

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Variação Gênica Da Espécie *Arbacia Lixula* (Linnaeus, 1758) (Echinodermata: Echinoidea) Em Três Populações Do Litoral Do Estado Do Rio De Janeiro



(Fotografia: Mariana Beauclair)



(Fotografia: Mariana Beauclair)



(Fotografia: Renato Ventura)



(fotografia: ©Pedro)

Ada André Pinheiro

**Rio de Janeiro
2005**

Variação Gênica da Espécie *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) (Echinodermata: Echinoidea) em Três Populações do Litoral do Estado do Rio de Janeiro.

Ada André Pinheiro

Monografia apresentada ao Departamento de Genética, Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Genética.

ORIENTADORES:
EDSON PEREIRA DA SILVA
CARLOS RENATO REZENDE VENTURA

Rio de Janeiro, dezembro de 2005

ADA ANDRÉ PINHEIRO

Variação gênica da espécie *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) (Echinodermata: Echinoidea) em três populações do litoral do Estado do Rio de Janeiro.

Banca Examinadora:

Professora Dra Cláudia Russo
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professora Dra Michelle Klautau
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professor Dr Paulo César de Paiva
Universidade Federal do Rio de Janeiro

FICHA CATALOGRÁFICA

PINHEIRO, ADA ANDRÉ

Variação Gênica da Espécie *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) (Echinodermata: Echinoidea) em três Populações do Litoral do Estado do Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro – RJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Instituto de Biologia, 2005

Monografia: Bacharel em Genética

- | | | |
|---------------------------|---------------|--------------------|
| 1. <i>Arbacia lixula</i> | 2. Echinoidea | 3. Variação gênica |
| 4. Genética de Populações | 5. Aloenzimas | |

As coisas são semelhantes. Isso faz a Ciência possível.
As coisas são diferentes. Isso faz a Ciência necessária.
Levins e Lewontin, 1985

(*In*: The Dialectical Biologist, Harvard University Press)

*Aos meus pais,
em retribuição ao amor incondicional, carinho permanente e liberdade
ampla, geral e irrestrita para escolher meu caminho.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, ao homem que teve mais dificuldade em me lapidar, para aceitar que falar pode ser irrelevante, ou fatal, do que esclarecer o processo evolutivo. Ainda não conseguiu nenhum dos dois, mas está fazendo um bom trabalho! Não agradeço por hoje, mas pelo futuro. Edson, eu cresci muito neste último ano e meio sob sua orientação e considero uma grande vitória a sintonia alcançada apesar das atribulações, mudanças, ansiedade, distância... Obrigada por não “desistir” de mim e por fazer Swansea ficar mais perto do que o Pelourinho. A propósito, o quarto Titã é você.

Ao meu co-orientador Renato Ventura, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À minha mãe, por tornar reais meus sonhos, por investir nas minhas conquistas, por abrir mão de coisas para si própria para me dar este privilégio. Eu valorizo cada gota do seu suor. Por me dar a opção de largar tudo e começar do zero se eu não estivesse feliz. Obrigada por, mesmo de tão longe, dividir os bons e maus momentos. Mãe, cada conquista minha traz você para mais perto de mim, porque você é responsável por elas também.

Pai, obrigada por me aplaudir tanto se eu estivesse num picadeiro como num foguete da NASA, e por valorizar a profissão que eu escolhi como a mais linda do mundo. Por me conduzir a cada obstáculo, pelas preces cheias de fé e amor, pelo apoio nos fracassos, por ser sempre o primeiro abraço nas vitórias. Obrigada por participar dessa luta diária, por entender as ausências, por me ajudar a superar as frustrações e me convencer a ir até o fim, mesmo com saudades, quando eu achei que tinha dado um passo maior do que minhas pernas. Estar de mãos dadas com você me dá segurança para continuar a caminhar, seja lá para onde for.

Liane, você também faz parte desta conquista. Obrigada por me oferecer um lar, para o qual eu pude correr, descansar, me refugiar e esquecer essa cidade maluca. Pela mesa acolhedora, pelas conversas, pelo exemplo de gosto e entrega ao trabalho, e por me dar de brinde uma família, meus $\frac{1}{4}$ irmãos: Olívia, Pedro e João. A vocês, obrigada por bagunçarem minha vida e afastarem o tédio de ser filha única.

À minha “vice-orientadora”, Michelle, um agradecimento muito especial. Por me ensinar a arte da eletroforese, por confiar e tirar as rodinhas rapidamente (mesmo morrendo de medo que eu explodisse o laboratório). Esta monografia também é dedicada a você, só não está na página anterior porque ninguém poderia suportá-la depois. Obrigada por compartilhar o sangue, o suor, as lágrimas e as alegrias desta empreitada.

À Carmen, pela disposição e paciência de parar seu trabalho para voltar no tempo e acompanhar minhas eletros e coletas. Obrigada também pelos bons momentos de descontração, bate-papo e companheirismo. E parabéns por ser a única que conseguiu manter a sanidade mental intacta, mesmo depois de conviver com a atual formação do LGM.

Aos apêndices do LGM e anjos da guarda de seus habitantes, Mariana e Carol. Nenhuma caixa de bombom paga a imensa e providencial ajuda que vocês me deram. Só pessoas especiais conseguem amenizar até mesmo um processo de dissecação. Carol, sua participação nas coletas foi fundamental (“Seu Baleia” que o diga!). Ter tentado matar meus bichos asfixiados foi compensado por não me deixar morrer afogada (ou esfaqueada). Mari, muito

obrigada pelo *book* do meu bicho e por todas as horas muitíssimo agradáveis da sua divertida e tranqüilizante companhia. Você é quase um Lexotan!

À nossa chefe interina, Rosa, pela coragem de assumir o comando do “harém”, com muita dedicação, carinho e um toque de classe. Tem que ser muito “macho” pra estalar o chicote sorrindo, manter tudo sobre controle e ainda ser aplaudida no final. Viva a evolução da autoridade!

Ao Christian, pela sempre animada presença. Você é o único que tem passe livre no “Clube da Luluzinha”.

Ao Sidnei, pela dura jornada de trabalho (motorista, mergulhador, carregador, animador) e ao Evandro, pela boa vontade em ajudar a coletar ouriços num dia chuvoso, numa praia suja, e ainda assim ser extremamente gentil.

Aos professores da Bio UFRJ, que contribuíram, cada um a sua maneira, para a formação da minha nova identidade: - Bióloga, muito prazer!

Aos Professores Antônio Solé-Cava e Helena Lavrado, por deixarem seus afazeres de lado para socorrer uma estranha à deriva, futura geneticista encantada com a biologia marinha, que queria mesmo era voltar pra casa. Obrigada pelo bote salva-vidas no fôlego final.

À Rose e Sol, por sempre resolverem meus problemas burocrático-existenciais e tornarem minha vida menos complicada. Obrigada por não se contentarem em cumprir suas funções “apenas” com eficiência, e acrescentarem doses cavalares de boa vontade e paciência.

Ao Professor Jomar Jota, por despertar em mim a curiosidade pela Ciência, que se tornou paixão. Por me deixar brincar de cientista nos “passeios” do colégio, por me pegar pelo colarinho e me jogar dentro do manguê: - Não quer ser bióloga? Vai se acostumando!

À professora e grande amiga Marlúcia. Primeiro, simplesmente por ser especial. E por acreditar e incentivar seus alunos a correr atrás do que queriam. Quando eu crescer quero ser igual a você!

Aos amigos de todos os meus (muitos) cantos.

À Aline, amiga querida: precisaria de uma página só pra você para agradecer por estes 13 anos. Um agradecimento especial pelo tempo Record de participação mais do que especial nessa minha vida itinerante.

Aos amigos da minha Shangri-La particular, Aldeia Velha: Luis Nelson, Ana Paula, Kleber, Maraylte, Nelsinho e Serginho. E a todas as pessoas que me receberam de braços abertos neste paraíso.

Ao Sr. Luiz (motorista, enfermeiro, secretário, amigo, conselheiro, salva-vidas, anjo da guarda), por ter surgido e me amparado num momento tão difícil. Por pouco este trabalho não sai; pelo muito que o senhor fez ele saiu.

Carlete, Fê, Gabi, Bela, Marie, Vivi: reuniões, confissões, discussões, gargalhadas, desabafos, planos...Ainda preciso agradecer?

Às forças que culminaram na maior concentração de gente boa por metro quadrado que eu já vi: a turma 2000/2 e aos companheiros das experiências transcendentais e (muito) mundanas: Alanis, Glauber, Léo, Thiago, Titi, Lula, Thadeo, Marquito, Mencialha, Maron, Adriana, Amanda, Luis, Flávio, Bia, Ana Paula, Pat, Wellington, Cachaça, Gui, Pocahontas, Mucuna, Izar, Carol.

A todos àqueles que em algum momento tenham feito parte da minha vida e que de alguma forma tenham contribuído para a concepção, desenvolvimento e nascimento deste trabalho: Muito obrigada!

ÍNDICE

Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas	x
Resumo	xi
1 – Introdução	1
1.1 – Eletroforese de aloenzimas e variação genética.....	1
1.2 – Variação genética intrapopulacional	2
1.3 – Variação genética interpopulacional	3
1.4 – A espécie <i>Arbacia lixula</i>	4
2 – Objetivo	6
3 – Material e Métodos.....	7
3.1 – Coleta, transporte e armazenamento das amostras	7
3.2 – Eletroforeses.....	9
3.2.1 – Escolha dos tecidos, enzimas e tampões	9
3.2.2 – Homogeneização	12
3.2.3 – Preparação dos géis	12
3.2.4 – Corrida eletroforética	13
3.2.5 – Revelação dos géis.....	13
3.2.6 – Interpretação do padrão eletroforético	13
3.2.7 – conservação dos géis	13
3.3 – Análise dos dados.....	14
4 – Resultados	16
5 – Discussão.....	22
5.1 – Variação genética intrapopulacional	22
5.2 – Variação genética interpopulacional	25
6 – Conclusão	33
7 – Referências bibliográficas	34

APÊNDICE - Frequências genotípicas das três populações de <i>Arbacia lixula</i> analisadas	41
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Arbacia lixula</i>	5
Figura 2. Localização dos pontos de coleta.....	8
Figura 3. Esquematização do método de eletroforese de aloenzimas	15
Figura 4. Dendrograma UPGMA de identidades gênicas	21

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Pontos de coleta e número de indivíduos coletados	7
Tabela II. Sistemas de tampão testados	9
Tabela III. Enzimas testadas	10
Tabela IV. Frequências alélicas e tamanho amostral por loco	16
Tabela V. Tamanho médio de amostra, número médio de alelos por loco, grau de polimorfismo e heterozigosidades médias para cada população	18
Tabela VI. Heterozigosidades observadas e esperadas por loco	18
Tabela VII. Probabilidades de equilíbrio de Hardy-Weiberg	19
Tabela VIII. Índices de endocruzamento de Wright para todos os locos	19
Tabela IX. Matriz de similaridade gênica	20

RESUMO

O padrão de variação gênica da espécie de ouriço-do-mar *Arbacia lixula* foi investigado em três populações do litoral do Estado do Rio de Janeiro (Praia da Ferradura - Búzios, Prainha - Arraial do Cabo e Ponta de Itaipu - Niterói) através da técnica de eletroforese de aloenzimas. No total, foram amostrados 241 indivíduos para 8 sistemas enzimáticos que forneceram resultados interpretáveis como 10 locos gênicos (α -Est3, *Cat*, *Lap-2*, *Lap-3*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Me*, *Odh*, *Sod* e *Sordh*). Os resultados obtidos indicam altos níveis de variação gênica para esta espécie, porém, compatíveis com o que já foi observado para outros equinodermos. Uma vez aplicada a correção de Bonferroni, a maioria dos locos não apresentou desvios significativos do esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os desvios encontrados foram sempre devidos a um déficit de heterozigotos. A identidade gênica média entre todas as populações foi 0,999 e o número de migrantes por geração, estimado a partir dos valores de F_{ST} , foi elevado (15,38 indivíduos). Apesar dos altos níveis de fluxo gênico e dos elevados valores de identidades gênicas, as três populações de *A. lixula* estudadas neste trabalho apresentaram índice de estruturação significativamente diferente de zero ($F_{ST} = 0,016$; $p < 0,001$). Contudo, esta diferenciação entre as populações não parece estar relacionada com a distância geográfica, uma vez que as populações mais próximas (Prainha e Ferradura) não são aquelas mais similares geneticamente. As populações da Prainha e Itaipu sofrem influência do fenômeno da ressurgência, que está ausente em Ferradura. Estes dados em conjunto (padrão de estruturação das populações estudadas X padrão de influência da ressurgência nos locais amostrados) sugerem que o fenômeno da ressurgência pode ser relevante na determinação do padrão de variação gênica interpopulacional observado, tanto através da simples limitação ao fluxo gênico quanto exercendo alguma pressão seletiva sobre os locos gênicos. Os resultados apresentados representam os primeiros dados referentes à genética de populações deste organismo no litoral brasileiro.

