Ezequiel Ale

Estudo filogeográfico de duas espécies de medusozoários
(Cnidaria), *Liriope tetraphylla* (Trachymedusae,
Gerioniidae) e *Olindias sambaquiensis* (Limnomedusae,
Olindiasidae), em uma região do Oceano Atlântico Sul-
ocidental.

São Paulo

2008

Ezequiel Ale

Estudo filogeográfico de duas espécies de medusozoários
(Cnidaria), *Liriope tetraphylla* (Trachymedusae,
Gerioniidae) e *Olindias sambaquiensis* (Limnomedusae,
Olindiasidae), em uma região do Oceano Atlântico Sul-
ocidental.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Genética e Biologia Evolutiva.

Orientador: Antonio Carlos Marques.

São Paulo

2008

Ale, Ezequiel

Estudo filogeográfico de duas espécies de medusozoários (Cnidaria), *Liriope tetraphylla* (Trachymedusae, Gerioniidae) e *Olindias sambaquiensis* (Limnomedusae, Olindiasidae), em uma região do Oceano Atlântico Sul-ocidental.

73 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Filogeografia, 2. Diversidade genética, 3. Hidrozoa. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

*Ao meu pai,
a primeira pessoa a me falar de evolução.*

*La certidumbre del origen común de las especies fortalece tanto nuestra memoria,
que el límite de los reinos desaparece y nos sentimos tan cerca de los hervívoros como de
los cristalizados o de los farináceos.*

Oliverio Girondo
1891-1967
Poeta argentino

Agradecimentos

Ao meu orientador, Antonio C. Marques, pela confiança depositada em mim, permitindo-me trabalhar com conforto e liberdade.

Aos professores Hemes W. Mianzan, Gabriel Genzano, Diogo Meyer, Álvaro E. Migotto e Maria A. Haddad, pelos oportunos conselhos sobre meu trabalho e as prontas respostas às minhas consultas.

À Karin, além do seu apoio permanente e sua presença na minha vida, por me permitir usufruir dos seus conhecimentos na área com seus aportes e críticas feitos em releituras dos meus manuscritos.

Ao Maurício e o Otto, com quem dividimos esforços (às vezes muito grandes) de coleta e trabalho, além de muitas risadas, e aos quais agradeço o apoio e amizade em momentos precisos.

Ao pessoal do Laboratório de Estudos em Medusozoa, às meninas Valquiria, Vanessa, Thaís, Juliana, Lucília e os meninos, Maurício, Maxi e Otto, como também ao pessoal do outro laboratório, o de Sistemática Molecular, às meninas, Karin, Sabrina, Silvia, Maíra, Claudinha, e aos meninos Almir e Cassimiro, pela troca diária de dicas e informações, sempre compartilhando o espaço e os recursos com boa vontade e bom humor.

Ao pessoal do CeBiMar-USP, da administração e da equipe técnica, por sempre ter contribuído, com muito boa disposição, para o desenvolvimento das atividades ali conduzidas.

Aos técnicos do IO-USP, não apenas pela boa disposição no empréstimo de equipamento, mas também no ensino da utilização do mesmo.

À minha família, que embora longe, sempre estão presentes me apoiando em todas as minhas empreitadas.

A meus amigos de longe, “Grillo”, Alex, Gustavo e Mariana, os quais sempre estão comigo e me ofereceram seu apoio quando esta viagem parecia complicada e incerta.

O presente trabalho foi possível graças aos aportes das agências, CNPq, CAPES e FAPESP.

Índice

Capítulo 1. Introdução	08
• A questão biológica	08
• Objetivo geral	13
• Espécies de estudo	13
• Referências	13
Capítulo 2. Sazonalidade e hábito demersal de <i>Olindias sambaquiensis</i> (Cnidaria: Hydrozoa)	19
• Introdução	20
• Material e Métodos	20
• Resultados	22
• Discussão e Conclusões	27
• Referências	31
Capítulo 3. Estudo filogeográfico da hidromedusa <i>Olindias sambaquiensis</i> (Cnidaria: Medusozoa) no Oceano Atlântico Sul-ocidental	34
• Introdução	34
• Material e Métodos	35
• Resultados	38
• Discussão	43
• Referências	44
Capítulo 4. Estudo filogeográfico da hidromedusa <i>Liriope tetraphylla</i> (Cnidaria: Medusozoa) no Oceano Atlântico Sul-ocidental: evidências de estruturação populacional em uma escala regional para uma espécie holoplanctônica	48
• Introdução	48
• Material e Métodos	50
• Resultados	53
• Discussão	58
• Referências	61
Capítulo 5. Considerações finais	65
• Referências	70
Abstract/Resumo	72

Capítulo I

Introdução

A QUESTÃO BIOLÓGICA

Os medusozoários e o desconhecimento sobre a biodiversidade marinha

Muitas espécies de Medusozoa são mais estudadas devido ao seu poder urticante, que provoca envenenamentos em banhistas (Mianzan *et al.*, 2000; Edwards & Hessinger, 2000), inclusive chegando a impactar negativamente na economia turística de algumas regiões (Mianzan *et al.*, 2001a). Outros aspectos da biologia destes organismos também causam interesse econômico e ecológico, como seu papel como predadores de populações larvais e juvenis de peixes (Ramírez & Zamponi, 1981; Purcell & Arai, 2001) e os aparecimentos excessivos e súbitos de grande quantidade de medusas na coluna d'água (*blooms*) (Mills, 2001). Na parte de pesquisa básica, as espécies de cnidários têm sido utilizadas em estudos filogenéticos, de desenvolvimento, biologia celular e de famílias gênicas, dentre outros (Ball *et al.*, 2004; Marques & Collins, 2004; Shao *et al.*, 2006; Matus, *et al.* 2006).

Espécies de medusozoários são encontradas em mares e oceanos ao longo do globo, inclusive em ambientes de água doce. Estudos filogeográficos sobre as distribuições globais de algumas dessas espécies têm sido conduzidos nos últimos anos, embora ainda sejam escassos (Dawson & Jacobs, 2001; Dawson & Martin, 2001; Schroth *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2004; Dawson, 2005a; Govindarajan *et al.*, 2005). Em escalas regionais, não globais, estudos desse tipo são ainda menos numerosos (Dawson, 2005a, 2005b) e inexistentes para o Atlântico sul-ocidental. Nesta região há algumas espécies de medusozoários pretensamente comuns aos litorais do Brasil e Argentina. Porém, não há comparações dirigidas a elucidar como as populações dessas espécies ficariam restritas ou seriam dispersas pelas condições oceânicas, históricas e atuais, do seu ambiente. Em uma dimensão maior, este desconhecimento encontra-se relacionado à dificuldade e escassez dos estudos dirigidos ao ecossistema marinho em geral (Knowlton, 1993; Migotto & Marques, 2003). Essas condições ambientais interagem com a capacidade dispersiva das espécies que o habitam, relacionada à biologia e história natural das mesmas. Assim, em estimativas sobre o potencial de dispersão das espécies, a velocidade de deslocamento de uma larva em deriva na corrente superficial, por exemplo, deve ser considerada conjuntamente com a duração da fase larval; e a estes parâmetros ainda se agregam vários aspectos bióticos e abióticos. A maioria das espécies de Medusozoa conta com uma larva plânula que possui uma duração no plâncton que varia entre horas e dias (Ramírez & Zamponi, 1981) e alguns grupos contam também com uma fase adulta reprodutiva e dispersiva, a medusa, que pode ser de longa duração. Em

outros Medusozoa, esta fase pode encontrar-se ausente ou muito modificada (Marques & Collins, 2004).

Dentre os Medusozoa, a classe Hydrozoa é a que apresenta as maiores variações em seu ciclo de vida, divididas basicamente em três grandes estratégias diferentes: a) coexistência de pólipos e medusas; b) redução total ou parcial do pólipo; c) redução total ou parcial da medusa. Paradoxalmente se observou a presença de espécies cosmopolitas que não liberam medusa em regiões insulares mostrando, aparentemente, maior capacidade de dispersão que as espécies formadoras de medusas (Cornelius, 1992a, 1992b). Seja em se tratando de pólipos ou medusas detectados em áreas geográficas isoladas, diferentes processos já foram mencionados para justificar essa condição, como: a) derivas trans-oceânicas dos pólipos fixos a substratos naturais ou artificiais (Calder, 1993); b) deriva costeira continental de curta distância de espécies com ampla gama de adaptação e capazes de produzir plânulas à deriva (Cornelius, 1992a) ou permanecer dormentes (Migotto *et al.*, 2001). Existem outras interpretações dispersionistas, pelas quais outros detalhes da biologia das espécies são também importantes para realizar inferências acerca de sua distribuição.

Heterogeneidade do ambiente marinho

A área de estudo deste projeto, o Oceano Atlântico sul-ocidental, apresenta uma série de características responsáveis pela estruturação do ambiente que conforma. A circulação superficial do Atlântico sul consiste em um grande vórtice anticiclônico tropical-subtropical, formado pelas correntes sul-equatorial do Brasil, parte da circumpolar Antártica e a de Benguela. Ao sul deste círculo se estende a corrente das Malvinas em direção à linha do Equador, sua temperatura superficial varia desde um mínimo de 5-6°C no inverno a 46-50°S a mais de 17°C no verão, ao norte dos 40°S (Boltovskoy E., 1981). O núcleo de água da corrente das Malvinas avança até cerca dos 40°S, onde se encontra, em seu flanco oriental, com a corrente subtropical do Brasil. A seguir, ambas as correntes viram no sentido leste como parte do vórtice subtropical (Boltovskoy E., 1981). O flanco ocidental da corrente das Malvinas, carregado de nutrientes, passa ao longo da costa argentina gerando um importante centro de produção nas águas de plataforma (Ramírez, 2002). Grande parte desta seção está habitada por espécies criófilas ("província Magallânica") mas, a partir da Península de Valdez, se começa a perceber a influência cíclica estival das águas quentes do ramo ocidental da corrente do Brasil, que aporta planctontes termófilos (cf. Boltovskoy E., 1981; Severov, 1990). No entanto, a variação sazonal de temperatura dessa região foi relacionada por outros autores às condições próprias do regime de ventos, profundidade e circulação das massas d'água, e não à influência das águas subtropicais (Lucas *et al.*, 2005). Estas peculiaridades da área

costeira compreendida entre 43°S e 30°S, determinou sua denominação como outra “província zoogeográfica”, a “Província Argentina” (Boltovskoy D., 1981). Entretanto, Boltovskoy D. (1981) também citou outros autores, como Beklemishev (1960), que consideraram o complexo sub-antártico como uma área de transição entre o complexo antártico e o subtropical.

No extremo norte do Atlântico sul-ocidental, a corrente sul-equatorial se divide em dois ramos ao se encontrar com o continente sul-americano, um no sentido norte, o das Guianas, e outro no sentido sul-sudoeste, o do Brasil. Desde o extremo norte do Atlântico sul-ocidental, essa corrente sul-equatorial do Brasil varia desde temperaturas tropicais na sua origem (30°C), até formar uma corrente subtropical, 18 a 24°C, com maior salinidade e maiores variações na sua salinidade que a corrente das Malvinas (Boltovskoy E., 1981). As franjas neríticas nas costas do Brasil e Uruguai (“seção nerítica brasileira”) (Boltovskoy D., 1981) exibem uma alta diversidade de espécies planctônicas, porém em baixas concentrações.

Na plataforma interior do mar argentino se encontram as águas costeiras, entre a corrente das Malvinas e o continente, desde os ca. 53°S até a zona de influência do rio da Prata, com temperaturas que, dependendo da latitude, podem ir de 4,5 a 14°C em agosto e de 11° a 23°C em fevereiro. A salinidade mostra pouca oscilação, 33-33,5‰. Esta massa se move na direção norte e está sujeita a mudanças esporádicas e locais devido às correntes de maré e aos ventos. Na “seção nerítica brasileira” as águas costeiras ocupam uma franja muito estreita, coincidente com a plataforma, não possuindo um bordo oriental bem definido nem uma salinidade muito diferente da do mar aberto, pouco menos de 36‰. A temperatura média superficial oscila entre 12°C na parte sul no inverno, e 27°C na parte norte no verão (Boltovskoy E., 1981).

As regiões neríticas estão expostas a grandes mudanças por salinizações máximas devido à evaporação ou diluições ocasionadas pelas descargas continentais de água doce (Lucas *et al.*, 2005). Isso se sucede com os rios da Prata e a Lagoa dos Patos, que afetam as condições ambientais até distâncias consideráveis de suas desembocaduras (Ramírez, 2002; Capurro, 1981). Essas descargas geram importantes frentes marítimas (Acha *et al.*, 2004; Piola *et al.*, 2005) que, como as outras frentes originadas nas diferenças na circulação e encontro das correntes marinhas, são influentes na dispersão e acumulação de muitas espécies com diferenças na tolerância às mudanças de salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido e turbidez da água (Mianzan *et al.*, 2001b; Mianzan *et al.*, 2001c; Acha *et al.*, 2003).

Os padrões de circulação e distribuição das frentes marítimas do Atlântico sul-ocidental têm por traz uma história de mudanças provocadas por diferentes fatores geológicos. Esses processos deixam marcas na história evolutiva das espécies, como

demonstrado por Wares & Cunningham (2001) no estudo das influências da última glaciação na filogeografia de três espécies da região entremarés do Oceano Atlântico Norte, *Semibalanus balanoides* (Arthropoda, Crustacea); *Nucella lapillus* e *Littorina obtusata* (Mollusca, Gastropoda).

As glaciações também mudaram a fisionomia e o clima do cone sul, incluindo variações no nível do mar (Hastenrath, 1991) e capas de gelo cobrindo o sul da Patagônia e penetrando no mar (Clapperton, 1991; Mörner, 1991a). Em períodos geológicos pós-glaciais as variações dos processos climáticos também alteraram as características do ambiente marinho na região, com variações no nível do mar na região central do litoral brasileiro e na Terra do Fogo (Martin *et al.*, 1991; Mörner 1991b).

O estudo da estrutura das populações marinhas

Táxons marinhos com alta fecundidade e larvas que podem se dispersar em grandes distâncias, resultando em espécies com amplas extensões de distribuição geográfica, grandes tamanhos de população e altas taxas de fluxo gênico entre localidades distantes, foram tidos como desafiadores de eventos de especiação alopátrica (Palumbi, 1994). Há, entretanto, alguns habitats marinhos, como os recifes de coral e os sedimentos moles de profundidade, que possuem uma composição de espécies que parece ser estruturada geograficamente. Baseado nesse tipo de dados, Palumbi (1994) concluiu que a generalização de que a especiação deve ser rara em táxons marinhos com grande dispersão parece ser incorreta. Diante dessa situação, a idéia da grande capacidade dispersiva no mar poderia ser colocada em dúvida, o qual, como já foi exposto, pode ser compreendido como um ambiente verticalmente estratificado, geograficamente estruturado, e modificado pela história geológica.

A conectividade entre populações naturais pode ser estudada com métodos diretos, os quais utilizam diferentes tipos de marcação de indivíduos. Através destes métodos, Becker *et al.* (2007) encontraram um auto-recrutamento significativo entre populações adjacentes de duas espécies do gênero *Mytilus* (Mollusca, Bivalvia) no litoral de San Diego (EUA), evidenciando pouca dispersão. Outros métodos para o estudo da dinâmica populacional em organismos marinhos utilizam modelos oceanográficos, muito úteis em regiões onde os padrões de circulação oceânica são bem conhecidos (Johnson *et al.*, 2001). Entretanto, os métodos diretos são difíceis de serem aplicados (Grosberg & Cunningham, 2001) e incapazes para detectar processos genealógicos ou vicariantes, o que faz com que os métodos indiretos de estudos genéticos se constituam em uma boa, e às vezes na única, ferramenta de investigação. As “marcas genéticas” podem não informar diretamente a origem de um propágulo como o faz uma marca física ou química, mas a distribuição geográfica dos marcadores genéticos pode ser interpretada através do

uso de modelos de genética de populações (Hellberg *et al.*, 2002) e de estudos filogeográficos (Avice *et al.*, 1987). Além disso esses métodos indiretos podem também ser utilizados junto com modelos oceanográficos (Dawson *et al.*, 2005; Galindo *et al.*, 2006).

Além de serem resultado de diferentes histórias genealógicas, as seqüências de DNA podem apresentar variações nas taxas de substituição. As variações resultantes mostram freqüências que são estatísticas populacionais sujeitas a mudanças relacionadas aos processos evolutivos, como a deriva gênica, o efeito fundador, o fluxo gênico e a seleção. Deste modo, a sua utilização pode ser dirigida tanto para determinações sistemáticas quanto para estudos filogeográficos e de estrutura populacional (Sunnucks, 2000).

Desde o começo da filogeografia (Avice *et al.*, 1987) observa-se que os trabalhos desta área discutem os resultados obtidos, principalmente sob a ótica e influência dos fenômenos geológicos do passado sobre a distribuição geográfica das espécies/populações, segundo o modelo de vicariância (*e.g.*, Hilbish *et al.*, 2000; Govindarajan *et al.*, 2004). Em outros trabalhos (*e.g.*, McFadden., 1999), observa-se que esta análise não pode explicar por si só os pequenos desvios das hipóteses filogeográficas de Avice e colaboradores, ou os fenômenos locais que parecem diferir do esperado por estas (Dawson, 2001). Esse enfoque baseado na obtenção de cladogramas surgiu como uma aproximação gráfica não matemática ao estudo das estruturas populacionais (Hey & Machado, 2003). Atualmente é utilizada uma combinação de métodos filogenéticos e de estatísticas sumárias nos estudos da estrutura das populações naturais de diferentes espécies (*e.g.*, Tomasik & Cook, 2005; Seki *et al.*, 2007; Froukh & Kochzius, 2007).

Entre os possíveis marcadores moleculares a serem utilizados, existem seqüências de genes mitocondriais que, por mostrarem altas taxas de substituição, são fontes atraentes de caracteres para o estudo das filogenias de linhagens de evolução recente (Moore, 1995). Ademais, as árvores filogenéticas traçadas com base nesses genes podem ter um bom grau de ajuste com a árvore evolutiva da espécie devido ao tamanho efetivo populacional (N_e) do genoma mitocondrial, que representa, por ser haplóide e uniparental, $\frac{1}{4}$ do nuclear para espécies dióicas (a probabilidade de coalescência aumenta à medida que o N_e diminui) (Moore, 1995).

Pelo exposto, os dados de seqüências nucleotídicas apresentam-se como úteis para inferências sobre história e estrutura populacional. Para o desenvolvimento do presente projeto foram selecionados os marcadores mitocondriais 16s e CO1, já utilizados em alguns trabalhos publicados sobre estudos filogenéticos (Cunningham & Buss, 1993; Bridge *et al.*, 1995; Collins, 2002; Collins *et al.*, 2005; Collins & Daly, 2005) e

filogeográficos (Dawson & Jacobs, 2001; Dawson, 2001; Dawson & Martin, 2001; Schroth *et al.*, 2002; Govindarajan *et al.*, 2004; Dawson, 2005; Govindarajan *et al.*, 2006) de Medusozoa.

OBJETIVO GERAL

A somatória das variações expostas nos aspectos oceanográficos e biológicos no Oceano Atlântico Sul-ocidental gera dúvidas quanto à unidade populacional das espécies que o habitam. Um estudo comparativo entre estas populações é uma abordagem possível para a investigação do problema. Para isso se apresenta útil o método de análises de seqüências de DNA, amplamente utilizado para estudar padrões filogeográficos. Estudos desse tipo já foram realizados para espécies distintas em diversos mares do globo, mas são escassos nas costas do Oceano Atlântico Sul-ocidental, ou inexistentes para os Medusozoa dessa região.

Perante isso, o presente projeto visa estudar a influência das variações presentes no litoral marítimo ao longo das costas do Brasil e Argentina, sobre populações de duas espécies de Cnidaria Medusozoa, seguindo um enfoque filogeográfico atreves da obtenção e análises de seqüências de DNA mitocondrial, e considerando também seus ciclos de vida e os fatores abióticos do lugar de coleta.

