprodutivo. Existem muitos trabalhos que utilizaram esta técnica para definição de espécies crípticas (Tuttle & Lindahl, 1980; Bucklin & Hedgecock, 1982; Solé-Cava *et al.*, 1985; Solé-Cava & Thorpe, 1987; Weber & Galleguillos, 1991; Gusmão *et al.*, 2000; Manchenko *et al.*, 2000; Lazoski *et al.*, 2001; Manchenko & Yakovlev, 2001).

Os equinodermos podem ser considerados um grupo de organismos bem adequado aos estudos de genética de populações, uma vez que são abundantes e apresentam grandes densidades populacionais, podendo, portanto, ser amostrados extensivamente sem causar distúrbios às suas populações naturais (Matsuoka *et al.*, 1995).

1.2- *Paracentrotus gaimardi*

O filo Echinodermata é composto por invertebrados exclusivamente marinhos que habitam predominantemente o infralitoral, são muito abundantes e morfologicamente diversificados (Smith, 1992). Os equinodermos estão distribuídos em cinco classes: Asteroidea, Ophiuroidea, Crinoidea, Echinoidea e Holoturoidea.

Os organismos pertencentes à classe Echinoidea são equinodermos de movimentos livres comumente conhecidos como ouriços-do-mar e bolachas-do-mar, que desempenham um papel chave na dinâmica das comunidades bentônicas como consumidores de macrófitas. Os ouriços-do-mar são classificados como equinóides regulares ou radiais. O corpo é mais ou menos esférico e encontram-se armados com espinhos móveis e relativamente longos que podem ser marrons, negros, castanhos, cinzas, roxos, verdes, rosas, brancos, vermelhos ou multicoloridos. A maioria dos ouriços-do-mar alimenta-se raspando algas, organismos incrustantes e detritos de superfícies duras (Ruppert & Barnes, 1996).

O gênero *Paracentrotus* é composto por apenas duas espécies: *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) e *P. gaimardi* (Blainville, 1825). *P. gaimardi* é um ouriço-do-mar que possui carapaça levemente achatada na face oral, com espinhos frágeis e de cor variada: verde, preto, cinza, castanho ou rosa. Sua classificação completa está listada abaixo:

Filo: Echinodermata

Classe: Echinoidea

Subclasse: Euechinoidea

Ordem: Echinoida

Família: Echinidae

Gênero: *Paracentrotus*

Espécie: *P. gaimardi*

Este organismo ocupa parte do litoral do Brasil (Rio de Janeiro a Santa Catarina), Angola e Golfo da Guiné. É uma espécie que vive em buracos escavados em rochas. Muito freqüentemente, compartilha esse abrigo com organismos de outras espécies (Barcellos, 2004).

Pouco se sabe sobre *P. gaimardi*, pois há poucos trabalhos com esta espécie (Campos Villaça & Yoneshigue, 1987; Boudouresque & Yoneshigue, 1987; Campos Villaça, 1988; Ventura & Barcellos, 2004; Barcellos, 2004), não existindo nenhum trabalho em genética de populações.

1.3- Problema a ser investigado

Paracentrotus gaimardi está presente no litoral do Rio de Janeiro apresentando cinco morfotipos diferentes, caracterizados pelas cores dos seus espinhos (castanho, cinza, preto, rosa, verde). Muitos trabalhos demonstraram que espécies que apresentavam variação de cores como esta, eram espécies diferentes que viviam em simpatria (Tuttle & Lindahl, 1980; Quicke et al., 1983; Aron & Solé-Cava, 1991).

Este estudo visa, utilizando o método de eletroforese de aloenzimas, comparar a variação gênica existente nos cinco morfotipos que ocorrem em simpatria no Estado do Rio de Janeiro. Para isso foram amostrados indivíduos de duas localidades (Prainha, Arraial do Cabo e Itaipu, Niterói). A hipótese nula subjacente é que as diferentes cores dos espinhos que definem os morfotipos representam apenas variação intraespecífica de *P. gaimardi*.

Outro aspecto enfocado neste trabalho foi o estudo da estruturação genética de populações de *P. gaimardi* em três localidades do Estado do Rio de Janeiro (Ferradura, Búzios; Prainha, Arraial do Cabo e Itaipu, Niterói). Nesse caso, a hipótese nula era a de homogeneidade genética entre as três populações estudadas.

O estudo da genética de populações de *P. gaimardi* tem relevância, uma vez que muito pouco se conhece sobre qualquer aspecto da sua biologia e este organismo se trata de uma espécie com potencial para ser explorada comercialmente, já que a espécie congênere, *Paracentrotus lividus*, é muito consumida como alimento requintado na Europa e na Ásia (Thorpe et al., 2000).

2- OBJETIVOS

- * Comparar geneticamente os morfotipos de *Paracentrotus gaimardi*;
- * Descrever a variação gênica da espécie *P. gaimardi* no litoral do Estado do Rio de Janeiro;
- * Caracterizar o grau de estruturação entre três populações de *P. gaimardi* no litoral do Estado do Rio de Janeiro.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1– Coleta, transporte e Armazenagem das amostras

Foram coletados 244 indivíduos da espécie *Paracentrotus gaimardi* nos meses de Setembro a Dezembro de 2004 em três pontos no Estado do Rio de Janeiro: Ferradura – Búzios; Ponta de Itaipu - Niterói; Prainha - Arraial do Cabo (Tabela I e Figura 1).

A coleta foi realizada por mergulho livre. Após a coleta, os indivíduos foram trazidos vivos, em um recipiente com água do mar, até o laboratório onde foram dissecados, os tecidos lavados com água do mar, identificados e armazenados em freezer a - 20°C.

Tabela I: Descrição dos pontos de coleta de *P. gaimardi* no Estado do Rio de Janeiro.

Locais de coleta	Abreviatura	N	Característica	Latitude	Longitude
Itaipu	ITA	138	Costão com batimento de moderado a fraco.	22°59'S	43°04'W
Prainha	PRA	81	Costão com batimento de moderado a forte.	22°57'S	42°00'W
Ferradura	FER	25	Costão batimento fraco.	22°45'S	41°53'W



Figura 1: Localização dos pontos de coleta de *Paracentrotus gaimardi*.

3.2- Eletroforeses

3.2.1 *Escolha de tecidos, enzimas e tampões*

A primeira etapa do trabalho eletroforético é a determinação dos melhores tecidos, tampões e sistemas enzimáticos para o organismo estudado. A única maneira de se determinar quais tampões são mais efetivos para uma dada enzima, de um dado organismo, é empiricamente. Para tanto, são necessários experimentos fatoriais do tipo “tecido X enzima X tampão”.

Foram testados 4 sistemas de tampão (Tabela II) para 30 sistemas enzimáticos (Tabela III) e três tecidos (músculo da lanterna, gônada e intestino). Dos 30 sistemas enzimáticos testados, oito deles (*Cat*, α -*Est*, *Mdh*, *Pep* (*Pro Phe*), *Pgi*, *Pgm*, *Sod* e *Xod*) puderam ser interpretadas geneticamente para 10 *loci* gênicos. Os tampões utilizados foram tris-EDTA-maleato, tris citrato/borato e descontínuo tris-hidróxido de lítio. Os tecidos escolhidos foram Intestino e Músculo da Lanterna.

Tabela II: Sistemas de tampão utilizados.

Tampão	Receita		Referência
	Eletrodos	Gel	
Tris-citrato pH 8,0 (TC-8)	Trizma base 30,3 g Ácido cítrico 12,0 g Água destilada 1,0 L	8,47 mL do tampão do eletrodo em 212 mL de água destilada	Ward & Beardmore, 1977
Tris-citrato borato (Poulik)	Ácido bórico 18,55 g Hidróxido de sódio 2,4g Água destilada 1,0 L (pH 8,1)	Trizma base 9,21 g Ácido cítrico 1,05 g Água destilada 1,0 L (pH 8,7)	Poulik, 1957
Tris-EDTA maleato (TEM)	Trizma base 12,1 g Ácido Maleico 11,6 g Cloreto de Magnésio 2,0 g EDTA 2,9 g Água destilada 1,0 L (pH 7,4)	20 mL do tampão do eletrodo em 200 mL de água destilada	Brewer, 1970
Tris-hidróxido de lítio pH 8,0 (TlOH)	Hidróxido de lítio 2,51 g Ácido bórico 18,55 g Água destilada 1,0 L	Trizma base 3,63 g Ácido cítrico 1,05 g Água destilada 1,0 L	Selander <i>et al.</i> , 1971

Tabela III: Enzimas testadas, com abreviações, número de comissão (nº E.C.), número de subunidades, número de *loci* interpretados, tampão e tecido utilizados.

Enzima	Abrev.	Nº E.C.	Nº sub.*	Nº loci	Tampão**	Tecido***	Obs.****
Aconitase	Acon	4.2.1.3	1	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Catalase	Cat	1.11.1.6	4	1	2, 3, 4	m, i	2
Desidrogenase da glucose 6 fosfato	<i>G6pd</i>	1.1.1.49	2	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Desidrogenase da xantina	<i>Xdh</i>	-	-	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	1
Desidrogenase do fosfogliconato	<i>Pgd</i>	1.1.4.4	2	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Desidrogenase do glutamato	<i>Gdh</i>	1.4.1.3	1 / 2	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Desidrogenase do isocitrato	<i>Idh</i>	1.1.1.42	2	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Desidrogenase do lactato	<i>Ldh</i>	1.1.1.27	4	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Desidrogenase do malato	<i>Mdh</i>	1.1.1.37	2	1	4	i	2
Desidrogenase do octanol	<i>Odh</i>	1.1.1.1	2	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	1
Desidrogenase do α glicerofosfato	α - <i>Gpd</i>	1.1.1.8	2	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Dismutase de superóxido	<i>Sod</i>	1.15.1.1	1	1	2, 3, 4	m, i	2
Enzima málica	<i>Me</i>	1.1.1.40	4	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	1
Esterase, alfa	α - <i>Est</i>	3.1.1.1	1	3	4	i	2
Fosfatase ácida	<i>Acp</i>	3.1.3.2	1 / 2	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Fosfoglicomutase	<i>Pgm</i>	2.7.5.1	1	1	4	i	2

Tabela III – Enzimas testadas, com abreviações, número de comissão (nº E.C.), número de subunidades, número de *loci* interpretados, tampão e tecido utilizados (continuação).

