ANGELA APARECIDA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA E POPULACIONAL
DO POLVO COMUM (*Octopus cf. vulgaris*)
DA COSTA BRASILEIRA: ANÁLISE DO DNA
MITOCONDRIAL E MICROSSATÉLITES**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia da Universidade de
São Paulo/Instituto de Ciências Biomédicas/Instituto
Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para
obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.**

São Paulo

2008

ANGELA APARECIDA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA E POPULACIONAL
DO POLVO COMUM (*Octopus cf. vulgaris*)
DA COSTA BRASILEIRA: ANÁLISE DO DNA
MITOCONDRIAL E MICROSSATÉLITES**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia da Universidade de
São Paulo/Instituto de Ciências Biomédicas/Instituto
Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para
obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.**

São Paulo

2008

ANGELA APARECIDA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA E POPULACIONAL
DO POLVO COMUM (*Octopus cf. vulgaris*)
DA COSTA BRASILEIRA: ANÁLISE DO DNA
MITOCONDRIAL E MICROSSATÉLITES**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia da Universidade de
São Paulo/Instituto de Ciências Biomédicas/Instituto
Butantan/ Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para
obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.**

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Moreira, Angela Aparecida.

Caracterização filogenética e populacional do polvo comum (*Octopus cf. vulgaris*) da costa brasileira: análise do DNA mitocondrial e microssatélites / Angela Aparecida Moreira. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Alexandre Wagner Silva Hilsdorf.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia EP/IPT/ICB/Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genética.

Versão do título para o inglês: Phylogenetic and populational characterization of the Octopus (*Octopus cf. vulgaris*) of the Brazilian coast: analysis of mitochondrial DNA and microsatellites.

Descritores: 1. Polvo 2. Filogenia (características) 3. DNA mitocondrial (análise) I. Hilsdorf, Alexandre Wagner Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB039/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Angela Aparecida Moreira.

Título da Tese: Caracterização filogenética e populacional do polvo comum (*Octopus cf. vulgaris*) da costa brasileira: análise do DNA mitocondrial e microssatélites.

Orientador(a): Alexandre Wagner Silva Hilsdorf.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil**

Telefone : 55 11 - 3091.7733 - telefax : 55 11 3091.7438

e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 18 de abril de 2007.

Ilmo. Srs.

Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado

Coordenador da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Ref.: Solicitação de Certificado de Isenção

Venho por meio desta solicitar o Certificado de Isenção das Comissões de Ética em Experimentação Animal (CEEI-ICB/USP) e Comissão de Ética em Pesquisa Com Seres Humanos (CEPSH-ICB/USP), encaminhando o detalhamento do procedimento experimental que será utilizado.

Declaro que o projeto de pesquisa intitulado CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA E POPULACIONAL DO POLVO COMUM (*Octopus cf. vulgaris*) DA COSTA BRASILEIRA: ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL E MICROSSATÉLITES sob a responsabilidade da aluna Angela Aparecida Moreira e orientação do Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf do Núcleo de Ciências Ambientais da Universidade de Mogi das Cruzes, não fará uso de amostras biológicas e/ou células primárias provenientes de seres humanos e/ou animais; assim como não utilizará animais e seres humanos como veículo ou hospedeiro para coleta e manutenção de insetos ou organismos invertebrados.

O projeto (x) não utilizará células imortalizadas/ () utilizará células imortalizadas (caso afirmativo, preencha os dados abaixo).

Linhagem celular _____ () / _____ () / _____ () / _____ () .

Origem: (A) animal

(H) humana

Atenciosamente,

De acordo:

Aluno: _____

Orientador: _____

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP

Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

À minha mãe,

Tereza Stela Moreira

Ao meu pai,

Humberto Pavan

À minha mestra,

Irmã Conceição Jacintho

Por todo o amor, carinho, incentivo e compreensão da minha ausência.

Por me ensinarem a olhar além dos olhos...

Aos meus irmãos,

Aristides Moreira Junior (in memoriam)

Adriana Moreira

Andréia Estela Moreira

Presenças constantes apesar da distância...

Com amor,

DEDICO

Aos meus sobrinhos

Marina Teani Moreira

Ana Luiza Teani Moreira

Luiz Guilherme Ribas

João Pedro Ribas

Maria Clara Moreira e Silva

Com o desejo de que caminhem pelas estradas do conhecimento e do estudo, tornando-se pessoas responsáveis por fazer desta Terra um lugar justo e equitativo...

Esta é pois, a primeira herança que lhes deixo!

OFEREÇO

Ao meu Orientador,

Professor Doutor Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

Para você palavras jamais bastariam....

Obrigada pela compreensão nos momentos mais adversos, pelo sorriso nos instantes de vitórias e, principalmente pelo olhar carinhoso quando, por muitas vezes, a estrada me foi árdua.

Mestre e Amigo foi segurando em suas mãos que galguei cada degrau....

AGRADEÇO

AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de recursos para o desenvolvimento deste estudo (04/02631-9).

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, em especial à Professora Maria Elena Infante Malachias pelo seu exemplo e dedicação que muito me motivou.

Aos funcionários da Secretária do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo pelo atendimento atencioso e o esclarecimento de muitas de minhas dúvidas.

A Universidade de Mogi das Cruzes, Núcleo Integrado de Biotecnologia e Núcleo Integrado de Ciências Ambientais pela concessão do uso do Laboratório de Genética de Peixes e Aquicultura.

Ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento da Secretária de Aquicultura e Abastecimento, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Instituto de Pesca, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Marinho do Estado de São Paulo pela captura do material biológico utilizado neste estudo.

Ao Instituto de Investigação da Pesca e do Mar – IPIMAR, Lisboa, Portugal; e ao Núcleo de Estudos Costeiros da Universidade Federal do Pará pelo fornecimento de amostras de polvo.