1- INTRODUÇÃO

A constituição genética dos indivíduos, e as leis governando a sua herança, constituem o objeto de estudo da Genética. A genética de populações, por sua vez, está voltada para o estudo dos genótipos de grupos de indivíduos, as populações, e como esta constituição genética pode mudar ao longo das gerações (Silva, 2002b). Como ciência experimental, ela fornece descrições sobre os padrões reais da variação genética das populações. Como ciência teórica, ela faz previsões de quais composições genéticas são esperadas para estas populações e como estas podem mudar como consequência da ação das várias forças evolutivas que podem estar sobre elas operando (Griffiths *et al.*, 2002).

Uma das maneiras para amostragem da variação gênica é a utilização de marcadores moleculares, que são locos gênicos que apresentam alguma variabilidade e, portanto, são informativos para o estudo dos padrões de variação genética. Marcadores moleculares, interpretados sob a luz da genética de populações, podem ser usados para auxiliar na compreensão e conservação da biodiversidade (Solé-Cava, 2001). Dentre os marcadores moleculares, as aloenzimas têm sido amplamente utilizadas em estudos desta natureza.

1.2- Eletroforese de Aloenzimas e Variação Genética

Os estudos de variação gênica podem ser feitos com base nos polimorfismos dos polipeptídeos, devido à correspondência esperada entre seqüências de nucleotídeos no DNA e a seqüência de aminoácidos na proteína por ele codificada, ou seja, entre o gene e o seu produto (Griffiths *et al.*, 2002).

A técnica mais comum para distinguir diferentes alelomorfos de uma mesma enzima é a eletroforese em gel, que baseia-se na mudança de propriedades físico-químicas da enzima quando um aminoácido é substituído. A eletroforese pode ser definida, de maneira geral, como a migração de partículas carregadas sob a ação de uma corrente elétrica (Richardson *et al.*, 1986). Proteínas com cargas elétricas diferentes irão manifestar diferentes

mobilidades eletroforéticas e o padrão de bandas obtido pode ser interpretado como uma herança mendeliana simples.

A eletroforese de aloenzimas é, reconhecidamente, um dos métodos mais eficazes na detecção e amostragem de variação gênica (Silva, 2002b). Desde que foi introduzido a partir dos trabalhos de Harris (1966) com a espécie humana e de Hubby e Lewontin (1966) e Lewontin e Hubby (1966) com *Drosophila*, o método tem sido usado extensivamente para descrever a variação presente nas populações naturais e vem obtendo sucesso em estudos de genética marinha.

Estudos dessa natureza incluem questões tão variadas quanto: identificação de espécies crípticas e reavaliação da biodiversidade nominal (Lazoski *et al.*, 2001); investigação das relações entre modo de reprodução, dispersão e fluxo gênico (Russo *et al.*, 1994); entendimento dos padrões de recrutamento e estrutura familiar (Grosberg e Quinn, 1986); identificação de barreiras biogeográficas potenciais (Waters e Roy, 2004) e, até mesmo, detecção e acompanhamento de processos de bioinvasão (Müller *et al.*, 2001).

1.3- Variação genética intrapopulacional

A descrição mais simples da variação genética é a frequência de distribuição dos alelos alternativos ou dos genótipos em uma população. As frequências alélicas descrevem a quantidade de variação existente, enquanto as frequências genotípicas mostram como essa variação encontra-se distribuída entre seus membros (Purves *et al.*, 2002).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg é o modelo básico da Genética de populações (Griffiths *et al.*, 2002) e pode ser definido como a estabilidade nas frequências alélicas e a equidistribuição genotípica ao longo de sucessivas gerações. O equilíbrio garante a manutenção da variabilidade genética de uma população, uma vez que os organismos sejam diplóides, a reprodução sexuada e os cruzamentos ao acaso, bem como utiliza a hipótese nula de “inércia” da variação (Klaczko, 1990), ou seja, pressupõe a ausência de qualquer força evolutiva atuando (mutação, migração, deriva e seleção). Desvios das frequências previstas indicam que fatores coordenados podem estar operando para produzir associações não aleatórias dos alelos (Futuyma, 2002).

Muitos estudos têm se dedicado a descrever a variação gênica intrapopulacional em invertebrados marinhos desde a década de 1970. Nestes estudos ficou demonstrado, por exemplo, que os níveis de polimorfismo são, geralmente, altos (Vadas e Bristow, 1985; Magaya *et al.*, 1995; Benzie e Williams, 1997; Uthickie *et al.*, 1998; Manchenko *et al.*, 2000; Moberg e Burton, 2000; Holland, 2001; Ball e Chapman, 2003).

Estes altos níveis de variação gênica podem ser explicados tanto por modelos selecionistas (Levinton, 1973 e 1975; Gillespie, 1974), que buscam correlações entre fatores ambientais e frequências gênicas, quanto neutralistas (Kimura, 1968 e 1983; Ohta, 1974), que correlacionam os níveis de variação gênica ao balanço entre as forças de mutação e deriva genética. Tais explicações de ambas as correntes estão presentes nos estudos em genética marinha (Waples, 1987; Matsuoka e Nakamura, 1990; Johannesson *et al.*, 1995; Schmidt e Rand, 2001), contudo, mais recentemente, nos estudos sobre variação gênica assume-se o neutralismo como hipótese nula, embora, ainda, em muitos casos, a discussão volte ao centro (Solé-Cava e Thorpe, 1991; Skibinski, 2000).

1.4 - Variação genética interpopulacional

O fluxo gênico entre populações de diferentes regiões geográficas pode impedir que pressões seletivas ou variações aleatórias estabeleçam e mantenham diferenças genéticas locais (Scheltema e Williams, 1983; Slatkin, 1987). As diferenças nas frequências gênicas e/ou genotípicas serão tão mais significativas quanto mais limitada for a migração entre as populações, inibindo assim a homogeneização (Silva, 2002a).

A migração está, geralmente, associada à capacidade de dispersão dos organismos. Em organismos marinhos a dispersão está relacionada tanto com fatores externos, como correntes e ondas, como também reflete características intrínsecas à espécie, como modo de reprodução, tempo de viabilidade de gametas, larvas e indivíduos na coluna d' água (Solé-Cava *et al.*, 1992; Silva, 2002a).

A larva pelágica é um potente meio de dispersão entre populações co-específicas de organismos marinhos (Hedgecock, 1986), principalmente para os sedentários na vida adulta. Espera-se, então, que organismos que possuam

fase larvar planctônica apresentem maiores níveis de fluxo gênico do que espécies com menor capacidade dispersiva (Waples, 1987). Nem sempre, no entanto, esta relação é diretamente proporcional.

A aparente homogeneidade do ambiente marinho pode ocultar barreiras capazes de interceptar o movimento das larvas e influenciar o padrão de dispersão e recrutamento das espécies (Debenham *et al.*, 2000; Silva 2002b) como, por exemplo, o fenômeno da ressurgência, com suas alterações físico-químicas (salinidade, temperatura, turbidez e etc.) e bióticas (aumento da produtividade em toda a cadeia alimentar) (Valentin e Moreira, 1978; Coutinho *et al.*, 1989). Tal fenômeno, em algumas circunstâncias, pode ocasionar processos de diferenciação populacional, como já foi observado em alguns locais (Laudien *et al.*, 2003; Waters e Roy, 2004).

Populações naturais de uma diversidade de invertebrados marinhos têm revelado uma substancial diferenciação genética em diversas espécies que aparentam ter alta capacidade de dispersão (Marcus, 1977; Burton, 1983; Johnson e Black 1984a e 1984b; Smith 1988; Grant *et al.* 1992; Benzie e Williams, 1997; Schmidt e Rand, 2001; Laudien *et al.* 2003; Waters e Roy, 2004). Alguns destes estudos ilustram as conseqüências genéticas da ação de barreiras biogeográficas à dispersão larvar (Benzie e Williams, 1997), enquanto outros retratam o resultado de restrições ambientais sobre a sobrevivência e reprodução diferencial dos imigrantes (Johnson e Black 1984a e 1984b).

1.5- A Espécie *Arbacia lixula*

Os equinóides regulares comumente conhecidos como “ouriços-do-mar” (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA) são equinodermos bentônicos de movimentos livres que apresentam grandes densidades populacionais e são importantes consumidores das regiões costeiras de águas rasas mundiais (Black *et al.*, 1984). Desempenham um papel chave na dinâmica das comunidades bentônicas (Ruppert e Barnes, 1996), uma vez que são capazes de alterar profundamente a arquitetura do substrato e a estrutura da comunidade residente nos ecossistemas de substrato consolidado (Lawrence, 2001; Tavares, 2004). Além da reconhecida importância ecológica, algumas espécies são de grande interesse comercial (Thorpe *et al.*, 2000; Lawrence,

2001), possuindo um alto valor no mercado como recurso pesqueiro e a utilização de seus esqueletos para fins artesanais (Zama, 2005).

A espécie *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) é exclusivamente litorânea, encontrada principalmente em substrato rochoso no sublitoral até cerca de 50m de profundidade (Tommasi, 1966). Ocorre ao longo da costa atlântica da América do Sul (da Venezuela até a foz do Rio Prata, Uruguai), no Mediterrâneo, na costa africana, nas Ilhas Canárias, Madeira e Açores (Tommasi, 1966; Giordano, 1986). Suas dimensões são consideradas medianas. A coloração da carapaça e dos espinhos é marrom escura, com tons que variam do avermelhado ao negro. Os espinhos são longos e finos com a extremidade esbranquiçada (Giordano, 1986).

Apesar de ser freqüente no litoral brasileiro e um dos mais importantes consumidores do hábitat sublitoral (Tavares *et al.*, 2004), a espécie *Arbacia lixula* é muito pouco estudada no Atlântico Sul.

Neste trabalho, o padrão de variação gênica da espécie *Arbacia lixula* foi estudado em três populações, perfazendo um total de 150 Km da costa do Estado do Rio de Janeiro. Os pontos estudados incluem áreas afetadas pelo fenômeno da ressurgência, que ocorre na região de Cabo Frio, bem como uma área protegida da influência desse fenômeno. Os resultados apresentados representam os primeiros dados referentes à genética de populações deste organismo no litoral brasileiro.