ESPÉCIES DE ESTUDO

As espécies selecionadas para o desenvolvimento deste projeto apresentam dois ciclos de vida diferentes, o que é importante, a princípio, na capacidade dispersiva. As espécies são:

Subclasse Trachymedusae - Família Geryoniidae

Liriope tetraphylla (Chamisso & Eysenhardt, 1821) – só apresenta medusa

Subclasse Limnomedusae - Família Olindiasidae

Olindias sambaquiensis F. Müller, 1861 – apresenta pólipos e medusa

REFERÊNCIAS

- Acha, E.M., H.W. Mianzan, O. Iribarne, D.A. Gagliardini, C. Lasta, P. Daleo. 2003. The role of the Río de la Plata bottom salinity front in accumulating debris. *Marine Pollution Bulletin* 46: 197-202.
- Acha, E.M., H.W. Mianzan, R.A. Guerrero, M. Favero, J. Bava. 2004. Marine fronts at the continental shelves of austral South America. Physical and ecological processes. *Journal of Marine Systems* 44: 83-105.
- Avise, J.C., J. Arnold, R. Martin Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb, N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge

- between population genetics and systematics. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Ball, E.E., D.C. Hayward, R. Saint, D.J. Miller. 2004. A simple plan - Cnidarians and the origins of developmental mechanisms. *Nature Reviews/Genetics* 5: 567-577.
- Becker, B.J., L.A. Levin, F.J. Fodrie, P.A. McMillan. 2007. Complex larval connectivity patterns among marine invertebrate populations. *Proceedings of the Natural Academy of Science* 14: 3267-3272.
- Boltovskoy, D. 1981. Características biológicas del Atlántico Sudoccidental. In Boltovskoy D. (ed), *Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata: 239-251.
- Boltovskoy, E. 1981. Masas de agua en el Atlántico sudoccidental. In Boltovskoy D. (ed), *Atlas del zooplancton del Atlántico sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata: 227-237.
- Bridge D., C.W. Cunningham, R. DeSalle, L.W. Buss. 1995. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Molecular Biology and Evolution* 12: 679-689.
- Calder, D.R. 1993. Local distribution and biogeography of the hydroids (Cnidaria) of Bermuda. *Caribbean Journal of Science* 29: 61-74.
- Capurro, L.R.A. 1981. Características físicas del Atlántico Sudoccidental. In Boltovskoy D. (ed), *Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata: 219-225.
- Clapperton, C.M. 1991. Influence of tectonics on the extent of quaternary glaciations in the Andes. *Boletim do Instituto de Geologia da USP* 8: 89-108.
- Collins, A.G. 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 418-432.
- Collins, A.G., M.M. Daly. 2005. A New deep-water species of Stauromedusae, *Lucernaria janetae* (Cnidaria, Staurozoa, Lucernariidae), and a preliminary investigation of stauromedusan phylogeny based on nuclear and mitochondrial rDNA data. *Biological Bulletin* 208: 221-230.
- Collins, A.G., S. Winkelmann, H. Hadrys, B. Schierwater. 2005. Phylogeny of Capitata and Corynidae (Cnidaria, Hydrozoa) in light of mitochondrial 16S rDNA data. *Zoologica Scripta* 34: 91-99.

- Cornelius, P.F.S. 1992a. Medusa loss in leptolid hydrozoan (Cnidaria), hydroid rafting, and abbreviated life-cycles among their remote-island faunae: an interim review. *Scientia Marina* 56: 245-261.
- Cornelius, P.F.S. 1992b. The Azores hydroid fauna and its origin, with discussion of rafting and medusa suppression. *Arquipélago Life and Earth Sciences* 10: 75-99.
- Cunningham C.W., L.W. Buss. 1993. Molecular evidence for multiple episodes of paedomorphosis in the family Hydractiniidae. *Biochemical Systematics and Ecology* 21: 57-69.
- Dawson, M.N. 2001. Phylogeography in coastal marine animals: a solution from California? *Journal of Biogeography* 28: 723-736.
- Dawson, M.N. 2005a. *Cyanea capillata* is not a cosmopolitan jellyfish: morphological and molecular evidence for *C. annaskala* and *C. rosea* (Scyphozoa: Semaestomeae: Cyaneidae) in south-eastern Australia. *Invertebrate Systematics* 19: 361-370.
- Dawson, M.N. 2005b. Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Austrália. *Journal of Biogeography* 32: 515-533.
- Dawson, M.N., D.K. Jacobs. 2001. Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biological Bulletin* 200: 92-96.
- Dawson, M.N., L.E. Martin. 2001. Geographic variation and ecological adaptation in *Aurelia* (Scyphozoa, Semaestomeae): some implications from molecular phylogenetics. *Hydrobiologia* 451: 259-273.
- Dawson, M.N., A. Sen Gupta, M.H. England. 2005. Coupled biophysical global ocean model and molecular genetic analyses identify multiple introductions of cryptogenic species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 11968-11973.
- Edwards, L., D. Hessinger. 2000. Portuguese Man-of-war (*Physalia physalis*) venom induces calcium influx into cells by permeabilizing plasma membranes. *Toxicon* 38: 1015-1028.
- Froukh, T., M. Kochzius. 2007. Genetic population structure of endemic fourline wrasse (*Larabicus quadrilineatus*) suggests limited larval dispersal distances in the Red Sea. *Molecular Ecology* 16: 1359-1367.
- Galindo, H.M.; D.B. Olson, S.R. Palumbi. 2006. Seascape genetics: a coupled oceanographic-genetic model predicts population structure of Caribbean corals. *Current Biology* 16:1622-1626.
- Govindarajan, A.F., K.M. Halanych, C.W. Cunningham. 2005. Mitochondrial evolution and phylogeography in the hydrozoan *Obelia geniculata* (Cnidaria). *Marine Biology* 146: 213-222.

- Govindarajan, A.F., F. Boero, K.M. Halanych. 2006. Phylogenetic analysis with multiple markers indicates repeated loss of the adult medusa stage in Campanulariidae (Hydrozoa, Cnidaria). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 820-834.
- Grosberg, R.K., C.W. Cunningham. 2001. Genetic structure in the sea: from populations to communities. In Bertness, M.D., S. Gaines, M.E., Hay (eds), *Marine Community Ecology*. Sinauer Associates, Sunderland: 61-84.
- Hastenrath, S. 1991. A review of glacier variations in the tropics: The past 500,000 years. *Boletim do Instituto de Geologia da USP* 8: 71-73.
- Hellberg, M.E., R.S. Burton, J.E. Neigel, S.R. Palumbi. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science* 70: 273-290.
- Hey, J., C.A. Machado. 2003. The study of structured populations - new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews/Genetics* 4: 535-543.
- Hilbish, T.J., A. Mullinax, S.I. Dolven, A.R. Meyer, K. Koehn, P.D. Rawson. 2000. Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of transequatorial migration. *Marine Biology* 136: 69-77.
- Holland, B.S., M.N. Dawson, G.L. Crow, D.K. Hofmann. 2004. Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Marine Biology* 145: 1119-1128.
- Johnson, D.R., H.M. Perry, W.D. Burke. 2001. Developing jellyfish strategy hypotheses using circulation models. *Hydrobiologia* 451: 213-221.
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 189-216.
- Lucas, A.J., R.A. Guerrero, H.W. Mianzan, E.M. Acha, C.A. Lasta. 2005. Coastal oceanographic regimes of the Northern Argentine continental shelf (34-43°S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65: 405-420.
- Marques, A.C., A.G. Collins. 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* 123: 23-42.
- Martin, L., J.M. Flexor, K. Suguio. 1991. Possible changes in the Holocene wind pattern recorded on southeastern Brazilian coast. *Boletim do Instituto de Geologia da USP* 8: 117-131.
- Matus, D.Q., G.H. Thomsen, M.Q. Martindale. 2006. Dorso/ventral genes are asymmetrically expressed and involved in germ-layer demarcation during Cnidarian gastrulation. *Current Biology* 16: 499-505.
- McFadden, C.S. 1999. Genetic and taxonomic relationships among Northeastern Atlantic and Mediterranean populations of the soft coral *Alcyonium coralloides*. *Marine Biology* 133: 171-184.

- Mianzan, H., D. Sorrarain, J. Burnett, L. Lutz. 2000. Mucocutaneous junctional and flexural paresthesias caused by the holoplanktonic Trachymedusae *Liriope tetraphylla*. *Dermatology* 201: 46-48.
- Mianzan, H.P., J. Fenner, P.F.S. Cornelius, F.C. Ramirez. 2001a. Vinegar as disarming agent to prevent further discharge of the nematocysts of the stinging hydromedusa *Olindias sambaquiensis*. *Cutis* 68: 45-48.
- Mianzan, H., E.M. Acha, R.A. Guerrero, F.C. Ramírez, D.R. Sorrarain, C. Simionato, J. Borus. 2001b. South Brazilian marine fauna in the Río de la Plata Estuary: discussing the barrier hypothesis. IX^o COLACMAR, San Andrés, Colombia, Septiembre 16-20.
- Mianzan, H., C. Lasta, E. Acha, R. Guerrero, G. Macchi, C. Bremec. 2001c. The Rio de La Plata estuary, Argentina-Uruguay. *Ecological Studies* 144:185-204.
- Mills, C.E. 2001. Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions? *Hydrobiologia* 451: 55-68.
- Migotto, A.E., A.C. Marques. 2006. Invertebrados marinhos. In Lewinsohn T. (ed), Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira. Ministério do Meio Ambiente, Brasília: 149-202.
- Migotto, A.E., A.C. Marques, M.N. Flynn. 2001. Seasonal recruitment of Hydroids (Cnidaria) on experimental panels in the São Sebastião Channel, Southeastern Brazil. *Bulletin of Marine Science* 68: 287-298.
- Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49: 718-726.
- Mörner, N.A. 1991a. The Patagonian glaciations and the onset of general quaternary-type glaciations on the globe. *Boletim do Instituto de Geologia da USP* 8: 109-115.
- Mörner, N.A. 1991b. Holocene sea level changes in the Tierra del Fuego region. *Boletim do Instituto de Geologia da USP* 8: 133-151.
- Palumbi, S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematic* 27: 547-572.
- Piola, A.R., R.P. Matano, E.D. Palma, O.O. Möller Jr., E.J.D. Campos. 2005. The influence of the Plata River discharge on the western south Atlantic shelf. *Geophysical Research Letters* 32: 1-4.
- Purcell, J.E., M.N. Arai. 2001. Interactions of pelagic cnidarians and ctenophores with fish: a review. *Hydrobiologia* 451: 27-44.
- Ramírez, F.C. 2002. Plancton sin formol. Publicación Especial del INIDEP, Mar del Plata.
- Ramírez, F.C., M.O. Zamponi. 1981. Hydromedusae. In Boltovskoy D. (ed), Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton

- marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata: 443-469.
- Schroth, W., G. Jarms, B. Streit, B. Schierwater. 2002. Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BioMed Central Evolutionary Biology* 2: 1-10.
- Seki, S.I., M. Sakanashi, N. Kawaji, N. Kotaka, 2007. Phylogeography of the Ryukyu robin (*Erithacus komadori*): population subdivision in land-bridge island in relation to the shift in migratory habit. *Molecular Ecology* 16: 101-113.
- Severov, D.N. 1990. Particularidades de las condiciones oceanológicas del Atlántico Sud-occidental sobre la base de características temporales medias procedentes de una serie de años. *Frente Marítimo* 6: 109-119.
- Shao, Z., S. Graf, O.Y. Chaga, D.V. Lavrov. 2006. Mitochondrial genome of the moon jelly *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa): A linear DNA molecule encoding a putative DNA-dependent DNA polymerase. *Gene* 381: 92-101.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Reviews* 3:109-203.
- Tomasik, E., J.A. Cook. 2005. Mitochondrial phylogeography and conservation genetics of Wolverine (*Gulo gulo*) of north western North America. *Journal of Mammalogy* 86: 386-396.
- Wares, J.P., C.W. Cunningham. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 55: 2455-2469.

Capítulo II

Sazonalidade e hábito demersal de *Olindias sambaquiensis* (Cnidaria: Hydrozoa)

Palavras chave: dinâmica populacional, Limnomedusae, história natural.

Abstract: *Olindias sambaquiensis* is an endemic species of the Southwestern Atlantic Ocean with poorly known ecology and natural history. The goal of our study is to investigate the habitat, ecology, and population dynamics of *O. sambaquiensis*. We performed seasonal surveys along the coast of the States of São Paulo and Paraná (Southern Brazil), adopting different sampling methods. Sexually immature and mature medusae occur all over the year. A markedly population rise was observed during the winter-spring season, in which the population was mainly formed by immature and early mature specimens. This pattern of population dynamics is opposite in relation to that observed at the Southernmost area of its distribution, on coastal waters along the Province of Buenos Aires (Argentina), where the species is more abundant during the summer season. *Olindias sambaquiensis* presents a particular demersal habit and affinities to coastal waters. We hypothesize that these data eventually favor a possible population structure along the geographic distribution of the species, what shall be tested genetically.

Resumo: *Olindias sambaquiensis* é uma espécie endêmica do Oceano Atlântico Sul-ocidental, para a qual pouco se sabe sobre sua ecologia e história natural. O objetivo de nosso estudo foi investigar o habitat, ecologia e dinâmica populacional de *O. sambaquiensis*. Realizamos coletas sazonais nos litorais dos estados de São Paulo e Paraná (sul do Brasil), adotando diferentes metodologias de coleta. Medusas maduras e imaturas ocorreram ao longo de todo o ano. Um aumento populacional foi observado no inverno-primavera, quando a população esteve formada principalmente por medusas em estágio imaturo. Esse padrão de dinâmica populacional é oposto ao observado no extremo sul de sua distribuição, em águas costeiras ao longo da Província de Buenos Aires (Argentina), onde a espécie é mais abundante no verão. *Olindias sambaquiensis* apresenta um hábito demersal singular e afinidade com a massa d'água costeira. Levantamos a hipótese que estes dados favorecem um certo nível de estruturação populacional ao longo da sua distribuição geográfica, o que deverá ser testado com análises genéticas.

INTRODUÇÃO

Olindias sambaquiensis F. Müller, 1861 (Hydrozoa, Limnomedusae) é uma espécie meroplanctônica, com uma fase de pólipó sésil, de tamanho pequeno, solitário e pouco diferenciado, que produz assexuadamente medusas que representam a fase sexual do ciclo de vida (Zamponi & Facal, 1987). As medusas podem formar populações onde a razão sexual de machos para fêmeas é 1:1 (Macchi *et al.*, 1995), e seu ciclo conta com larvas plânulas ciliadas. Essas larvas têm uma duração curta no plâncton, e logo assentam-se e recrutam-se ao fundo, onde se deslocam até reconhecer um substrato adequado para o desenvolvimento de um novo pólipó (Zamponi & Facal, 1987).

A espécie é considerada endêmica do Oceano Atlântico Sul-ocidental, distribuída desde o litoral norte do Estado de São Paulo (Brasil) até a Baía de San Blas (Província de Buenos Aires, Argentina) (Vannucci, 1951a; Mianzan & Zamponi, 1988). Essas medusas são agentes de acidentes de banhistas e pescadores (Haddad *et al.*, 2002) e podem representar grande parte da biomassa local em alguns dos pontos da sua distribuição (Mianzan & Guerrero, 2000). Estes fatores tornam a espécie de grande impacto na economia turística de algumas regiões, as quais podem ficar inadequadas para banho (Mianzan *et al.*, 2001).

Estudos visando estabelecer as características ecológicas e da dinâmica populacional desta espécie foram realizados para o litoral argentino (Zamponi & Facal, 1987; Mianzan & Zamponi, 1988; Macchi *et al.*, 1995; Chiaverano *et al.*, 2004). Estes estudos caracterizam a espécie como mais abundante no verão daquela região. Em contraste, no Brasil, ao menos para o litoral dos estados de São Paulo e Paraná, há indícios de uma maior presença da espécie no período inverno-primavera (Vannucci, 1951b; Souza *et al.*, 2004; Nogueira Jr., 2006). À parte esta eventual heterogeneidade de ocorrência, pouco se sabe sobre a sazonalidade da espécie, e somente algumas poucas notas anedóticas foram feitas com relação à sua biologia e história natural, sem nenhum estudo metodologicamente sistematizado.

Nosso estudo tem o objetivo de investigar a distribuição sazonal de *Olindias sambaquiensis*, por meio de coletas sistematizadas, e caracterizar sua história natural com inferências sobre uso do habitat, comportamento e dinâmica populacional da espécie. Nossas hipóteses são dirigidas a um embasamento relacionado à ecologia e biogeografia desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas sazonais foram realizadas ao largo da Ilha de São Sebastião, Estado de São Paulo (dias 21 e 22 de abril, 19 e 21 de julho e 17 e 18 de outubro de 2006, e 30 e

31 de janeiro de 2007), perfazendo um total de 35 amostragens georreferenciadas. Os animais foram coletados em arrastos de redes de porta para pesca de camarão, com malha da rede variando de 13 a 20 mm e largura da boca variando de 8 a 10 m, cada arrasto com 20 minutos de duração. As amostragens foram conduzidas no período diurno (entre 08:00h e 15:00h) em 9 pontos de coleta, com profundidades variando entre 12m e 45m (Figura 1A). No ponto 9 da Figura 1A também foi conduzido um arrasto noturno (dia 7 de agosto de 2007, entre 19h15min e 19h35min) e outro diurno (dia 8 de agosto de 2007, entre 09h40min e 10h00m).

A mesma metodologia de coleta foi empregada em amostragens diurnas, complementares, conduzidas no litoral de Pontal do Sul, Estado de Paraná, no mês de outubro de 2006. Naquela oportunidade, as amostras foram coletadas em 6 pontos do litoral das praias de Shangrilá e Ipanema (dia 17 de outubro de 2006, entre 07:00h e 13:00h, a profundidades entre 10m e 11m) e em 7 pontos de um transecto perpendicular à entrada da Baía de Paranaguá (dia 18 de outubro de 2006, entre 09:00h e 16:00h, a profundidades entre 10m e 35m) (Figura 1B).

Figura 1. Locais de amostragem de *Olindias sambaquiensis*. A. Pontos de coleta no litoral da Ilha de São Sebastião, estado de São Paulo; CSS: Canal de São Sebastião. B: Pontos de coleta no litoral de Pontal do Sul, estado do Paraná.

Os espécimes foram triados e identificados *in situ*, uma vez que *Olindias sambaquiensis* é uma espécie com indivíduos de grandes dimensões e facilmente caracterizável. Os indivíduos coletados foram fixados em solução de formalina a 10% para as análises morfológicas subseqüentes. Espécimes-testemunho dos materiais coletados, conservados em álcool e formol, são parte da coleção do Laboratório de Estudos em Medusozoa do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da

Universidade de São Paulo (USP), e serão devidamente depositados na Coleção de Cnidários do Museu de Zoologia da USP.

Em laboratório, os espécimes fixados em solução formalina foram contados e medidos com relação ao seu diâmetro umbrelar (DU). Os dados coligidos foram utilizados em testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (W), realizados no programa *Statgraphics Plus 3.0* (Statistical Graphics Corporation, 1997), com o objetivo de comparar as medições do DU de espécimes coletados em diferentes localidades e estações do ano.

A densidade de exemplares (n° de medusas/m²) nos pontos amostrados foi utilizada para estimar a abundância da espécie. O parâmetro densidade é um cálculo que atende melhor às variações na área abrangida em cada arrasto, principalmente devido às mudanças na direção e intensidade de ventos e correnteza. A área coberta em cada amostragem é obtida do produto entre a largura de boca da rede utilizada e a distância percorrida pela mesma sobre o fundo. Essa distância é calculada considerando as coordenadas do início (quando as redes começam a ser arrastadas) e do final do arrasto (quando as redes são fechadas), pontos georreferenciados, com posterior conferência em cartas náuticas da Marinha do Brasil, as quais também foram utilizadas para estimar as profundidades dos pontos de coleta.

Paralelamente, amostramos o plâncton em todos os pontos de coleta mencionados, e em diferentes estações do ano. As coletas de plâncton foram realizadas com redes do tipo Hensen, de malha 300-500 μ , em arrastos oblíquos até 5m, 10m e entre 15m e 20m de profundidade.

As salinidades foram medidas com salinômetro manual, sendo confirmadas a partir da comparação com dados de campanhas oceanográficas publicados por outros autores. A transparência da água foi medida com disco de Secchi.

Observações para determinar a presença da espécie nas localidades de coleta também foram feitas por avistamentos de superfície e por meio de mergulho livre.

RESULTADOS

Sazonalidade

Coletamos um total de 733 espécimes de *O. sambaquiensis* nos 32 arrastos conduzidos entre abril de 2006 e janeiro de 2007 (Figura 2), nos pontos 1 a 8 da Figura 1A. Os números totais de cada estação do ano indicam um pico populacional no inverno e na primavera. Julho foi o mês com maior número de medusas coletadas, com uma abundância duas vezes maior que a do mês de abril (0,0044 indivíduos/m², ou aproximadamente um indivíduo a cada 227m²). Janeiro foi o mês com menor abundância, em que foi coletado aproximadamente 1 indivíduo a cada 3000m²; além disso, nesse mês

também foram coletados exemplares nas piores condições: sem manúbrio, com mesoglêia em estado frouxo, restos inconspícuos de tecido gonadal e tentáculos remanescentes esparsos. Medusas em condições semelhantes não foram coletadas nas outras estações do ano.