Enzima	Abrev.	Nº E.C.	Nº sub.*	Nº <i>loci</i>	Tampão**	Tecido***	Obs.****
Fumarase	<i>Fum</i>	4.2.1.2	4	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Glioxalase	<i>Gox</i>	1.1.3.1	4	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Glutatona redutase	<i>Gsr</i>	1.6.4.2	2	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Hexoquinase	<i>Hk</i>	2.7.1.1	1	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	1
Isomerase da glicose-6-fosfato	<i>Pgi</i>	5.3.1.9	2	1	3	m	2
Isomerase da Mannose - 6 – fosfato	<i>Mpi</i>	5.3.1.8	1	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	1
Aminopeptidase da Leucina	<i>Lap</i>	3.4.1.1	1	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Oxidase da xantina	<i>Xod</i>	1.2.3.2	2	1	2	i	2
Oxidase do Aldeído	<i>Aldox</i>	1.2.3.1	1	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Peptidase (gly phe)	<i>Pep</i>	3.4.11.1	2	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Peptidase (pro phe)	<i>Pep</i>	3.4.11.1	2	1	2	i	2
Quinase da Creatina	<i>Ck</i>	2.7.3.2	2	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	1
Quinase do Adenilato	<i>Ak</i>	2.7.4.3	1	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0
Sorbitol desidrogenase	<i>Sordh</i>	1.1.1.14	4	-	1, 2, 3, 4	m, i, g	0

* - = não conhecida; 1 = monomérica; 2 = dimérica; 4 = tetramérica.

** 1 = TC8.0; 2 = Poulik; 3 = TEM; 4 = TLiOH.

*** m = músculo da lanterna; i = intestino; g = gônada.

**** Resultado do experimento piloto: 0 = Sem atividade; 1 = Atividade presente, mas resultados não interpretáveis; 2 = Usadas neste trabalho.

3.2.2 Homogeneização

Os tecidos foram homogeneizados em uma placa de acrílico perfurada, com auxilio de um bastão de vidro. A homogeneização foi feita em ambiente refrigerado e a placa de acrílico mantida sobre uma placa de vidro com gelo, para evitar a proteólise e desnaturação das enzimas. Pedaços de papel filtro (Whatman 3MM) de aproximadamente 2x15mm eram mergulhados no homogeneizado e logo em seguida colocados nos géis. Em um gel foi possível acondicionar entre 20 e 35 indivíduos.

3.2.3 Preparação dos géis

O gel suporte para a eletroforese horizontal foi feito de amido 12,5% (27,5g de amido em 220ml de tampão). A solução de amido era levada ao fogo até fervura e submetida ao vácuo para retirada das bolhas. A solução era derramada sobre uma placa de vidro com um espaçador de acrílico com 6mm de altura. Após ser resfriado à temperatura ambiente, o gel era levado à geladeira para atingir temperatura e consistência ideais para corrida.

Com o tecido homogeneizado, o gel era cortado a uma distância de aproximadamente 3cm de sua borda inferior, resultando em duas partes desiguais. Os papéis embebidos no homogeneizado eram colocados no gel (na parte maior). O gel era então remontado. Uma gota de solução de azul de bromofenol era adicionada em cada extremidade do gel para ser usado como marcador de corrida. O gel era, então, colocado em uma cuba de eletroforese horizontal para a corrida eletroforética.

3.2.4- Corrida eletroforética

As corridas eletroforéticas foram realizadas em uma geladeira, à temperatura média de 5°C, a uma potência média de 3,2 W e um período variando de 6 à 9 horas dependendo do tampão utilizado.

Após a corrida, o gel era fatiado, numa mesa de corte, em fatias de aproximadamente 1mm de espessura. O resultado eram 5 ou 6 fatias, das quais as duas externas eram descartadas devido a má resolução das enzimas nas mesmas.

3.2.5- *Revelação*

As fatias de gel eram colocadas em placas de acrílico e, posteriormente, adicionadas soluções reveladoras apropriadas para cada enzima, conforme Harris & Hopkinson (1978) e Richardson *et al.* (1986). A Figura 2 representa as etapas do método de eletroforese de aloenzimas.

3.2.6 *Interpretação*

Os padrões de banda resultantes da revelação foram interpretados mendelianamente, de maneira conservadora, seguindo os padrões já encontrados para enzimas mono, di, e tretraméricas (Harris & Hopkinson, 1978; Richardson *et al.* 1986). Os alelos eram classificados de acordo com sua mobilidade anódica. O alelo mais rápido de cada população era designado “a”, o segundo “b”, e assim por diante.

3.2.7- *Fixação dos géis*

Após a interpretação, os géis eram colocados por 24 horas em uma solução fixadora de ácido acético a 7% para as enzimas desidrogenases e uma solução de 5 partes de metanol, 5 partes de água destilada e 1 de ácido acético (5:5:1) no caso das outras enzimas. Em seguida eram mergulhados por outras 24 horas em solução de glicerol 5%, etiquetados e montados entre duas folhas de celofane embebidas na mesma solução de glicerol e deixados para secar por alguns dias a temperatura ambiente, sendo posteriormente arquivados.

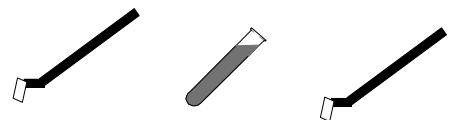
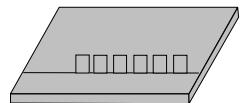
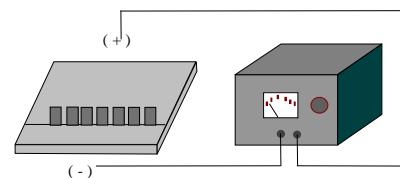
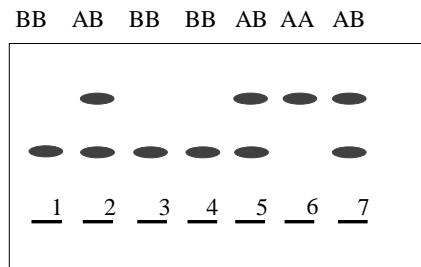
1) POPULAÇÃO NATURAL**2) INDIVÍDUO****3) AMOSTRA DE TECIDO DO INDIVÍDUO****4) HOMOGENEIZADO****5) GEL DE AMIDO COM AMOSTRAS DE HOMOGENEIZADO DE CADA INDIVÍDUO DA POPULAÇÃO****6) ELETROFORESE****7) COLORAÇÃO ESPECÍFICA DAS ALOENZIMAS E INTERPRETAÇÃO MENDELIANA DAS BANDAS NO GEL**

Figura 2: Resumo do método de eletroforese de aloenzimas (adaptado de Silva, 2002a).

3.3- Análise de dados

As freqüências genotípicas observadas, interpretadas diretamente dos géis, encontram-se no Apêndice desta monografia. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se os programas GENEPOL versão 3.3 (Raymond & Rousset, 2001) e BYOSIS-2 (Swofford & Selander, 1997). Os valores de P obtidos foram corrigidos com a técnica de Bonferroni (Rice, 1989):

$$P = \alpha/k$$

Onde:

α é o nível de significância e,

k é o número de testes realizados.

A significância dos índices de fixação de Weir & Cockerham (1984), θ e f , foi testada por qui-quadrado (χ^2) segundo Waples (1987):

$$H_0: \theta = 0 \Rightarrow \chi^2 = 2N\theta(k-1); \text{ g.l.} = (k-1)(s-1)$$

e

$$H_0: f = 0 \Rightarrow \chi^2 = (f)^2 N (k-1); \text{ g.l.} = k(k-1)/2$$

Onde:

N é o número total de indivíduos,

k é o número de alelos no *locus*, e

s é o número de populações.

4- RESULTADOS

4.1- Os morfotipos

Os sistemas enzimáticos analisados foram interpretados como 9 *loci* gênicos. Todos se mostraram polimórficos, à exceção de *Sod*. A enzima α -*Est* apresentou 2 *loci* (Tabela IV).

A média de alelos por *locus* nas populações oscilou entre 1,7 e 2,1. O polimorfismo médio foi de 73,36% e as heterozigosidades variaram de 0,159 (Prainha, morfotipo castanho) a 0,343 (Itaipu, morfotipo rosa), com média para todas as populações de 0,232 (Tabela V). A maior heterozigosidade por *locus* observada foi para enzima *Pgm* em Itaipu, morfotipo rosa (1,000 – Tabela VI).

A maioria dos *loci* estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni, com exceção do *locus Mdh* em Itaipu, morfotipo verde (Tabela VII). O teste exato (Rousset & Raymond, 1995) indicou ser o desequilíbrio resultado de um déficit de heterozigotos.

O θ médio para todas as populações foi 0,062, que é significativo. O f médio para todas as populações foi também significativo (0,3297) (Tabela VIII).

A mínima identidade gênica encontrada foi igual a 0,686 entre Itaipu, morfotipo cinza e Prainha, morfotipo rosa e, as máximas iguais a 1,000 entre Itaipu, morfotipos rosa e verde e Prainha, morfotipos preto e verde (Tabela IX e Figura 3).

Tabela IV: Freqüências alélicas para os 5 morfotipos nas populações de Itaipu e Prainha.