A classificação e um exemplar da espécie estão ilustrados a seguir:

Filo **Echinodermata**
Classe **Echinoidea**
Subclasse **Euechinoidea**
Ordem **Phymosomatoida**
Família **Arbaciidae**
Gênero ***Arbacia***
Espécie ***Arbacia lixula***



Figura 1: *Arbacia lixula*
(Foto: Mariana Beauclair)

2- OBJETIVO

Fornecer estimativas da variabilidade genética intrapopulacional (heterozigosidade, número efetivo de alelos, grau de polimorfismo) e interpopulacional (índices de estruturação, identidades gênicas, fluxo gênico) de três populações da espécie *A. lixula* na costa do Estado do Rio de Janeiro.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- COLETA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Espécimes de *Arbacia lixula* foram coletados entre os dias 07 e 19 de Janeiro de 2005 em três pontos no Estado do Rio de Janeiro (Ferradura – Búzios; Ponta de Itaipu - Niterói; Prainha - Arraial do Cabo; Figura 2) totalizando 250 indivíduos (Tabela I). Para tanto, foi utilizado o mergulho livre. Os animais foram encontrados em profundidades entre 2 e 4 metros.

Os indivíduos foram transportados dos locais de coleta até o laboratório acomodados em um recipiente com água do mar, ao qual foi acoplada uma bomba motora de oxigenação, sendo mantidos vivos até o momento da dissecação. Nesse processo foram extraídos os tecidos do intestino, gônadas e músculo da lanterna de Aristóteles para a realização de testes de atividade enzimática. Todos os tecidos foram mantidos a -20°C, como é feita a armazenagem e a conservação das amostras para eletroforese.

Tabela I: Pontos de coleta de *A. lixula* no Estado do Rio de Janeiro, abreviações utilizadas e número de indivíduos coletados.

LOCAIS DE COLETA	ABREVIATURA	N	LATITUDE	LONGITUDE
Itaipu	ITA	98	22°59'S	43°04'W
Prainha	PRA	85	22°57'S	42°00'W
Ferradura	FER	67	22°45'S	41°53'W



Figura 2: Localização dos pontos de coleta de *Arbacia lixula* (adaptado de Google maps).

3.2- Eletroforeses

3.2.1 Escolha dos tecidos, enzimas e tampões

Foram realizados experimentos fatoriais do tipo “tecido X enzima X tampão” para a determinação das melhores condições experimentais de cada enzima.

Foram testados 4 sistemas de tampão (Tabela II) para 30 sistemas enzimáticos (Tabela III) e três tecidos (músculo da lanterna, gônada e intestino).

Tabela II: Sistemas de tampão testados.

Tampão	Protocolo		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 e 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 (TlOH)	Hidróxido de lítio 2,51 g Ácido bórico 18,55 g Água destilada 1,0 L (pH 8,0)	Trizma base 3,63 g Ácido cítrico 1,05 g Água destilada 1,0 L (pH 8,0)	Selander <i>et al.</i> , 1971

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

Enzima	Abrev.	Nº E.C.	Nº sub.*	Nº <i>loci</i>
Aconitase	Acon	4.2.1.3	1	-
Aminopeptidase da Leucina	Lap	3.4.1.1	1	2
Catalase	Cat	1.11.1.6	4	1
Desidrogenase do fosfogliconato	Pgd	1.1.4.4	2	-
Desidrogenase do α glicerofosfato	α -Gpd	1.1.1.8	2	-
Desidrogenase da glucose 6 fosfato	G6pd	1.1.1.49	2	-
Desidrogenase do glutamato	Gdh	1.4.1.3	1 / 2	-
Desidrogenase do isocitrato	Idh	1.1.1.42	2	-
Desidrogenase do lactato	Ldh	1.1.1.27	4	-
Desidrogenase do malato	Mdh	1.1.1.37	2	2
Desidrogenase do octanol	Odh	1.1.1.1	2	1
Desidrogenase do sorbitol	Sordh	1.1.1.14	4	1
Desidrogenase da xantina	Xdh	-	-	-
Dismutase de superóxido	Sod	1.15.1.1	1	1
Enzima málica	Me	1.1.1.40	4	1
Esterase, alfa	α -Est	3.1.1.1	1	1

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

Enzima	Abrev.	Nº E.C.	Nº sub.*	Nº <i>loci</i>
Fosfatase ácida	<i>Acp</i>	3.1.3.2	1 / 2	-
Fosfoglicomutase	<i>Pgm</i>	2.7.5.1	1	-
Fumarase	<i>Fum</i>	4.2.1.2	4	-
Glioxalase	<i>Gox</i>	1.1.3.1	4	-
Glutathiona redutase	<i>Gsr</i>	1.6.4.2	2	-
Hexoquinase	<i>Hk</i>	2.7.1.1	1	-
Isomerase da glicose-6-fosfato	<i>Pgi</i>	5.3.1.9	2	-
Isomerase da Mannose - 6 – fosfato	<i>Mpi</i>	5.3.1.8	1	-
Oxidase do Aldeído	<i>Aldox</i>	1.2.3.1	1	-
Oxidase da xantina	<i>Xod</i>	1.2.3.2	2	-
Peptidase (gly phe)	<i>Pep</i>	3.4.11. 1	2	-
Peptidase (pro phe)	<i>Pep</i>	3.4.11. 1	2	-
Quinase da Creatina	<i>Ck</i>	2.7.3.2	2	-
Quinase do Adenilato	<i>Ak</i>	2.7.4.3	1	-

Para Subunidades: - = não conhecida; 1 = monomérica; 2 = dimérica; 4 = tetramérica.

3.2.2- Homogeneização

Pequenas quantidades de amostra do tecido congelado de cada indivíduo foram colocadas em uma placa de acrílico perfurada e, então, maceradas com um bastão de vidro para a lise das células e liberação das enzimas. Para retardar ao máximo a proteólise e a desnaturação das enzimas, todo o processo foi realizado de forma rápida, em ambiente refrigerado e com a placa de acrílico mantida sobre gelo.

Retângulos de aproximadamente 2 x 15 mm de papel de filtro (Whatman 3 MM) foram mergulhados nos homogeneizados e, logo em seguida, aplicados nos géis.

3.2.3- Preparação dos Géis

O gel suporte para a eletroforese foi feito de amido a uma concentração de 12,5% (27,5g de amido em 220ml de tampão). A solução de amido foi levada ao fogo até fervura e em seguida submetida ao vácuo para evitar a formação de bolhas. A solução foi derramada sobre uma placa de vidro, limitada nas bordas por um espaçador de acrílico de 6mm de altura, sendo imediatamente coberta com uma segunda placa de vidro. Após ser resfriado à temperatura ambiente, o gel foi levado à geladeira para atingir a temperatura e consistência ideais para a corrida, permanecendo aí durante a homogeneização do tecido, até o momento da aplicação das amostras.

Após a preparação dos tecidos, o gel foi retirado da geladeira, desenformado e cortado acerca de 3 cm a partir da sua borda inferior, sendo dividido em duas partes desiguais separadas ainda sobre a placa de vidro. As amostras dos indivíduos de cada uma das três populações foram colocadas verticalmente, lado a lado, na parte maior do gel que foi, então, remontado, pressionando-se a parte menor de encontro a maior e reencaixando o espaçador em sua posição original. Uma gota de solução de azul de bromofenol foi aplicada em cada lateral do gel como marcador de avanço da corrida. O gel foi, então, colocado em uma cuba horizontal para a corrida eletroforética.

3.2.4- Corrida eletroforética

As corridas eletroforéticas foram realizadas com as cubas dentro de geladeira, a uma temperatura de 5°C. Para o tampão TC8, a potência foi mantida na faixa entre 2.400 a 2.800 mW, variando o tempo de corrida entre 5 e 7 horas. Para o tampão TLiOH, a potência utilizada foi mantida entre 3.000 a 3.500 mW, e o tempo de corrida variou entre 7 e 9 horas.

Ao final da corrida, os papéis de filtro, os excessos das laterais, da frente de corrida e da parte anódica foram descartados e a lateral superior direita do gel marcada com um corte para indicar o último indivíduo. O gel foi então fatiado numa mesa de fatiamento fixa retangular de acrílico, que possui um fio de aço orientado diagonalmente. Foram produzidas 5 ou 6 fatias horizontais, das quais as duas externas foram descartadas, devido à má resolução das enzimas nas mesmas.

3.2.5- Revelação

As fatias foram colocadas individualmente em placas de acrílico e, posteriormente, foram adicionadas as soluções apropriadas para a revelação de cada enzima, conforme Harris e Hopkinson (1978) e Richardson *et al.* (1986).

3.2.6- Interpretação do Padrão Eletroforético

Os padrões de bandas resultantes da revelação foram interpretados e desenhados em papel pautado. As bandas foram interpretadas mendelianamente, de maneira conservadora e de acordo com as estruturas conhecidas para cada sistema enzimático em questão (Harris e Hopkinson, 1978; Richardson *et al.*, 1986). Os alelos foram classificados de acordo com sua mobilidade eletroforética anódica, sendo o alelo mais rápido designado de “a”, o segundo mais rápido de “b”, e assim por diante. Uma representação do método está ilustrado na Figura 3.

3.2.7- Conservação dos Géis

Após a interpretação, os géis foram fixados e secos para arquivamento. O processo de fixação consistiu em manter as fatias do gel em soluções fixadoras durante 24 horas. As fatias reveladas com as enzimas desidrogenases (*Mdh*,

Odh, *Sod*, *Sordh* e *Me*) foram mantidas em uma solução de ácido acético a 7%. Já as fatias reveladas com as demais enzimas (*Cat*, *α-Est* e *Lap*) foram mantidas em solução “5:5:1” (5 partes de metanol, 5 de água destilada e 1 de ácido acético). Após esse período as fatias foram embebidas glicerol a 5% por mais 24 horas no mínimo (Numachi, 1981). Em seguida, foram etiquetadas e embaladas entre duas folhas de papel celofane, embebidas na mesma solução de glicerol, sendo deixadas para secar à temperatura ambiente. Depois de secos, os géis foram arquivados.

3.3-Análise dos Dados

A partir dos dados originais das frequências genotípicas observadas, (Apêndice), foram investigados problemas básicos da Genética de Populações. Todos os cálculos foram realizados usando os programas BIOSYS (Swofford e Selander, 1997).

O nível de significância para os valores de P obtidos a partir do teste do qui-quadrado para a conformidade ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foram corrigidos com a técnica de Bonferroni (Rice, 1989).

$$P = \alpha/k$$

Onde:

α = nível de significância e,

k = número de testes realizados.

A significância dos Índices de fixação de Wright foi testada por qui-quadrado (χ^2) segundo Waples (1987):

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

e

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

Onde:

N = número total de indivíduos

k = número de alelos no loco

s = número de populações

A partir dos valores de F_{ST} foi possível obter uma estimativa do fluxo gênico ($N_e m$), que é o número médio de migrantes trocados entre populações a cada geração:

$$N_e m = (1/F_{ST}) - 1 / 4$$

1) POPULAÇÃO NATURAL



2) INDIVÍDUO



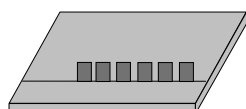
3) AMOSTRA DE TECIDO DO INDIVÍDUO



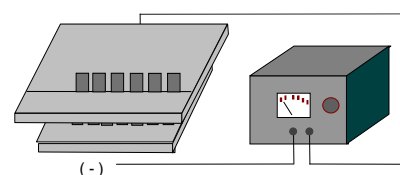
4) HOMOGENEIZADO



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

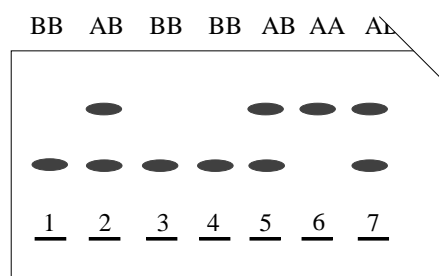


Figura 3: Resumo do método de eletroforese de aloenzimas (adaptado de Silva, 2002a).