A Figura 3 relaciona-se às amostragens conduzidas no ponto 9 da Figura 1A, nos meses de julho e outubro de 2006 e janeiro/2007. Tais

resultados são mostrados à parte porque, para este ponto, não foram realizadas coletas no mês de abril/2006. O número de indivíduos coletados no ponto 9 no mês de julho/2006 é quase 2/3 do coletado nos 8 pontos restantes para o mesmo mês, totalizando uma densidade três vezes maior que a média dos outros pontos. Essa concentração particular de medusas não foi observada no mês de outubro para o mesmo ponto. Variações sazonais desse tipo também são detectadas quando outros pontos de amostragem são analisados individualmente. Em uma coleta realizada no mês de agosto/2007, no ponto 9 da Figura 1A, foram amostrados 200 exemplares, o que representou a maior densidade aferida nas amostragens realizadas em volta da Ilha de São Sebastião (aproximadamente 1 indivíduo a cada 15m²).

Os arrastos conduzidos no mês de outubro/2006, em Pontal do Sul, mostraram que, nessa região, a espécie também é abundante na primavera. Entre os pontos 1 a 6 da Figura 1B, 1051 indivíduos foram coletados, 167 entre os pontos 2, 3 e 4, e 889 entre os pontos 5 e 6.

Figura 2. Somatória do número de medusas coletadas em cada mês de amostragem nos pontos 1 a 8 da Figura 1A. O valor da densidade (indivíduos/m²) aparece em parênteses.

Figura 3. Somatória do número de medusas coletadas em cada mês de amostragem no ponto 9 da Figura 1A. O valor da densidade (indivíduos/m²) aparece em parênteses.

Estado de maturação dos espécimes

Nas quatro estações do ano foram coletados indivíduos com DU menor que 5cm, os quais poderiam ser classificados no estágio “1 = *immature*” ou “2 = *early maturation*”, e indivíduos entre 5cm e 7cm, estágios “2 = *early maturation*”, “3 = *mature*”, ou “4 = *spent*” (sistematização das classes de tamanhos segundo Macchi *et al.*, 1995).

Uma maior proporção de espécimes entre 5cm e 7cm de DU (estágios 2 a 4) foi encontrada nas coletas de abril/2006 e janeiro/2007, em relação a julho/2006 e outubro/2006, quando a maior parte da população amostrada encontrava-se abaixo dos 5cm de DU (estágios 1 e 2). A diferença foi significativa (Figura 4) entre o grupo de dados das coletas de inverno-primavera e o grupo de dados de verão-outono (Teste de Kruskal-Wallis = 145,15; $p < 0,05$).

Por outro lado, o DU do material coletado em Pontal do Sul em outubro de 2006 não teve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao material amostrado no mesmo mês em São Sebastião (Figura 5), para as seguintes hipóteses alternativas: mediana 1 $\neq$ mediana 2 ($W=21816,5$ e $p=0,756$); mediana 1 $>$ mediana 2 ($W=21816,5$ e $p=0,622$); mediana 1 $<$ mediana 2 ($W=21816,5$ e $p=0,378$).

Figura 4. Distribuição das medições de diâmetro umbrelar (DU), segundo o mês de coleta, nos pontos 1 a 8 da figura 1A. Para cada amostra, a linha vertical indica os valores mínimo e máximo, os quadrados pequenos representam valores únicos que caem por fora dessa distribuição, e a linha horizontal dentro das caixas representa a mediana.

Figura 4. Distribuição das medições de DU obtidas para o material coletado em outubro/2006 nas localidades de São Sebastião (SS) e Pontal do Sul (PS). Para cada amostra, a linha vertical indica os valores mínimo e máximo, os losangos representam valores únicos que caem por fora dessa distribuição, e a linha horizontal dentro das caixas representa a mediana.

Hábito demersal

Os exemplares de *O. sambaquiensis* foram obtidos em todas as estações do ano por meio de coletas diurnas conduzidas com redes de arrasto de fundo. Coletas durante o dia e a noite em um mesmo ponto de amostragem foram realizadas para estudar possíveis variações nictemerais do comportamento da espécie, aparentemente demersal. O ponto 9 da Figura 1A foi selecionado para esta amostragem por ter apresentado grande abundância da espécie durante o período inverno-primavera. Nesse ponto conduzimos um arrasto diurno e outro noturno, com 14hs de intervalo. Redes de porta foram arrastadas a 32 metros de profundidade sobre o fundo, simultaneamente a arrastos oblíquos com rede de plâncton (malha de 200µm e 60cm de diâmetro de boca) com sistema de fechamento, entre 10 e 15m de profundidade na coluna de água. Apenas uma medusa foi coletada durante a noite e 200 foram capturadas no arrasto diurno com a rede de portas. A fauna acompanhante foi a mesma nas duas ocasiões, sendo composta por espécies de hábito demersal e bentônicas, (e.g: arraia *Atlantoraja platana* e *Sympterygia bonapartii*; peixe-morcego *Ogcocephalus vespertilio*; linguados; baiacus, família Tetraodontidae; caranguejos-ermitões; siris, *Callinectes* sp.; ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus*; estrelas-do-mar *Luidia senegalensis* e *Astropecten brasiliensis*). Nenhum espécime foi coletado com a rede plâncton em qualquer dos arrastos.

Em nenhum dos pontos mencionados, bem como em nenhuma estação do ano, foram coletados exemplares de *O. sambaquiensis* nas amostragens realizadas com redes de plâncton.

Habitat nerítico

As coletas conduzidas nos litorais de São Sebastião e Pontal do Sul demonstram a ocorrência da espécie na região nerítica costeira. Para testar a abrangência da distribuição em relação à distância da costa, foi conduzida uma coleta em pontos mais afastados do litoral. Arrastos foram realizados em um transecto desde a entrada do Canal da Galheta, na Baía de Paranaguá, até 24 milhas (44,5km) mar fora (pontos 7 a 13 da Figura 1B). O ponto mais longínquo da costa (ponto 7) apresentou características oceânicas (salinidade 36‰) e uma profundidade maior de 35 metros, os pontos médios desse transecto tiveram salinidade de 35‰, sendo ainda menor nos pontos mais próximos da costa. Exemplares de *O. sambaquiensis* foram coletados apenas nos dois últimos pontos do transecto (12 e 13), próximos à costa e onde a salinidade normalmente não supera os 34‰ (Emilson, 1959; Matsuura, 1986) (Tabela 1).

Tabela 1. Variação na presença de *O.sambaquiensis* em relação à distância do litoral, em amostragem realizada em um transecto de 44,5km transversal à entrada da baía de Paranaguá.

Ponto do Arrasto ¹	Profundidade (m)	Salinidade (‰)	N° de indivíduos
7	35	36	0
8	32		0
9	27	35	0
10	24		0
11	20		0
12	15	35-34	9
13	10	34	11

¹ Os números correspondem aos pontos marcados na Figura 1B.

Observações *in situ*

Em arrastos de fundo realizados nos pontos 7 e 8 da Figura 1A (profundidades entre 12 e 25 m) foram coletados 79 e 204 exemplares em julho/2006 e outubro/2006, respectivamente. Os 79 exemplares coletados no inverno foram capturados com arrastos conduzidos entre os 20 e 25 metros de profundidade, aproximadamente às 14:00h, e com 6m de visibilidade na coluna d'água. No dia seguinte, novamente às 14:00h, com visibilidade entre 6-7m, foram realizados mergulhos livres na mesma área (Praia do Curral). Havia boas condições de observação da coluna d'água e dos organismos do macrozooplâncton, mas nenhum espécime de *O. sambaquiensis* foi avistado. Entretanto, um número significativo de outros organismos do macrozooplâncton, como *Mnemiopsis leidyi* (Ctenophora) e *Thalia democratica* (Chordata: Tunicata), foram coletados e observados.

Vários avistamentos foram feitos a partir da embarcação nas coletas realizadas em Pontal do Sul (pontos 1 a 6 da Figura 1B). A espécie *Lychnorhiza lucerna* (Scyphozoa: Rhizostomeae) era visível desde os primeiros metros da coluna d'água até a superfície. Ainda assim, a coleta de *L. lucerna* foi abundante nas redes de arrasto de portas e, embora também coletada abundantemente com mesma metodologia, nenhum espécime de *O. sambaquiensis* foi avistado próximo à superfície.

Espécimes de *Chrysaora lactea* (Scyphozoa: Semaestomeae) nadavam na superfície de zonas rasas de praias e foram coletados por mergulho livre nos litorais de São Sebastião (SP) e Bombinhas (SC). Esse comportamento de natação, próximo à superfície, foi também observado para medusas da mesma espécie no extremo sul do Canal de São Sebastião. Também no extremo sul do Canal de São Sebastião, a hidromedusa *Rhacostoma atlantica* foi coletada na superfície com puçá de plâncton, estando também presente nas amostragens feitas com redes de arrasto de fundo. Essa área é representada pelos pontos 7, 8, 9 da Figura 1A, em que *O. sambaquiensis* foi mais abundantemente coletada que as medusas das espécies mencionadas, por meio de arrasto de redes de fundo, mas nunca foi avistada na superfície.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As coletas conduzidas no litoral da Ilha de São Sebastião demonstraram a presença da espécie *Olindias sambaquiensis* ao longo do ano. Essas coletas, realizadas em diferentes estações do ano e sob diferentes condições climáticas, tiveram uma conseqüente variação sazonal e diária do regime de ventos da região, um fenômeno que causa variação das correntes de superfície e contracorrentes de fundo na área estudada (Emilson, 1962; Miranda & Castro Filho, 1995; Castro Filho *et al.*, 1998). Essas variações podem ter ocasionado diferenças entre os pontos de coleta na micro-distribuição da população de *O. sambaquiensis*, mas não de um jeito determinante na ausência ou presença da espécie como um todo. Além das particularidades da amostragem e do ponto de coleta, as Figuras 2 e 3 demonstram um padrão sazonal na ocorrência da espécie, com uma queda muito pronunciada no verão.

Para populações de *O. sambaquiensis* do litoral argentino, foi determinado que a maioria dos machos atinge a maturidade reprodutiva entre os 4cm e 5cm de DU, enquanto as fêmeas a atingem geralmente a partir dos 6cm de DU (Macchi *et al.*, 1995). Adotando-se esta sistematização, e considerando-se todos os períodos de amostragem, foram encontrados exemplares com dimensões correspondentes ao de indivíduos maduros e imaturos em todas as estações do ano. Embora este fato possa ser interpretado como indício de que a espécie manteve o potencial reprodutivo durante todo o ano, houve um pico de amostragem no número de indivíduos nos meses de inverno-primavera, seguido de um decréscimo no verão. O aumento no tamanho populacional foi caracterizado também pela presença de uma maior proporção de espécimes com DU correspondente ao de indivíduos imaturos. Assim, para compreender em detalhes o ciclo da espécie na área estudada, e considerando-se o caráter meroplancônico da espécie, ainda é necessário investigar a dinâmica de uma eventual população de pólipos, a qual poderia passar por um pico de liberação de medusas (reprodução assexuada) no período outono-inverno. Pólipos desta espécie ainda não foram descritos para o litoral brasileiro.

A queda na abundância em janeiro/2007 foi abrupta, diminuindo em 10 vezes a densidade de medusas em relação a outubro/2006. Parte dessa perda deve estar relacionada à morte de indivíduos, eventualmente após cumprido seu ciclo reprodutivo, como evidenciado pelas medusas com mesogléia degradada coletadas no verão. Um segundo fator que pode estar relacionado a essa diminuição, pode ser as alterações do ambiente das medusas na estação, como a chegada de águas mais frias (Águas Centrais do Atlântico Sul, ACAS) pelo fundo no verão (Matsuura, 1986). Nossos dados demonstram que a população de medusas se recuperou no outono, o que pode indicar um processo cíclico e anual.

A dinâmica populacional aqui descrita parece ser característica do litoral sul-sudeste do Brasil. Independentemente do grau de conectividade entre as comunidades de São Sebastião (SP) e Pontal do Sul (PR), aspecto não abordado no presente estudo, a composição das populações das duas regiões mostrou-se homogênea em relação aos tamanhos dos organismos coletados no mesmo mês (outubro/2006) (Figura 4).

É interessante notar que o pico de crescimento populacional observado no inverno-primavera para as populações estudadas no Brasil é temporalmente oposto ao padrão observado para o litoral sul da Província de Buenos Aires (Argentina), onde a maior abundância da espécie é observada no verão (Mianzan & Zamponi, 1988; Chiaverano *et al.*, 2004). Coincidentemente, as populações dos litorais do estado de São Paulo (Brasil) e da província de Buenos Aires (Argentina) constituem os extremos norte e sul da distribuição conhecida da espécie (Vannucci, 1951a; Mianzan & Zamponi, 1988). Na época em que as águas costeiras dessas regiões atingem uma temperatura superficial similar, entre 20 e 23°C (Boltovskoy, 1981; Matsuura, 1986; Lucas *et al.*, 2005), ambas as populações apresentam um pico de crescimento. Outra característica comum é a presença de medusas com mesogléia e umbrelas degradadas nos meses de decréscimo populacional, em março-abril na Argentina (Chiaverano *et al.*, 2004), e em janeiro no Brasil.

A espécie atingiu o menor número de medusas coletadas na área estudada nos meses do verão, quando a ACAS geralmente está mais próxima da costa e pode gerar uma termoclina de temperatura mais baixa no fundo (Emilson, 1959; Matsuura, 1986). O pico de crescimento populacional observado no inverno-primavera encontra-se relacionado à massa de água costeira (AC), a qual não possui estratificação térmica significativa durante o inverno. Essa massa d'água conforma um ambiente compartimentado diferente das correntes oceânicas da região, possui uma salinidade que não supera os 35‰ e se encontra sujeita tanto a maiores variações em suas características físico-químicas quanto à ação de ventos e marés que podem originar meandros e contracorrentes (Emilson, 1959; Emilson, 1961; Boltovskoy, 1981; Matsuura, 1986; Lucas *et al.*, 2005). A associação com a AC foi também observada na coleta realizada em Pontal do Sul (PR) (pontos 1 a 13 da Figura 1B), em outubro/2006. Ademais, os espécimes da Argentina também mostram associação com uma região caracterizada pela presença de AC, com salinidade inferior a 34‰, diferente das águas de plataforma, que estão encostadas, no seu lado leste, sobre a corrente das Malvinas, a qual pode passar a centenas de quilômetros de distância do litoral (Boltovskoy, 1981; Lucas *et al.*, 2005).

Olindias sambaquiensis possui um comportamento peculiar. Embora o método clássico para coleta de hidromedusas seja a utilização de rede para captura de

zooplâncton do tipo Hensen, com malha de até 300µm de abertura para facilitar a retenção de indivíduos pequenos (Ramírez & Zamponi, 1981), esta apenas excepcionalmente captura os indivíduos de *O. sambaquiensis*. Uma vez que os espécimes podem alcançar vários centímetros de diâmetro, eles são comumente capturados por pescadores nas redes de arrasto utilizadas na pesca comercial do camarão, de malhagens maiores. Essa coleta em arrastos de fundo indica que *O. sambaquiensis* apresenta hábitos demersais, o que é corroborado pela ausência de indivíduos em nossas amostras de plâncton. Esforços intensivos para a coleta de plâncton que foram realizados entre 1999 e 2000, com arrastos ao longo da coluna d'água, na área do Canal de São Sebastião (nas proximidades dos pontos 7 e 8 da Figura 1A), obtiveram apenas dois espécimes de *O. sambaquiensis* (Tronolone, 2001). Com metodologia semelhante, nenhuma *O. sambaquiensis* foi coletada no mesmo local entre 2005 e 2006, novamente com coletas intensivas (Otto Oliveira, com. pess.). Essa ausência contrasta com o grande número de espécimes coletados nos mesmos locais pelos arrastos com redes de portas. A hipótese de que o tamanho e a baixa densidade das medusas em alguns dos pontos de coleta sejam impeditivos para a coleta de *O. sambaquiensis* com redes de plâncton pode ser descartada, uma vez que essa metodologia foi efetiva para amostrar outros organismos planctônicos de dimensões similares, como os ctenóforos *Mnemiopsis leidyi* e *Beroe ovata*. Essa é mais uma evidência da ausência da espécie na coluna d'água e sua associação ao fundo. O hábito demersal da espécie também é confirmado por avistamentos de várias espécies de medusas na região superficial da coluna d'água, espécies estas também amostradas nas redes de arrasto, em número menor que *O. sambaquiensis*.

Dentro da subclasse Limnomedusae encontram-se associações de medusas ao fundo, como para *Armorhydra janowiczi* da família Armorhydridae (Swedmark & Teissier, 1958). O hábito também é conhecido para a família Olindiasidae, em que a espécie *Gonionemus vertens* é considerada semi-planctônica, por se encontrar comumente associada a algas (Bakker, 1980), substratos aos quais se adere com células especializadas situadas próximas do extremo distal dos tentáculos (Singla, 1977). Há também registros de *Olindias phosphorica* avistadas no fundo (Hartman & Emery, 1956) e de variações diurnas nesse comportamento, onde a medusa é encontrada sobre algas durante o dia e se alimentando ativamente de peixes durante a noite (Breder, 1956). Em nossa área de estudo, exemplares de *O. sambaquiensis* aderidos ao fundo já foram observados por mergulhadores (Alvaro E. Migotto, com. pess.). Ademais, estas observações são corroboradas pelo estudo do comportamento de espécimes em aquários, os quais mantiveram-se, durante a maior parte do tempo, próximos ao fundo, tocando este com os seus tentáculos. Vannucci (1951b) já havia observado este

comportamento em aquário, em que as medusas separavam-se do fundo realizando movimentos natatórios apenas para se alimentar e, possivelmente, por necessidades respiratórias, para logo voltar a se depositar no fundo do aquário. Além disso, há uma hipótese de que, no ambiente natural, a espécie apresente fototropismo negativo (Chiaverano, 2001). Igualmente, há a possibilidade de um mecanismo de regulação interna do ritmo circadiano para estes organismos. Parte do material obtido em algumas de nossas coletas foi analisado por outros pesquisadores para determinar a presença do hormônio Melatonina e do gene para sua principal enzima da via de biossíntese, a AANAT. O hormônio está envolvido na regulação do ritmo circadiano em organismos tão divergentes como metazoários basais e vertebrados. Resultados preliminares indicam a presença do gene para AANAT e do hormônio Melatonina tanto em *O. sambaquiensis* como também em outras espécies de medusas coletadas por nossa equipe (Rafael Peres & José Cipolla-Neto, com. pess.).

A hipótese de que esse comportamento demersal tenha variação nictemeral foi testada com arrastos diurnos e noturnos em um mesmo ponto de coleta. Embora haja somente uma amostragem, não permitindo testes estatísticos relacionados a erros amostrais, os dados corroboram a existência da variação nictemeral no comportamento demersal da medusa. Estudos futuros poderão refinar o conhecimento sobre a variação da posição dessas medusas em relação ao fundo, uma vez que as redes de arrasto utilizadas atingem uma altura de boca de aproximadamente 1,5m.

Dentro da classe Hydrozoa, há grandes variações nos ciclos de vida, divididas basicamente em três grandes estratégias diferentes: a) coexistência de pólipos e medusas; b) desaparecimento total ou parcial da medusa; c) redução do pólipo, o que em algumas espécies resulta numa existência holoplanctônica. Como o pólipo é sésil, a idéia clássica preponderante é que a medusa representa a fase dispersiva do ciclo de vida, o que se poderia interpretar como uma vantagem das espécies meroplanctônicas e holoplanctônicas quando comparadas com aquelas não produtoras de medusas. Paradoxalmente, se observou a presença de espécies cosmopolitas não produtoras de medusa em regiões insulares mostrando, aparentemente, maior capacidade de dispersão que as espécies formadoras de medusas (Cornelius, 1992a, 1992b). Por outro lado, foi demonstrado, por meio de estudos moleculares, que espécies meroplanctônicas de cifomedusas, previamente tidas como globalmente distribuídas, englobam um conjunto de espécies crípticas, mais restritas geograficamente (Schroth *et al.*, 2002; Dawson, 2005). Deste modo, a presença da medusa no ciclo de vida não é motivo *per se* para assegurar uma grande capacidade de dispersão. Além disso, especificamente para *O. sambaquiensis*, a capacidade dispersiva seria teoricamente mais limitada devido ao comportamento demersal circadiano da medusa.