<i>Locus</i>	População									
	I-CAS	I-CNZ	I-PRT	I-RSA	I-VRD	P-CAS	P-CNZ	P-PRT	P-RSA	P-VRD
<i>α-Est-2</i>										
A	0,063	0,750	0,400	0,250	0,091	0,042	0,333	0,200	0,000	0,167
B	0,874	0,250	0,400	0,750	0,773	0,583	0,500	0,500	0,500	0,833
C	0,063	0,000	0,200	0,000	0,136	0,375	0,167	0,300	0,500	0,000
N	8	2	5	4	11	12	6	5	3	3
<i>α-Est-3</i>										
A	0,286	0,900	0,750	0,750	0,714	0,658	0,750	0,444	0,000	0,375
B	0,714	0,100	0,250	0,250	0,286	0,342	0,250	0,556	1,000	0,625
N	14	5	4	4	14	19	6	9	3	8
<i>Cat</i>										
A	0,583	0,500	0,800	0,389	0,500	0,812	0,125	0,500	0,250	0,400
B	0,417	0,500	0,200	0,611	0,500	0,188	0,875	0,500	0,750	0,600
N	12	4	5	9	8	8	4	2	2	10
<i>Mdh</i>										
A	0,325	0,125	0,227	0,200	0,227	0,344	0,083	0,333	0,200	0,389
B	0,650	0,875	0,728	0,700	0,750	0,593	0,917	0,445	0,700	0,611
C	0,025	0,000	0,045	0,100	0,023	0,063	0,000	0,222	0,100	0,000
N	20	4	11	5	22	16	6	9	5	9
<i>Pep</i>										
A	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,944	1,000	0,909	1,000	0,937
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,091	0,000	0,063
N	11	10	7	3	19	18	9	11	5	8

Tabela IV: Freqüências alélicas para os 5 morfotipos nas populações de Itaipu e Prainha (continuação).

<i>Locus</i>	População									
	I-CAS	I-CNZ	I-PRT	I-RSA	I-VRD	P-CAS	P-CNZ	P-PRT	P-RSA	P-VRD
<i>Pgi</i>										
A	0,133	0,286	0,091	0,111	0,083	0,000	0,000	0,625	0,125	0,300
B	0,700	0,714	0,773	0,667	0,834	0,786	0,750	0,375	0,750	0,600
C	0,167	0,000	0,136	0,222	0,083	0,214	0,250	0,000	0,125	0,100
N	15	7	11	9	12	7	4	4	4	5
<i>Pgm</i>										
A	0,000	0,000	0,000	0,500	0,333	0,667	1,000	0,833	1,000	1,000
B	1,000	1,000	1,000	0,500	0,667	0,333	0,000	0,167	0,000	0,000
N	3	1	1	3	6	3	2	3	2	2
<i>Sod</i>										
A	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
N	35	13	18	9	34	22	9	10	5	16
<i>Xod</i>										
A	0,885	0,643	0,833	0,833	0,750	0,944	0,937	0,875	0,900	0,750
B	0,115	0,357	0,167	0,167	0,250	0,056	0,063	0,125	0,100	0,250
N	13	7	3	3	6	9	8	4	5	8

Tabela V: Tamanho médio de amostra, número médio de alelos por *locus*, grau (%) de polimorfismo e heterozigosidades médias observadas e esperadas para cada morfotípico (Desvios-padrão entre parêntesis) nas populações de Itaipu e Prainha.

População	Tamanho	Nº médio	% de <i>loci</i>	Heterozigosidade média	
	médio de amostra	de alelos	polimórficos*	Observada	Esperada**
I – CAS	14,6 (\pm 3,0)	2,0 (\pm 0,3)	66,7	0,190 (\pm 0,058)	0,261 (\pm 0,074)
I – CNZ	5,9 (\pm 1,3)	1,7 (\pm 0,2)	66,7	0,240 (\pm 0,069)	0,273 (\pm 0,079)
I – PRT	7,2 (\pm 1,8)	2,0 (\pm 0,3)	66,7	0,212 (\pm 0,067)	0,296 (\pm 0,082)
I – RSA	5,4 (\pm 0,9)	2,0 (\pm 0,2)	77,8	0,343 (\pm 0,102)	0,370 (\pm 0,074)
I – VRD	14,7 (\pm 3,0)	2,1 (\pm 0,3)	77,8	0,278 (\pm 0,067)	0,327 (\pm 0,065)
P – CAS	12,7 (\pm 2,1)	2,1 (\pm 0,2)	88,9	0,159 (\pm 0,050)	0,332 (\pm 0,070)
P – CNZ	6,0 (\pm 0,8)	1,8 (\pm 0,2)	66,7	0,171 (\pm 0,057)	0,227 (\pm 0,078)
P – PRT	6,3 (\pm 1,1)	2,1 (\pm 0,2)	88,9	0,302 (\pm 0,083)	0,428 (\pm 0,083)
P – RSA	3,8 (\pm 0,4)	1,8 (\pm 0,3)	55,6	0,237 (\pm 0,084)	0,253 (\pm 0,088)
P – VRD	7,7 (\pm 1,4)	1,9 (\pm 0,2)	77,8	0,185 (\pm 0,046)	0,330 (\pm 0,077)
Média todas as pops	8,43	1,9	73,36	0,232	0,309

* Um *locus* foi considerado polimórfico quando mais de um alelo foi detectado

** Estimativa não-viciada (Nei, 1978)

Tabela VI: Heterozigosidades por *locus* para os 5 morfotipos nas populações de Itaipu e Prainha.

Local	α -Est-2		α -Est-3		Cat		Mdh		Pep		Pgi		Pgm		Xod	
	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}
I-CAS	0,250	0,242	0,286	0,423	0,333	0,507	0,300	0,483	0,000	0,000	0,467	0,480	0,000	0,000	0,077	0,212
I-CNZ	0,500	0,500	0,200	,0200	0,500	0,571	0,250	0,250	0,000	0,000	0,286	0,440	0,000	0,000	0,429	0,495
I-PRT	0,400	0,711	0,500	0,429	0,400	0,356	0,182	0,437	0,000	0,000	0,091	0,394	0,000	0,000	0,333	0,333
I-RSA	0,500	0,429	0,500	0,429	0,333	0,503	0,200	0,511	0,000	0,000	0,222	0,523	1,000	0,600	0,333	0,333
I-VRD	0,455	0,394	0,286	0,423	0,500	0,533	0,091	0,394	0,000	0,000	0,333	0,304	0,333	0,485	0,500	0,409
P-CAS	0,250	0,540	0,368	0,462	0,375	0,325	0,188	0,542	0,000	0,108	0,143	0,363	0,000	0,533	0,111	0,111
P-CNZ	0,333	0,667	0,167	0,409	0,250	0,250	0,167	0,167	0,000	0,000	0,500	0,429	0,000	0,000	0,125	0,125
P-PRT	0,200	0,689	0,444	0,523	0,000	0,667	0,556	0,680	0,182	0,173	0,750	0,536	0,333	0,333	0,250	0,250
P-RSA	0,333	0,600	0,000	0,000	0,500	0,500	0,600	0,511	0,000	0,000	0,500	0,464	0,000	0,000	0,200	0,200
P-VRD	0,333	0,333	0,250	0,500	0,200	0,505	0,111	0,503	0,125	0,125	0,400	0,600	0,000	0,000	0,250	0,400

Tabela VII: Probabilidades (P) de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Ho: união de gametas ao acaso) para os 5 morfotipos nas populações de Itaipu e Prainha.

<i>Locus</i>	Populações									
	I-CAS	I-CNZ	I-PRT	I-RSA	I-VRD	P-CAS	P-CNZ	P-PRT	P-RSA	P-VRD
<i>α-Est-2</i>	1,0000	-	0,1111	1,0000	1,000	0,0287	0,1342	0,0476	1,0000	-
<i>α-Est-3</i>	0,2580	-	1,0000	1,0000	0,2580	0,6069	0,2727	1,0000	-	0,2168
<i>Cat</i>	0,2893	1,0000	1,0000	0,4932	1,0000	1,0000	-	0,3333	-	0,0817
<i>Mdh</i>	0,1138	-	0,0376	0,1111	0,0001*	0,0011	-	0,2339	1,0000	0,0317
<i>Pep</i>	-	-	-	-	-	0,0286	-	1,0000	-	-
<i>Pgi</i>	0,2452	0,4406	0,0075	0,0371	1,0000	0,2308	1,0000	1,0000	1,0000	0,6190
<i>Pgm</i>	-	-	-	0,4000	1,0000	0,2000	-	-	-	-
<i>Xod</i>	0,1200	1,0000	-	-	1,0000	-	-	-	-	0,3846

* Significativo após correção de Bonferroni ($\alpha=0,00098$)

Tabela VIII: Índices de endocruzamento de Weir & Cockerham para todos os *loci* para os 5 morfotipos nas populações de Itaipu e Prainha.

<i>Locus</i>	<i>f</i>	θ	<i>F</i>
<i>α-Est-2</i>	0,3359 ^{ns}	0,0525 ^{ns}	0,3708
<i>α-Est-3</i>	0,2716 ^{ns}	0,1466 ^{ns}	0,3783
<i>Cat</i>	0,2820 ^{ns}	0,0575 ^{ns}	0,3233
<i>Mdh</i>	0,5092*	- 0,0195 ^{ns}	0,4996
<i>Pep</i>	0,3988 ^{ns}	- 0,0185 ^{ns}	0,3877
<i>Pgi</i>	0,2518 ^{ns}	0,0070 ^{ns}	0,2570
<i>Pgm</i>	0,2871 ^{ns}	0,3909 ^{ns}	0,5658
<i>Xod</i>	0,1684 ^{ns}	- 0,0140 ^{ns}	0,1568
Todos	0,3297*	0,0620*	0,3713

* $p < 0,05$; ns = não significativo

Tabela IX: Matriz de similaridade genética para os 5 morfotipos nas populações de Itaipu e Prainha. Acima da diagonal: identidade genética; abaixo da diagonal: distância genética entre as populações (Nei, 1978). Os valores em negrito correspondem aos valores de Identidade Gênica encontrados dentro do intervalo esperado para espécies congêneres segundo Thorpe (1983).