4- RESULTADOS

Ao final dos testes, oito sistemas enzimáticos apresentaram atividade interpretável para dois dos quatro sistemas de tampão testados, de tal forma: *Cat*, *Lap*, *Odh*, *Sod* e *Sordh* para o tampão TLiOH e α -*Est*, *Mdh* e *Me* para o tampão TC-8. Dentre os tecidos testados, o intestino foi aquele para o qual as enzimas apresentaram melhor atividade.

De acordo com estas condições, foram analisados geneticamente 241 indivíduos de três populações de *Arbacia lixula* ao longo do litoral do Estado do Rio de Janeiro. Os oito sistemas enzimáticos analisados foram interpretados como dez locos gênicos, sendo, à exceção da *Sod*, todos polimórficos. As enzimas *Mdh* e *Lap* apresentaram dois locos gênicos cada uma. As frequências gênicas para todos os locos em todas as populações estudadas, bem como os respectivos tamanhos de amostra utilizados, encontram-se na tabela IV.

A média de alelos por população oscilou de 2,7 (Ferradura) a 2,9 (Itaipu). A porcentagem de locos polimórficos encontrada nas populações estudadas foi igual a 90%. As heterozigosidades observadas variaram de 0,331 (Prainha) a 0,381 (Itaipu), com média para todas as populações igual a 0,354 (Tabela V). A maior heterozigosidade esperada por loco foi para a enzima *Mdh*-2 na população de Ferradura ($H_e = 0,692$ – Tabela VI).

A maioria dos locos resultou estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni, com exceção dos locos *Odh* e *Mdh*-1 para a população da Prainha e *Lap*-3 para a população da Ferradura (Tabela VII). Em todos os casos, os desequilíbrios encontrados foram devidos a déficit de heterozigotos.

A média dos F_{ST} para todos os locos foi 0,016 (Tabela VIII), valor significativamente diferente de zero ($p < 0,001$). O número de migrantes por geração, estimado a partir dos valores de F_{ST} , foi de 15,38 indivíduos.

A identidade gênica média entre todas as populações foi 0,999. A maior identidade gênica obtida foi igual a 1,000, entre as populações de Itaipu e Prainha e Itaipu e Ferradura; enquanto a menor foi igual a 0,997 entre as populações da Prainha e Ferradura (Tabela IX e Figura 3).

Tabela IV: Frequências alélicas e tamanho amostral para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura.

Loco*	População		
	Itaipu	Prainha	Ferradura
<i>Cat</i>			
A	0,231	0,081	0,152
B	0,731	0,838	0,712
C	0,038	0,081	0,136
N	39	37	33
<i>α-Est-3</i>			
A	0,104	0,078	0,174
B	0,557	0,603	0,500
C	0,245	0,241	0,244
D	0,094	0,078	0,081
N	53	58	43
<i>Lap-2</i>			
A	0,143	0,050	0,063
B	0,714	0,825	0,875
C	0,143	0,125	0,063
N	7	20	8
<i>Lap-3</i>			
A	0,539	0,469	0,452
B	0,461	0,531	0,548
N	38	49	21
<i>Mdh-1</i>			
A	0,019	0,000	0,000
B	0,037	0,031	0,038
C	0,907	0,888	0,910
D	0,037	0,082	0,051
N	54	49	39

Tabela IV: Frequências alélicas e tamanho amostral para as populações de Itaipu, Prainha e Ferradura (continuação).

Loco*	População		
	Itaipu	Prainha	Ferradura
<i>Mdh-2</i>			
A	0,167	0,160	0,346
B	0,417	0,440	0,346
C	0,375	0,380	0,308
D	0,042	0,020	0,000
N	24	25	13
<i>Me</i>			
A	0,080	0,083	0,214
B	0,740	0,861	0,714
C	0,180	0,056	0,071
N	25	18	7
<i>Odh</i>			
A	0,159	0,058	0,214
B	0,727	0,712	0,714
C	0,114	0,231	0,071
N	22	26	21
<i>Sod</i>			
A	1,000	1,000	1,000
N	47	46	47
<i>Sordh</i>			
A	0,684	0,667	0,821
B	0,316	0,333	0,179
N	19	12	14

*O código de abreviação das enzimas encontra-se na tabela III;

N = tamanho da amostra.

Tabela V: Tamanho médio de amostra, número médio de alelos por *locus*, grau (%) de polimorfismo e heterozigosidades médias observadas e esperadas (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	32,8 (± 5,0)	2,9 (± 0,3)	90,0	0,381 (± 0,079)	0,417 (± 0,062)
Prainha	34,0 (± 5,0)	2,8 (± 0,3)	90,0	0,331 (± 0,075)	0,369 (± 0,061)
Ferradura	24,6 (± 4,7)	2,7 (± 0,3)	90,0	0,351 (± 0,082)	0,396 (± 0,069)
Média todas as pops	30,47	2,8	90,0	0,354	0,394

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

** Estimativa não-viciada (Nei, 1978)

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

LOCAL	<i>Cat</i>		<i>Est-3</i>		<i>Lap-2</i>		<i>Lap-3</i>		<i>Mdh-1</i>		<i>Mdh-2</i>		<i>Me</i>		<i>Odh</i>		<i>Sordh</i>	
	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	0,231	0,417	0,717	0,616	0,517	0,484	0,342	0,504	0,185	0,175	0,792	0,670	0,4000	0,422	0,364	0,443	0,211	0,444
PRA	0,243	0,289	0,741	0,570	0,250	0,309	0,531	0,503	0,102	0,206	0,640	0,649	0,278	0,256	0,192	0,446	0,333	0,464
FER	0,455	0,458	0,767	0,661	0,250	0,242	0,143	0,508	0,128	0,169	0,692	0,692	0,571	0,473	0,286	0,449	0,214	0,304

ITA = Itaipu; PRA = Prainha; FER = Ferradura

H_{obs} = Heterozigosidade observada; H_{esp} = Heterozigosidade esperada

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

Loco	Populações		
	Itaipu	Prainha	Ferradura
<i>Cat</i>	0,003	0,194	0,133
<i>α-Est-3</i>	0,176	0,019	0,236
<i>Lap-2</i>	0,849	0,412	0,994
<i>Lap-3</i>	0,045	0,701	0,001*
<i>Mdh-1</i>	0,998	0,000*	0,008
<i>Mdh-2</i>	0,043	0,665	0,780
<i>Me</i>	0,024	0,947	0,849
<i>Odh</i>	0,256	0,000*	0,040
<i>Sordh</i>	0,018	0,303	0,223

* Significativo após correção de Bonferroni ($\alpha = 0,0019$)

Tabela VIII - Índices de endocruzamento de Wright para todos os locos polimórficos.

Loco	F_{is}	F_{it}	F_{st}
CAT	0,191 ***	0,208	0,022 ***
<i>α-Est-3</i>	-0,217 **	-0,210	0,006 ns
<i>Lap-2</i>	-0,097 ns	-0,073	0,022 ns
<i>Lap-3</i>	0,319 *	0,322	0,006 ns
<i>Mdh-1</i>	0,238 *	0,240	0,003 ns
<i>Mdh-2</i>	-0,085 ns	-0,068	0,016 ns
<i>Me</i>	-0,135 ns	-0,102	0,029 ns
<i>Odh</i>	0,357 *	0,370	0,020 ns
<i>Sordh</i>	0,352 ***	0,368	0,024 ns
Média	0,078*	0,093	0,016*

*p < 0.001; **p < 0.005; ***p < 0.05; ns = não significativo.

Tabela IX: 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	****	1,000	1,000
Prainha	0,000	****	0,997
Ferradura	0,000	0,003	****

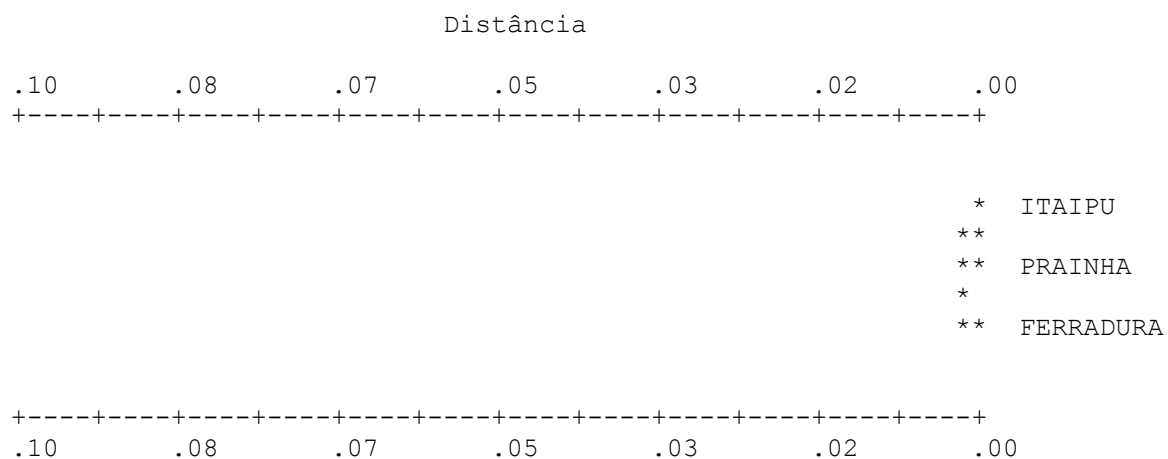


Figura 4: Dendrograma de UPGMA de distâncias genéticas das três populações de *A. lixula* estudadas.

5- DISCUSSÃO

5.1- Variação genética intrapopulacional

Os resultados obtidos neste trabalho indicam altos níveis de variação gênica para a espécie *Arbacia lixula*, contudo, compatíveis com os dados encontrados normalmente para invertebrados marinhos. Por exemplo, elevadas heterozigosidades foram observadas para os gastrópodes *Cerithium caeruleum*, *C. scabridum* (H média = 0.64 e 0.62, respectivamente; Ritte e Pashtan, 1982) e *Haliotis tuberculata* (H entre 0.24 e 0.34; Magaya *et al.*, 1995); para o poliqueta *Glycera dibranchiata* (H entre 0.173 e 0.322; Vadas e Bristow, 1985); para as espécies de mexilhão *Perna canaliculus* (H entre 0,263 e 0,347; Smith, 1988) e *P. perna* (H média = 0.83; Holland, 2001); para o bivalve *Tridacna maxima* (H média = 0.39; Benzie e Williams, 1997); para a anêmona *Anthopleura orientalis* (H média = 0.250; Manchenko *et al.*, 2000); e para os crustáceos *Penaeus monodon* (H média = 0.78; Supungul *et al.*, 2000) e *Litopenaeus setiferus* (H média = 0.59; Ball e Chapman, 2003).

Os trabalhos com equinodermos revelam padrões semelhantes, como visto para *Holoturia atra* (H = 0,410 e 0,420, Uthickie *et al.*, 1998 e 2001, respectivamente) e *Stichopus chloronotus* (H = 0,360 e 0,190, Uthickie *et al.*, 1999 e 2001, respectivamente) da classe Holoturoidea; *Linckia laevigata* (H = 0,360, Williams e Benzie, 1998), *Asterina pectinifera* (H = 0,120, Matsuoka e Asano, 2003) e *Coscinasterias tenuispina* (H = 0,330, Pazoto, 2004) da classe Asteroidea; e, ainda, *Strongylocentrotus nudus*, *S. intermedius* e *S. pallidus* (H = 0,130, 0,240 e 0,240, respectivamente; Manchenko e Yakovlev, 2001), *S. franciscanus* (H = 0,340; Moberg e Burton, 2000) e *Paracentrotus gaimardi* (H = 0,228; Duarte, 2005), da classe Echinoidea.