Nossos resultados constituem fontes inéditas de informação sobre a biologia de *O. sambaquiensis*, e poderão ser ampliados e testados com maior esforço amostral em tempo e espaço. Entretanto, podemos concluir que há evidências de que a espécie possui características que podem favorecer um certo nível de estruturação populacional ao longo da sua distribuição geográfica, e certo grau de independência de recrutamento desde áreas longínquas, tais como:

- a) um ciclo anual no desenvolvimento da população de medusas que, constituindo a fase sexual do ciclo de vida, pode indicar que a espécie se reproduz localmente;
- b) a defasagem temporal desse ciclo que mostra uma dinâmica oposta entre as populações nos extremos da distribuição da espécie (Brasil-Argentina);
- c) associação da espécie à massa de Água Costeira, que se mostra como um ambiente compartimentado e relativamente independente das correntes oceânicas como ACAS, Subtropical do Brasil ou Corrente das Malvinas, muito mais amplas em área abrangida e com maior potencial de dispersão para espécie planctônicas;
- d) o comportamento demersal da medusa que, sendo compreendida como a fase dispersiva do ciclo de vida de grande parte das espécies meroplanctônicas, acaba sendo uma limitação dessa propriedade.

REFERÊNCIAS

- Bakker, C. 1980. On the distribution of *Gonionemus vertens* A. Agassiz (Hydrozoa, Limnomedusae), a new species in the eelgrass beds of Lake Grevelingen (S.W. Netherlands). *Aquatic Ecology* 14: 186-195.
- Boltovskoy, E. 1981. Masas de agua en el Atlántico sudoccidental. In Boltovskoy D. (ed.), *Atlas del zooplankton del Atlántico sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplankton marino*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata: 227-237.
- Breder, C. 1956. Notes on the behavior and habits of the medusa, *Olindias phosphorica tenuis* Fewkes. *Zoológica-New York* 41: 13-16.
- Castro Filho, B.M., L.B. Miranda. 1998. Hydrographic properties in the São Sebastião Channel: daily variations observed in March 1980. *Revista Brasileira de Oceanografia* 46: 111-123.
- Chiaverano, L. 2001. Crecimiento, desarrollo y posibles causas ambientales de agregación en *Olindias sambaquiensis* (Limnomedusae. Olindidae) durante su fase sexual en la zona de El Rincón (Bs. As. Argentina). Tesis de Grado, Facultad de Ciencias. Exactas. y Naturales,. Universidad de Mar del Plata. 69 pp.

- Chiaverano, L., H. Mianzan, F. Ramírez. 2004. Gonad development and somatic growth patterns of *Olindias sambaquiensis* (Limnomedusae, Olindiidae). *Hydrobiologia* 530/531: 373-381.
- Cornelius, P.F.S. 1992a. Medusa loss in leptolid hydrozoan (Cnidaria), hydroid rafting, and abbreviated life-cycles among their remote-island faunae: an interim review. *Scientia Marina* 56: 245-261.
- Cornelius, P.F.S. 1992b. The Azores hydroid fauna and its origin, with discussion of rafting and medusa suppression. *Arquipélago, Life and Earth Sciences* 10: 75-99.
- Dawson, M.N. 2005. *Cyanea capillata* is not a cosmopolitan jellyfish: morphological and molecular evidence for *C. annaskala* and *C. rosea* (Scyphozoa: Semaestomeae: Cyaneidae) in south-eastern Australia. *Invertebrate Systematics* 19: 361-370.
- Emilson, I. 1959. Alguns aspectos físicos e químicos das águas marinhas brasileiras. *Ciência e Cultura* 11: 44-54.
- Emilson, I. 1961. The shelf and coastal waters off southern Brazil. *Boletim do Instituto de Oceanografia de São Paulo* 11: 101-112.
- Emilson, I. 1962. As correntes marítimas no canal de São Sebastião. *Ciência e Cultura* 14: 269-270.
- Haddad, Jr. V., F.L. Silveira., J.L.C. Cardoso, A.C. Morandini. 2002. A Report of 49 cases of cnidarian envenoming from southeastern Brazilian coastal waters. *Toxicon* 40: 1445-1450.
- Hartman, O., K.O. Emery. 1956. Bathypelagic coelenterates. *Limnology and Oceanography* 1: 304-312.
- Lucas, A.J., R.A. Guerrero, H.W. Mianzan, E.M. Acha, C.A. Lasta. 2005. Coastal oceanographic regimes of the northern argentine continental shelf (34-43°S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65: 405-420.
- Macchi, G., H. Mianzan, H. Christiansen, F. Ramírez. 1995. Histology of the gonadal cycle of the stinging hydromedusa *Olindias sambaquiensis*, Müller, 1861 at Blanca Bay, Argentina. *Bolletino della Societa Adriatica di Scienze* 76: 59-68.
- Matsuura, Y. 1986. Contribuição ao estudo da estrutura oceanográfica da região sudeste entre Cabo Frio (RJ) e Cabo de Santa Marta Grande (SC). *Ciência e Cultura* 38: 1439-1450.
- Mianzan, H.W., P.J. Fenner, P.F.S. Cornelius, F.C. Ramírez. 2001. Vinegar as a disarming agent to prevent further discharge of the nematocyst of the stinging hydromedusa *Olindias sambaquiensis*. *Cutis* 68: 45-48.
- Mianzan, H.W., R.A. Guerrero. 2000. Environmental patterns and biomass distribution of gelatinous macrozooplankton. Three study cases in the south-western Atlantic Ocean. *Scientia Marina* 64: 215-224.

- Mianzan, H.W., M.O. Zamponi. 1988. Estudio bioecológico de *Olindias sambaquiensis* Müller, 1861 (Limnomedusae, Olindiidae) en el area de Monte Hermoso. II. Factores meteorológicos que Influyen en su aparición. Iheringia 2: 63-68.
- Nogueira Jr., M. 2004. Macrozooplâncton gelatinoso do litoral do Paraná: Composição, abundância e aspectos ecológicos. Dissertação de Mestrado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná. 164pp.
- Miranda, L.B., B.M. Castro-Filho. 1995. Variabilidade da circulação e do transporte do volume no Canal de São Sebastião. Publicação Especial do Instituto de Oceanografia de São Paulo 11: 1-9.
- Schroth, W., G. Jarms, B. Streit, B. Schierwater. 2002. Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. BioMed Central Evolutionary Biology 2: 1-10.
- Singla, C.L. 1977. Fine structure of the adhesive pads of *Gonionemus vertens*. Cell and Tissue Research 181: 395-402.
- Souza, D.T., M.A. Haddad, M. Nogueira. 2004. Ocorrência e sazonalidade de *Olindias sambaquiensis* Müller, 1861 no Litoral do estado do Paraná. XXV Congresso Brasileiro de Zoologia, Brasília, 8-13 de fevereiro de 2004.
- Statistical Graphics Corporation. 1997. Statgraphics*Plus* 3.0 for Windows.
- Swedmark, B., G. Teissier. 1958. *Armorhydra janowiczi* n. g., n. sp. hydroméduse benticue. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences de Paris 247: 133-135.
- Tronolone, V.B. 2001. Hidromedusas (Cnidaria, Hydrozoa) do Canal de São Sebastião, SP. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo. 169pp.
- Vannucci, M. 1951a. Distribuição dos Hydrozoa até agora conhecidos nas costas do Brasil. Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo 2: 105-124.
- Vannucci, M. 1951b. Hydrozoa e Scyphozoa existentes no Instituto Paulista de Oceanografia I. Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo 2: 67-98.
- Zamponi, M.O., O.N. Facal. 1987. Estudio bioecológico de *Olindias sambaquiensis* Müller, 1861 (Limnomedusae; Olindiidae) en el area de Monte Hermoso. I. Ciclo de vida. Neotrópica 33: 119-126.

Capítulo III

Estudo filogeográfico da hidromedusa *Olindias sambaquiensis* (Cnidaria: Medusozoa) no Oceano Atlântico Sul-ocidental.

Palavras chave: Filogeografia, DNA mitocondrial, diversidade genética, Hydrozoa.

Abstract: *Olindias sambaquiensis* is a meroplanktonic species, endemic to the Southwestern Atlantic Ocean, from the north shore of the state of São Paulo (Brazil) to San Blás Bay (Argentina). The Argentinean populations of *O. sambaquiensis* inhabit a circumscribed water mass with lower salinity and temperature than that of the Brazilian shore. The population dynamics and ecology of the species suggest a genetic structure along its distribution. Indeed, phylogeographic analyses based on mitochondrial DNA corroborate the existence of two groups of haplotypes with different demographic histories and phylogenetic positions.

Resumo: *Olindias sambaquiensis* é uma espécie meroplanctônica, endêmica do Atlântico Sul-ocidental, desde o litoral norte do Estado de São Paulo (Brasil) até a Baía de San Blás (Argentina). As populações argentinas de *O. sambaquiensis* habitam massas d'água circunscritas, com salinidade e temperatura inferiores que aquelas da costa brasileira. A dinâmica populacional e ecologia da espécie sugerem uma estruturação genética ao longo da sua distribuição. De fato, análises filogeográficas baseadas em marcadores mitocondriais corroboram a existência de dois grupos de haplótipos com histórias demográficas e posições filogenéticas diferentes.

INTRODUÇÃO

Olindias sambaquiensis F. Müller, 1861 (Hydrozoa, Limnomedusae) é uma espécie de hidromedusa (Cnidaria, Hydrozoa) considerada endêmica do Oceano Atlântico Sul-ocidental, distribuída desde o litoral norte do Estado de São Paulo (Brasil) até a Baía de San Blás (Província de Buenos Aires, Argentina) (Vannucci, 1951; Mianzan & Zamponi, 1988). A espécie possui um ciclo de vida meroplanctônico, com uma fase de pólipó sésil que produz assexuadamente medusas, as quais representam a fase sexual do ciclo de vida (Zamponi & Facal, 1987). Populações de medusas apresentam a razão sexual de machos para fêmeas de 1:1 (Macchi *et al.*, 1995). Seu ciclo de vida conta com larvas plânulas ciliadas, as quais possuem uma duração curta no plâncton, logo assentando-se e recrutando-se ao fundo, onde se deslocam até reconhecer um substrato adequado para o desenvolvimento de um novo pólipó (Zamponi & Facal, 1987). Ao longo de sua distribuição, a espécie ocupa uma região com aspectos ecológicos e oceanográficos

diversos (Boltovskoy E., 1981; Boltovskoy D., 1981; Matsuura, 1986). Em seu limite sul, no litoral argentino, *O. sambaquiensis* habita águas com temperaturas e salinidades inferiores às da região costeira da zona nerítica brasileira, além de contar com a circulação fechada e diferenciada da corrente das Malvinas (Emilson, 1961; Boltovskoy E., 1981; Capurro, 1981; Lucas *et al.*, 2005). Por outro lado, alguns aspectos da ecologia e dinâmica populacional da espécie (Capítulo 2 desta dissertação) sugerem a possibilidade de haver estrutura genética ao longo da sua distribuição.

Por um lado, padrões filogeográficos de populações de *O. sambaquiensis*, ou como estes padrões respondem às diferentes condições oceanográficas da área de distribuição, não são conhecidos. Tal desconhecimento deve-se à escassez, de estudos filogeográficos para espécies de Hydrozoa como um todo, além da inexistência dos mesmos para este grupo no Atlântico Sul-ocidental e em escalas regionais. Diante desse desconhecimento, este estudo tem por objetivo investigar a estrutura populacional e filogeografia de *O. sambaquiensis* no Atlântico Sul-ocidental, correlacionando a biologia da espécie com sua presença em ambientes oceanográficos heterogêneos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Coletas de material biológico no Brasil foram realizadas por meio de arrastos de redes de porta para pesca comercial de camarão, com malha da rede variando de 13 a 20 mm e largura da boca variando de 8 a 10 m. Os pontos amostrados no Brasil pertencem aos litorais da localidade de São Sebastião (SS) estado de São Paulo (dia 19 de julho de 2006, 23°50'S/45°13'W), Pontal do Sul (PS), estado de Paraná (dia 04 de outubro de 2006, 25°39'S/48°24'W) e Bombinhas (BO), estado de Santa Catarina (dia 30 de outubro de 2006, 27°07'S/48°34'W) (Figura 1). Para a obtenção de material do litoral argentino foram realizadas

Figura 1. Os círculos representam os locais de amostragem de *O. sambaquiensis*, *n*=número de espécimes seqüenciados para o marcador CO1, SS= São Sebastião, PS= Pontal do Sul, BO= Bombinhas, CL= Claromecó, RP= Rio da Prata.

coletas de medusas arribadas na praia da localidade de Claromecó (CL), Província de Buenos Aires, (dia 16 de janeiro de 2006, 38°55'S/60°03'W) e um exemplar foi capturado

na desembocadura do Rio da Prata (RP) (dia 12 de fevereiro de 2000, 35°06'S/56°45'W) (Figura 1). Espécimes-testemunho dos materiais coletados, conservados em álcool e formol, são parte da coleção do Laboratório de Estudos em Medusozoa do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), e serão devidamente depositados na Coleção de Cnidários do Museu de Zoologia da USP.

Análises moleculares

Extrações de DNA genômico do material conservado em álcool 93° foram conduzidas utilizando os reagentes EZ-DNA (Biosystems) e Instagene (Bio-Rad). Para tal fim, porções de poucos milímetros de tecido do manúbrio de cada medusa foram extraídas. O DNA obtido foi amplificado por meio de PCR seguindo um perfil de reação de 3 ciclos (94°C/2min, 45°C/1min, 72°C/1min), 30 ciclos (94°C/40s, 49°C/30s, 72°C/50s) e 72°C/5min de extensão final. Foram utilizados os *primers* dos segmentos dos genes mitocondriais da subunidade 1 da proteína citocromo oxidase (CO1), desenhados por Folmer *et al.* (1994), e os da subunidade ribossomal 16S, desenhados por Cuninham & Buss (1993). O volume de reação foi de 25µL, incluindo: DNA-1µL, mix de dNTPs (200µM)-0,5µL, buffer Taq 10X (Fermentas)-2,5µL, MgCl₂ 1,5mM-1,5µL, 1µL de cada primer (1µM) e 0,1µL de Taq (Fermentas). Os produtos de PCR foram purificados por meio de *kits* de coluna de afinidade com partículas magnéticas AMPure® (Agencourt®) e ChargeSwitch® (Invitrogen™). O DNA purificado foi submetido à marcação fluorescente por PCR, em reações independentes para as fitas *forward* e *reverse*, utilizando o reagente Big Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Após precipitação, os produtos dessas reações foram enviados ao Serviço de Seqüenciamento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, onde ambas fitas de DNA de cada amostra foram seqüenciadas utilizando um equipamento ABI PRISM® 3100 (Hitachi).

Os cromatogramas obtidos após seqüenciamento foram analisados visualmente, não se detectando presença de picos duplos, como esperado para amostras com um único haplótipo, com a cautela de se conferir que não se tratavam de seqüências de pseudo-genes nucleares. Seqüências consenso foram obtidas a partir desses cromatogramas utilizando o programa PhredPhrap (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998) e visualizadas com o programa Consed (Gordon *et al.*, 1998). Também foram realizados *blasts*, na base de dados GenBank, para os quais essas seqüências coincidiram com os mesmos fragmentos mitocondriais pertencentes a outras espécies de medusozoários, representando uma segunda confirmação de que as seqüências obtidas pertencem ao DNAm_t. A maior presença de transições (ts) em relação a transversões (tv), na razão superior ao dobro, foi também considerada evidência de que as seqüências pertencem ao DNAm_t, uma vez que o mesmo é caracterizado por uma maior taxa de ts/tv que o DNA nuclear (Bazin *et al.*, 2006). A seqüência de aminoácidos

codificada também foi determinada para o fragmento do marcador CO1 obtido, utilizando-se uma sequência de tal proteína pertencente à espécie do cnidário *Palythoa tuberculosa* (Anthozoa, Hexacorallia), obtida do GenBank sob o código BAE48388 e publicada por Reimer *et al.* (2006).

Com exceção de algumas bases eliminadas dos extremos 5' e 3', que por particularidades do seqüenciamento geraram regiões de pareamento dificultoso, tanto as matrizes de seqüências parciais dos genes 16S como as do CO1, alinhadas com o programa Clustal (Thompson *et al.*, 1994) em Bioedit (Hall, 1999), não apresentaram *gaps*. Desta forma, as seqüências foram então tratadas como dados pré-alinhados nas análises posteriores.

Análises de dados

O relacionamento filogenético entre os haplótipos foi estudado por meio de análises de parcimônia, utilizando o programa PAUP* 4.0 (Swofford, 2002). Esta análise consistiu de uma busca heurística com 1000 réplicas com algoritmo de adição aleatória de seqüências, adotando a estratégia de busca TBR com ponderação sucessiva de caracteres. Duas seqüências de CO1 da espécie *Maeotias marginata* (Limnomedusae, Olindiasidae) obtidas do GenBank (códigos AF383926 e AF383927; Vainola & Oulasvirta, 2001) foram utilizadas como terminais para enraizamento dos haplótipos de *O. sambaquiensis*. Três seqüências de 16S pertencentes às espécies *Maeotias marginata*, *Craspedacusta sinensis* e *Olindias phosphorica* (Limnomedusae, Olindiasidae), publicadas por Collins *et al.* (2005), obtidas do GenBank sob os códigos AY512508, AY512507 e AY512509 respectivamente, foram utilizadas com o mesmo fim.

Comparações par a par (*pairwise analyses*), utilizando o programa DnaSP 4.20.2 (Rozas *et al.*, 2003), foram realizadas com a finalidade de obter diferentes parâmetros estatísticos indicadores da diversidade genética das amostras, a saber, número de haplótipos (*h*); diversidade haplotípica (*H*); número de sítios polimórficos (*S*); número médio de diferenças nucleotídicas (*k*); diversidade nucleotídica Π (π).

Evidências de subdivisão geográfica foram obtidas por meio de métodos de análises da variância molecular (AMOVA) e de comparações par a par dos valores de *Fst* e de diversidade nucleotídica, utilizando o programa de computação Arlequin 2.01 (Schneider *et al.*, 2000). As amostras RP e BO não foram incluídas em tais análises por apresentarem apenas um e três espécimes amostrados respectivamente. Dois modelos de agrupamentos foram utilizados na AMOVA para dividir a variância molecular total em diferentes componentes: diferenças dentro das populações, entre as populações e entre grupos. Os modelos testados foram: 1- Sem agrupamento, (SS, PS, CL), considerando as três localidades amostradas como pertencentes a uma única população; 2- Dois grupos, (SS, PS)/(CL), separando as localidades do Brasil, geograficamente mais

próximas entre si, da amostra argentina. A conectividade entre as localidades foi estimada por meio do número de migrantes por geração Nm , aplicando as equações de F_{st} (equation 3) e Nm (equation 4) publicadas por Hudson *et al.* (1992) com o programa DnaSP. Por se tratar de DNAm, Nm é o produto entre o número efetivo de fêmeas (N_f) em cada subpopulação e a fração de fêmeas migrantes (m_f) em cada subpopulação a cada geração, representando o número efetivo de fêmeas migrantes em cada subpopulação por geração.

Análises da distribuição das diferenças nucleotídicas par a par entre as distintas seqüências (*mismatch distribution*) foram conduzidas para testar as hipóteses de equilíbrio *versus* expansão populacional utilizando DnaSP. Valores de Tau, $\tau=2\mu Lt$, dos tempos de expansão populacional, onde μ é a taxa de mutação e L o comprimento da seqüência analisada (Roger & Harpending, 1992), também foram obtidos, assim como os índices para testar a significância estatística das análises: o SSD (*sum of square deviations*) desvio da soma de quadrados entre as distribuições observadas e esperadas sob o modelo de expansão populacional e o índice de Harpending (Harpending, 1994). O teste de desvio da neutralidade F_s (Fu, 1997), sensível à expansão populacional, também foi aplicado para avaliar esse cenário. Os valores dos estimadores do índice Teta ($\theta=2N\mu$, em que N = tamanho efetivo populacional) da estimativa da taxa de mutação, calculados para tal teste, foram utilizados também nas simulações por coalescência (Hudson, 1990), dirigidas a obter o grau de significância das estatísticas resultantes. Uma vez que alguns padrões de distribuição da diversidade genética podem ser indistinguíveis entre os ocasionados pelo efeito da seleção natural daqueles ocasionados pelos processos demográficos, como efeitos de gargalo ou expansões populacionais, o teste de neutralidade MK (McDonald & Kreitman, 1991) também foi conduzido para detectar evidência de desvio da neutralidade devido à seleção natural. As mesmas duas seqüências de CO1 da espécie *M. marginata* mencionadas acima foram utilizadas como grupo externo desta análise, para a qual foi utilizando o programa DnaSP.