População	I-CAS	I-CNZ	I-PRT	I-RSA	I-VRD	P-CAS	P-CNZ	P-PRT	P-RSA	P-VRD
I-CAS	****	0,887	0,956	0,951	0,965	0,905	0,783	0,872	0,827	0,853
I-CNZ	0,120	****	0,999	0,955	0,949	0,850	0,822	0,825	0,686	0,770
I-PRT	0,045	0,001	****	0,966	0,980	0,942	0,807	0,856	0,740	0,795
I-RSA	0,050	0,047	0,034	****	1,000	0,986	0,983	0,976	0,895	0,973
I-VRD	0,035	0,052	0,020	0,000	****	0,974	0,917	0,929	0,861	0,923
P-CAS	0,100	0,163	0,060	0,014	0,026	****	0,917	0,968	0,902	0,939
P-CNZ	0,245	0,195	0,215	0,017	0,087	0,087	****	0,940	0,932	0,959
P-PRT	0,137	0,192	0,155	0,024	0,074	0,032	0,062	****	0,978	1,000
P-RSA	0,189	0,377	0,301	0,111	0,150	0,103	0,070	0,022	****	0,979
P-VRD	0,158	0,261	0,229	0,027	0,080	0,063	0,042	0,000	0,021	****

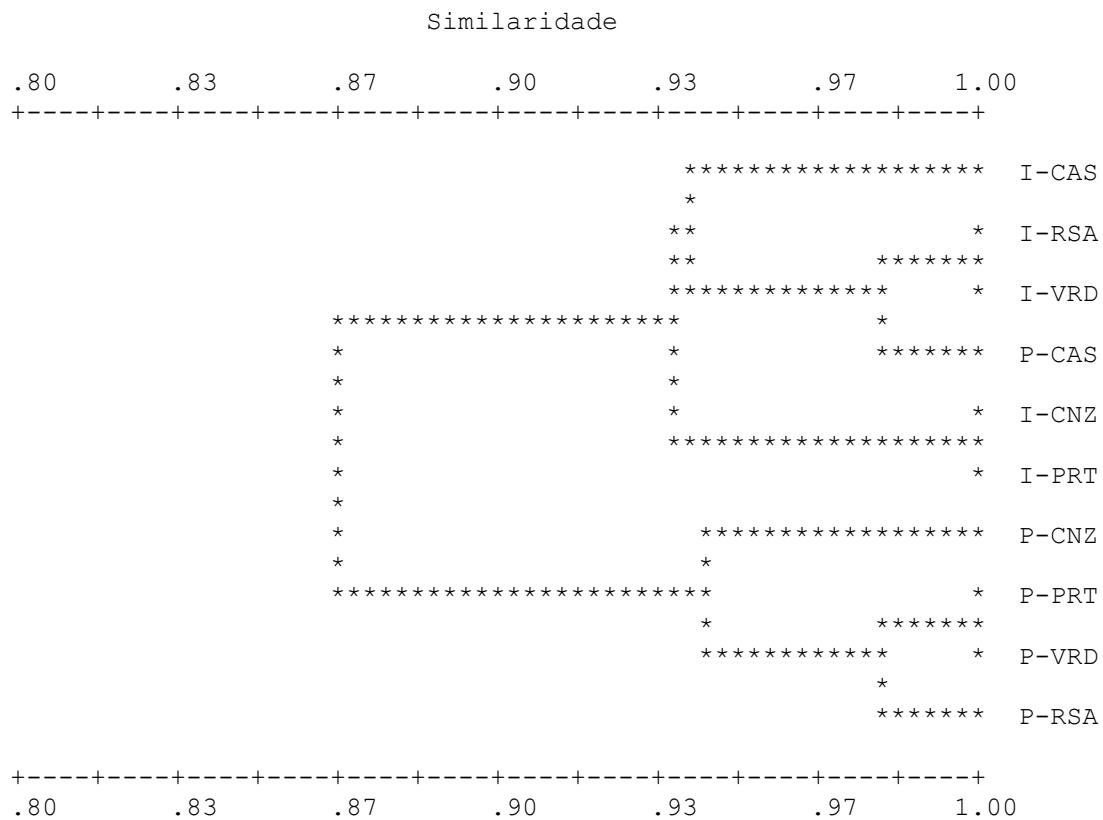


Figura 3: Dendrograma de UPGMA de identidades genéticas entre os 10 morfotipos das populações de Itaipu e Prainha.

4.2– As populações

Os sistemas enzimáticos analisados foram interpretados como 10 *loci* gênicos. Todos se mostraram polimórficos, à exceção de *Sod*. A enzima α -*Est* apresentou 3 *loci* (Tabela X).

A média de alelos por *locus* nas populações oscilou entre 2,0 e 2,1. O polimorfismo médio foi de 80,0% e as heterozigosidades variaram de 0,188 (Prainha) a 0,272 (Ferradura), com média para todas as populações de 0,228 (Tabela XI). A maior heterozigosidade por *locus* observada foi para enzima *Cat* em Ferradura (0,700 – Tabela XII).

A maioria dos *loci* estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni, com exceção do *locus Mdh* em Itaipu e Prainha, e do *locus α -Est-2* em Prainha (Tabela XIII). Em todos os casos, o teste exato (Rousset & Raymond, 1995) indicou serem os desequilíbrios resultado de um déficit de heterozigotos.

O θ médio para todas as populações foi 0,0296, que é significativo. O f médio para todas as populações foi também significativo (0,3255) (Tabela XIV).

As identidades genéticas (I) foram todas maiores que 0,94 (Tabela XV e Figura 4).

Tabela X: Freqüências alélicas para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura.

<i>Locus</i>	População		
	Itaipu	Prainha	Ferradura
<i>α-Est-1</i>			
A	1,000	1,000	0,962
B	0,000	0,000	0,038
N	6	18	13
<i>α-Est-2</i>			
A	0,200	0,138	0,089
B	0,700	0,569	0,735
C	0,100	0,293	0,176
N	30	29	17
<i>α-Est-3</i>			
A	0,598	0,533	0,737
B	0,402	0,467	0,263
N	41	45	19
<i>Cat</i>			
A	0,539	0,481	0,550
B	0,461	0,519	0,450
N	38	26	10
<i>Mdh</i>			
A	0,250	0,300	0,286
B	0,718	0,622	0,714
C	0,032	0,078	0,000
N	62	45	14

Tabela X: Freqüências alélicas para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura (continuação).

<i>Locus</i>	População		
	Itaipu	Prainha	Ferradura
<i>Pep</i>			
A	1,000	0,951	0,896
B	0,000	0,049	0,104
N	50	51	24
<i>Pgi</i>			
A	0,130	0,188	0,265
B	0,740	0,667	0,588
C	0,130	0,145	0,147
N	54	24	17
<i>Pgm</i>			
A	0,250	0,875	0,571
B	0,750	0,125	0,429
N	14	12	7
<i>Sod</i>			
A	1,000	1,000	1,000
N	109	62	23
<i>Xod</i>			
A	0,797	0,882	0,929
B	0,203	0,118	0,071
N	32	34	14

Tabela XI: Tamanho médio de amostra, número médio de alelos por *locus*, grau (%) de polimorfismo e heterozigosidades médias observadas e esperadas para cada população (Desvios-padrão entre parêntesis) para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura.

População	Tamanho médio de amostra	Nº médio de alelos	% de <i>loci</i> polimórficos*	Heterozigosidade média	
				Observada	Esperada**
Itaipu	43,6 ($\pm 9,1$)	2,0 ($\pm 0,3$)	70,0	0,224 ($\pm 0,052$)	0,302 ($\pm 0,068$)
Prainha	34,6 ($\pm 5,0$)	2,1 ($\pm 0,2$)	80,0	0,188 ($\pm 0,046$)	0,316 ($\pm 0,074$)
Ferradura	15,8 ($\pm 1,7$)	2,1 ($\pm 0,2$)	90,0	0,272 ($\pm 0,064$)	0,329 ($\pm 0,066$)
Média todas as pops	31,3	2,06	80,0	0,228	0,316

* Um *locus* foi considerado polimórfico quando mais de um alelo foi detectado

** Estimativa não-viciada (Nei,1978)

Tabela XII: Heterozigosidades por *locus* para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura.

Local	α -Est-1		α -Est-2		α -Est-3		Cat		Mdh		Pep		Pgi		Pgm		Xod	
	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}
ITA	0,000	0,000	0,400	0,468	0,317	0,487	0,395	0,504	0,194	0,425	0,000	0,000	0,296	0,422	0,357	0,389	0,281	0,329
PRA	0,000	0,000	0,276	0,581	0,311	0,503	0,269	0,509	0,289	0,523	0,059	0,094	0,417	0,510	0,083	0,228	0,176	0,211
FER	0,077	0,077	0,294	0,433	0,316	0,398	0,700	0,521	0,429	0,423	0,125	0,191	0,353	0,579	0,286	0,527	0,143	0,138

Tabela XIII: Probabilidades (P) de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_0 : união de gametas ao acaso) para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura.

<i>Locus</i>	Populações		
	Itaipu	Prainha	Ferradura
<i>α-Est-1</i>	-	-	-
<i>α-Est-2</i>	0,1204	0,0014*	0,1101
<i>α-Est-3</i>	0,0480	0,0156	0,5498
<i>Cat</i>	0,2057	0,0209	0,5199
<i>Mdh</i>	0,0000*	0,0005*	1,0000
<i>Pep</i>	-	0,0975	0,2057
<i>Pgi</i>	0,0032	0,1705	0,0441
<i>Pgm</i>	1,0000	0,1304	0,4406
<i>Xod</i>	0,5776	0,3712	1,0000

* Significativo após correção de Bonferroni ($\alpha=0,0021$)

Tabela XIV: Índices de endocruzamento de Weir & Cockerham para todos os *loci* para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura.