Os modelos que tentam explicar a alta variabilidade gênica encontrada em invertebrados marinhos se baseiam tanto na ação da seleção natural quanto de fatores estocásticos (Solé-cava e Thorpe, 1991). Segundo as previsões selecionistas o polimorfismo estaria relacionado à aptidão dos organismos em perceber e responder a um gradiente de variação ambiental, no tempo e no espaço (Gillespie, 1974; Nevo, 1978). O argumento neutralista, por sua vez, considera que os altos níveis de variação são produto da relação entre

tamanho efetivo de população e a taxa de mutação (Kimura, 1983). Todavia, na ausência de estudos que integrem aspectos bioquímicos, ecológicos e genéticos desta espécie, é preferível evitar as afirmações sobre a natureza exata dos mecanismos mantenedores dos níveis de variação observados nas populações estudadas de *A. lixula*.

A maioria dos locos resultou estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni, porém, os três casos de desequilíbrio encontrados correspondem a um número maior do que o esperado por acaso (1,35). Não foi observado um padrão específico como, por exemplo, um desequilíbrio do mesmo loco em todas as populações, que poderia ser atribuído a algum fenômeno de natureza direcional. Nos três casos, os desequilíbrios foram devidos aos déficits de heterozigotos, um fenômeno comumente registrado em invertebrados marinhos (Zouros e Foltz, 1984; Volckaert e Zouros, 1989; Andrade *et al.*, 2005), incluindo equinodermos (Mladenov e Emson, 1990; Moberg e Burton, 2000; Addison e Hart, 2004).

Não existe um consenso no que diz respeito aos mecanismos geradores do déficit de heterozigotos em invertebrados marinhos (Boyer, 1974; Colgan, 1981; Borsa *et al.*, 1991). De modo geral, a explicação para o fenômeno é feita caso a caso, analisando-se a adequação das várias hipóteses possíveis aos resultados obtidos. As hipóteses explicativas podem estar relacionadas com o rompimento dos pressupostos da lei de Hardy-Weiberg (alelos nulos, aneuploidias, endocruzamento, efeito Wahlund e seleção natural) ou com artefatos da técnica (baixa resolução das eletroforeses).

Possíveis erros de interpretação dos padrões de bandejamento, devido à baixa resolução das eletroforeses, parece uma possibilidade pouco provável por dois motivos: primeiro porque este fenômeno tem sido freqüentemente observado em outras espécies de invertebrados marinhos, mesmo quando outras técnicas moleculares são utilizadas (Hare *et al.*, 1996; Supungul, *et al.*, 2000; Ball e Chapman, 2003). Segundo, erros de interpretação, em favor dos homozigotos, provavelmente gerariam um padrão constante, com desvios nos mesmos locos em todas as populações. Entretanto, neste estudo, os déficits de heterozigotos ocorreram em diferentes locos para diferentes populações.

Mutações gênicas e cromossômicas também podem gerar um aparente excesso de homozigotos. Indivíduos heterozigotos com um alelo nulo ou

aneuplóides (hemizigotos) apresentarão um padrão eletroforético semelhante ao de homozigotos. No entanto, a proporção de indivíduos portadores de alelos não funcionais para enzimas fundamentais ao metabolismo ou aneuplóides deve ser pequena, devido à desvantagem desses indivíduos em relação aos demais (Russo, 1991). Toda vez que foram observados, tanto em populações naturais quanto em cruzamentos de laboratório, os alelos nulos apresentavam uma baixa frequência (Raymond *et al.*, 1997). A aneuploidia ocorre na fase embrionária e, normalmente, é letal. Apesar de já terem sido encontrados aneuplóides em outros invertebrados marinhos (Gaffney, 1990; Jacobi *et al.*, 1990), não há casos de aneuploidias reportados na literatura para equinodermos (Lénárt *et al.*, 2005).

O endocruzamento aumenta a homozigose nas populações (Futuyma, 2002). No entanto, a biologia reprodutiva de *Arbacia lixula*, que apresenta fertilização externa pela liberação de gametas na massa d'água e possuem larvas planctônicas, não favorece esta hipótese. Também seria esperado que o endocruzamento causasse déficit de heterozigotos em todos, ou pelo menos na maioria dos locos, e não apenas em alguns (Zouros *et al.*, 1988).

O déficit de heterozigotos pode ser resultado da inclusão numa única amostra de indivíduos oriundos de subpopulações com composições genéticas diferentes, fenômeno conhecido como “efeito Wahlund”, que pode ser de caráter espacial ou temporal (Boyer, 1974; Borsa *et al.*, 1991). O efeito Wahlund espacial seria consequência da amostragem de indivíduos provenientes de subpopulações de diferentes áreas. O efeito Wahlund temporal, por sua vez, decorreria da amostragem de diferentes *coortes*. As populações naturais podem ser compostas de várias classes de idades, com diferentes composições genéticas em função da deriva genética ou da seleção natural diferenciada ao longo dos anos, ou ainda, ser produto de vários eventos de recrutamento, determinados por mudanças cíclicas de regimes de ventos e correntes. As populações de *Arbacia lixula* amostradas podem ser compostas tanto de indivíduos oriundos de diferentes áreas quanto de diferentes *coortes*. Assim sendo, não é possível descartar as hipóteses de efeito Wahlund espacial e temporal.

O excesso de homozigotos pode ser, ainda, resultado de uma mortalidade seletiva loco-específica dos heterozigotos, durante o estágio larvar ou antes do

assentamento (Johnson e Back, 1984b; Volckaert e Zouros, 1989). Alguns trabalhos já foram capazes de demonstrar que diferentes genótipos alozímicos podem ter valores adaptativos diferentes quando relacionados com fatores ambientais (Nevo, 1990). Porém, a seleção natural é uma hipótese pouco parcimoniosa e de difícil demonstração empírica. Na impossibilidade de demonstrar que os genótipos em questão produzem diferenças que tenham impacto sobre a adaptação, não é possível favorecer nenhuma explicação seletcionista para os desvios observados.

Em resumo, a causa do déficit de heterozigotos nas populações aqui estudadas não foi esclarecida. Parece pouco provável que alelos nulos, aneuploidia, erros de interpretação e endocruzamento sejam os causadores dos desequilíbrios encontrados. O efeito Wahlund e a seleção natural permanecem como possíveis explicações para o déficit observado.

5.2 - Variação genética interpopulacional

A manutenção da homogeneidade genética em organismos com ampla distribuição geográfica vai depender em grande parte do fluxo gênico entre as populações (Hedgcock, 1986; Slatkin, 1987).

A efetivação da migração em organismos marinhos com larva planctônica depende do sucesso em várias etapas: dispersão, assentamento, sobrevivência e reprodução no novo hábitat. Esse sucesso depende da superação de barreiras físicas e biológicas até a combinação dos genes migrantes com o *pool* gênico local.

As condições hidrográficas locais determinam o padrão de recrutamento e afetam diretamente a dispersão das larvas planctônicas. A ação de correntes e outros movimentos de água como vórtices e meandros podem arrastar as larvas para longe da costa ou confiná-las a locais específicos e, ainda, causar variações bruscas nas condições físico-químicas do meio, tais como salinidade e temperatura, ocasionando a morte de recrutas (Debenham *et al.*, 2000). Os indivíduos enfrentam ainda a competição por espaço e/ou alimento, predação e parasitismo (Olson e McPherson, 1987). A dispersão dos organismos que conseguirem ultrapassar essas barreiras pode, ainda assim, não se converter em fluxo gênico entre as populações, já que a ação de seleção pós-fixação

pode inviabilizar o indivíduo ou grupo de indivíduos no novo ambiente (Koehn *et al.*, 1976; Burton, 1983; Koehn, 1985; Hedgecock, 1986). A ação de um ou a combinação de alguns desses fatores pode interromper ou alterar o fluxo gênico e resultar na formação de diferentes padrões genéticos no espaço e no tempo, se refletindo em populações mais ou menos estruturadas (Silva, 1991).

O índice de estruturação populacional de Wright foi significativamente diferente de zero ($F_{ST} = 0,016$) e a estimativa do número de migrantes por geração, calculada a partir dos valores de F_{ST} , foi alto ($N_m = 15,38$). Os dados de variação interpopulacional indicam, portanto, que as subpopulações estão estruturadas localmente, mas que mantêm trocas gênicas entre si. Esse dado, combinado com as altas identidades gênicas ($IGM = 0,999$) e a ausência de alelos de alta frequência exclusivos para as populações, é consistente com a observação de Hedgecock (1986) de que a maioria das espécies que possuem larvas planctônicas exibe um padrão de distribuição de frequências alélicas característico de alto fluxo gênico, com uma considerável heterogeneidade de estrutura de populações subjacente à aparente homogeneidade gênica.

De acordo com Futuyma (2002), para estimativas de F_{ST} significativamente diferentes de zero, valores inferiores a 0,05 indicam baixa estruturação. No entanto, estes valores só têm sentido em função de outras observações como, por exemplo, a distância geográfica amostrada e informações relativas aos níveis de F_{ST} em populações de espécies próximas ou similares (Silva, 2002a). Trabalhos com invertebrados marinhos têm demonstrado que espécies com desenvolvimento planctônico apresentam, geralmente, pouca divergência mesmo entre longas distâncias ($F_{ST} = 0.004$ a 0.020 - Johnson e Black, 1984a). As populações estudadas no presente trabalho distam no máximo 150 Km e, mesmo estando dentro da faixa de organismos citados como pouco diferenciados, apresentaram estruturação igual ou superior aos de outras espécies separadas por distâncias muito maiores.

Por exemplo, Ball e Chapman (2003) estudaram o crustáceo *Litopenaeus setiferus* ao longo de uma faixa geográfica de aproximadamente 2.000 Km e encontraram níveis de diferenciação muito baixos ($F_{ST} = 0.002$). O mesmo foi observado por Williams e Benzie (1998) para populações da estrela-do-mar *Linckia laevigata* entre as regiões do Oeste do Pacífico e Oeste da Austrália

($F_{ST} = 0.002$). A espécie de holotúria *Holothuria nobilis* apresentou um índice de estruturação não significativamente diferente de zero (0,0064), entre populações do Pacífico e do Índico (Uthickie e Benzie, 2003). Debenham e seus colaboradores (2000) também não encontraram evidências de subdivisão geográfica em seis populações do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus franciscanus* entre o Alaska e Baja Califórnia, México (todos os valores de $F_{ST} \leq 0.008$ e não significantes estatisticamente). Por outro lado, apesar do alto potencial de dispersão da larva pelágica, a diferenciação geográfica parece ser antes uma regra do que uma exceção em invertebrados marinhos (Hedgecock 1986). O grau e o padrão de estruturação é que, de fato, variam grandemente entre as espécies e entre as populações, de acordo com os fatores que estejam atuando ao longo da sua distribuição. correntes e fenômenos oceanográficos associados são, freqüentemente, reportados na literatura como responsáveis por níveis de estruturação maiores do que o esperado e por diferentes padrões de diferenciação.