RESULTADOS

Polimorfismo dos marcadores 16S e CO1

Seqüências de DNAm, obtidas de um mesmo grupo de 21 espécimes, mostraram um menor grau de polimorfismo no marcador 16S que no marcador CO1 (Tabela 1). Diante desse padrão, um maior esforço de obtenção de seqüências de CO1 foi realizado para conduzir as análises populacionais apresentadas.

Tabela 1. Comparação do grau de informação contida no polimorfismo observado de seqüências parciais dos genes mitocondriais 16S e CO1, para um mesmo grupo de 21 espécimes de *O. sambaquiensis*.

Marcador	Pb^1	S^2	SIP^3	h^4	H^5	k^6	π^7
16S	517	21	3	9	0,781	2,962	0,006
CO1	568	37	15	20	0,995	7,224	0,013

¹Número de pares de bases das seqüências estudadas.

²Número de sítios variáveis.

³Sítios informativos para parcimônia.

⁴Número de haplótipos.

⁵Diversidade haplotípica.

⁶Número médio de diferenças nucleotídicas.

⁷Diversidade nucleotídica.

Relacionamentos haplotípicos

A análise filogenética de 25 seqüências parciais do marcador 16S (4 de SS, 10 de PS, 3 de BO, 1 do RP, 4 de CL e 3 do grupo externo) não revelou definição dos relacionamentos entre os haplótipos do grupo interno (1 árvore, 162,6 passos, CI=0,992; RI=0,983). Tal análise contou com apenas três sítios informativos para parcimônia no grupo interno, que não resolveram agrupamentos diferenciais entre haplótipos das distintas localidades. Por outro lado, a análise por parcimônia de 40 seqüências do marcador CO1, (11 de SS, 12 de PS, 3 de BO, 1 do RP, 11 de CL e 2 do grupo externo), com 21 sítios informativos para parcimônia no grupo interno, resultou em 153 cladogramas mais parcimoniosos

Figura 2. Cladograma para o marcador mitocondrial CO1, obtido em uma análise por parcimônia para os 38 espécimes (terminais) coletados em diferentes localidades do Brasil (BR) e da Argentina (AR). Os símbolos: ▲, ● e ■, representam haplótipos que são compartilhados por diferentes terminais. SS=São Sebastião, PS=Pontal do Sul, BO=Bombinhas, CL=Claromecó, RP=Rio da Prata.

(134,33 passos, CI=0,925, RI=0,940). O consenso estrito de tais cladogramas, no qual cada terminal corresponde à sequência obtida para um espécime de *O. sambaquiensis*, revelou uma topologia mais informativa que a obtida para o marcador 16S (Figura 2).

Na figura 2 observa-se que os ramos basais foram ocupados por representantes das amostras coletadas no litoral brasileiro (SS, PS, BO). Por sua vez, as amostras coletadas no litoral argentino (RP, CL) se situaram todas em um mesmo clado apical, ainda que não possam ser corroboradas como formando um grupo monofilético por estarem em uma politomia com haplótipos de SS, PS e BO. Como a análise tem um caráter intra-específico, para o qual se supõe que os tempos evolutivos são curtos para o aparecimento dos entrenós, não deve ser descartada a possibilidade de separação incompleta das linhagens (*incomplete lineage sorting*), assim como processos de introgressão que estejam contribuindo para o estabelecimento desse padrão (Moore, 1995). A posição apical desta politomia corroboraria a hipótese de introgressão (Peters *et al.*, 2007).

Outro aspecto interessante é que apenas aparece um único haplótipo repetido entre as localidades brasileiras, compartilhado pelos terminais Osa28SS e Osa11PS. Entretanto, CL mostra o aparecimento de dois haplótipos repetidos, um deles compartilhado pelos terminais Osa01/02/05CL e outro pelos terminais Osa07/10CL, revelando uma menor diversidade haplotípica.

Estrutura genética

A tabela 2 mostra os resultados da AMOVA entre as localidades amostradas com $n > 10$ espécimes seqüenciados para o marcador CO1 (SS, PS, CL) e como a variação genética total se distribui entre os dois modelos de agrupamento testados. O modelo 1, sem restrições de agrupamento, revelou que as diferenças entre localidades representam cerca de 17% da variância total, o que é estatisticamente significativo. No modelo 2, que

Tabela 2. Resultados da AMOVA entre as localidades SS ($n=11$), PS ($n=12$) e CL ($n=11$) e distribuição da variação genética sob modelos diferentes de agrupamentos definidos *a priori*. Os valores de significância estatística (p) foram obtidos por 1023 permutações não paramétricas, ($g.l.$ =graus de liberdade). Os diferentes componentes da variância informados são: Va = variância da diferença entre populações, Vb = da diferença dentro das populações dentro de grupos e Vc = entre haplótipos dentro das populações.

Estrutura de populações testada	Origem da variação	<i>g.l.</i>	Soma de quadrados	Componentes da Variância	% da Variância	<i>p</i>
Sem agrupamento: 1-(SS, PS, CL)	Entre populações	2	22.737	0.67007 Va	16.96	0,00
	Dentro das populações	31	101.705	3.28079 Vb	83.04	
Dois grupos: 1-(SS, PS) 2-(CL)	Entre grupos	1	17.489	0.89144 Va	20.94	0,34
	Entre populações dentro de grupos	1	4.248	0.08427 Vb	1.98	0,28
	Dentro das populações	31	112.462	3.62781 Vc	77.08	0,00

agrupa as amostras do litoral brasileiro em contraposição à amostra argentina de CL, as

diferenças foram ainda maiores, 20,94% da variância total, embora não seja significativamente maior que o esperado aleatoriamente. Neste segundo agrupamento pode se observar que a porcentagem da variância total devido à diferença entre as populações dentro de grupo não é significativa (1,98%, $p=0,28$) o que se refere diretamente a uma homogeneidade entre as localidades brasileiras de SS e PS.

Como sugerido pelos resultados da AMOVA, tanto a comparação par a par dos índices de fixação (Tabela 3) como da divergência genética (Tabela 4) mostram que a população CL (F_{st} : 0.20) é significativamente diferente das localidades SS (F_{st} : 0.14) e PS (F_{st} : 0.17), sendo que as últimas não se mostraram significativamente diferentes entre si. A estimativa da taxa de migração calculada resultou em aproximadamente uma a duas fêmeas migrantes por geração entre as localidades do Brasil e Argentina (Tabela 3). A pouca estruturação entre SS e PS revelou um Nm equivalente a quase 64 fêmeas migrantes por geração entre as localidades, considerando-se as mesmas como pertencentes a uma mesma unidade populacional.

Tabela 3. Fluxo gênico e diferenciações par a par entre as localidades SS ($n=11$), PS ($n=12$) e CL ($n=11$). Abaixo da diagonal estão os índices de fixação populacional (F_{st}) par a par, entre parênteses valores das probabilidades (1023 permutações). Sob a diagonal está o número de migrantes por geração (Nm).

Localidade	SS	PS	CL
SS		63,94	2,33
PS	0,009 (0,28)		1,05
CL	0,177 (0,00*)	0,320(0,00*)	

*Diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 4. Comparações par a par da divergência nucleotídica entre localidades SS ($n=11$), PS ($n=12$) e CL ($n=11$). Sobre a diagonal está o número médio de diferenças par a par entre localidades, entre os parênteses valor das probabilidades. Abaixo da diagonal estão as médias corrigidas das diferenças par a par.

Localidade	SS	PS	CL
SS		7,81 (0,22)	7,95 (0,00)*
PS	0,06		7,94 (0,00)*
CL	1,40	2,56	

*Diferenças estatisticamente significativas.

Diversidade genética, neutralidade e história demográfica

As comparações par a par intra-localidades também revelam que a diversidade genética da amostra CL é menor que a das localidades SS e PS (Tabela 5). As medidas de diversidade haplotípica e nucleotídica são mais altas nas localidades SP e SC que em BA. Entretanto, é detectado um desvio estatisticamente significativo da neutralidade para os haplótipos obtidos da população brasileira (SS-PS), mas não para os da localidade argentina (CL) (Tabela 5). Tal resultado do teste F_s coincide com outros resultados das comparações pareadas (Figura 3), nas quais a unidade populacional SS-PS revelou um maior ajuste com a distribuição esperada sob um modelo de expansão populacional que a localidade CL. O teste SSD (0,007, $p=0.660$) e o índice de Harpending (0,014, $p=0.850$)

também não revelaram diferenças significativas com o esperado sob o modelo de expansão populacional para o agrupamento SS-PS.

Tabela 5. Caracterização genética das três localidades estudadas mostrando: número de seqüências obtidas (n), número de haplótipos diferentes (h), diversidade haplotípica (H) com a variância (V_h), diversidade nucleotídica (π), valor de Teta (θ_π) e resultado do teste de neutralidade de F_s com o valor da probabilidade.

Localidade	n	h	$H \pm V_h$	π	θ_π	$F_s (p)$
SS	11	11	1,000 $\pm$ 0,001	0,016	8,909	-4,592 (0,011*)
PS	12	12	1,000 $\pm$ 0,001	0,012	6,590	-6,751 (0,002*)
CL	11	8	0,964 $\pm$ 0,003	0,007	4,182	-1,961 (0,118)

*Valores estatisticamente significativos.

Figura 3. Distribuição de diferenças par a par entre as seqüências parciais de CO1 da população brasileira (SS-PS) à esquerda ($n=23$), e as da população argentina (CL) à direita ($n=11$), SS = São Sebastião, PS = Pontal do Sul, CL = Claromecó. A linha cheia representa a distribuição esperada (Esp.) sob o modelo de Expansão Populacional (EP) e a linha com círculos a distribuição Observada (Obs.).

Comparativamente, não foram obtidos resultados coincidentes com o esperado sob um modelo de expansão populacional para os haplótipos de CL (SSD=0,140, $p=0,000$ e índice de Harpending=0,292, $p=0,010$). Um valor de Tau de 9,652 revela que esse evento de expansão populacional do grupo de haplótipos SS-PS pode ter sido muito antigo, além de mostrar um padrão multimodal (Figura 3) e um valor médio de diferenças par a par elevado (7,731), revelando uma história populacional longa, com possibilidade de acontecimento de algum evento de gargalo ou subdivisão populacional.

O teste MK não revelou desvio de neutralidade ($p=0,583$), pelo que não foi detectada evidência de seleção natural positiva ou negativa agindo diretamente sobre o

segmento do marcador CO1 utilizado nas análises desenvolvidas no presente trabalho (Tabela 6).

Tabela 6. Tabela do teste MK e índice de neutralidade obtido sem desvio significativo da neutralidade.

	Substituições sinônimas	Substituições não sinônimas
Diferenças fixas entre espécies	75	8
Sítios polimórficos	47	7

Índice de neutralidade = 1,396; $p = 0,583$.

DISCUSSÃO

As análises de diferenciação populacional (AMOVA e comparações pareadas de *Fst* e diversidade nucleotídica) detectaram que os haplótipos obtidos para o marcador CO1 nas localidades SS-PS e CL pertencem a dois agrupamentos populacionais diferentes. Entretanto, mais amostragens, principalmente no litoral do Brasil (estados de Santa Catarina e Rio Grande de Sul), são necessárias para determinar se esse padrão está associado a um isolamento por distância ou a uma quebra filogeográfica em alguma latitude entre Brasil e Argentina. Tais pontos não amostrados poderiam ser interpretados como pertencentes a “populações fantasmas” (*ghost populations*) para as quais as análises apresentadas neste trabalho não aportaram dados, o que poderia enviesar, por superestimação, os índices θ e *Nm* obtidos (Beerli, 2004). Deste modo, existiria a possibilidade de que o fluxo gênico entre as localidades do Brasil e Argentina se revelasse ainda menor que o detectado nas análises apresentadas, reforçando a evidência da estruturação genética informada para as localidades estudadas. Por outro lado, os dados sobre a história natural da espécie, apresentados no Capítulo 2 revelaram uma dinâmica populacional diferente para as populações argentinas e brasileiras de *O. sambaquiensis*, ocupando extremos de sua distribuição conhecida. Deste modo, os dados apresentados sobre a genética de populações da espécie coincidem e poderiam estar correlacionados com a observação de que a mesma habita regiões com diferentes condições oceanográficas, mostrando populações com sazonalidades opostas nos seus ciclos reprodutivos anuais e uma fase de medusa com um comportamento demersal diurno que, a princípio, sugere uma limitação no seu poder dispersivo (Capítulo 2).

A análise por parcimônia dos relacionamentos haplotípicos revela, por um lado, um posicionamento preponderantemente basal das seqüências obtidas das amostras das localidades brasileiras, enquanto os haplótipos obtidos de amostras do litoral argentino ocupam só uma posição apical. Eventos de introgressão e/ou separação incompleta de linhagens também são evidentes, devido à presença de alguns haplótipos das localidades brasileiras no mesmo clado que haplótipos das localidades argentinas. Por

outro lado, os resultados obtidos com a análise de distribuição de diferenças nucleotídicas par a par mostram uma expansão populacional antiga para os haplótipos de SS-PS, não se detectando tal evento para aqueles da localidade argentina.

A ação da seleção natural agindo diretamente no segmento do marcador CO1 utilizado, originando o padrão de estruturação geográfica observado, não foi detectada, como revelado pelo resultado do teste MK. Entretanto, não é possível ignorar que, em se tratando de um gene mitocondrial, este pode experimentar o efeito “carona” (*hitchhiking*). Tal efeito, que pode afetar marcadamente o genoma mitocondrial (Bazin *et al.*, 2006), acontece quando um gene selecionado positivamente se espalha pela população, levando consigo outros genes ligados à mesma região cromossômica, com conseguinte diminuição da diversidade genética populacional em tal região,

Pelo exposto, além das condições de circulação das massas d’água das regiões habitadas pelas partições populacionais detectadas, e da distância entre elas, não é possível descartar completamente que a estrutura genética observada seja também devida à adaptação local por seleção positiva ou, inclusive, por efeito da seleção purificadora de genes levemente deletérios agindo sobre o genoma mitocondrial. Entretanto, isto não necessariamente contradiz a evidência de um evento demográfico, como a expansão de uma população geneticamente mais diversa desde o litoral brasileiro para o sul, que possa ter acontecido junto, ou antes, de um evento de seleção natural.

Nossos resultados, baseados na análise de um segmento do marcador CO1, sugerem que *O. sambaquiensis* apresenta uma subdivisão populacional caracterizada por haplótipos com uma história demográfica mais antiga no norte da sua distribuição conhecida e com um posicionamento filogenético preponderantemente mais basal que os das localidades argentinas, os quais aparecem apenas numa posição mais apical da topologia obtida na análise filogenética de tal marcador.

REFERÊNCIAS

- Bazin, E., S. Glémin, N. Galtier. 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312: 570-572.
- Beerli, P. 2004. Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. *Molecular Ecology* 13: 827-836.
- Boltovskoy, E. 1981. Masas de agua en el Atlántico sudoccidental. In Boltovskoy D. (ed.), *Atlas del zooplancton del Atlántico sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata: 227-237.

- Boltovskoy, D. 1981. Características biológicas del Atlántico Sudoccidental. In Boltovskoy D. (ed), Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata: 239-251.
- Capurro, L.R.A. 1981. Características físicas del Atlántico Sudoccidental. In Boltovskoy D. (ed). Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata: 219-225.
- Collins, A.G., S. Winkelmann, H. Hadrys, B. Schierwater. 2005. Phylogeny of Capitata and Corynidae (Cnidaria, Hydrozoa) in light of mitochondrial 16S rDNA data. *Zoologica Scripta* 34: 91-99.
- Cunningham C.W., L.W. Buss, 1993. Molecular evidence for multiple episodes of paedomorphosis in the family Hydractiniidae. *Biochemical Systematics and Ecology* 21: 57-69.
- Emilson, I. 1961. The shelf and coastal waters off southern Brazil. *Boletim do Instituto de Oceanografia de São Paulo* 11: 101-112.
- Ewing, B., P. Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.
- Ewing, B., I. Hillier, M.C. Wendl, P. Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175-185.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- Fu, Y.-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Gordon, D., C. Abajian, P. Green. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8: 195-202
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Harpending, H. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66: 591-600.
- Hudson, R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. 7: 1-44.
- Hudson, R.R., M. Slatkin, W.P. Maddison. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583-589.

- Lucas, A.J., R.A. Guerrero, H.W. Mianzan, E.M. Acha, C.A. Lasta. 2005. Coastal oceanographic regimes of the northern Argentine continental shelf (34-43°S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65: 405-420.
- McDonald, J.H., M. Kreitman. 1991. Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature* 351: 652-654.
- Macchi, G., H. Mianzan, H. Christiansen, F. Ramírez, 1995. Histology of the gonadal cycle of the stinging hydromedusa *Olindias sambaquiensis*, Müller, 1861 at Blanca Bay, Argentina. *Bolletino della Società Adriatica di Scienze* 76:59-68.
- Matsuura, Y. 1986. Contribuição ao estudo da estrutura oceanográfica da região sudeste entre Cabo Frio (RJ) e Cabo de Santa Marta Grande (SC). *Ciência e Cultura* 38: 1439-1450.
- Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49: 718-726.
- Peters, J.L., Y. Zhuravlev, I. Fefelov, A. Logie, K.E. Omland. 2007. Nuclear loci and coalescent methods support ancient hybridization as cause of mitochondrial paraphyly between gadwall and falcated duck (*Anas* spp.). *Evolution* 61: 1992-2006.
- Reimer, J.D., S. Ono, K. Takishita, J. Tsukahara, T. Maruyama. 2006. Molecular evidence suggesting species in the zoanthid genera *Palythoa* and *Protopalythoa* (Anthozoa: Hexacorallia) are congeneric. *Zoological Science* 23: 87-94.
- Rogers, A.R., H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- Rozas, J., J.C. Sánchez-DellBarrio, X. Messenguer, R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Schneider S., D. Roessli, L. Excoffier. 2000. ARLEQUIN: a software for population genetic data analysis. Version 2000. Genetic and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Vainola, R., P. Oulasvirta. 2001. The first record of *Maeotias marginata* (Cnidaria, Hydrozoa) from the Baltic Sea: a Pontocaspian invader. *Sarsia* 86: 401-404.
- Vannucci, M. 1951. Distribuição dos Hydrozoa até agora conhecidos nas costas do Brasil. *Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo* 2: 105-124.

Zamponi, M.O., O.N., Facal. 1987. Estudio bioecológico de *Olindias sambaquiensis* Müller, 1861 (Limnomedusae; Olindiidae) en el area de Monte Hermoso. I. Ciclo de vida. Neotropica 33: 119-126.

Capítulo IV

Estudo filogeográfico da hidromedusa *Liriope tetraphylla* (Cnidaria: Medusozoa) no Oceano Atlântico Sul-ocidental: evidências de estruturação populacional em uma escala regional para uma espécie holoplanctônica.

Palavras chave: Filogeografia, DNA mitocondrial, diversidade genética, plâncton.

Abstract: *Liriope tetraphylla* is considered a cosmopolitan holoplanktonic species inhabiting water masses with different oceanographical and ecological conditions. Broad ecological and geographical distributions represent a key question for the study of population genetics of planktonic organisms. Phylogeographical patterns of holoplanktonic species, like *L. tetraphylla*, and its relationship with marine environmental heterogeneities is still unknown. In this study, we performed a mitochondrial DNA phylogeographic analyses using CO1 and 16S. Our data have demonstrated that the cosmopolitan condition of the species is not corroborated, and the so-called *L. tetraphylla* possibly includes cryptic species. On the other hand, in a regional scale, our data reveal a population structure for *L. tetraphylla* in the Southwestern Atlantic Ocean.

Resumo: *Liriope tetraphylla* é considerada como uma espécie holoplanctônica com distribuição cosmopolita que habita massas d'água com condições oceanográficas e ecológicas distintas. Distribuições ecológicas e geográficas abrangentes representam uma questão central no estudo da genética de populações de organismos planctônicos. Padrões filogeográficos de espécies holoplanctônicas, como *L. tetraphylla*, e suas relações com heterogeneidades do ambiente marinho ainda são desconhecidos. Neste estudo conduzimos análises filogeográficas dos marcadores mitocondriais CO1 e 16S. Nossos dados demonstraram que a condição cosmopolita da espécie não é corroborada, e o então denominado *L. tetraphylla* possivelmente inclui espécies crípticas. Por outro lado, em uma escala regional, nossos dados revelam uma estrutura populacional para *L. tetraphylla* no Atlântico Sul-ocidental.