Locus	f	θ	F
<i>α-Est-1</i>	0,0023 ^{ns}	- 0,0036 ^{ns}	- 0,0013
<i>α-Est-2</i>	0,3514*	0,0156 ^{ns}	0,3615
<i>α-Est-3</i>	0,3460*	0,0143 ^{ns}	0,3553
<i>Cat</i>	0,2319 ^{ns}	- 0,0229 ^{ns}	0,2143
<i>Mdh</i>	0,4474*	- 0,0080 ^{ns}	0,4430
<i>Pep</i>	0,3608*	0,0423 ^{ns}	0,3879
<i>Pgi</i>	0,2890*	- 0,0012 ^{ns}	0,2882
<i>Pgm</i>	0,3352 ^{ns}	0,3715*	0,5822
<i>Xod</i>	0,1368 ^{ns}	0,0111 ^{ns}	0,1464
Todos	0,3255*	0,0296*	0,3455

* $p < 0,05$; ns = não significativo

Tabela XV: Matriz de similaridade genética para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura. Acima da diagonal: identidade genética; abaixo da diagonal: distância genética entre as populações (Nei, 1978).

População	Itaipu	Prainha	Ferradura
Itaipu	****	0,943	0,986
Prainha	0,059	****	0,987
Ferradura	0,014	0,013	****

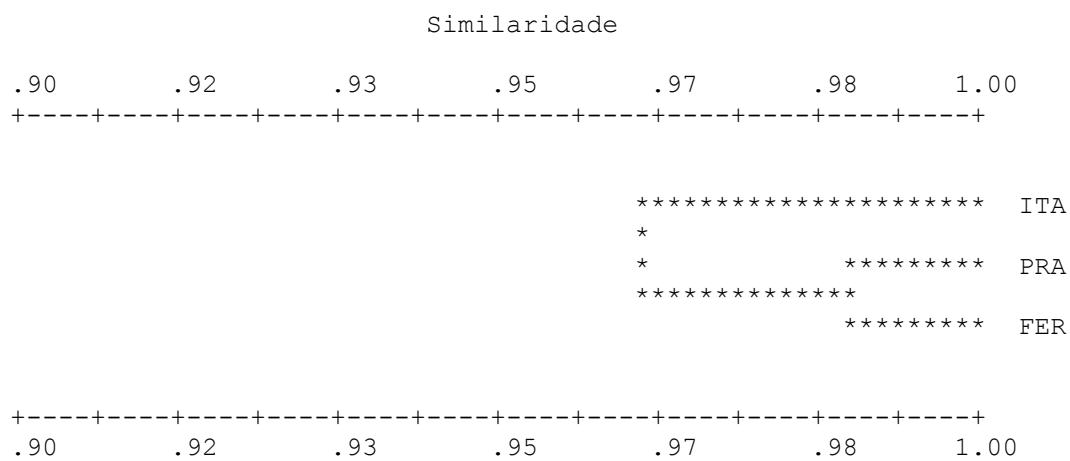


Figura 4: Dendrograma de UPGMA de identidades genéticas para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura.

5- DISCUSSÃO

5.1- Os morfotipos

O homem sempre buscou organizar o mundo. A Taxonomia e a Sistemática são um exemplo dessa busca de organização. Contudo, ao tentar classificar os organismos vivos em espécies, ele se deparou com a contradição entre “*Diversidade e Ordem da realidade biológica*”. Atualmente, existem mais de 20 conceitos de espécie, sendo o conceito biológico de espécie o mais popular e influente (Silva, 2002b).

O conceito biológico define as espécies como grupos que não se intercruzam na natureza. Esta definição independe da diferenciação morfológica entre os grupos (Futuyma, 2002; Silva; 2002b), o que fica bastante evidente no caso das espécies crípticas. Entretanto, na prática, a Taxonomia é feita com base em caracteres morfológicos. No mar, é comum a ocorrência de espécies crípticas, uma vez que muitas das espécies de invertebrados marinhos são classificadas com base em poucos caracteres. Tanto é assim que, desde o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, muitas espécies crípticas puderam ser identificadas (Knowlton, 2000; Silva, 2002b).

Os morfotipos de *Paracentrotus gaimardi* analisados molecularmente nesta monografia, pelo método de eletroforese de aloenzimas, apresentaram valores de Identidades gênicas (IG) oscilando entre valores muito altos (morfotipos que vivem em simpatria – por exemplo: Itaipu, morfotipo rosa e Itaipu, morfotipo preto apresentaram IG igual a 1,000) e valores muito baixos (morfotipos que vivem em alopatria – por exemplo: Itaipu, morfotipo cinza e Prainha, morfotipo rosa apresentaram IG igual a 0,686).

Thorpe (1983) analisou diversos trabalhos que tratavam de genética de populações dos mais diversos organismos. Com base no seu levantamento, ele foi capaz de determinar, empiricamente, os intervalos de valores de Identidade gênica (medidas pela equação de Nei, 1978) nos quais se encontravam populações coespecíficas, congêneres e gêneros de uma mesma família (Figura 5). Os valores observados para populações coespecíficas estão, geralmente,

acima de 0,80. Espécies congêneres apresentam valores de IG que variam entre 0,15 e 0,85.

No presente estudo, foram encontrados 5 valores de Identidades gênicas, de um total de 45, dentro do intervalo observado para populações cogenéricas. Contudo, em todos os casos, estes valores diziam respeito, sempre, a morfotipos alopátricos. Do mesmo modo, não foi observado nenhum *locus* diagnóstico entre os morfotipos, seja em simpatria ou alopatria. Estes dados sugerem que, embora parte da variação gênica seja encontrada entre os morfotipos, não existe um isolamento reprodutivo entre nenhum deles.

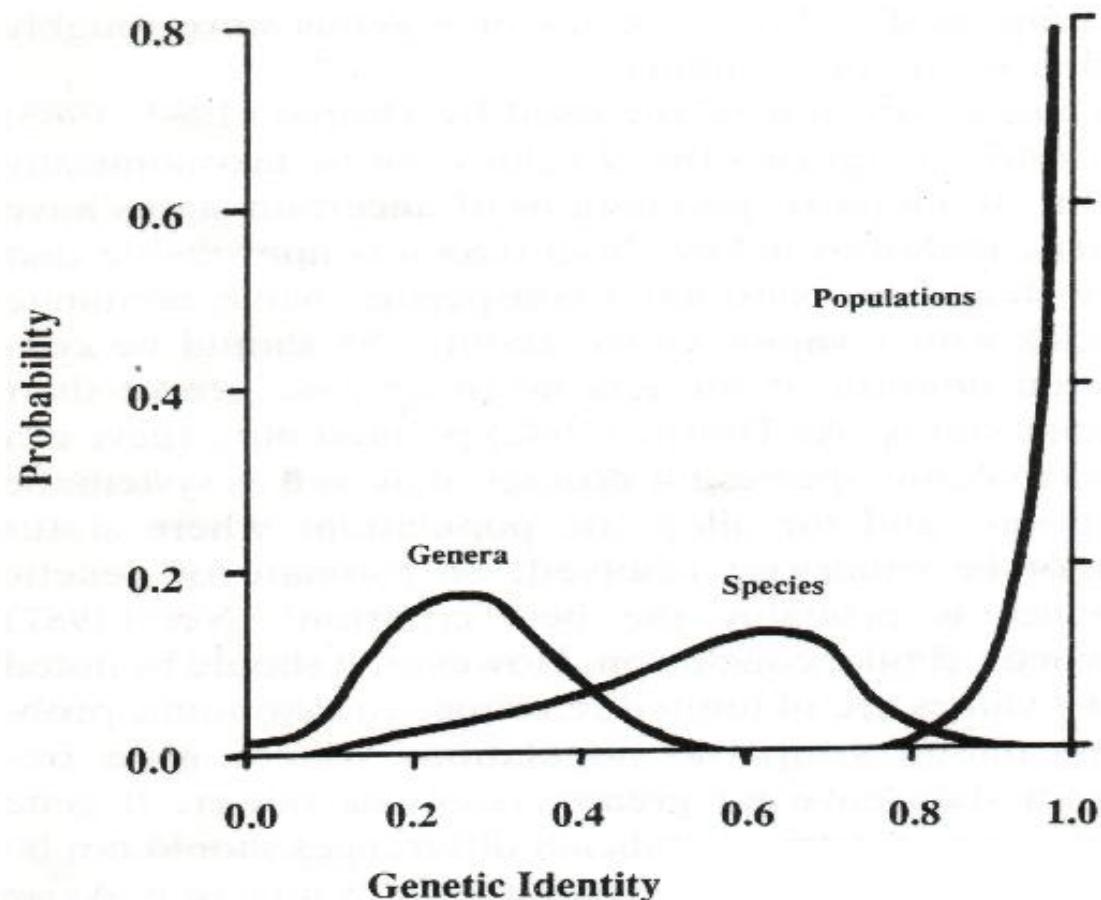


Figura 5: Gráfico de probabilidade da distribuição da Identidade Gênica de Nei (Nei, 1978) para populações coespecíficas, congêneres e gêneros de uma mesma família (retirado de Thorpe & Solé-Cava, 1994).

Aron & Solé-Cava (1991) analisando dois morfotipos da ascidia *Botryllus niger* encontraram cinco *loci* diagnósticos entre doze analisados. Quicke e colaboradores (1983) estudando variações entre sete morfotipos da espécie de anêmona *Actinia eqüina*, encontraram um *locus* diagnóstico (*Hk*) entre dois (*Hk* e *Mdh*) que haviam demonstrado ter alguma ligação com o padrão de cor em estudo anterior. Outros trabalhos que podem ser citados são aqueles de Day e colaboradores (2000) que estudaram três espécies de ostras do gênero *Saccostrea*, encontrando três *loci* diagnósticos entre os oito estudados; Gusmão e colaboradores (2000) que estudaram quatro espécies de camarão do gênero *Penaeus*, sendo que uma delas (*P. subtilis*) apresentava dois morfotipos, entre os quais foram encontrados dois *loci* diagnósticos entre quatorze estudados e para a espécie de anêmona *Anthopleura orientalis*, que apresentava dois morfotipos, e foram identificados oito *loci* diagnóstico entre os 21 analisados (Manchenko *et al.*, 2000).

A interpretação de que os morfotipos representam apenas um polimorfismo intraespecífico é fortalecida pela observação do dendrograma, que mostra um agrupamento pelos locais de amostragem e não pelos morfotipos (a única exceção foi o morfotipo castanho de Prainha que ficou agrupado junto à população de Itaipu). Uma clara indicação de que a variação existente está mais relacionada à distância geográfica do que à variação de cores dos espinhos que define os morfotipos estudados.