Dados obtidos para os bivalves *Tridacna maxima* e *T. gigas* indicaram caminhos de fluxo gênico perpendiculares às principais correntes oceânicas de superfície (Benzie e Williams, 1997). As populações do asteróide *Patiriella regularis* investigadas por Waters e Roy (2004) apresentaram elevados valores de estruturação entre as populações mais ao norte e mais ao sul da costa da Nova Zelândia, sugerindo que a ressurgência que ali ocorre estaria interferindo nas freqüências observadas. Nessa mesma região, Smith (1988), estudando a espécie de mexilhão *Perna canaliculus*, também observou diferenças entre as amostras coletadas mais ao norte e as coletadas mais ao sul. O autor sugeriu que um dos motivos responsáveis pela restrição ao fluxo gênico seria a ação de correntes marinhas. Grant *et al.* (1992) observaram diferenças significativas para dois locos gênicos (*Mpi* e *Pgi*) em populações do mexilhão *Perna perna* ao longo de uma faixa de 3.700 Km na costa da Namíbia. Grant e seus colaboradores especularam que as diferenças observadas poderiam ser resultado da ação de correntes e da ressurgência que ocorre naquela região. Do mesmo modo, Laudien e colaboradores (2003) explicaram o alto nível de estruturação para duas das quatro populações de *Donax serra* estudadas, também na região da Namíbia, como sendo consequência da ação da ressurgência.

Na costa oeste do oceano Atlântico, o afloramento das águas centrais do Atlântico Sul (ACAS) é responsável pelo fenômeno de ressurgência na região de Cabo Frio e adjacências (Coutinho *et al.*, 1989). Comparado ao que ocorre em outras regiões do mundo é considerado um fenômeno local, de pequena escala e que ocorre em eventos rápidos. Em Itaipu a ressurgência é tida como parcial (Andre *et al.*, 1988). Na Região de Cabo Frio (RJ, Brasil), resulta num mosaico de regiões sob maior e menor influência do fenômeno (Coutinho *et al.*, 1989). Ainda assim, estudos já revelaram que este evento, que ocorre mais intensamente em Arraial do Cabo, pode estar agindo como uma barreira ao fluxo gênico em diferentes espécies (Silva, 1991; Moura-Neto, 2003; Pazoto, 2005; Duarte, 2005).

As populações de *Perna perna* analisadas por Silva (1991), nessa mesma região, mostraram que o fluxo gênico entre populações distantes apenas 50 Km era pequeno ($F_{ST} = 0.078$), quando comparado com populações da mesma espécie de outras regiões separadas por distâncias 150 vezes maiores. O mesmo foi constatado por Moura-Neto (2003), que estudou o mexilhão *P. perna* numa faixa de aproximadamente 2.000 Km da costa brasileira e observou que a população de Arraial do Cabo se mostrou mais diferenciada em relação às demais populações analisadas. A possível influência da ressurgência sobre o fluxo gênico também foi observada em duas espécies de equinodermos. No estudo realizado por Pazoto (2005) com 6 populações da estrela-do-mar *Coscinasterias tenuispina* no litoral do Rio de Janeiro, a ressurgência foi questionada como responsável pelo diferente padrão de estruturação observado para uma das populações. O ponto amostral localizado na área de maior intensidade do fenômeno (Ilha do Cabo Frio, Arraial do Cabo) apresentou menor identidade gênica e maior índice de estruturação em relação à média das demais localidades e não se agrupou com os pontos mais próximos geograficamente. Já as 3 populações do ouriço-do-mar *Paracentrotus gaimardi* investigadas por Duarte (2005) apresentaram um padrão de estruturação relacionado com a distância geográfica, contudo, com um valor inesperadamente alto para uma espécie com alta capacidade de dispersão. A ação da ressurgência como barreira ao fluxo gênico foi usada como possível justificativa para os altos valores de estruturação.

Os valores de F_{ST} observados para as populações de *C. tenuispina* (0,065) e *P. gaimardi* (0,055) foram elevados, sendo semelhantes àqueles obtidos para espécies com baixa capacidade de dispersão. De outro modo, o F_{ST} observado aqui para *Arbacia lixula* foi comparativamente mais baixo (0,016) e as populações mostraram-se muito mais semelhantes geneticamente. Apesar das três espécies de equinodermos possuírem fase larval planctotrófica e estarem sob influência do mesmo fenômeno, diferenças em outros aspectos biológicos podem estar determinando os diferentes níveis de estruturação observados. Por exemplo, para as populações da Ponta de Itaipu, tanto para espécie *C. tenuispina* (Alves *et al.*, 2002) quanto para *P. gaimardi* (Barcelos, 2004), foram encontradas evidências de um ciclo gametogênico marcado, com diferenças de picos anuais que coincidem com os períodos de ressurgência. Tal fato pode proporcionar um recrutamento anual menor nestas duas espécies quando comparadas com *A. lixula*. Além disso, *C. tenuispina* é capaz de se reproduzir tanto de forma sexuada, com produção de larvas planctotróficas, quanto de forma assexuada e, espécies com reprodução assexuada facultativa apresentam valores de F_{ST} maiores do que espécies com reprodução exclusivamente sexuada (Stickle *et al.*, 1991; Solé-Cava *et al.*, 1992; Russo *et al.*, 1994).

Resultados obtidos para as populações de *Arbacia lixula* amostradas por Zama (2005) sugeriram que a espécie deve possuir um ciclo reprodutivo contínuo e rápido em Itaipu e na Prainha, ocorrendo produção e liberação de gametas praticamente o ano todo. A estratégia reprodutiva de constante liberação de gametas resulta no aumento do recrutamento anual da espécie (Guettaf *et al.* 2000). Do mesmo modo, a ressurgência não é uma barreira fixa, que está presente o ano inteiro; ocorre principalmente na primavera e no verão (Valentin e Moreira, 1978). A composição das populações seria, então, resultado de eventos de recrutamento em períodos com e sem ressurgência. Isso poderia explicar a baixa magnitude da estruturação uma vez que, segundo Slatkin (1973), uma barreira geográfica à dispersão causa mudanças drásticas nas frequências gênicas apenas quando quase todos os indivíduos que tentam atravessar a barreira são parados.

O fluxo gênico entre as populações de *Arbacia lixula*, no entanto, não parece ser determinado apenas pelo seu ciclo reprodutivo e capacidade de

dispersão (tempo de competência larvar), uma vez que, se assim fosse, suas populações deveriam se apresentar estruturadas de acordo com o modelo de isolamento por distância ou “stepping stones” unidimensional (Wright, 1943). De acordo com esse modelo, as populações que são mais próximas geograficamente também seriam mais semelhantes geneticamente. As populações da Prainha e Ferradura estão separadas por apenas 30Km de distância, enquanto a população de Itaipu está localizada a 120km delas. No entanto, a diferenciação encontrada entre as populações aqui estudadas não parece estar relacionada com a distância geográfica, uma vez que as populações mais próximas (Prainha e Ferradura) não são aquelas mais similares geneticamente ($MIG = 0,997$). O padrão de estruturação nesta espécie pode ser adequadamente explicado por um modelo de ilhas, no qual as populações trocam migrantes entre si independentemente da posição espacial (Wright, 1943).

Os pontos da Prainha e Itaipu sofrem influência do fenômeno da ressurgência, que está ausente em Ferradura. O F_{ST} dois a dois entre Prainha e Itaipu ($F_{ST} = 0,0032$) é menor do que entre Prainha e Ferradura ($F_{ST} = 0,0042$). Estes dados em conjunto (padrão de estruturação das populações estudadas x padrão de influência da ressurgência nos locais amostrados) sugerem que o fenômeno da ressurgência pode ser relevante na determinação do padrão de variação gênica interpopulacional observado, tanto através da simples limitação ao fluxo gênico quanto exercendo alguma pressão seletiva sobre os locos gênicos.

Os dados de variação gênica observados aqui corroboram os resultados de comparações reprodutivas obtidos por Zama (2005). A autora sugeriu que as semelhanças entre os ciclos gametogênicos de *Arbacia lixula* nas populações de Itaipu e Prainha indicam a ocorrência de fluxo gênico entre os equinóides das áreas estudadas. Já as diferenças fisiológicas e morfológicas encontradas dentro e entre as populações, foram explicadas, respectivamente, como resultado de uma influência do ambiente sobre a biologia dessa espécie e à ocorrência de plasticidade fenotípica (Zama, 2005). A inclusão de informações a respeito das características reprodutivas e morfológicas das populações de Ferradura poderia ser de grande relevância para uma

interpretação mais clara da relação entre ressurgência, aspectos biológicos e padrões genéticos das espécies em questão.

A análise genética sozinha é, geralmente, insuficiente para decidir se a diferenciação populacional resulta primordialmente da restrição ao fluxo larvar acompanhado de diferenciação local aleatória, ou de seleção natural diversificadora (Hedgecock, 1986). Johnson e Black (1984b) observaram que no gastrópode pulmonado *Siphonaria jeanae* é a mortalidade seletiva, seja no plâncton ou logo após o assentamento, o principal fator determinante das frequências gênicas dos recrutas. Um cline de frequências alélicas para a espécie de mexilhão *Mytilus edulis* foi associado a um gradiente de salinidade por Koehn e colaboradores (1976). Os resultados de Schmidt e Rand (2001) permitiram a conclusão de que a seleção natural é a responsável pela diferenciação entre populações de *Semibalanus balanoides* de quatro tipos de habitats do médiolitoral, uma vez que tal diferenciação foi correlacionada com as diferentes condições ambientais e pressões seletivas as quais as populações estavam submetidas. Um balanço entre migração e seleção também foi proposto para explicar o padrão de diferenciação entre populações do ouriço-do-mar *Arbacia punctulata* na costa Atlântica dos Estados Unidos. Os clones de frequências gênicas estavam relacionados à temperatura (Marcus, 1977).

De acordo com os exemplos citados, uma forma de tentar distinguir se a diferenciação é devido à seleção ou à deriva genética é se valer da natureza dessas duas forças. Enquanto a seleção é uma força direcional, a deriva é estocástica. O que equivale a dizer que, em princípio, padrões que se repetem são mais associados à divergência adaptativa local do que atribuídos à deriva (Klaczko, 1990). Contudo, a seleção natural pode agir de diferentes formas o que dificulta um modelo geral (Waples, 1987).

Neste estudo não foi observado um cline ou padrão específico correspondendo a variações em parâmetros ambientais que pudesse ser imediatamente atribuído a algum processo de natureza determinística. Um fato interessante, contudo, é que a estruturação significativa observada para *A. lixula* se deve, fundamentalmente, ao efeito do loco *Catalase*. A enzima Catalase faz parte de um complexo sistema de defesa antioxidante que atua na proteção dos organismos aeróbicos contra os efeitos danosos das espécies

reativas de oxigênio (Ramos-Vasconcelos *et al.*, 2001). Dellali e colaboradores (2001) concluíram que parâmetros oceanográficos (como oxigênio dissolvido, temperatura, pH e salinidade) podem exercer influência sobre a atividade da enzima *Catalase* em duas espécies de bivalves (*Ruditapes decussatus* e *Mytilus galloprovincialis*) estudadas na Laguna de Bizerte, na Tunísia. Do mesmo modo, um mecanismo seletivo relacionado à atividade diferencial dos alelos do loco *Catalase* poderia estar envolvido na diferenciação das populações de *Arbacia lixula* aqui estudadas. Na ausência de evidências mais conspícuas que apóiem a utilização do argumento de que a seleção natural é a principal força determinante da diferenciação observada, a combinação de fluxo gênico e deriva genética parece ser uma explicação suficiente, porque mais parcimoniosa, para os níveis de diferenciação genética observados.

É necessário que dados de um número de maior de populações sejam somados àqueles produzidos aqui, para que o problema da relação entre ressurgência, aspectos reprodutivos, variação gênica e estruturação em *Arbacia lixula* seja melhor compreendido.