Ao fotógrafo Alessandro Archidiacono pela documentação fotográfica utilizada neste trabalho.

Á Fabiana Iervolino e Juliana Viana da Silva do Laboratório de Genética de Peixes e Aquicultura da Universidade de Mogi das Cruzes pela imensa colaboração e ensinamentos. Obrigada pela presença constante e alegrias vivenciadas. Amigas, sem vocês a tarefa seria incompleta, dizer obrigada não é suficiente...

Às eternas amigas Sílvia R. C. Alvarez, Solange Hassan A. Ali Fernandes, Edna Barbosa Ferreira, Rosana Duarte, Adriana de L. Leonel Marasco, Margareth D. Sameshima, Clarice Serafim, Elza Contieri, Tereza C. Vidal e ao querido amigo Wagner L. Volpe. Com vocês tenho vivido meus dias em paz. Obrigada pelo olhar confidente e pela iluminação espiritual que me dedicam. São os grandes Amigos que dão brilho e significado à existência humana.

À minha família por compreender e respeitar minhas ausências e momentos de interminável silêncio. Sem suas orações meu coração ficaria angustiado.

Aos meus Alunos, fonte maior de inspiração e de desejo de avançar. Queridos Alunos que me ensinam a caminhar, estimulam meus olhos para transpor o horizonte e me banham com sua juventude e esperança. Para vocês, minha eterna dedicação e gratidão!

Aos Amigos funcionários do Colégio Nossa Senhora do Rosário – Irmãs Dominicanas, que nesses vinte anos de caminhada me acolheram com as mãos repletas de Amor.

Aos que aqui não foram citados, mas que estão em cada letra utilizada nas páginas que seguirão.

Á Deus. Senhor, obrigada pela vida que me concedes!

Muito Obrigada!

*“Tu és o meu Senhor;
não tenho outro bem além de ti.”*

Salmo 16-2

Este estudo foi realizado no Laboratório de Genética de Peixes e Aqüicultura, do Núcleo Integrado de Biotecnologia, da Universidade de Mogi das Cruzes, sob a orientação do Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf, com recursos da FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo).

RESUMO

MOREIRA, A.A. **Caracterização filogenética e populacional do polvo comum (*Octopus* cf. *vulgaris*) da costa Brasileira**: Análise do DNA mitocondrial e microssatélites. 181 f. Tese - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O táxon *Octopus vulgaris* tem ampla distribuição geográfica em águas tropicais, subtropicais e temperadas nos Oceanos Atlântico, Índico e Oeste do Pacífico sendo especialmente abundante no Mar Mediterrâneo e no Leste do Atlântico. Na última década trabalhos foram realizados em várias partes do mundo com o objetivo de elucidar as lacunas existentes na sistemática dos octópodes, sendo a fauna do Atlântico Sul ocidental a menos estudada. Embora esses trabalhos tenham proporcionado um melhor entendimento a cerca da filogenia, este quadro ainda permanece incompleto. O presente estudo apresenta dados da filogenia molecular de *Octopus* da Costa Brasileira. A diversidade da sequência do DNA de nove populações de *Octopus* cf. *vulgaris* da Costa Brasileira e de uma população de *Octopus vulgaris* proveniente de Portugal foi investigada pelo uso do gene *Citocromo oxidase* – subunidade I (COI) do DNA mitocondrial. Fragmentos de aproximadamente 600 pb do gene COI_{mt} foram amplificados por meio dos *primers* universais LCO1490 e HCO2198, purificados e seqüenciados. As seqüências foram alinhadas pelo método ClustalW. A árvore filogenética gerada pelo alinhamento das seqüências do COI_{mt} revelou dois conjuntos principais, formando clados monofiléticos sustentados por *bootstraps* superiores a 93 %. Um clado contendo os indivíduos provenientes das regiões Sudeste e Sul da Costa Brasileira, similares aos haplótipos de Portugal, que são taxonomicamente classificados como *Octopus vulgaris*, e outro conjunto formado pelos indivíduos coletados em várias localidades da região Nordeste da Costa Brasileira. A divergência nucleotídica entre os clados foi de 17 %. Este nível de diferenciação genética sugere a presença de duas espécies de *Octopus* que aparentemente não apresentam diferenças morfológicas, sendo o grupo Sudeste e Sul, o *Octopus vulgaris* verdadeiro e o grupo do Norte e Nordeste, uma outra espécie a ser classificada. Além disso, os resultados da análise genética das populações de *Octopus* sp e de *O. vulgaris* são apresentados. Os *loci* microssatélites utilizados foram polimórficos em todas as populações estudadas. Trinta e nove alelos foram encontrados na população da região Nordeste da Costa Brasileira e 55 alelos foram encontrados nas populações provenientes das regiões Sudeste e Sul da Costa Brasileira. As estimativas F_{ST} , de R_{ST} e os resultados da Inferência Bayesiana sugeriram que as populações da região Nordeste são geneticamente distintas das populações Sudeste e Sul. O modelo de isolamento-por-distância parece explicar a dinâmica das populações dos *Octopus* sp e *O. vulgaris*, embora nenhuma associação significativa entre a distância geográfica e a diferenciação genética tenha sido encontrada. A análise da Região de Controle (A+T) do DNAm_t revelou a existência de 12 haplótipos existentes para as populações da região Nordeste e 7 haplótipos para os animais das regiões Sudeste e Sul da Costa Brasileira, corroborando com o nível de estruturação genética encontrado pela avaliação com os microssatélites.

Palavras-chave: *Octopus*. Citocromo Oxidase Subunidade I. Marcadores Microssatélites. DNA mitochondrial.

ABSTRACT

MOREIRA, A.A. **Phylogenetic and Population characterization of the Common Octopus (*Octopus cf. vulgaris*) of the Brazilian Coast:** Analysis of Mitochondrial DNA and Microsatellites. 181 f. Ph.D.Thesis - Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2008.