Quando são analisados os desvios encontrados para a lei de Hardy-Weinberg, pode-se perceber que o único desvio observado (*locus Mdh* para o morfotipo verde da população de Itaipu) pode ser explicado apenas pelo acaso, uma vez que 5% de 51 testes é 2,55 (número de desvios esperados apenas pelo acaso). Este resultado poderia indicar que os morfotipos não são completamente artificiais, mas possuem alguma realidade biológica. Somado a isso, os dez morfotipos apresentaram elevados índices de estruturação. Contudo, estes dados não são suficientes para afirmar que os morfotipos estudados representam unidades evolutivas separadas. Isto porque, o tamanho amostral utilizado pode ter tido um papel na definição dos valores de θ . Embora, seja sabido que as maiores

variâncias nessas estimativas estão associadas ao número de *loci* e não ao tamanho amostral (Gorman & Renzi, 1979), é também verdade que isso se aplica melhor a níveis de variação gênica moderados. Invertebrados marinhos, no entanto, em geral, possuem elevados níveis de variação gênica (Silva, 2002a).

5.2- As populações

A variabilidade gênica encontrada para a espécie *Paracentrotus gaimardi* ($H_{obs}=0,228$), está dentro da faixa encontrada para outros trabalhos com invertebrados marinhos, por exemplo, Vadas & Bristow (1985) com o poliqueta *Glycera dibranchiata* (H_{obs} entre 0,173 e 0,322); Smith (1988) com o mexilhão *Perna canaliculus* (H_{obs} entre 0,263 e 0,347); Benzie e Williams (1997) com o bivalve *Tridacna maxima* (H_{obs} entre 0,345 e 0,548) e Manchenko e colaboradores (2000) com a espécie de anêmona *Antropleura orientalis* ($H_{média} = 0,250$). O mesmo se dando no caso dos Equinodermos, para os quais podem ser citados como exemplos, os organismos *Linckia laevigata* ($H_{obs} = 0,360$, Williams & Benzie, 1998), *Acanthaster planci* ($H_{obs} = 0,180$, Benzie, 1999), *Asterina pectinifera* ($H_{obs} = 0,120$, Matsuoka & Asano, 2003) e *Coscinasterias tenuispina* ($H_{obs} = 0,330$, Pazoto, 2004) da classe Asteroidea; *Holoturia atra* ($H_{obs} = 0,410$ e 0,420, Uthicke *et al.*, 1998 e 2001, respectivamente) e *Stichopus chloronotus* ($H_{obs} = 0,360$ e 0,190, Uthicke *et al.*, 1999 e 2001, respectivamente) da classe Holoturoidea e, também, organismos da classe Echinoidea, como *Strongylocentrotus nudus*, *S. intermedius* e *S. pallidus* ($H_{obs} = 0,130$, 0,240 e 0,240, respectivamente; Manchenko & Yakovlev, 2001) e *S. franciscanus* ($H_{obs} = 0,340$; Moberg & Burton, 2000).

Os modelos que tentam explicar a alta variabilidade gênica encontrada em invertebrados marinhos são vários e se baseiam tanto na ação da seleção natural quanto de fatores estocásticos (Silva, 2002a). Para o presente estudo, não é possível fazer nenhuma afirmação sobre os mecanismos que mantêm os altos níveis de variação de *P. gaimardi*, uma vez que para isso seriam necessários estudos mais direcionados a este problema, envolvendo aspectos bioquímicos, ecológicos e genéticos desta espécie.

O índice de Weir & Cockerham encontrado para as populações de *P. gaimardi* foi elevado e significativo ($\theta = 0,0296$), evidenciando que as três populações estudadas estão estruturadas. Esta estruturação parece ser adequadamente explicada pelo modelo de isolamento por distância, uma vez que, as populações mais próximas geograficamente são, também, as mais semelhantes geneticamente. Prainha e Ferradura que são as populações mais próximas geneticamente estão separadas por apenas 30Km de distância, enquanto Itaipu, a população com maior distância genética, está localizada a 150km delas.

Índices de estruturação elevados são esperados para populações que possuem uma baixa capacidade de dispersão larvar. Por exemplo, Duran e colaboradores (2004) encontraram um índice de estruturação igual a 0,180 para a espécie de esponja *Crambe crambe* que apresenta dispersão mediada por larvas lecitotróficas. Por outro lado, em espécies que possuem uma alta capacidade de dispersão espera-se encontrar baixa estruturação gênica. Estudos com o mexilhão *Perna canaliculus*, por exemplo, evidenciaram baixa estruturação de populações distantes até 2000km ($F_{st} = 0,002$, Apte & Gardner, 2001). Do mesmo modo, a espécie de holotúria *Holothuria nobilis* que também se dispersa a partir de larvas planctotróficas apresentou um índice de estruturação igual a 0,0064 (Uthicke & Benzie, 2003), não significativamente diferente de zero, entre populações do Pacífico e do Índico. Contudo, essa relação entre capacidade de dispersão e fluxo gênico nem sempre acontece, não é raro encontrar trabalhos demonstrando elevados índices de estruturação para espécies de reprodução sexuada e larvas planctotróficas. Waters & Roy (2004) encontraram um elevado valor de F_{st} (0,072) na análise de populações da estrela do mar *Patiriella regularis* localizadas ao norte e ao sul do fenômeno da ressurgência que ocorre na região da Nova Zelândia. Do mesmo modo, Smith (1988), estudando a espécie *Perna canaliculus* na mesma região, também encontrou diferenças entre populações localizadas mais ao norte e mais ao sul, explicando os seus resultados pela ação de correntes. A região estudada nesta monografia é afetada diretamente pelo fenômeno da ressurgência, que ocorre intensamente em Arraial do Cabo, mas tem efeito moderado nos

pontos da Prainha e Itaipu e fraco em Ferradura. Desta forma, é possível que barreiras físicas, como a ressurgência, possam estar exercendo uma limitação ao fluxo gênico da espécie *P. gaimardi*, porém, não foi possível formular nenhuma hipótese mais específica para explicar os resultados obtidos.

Foram encontrados três desvios significativos para a lei de Hardy-Weinberg, todos devidos à deficiência de heterozigotos. Este valor é maior do que o que se esperaria por acaso (5% de 23 testes é 1,15 – número de desvios esperados). O número de desvios observados não pode excluir a hipótese de que alguns dos pressupostos da lei de Hardy-Weinberg devem estar sendo violados no caso das populações estudadas. Contudo, a deficiência de heterozigotos em invertebrados marinhos é um fenômeno comum, embora não tenha tido, ainda, as suas causas identificadas. A natureza deste estudo não permitiu a formulação de nenhuma hipótese a respeito das causas dos desvios encontrados.

6- CONCLUSÕES

- * Os morfotipos estudados representam variação intraespecífica de *Paracentrotus gaimardi*;
- * A espécie *P. gaimardi* apresentou elevada variação gênica, porém, comparável com outros invertebrados marinhos;
- * As três populações de *P. gaimardi* estudadas apresentaram-se estruturadas seguindo o modelo de isolamento por distância.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apte, S. & Gardner, J. P. A. 2001. Absence of population genetic differentiation in the New Zealand greenshell mussel *Perna Canaliculus* (Gmelin, 1791) as assessed by allozyme variation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 258: 173-194.
- Aron, S. & Solé-Cava, A. M. 1991. Genetic evaluation of the taxonomic status of two varieties of the cosmopolitan ascidian *Botryllus niger* (Asciidae: Botryllidae). *Biochemical Systematics and Ecology* 19(4): 271-276.
- Barcellos, C. F. 2004. *Variações morfológicas e reprodutivas de Paracentrotus gaimardi (Blainville, 1825) (Echinodermata: Echinoidea) em três populações na costa brasileira*. Dissertação de mestrado. Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 55p.
- Benzie, J. A. & Williams, S. T. 1997. Genetic structure of giant (*Tridacna maxima*) populations in the west Pacific is not consistent with dispersal by present-day ocean currents. *Evolution* 51: 768-783.
- Benzie, J. H. A. 1999. Major genetic differences between crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) populations in the Indian and Pacific Oceans. *Evolution* 53: 1782-1795.
- Boudouresque, C. F. & Yoneshigue, Y. 1987. Données préliminaires sur les peuplements phytobenthiques et sur les échinides herbivores de la région de Cabo-Frio (Brésil). *Nerítica* 2(1): 65-106.
- Bucklin, A. & Hedgecock, D. 1982. Biochemical genetic evidence for a third species of *Meridium* (Coelenterata: Actiniaria). *Marine Biology* 66: 1-7.
- Brewer, J. F. 1970. *An introduction to isozyme techniques*. Academic Press, New York.

- Campos Villaça, R. & Yoneshigue, Y. 1987. Donnees preliminaires sur le comportement alimentaire de *Paracentrotus gaimardii* dans la region de Cabo Frio (Bresil). In: Boudouresque, C., F. (ed.) *Colloque International sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*. GIS Posidoinie publ., Marseille. Pp. 125-138.
- Campos Villaça, R. 1988. *Le phytobenthos infralittoral des biotopes sciaphiles dans la region d'upwelling de Cabo Frio (Bresil)*. Tese de Doutorado. Faculté des Sciences de Luminy, Université d'Aix-Marseille II, Soutenue. 217p.
- Carlini-Garcia, L. A.; Vencovsky, R. & Coelho, A. S. G. 2001. Método Bootstrap aplicados em níveis de reamostragem na estimativa de parâmetros genéticos populacionais. *Scientia Agricola* 58(4): 785-793.
- Darwin, C.R. 1859. *The origin of species by means of natural selection*. John Murray, London.
- Day, A. J.; Hawkins, A. J. S. & Visootiviseth, P. 2000. The use of allozymes and shell morphology to distinguish among sympatric species of rock oyster *Saccostrea* in Thailand. *Aquaculture* 187: 51-72.
- Duran, S.; Pascual, M.; Estoup, A. & Turon, X. 2004. Strong population structure in the marine sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida) as revealed by microsatellite markers. *Molecular Ecology* 33: 511-522.
- Futuyma, D. J. 2002. *Biologia Evolutiva*. 2º Edição. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo.
- Gorman, G. C. & Renzi Jr, J. 1979. Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoretic studies: Efect of sample size. *Copeia* 2: 242-249.
- Gusmão, J.; Lazoski, C. & Solé-Cava, A. M. 2000. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I anallyses. *Marine Biology* 137: 435-446.