6- CONCLUSÃO

O estudo de marcadores moleculares de aloenzimas para a espécie *Arbacia lixula* na costa do estado do Rio de Janeiro demonstrou altos níveis de variação gênica intrapopulacional.

A despeito dos altos níveis de fluxo gênico e dos elevados valores de identidades gênicas encontrados, as três populações de *A. lixula* estudadas neste trabalho apresentam-se estruturadas.

A diferenciação encontrada entre as populações não parece estar relacionada com a distância geográfica. Se for este o caso, o padrão de estruturação nessa espécie pode ser adequadamente explicado por um modelo de ilhas, no qual as populações trocam migrantes entre si independentemente da distância geográfica. É possível que o fenômeno de ressurgência em Arraial do Cabo e Itaipu possa estar exercendo algum papel na definição deste padrão observado.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addison, J.A. e Hart, M.W. 2004. Analysis of population genetic structure of the green sea urchin (*Strongylocentrotus drobachiensis*) using microsatélites. **Marine Biology** **104**: 243-251.
- Alves, S.L.S.; Pereira, A.D. e Ventura, C.R.R. 2002. Sexual and asexual reproduction of *Coscinasterias tenuispina* (Echinodermata: Asteroidea) from Rio de Janeiro, Brasil. **Marine Biology** **140**: 95-101.
- Andrade, S.C.S; Medeiros, H.F. e Solferini, V.N. 2005. Homogeneity test of Hardy-Weinberg deviations in Brazilian littorinids: evidence for selection? **Journal of Molluscan Studies** **71**: 167-174.
- Andre D.L.; Jacob, S.A e Valentin, J.L. 1988. Características hidrológicas da região costeira entre Cabo Frio e Rio de Janeiro (Resultados de quatro operações oceanográficas). **Anais Hidrográficos** **43**: 101-127.
- Ball, A.O. e Chapman, R.W. 2003. Population genetic analysis of white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, using microsatellite genetic markers. **Molecular Ecology** **12**: 2319-2330.
- Barcelos, 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 - Universidade Federal do Rio de Janeiro. 55p.
- Benzie, J.A. e 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.
- Black, R.; Cood, C.; Herbbert, D.; Vink, S. e Burt, J. 1984. The functional significance of the relative size of Aristotle's lantern in the sea urchin *Echinometra mathaei* (de Blainville). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** **77**: 81-97.
- Borsa, P.; Zainuri, M. e Delay, B. 1991. Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. **Heredity** **66**: 1-8.
- Boyer, J.F. 1974. Clinal and size-dependent variation at the LAP locus in *Mytilus edulis*. **Biological Bulletin** **147**: 535-549.
- Brewer, J.F. 1970. **An introduction to isozyme techniques**. Academic Press, New York. 186p.
- Burton, R.S. 1983. Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. **Marine Biology** **4**: 193-206.
- Colgan, D.J. 1981. Spatial and temporal variation in the genotypic frequencies of the mussel *Brachidontes rostratus*. **Heredity** **46**: 197-208.
- Coutinho, R., Fonseca, M.C.S. e Santos, D.P. 1989. Recrutamento nos costões rochosos da região de Arraial do Cabo e adjacências (RJ). In: **Simpósio sobre Oceanografia. Instituto Oceanográfico, USP**. p. 40.

- Debenham, P.; Brzezinski, M.; Foltz, K. e Gaines, S. 2000. Genetic structure of populations of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** **253**: 49–62.
- Dellali, M., Romeo, M. e Aissa, P. 2001. Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. **Oceanologica Acta** **24**: 263-271.
- Duarte, M.R.D. 2005. **Padrão de variação gênica em morfotipos e populações de *Paracentrotus gaimardi* (Blainville, 1825) (Echinodermata: Echinoidea) do litoral do Rio de Janeiro**. Monografia de Bacharelado. Universidade Federal Fluminense. 53p.
- Futuyma, D.J. 2002. **Biologia Evolutiva**. 2º Edição. SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA, Ribeirão Preto. 646p.
- Gaffney, P. M. 1990. Enzyme heterozygosity, growth rate, and viability in *Mytilus edulis*: another look. **Evolution** **44**: 204-210.
- Gillespie, J. 1974. The role of environmental grain in the maintenance of genetic variation. **American Naturalist** **108**: 831-836.
- Giordano, F. 1986. **Ouriços do sublitoral rochoso da região de São Sebastião – São Paulo – Uma abordagem ecológica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 128p.
- Grant, W.S.; Scheneider, A.C.; Leslie, R.W. e Cherry, M.I. 1992. Population genetics of the brown mussel *Perna perna* in Southern Africa. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** **165**: 45-58.
- Griffiths, A.J.F.; Miller, J.H.; Suzuki, D.T.; Lewontin, R.C. e Gelbart, W.M. 2002. **Introdução à Genética**. 7ª edição. GUANABARA KOOGAN, Rio de Janeiro. 794p.
- Grosberg, R.K e Quinn, J.F. 1986. The genetic control and consequences of kin recognition by the larvae of a colonial marine invertebrate. **Nature** **322**: 456-459.
- Guettaf, M.; San Martin, G.A. e Francour, P. 2000. Interpopulation variability of the reproductive cycle of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in the south-western Mediterranean. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom** **80**: 899-907.
- Hare, M.P.; Karl, S.A. e Avise, J.C. 1996. Anonymous nuclear DNA markers in the American oyster and their implications for the heterozygote deficiency phenomenon in marine bivalves. **Molecular Biology and Evolution** **13**: 334-345.
- Harris, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences** **164**: 298-310.
- Harris, H. e Hopkinson, D.A. 1978. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. North Holland Publishing Company. 670p.
- Hedgecock, D. 1986. Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? **Bulletin of Marine Science** **39**: 550-564.
- Holland, B.S. 2001. Invasion without a bottleneck: microsatellite variation in natural and invasive populations of the brown mussel *Perna perna* (L). **Marine Biotechnology** **3**: 407-415.

- Hubby, J.L. e 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.
- Jacobi, C.M.; Rosenberg, C. e Vianna-Morgante, A.M. 1990. The karyotype of the brown mussel *Perna perna* (L) (Bivalvia: Mytilidae). **Revista Brasileira de Genética** **13**: 669-673.
- Johannesson, K., Johannesson, B. e Lundgren, U. 1995. Strong natural selection causes microscale allozyme variation in a marine snail. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **92**: 2602-2606.
- Johnson, M.S. e Black, R. 1984a. Pattern beneath the chaos: the effect of recruitment on genetic patchiness in an intertidal limpet. **Evolution** **38**: 1371-1383.
- Johnson, M.S. e Black, R. 1984b. The wahlund effect and the geographical scale of variation in the intertidal limpet *Siphonaria* sp. **Marine Biology** **78**: 295-302.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature** **217**: 624-626.
- Kimura, M. 1983. **The Neutral Theory of molecular evolution**. Cambridge University Press. 367p.
- Klaczko, L.B. 1990. A genética de populações e a origem das adaptações. In: Martins, R.P. e Lopes, F.S. (Eds.), **Encontro de Ecologia Evolutiva**. Rio Claro, SP.
- Koehn, R.K; Milkman, R. e Milton, J. 1976. Population genetics of marine pelecypods – Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis*. **Evolution** **30**: 2-32.
- Koehn, R.K. 1985. Adaptive aspects of biochemical and physiological variability. In: Gibbs, P.E. (Ed.), **Proceedings of the 19th European Marine Biology Symposium**, London. Pp. 425-441.
- Laudien, J.; Flint, N.S.; Van der Bank, F.H. e Brey, T. 2003. Genetic and morphological variation in four populations of the surf clam *Donax serra* (Röding) from southern Africa sandy beaches. **Biochemical Systematics and Ecology** **31**: 751-772.
- Lawrence, J.M. 2001. **Edible sea urchins: biology and ecology**. Lawrence, J.M. (Ed.), Elsevier Science. 419p.
- 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* Nardo, 1847. **Marine Biology** **139**: 421-429.
- Levinton, J.S. 1973. Genetic variation in a gradient of environmental variability: marine Bivalvia (Mollusca). **Science** **180**: 75-76.
- Levinton, J.S. 1975. Levels of genetic polymorphism at two enzyme encoding loci in eight species of the genus *Macoma* (Mollusca: Bivalvia). **Marine Biology** **33**: 41-47.
- Lewontin, R.C. e 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.

- Magaya, Y.D.; Gosling, E.M; Mercer, J.P. e Donlon, J. 1995. Genetic variation on three polymorphic loci in wild and hatchery stocks of the abalone *Haliotis tuberculata* Linneaus. **Aquaculture** **163**: 71-80.
- Manchenko, G.P.; Dautova, T.N. e 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. e Yakovlev, S.N. 2001. Genetic divergence between three sea urchin species of the genus *Strongylocentrotus* from the Sea of Japan. **Biochemical Systematics and Ecology** **29**: 31-44.
- Marcus, N.H. 1977. Genetic variation within and between geographically separate populations of the sea urchin *Arbacia punctulata*. **Biological Bulletin** **153**: 560-576.
- Matsuoka, N. e Nakamura, Y. 1990. Enzyme variation within the population of the sea-urchin, *Glyptocidaris crenulares*, from Japanese waters. **Comparative Biochemistry and Physiology** **96B**: 335-338.
- Matsuoka, N. e Asano, H. 2003. Genetic variation in northern Japanese populations of the starfish *Asterina pectinifera*. **Zoological Science** **20**: 985-988.
- Mladenov, P.V. e Emson, R. H. 1990. Genetic structure of population of two closely related brittle stars with contrasting asexual life histories, with observations on the genetics structure of a second asexual specie. **Marine Biology** **104**: 265-274.
- Moberg, P.E. e Burton, R.S. 2000. Genetic heterogeneity among adult and recruit red sea urchins, *Strongylocentrotus franciscanus*. **Marine Biology** **136**: 773-784.
- Moura-Neto, H.S. 2003. **Estrutura genética de populações do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense. 74p.
- Müller, J.; Wöll, S.; Fuchs, U. e Seitz, A. 2001. Genetic interchange of *Dreissena polymorpha* populations across a canal. **Heredity** **86**: 103-109.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** **89**: 583-590.
- Nevo, E. 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. **Theoretical Population Biology** **13**: 121-177.
- Nevo, E. 1990. Molecular evolutionary genetics of isozymes: pattern, theory and application. *In*: **Isozymes: Structure, Function and Use in Biology and Medicine**. Proceedings of the Sixth International Congress On Isozymes Held At Toyama, Japan. Pp 701-742.
- Numachi, K. 1981. A simple method for preservation and scanning of starch gels. **Biochemical Genetics** **19**: 233-236.
- Ohta, T. 1974. Mutational pressures as the main cause of molecular evolution and polymorphism. **Nature** **252**: 351-354.
- Olson, R.R. e McPherson, R. 1987. Potential vs realized larval dispersal: fish predation on larvae of the ascidian *Lissoclinum patella* (Gottschaldt). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** **110**: 245-256.