Octopus vulgaris taxon is a cephalopod species of great commercial interest both in the European and Asian market with a wide geographic distribution in tropical, subtropical and temperate waters in the Atlantic Ocean, Indian Ocean and Western Pacific and it is particularly abundant in the Mediterranean Sea and in the Eastern Atlantic Ocean. There were plenty of studies all over the world in the last decade to shed more light on the existing gaps of the systematic of cephalopods, however, the distribution of cephalopod fauna of the South Western Atlantic was the least investigated. Despite the fact that these studies have provided a better understanding for the phylogenetic basis, much remains to be discovered. The present study shows data of the molecular phylogeny of the *Octopus vulgaris* from the Brazilian coast. The diversity of DNA sequences of nine populations of *Octopus cf. vulgaris* along the Brazilian coast and one population from Portugal were investigated by using mitochondrial Cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene. Approximately 600 bp of COI genes were amplified by LCO1490 and HCO2198 primers, then purified and sequenced by the ClustalW method. The phylogenetic tree generated by the COI sequences alignment revealed two main sets forming monophyletic clades backed up by bootstraps superior to 93%. It was found one clade of individuals from Southeastern and South regions of the Brazilian coast, similar to the haplotypes from Portugal which is taxonomically classified *Octopus vulgaris* and another group collected from several localities of the Northeast region of the Brazilian Coast. The nucleotide divergence between clades was of 17%. Thus, this level of genetic differentiation suggests the presence of two species of *Octopus* that do not seem to present morphological differences, being the South and Southeastern group of *Octopus vulgaris* the true species whereas the North and Northeast group is another species yet to be classified. Furthermore, results of genetic population analysis of the *Octopus* sp and *O. vulgaris* are presented. Microsatellites loci were all polymorphic in the all populations surveyed. Thirty-nine alleles were found in the population of the Northeast region of the Brazilian coast and 55 alleles from Southeastern and South regions of the Brazilian coast. The F_{ST} , R_{ST} estimates and Inferences Bayesian suggested that distinct genetic populations of both species in Northeast as well as Southeastern and South, respectively. Isolation-by-distance model seems explain the population dynamics of *Octopus* sp and *O. vulgaris*, although no significant association between geographical distance and genetic differentiation was found. The mtDNA analysis of long non-coding regions (A+T) also revealed 12 existing haplotypes for the populations from the Northeast region and 7 haplotypes for animals from Southeastern and South regions of the Brazilian Coast, and corroborated the level of genetic structuring found by the microsatellites evaluation.

Key words: *Octopus*. Cytocromo Oxidase Subunit I. Microsatellites Markers. Mitochondrial DNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ovos de <i>Octopus vulgaris</i>	27
Figura 2 -	Exemplos de organização do genoma mitocondrial em cefalópodes	38
Figura 3 -	Comparação entre as seqüências dos genes do DNAm _t de peixes e moluscos	39
Figura 4 -	Potes de captura utilizados na pesca comercial para a coleta do polvo	45
Figura 5 -	Embarcação utilizada na pesca comercial do polvo	46
Figura 6 -	Lançamento de espinhéis de potes durante a captura de polvos na pesca comercial	47
Figura 7 -	Pote de captura contendo ovos do polvo e animal adulto sendo retirado do pote de captura pela adição de querosene	48
Figura 8 -	Preparação para biópsia histológica em alto mar	50
Figura 9 -	Biópsia histológica realizada em alto mar	51
Figura 10 -	Obtenção de tecido muscular em laboratório	52
Figura 11 -	Representação esquemática do DNA mitocondrial de <i>Octopus vulgaris</i> . A seta indica a Região de Controle (A+T)	59
Figura 12 -	Gel de agarose 0,8% com produtos da amplificação, por PCR do fragmento de, aproximadamente, 658 pb do gene do DNAm _t citocromo oxidase subunidade I (COI) de polvos capturados no Estado de Pernambuco. M=Marcador de peso molecular 100 pb; 01-19 representam indivíduos da amostra. A banda de 500 pb está indicada pelo símbolo ♦	74
Figura 13 -	Relações filogenéticas inferidas por “Neighbor-joining” (NJ) para as amostras de <i>Octopus</i> sp, construídas pelo alinhamento de ≈ 658 pb do gene mitocondrial COI. A escala indica a distância de Tamura-Nei. Valores de “bootstrap”, baseados em 1000 replicações, maiores que 50%, são apresentados nos ramos da árvore. O molusco <i>Katharina tunicata</i> foi utilizada como grupo externo	79
Figura 14 -	Mapa de distribuição de duas espécies de polvo identificadas neste estudo. As regiões indicadas em vermelho representam as áreas de distribuição do <i>Octopus</i> sp e, as indicadas em azul, apontam para as áreas de distribuição do <i>Octopus vulgaris</i>	81
Figura 15 -	DNA total extraído de 20 animais capturados no Estado do Ceará	82
Figura 16 -	Gel de agarose 0,8% com produtos de amplificação por PCR do locus microssatélite μOv10 para polvos capturados no Estado do Rio Grande do Norte. M=Marcador de peso molecular 100 pb; B=branco; 02-26 representam indivíduos da amostra. Bandas de, aproximadamente, 130 pb. A banda de 100 pb está indicada pelo símbolo ♦	83
Figura 17 -	Gel de agarose 0,8% com produtos de amplificação por PCR do locus microssatélite μOv12 para polvos capturados no Estado da Bahia. M=Marcador de peso molecular 100 pb; B=branco; 01-37 representam indivíduos da amostra. Bandas de, aproximadamente, 180 pb. A banda de 100 pb está indicada pelo símbolo ♦	83
Figura 18 -	Fracionamento em gel de poliacrilamida 12,0% de fragmentos	