INTRODUÇÃO

Liriope tetraphylla Chamisso & Eysenhardt 1821 (Trachymedusae, Geryoniidae) é uma espécie de hidromedusa (Cnidaria, Hydrozoa) que desenvolve seu ciclo de vida inteiramente na coluna d'água (holoplanctônica), sem possuir fase de póipo. Assim, a princípio, os indivíduos desta espécie estariam inteiramente sujeitos aos efeitos das correntes marinhas ao longo de todo seu ciclo de vida. A espécie é assumida como de distribuição cosmopolita, sendo sua presença documentada em distintas partes do globo

(Ueno & Mitsutani, 1994; Daly Yahia *et al.*, 2003; Batistić *et al.*, 2007) inclusive associada a diferentes correntes marinhas oceânicas (e.g., Calder, 1971; Palma *et al.*, 2007). Entretanto, em algumas regiões do Oceano Atlântico Sul-ocidental, tais como o litoral sudeste brasileiro, *L. tetraphylla* é encontrada associada às águas costeiras, presente em distintos períodos do ano, sendo uma das hidromedusas mais abundantes no zooplâncton (Tronolone, 2007). Nas águas costeiras do litoral norte da Província de Buenos Aires, espécimes de *L. tetraphylla* também são muito abundantes durante o verão, com menor ocorrência durante o inverno (Mianzan *et al.*, 2001a). Esta abrangência ecológica e geográfica, com diferentes abundâncias em diferentes massas de água e regiões do globo, é comum em muitos organismos planctônicos e representa a principal questão relacionada ao estudo da estruturação genética das populações dessas espécies em escalas regionais (*i.e.*, não globais).

A região costeira do Atlântico Sul-ocidental situada entre o litoral sudeste brasileiro e o litoral norte argentino (província de Buenos Aires) é heterogênea em seus aspectos ecológicos e oceanográficos (Boltovskoy E., 1981; Boltovskoy D., 1981; Matsuura, 1986). Há massas d'água diferentes que banham a zona nerítica brasileira e o litoral de Buenos Aires – a primeira com média de temperatura e salinidade maior que a segunda (Emilson, 1961; Capurro, 1981; Lucas *et al.*, 2005). A barreira geográfica putativa neste cenário, a qual poderia limitar a dispersão dos organismos planctônicos entre essas regiões, é o estuário do '*Rio de la Plata*' (Rio da Prata), que provoca uma grande descarga de água doce no Atlântico, causando assim a quebra da continuidade do ambiente costeiro (Mianzan *et al.*, 2001a). Entretanto, a interpretação da cunha doce do Rio da Prata como uma barreira para a dispersão de organismos marinhos deve ser compreendida dentro do regime de flutuações cíclicas na magnitude dessa descarga, sugerindo que a ação de barreira seria, no máximo, intermitente (Mianzan *et al.*, 2001b).

Neste contexto, ainda não é conhecido como os padrões filogeográficos de espécies holoplanctônicas, como *L. tetraphylla*, podem ser afetados pelas condições oceanográficas descritas. Uma abordagem possível para investigar esta questão reside em estudos filogeográficos. Porém, por outro lado, estudos filogeográficos não são abundantes para organismos holoplanctônicos, são escassos para espécies de Hydrozoa como um todo, e são inexistentes para este grupo no Atlântico Sul-ocidental e em escalas regionais. Assim, diante desse desconhecimento, este estudo tem por objetivo investigar a estrutura populacional e filogeografia de *L. tetraphylla* no Atlântico Sul-ocidental, correlacionando a biologia da espécie com sua presença em ambientes oceanográficos heterogêneos em uma escala regional.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos espécimes

Coletas do material biológico foram realizadas com redes de plâncton de 300-500 μ de abertura de malha, em pontos nos litorais do Brasil e da Argentina (Figura 1), entre dezembro de 2005 e novembro de 2006. Os pontos amostrados no Brasil foram nas localidades de São Sebastião, Estado de São Paulo (SP) (dia 22 de novembro de 2005, 23°50'S/45°24'W e dia 19 de julho de 2006, 23°55'S/45°25'W) e Bombinhas, Estado de Santa Catarina (SC) (dia 30 de novembro de 2006, 27°07'S/48°34'W). Na Argentina foram realizadas coletas na baía de 'San Borombón', Província de Buenos Aires (BA) (dia 17 de dezembro de 2005, 23°46'S/45°21'W). Espécimes

testemunho dos materiais coletados, conservados em álcool e formol, estão incorporados na coleção do Laboratório de Estudos em Medusozoa do Departamento de

Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), e serão apropriadamente depositados na coleção de Cnidaria do Museu de Zoologia da USP.

Análises moleculares

Extrações de DNA genômico do material conservado em álcool 93° foram conduzidas utilizando os reagentes EZ-DNA (Biosystems) e Instagene (Bio-Rad). Para tal fim foram utilizadas medusas inteiras, uma vez que o tamanho das mesmas restringia-se a poucos milímetros de diâmetro e comprimento (3 a 5 mm). O DNA obtido foi amplificado por meio de PCR seguindo um perfil de reação de 3 ciclos (94°C/2min, 45°C/1min, 72°C/1min), 30 ciclos (94°C/40s, 49°C/30s, 72°C/50s) e 72°C/5min de extensão final. Foram utilizados os *primers* dos segmentos dos genes mitocondriais da subunidade 1 da proteína citocromo oxidase (CO1), desenhados por Folmer *et al.* (1994), e os da subunidade ribossomal 16S, desenhados por Cuninham & Buss (1993). O volume de reação foi de 25 μ L, incluindo: DNA-1 μ L, mix de dNTPs (200 μ M)-0,5 μ L, buffer Taq 10X (Fermentas)-2,5 μ L, MgCl₂ 1,5mM-1,5 μ L, 1 μ L de cada primer (1 μ M) e 0,1 μ L de Taq (Fermentas). Os produtos de PCR foram purificados utilizando *kits* de coluna de afinidade

Figura 1. Área de estudo. Os losangos representam os locais de amostragem de *L. tetraphylla*, *n*=número de espécimes seqüenciados para o marcador CO1, SP= São Sebastião, São Paulo; SC= Bombinhas, Santa Catarina; BA= Baía de San Borombón, Buenos Aires.

com partículas magnéticas AMPure® (Agencourt®) e ChargeSwitch® (Invitrogen™). O DNA purificado foi submetido à marcação fluorescente por PCR, em reações independentes para as fitas *forward* e *reverse*, utilizando o reagente Big Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Após precipitação, os produtos dessas reações foram enviados ao Serviço de Seqüenciamento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, onde ambas fitas de DNA de cada amostra foram seqüenciadas utilizando um equipamento ABI PRISM® 3100 (Hitachi).

Os cromatogramas obtidos após seqüenciamento foram analisados visualmente, não se detectando presença de picos duplos, como esperado para amostras com um único haplótipo, com a cautela de se conferir que não se tratavam de seqüências de pseudo-genes nucleares. Seqüências consenso foram obtidas a partir desses cromatogramas utilizando o programa PhredPhrap (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998) e visualizadas com o programa Consed (Gordon *et al.*, 1998). Também foram realizados *blasts*, na base de dados GenBank, para os quais essas seqüências coincidiram com os mesmos fragmentos mitocondriais pertencentes a outras espécies de medusozoários, representando uma segunda confirmação de que as seqüências obtidas pertencem ao DNAm. A maior presença de transições (ts) em relação a transversões (tv), em uma ordem superior a duas vezes para os dois marcadores (CO1: 31ts/3tv; 16S: 7ts/1tv), foi também considerada evidência de que as seqüências pertencem ao DNAm, uma vez que o mesmo é caracterizado por uma maior taxa de ts/tv que o DNA nuclear (Bazin *et al.*, 2006). Para o fragmento do marcador CO1 obtido também foi determinada a seqüência de aminoácidos codificada, utilizando uma seqüência de tal proteína pertencente à espécie do cnidário *Palythoa tuberculosa* (Anthozoa, Hexacorallia), obtida do GenBank sob o código BAE48388 e publicada por Reimer *et al.* (2006).

Com exceção de algumas bases eliminadas dos extremos 5' e 3', que por particularidades do seqüenciamento geraram regiões de pareamento dificultoso, tanto as matrizes de seqüências parciais dos genes 16S como as do CO1, alinhadas com o programa Clustal (Thompson *et al.*, 1994) em Bioedit (Hall, 1999), não formaram *gaps*. Desta forma, as seqüências foram então tratadas como dados pré-alinhados nas análises posteriores.

Análises de dados

O relacionamento filogenético entre os haplótipos foi estudado por meio de análises de parcimônia, utilizando o programa PAUP* 4.0 (Swofford, 2002). Esta análise consistiu de uma busca heurística com 1000 réplicas com algoritmo de adição aleatória de seqüências, adotando a estratégia de busca TBR com ponderação sucessiva de caracteres. Duas seqüências de CO1 da espécie *Maeotias marginata*, obtidas do GenBank sob os códigos AF383926 e AF383927 (Vainola & Oulasvirta, 2001) e duas de

Olindias sambaquiensis (E. Ale, dados não publicados), foram utilizadas como grupos externos para enraizamento dos haplótipos de *L. tetraphylla*. Ambas as espécies, pertencentes à família Olindiidae (Limnomedusae), foram escolhidas por representarem as seqüências disponíveis com posição filogenética mais próxima da família Geryoniidae (Trachymedusae), a qual pertence *L. tetraphylla* (Collins, 2002). Duas seqüências de 16S registradas no GenBank como pertencentes a *L. tetraphylla* sob os códigos AY512510 (Collins *et al.*, 2005) e U19377 (Bridge *et al.*, 1995), foram utilizadas com mesmo fim.

Comparações par a par (*pairwise analyses*), utilizando o programa DnaSP 4.20.2 (Rozas *et al.*, 2003), foram realizadas com a finalidade de obter diferentes parâmetros estatísticos indicadores da diversidade genética das amostras, a saber, número de haplótipos (h); diversidade haplotípica (H); número de sítios polimórficos (S); número médio de diferenças nucleotídicas (k); diversidade nucleotídica P_i (π).

Evidências de subdivisão geográfica foram obtidas por meio de métodos de análises da variância molecular (AMOVA) e de comparações par a par dos valores de F_{st} e de diversidade nucleotídica, utilizando o programa de computação Arlequin 2.01 (Schneider *et al.*, 2000). Três modelos de agrupamentos foram utilizados na AMOVA para dividir a variância molecular total em diferentes componentes: diferenças dentro das populações, entre as populações e entre grupos. Os modelos testados foram: 1- Sem agrupamento, (SP, SC, BA), considerando as três localidades amostradas como pertencentes a uma única população; 2- Dois grupos, (SP, SC)/(BA), separando as localidades do Brasil, geograficamente mais próximas entre si, da amostra argentina; 3- Dois grupos, (SP)/(SC, BA), separando a localidade do norte das do sul da distribuição geográfica estudada. A conectividade entre as localidades foi estimada através do número de migrantes por geração Nm , aplicando as equações de F_{st} (equation 3) e Nm (equation 4) publicadas por Hudson *et al.* (1992) com o programa DnaSP.

Análises da distribuição das diferenças nucleotídicas par a par entre as distintas seqüências (*mismatch distribution*) foram conduzidas para testar as hipóteses de equilíbrio *versus* expansão populacional utilizando DnaSP. Valores de Tau, $\tau=2\mu L t$, dos tempos de expansão populacional, onde μ é a taxa de mutação e L o comprimento da seqüência analisada (Roger & Harpending, 1992), também foram obtidos, assim como os índices para testar a significância estatística das análises: o SSD (*sum of square deviations*) desvio da soma de quadrados entre as distribuições observadas e esperadas sob o modelo de expansão populacional e o índice de Harpending (Harpending, 1994). Os testes de desvio da neutralidade F_s (Fu, 1997) e R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), sensíveis à expansão populacional, também foram aplicados para avaliar esse cenário. Os valores dos estimadores do índice Teta ($\theta=2N\mu$, em que N = tamanho efetivo

populacional) da estimativa da taxa de mutação, calculados para tais testes, foram utilizados também nas simulações por coalescência (Hudson, 1990), dirigidas a obter o grau de significância das estatísticas resultantes. Uma vez que alguns padrões de distribuição da diversidade genética podem ser indistinguíveis entre os ocasionados pelo efeito da seleção natural ou pelos processos demográficos, como efeitos de gargalo ou expansões populacionais, descrições do número de substituições sinônimas e não sinônimas também foram conduzidas.

RESULTADOS

Polimorfismo dos marcadores 16S e CO1

Seqüências de DNAm, obtidas para um grupo de 20 espécimes, mostraram um menor grau de polimorfismo no marcador 16S que no marcador CO1 (Tabela 1). Devido a este padrão, houve um maior esforço de obtenção de seqüências de CO1 para realizar as análises populacionais apresentadas. Há somente duas seqüências do marcador 16S depositadas no GenBank para a espécie *L. tetraphylla*, uma delas obtida de uma amostra coletada na região costeira de Califórnia (EUA) (código: AY512510, Collins *et al.*, 2005) e outra sem a origem geográfica informada (código: U19377, Bridge *et al.*, 1995). A matriz de distância genética (Tabela 2) apresenta uma divergência ao redor de 10% entre os seis haplótipos detectados para as localidades do Atlântico Sul-ocidental (Tabela 1) e os dois depositados no GenBank. A restrição da análise a um caráter mais regional, considerando somente a distância genética entre os haplótipos do Atlântico Sul-ocidental, resulta em um valor de 1% ou menos; por outro lado, a distância genética observada entre os haplótipos do GenBank é, aproximadamente, da mesma magnitude. Não foram encontrados registros de seqüências de CO1 para esta espécie no GenBank.

Tabela 1. Comparação do grau de informação contida nos polimorfismos observados em seqüências parciais dos genes mitocondriais 16S e CO1, para 20 espécimes de *Liriope tetraphylla*.

Marcador	Pb^1	S^2	SIP^3	h^4	H^5	k^6	π^7
16S	446	8	1	6	0,516	0,890	0,002
CO1	547	27	7	14	0,916	4,290	0,008

¹Número de pares de bases das seqüências estudadas.

²Número de sítios variáveis.

³Sítios informativos para parcimônia no grupo interno.

⁴Número de haplótipos.

⁵Diversidade haplotípica.

⁶Número médio de diferenças nucleotídicas.

⁷Diversidade nucleotídica.

Tabela 2. Matriz de distâncias inter-haplótípicas para seqüências parciais do gene mitocondrial 16S pertencentes a espécimes de *L. tetraphylla* coletados no Atlântico Sul-ocidental (ASO- haplótipos 1 a 6) e duas seqüências obtidas no GenBank (GBK- haplótipos 1 e 2), uma de origem geográfica desconhecida (GBK-1) e outra pertencente ao Pacífico dos EUA (GBK-2). Abaixo da diagonal é mostrado o número absoluto de diferenças nucleotídicas em comparações par a par; acima da diagonal é indicado o desvio padrão.

	GBK-1	GBK-2	ASO-1	ASO-2	ASO-3	ASO-4	ASO-5	ASO-6
GBK-1		2,224	6,423	6,361	6,298	6,298	6,298	6,423
GBK-2	05		6,168	6,102	6,034	6,034	6,034	6,168
ASO-1	46	42		1,991	2,224	2,224	2,224	2,224
ASO-2	45	41	04		0,999	0,999	0,999	0,999
ASO-3	44	40	05	01		1,411	1,411	1,411
ASO-4	44	40	05	01	02		1,411	1,411
ASO-5	44	40	05	01	02	02		1,411
ASO-6	46	42	05	01	02	02	02	

Relacionamentos haplotípicos

Devido ao baixo grau de polimorfismo das 23 seqüências parciais obtidas para o marcador 16S na escala regional, a análise filogenética destas seqüências não permitiu a definição dos relacionamentos entre as mesmas. Os haplótipos do Atlântico Sul-ocidental apareceram todos em uma politomia na árvore de consenso estrito obtida (10 árvores, 142,5 passos, CI=0,940, RI=0,936). Em tal análise o único sítio informativo para parcimônia no grupo interno agrupa um terminal de SC com outro de BA (Lte10SC e Lte26BA), os quais apareceram separados na análise do marcador CO1. A análise por parcimônia das 31 seqüências do marcador CO1, (8 de SP, 8 de SC, 11 de BA e 4 do grupo externo), com 9 sítios informativos para parcimônia no grupo interno, resultou em um único cladograma (172,3 passos,

Figura 2. Cladograma para o marcador mitocondrial CO1, obtido em uma análise por parcimônia, para os 27 espécimes (terminais), coletados em diferentes localidades do Brasil (BR) e da Argentina (AR). Os símbolos: ■ e ●, representam os únicos dois haplótipos que são compartilhados por diferentes terminais. SP = São Paulo, SC = Santa Catarina, BA = Buenos Aires.

CI=0,986, RI=0,985), mais informativo, no qual cada terminal correspondeu à sequência obtida para um espécime de *L. tetraphylla* (Figura 2).

Embora a topologia do cladograma obtido apresente um padrão polifilético para as três regiões, observa-se que os ramos basais somente foram ocupados por representantes das amostras coletadas no litoral brasileiro (SP e SC). Por sua vez, as amostras coletadas no litoral argentino se situaram todas em um mesmo clado apical, ainda que não possa ser corroborado como monofilético, devido à existência de uma politomia destes com 3 haplótipos de SC e um de SP. A presença de tais haplótipos junto com os do grupo BA pode representar introgressão entre as populações do Brasil e Argentina (Peters *et al.*, 2007). Como a análise tem um caráter intra-específico, onde se supõe que os tempos evolutivos para o aparecimento dos internós sejam curtos, não deve ser descartada a possibilidade de que a separação incompleta das linhagens (*incomplete lineage sorting*) também esteja contribuindo para o estabelecimento desse padrão (Moore, 1995).

Outro aspecto interessante é que observa-se uma menor diversidade haplotípica também para o conjunto de haplótipos de BA, no qual um mesmo haplótipo é compartilhado entre seis dos 11 terminais (Lte02/05/19/22/25/26-BA). É interessante notar que este mesmo haplótipo é compartilhado apenas por um único terminal de SC (Lte09SC) o que, obrigatoriamente, torna impossível o aparecimento de um grupo formado exclusivamente por espécimes de BA; um eventual clado apical argentino seria, portanto, no máximo parafilético (incluindo também Lte09SC) e aumenta uma expectativa de introgressão ou separação incompleta de linhagens. Por outro lado, há somente um segundo haplótipo compartilhado entre três terminais de SP e SC (Lte08SP e Lte08/10SC).

Estrutura genética

A Tabela 3 mostra os resultados da AMOVA entre as três localidades amostradas e como a variação genética total se distribui entre os três modelos de agrupamento testados. O modelo 1, sem agrupamento, revelou que as diferenças entre localidades representam 24,22% da variância total, o que é estatisticamente significativo ($F_{st}=24,224$, $p=0$). No modelo 2, que agrupa as amostras do litoral brasileiro em contraposição à amostra argentina de BA, as diferenças foram ainda maiores, 27,49% da variância total, embora não seja significativamente maior que o esperado aleatoriamente. Por outro lado, o terceiro modelo, que agrupa as seqüências SC e BA contra as de SP, mostrou uma variância entre grupos de apenas 3,58% da variância total, sendo não significativa. Neste terceiro modelo de agrupamento, uma porcentagem significativa da variância total

(21,64%, $p=0,02$) é resultante das diferenças entre populações dentro do grupo, o que refere diretamente a uma diferença significativa entre as localidades de SC e BA.

Tabela 3. Resultados da AMOVA entre as três localidades estudadas (SP $n=8$; SC $n=8$ e BA, $n=11$) e como é distribuída a variação genética sob os três modelos diferentes de agrupamentos definidos *a priori*. Os valores de significância estatística (p) foram obtidos por 1023 permutações não paramétricas (*g.l.*=graus de liberdade). Os diferentes componentes da variância informados são: Va = variância da diferença entre populações, Vb = da diferença dentro das populações dentro de grupos e Vc = entre haplótipos dentro das populações.