- Pazoto, C.E.P. 2004. **Genética de populações de *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Asteroidea) no litoral do rio de janeiro**. Monografia de Bacharelado. Universidade Federal Fluminense. 66p.
- Poulik, M.D. 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system buffers. **Nature** **180**: 1477-1479.
- Purves, W.K.; Sadava, D.; Orians, G.H. e Heller, H.C. 2002. **Vida, a Ciência da Biologia**. 6ª edição. ARTMED EDITORA S.A., Porto Alegre-RS.
- Ramos-Vasconcelos, G.; Alves, A.L.H. e Hermes-Lima, M. 2001. Radicais livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal. *In*: El-Hani, C.M. e Videira, A.A.P. (Eds.). **O que é vida? Para entender a biologia do século XXI**. RELUME DUMORÁ, Rio de Janeiro. Pp 209-231.
- Raymond, M.; Vääntö, R. L.; Thomas, F.; Rousset, F.; Meeüs, T. e Renaud, F. 1997. Heterozygote deficiency in the mussel *Mytilus edulis* species complex revisited. **Marine Ecology Progress Series** **156**: 225-237.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution** **43**: 223-225.
- Richardson, B.J.; Baverstock, P.R. e Adams, M. 1986. **Allozyme electrophoresis – a handbook for animal systematics and population studies**. Academic Press, Sydney. 410p.
- Ritte, U. e Pashtan, A. 1982. Extreme levels of genetic variability in two red sea Cerithium species (Gastropoda: Cerithidae). **Evolution** **36**: 403-407.
- Ruppert, E.E. e Barnes, R.D. 1996. **Zoologia dos Invertebrados**. 6ª edição. ROCA LTDA, São Paulo. 1029p.
- Russo, C.A.M. 1991. **Genética de populações de anêmonas do mar**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 112 p.
- Russo, C.A.M.; Solé-Cava, A. M. e Thorpe, J. P. 1994. Population structure and genetic variation in two tropical sea anemones (Cnidária, Actinidae) with different reproductive strategies. **Marine Biology** **119**: 267-276.
- Scheltema, R.S. e Williams I.P. 1983. Long distance dispersal of planktonic larvae and the biogeography and evolution of some Polynesian and Western Pacific mollusks. **Bulletin of Marine Science** **33**: 545-565.
- Schmidt, P.S. e Rand, D.M. 2001. Adaptive maintenance of genetic polymorphism in an intertidal barnacle: habitat and life-stage-specific survivorship of *Mpi* genotypes. **Evolution** **55**: 1336-1344.
- Selander, R.K.; Smith, M.H.; Yang, S. Y.; Johnson, W. E. 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**: 49-70.
- Silva, E.P. 1991. **Estudos em genética bioquímica com os moluscos bivalves *Perna perna* (Linné, 1758) (Mytilidae) e *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Veneridae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 181p.
- Silva, E.P. 2002a. Especiação no ambiente marinho. *In*: Soares-Gomes, A. e Pereira, R.C. (Eds.), **Biologia Marinha**. INTERCIÊNCIAS, Rio de Janeiro. Pp. 35-47.

- Silva, E.P. 2002b. Genética Marinha. *In*: Soares-Gomes, A. e Pereira, R.C. (Eds), **Biologia Marinha**. INTERCIÊNCIAS, Rio de Janeiro. Pp. 335-351.
- Skibinski, D.O.F. 2000. DNA tests of neutral theory: applications in marine genetics. **Hydrobiologia** **420**: 137-152.
- Slatkin, M. 1973. Gene flow and selection in cline. **Genetics** **75**: 733-756
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science** **236**: 789-792.
- 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. 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação. *In*: MATIOLI, S.R. (Ed). **Biologia Molecular e Evolução**. HOLOS EDITORA, São Paulo. Pp. 172-191.
- Solé-Cava, A.M. e Thorpe, J.P. 1991. High levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. **Biological Journal of the Linnean Society** **44**: 65-80.
- Solé-Cava, A.M.; Russo, C.A.M. e Silva, E.P. 1992. Fluxo gênico e estruturação em populações de invertebrados marinhos bênticos. **Revista Brasileira de Genética** **15**: 274-279.
- Stickle, W.B.; Foltz, D.W.; Katoh, M. e Nguyen, H.L. 1991. Genetic structure of five species of sea stars (Echinodermata, Asteroidea) from the Alaska. **American Zoologist** **31**: A29.
- Supungul, P.; Sootaman, D. Klinbunga, S.; Kamonrat, W.; Jarayabhand, P e Tassanakagon, A. 2000. Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger (*Penaeus monodon*) in Thailand. **Marine Biotechnology** **2**: 339-347.
- Swofford, D.L. e Selander, R.B. 1997. BIOSYS 2 a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetics and systematics. <http://amar.colostate.edu>.
- Tavares, Y.A.G; Kawall, H.G.; Borzone, C.A. 2004. Biochemical changes in the gonad in relation to the reproductive cycle of *Echinometra lucunter* and *Arbacia lixula* in southern Brazil. *In*: Lawrence e Guzmán (Eds.). **Sea Urchin Fisheries and Ecology**. Proceedings of the International Conference on Fisheries and Aquaculture. Pp. 147-155.
- Tavares, Y.A.G. 2004. **Biologia reprodutiva dos equinóides *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) e *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) na Ilha da Galheta, litoral Paranaense, Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. 196p.
- Thorpe, J.P.; Solé-Cava, A.M. e Watts, P.C. 2000. Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *In*: Solé-Cava, A.M, Russo, C.A.M. e Thorpe, J.P. (Eds.). **Marine Genetics**. Pp. 165-184.
- Tommasi, L.R. 1966. Lista dos equinóides recentes do Brasil. *Contribuição do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo*. **Série Oceanografia Biológica** **11**: 1-50.
- Uthicke, S.; Benzie, J.H.A. e 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. e 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.; Connand, C. e 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. e Benzie, J.A.H. 2003. Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holoturia nobilis* (Echinodermata: Holoturoidea) populations from the Indo-Pacific. **Molecular Ecology 12**: 2635-2648.
- Vadas, R.L. e Bristow, G. 1985. Genetic changes associated with bottleneck in an overharvested population of *Glycera dibranchiata* (Polychaeta). In: Gray, J.S. e Christiansen, M.E. (Eds.). **Marine Biology of Polar Regions and Effects of Stress on Marine Organisms**. John Wiley & Sons, University of Oslo. Pp. 617-629.
- Valentin, J. e Moreira, A.P. 1978. A matéria orgânica de origem zooplanctônica nas águas de ressurgência de Cabo Frio (Brasil). **Publicação do Instituto de Pesquisa da Marinha 122**: 10p.
- Volckaert, F. e Zouros, E. 1989. Allozyme and physiological variation in the scallop *Placopecten magellanicus* and a general model for the effects of heterozygosity on fitness in marine mollusks. **Marine Biology 103**: 51-61.
- Waples, R.S. 1987. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. **Evolution 41**: 385-400.
- Ward, R.D. e 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.
- Waters, J.M. e Roy, M.S. 2004. Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene-flow? **Molecular Ecology 13**: 2797-2806.
- Williams, S.T. e 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.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. **Genetics 28**: 114-138.
- Zama, P.C. 2005. **Comparação interpopulacional de caracteres morfológicos e reprodutivos do ouriço-do-mar *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) (echinodermata: Echinoidea) em duas localidades do litoral do estado do Rio de Janeiro**. Dissertação de Mestrado. Museu Nacional - Universidade Federal do Rio de Janeiro. 71p.
- Zouros, E. e Foltz, D.W. 1984. Minimal selection requirements for the correlation between heterozygosity and growth, and for the deficiency of heterozygotes, in oyster populations. **Developmental Genetics 4**: 393-405.
- Zouros, E.; Romerodorey, M. e Mallet, A.L. 1988. Heterozygosity and growth in marine bivalves: further data and possible explanations. **Evolution 42**: 1332-1341.

Freqüências genotípicas das três populações de *Arbacia lixula* analisadas.

ITAIPU – Niterói

Locus	Freqüências genotípicas									
<i>Cat</i>	AA= 6	AB= 6	AC= 0	BB= 24	BC= 3	CC= 0				
<i>α-Est-3</i>	AA= 1	AB= 6	AC= 3	AD= 0	BB= 13	BC= 21	BD= 6	CC= 0	CD= 2	DD= 1
<i>Lap-2</i>	AA= 0	AB= 2	AC= 0	BB= 3	BC= 2	CC= 0				
<i>Lap-3</i>	AA= 14	AB= 13	BB= 11							
<i>Mdh-1</i>	AA= 0	AB= 0	AC= 2	AD= 0	BB= 0	BC= 4	BD= 0	CC= 44	CD= 4	DD= 0
<i>Mdh-2</i>	AA= 0	AB= 8	AC= 0	AD= 0	BB= 1	BC= 9	BD= 1	CC= 4	CD= 1	DD= 0
<i>Me</i>	AA= 0	AB= 1	AC= 3	BB= 15	BC= 6	CC= 0				
<i>Odh</i>	AA= 1	AB= 5	AC= 0	BB= 12	BC= 3	CC= 1				
<i>Sod</i>	AA= 47									
<i>Sordh</i>	AA= 11	AB= 4	BB= 4							

PRAINHA - Arraial do Cabo

Locus	Frequências genotípicas									
<i>Cat</i>	AA= 0	AB= 3	AC= 1	BB= 28	BC= 5	CC= 0				
<i>α-Est-3</i>	AA= 0	AB= 9	AC= 0	AD= 0	BB= 14	BC= 26	BD= 8	CC= 0	CD= 1	DD= 0
<i>Lap-2</i>	AA= 0	AB= 2	AC= 0	BB= 14	BC= 3	CC= 1				
<i>Lap-3</i>	AA= 10	AB= 25	BB= 14							
<i>Mdh-1</i>	AA= 0	AB= 0	AC= 0	AD= 0	BB= 1	BC= 1	BD= 0	CC= 41	CD= 4	DD= 2
<i>Mdh-2</i>	AA= 1	AB= 6	AC= 0	AD= 0	BB= 4	BC= 9	BD= 0	CC= 4	CD= 1	DD= 0
<i>Me</i>	AA= 0	AB= 3	AC= 0	BB= 13	BC= 2	CC= 0				
<i>Odh</i>	AA= 1	AB= 1	AC= 0	BB= 16	BC= 4	CC= 4				
<i>Sod</i>	AA= 46									
<i>Sordh</i>	AA= 6	AB= 4	BB= 2							

FERRADURA - Búzios

Locus	Frequências genotípicas									
<i>Cat</i>	AA= 2	AB= 6	AC= 0	BB= 16	BC= 9	CC= 0				
<i>α-Est-3</i>	AA= 2	AB= 8	AC= 3	AD= 0	BB= 7	BC= 15	BD= 4	CC= 0	CD= 3	DD= 0
<i>Lap-2</i>	AA= 0	AB= 1	AC= 0	BB= 6	BC= 1	CC= 0				
<i>Lap-3</i>	AA= 8	AB= 4	BB= 9							
<i>Mdh-1</i>	AA= 0	AB= 0	AC= 0	AD= 0	BB= 0	BC= 3	BD= 0	CC= 33	CD= 2	DD= 1
<i>Mdh-2</i>	AA= 1	AB= 3	AC= 4	AD= 0	BB= 2	BC= 2	BD= 0	CC= 1	CD= 0	DD= 0
<i>Me</i>	AA= 0	AB= 3	AC= 0	BB= 3	BC= 1	CC= 0				
<i>Odh</i>	AA= 3	AB= 3	AC= 0	BB= 12	BC= 4	CC= 0				
<i>Sod</i>	AA= 48									
<i>Sordh</i>	AA= 10	AB= 3	BB= 1							

Despedida

*Eu não sou daqui também marinheiro
mas eu venho de longe e ainda
do lado de trás da terra
Além da missão cumprida
vim só dar despedida*

*Filho de sol poente
quando teima em passear
desce de sal nos olhos
doente da falta de voltar
Filho de sol poente
quando teima em passear
desce de sal nos olhos
doente da falta que sente do mar*

*Vim só dar despedida
Vim só dar despedida*

Marcelo Camelo