	amplificados do <i>locus</i> $\mu\text{Ov}10$ - $(\text{GA})_{14}$ de <i>Octopus</i> sp. M= Marcador de peso molecular 10 pb, sendo a banda mais intensa ($\diamond$), corresponde a 100 pb. Verifica-se a presença de duas bandas próximas, indicando que as amostras utilizadas são heterozigotas. Raias 02 e 03: fragmentos de 118 e 133 pb, respectivamente. Raias 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13 e 14: fragmentos de 122 e 133 pb, respectivamente	85
Figura 19 -	Valores de K (maior verossimilhança) para o conjunto de dados dos animais capturados nos Estados da região Nordeste da Costa Brasileira. A seta indica o valor com menor desvio-padrão (K=4)	96
Figura 20 -	Valores de Delta K para o conjunto de dados dos animais capturados nos Estados da região Nordeste da Costa Brasileira, indicando o valor provável do número de populações representado pela seta ($\Delta K = 4$)	97
Figura 21 -	“Bar plot” representativo da alocação dos 140 animais capturados nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia e Pernambuco em quatro populações indicadas pelas cores amarelo, vermelho, verde e azul. Os resultados foram obtidos pela aplicação de uma extensão de corrida de “burn-in” de 100000 de comprimento e 500000 repetições. A fusão de cores representa indivíduos que possuem características genotípicas que podem ser compartilhadas com indivíduos de outra população que não a qual os mesmos foram alocados	98
Figura 22 -	Padrão de divergência genética entre quatro populações de <i>Octopus</i> sp, definido pelo agrupamento UPGMA, com base na identidade genética obtida a partir das distâncias genéticas de Nei (1978). Valores de <i>bootstrap</i> , baseados em 1000 replicações	103
Figura 23 -	Relação entre os haplótipos de <i>Octopus</i> sp obtida pela análise de Inferência Bayesiana (BI). Árvore não-enraizada. Haplótipos 1 e 2: Ceará; haplótipos 3, 4, 5, 6 e 7: Rio Grande do Norte; haplótipos 8, 9 e 10: Pernambuco e haplótipos 11 e 12: Bahia ..	110
Figura 24 -	Filograma dos haplótipos de <i>Octopus</i> sp obtido pela análise de Inferência Bayesiana (BI). Números entre os ramos representam os valores de “bootstrap”. São mostrados apenas os suportes maiores que 50,0%. Haplótipos 1 e 2: Ceará; haplótipos 3, 4, 5, 6 e 7: Rio Grande do Norte; haplótipos 8, 9 e 10: Pernambuco e haplótipos 11 e 12: Bahia	111
Figura 25 -	DNA total extraído de 30 animais capturados no Estado do Rio de Janeiro. Marcador de peso molecular 100 pb (M). ($\diamond$) indica a banda de 100 pb	114
Figura 26 -	Gel de agarose 0,8% com produtos de amplificação por PCR do <i>locus</i> microssatélite $\mu\text{Ov}04$ para polvos capturados no Estado de São Paulo. M=Marcador de peso molecular 100 pb; B=branco; 01-19 representam indivíduos da amostra. Bandas de, aproximadamente, 125 pb. A banda de 100 pb está indicada pelo símbolo $\diamond$	116