Estrutura de populações testada	Origem da variação	<i>g.l.</i>	Soma de quadrados	Componentes da variância	% da variância	p
Sem agrupamento:	Entre populações	2	13.403	0.55768 Va	24.22	0,00
1-(SP, SC, BA)	Dentro das populações	24	41.868	1.74448 Vb	75.78	
Dois grupos:	Entre grupos	1	11.204	0.68291 Va	27.49	0,34
1-(SP, SC)	Entre populações					
2-(BA)	dentro de grupos	1	2.200	0.05688 Vb	2.29	0,62
	Dentro das populações	24	41.868	1.74448 Vc	70.22	0,00
Dois grupos:	Entre grupos	1	6.983	0.08362 Va	3.58	0,66
1-(SP)	Entre populações					
2-(SC, BA)	dentro de grupos	1	6.420	0.50472 Vb	21.64	0,02
	Dentro das populações	24	41.868	1.74448 Vc	74.78	0,00

Como sugerido pelos resultados da AMOVA, tanto a comparação par a par dos índices de fixação (Tabela 4) como da divergência genética (Tabela 5) mostram que a população BA (F_{st} : 0.300) é significativamente diferente das populações SP (F_{st} : 0.177) e SC (F_{st} : 0.228), sendo que as últimas não se mostraram significativamente diferentes entre si. A estimativa da taxa de migração resultou em aproximadamente uma fêmea migrante por geração entre as localidades do Brasil e Argentina (Tabela 4). Por não haver estruturação entre SP e SC, o cálculo de N_m entre essas localidades é indeterminado, considerando-se ambas as localidades como pertencentes a uma mesma unidade populacional.

Tabela 4. Fluxo gênico e diferenciações par a par entre as localidades amostradas. Abaixo da diagonal os índices de fixação populacionais (F_{st}) par a par, entre parênteses valores das probabilidades (110 permutações). Acima da diagonal o número de migrantes por geração (N_m).

Localidade	SP	SC	BA
SP		Indeterminado ¹	0,98
SC	-0,02 (0,59±0,04)		1,21
BA	0,38 (0,00±0,00*)	0,33 (0,00±0,00*)	

*Diferenças estatisticamente significativas.

¹ As localidades SP-SC pertencem à mesma unidade populacional (mais detalhes no texto).

Tabela 5. Comparações par a par da divergência nucleotídica entre localidades. Acima da diagonal está o número médio de diferenças par a par entre localidades, entre parênteses o valor da probabilidade. Abaixo da diagonal estão as médias corrigidas das diferenças par a par.

Localidade	SP	SC	BA
SP		5,10(0,59)	5,57 (0,00)*
SC	-0,10		3,69 (0,00)*
BA	1,89	1,08	

*Diferenças estatisticamente significativas.

Diversidade genética, neutralidade e história demográfica

As comparações par a par intra-localidades também revelam que a diversidade genética da amostra BA é menor que a das localidades SP e SC (Tabela 6). As medidas de diversidade haplotípica e nucleotídica são mais altas nas localidades SP e SC que em BA, e o menor valor de τ na amostra BA indica uma expansão populacional mais recente em relação às localidades SP e SC. O teste SSD (Tabela 6) e o índice de Harpending

Tabela 6. Caracterização genética das três localidades estudadas mostrando: número de seqüências obtidas (n), número de haplótipos diferentes (h), diversidade haplotípica (H) com a variância (V_h), diversidade nucleotídica (π), desvio da soma de quadrados sob o modelo de expansão populacional (SSD) com as probabilidades desses resultados serem significativamente diferentes dos observados (p) e valores de Tau (τ) da medida de tempo relativa desde a expansão populacional, em gerações.

Localidade	n	h	$H \pm V_h$	π	SSD (p)	τ
SP	8	8	1,000 $\pm$ 0,004	0,012	0,061 (0,118)	6,5
SC	8	7	0,964 $\pm$ 0,006	0,008	0,001 (0,832)	3,6
BA	11	6	0,727 $\pm$ 0,021	0,002	0,007 (0,653)	1,2

($p > 0.05$ para as três localidades) não apresentam diferença significativa com o esperado sob o modelo de expansão populacional.

Por outro lado, outros aspectos dessas comparações pareadas diferem entre as unidades populacionais detectadas (Figura 3). Uma distribuição unimodal com um valor médio de diferenças pareadas pequeno (1,091) foi observada para BA, enquanto um padrão bimodal com um valor médio de diferenças par a par mais elevado (5,108) foi observado para o grupo SP-SC, revelando uma história populacional mais longa, com algum evento de gargalo ou subdivisão populacional para esse agrupamento.

Figura 3. Distribuição de diferenças par a par entre as seqüências parciais de CO1 da população brasileira (SP-SC) à esquerda ($n=16$), e as da população argentina (BA) à direita ($n=11$), SP = São Paulo, SC = Santa Catarina, BA = Buenos Aires. A linha cheia representa a distribuição esperada (Esp.) sob o modelo de Expansão Populacional (EP) e a linha com círculos a distribuição Observada (Obs.).

Os resultados dos testes de neutralidade $R2$ e Fs aplicados sobre as partições de dados que refletem a estrutura populacional detectada (Tabela 7) mostram que os índices encontrados são significativos, detectando-se um importante desvio da neutralidade.

Tabela 7. Resultados dos testes de neutralidade $R2$ e Fs , entre parênteses probabilidade de cada estatística obtida por meio de 10.000 réplicas de simulação por coalescência. O número de seqüências obtidas para cada grupo (n), número de haplótipos diferentes (h), diversidade haplotípica (H) com a variância (V_h), diversidade nucleotídica (π) e o valor de θ_π utilizado para os testes são também informados.

Grupo	n	h	$H \pm V_h$	π	θ_π	$R2$	Fs
Brasil (SP-SC)	16	14	0,975 $\pm$ 0,001	0,009	5,108	0,056 (0,000)	-7,603 (0,000)
Argentina (BA)	11	6	0,727 $\pm$ 0,021	0,002	1.091	0,109 (0,003)	-3,304 (0,002)

Das 33 substituições encontradas na matriz de 27 seqüências de CO1 utilizada nas análises, apenas uma delas foi não sinônima. Essa substituição origina uma mudança do aminoácido Metionina (*Met*) para Isoleucina (*Ile*), ambos com cadeias laterais hidrofóbicas. Apenas um haplótipo, pertencente a um único espécime (Lte24BA) dos seis detectados na localidade BA, apresentou essa substituição codificante para *Ile*. O haplótipo mais freqüente de tal amostra, compartilhado por seis terminais da figura 2, só apresentou substituições sinônimas, e também foi seqüenciado em um espécime coletado em SC (Figura 2).

DISCUSSÃO

Embora o segmento do gene mitocondrial 16S analisado não tenha aportado informação sobre a filogeografia de *L. tetraphylla* na escala regional, nossos resultados coincidem com estudos em outras espécies de Medusozoa nas quais, em uma escala global, tal marcador se mostrou útil na determinação de estruturação genética (Govindarajan *et al.*, 2004; Schroth *et al.*, 2005). Em nossa análise detectamos divergência genética (~10%) entre seqüências parciais de 16S obtidas do material coletado no Atlântico Sul-ocidental e as publicadas no GenBank, pertencentes a outras regiões do globo. Essa diferença entre os dois grupos é 10 vezes superior à observada entre os haplótipos de cada grupo. Por outro lado, a espécie *L. tetraphylla* apresenta uma morfologia simples que, junto com seu cosmopolitismo, lhe proporcionou uma história taxonômica com várias sinonímias (Calder, 1971). Tal fato, contraposto com nossos dados moleculares, gera dúvidas sobre o monofiletismo das seqüências de 16S analisadas e o número de linhagens (eventualmente espécies) existentes. Evidentemente, esses aspectos também desafiam a condição cosmopolita atribuída à espécie. Estudos filogeográficos em escala global deverão avaliar melhor a possibilidade de *L. tetraphylla* ser constituída por um conjunto de espécies crípticas, como já hipotetizado para outros Medusozoa (*e.g.*, Dawson & Jacobs, 2001; Dawson, 2005).

Já na escala regional, as análises do segmento da região 5' do marcador CO1 evidenciam que a população de *L. tetraphylla* do Atlântico Sul-ocidental encontra-se estruturada. As análises de diferenciação populacional (AMOVA e comparações pareadas de *Fst* e diversidade nucleotídica) detectaram dois agrupamentos populacionais diferentes, um no Brasil (SP-SC) e outro na Argentina (BA). Por outro lado, os valores dos distintos índices relacionados com a diversidade genética (H , π , θ) seguem, aparentemente, um gradiente decrescente na direção norte-sul (Tabela 7), desde SP, passando por SC, até BA. Tal gradiente se mostra concomitantemente oposto ao do fluxo gênico (Nm), que é maior entre BA e SC que entre BA e SP. Determinar se esse é um padrão significativo e associado ao isolamento por distância, ou a uma quebra filogeográfica em alguma latitude entre Brasil e Argentina (o estuário do Rio da Prata), demandaria a realização de uma amostragem no litoral sul do Brasil, preferencialmente em um ponto equidistante entre BA e SC. Esse ponto não amostrado poderia ser interpretado como pertencente a uma “população fantasma” (*ghost population*) para a qual as análises apresentadas neste trabalho não aportaram dados, o que poderia enviesar, por superestimação os índices θ e Nm obtidos (Beerli, 2004). Entretanto, simulações de coalescência, realizadas por Beerli (2004), considerando diferentes taxas de migração entre um número diferente de populações de tamanho efetivo conhecido, demonstraram que o efeito da falta da amostragem de algumas populações não necessariamente afeta significativamente a estimativa de Nm a partir das populações amostradas. Por outro lado, este mesmo autor discutiu que o viés sobre a estimativa de θ foi importante quando poucas populações foram amostradas. Entretanto, também foi demonstrado que a inclusão de uma população fantasma nas análises, quando a amostra populacional é suficiente, pode não beneficiar a estimativa de θ (Bittner & King, 2003; Beerli, 2004). Consideramos que este último caso corresponde melhor ao presente trabalho, uma vez que, para obter uma maior amostragem que a apresentada, seria necessário apenas coletar no sul do litoral brasileiro, completando uma amostragem de quatro localidades equidistantes ao longo da geografia estudada.

A capacidade de *L. tetraphylla* de tolerar baixas salinidades (Souza *et al.*, 1996), possivelmente constituindo a causa da espécie ser abundantemente encontrada associada ao estuário do Rio da Prata, contradiz a pressuposição de que o ambiente mixo-halino dessa desembocadura representaria, de fato, uma barreira para sua dispersão. Além disso, a descarga de águas continentais no estuário do Rio da Prata varia sazonalmente em resposta aos efeitos dos ventos da região (Piola *et al.*, 2005). Isto faz com que, no inverno, tal descarga possa afetar o litoral sul do Brasil, possibilitando potencialmente o fluxo gênico entre as populações e, no verão, quando a espécie é mais abundante no litoral argentino, esta seja retida mais rente ao litoral de BA, podendo isso

contribuir com seu isolamento. Dados ainda desconhecidos sobre o grau de mistura das massas d'água estuarina do Rio da Prata e costeiras da Zona Nerítica Brasileira, e da duração e sazonalidade do ciclo de vida de *L. tetraphylla* no ambiente natural, são necessários para entender como estes fatores poderiam interagir na sua distribuição geográfica e estruturação populacional no Atlântico Sul-ocidental.

A análise por parcimônia dos relacionamentos haplotípicos revela um posicionamento preponderantemente basal das seqüências obtidas das amostras das localidades brasileiras, com a possibilidade do acontecimento de eventos de introgressão e/ou separação incompleta de linhagens que explicariam o aparecimento das seqüências de BA junto a algumas de SP e SC em uma posição apical da topologia. Por sua vez, também se observa que o grupo de seqüências de BA representa uma porção de diversidade genética menor em relação à do grupo SP-SC, da qual parece derivar. Por outro lado, os resultados obtidos com a análise de distribuição de diferenças nucleotídicas par a par mostram uma expansão populacional mais antiga para os haplótipos de SP-SC, em relação àqueles da localidade argentina, para a qual τ é menor. Os testes R_2 e F_s , sensíveis a expansão populacional, também mostraram valores significativos de desvios da neutralidade para as duas partições populacionais detectadas, o que foi mais marcante no conjunto de seqüências do Brasil. Outro resultado também observado foi que as seqüências obtidas mostraram predomínio de substituições sinônimas, sendo detectada apenas uma substituição não sinônima em um dos haplótipos minoritários da amostra BA. Estes resultados revelam que a seleção natural adaptativa não estaria agindo diretamente no segmento do marcador CO1, utilizado nesta análise, para originar este padrão de estruturação biogeográfica. Entretanto, não é possível ignorar que, em se tratando de um gene mitocondrial, este pode experimentar um efeito-“carona” (*hitchhiking*), ao qual os testes R_2 e F_s também são sensíveis (Fu, 1997; Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Tal efeito, ao qual o genoma mitocondrial pode ser sensível (Bazin *et al.*, 2006), acontece quando um gene selecionado positivamente se espalha pela população, levando consigo outros genes ligados na mesma região cromossômica, com consequente diminuição da diversidade genética populacional,

Pelo exposto, além das condições diferenciais de circulação das massas d'água das regiões habitadas pelas partições populacionais detectadas, e da distância entre elas, não é possível descartar que a estrutura observada na localidade BA seja também devida à adaptação local às condições ecológicas da região por seleção positiva ou, inclusive, ao efeito da seleção purificadora de genes levemente deletérios. Entretanto, isto não necessariamente contradiz a evidência de que um evento demográfico, como a expansão de uma população geneticamente mais diversa a partir do litoral brasileiro para o sul, possa ter acontecido junto, ou mesmo antes, de um evento de seleção natural.

Nossos resultados, baseados na análise de um segmento do marcador CO1, sugerem que *L. tetraphylla* apresenta uma subdivisão populacional caracterizada por haplótipos com uma história demográfica mais recente no sul da distribuição estudada (BA) que aqueles pertencentes à unidade populacional SP-SC, no Brasil, os quais apresentam uma história demográfica mais antiga e um posicionamento filogenético preponderantemente mais basal.

REFERÊNCIAS

- Batistić M., N. Jasprica, M. Carić, D. Lučić. 2007. Annual cycle of the gelatinous invertebrate zooplankton of the eastern South Adriatic coast (NE-Mediterranean). *Journal of Plankton Research* 29: 671-686.
- Bazin, E., S. Glémin, N. Galtier. 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312: 570-572.
- Beerli, P. 2004. Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. *Molecular Ecology* 13: 827-836.
- Bittner, T.D., R.B. King. 2003. Gene flow and melanism in garter snakes revisited: a comparison of molecular makers and island vs. coalescent models. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 389-399.
- Boltovskoy, E. 1981. Masas de agua en el Atlántico Sudoccidental. In Boltovskoy, D. (ed.), *Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata: pp. 227-237.
- Boltovskoy, D. 1981. Características biológicas del Atlántico Sudoccidental. In Boltovskoy, D. (ed.), *Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata: pp. 239-251.
- Bridge, D., C.W. Cunningham, R. DeSalle, L.W. Buss. 1995. Class-level relationship in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Molecular Biology and Evolution* 12: 679-689.
- Calder, D.R. 1971. Hydroids and hydromedusae of southern Chesapeake bay. Virginia Institute of Marine Science, Special Papers in Marine Science number 1: pp. 125.
- Capurro, L.R.A. 1981. Características físicas del Atlántico Sudoccidental. In Boltovskoy, D. (ed.), *Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata: pp. 219-225.
- Collins, A.G. 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 418-432.

- Collins, A.G., S. Winkelmann, H. Hadrys, B. Schierwater. 2005. Phylogeny of Capitata and Corynidae (Cnidaria, Hydrozoa) in light of mitochondrial 16S rDNA data. *Zoologica Scripta* 34: 91-99.
- Daly Yahia M.N., J. Goy, O. Daly Yahia-Kéfi. 2003. Distribution and ecology of Medusae and Scyphomedusae (Cnidaria) in Tunis Gulf (SW-Mediterranean). *Oceanologica Acta* 26: 645-655.
- Dawson, M.N., D.K. Jacobs. 2001. Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biological Bulletin* 200: 92-96.
- Dawson, M.N. 2005. *Cyanea capillata* is not a cosmopolitan jellyfish: morphological and molecular evidence for *C. annaskala* and *C. rosea* (Scyphozoa: Semaestomeae: Cyaneidae) in south-eastern Australia. *Invertebrate Systematics* 19: 361-370.
- Emilson, I. 1961. The shelf and coastal waters off southern Brazil. *Boletim do Instituto Oceanográfico, São Paulo* 11: 101-112.
- Ewing, B., P. Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.
- Ewing, B., I. Hillier, M.C. Wendl, P. Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175-185.
- Fu, Y.-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Goloboff, P., J. Farris, Nixon K.. 2003.T.N.T.: Tree Analysis Using New Technology. Program and documentation, available from the authors, and at www.muc.dk/public/phylogeny.
- Gordon, D., C. Abajian, P. Green. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8: 195-202
- Govindarajan, A.F., K.M. Halanych, C.W. Cunningham. 2004. Mitochondrial evolution and phylogeography in the hydrozoan *Obelia geniculata* (Cnidaria). *Marine Biology* 146:213-222.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Harpending, H. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66:591-600.
- Hudson, R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. 7: 1-44.
- Hudson, R.R., M. Slatkin, W.P. Maddison. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583-589.

- Lucas, A.J., R.A. Guerrero, H.W. Mianzan, E.M. Acha, C.A. Lasta. 2005. Coastal oceanographic regimes of the northern argentine continental shelf (34-43°S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65: 405-420.
- Matsuura, Y. 1986. Contribuição ao estudo da estrutura oceanográfica da região sudeste entre Cabo Frio (RJ) e Cabo de Santa Marta Grande (SC). *Ciência e Cultura* 38: 1439-1450.
- Mianzan, H., C. Lasta, E. Acha, R. Guerrero, G. Macchi, C. Bremec. 2001a. The Rio de La Plata estuary, Argentina-Uruguay. *Ecological Studies* 144: 185-204.
- Mianzan, H.W., E.M. Acha, R.A. Guerrero, F.C. Ramírez, D.R., Sorarrain, C. Simionato, J. Borus. 2001b. South Brazilian marine fauna in the Río de la Plata Estuary: Discussing the barrier hypothesis. *Proceedings IX COLACMAR*: pp.1-4.
- Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49: 718-726.
- Palma, S., P. Apablaza, N. Silva. 2007. Hydromedusae (Cnidaria) of the Chilean southern channels (from the Corcovado Gulf to the Pulluche-Chacabuco Channels). *Scientia Marina* 71: 65-74.
- Peters, J.L., Y. Zhuravlev, I. Fefelov, A. Logie, K.E. Omland. 2007. Nuclear loci and coalescent methods support ancient hybridization as cause of mitochondrial paraphyly between gadwall and falcated duck (*Anas* spp.). *Evolution* 61: 1992-2006.
- Piola, A.R., R.P. Matano, E.D. Palma, O.O. Möller Jr., E.J.D. Campos. 2005. The influence of the Plata River discharge on the western south Atlantic shelf. *Geophysical Research Letters*, vol. 32-L01603, pp: 4.
- Ramos-Onsins, S.E., J. Rozas. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2092-2100.
- Reimer, J.D., S. Ono, K. Takishita, J. Tsukahara, T. Maruyama. 2006. Molecular evidence suggesting species in the zoanthid genera *Palythoa* and *Protopalythoa* (Anthozoa: Hexacorallia) are congeneric. *Zoological Science* 23: 87-94.
- Rogers, A.R., H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- Rozas, J., J.C. Sánchez-DellBarrio, X. Messenguer, R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Schneider S., D. Roessli, L. Excoffier. 2000. ARLEQUIN: A software for population genetic data analysis. Version 2000. Genetic and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- Schroth, W., G. Jarms, B. Streit, B. Schierwater. 2002. Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BMC Evolutionary Biology* 2: 1-10.

- Souza, M.M., E. Scemesa, E.G. Mendes. 1996. Behavioral modifications of *Liriope tetraphylla* (Chamisso and Eysenhardt) (Cnidaria, Hydrozoa, Trachymedusae) induced by hyposmotic conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 206: 223-236.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tronolone, V.B., 2007. Estudo faunístico e da distribuição das hidromedusas (Cnidária, Hydrozoa) da região compreendida entre Cabo Frio (RJ) e Cabo de Santa Marta Grande (SC), Brasil. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo. 209p.
- Ueno, S., A. Mitsutani, 1994. Small-scale swarm of a hydrozoan medusa *Liriope tetraphylla* in Hiroshima Bay, the Inland Sea of Japan. *Bulletin of the Plankton Society of Japan* 41: 93-104.
- Vainola, R., P. Oulasvirta. 2001. The first record of *Maeotias marginata* (Cnidaria, Hydrozoa) from the Baltic Sea: a Pontocaspian invader. *Sarsia* 86: 401-404.