- Harris, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 164: 298-310.
- Harris, H. & Hopkinson, D. A. 1978. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Hubby, J. L. & Lewontin, R. C. 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. I-The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 577-594.
- Knowlton, N. 2000. Molecular genetics analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420: 73-90.
- 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.
- Lewontin, R. C. & Hubby, J. L. 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II-Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 569-595.
- Manchenko, G. P.; Dautova, T. N. & Latypov, Y. Y. 2000. High levels of genetic divergence between sympatric color morphs of the littoral sea-anemona *Anthopleura orientalis* (Anthozoa: Actinaria). *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 737-750.
- Manchenko, G. P. & Yakovlev, S. N. 2001. Genetic divergence between three sea urchin species of the genus *Stegylocentrotus* from the Sea of Japan. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 31-44.
- Matsuoka, N.; Kohyama, K. & Asano, H. 1995. Genetic distance and enzyme variation in local populations of two echinoderms from japonese waters. *Comparative Biochemistry and Phisiology* 110B: 225-233.

- Matsuoka, N. & Asano. 2003. Genetic variation in northern Japanese populations of the starfish *Asterina pectinifera*. *Zoological Science* 20: 985-988.
- Moberg, P. E. & Burton, R. S. 2000. Genetic heterogeneity among adult and recruit red sea urchins, *Strongylocentrotus franciscanus*. *Marine Biology* 136: 773-784.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Pazoto, C. E. M. 2004. *Genética de populações de Coscinasterias tenuispina (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Asteroidea) no litoral do Rio de Janeiro*. Monografia Bacharel em Biologia Marinha. Departamento de Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 66p.
- Poulik, M. D. 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature* 180: 1477-1479.
- Quicke, D. L. J.; Donoghue, A. M. & Brace, R. C. 1983. Biochemical-genetic and ecological evidence that red/brown individuals of the anemone *Actinia equina* comprise two morphs in Britain. *Marine Biology* 77: 29-37.
- Raymond, M.; Rousset, F. 2001. GENEPOP 3.3: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. <ftp://cefe.cnrs-mop.fr>.
- Rice, W. R. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Richardson, B. J.; Baverstock, P. R. & Adams, M. 1986. *Allozyme electrophoresis – a handbook for animal systematics and population studies*. Academic Press, Sydney.
- Rousset, F. & Raymond, M. 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140: 1413-1419.

- Ruppert, E. E. & Barnes, R. D. 1996. *Zoologia de Invertebrados*. 6^a edição. Roca LTDA, São Paulo.
- Selander, R. K.; Smith, M.H.; Yang, S. Y.; Johnson, W. E. & Gentry, J. R. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I: Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in Genetics VI*. Univ. Texas Publ., Texas. Pp. 49-70.
- Silva, E. P. 2002a. Genética Marinha. In: Soares-Gomes, A. & Pereira, R. C. (eds). *Biologia Marinha*. Interciências, Rio de Janeiro. Pp. 335-351.
- Silva, E. P. 2002 b. Especiação no Ambiente Marinho. In: Soares-Gomes, A. & Pereira, R. C. (eds). *Biologia Marinha*. Interciências, Rio de Janeiro. Pp. 36-47.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 789-792.
- Smith, B. A. 1992. Echinoderm phylogeny: Morphology and molecules approach accord. *Tree* 7(7): 224-229.
- Smith, P. J. 1988. Biochemical-genetic variation in the green-lipped mussel *Perna canaliculus* around New Zealand and possible implications for mussel farming. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 22: 85-90.
- Solé-Cava, A. M. & Thorpe, J. P. 1987. Further genetic evidence for the reproductive isolation of green sea anemone *Actinia prasina* gosse from common intertidal beadlet anemone *Actinia equina* (L.). *Marine Ecology – Progress Series* 38: 225-229.
- Solé-Cava, A. M.; Thorpe, J. P. & Kaye, J. G. 1985. Reproductive isolation with little genetic divergence between *Urticina* (= *Tealia*) *felina* and *U. eques* (Anthozoa: Actiniaria). *Marine Biology* 85: 279-284.

- Swofford, D. L. & Selander, R. B. 1997. BIOSYS 2 a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetics and systematics. <http://lamar.colostate.edu>.
- Thorpe, J. P. 1983. Enzyme variation, genetic distance and evolutionary divergence in relation to levels of taxonomic separation. In: Oxford, G. S. & Rollinson, D. (eds). *Protein polymorphism: Adaptive and taxonomic significance*. Systematics Association publ, London. Pp.131-152.
- Thorpe, J. P. & Solé-Cava, A. M. 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zoologica Scripta* 23(1): 3-18.
- Thorpe, J. P.; Solé-Cava, A. M. & Watts, P. C. 2000. Exploited marine invertebrates: Genetics and fisheries. *Hydrobiologia* 420: 165-184.
- Tuttle, R. D. & Lindahl, R. 1980. Genetic variability in three co-occurring forms of the genus *Othilia* (Echinaster). *Experientia* 36: 923-925.
- Uthicke, S.; Benzie, J. H. A. & Ballment, E. 1998. Genetic structure of the fissiparous populations of *Holothuria atra* on the Great Barrier Reef. *Marine Biology* 132: 141-151.
- Uthicke, S.; Benzie, J. H. A. & Ballment, E. 1999. Populations genetics of the fissiparous holothurian *Stichopus chloronotus* (Aspidochirotida) on the Great Barrier Reef, Australia. *Coral Reefs* 18: 123-132.
- Uthicke, S.; Connard, C. & Benzie, J. H. A. 2001. Populations genetics of the fissiparous holothurians *Stichopus chloronotus*, and *Holothuria atra* (Aspidochirotida): a comparison between the Torres Strait and La Reunion. *Marine Biology* 139: 257-265.
- Uthicke, S. & Benzie, J. A. H. 2003. Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific. *Marine Biology* 142: 2635-2648.

- Vadas, R. L. & Bristow, G. 1985. Genetic changes associated with bottleneck in an overharvested population of *Glycera dibranchiata* (Polychaeta). In: Gray J. S. & M. E. Christiansen (Eds.), *Marine Biology of Polar Regions and Effects of Stress on Marine Organisms*. John Wiley & Sons, University of Oslo, Norway, Pp. 617-629.
- Vadas, R. L.; Smith, B. D.; Beal, B. & Dowling, T. 2002. Sympatric growth morphs and size biomodality in green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Ecological Monographs* 72(1): 113-132.
- Ventura, C. R. & Barcellos, C. F. 2004. Instantaneous comparison of reproductive and morphological traits of *Paracentrotus gaimardi* (Echinodermata: Echinoidea) along the Brazilian coast. In: Lawrence, J. M. & Gúzman, O. (eds). *Sea urchins: Fisheries and ecology*. Destech publ., Inc., Lancaster, Pennsylvania. Pp. 156-163.
- Waples, R. S. 1987. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. *Evolution* 41: 385-400.
- Waters, J. M. & Roy, M. S. 2004. Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene-flow? *Molecular Ecology* 13: 2797-2806.
- Ward, R. D. & Beardmore, J. A. 1977. Protein variation in sympatric freshwater *Lymnaea peregra* and *L. ovata* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 139-149.
- Weber, L. I. & Galleguillos, R. 1991. Morphometric and electrophoretic evidences for two species of genus *Liopetrolisthes* (Crustacea: Decapoda: Porcellanidae) and some aspects of their variability. *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 100(1): 201-207.

Weir , B. S. & Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.

Williams, S. T. & Benzie J. A. H. 1998. Evidence of a biogeographic break between population of a high dispersal starfish: congruent regions within indo-west pacific defined by colormorphs, mtDNA, and allozymes data. *Evolution* 52: 87-99.

APÊNDICES

Apêndice I- Freqüências genotípicas dos morfotipos de *Paracentrotus gaimardi* analisados.

Itaipu, Niterói – Morfotipo: Castanho			
<i>Locus</i>	Freqüências genotípicas		
<i>α-Est-2</i>	AB=1	BB=6	BC=1
<i>α-Est-3</i>	AA=2	AB=4	BB=8
<i>Cat</i>	AA=5	AB=4	BB=3
<i>Mdh</i>	AA=4	AB=5	BB=10
<i>Pep</i>	AA=11		
<i>Pgi</i>	AA=1	AB=2	BB=7
<i>Pgm</i>	BB=3		
<i>Sod</i>	AA=35		
<i>Xod</i>	AA=11	AB=1	BB=1

Itaipu, Niterói – Morfotipo: Cinza			
<i>Locus</i>	Freqüências genotípicas		
<i>α-Est-2</i>	AA=1	AB=1	
<i>α-Est-3</i>	AA=4	AB=1	
<i>Cat</i>	AA=1	AB=2	BB=1
<i>Mdh</i>	AB=1	BB=3	
<i>Pep</i>	AA=10		
<i>Pgi</i>	AA=1	AB=2	BB=4
<i>Pgm</i>	BB=1		
<i>Sod</i>	AA=13		
<i>Xod</i>	AA=3	AB=3	BB=1

Itaipu, Niterói – Morfotipo: Preto			
Locus	Freqüências genotípicas		
<i>α-Est-2</i>	AA=2	BB=1	BC=2
<i>α-Est-3</i>	AA=2	AB=2	
<i>Cat</i>	AA=3	AB=2	
<i>Mdh</i>	AA=2	AB=1	BB=7
<i>Pep</i>	AA=7		
<i>Pgi</i>	AA=1	BB=8	BC=1
<i>Pgm</i>	BB=1		
<i>Sod</i>	AA=18		
<i>Xod</i>	AA=2	AB=1	