Figura 27 -	Gel de agarose 0.8% com produtos de amplificação por PCR do <i>locus</i> microssatélite μ Oct08 de polvos capturados no Estado do Rio de Janeiro. M=Marcador de peso molecular 100 pb; 01-37 representam indivíduos da amostra. Bandas de, aproximadamente, 125 pb. A banda de 100 pb está indicada pelo símbolo ❖	116
Figura 28 -	Fracionamento em gel de poliacrilamida 12% de fragmentos amplificados do <i>locus</i> μ Oct03 – (AT) ₁₆ (GT) ₁₅ de <i>Octopus vulgaris</i> . M = Marcador de peso molecular 10 pb, sendo a banda mais intensa (❖), correspondente a 100 pb. A exceção das raia 05 e 07, que evidenciam a presença de duas bandas próximas (131 e 136 pb, respectivamente) apontando para amostras heterozigotas, verifica-se a presença de uma banda de 131 pb, indicando que as amostras utilizadas são homozigotas	117
Figura 29 -	Valores de K (maior verossimilhança) para o conjunto de dados dos animais capturados nos Estados das regiões Sudeste e Sul da Costa Brasileira. A seta indica o valor com menor desvio-padrão (K=4)	130
Figura 30 -	Valores de Delta K para o conjunto de dados dos animais capturados nos Estados das regiões Sudeste e Sul da Costa Brasileira, indicando o valor provável do número de populações representado pela seta (ΔK)	132
Figura 31 -	“Bar plot” representativo da alocação de animais capturados nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina em quatro populações indicadas pelas cores vermelho, verde, azul e amarelo. Os resultados foram obtidos pela aplicação de uma extensão de corrida de “burn-in” de 100000 de comprimento e 500000 repetições. A fusão de cores representa indivíduos que possuem características genotípicas que podem ser compartilhadas com indivíduos de outra população que não a qual o mesmo foi alocado	133
Figura 31 -	Continuação	134
Figura 32 -	Padrão de divergência genética entre cinco populações de <i>Octopus vulgaris</i> , definido pelo agrupamento UPGMA, com base na identidade genética obtida a partir das distâncias genéticas de Nei (1978), Valores de <i>bootstrap</i> , baseados em 5000 replicações	136
Figura 33 -	Relação entre os haplótipos de <i>Octopus vulgaris</i> obtida pela análise de Inferência Bayesiana (BI). Árvore não-enraizada. Haplótipo 1: RJ; SP; PR e SC; Haplótipo 2: RJ; Haplótipo 3: RJ; SP; PR e SC; Haplótipo 4: RJ; Haplótipo 5: RJ; Haplótipo 6: PR e Haplótipo 7: SC	141
Figura 34 -	Filograma dos haplótipos de <i>Octopus</i> sp obtido pela análise de Inferência Bayesiana (BI). Números entre os ramos representam os valores de “bootstrap”. Haplótipo 1: Rio de Janeiro; São Paulo; Paraná e Santa Catarina; Haplótipo 2: Rio de Janeiro; Haplótipo 3: Rio de Janeiro; São Paulo; Paraná e Santa Catarina; Haplótipo 4: Rio de Janeiro; Haplótipo 5: Rio de Janeiro; Haplótipo 6: Paraná e Haplótipo 7: Santa Catarina ..	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Regiões de captura do polvo e número de animais	44
Tabela 2 -	Organização dos estoques de polvo	49
Tabela 3 -	Espécimes e procedência dos polvos analisados no presente estudo	54
Tabela 4 -	Características dos <i>loci</i> microsatélites selecionados para a avaliação molecular das amostras de polvo	63
Tabela 5 -	Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (Forward e Reverse) para os <i>loci</i> microsatélites	64
Tabela 6 -	Matriz de divergência nucleotídica estimada de acordo com Tamura–Nei (1993) baseada em seqüências do gene mitocondrial COI para 25 seqüências de <i>Octopus</i>	76
Tabela 7 -	Condições de amplificação do DNA para cada <i>locus</i> microsatélite	84
Tabela 8 -	Genética descritiva dos <i>loci</i> microsatélites considerando os indivíduos de todas as populações conjuntamente. A=número de alelos, Ae=número efetivo de alelos por <i>locus</i> , He=diversidade gênica, $h_{m\acute{a}x}$ =diversidade máxima, $He / h_{m\acute{a}x}$ = proporção de diversidade máxima (em %)	84
Tabela 9 -	Índices de diversidade entre as populações de <i>Octopus</i> sp analisadas	87
Tabela 10 -	Tamanho em pares de bases (pb), número de alelos e diversidade alélica para cada <i>locus</i> microsatélite	87
Tabela 11 -	Relação dos alelos encontrados no <i>locus</i> microsatélite μ Ov04 [(TTA) ₂₂] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições () _n	88
Tabela 12 -	Relação dos alelos encontrados no <i>locus</i> microsatélite μ Ov06 [(ATT) ₂₄] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições () _n	88
Tabela 13 -	Relação dos alelos encontrados no <i>locus</i> microsatélite μ Ov10 [(GA) ₁₄] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições () _n	88
Tabela 14 -	Relação dos alelos encontrados no <i>locus</i> microsatélite μ Ov12 [(GATA) ₂₀] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições () _n	89
Tabela 15 -	Relação dos alelos encontrados no <i>locus</i> microsatélite μ Oct03 [(AT) ₁₆ (GT) ₁₅] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições () _n	89
Tabela 16 -	Relação dos alelos encontrados no <i>locus</i> microsatélite μ Oct08 [(TG) ₃₆] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições () _n	89
Tabela 17 -	Freqüência dos alelos (indicados pelo número de repetições) nos seis <i>loci</i> microsatélites nucleares nas populações de <i>Octopus</i> sp estudadas. Em negrito, os alelos exclusivos em cada população	91
Tabela 18 -	Diversidade genética para seis loci microsatélites em quatro populações de <i>Octopus</i> sp: Número de alelos (A); Número efetivo de alelos por locus (Ae); Riqueza alélica (A _R); Heterozigosidade observada (Ho); Heterozigosidade esperada (He); diversidade máxima ($h_{m\acute{a}x}$) e coeficiente de endogamia	

	(F_{IS}). Os números em () indicam o desvio padrão	93
Tabela 19 -	Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg	94
Tabela 20 -	Resultado da análise de variância molecular (AMOVA)	99
Tabela 21 -	Estimativa de F_{ST} (acima da linha diagonal) e R_{ST} (abaixo da linha diagonal) entre pares de populações de <i>Octopus</i> sp	99
Tabela 22 -	Estimativa das estatísticas F de Wright (1965), de R_{ST} de Slatkin (1995) e do número de migrantes por geração (Nm) em quatro populações de <i>Octopus</i> sp. Intervalo de confiança (IC) de 95,0 % de probabilidade	100
Tabela 23 -	Distribuição das amostras de acordo com as localidades geográficas e haplótipo do <i>Octopus</i> sp. (-) haplótipos não encontrados	105
Tabela 24 -	Variação das seqüências entre os 12 haplótipos da região controladora (A+T) do DNAm de <i>Octopus</i> sp. Os números no topo indicam os sítios polimórficos. O número de indivíduos pertencentes a cada haplótipo é mostrado entre parênteses após o nome do haplótipo	106
Tabela 25 -	Frequências haplotípicas, número de seqüências (N), diversidade nucleotídica (π) e diversidade haplotípica (Hd), dentro das populações e nos dados totais de <i>Octopus</i> sp	107
Tabela 26 -	Análise da Variância Molecular (AMOVA) no conjunto de populações de <i>Octopus</i> sp	108
Tabela 27 -	Valores de F_{ST} entre as populações de <i>Octopus</i> sp estudadas (acima da linha diagonal) e os valores das probabilidades (abaixo da linha diagonal)	108
Tabela 28 -	Distância genética absoluta entre os haplótipos	111
Tabela 29 -	Condições de amplificação do DNA para cada <i>locus</i> microssatélite	115
Tabela 30 -	Genética descritiva dos loci microssatélites considerando os indivíduos de todas as populações de <i>Octopus vulgaris</i> conjuntamente: A = número de alelos; Ae = número efetivo de alelos por <i>locus</i> ; Ho = heterozigosidade observada; He = heterozigosidade esperada, P = probabilidade associada; $h_{m\acute{a}x}$ = diversidade máxima; $He/h_{m\acute{a}x}$ = proporção de diversidade máxima (em %)	118
Tabela 31 -	Tamanho em pares de bases (pb), número de alelos e diversidade alélica para cada <i>locus</i> microssatélite	119
Tabela 32 -	Relação dos alelos encontrados no <i>locus</i> microssatélite μ Ov04 [(TTA) ₂₂] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições () _n	120
Tabela 33 -	Relação dos alelos encontrados no <i>locus</i> microssatélite μ Ov06 [(ATT) ₂₄] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições () _n	120
Tabela 34 -	Relação dos alelos encontrados no <i>locus</i> microssatélite μ Ov10 [(GA) ₁₄] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições () _n	120