Capítulo V

Considerações finais

Os dados apresentados nesta dissertação revelaram que as populações de *Olindias sambaquiensis* e *Liriope tetraphylla* estudadas (Figura 1) encontram-se estruturadas. Análises de diferenciação populacional (AMOVA e comparações pareadas de *Fst* e diversidade nucleotídica), baseadas no polimorfismo de um segmento da região 5' do marcador mitocondrial CO1, revelaram agrupamentos populacionais diferentes para as localidades estudadas de cada uma das espécies nos litorais do Brasil e Argentina. O fluxo gênico se revelou reduzido entre localidades de Argentina e Brasil para ambas as espécies. Deste modo, é possível observar que o auto-recrutamento deve ser significativo para estas populações. Estes dados constituem evidência de que pode ser incorreta a generalização de que as grandes capacidades reprodutivas apresentadas por vários táxons marinhos, e/ou a falta de estruturação do seu meio ambiente, podem facilitar a dispersão e falta de estruturação genética populacional em escalas regionais. Palumbi (1994) já levantou a questão da contradição entre estes modelos de grande dispersão e a presença de habitats marinhos com uma composição de espécies estruturada. Seguindo esta linha, nossos dados sobre ecologia, dinâmica populacional e comportamento de *O. sambaquiensis* (Capítulo 2) também corroboram que: i) a espécie habita ambientes compartimentados, ii) apresenta uma dinâmica populacional com sazonalidade local, e iii) a sua fase dispersiva mostra uma medusa com um marcante comportamento demersal. Em uma escala geográfica regional, como a deste estudo, estes aspectos tendem a favorecer o auto-recrutamento em relação à dispersão, o que aparentemente tem se refletido na estrutura genética detectada entre os extremos da distribuição conhecida para esta espécie. Por outro lado, espécimes mediterrâneos de *L. tetraphylla* têm ciclos reprodutivos de até quatro semanas, nos meses mais quentes, a sete, nos meses mais frios, o que permite a sucessão de várias gerações em poucos meses (Buecher *et al.*, 1997). Já no Atlântico

Figura 1. Área de estudo. Os símbolos representam os locais de amostragem de *L. tetraphylla* ■, e *O. sambaquiensis* ●. LSE-ZNB e LS-ZNB = Litoral Sudeste e Litoral Sul da Zona Nerítica Brasileira, respectivamente.

Sul-ocidental esta espécie pode alcançar grande abundância de medusas nos meses do verão na Baía de *San Borombón*, na região estuarina do Rio da Prata (Figura 1), quando a descarga deste estuário é retida mais rente ao litoral da província de Buenos Aires (Argentina). Deste modo, uma rápida sucessão de várias gerações em um mesmo ponto geográfico também pode se constituir em um fator que favoreça o auto-recrutamento, diminuindo a capacidade dispersiva das medusas e favorecendo a estruturação geográfica de suas populações.

Pelo exposto, para fazer inferências sobre a estruturação na distribuição geográfica de determinada espécie, propriedades que podem ser relacionadas *a priori* com capacidades dispersivas, como a tolerância às mudanças de salinidade e a presença de um ciclo de vida holoplantônico, apresentadas por *L. tetraphylla*, não devem ser consideradas isoladas de outros aspectos de sua história natural. Do mesmo modo, a associação do cosmopolitismo comumente aceito de *L. tetraphylla* com estas características pode ser incorreta, como sugerido pelos resultados obtidos da análise de um segmento do marcador mitocondrial 16S (Capítulo 4). Além dos aspectos biológicos e ecológicos, discutidos juntamente com nossos dados genéticos, para explicar a estrutura populacional encontrada na escala regional temos levantado evidência, baseada no mesmo marcador, de que esta condição cosmopolita é duvidosa e precisa ser testada com análises filogeográficas em escala global.

Do ponto de vista ecológico deve se salientar que a área geográfica estudada apresenta três regiões bem definidas, a saber: 1-Região Litorânea Sudeste e Sul da Zona Nerítica Brasileira, 2-Estuário do Rio da Prata, 3-Região de *El Rincón* (Figura 1). As três regiões se diferenciam por constituírem massas d'água características em relação à temperatura e salinidade, apresentando variações ambientais para as quais as duas espécies estudadas mostram tolerância. Além disso, tais massas d'água apresentam diferentes padrões de circulação, influídos também pelos regimes de ventos, e mostram sazonalidades características. Deste modo, o limite entre as águas de *El Rincón* e as do estuário do Rio da Prata, por exemplo, pode oscilar em uma posição entre as localidades de Necochea e Mar del Plata (Figura 1), sem uma interação marcante entre as duas (Lucas *et al.*, 2005). Entretanto, o estabelecimento da frente de encontro entre as águas do estuário do Rio da Prata e as águas costeiras do sul do Brasil pode se estabelecer entre o litoral do Uruguai (verão) e o Cabo de Santa Marta Grande (no inverno) (Piola *et al.*, 2005) (Figura 1). Nas frentes de encontro mencionadas acima, a mistura das águas pode não ser significativa, sendo possível diferenciar uma massa d'água da outra em ambos os lados das frentes. A interação entre a compartimentalização destas massas d'água e as características biológicas previamente mencionadas para as espécies envolvidas no presente trabalho, poderia explicar o baixo fluxo gênico e a conseguinte

estruturação entre as populações que habitam as regiões do litoral argentino e aquelas do litoral brasileiro.

Pelo exposto, a proposta de que o Rio da Prata represente uma barreira para a dispersão de organismos marinhos entre os litorais do Brasil e Argentina não é corroborada pelos padrões genéticos e ecológicos discutidos acima. Por um lado, em termos eco-fisiológicos, ambas as espécies podem tolerar salinidades baixas de ambientes mixohalinos e, em particular, *L. tetraphylla* se desenvolve conspicuamente na desembocadura do estuário. Por outro lado, devido ao menor grau de salinidade das águas do Rio da Prata, a descarga do estuário se desloca por sobre a água salgada do ambiente costeiro, estabelecendo-se uma cunha sob a qual a água salgada do ambiente marinho penetra na desembocadura do rio (Figura 2). No cenário exposto, o

Figura 2: Diagrama de um corte longitudinal do estuário do Rio da Prata, mostrando seu padrão típico de estratificação (adaptado de Acha & Mianzan, 2003). Para orientação, a montante do rio está à esquerda e sua vazante (ou alto-mar), à direita.

comportamento demersal da medusa de *O. sambaquiensis* permitiria, a princípio, que a mesma consiga se deslocar ao longo do litoral atravessando o estuário sob a halocline formada entre as duas massas d'água, sem entrar em contato direto com a descarga do rio. Como discutido, as condições físicas ou químicas do estuário não parecem ser barreiras para o desenvolvimento e transporte de indivíduos/populações das espécies estudadas. Entretanto, como explicado acima, as fases planctônicas destas espécies, sujeitas à circulação das massas d'água às quais habitam, ficariam restritas às mesmas, e dependendo de fatores como a interação entre o grau de mistura de tais massas e a história natural de cada espécie.

Para ambas as espécies também foi observado que o agrupamento populacional formado pelos haplótipos coletados nas localidades brasileiras revela uma história demográfica mais antiga, com valores de r e média de diferenças nucleotídicas par a par elevados, assim como também distribuições de diferenças nucleotídicas par a par coincidentes com expansões populacionais seguidas de gargalos ou eventos de

subdivisão populacional (Seki *et al.*, 2007). Estas medidas de diversidade também evidenciaram a estruturação entre as populações do litoral brasileiro e as pertencentes ao litoral argentino. Estas últimas revelaram um padrão de expansão populacional coincidente com uma história demográfica mais recente para *L. tetraphylla* ou, no caso de *O. sambaquiensis*, nenhum indício de tal evento. De maneira corroborativa, as medidas de diversidade genética (Tabela 1) revelam um mesmo padrão para ambas as espécies, com valores mais elevados no litoral brasileiro.

Tabela 1. Comparação entre diferentes medidas de diversidade genética obtidas sob o modelo de estruturação detectado entre localidades do litoral do Brasil e da Argentina (SP=São Paulo, SC=Santa Catarina, PR=Paraná, BA=Buenos Aires). Todas as medidas são maiores para o agrupamento brasileiro nas duas espécies. São informados: número de seqüências obtidas para cada grupo (n), número de haplótipos diferentes (h), diversidade haplotípica (H) com a variância (V_h), diversidade nucleotídica (π) e o valor de Teta (θ_π), juntamente com os resultados do teste F_s acompanhados da probabilidade estatística obtida por meio de 10.000 réplicas de simulação por coalescência.

Espécie	Grupo	n	h	$H \pm V_h$	π	θ_π	F_s
<i>L. tetraphylla</i>	Brasil (SP-SC)	16	14	$0,975 \pm 0,001$	0,009	5,108	-7,603 (0,000)
	Argentina (BA)	11	6	$0,727 \pm 0,021$	0,002	1,091	-3,304 (0,002)
<i>O. sambaquiensis</i>	Brasil (SP-PR)	23	22	$0,996 \pm 0,000$	0,014	12,734	-15,193 (0,000)
	Argentina (BA)	11	8	$0,964 \pm 0,003$	0,007	4,182	-1,961 (0,118)

O padrão filogeográfico encontrado para o marcador CO1, obtido a partir de árvores de parcimônia, também foi coincidente para as duas espécies. As topologias resultantes mostraram que os ramos basais são somente ocupados por haplótipos pertencentes ao material coletado no litoral brasileiro. Os haplótipos das populações argentinas sempre se encontraram juntos em um mesmo clado apical. Tal grupo não é monofilético devido à presença de alguns haplótipos das localidades brasileiras no mesmo, o que pode ser um indicativo de eventos de introgressão ou separação incompleta de linhagens (Figura 3). De fato, a posição derivada da politomia favorece a hipótese de introgressão, e a inclusão de todos os haplótipos das localidades argentinas dentro dessa politomia pode ser um sinal de que as localidades brasileiras sejam as receptoras desta introgressão (Peters *et al.*, 2007).

Figura 3: Diagrama do padrão comum de relacionamentos haplotípicos, entre seqüências do marcador mitocondrial CO1, encontrado para as espécies *L. tetraphylla* e *O. sambaquiensis*.

O embasamento das conclusões sobre o padrão filogeográfico de uma espécie na topologia obtida para uma única linhagem gênica pode levar a um erro interpretativo, uma vez que não necessariamente a história genealógica desta linhagem coincide com a história evolutiva das populações (Hey & Machado, 2003). Enfoques “multilocus”, que utilizam diferentes marcadores moleculares para construir hipóteses independentes de relacionamentos filogenéticos, são atualmente utilizados em diversos estudos filogeográficos em uma tentativa de mitigar este problema. Embora esta não tenha sido a metodologia seguida no presente trabalho, é importante salientar que nossos dados revelam um padrão coincidente para duas espécies e, deste modo, para dois segmentos independentes dos genomas mitocondriais envolvidos, o que aqui denominamos de enfoque “multiespécie”. Deste modo, e mesmo utilizando um único marcador molecular por espécie, os resultados obtidos de forma independente podem ajudar no levantamento de uma hipótese consistente sobre o padrão filogeográfico da história evolutiva das espécies que habitam uma região geográfica mais restrita. Esta idéia é baseada nas hipóteses filogeográficas de *Avise et al.* (1987), dentro das quais, basicamente, é proposto que um mesmo evento vicariante, que afete o padrão biogeográfico de uma região, pode originar padrões filogeográficos similares para diferentes espécies (Dawson, 2001). Embora nosso estudo não reflita fenômenos vicariantes, o mesmo enfoque de filogeografia comparada pode ser aplicado, uma vez que não seriam apenas eventos vicariantes que estariam envolvidos no estabelecimento de padrões filogeográficos. Seguindo esta linha, o presente trabalho aporta evidência independente para duas espécies de Hydrozoa, pertencentes a duas ordens distintas e com histórias naturais diferentes, para as quais o mesmo marcador molecular parece revelar um padrão filogeográfico comum. Porém, tal colocação não contradiz que estudos com marcadores nucleares, como o ITS1, já utilizado em estudos filogeográficos em medusozoários (Dawson & Jacobs, 2001; Dawson & Martin, 2001; Schroth *et al.*, 2002; Dawson, 2005a, 2005b), possam aportar mais informação sobre este quesito. Do mesmo modo, a utilização de mais espécies de Medusozoa com padrões similares de distribuição aos apresentados aqui, também deve de ser considerada em diretrizes futuras. Este último aspecto vem sendo trabalhado e já temos gerado dados preliminares, não incluídos no presente estudo.

Nossos dados sugerem que existe um padrão filogeográfico no qual as populações que habitam a região sul do litoral estudado apresentam uma menor diversidade nucleotídica e um posicionamento filogenético apical para um segmento do marcador CO1 nas análises conduzidas, tanto para *L. tetraphylla* como para *O. sambaquiensis*. Partindo destes resultados, levantamos a hipótese de que populações destas espécies poderiam ter se deslocado para o sul após diferentes eventos de expansão populacional,

desde o sudeste do litoral do Brasil, até atingir os limites atualmente conhecidos de distribuição no litoral argentino. Deste modo, tal região possivelmente não esteve sempre disponível para ser habitada por estas populações. Diferentes eventos geológicos, como mudanças climáticas e de circulação de massas d'água (Martin *et al.*, 1991; Mörner, 1991a), incluindo os efeitos dos diferentes períodos glaciais (Clapperton, 1991; Mörner, 1991b) que aconteceram no cone sul da América, poderiam estar envolvidos no estabelecimento do padrão detectado. Os resultados aqui apresentados representam uma primeira aproximação ao estudo destas questões no Atlântico sul-ocidental. Para respondê-las com maiores detalhes, nossos dados continuarão a ser incrementados com estudos em outras espécies e através a utilização de outras metodologias de análise, inclusive com a incorporação de outros marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS

- Acha, E.M., H.W. Mianzan. 2003. El estuario del Plata: donde el río se encuentra con el mar. *Ciencia Hoy* 13: 10-20.
- Awise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb, N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Buecher, E., G.O.Y. Jacqueline, B. Planque, M. Ettienne, S. Dallot. 1997. Long-term fluctuations of *Liriope tetraphylla* in Villefranche bay between 1966 and 1993 compared to *Pelagia nocticula* pullulations. *Oceanologica Acta* 20: 145-157.
- Clapperton, C.M. 1991. Influence of tectonics on the extent of quaternary glaciation in the Andes. *Boletim do Instituto de Geologia da USP* 8: 89-108.
- Dawson, M.N. 2001. Phylogeography in coastal marine animals: a solution from California? *Journal of Biogeography* 28: 723-736.
- Dawson, M.N., D.K. Jacobs. 2001. Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biological Bulletin* 200: 92-96.
- Dawson, M.N., L.E. Martin. 2001. Geographic variation and ecological adaptation in *Aurelia* (Scyphozoa, Semaestomeae): some implications from molecular phylogenetics. *Hydrobiologia* 451: 259-273.
- Dawson, M.N. 2005. Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia. *Journal of Biogeography* 32: 515-533.
- Dawson, M.N. 2005. *Cyanea capillata* is not a cosmopolitan jellyfish: morphological and molecular evidence for *C. annaskala* and *C. rosea* (Scyphozoa: Semaestomeae: Cyaneidae) in south-eastern Australia. *Invertebrate Systematics* 19: 361-370.

- Hey, J., A.C. Machado. 2003. The study of structured populations – new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews/Genetics* 4: 535-543.
- Lucas, A.J., R.A. Guerrero, H.W. Mianzan, E.M. Acha, C.A. Lasta. 2005. Coastal oceanographic regimes of the Northern Argentine continental shelf (34-43°S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65: 405-420.
- Martin, L., J.M. Flexor, K. Suguio. 1991. Possible changes in the Holocene wind pattern recorded on southeastern Brazilian coast. *Boletim do Instituto de Geologia da USP* 8: 117-131.
- Mörner, N.A. 1991a. Holocene sea level changes in the Tierra del Fuego region. *Boletim do Instituto de Geologia da USP* 8: 133-151.
- Mörner, N.A. 1991b. The Patagonian glaciations and the onset of general quaternary-type glaciations on the globe. *Boletim do Instituto de Geologia da USP* 8: 109-115.
- Palumbi, S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematic* 27: 547-572.
- Peters, J.L., Y. Zhuravlev, I. Fefelov, A. Logie, K.E. Omland. 2007. Nuclear loci and coalescent methods support ancient hybridization as cause of mitochondrial paraphyly between gadwall and falcated duck (*Anas* spp.). *Evolution* 61: 1992-2006.
- Piola, A. R.; Matano, R. P.; Palma, E. D.; Möller Jr., O. O.; Campos, E. J. D. 2005. The influence of the Plata River discharge on the western south Atlantic shelf. *Geophysical Research Letters*, vol. 32-L01603, pp:4.
- Schroth, W., G. Jarms, B. Streit, B. Schierwater. 2002. Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BMC Evolutionary Biology* 2: 1-10.
- Seki, S.I., M. Sakanashi, N. Kawaji, N. Kotaka. 2007. Phylogeography of the Ryukyu robin (*Erithacus komadori*): population subdivision in land-bridge island in relation to the shift in migratory habit. *Molecular Ecology* 16: 101-113.

Abstract

Medusozoan species, with quite different life-cycles, inhabit different seas and oceans around the world. In a regional scale, some hydrozoan species are widespread along the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian and Argentinean shores), with populations distributed along a heterogeneous and structured environment. The relation between the distribution of the species and most of the biological and environmental factors is still largely unknown. Therefore, the aim of this study is to investigate the distributional patterns and genetic structure of populations of two hydrozoan species of SW Atlantic Ocean in relation to: (1) the different life histories and (2) the water masses structures of the marine environment. The species studied were the meroplanktonic *Olindias sambaquiensis* (life cycle: egg → planula → polyp → medusa → egg) and the holoplanktonic *Liriope tetraphylla* (life cycle: egg → planula → medusa → egg). We gathered data on the ecology and natural history of the species, and carried out phylogeographic analyses using CO1 and 16S DNA markers. Our results have shown similar phylogeographical patterns and genetic structures for both species. The Brazilian populations are basal and have a higher nucleotidic diversity than the apical Argentinean populations. The Rio de La Plata river is not an effective barrier, and introgression possibly occurs for both species and might be related to the circulation of the water masses. Biologically, the genetic structure found for *Olindias sambaquiensis* must be related to its demersal habit and close affinity to coastal water masses, and that found for *Liriope tetraphylla* must be related to its reproductive cycle and auto-recruitment.

Resumo

Espécies de medusozoários com ciclos de vida muito diferentes habitam distintos mares e oceanos ao redor do mundo. Em uma escala regional, algumas espécies de hidrozoários estão amplamente distribuídas no Atlântico Sul-ocidental, (litorais do Brasil e Argentina), com populações habitando ambientes heterogêneos e estruturados. A relação entre a distribuição das espécies e a maior parte dos fatores ambientais é pouco conhecida. Deste modo, o objetivo de nosso estudo é pesquisar os padrões de distribuição e a estrutura genética populacional de duas espécies de hidrozoários do Atlântico Sul-ocidental em relação a: (1) as diferentes histórias naturais e (2) as distintas estruturas de massas d'água do ambiente marinho. As espécies estudadas foram *Olindias sambaquiensis* (meroplanctônica, ciclo de vida: ovo → plânula → pólipó → medusa → ovo) e *Liriope tetraphylla* (holoplanctônica, ciclo de vida: ovo → plânula → medusa → ovo). Dados sobre a ecologia e história natural de tais espécies foram coletados e análises filogeográficas foram conduzidas utilizando os marcadores

mitocondriais 16S e CO1. Nossos resultados revelaram um padrão filogeográfico similar para ambas as espécies. As populações brasileiras são basais e têm uma maior diversidade nucleotídica que as populações argentinas, as quais ocupam uma posição apical. O Rio da Prata não é uma barreira efetiva e introgressão possivelmente ocorre em ambas as espécies, podendo estar relacionada à circulação das massas d'água. A estrutura genética encontrada para *Olindias sambaquiensis* pode estar relacionada com seu hábito demersal e afinidade com massas d'água costeiras, e para *Liriope tetraphylla* com seu ciclo reprodutivo e auto-recrutamento.