Itaipu, Niterói – Morfotipo: Rosa			
Locus	Freqüências genotípicas		
<i>α-Est-2</i>	AB=2	BB=2	
<i>α-Est-3</i>	AA=2	AB=2	
<i>Cat</i>	AA=2	AB=3	BB=4
<i>Mdh</i>	BB=4	BC=1	
<i>Pep</i>	AA=3		
<i>Pgi</i>	AA=1	BB=5	BC=2
<i>Pgm</i>	AB=3		
<i>Sod</i>	AA=9		
<i>Xod</i>	AA=2	AB=1	

Itaipu, Niterói – Morfotipo: Verde				
<i>Locus</i>	Freqüências genotípicas			
α - <i>Est-2</i>	AB=2	BB=6	BC=3	
α - <i>Est-3</i>	AA=8	AB=4	BB=2	
<i>Cat</i>	AA=2	AB=4	BB=2	
<i>Mdh</i>	AA=4	AB=1	AC=1	BB=16
<i>Pep</i>	AA=19			
<i>Pgi</i>	AB=2	BB=8	BC=2	
<i>Pgm</i>	AA=1	AB=2	BB=3	
<i>Sod</i>	AA=34			
<i>Xod</i>	AA=3	AB=3		

Prainha, Arraial do Cabo – Morfotipo: Castanho				
<i>Locus</i>	Freqüências genotípicas			
α - <i>Est-2</i>	AC=1	BB=6	BC=2	CC=3
α - <i>Est-3</i>	AA=9	AB=7	BB=3	
<i>Cat</i>	AA=5	AB=3		
<i>Mdh</i>	AA=5	AB=1	BB=8	BC=2
<i>Pep</i>	AA=17	AB=1		
<i>Pgi</i>	BB=5	BC=1	CC=1	
<i>Pgm</i>	AA=2	BB=1		
<i>Sod</i>	AA=22			
<i>Xod</i>	AA=8	AB=1		

Prainha, Arraial do Cabo – Morfotipo: Cinza				
Locus	Freqüências genotípicas			
<i>α-Est-2</i>	AA=1	AB=2	BB=2	CC=1
<i>α-Est-3</i>	AA=4	AB=1	BB=1	
<i>Cat</i>	AB=1	BB=3		
<i>Mdh</i>	AB=1	BB=5		
<i>Pep</i>	AA=9			
<i>Pgi</i>	BB=2	BC=2		
<i>Pgm</i>	AA=2			
<i>Sod</i>	AA=9			
<i>Xod</i>	AA=7	AB=1		

Prainha, Arraia do Cabo – Morfotipo: Preto					
Locus	Freqüências genotípicas				
<i>α-Est-2</i>	AA=1	BB=2	BC=1	CC=1	
<i>α-Est-3</i>	AA=2	AB=4	BB=3		
<i>Cat</i>	AA=1	BB=1			
<i>Mdh</i>	AA=1	AB=1	AC=3	BB=3	BC=1
<i>Pep</i>	AA=9	AB=2			
<i>Pgi</i>	AA=1	AB=3			
<i>Pgm</i>	AA=2	AB=1			
<i>Sod</i>	AA=10				
<i>Xod</i>	AA=3	AB=1			

Prainha, Arraial do Cabo – Morfotipo: Rosa			
Locus	Freqüências genotípicas		
α -Est-2	BB=1	BC=1	CC=1
α -Est-3	BB=3		
<i>Cat</i>	AB=1		
<i>Mdh</i>	AB=2	BB=2	BC=1
<i>Pep</i>	AA=5		
<i>Pgi</i>	AB=1	BB=2	BC=1
<i>Pgm</i>	AA=2		
<i>Sod</i>	AA=5		
<i>Xod</i>	AA=4	AB=1	

Prainha, Arraial do Cabo – Morfotipo: Verde			
Locus	Freqüências genotípicas		
α -Est-2	AB=1	BB=2	
α -Est-3	AA=2	AB=2	BB=4
<i>Cat</i>	AA=3	AB=2	BB=5
<i>Mdh</i>	AA=3	AB=1	BB=5
<i>Pep</i>	AA=7	AB=1	
<i>Pgi</i>	AA=1	AB=1	BB=2
<i>Pgm</i>	AA=2		
<i>Sod</i>	AA=16		
<i>Xod</i>	AA=5	AB=2	BB=1

Apêndice II- Freqüências genotípicas das três populações de *Paracentrotus gaimardi* analisadas.

		Itaipu, Niterói			
<i>Locus</i>		Freqüências genotípicas			
α - <i>Est-1</i>	AA=6				
α - <i>Est-2</i>	AA=3	AB=6	BB=15	BC=6	
α - <i>Est-3</i>	AA=18	AB=13	BB=10		
<i>Cat</i>	AA=13	AB=15	BB=10		
<i>Mdh</i>	AA=10	AB=8	AC=1	BB=40	BC=3
<i>Pep</i>	AA=50				
<i>Pgi</i>	AA=4	AB=6	BB=32	BC=10	CC=2
<i>Pgm</i>	AA=1	AB=5	BB=8		
<i>Sod</i>	AA=109				
<i>Xod</i>	AA=21	AB=9	BB=2		

		Prainha, Arraial do Cabo				
<i>Locus</i>		Freqüências genotípicas				
α - <i>Est-1</i>	AA=18					
α - <i>Est-2</i>	AA=2	AB=3	AC=1	BB=13	BC=4	CC=6
α - <i>Est-3</i>	AA=17	AB=14	BB=14			
<i>Cat</i>	AA=9	AB=7	BB=9			
<i>Mdh</i>	AA=9	AB=6	AC=3	BB=23	BC=4	
<i>Pep</i>	AA=47	AB=4				
<i>Pgi</i>	AA=2	AB=5	BB=11	BC=5	CC=1	
<i>Pgm</i>	AA=10	AB=1	BB=1			
<i>Sod</i>	AA=62					
<i>Xod</i>	AA=27	AB=6	BB=1			

		Ferradura, Búzios		
<i>Locus</i>		Freqüências genotípicas		
<i>α-Est-1</i>	AA=12	AB=1		
<i>α-Est-2</i>	AB=3	BB=10	BC=2	CC=2
<i>α-Est-3</i>	AA=10	AB=7	BB=2	
<i>Cat</i>	AA=2	AB=7	BB=1	
<i>Mdh</i>	AA=1	AB=6	BB=7	
<i>Pep</i>	AA=20	AB=4		
<i>Pgi</i>	AA=4	AB=2	BB=7	BC=3
<i>Pgm</i>	AA=3	AB=2	BB=2	
<i>Sod</i>	AA=23			
<i>Xod</i>	AA=12	AB=2		

multitudinous seas incarnadine o oceano oco e regougo a proa abrindo um
 sulco a popa deixando um sulco como uma lavra de lazúli uma cicatriz
 contínua na polpa violeta do oceano se abrindo como uma vulva violeta
 a turva vulva violeta do oceano oinopa ponton cor de vinho ou cor de
 ferrugem conforme o sol batendo no refluxo de espumas o mar multitudinário
 miúdas migalhas farinha de água salina na ponta das maretas esfarelando
 ao vento iris nuntia junonis cambiando suas plumas mas o mar mas a escuma
 mas a espuma mas a espumaescuma do mar recomeçado e recomeçando
 o tempo abolido no verde vário no aquário equóreo o verde flore
 como uma árvore de verde e se vê é azul é roxo é púrpura é iodo é de
 novo verde glauco verde enfestados de azuis e súlfur e pérola e púrpur
 mas o mar mas o mar polifluente se ensafirando a turquesa se abrindo
 deiscente como um fruto que abre e apodrece em roxoamarelo pus de sumo
 e polpa e vurmo e goma e mel e fel mas o mar depois do mar depois do mar
 o mar ainda poliglauco polifosfóreo noturno agora sobre estrelas extremas
 mas liso e negro como uma pele de fera um cetim de fera um macio de
 pantera o mar polipantera torcendo músculos lubrivos sob estrelas
 trêmulas o mar como um livro rigoroso e gratuito como esse livro onde
 ele é absoluto de azul esse livro que se folha e refolha que se dobra
 e desdobra nele pele sob pele pli selon pli o mar poliestentóreo
 também oceano maroceano soprando espondeus homéreos como uma verde
 bexiga de plástico enfunada o mar cor de urina sujo de salsugem e de
 marugem de negrugem e de ferrugem o mar mareado a água gorda do mar
 marasmo placenta plácida ao sol chocada o mar manchado quarando ao
 sol lençol do mar mas agora mas aurora e o liso se reparte sob veios
 vinho a hora poliflui no azul verde e discorre e recorre e corre e
 entrecorre como um livro polilendo-se polilido sob a primeira tinta
 da aurora agora rosício roçar rosa da dedirrósea agora aurora pois
 o mar remora demora na hora na paragem da hora e do novo recolhe sua
 safra de verdes como se águas fossem redes e sua ceifa de azuis como
 se um fosse plus fosse dois fosse três fosse mil verdes vezes verdes
 vide azul mas o mar reverte mas o mar verde mas o mar é-se como o
 aberto de um livro aberto e esse aberto é o livro que ao mar reverte
 e o mar converte pois de mar se trata do mar que bate sua nata de
 escuma se eu lhe disser que o mar começa você dirá que ele cessa se eu
 lhe disser que ele avança você dirá que ele cansa se eu lhe disser
 que ele fala você dirá que ele cala e tudo será o mar e nada será o mar
 o mar mesmo aberto atrás da popa como uma fruta roxa uma vulva frouxa
 no seu mel de orgasmo no seu mal de espasmo o mar gárgulo e gargáreo
 gorjeando gárrulo esse mar esse mar livro esse livro mar marcado e
 vário murchado e flóreo multitudinoso mar purpúreo marúleo mar azúleo e
 mas e pois e depois e agora e se e embora e quando e outrora e mais e
 ademais mareando marujando marlunando marlevando marsoando polúphloisbos

Haroldo de Campos

In Galáxias, 1984, Editora Ex Libris, São Paulo.