Tabela 35 -	Relação dos alelos encontrados no <i>locus</i> microssatélite μOv12 [(GATA) ₂₀] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições () _n	120
Tabela 36 -	Relação dos alelos encontrados no <i>locus</i> microssatélite μOct03 [(AT) ₁₆ (GT) ₁₅] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições () _n	121
Tabela 37 -	Relação dos alelos encontrados no <i>locus</i> microssatélite μOct08 [(TG) ₃₆] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições () _n	121
Tabela 38 -	Frequência dos alelos (indicados pelo número de repetições) nos seis <i>loci</i> microssatélites nucleares nas populações estudadas	121
Tabela 39 -	Estimativa de parâmetros genéticos para as quatro populações de <i>Octopus vulgaris</i> , sendo: n = número de indivíduos amostrados; H _O = heterozigosidade observada; H _e = heterozigosidade esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg	123
Tabela 40 -	Índices de diversidade entre as populações de <i>Octopus vulgaris</i> analisadas	125
Tabela 41 -	Diversidade genética para seis <i>loci</i> microssatélites em quatro populações de <i>Octopus vulgaris</i> : Número de alelos (A); Número efetivo de alelos por locus (A _e); Riqueza alélica (A _R); Heterozigosidade observada (H _O); Heterozigosidade esperada (H _e); diversidade máxima (h _{máx}) e coeficiente de endogamia (F _{IS}). Os números em () indicam o desvio padrão	128
Tabela 42 -	Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg	129
Tabela 43 -	Resultado da análise de variância molecular (AMOVA)	131
Tabela 44 -	Estimativa de F _{ST} (acima da diagonal) e R _{ST} (abaixo da diagonal) entre pares de populações de <i>Octopus vulgaris</i>	134
Tabela 45 -	Estimativa das estatísticas F de Wright (1965) e de R _{ST} de Slatkin (1995) em quatro populações de <i>Octopus vulgaris</i> . Intervalo de confiança (IC) de 95,0 % de probabilidade	135
Tabela 46 -	Número de migrantes – Nm (acima da diagonal) e Distância genética (REYNOLDS et al., 1983) (abaixo da diagonal) estimadas para cinco populações de <i>Octopus vulgaris</i>	135
Tabela 47 -	Variação das seqüências entre os 04 haplótipos da Região Controladora (A+T) do DNAm _t de <i>Octopus vulgaris</i> . Os números no topo indicam os sítios polimórficos. O número de indivíduos pertencentes a cada haplótipo é mostrado entre parênteses após o nome do haplótipo	138
Tabela 48 -	Frequências haplotípicas, número de seqüências (N), diversidade nucleotídica (π), diversidade haplotípica (H _d) e F _{ST} – entre () os valores de P, para as quatro populações e nos dados totais de <i>Octopus vulgaris</i>	139
Tabela 49 -	Distância genética absoluta entre os haplótipos	142
Tabela 50 -	Análise da Variância Molecular (AMOVA) no conjunto de populações de <i>Octopus vulgaris</i>	143
Tabela 51 -	Valores de F _{ST} entre as populações de <i>Octopus</i> sp estudadas (acima da linha diagonal) e os valores das probabilidades (abaixo da linha diagonal)	144

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **AMOVA**: Análise Molecular de Variância
- **ANOVA**: Análise de Variância
- **16S**: Subunidade Ribossômica maior
- **COI**: Subunidade I do Complexo Citocromo Oxidase c
- **COIII**: Subunidade III do Complexo Citocromo Oxidase c
- **DNA**: Ácido desoxirribonucléico
- **DNAMt**: DNA Mitocondrial
- **DNA_n**: DNA Nuclear
- **dNTPs**: Didesoxinucleotídeos trifosfatados
- **D-loop**: "Displacement loop" ou região controladora do DNAMt
- **EDTA**: Ácido etilenodiaminotetracético
- **mA**: Mili -Ampere
- **PCR**: Reação em Cadeia da Polimerase
- **RNA**: Ácido Ribonucléico
- **rpm**: Rotações por minuto
- **SDS**: Sódio Duodecil Sulfato
- **STE**: Tris-HCl, EDTA e NaCl
- **TBE**: Tris – Borato – EDTA
- **TE**: Tris-EDTA
- **TEMED**: N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamino
- **Tris**: Trishidroximetil amino metano
- **Tris-Base**: Tris -hydroximetil-aminometano
- **Tris-Ácido**: Tris e Ácido Clorídrico
- **tRNA**: RNA Transportador
- **UPGMA**: método de agrupamento de pares sem pesos com média aritmética, do inglês "unweighted pair-group method with arithmetic mean"
- **UV**: Ultra-violeta
- **V**: Volts
- **W**: Watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	21
1.1 Características básicas dos Cefalópodes	22
1.1.1 O <i>Octopus vulgaris</i>	23
1.2 Estoques e Populações	28
1.3 Fluxo Gênico	29
1.3.1 Modelos de Fluxo Gênico	30
1.4 Marcadores Genéticos	31
1.4.1 Aspectos Gerais	31
1.4.2 Marcadores Microssatélites ou SSR ("Simple Sequence Repeat" - Sequências Simples Repetidas)	32
1.4.3 DNA Mitocondrial	35
1.4.4 Marcadores Moleculares no estudo de Cefalópodes	41
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo Geral	42
2.2 Objetivos Específicos	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Amostragem	43
3.2 Organização dos estoques	49
3.3 Biópsia	49
3.4 Extração do DNA total	53
3.5 DNA Mitocondrial	54
3.5.1 DNA Mitocondrial: Análise Filogenética	54
3.5.1.1 Amplificação e Seqüenciamento	55
3.5.1.2 Análise Estatística e Filogenética	57
3.5.2 DNA Mitocondrial: Análise Populacional	58
3.5.2.1 Amplificação e Seqüenciamento	60
3.5.2.2 Análise Genotípica e Populacional	61
3.6 DNA Nuclear: Marcadores Microssatélites	63
3.6.1 Análise Genotípica e Populacional	65
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1 Análise Filogenética	74
4.2 Análise Populacional	82

4.2.1 <i>Octopus</i> sp	82
4.2.1.1 Marcadores Microssatélites	82
4.2.1.1.1 Diversidade Genética	82
4.2.1.1.2 Frequências Alélicas	90
4.2.1.1.3 Variação Genética	92
4.2.1.1.4 Estrutura Genética e Fluxo Gênico	99
4.2.2 <i>Octopus</i> sp	105
4. 2.2.1 Região A+T do DNAm	105
4.2.3 <i>Octopus vulgaris</i>	114
4.2.3.1 Marcadores Microssatélites	114
4.2.3.1.1 Diversidade Genética	114
4.2.3.1.2 Frequências Alélicas	121
4.2.3.1.3 Variação Genética	124
4.2.3.1.4 Estrutura Genética e Fluxo Gênico	134
4.2.3 <i>Octopus vulgaris</i>	138
4.2.3.2 Região A+T do DNA Mitocondrial	138
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	145
REFERÊNCIAS	150

Classificação taxonômica

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DOS CEFALÓPODES

A classe *Cephalopoda* compreende cerca de 700 espécies, distribuídas em 140 gêneros e 45 famílias (SWEENEY; ROPER, 1998). Com exceção das espécies da subclasse *Nautiloidea*, os cefalópodes pertencem à subclasse *Coleioidea*, caracterizada por apresentar concha interna ou ausente, um único par de brânquias, 8 a 10 apêndices circumorais, saco de tinta e grandes “cérebros” e olhos (ROPER et al., 1984, HANLON; MESSENGER, 1996).

Os cefalópodes compartilham determinadas características com os vertebrados mais altamente desenvolvidos, tais como olhos com lente, pupila e um sistema nervoso bem desenvolvido (DE GROOT, 1995).

Possuem curto ciclo de vida, a maior parte é monocíclica podendo haver sincronia na desova e a abundância varia marcadamente de ano para ano (CADDY; GULLAND, 1983).

São oportunistas e algumas espécies possuem cuidado com a prole, o tamanho populacional é regulado pela disponibilidade de alimento e por condições abióticas, em geral possuem uma fase migratória (CADDY; GULLAND, 1983).

Possuem períodos de explosões populacionais intercalados por períodos com populações de menor tamanho (CAVERIVIERE, 1992). As populações naturais são controladas basicamente por três processos:

- ✓ Crescimento individual: expresso pelo aumento de massa corporal ao longo do tempo é um processo dependente da idade e do tamanho do indivíduo com limites geneticamente delimitados para cada espécie (BREY; GAGE, 1997);
- ✓ Mortalidade: pode ser causada por eventos episódicos devido a distúrbios no ambiente em que vivem (atribuída tanto a fatores antrópicos como poluição e pesca, como a variações anômalas dos fatores ambientais), aos limites impostos pela longevidade das espécies, ou ainda aos fenômenos naturais como a predação, parasitismo e doenças que geram perda em número ao longo do ciclo de vida das espécies (TOMÁS, 2002);

✓ Recrutamento: adição de juvenis à população parental (recrutamento biológico) ou à população submetida à captura pesqueira (recrutamento por pesca); depende de diversos fatores, tais como idade de primeira maturação, estrutura etária da população, capacidade reprodutiva e mortalidade das primeiras fases de vida (TOMAS, 2002).

Os cefalópodes predam ativamente crustáceos, peixes e moluscos inclusive outros cefalópodes, e são itens alimentares importantes para todos os grupos de vertebrados marinhos (AMARATUNGA, 1987).

Várias espécies da classe *Cephalopoda* fazem parte de pescarias importantes no Atlântico Norte (WHITAKER et al., 1991), Mediterrâneo (SÁNCHEZ; OBARTI, 1993; QUETGLAS et al., 1998), Pacífico (DEFEO; CASTILLA, 1998), Atlântico Central (HERNÁNDEZ-GARCIA et al., 1998) e Costa Africana (CADDY, 1983; AMARATUNGA, 1987). O mesmo não ocorre no Atlântico Sul Ocidental onde a pesca se encontra pouco desenvolvida, sendo em geral do tipo artesanal (COSTA; HAIMOVICI, 1990; HAIMOVICI; ANDRIGUETTO FILHO, 1986; ROPER et al., 1984).

1. 1.1 O *Octopus vulgaris*

O *Octopus vulgaris* pertence ao filo *Mollusca*, classe *Cephalopoda*, ordem *Octopoda*, família *Octopodidae* e gênero *Octopus* (RIOS, 1994), vive desde a Costa até a borda da plataforma continental (100m a 600m), em temperaturas que variam de 7,0 °C a 32,0 °C e a uma taxa de salinidade entre 32,0 ‰ e 40,0 ‰ (QUETGLAS et al., 2000; GUERRA, 1992).

A maioria dos dados bibliográficos sobre o comportamento e a biologia do *Octopus vulgaris* é baseada em observações realizadas em laboratório (NIXON, 1966; BOYLE, 1980; ANDREU-MOLINER; CACHAZA, 1984; ANDERSON et al., 1999; IGLESIAS et al., 2000).

Mais recentemente foram publicados alguns trabalhos que apresentam dados do estudo da biologia do *Octopus vulgaris*: na Península Ibérica (RODRÍGUES-RÚA

et.al., 2005), Ilhas Canárias (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2002), África Ocidental (CAVERIVIERI et al., 1999; BALGUERÍAS et al., 2000) e no Mediterrâneo (KATSANEVAKIS; VERRIOPOULOS, 2004) com diferentes resultados sobre o peso na maturidade e sobre o período de reprodução.

Os dados gerais de biometria, incluindo a relação entre o peso vivo e o comprimento total e dorsal do manto foram publicados por Nixon (1970), a partir da análise de animais mantidos em cativeiro e de animais coletados da natureza. A biometria de diversas espécies de polvo é também o assunto dos artigos escritos por Guerra e Manriquez (1980), Cunha e Pereira (1995) e Mangold (1998).

Uma identificação mais rigorosa do sexo é realizada pela observação dos órgãos reprodutores internos, sendo assim possível distinguir o sexo destes animais. Os machos possuem um testículo que se abre em um gonoducto ímpar do lado esquerdo do ânus e as fêmeas possuem um único ovário, mas este se abre em dois gonoductos, um de cada lado do ânus (SEMMENS et al., 2004; VILLANUEVA et al., 1996).

A fecundidade oscila de 100.000 a 400.000 ovos por fêmea, dependendo do seu tamanho. Os ovos são pequenos e formam cachos (Figura 1), e o cuidado das fêmeas com a postura já foi observado (GUERRA, 1992).

Os primeiros estudos de avaliação de estoques de polvo datam do fim da década de 1950 (TANAKA, 1958). Posteriormente, outros autores procuraram modelar populações de cefalópodes empregando métodos diversos (BRAVO DE LAGUNA, 1989; FOGARTY, 1989; BASON et al., 1996; DEFEO; CASTILLA, 1998), em geral utilizados para populações de peixes.

Das 112 espécies referenciadas para o gênero *Octopus* (TOMÁS, 2002), o táxon *Octopus vulgaris* é citado como tendo ampla distribuição geográfica em águas tropicais, subtropicais e temperadas nos Oceanos Atlântico, Índico e Oeste do Pacífico (ROPER et al., 1984; COSTA; HAIMOVICI, 1990), sendo especialmente abundante no Mar Mediterrâneo e no Leste do Atlântico.

Roper et al. (1984) sugerem que o *Octopus vulgaris* seja uma espécie cosmopolita. Entretanto, Mangold e Hochberg (1991) e Mangold (1998) redefiniram os limites desta espécie, sugerindo que sua distribuição restringe-se ao Mediterrâneo e a Costa Leste do Oceano Atlântico.

Estudos também mostraram que espécies distintas são, incorretamente, identificadas como *Octopus vulgaris*. A distribuição do *Octopus vulgaris* não está

bem elucidada, entretanto sua distribuição ao redor do Mar Mediterrâneo e ao Leste do Atlântico é indiscutível (ICES, 2005).

Voss e Toll (1998) listaram 33 espécies e subespécies da subfamília *Octopodinae* para o Atlântico Ocidental, desde o Mar do Labrador até o Cape Horn, incluindo as ilhas do Atlântico Sul. Segundo Voight (1998), existe grande possibilidade de aumento desse número, uma vez que é citada a ocorrência de espécies similares em áreas distantes das localidades de seus respectivos tipos, mascarando assim espécies endêmicas de regiões mais restritas.

A população da Costa Norte atlântica da África vem sendo intensamente estudada desde a década de 1970 por diversos autores (GUERRA, 1979; PEREIRO; BRAVO DE LAGUNA, 1979; HATANAKA, 1979; MANGOLD, 1997; MANGOLD, 1986). Por sua vez, a biologia do morfotipo do Sul da África foi bem descrita por Smale e Buchan (1981).

A sistemática da família *Octopodidae* apresenta dificuldades devido à ausência de partes duras e a alta variabilidade morfométrica e morfológica (VOIGHT, 1991).

Em alguns casos, a separação de espécies toma por base, caracteres taxonômicos únicos de difícil avaliação objetiva tais como: coloração predominante na espécie, potência do veneno (ROPER; HOCHBERG, 1988), tamanho de ovo (FORSYTHE; HANLON, 1988) e morfologia das estruturas sexuais dos machos maduros, como hectocótilo e espermatóforo (VOSS, 1964).

Caracterizações e comparações morfológicas, morfométricas e merísticas são de grande importância na descrição e diferenciação de espécies e até subespécies (AUGUSTYN; GRANT, 1988; BARÓN, 2001), podendo mostrar aspectos sobre habitat e modo de vida de diversos grupos de cefalópodes (HANLON; MESSENGER, 1996).

Voight (1993b, 1994) demonstrou a importância das medidas anatômicas nos estudos de sistemática de polvos através de sua utilização em análises multivariadas, cujos objetivos consistiram desde comparações da morfologia das espécies até a associação desta com a distribuição geográfica e batimétrica.

Roper et al. (1984) e Mangold (1997) sugeriram que estudos sistemáticos com populações regionais de *Octopus vulgaris* devam ser realizados.

A filogenia dos *Octopodas* tem sido objeto de controvérsia no decorrer do último século. Registra-se nas últimas décadas um crescente interesse nos estudos filogenéticos, a partir dos quais diversas publicações foram realizadas nesse campo, tais como: Voight, 1993a; Voight, 1997; Young; Vecchione, 1996.

Carlini et al. (2001) examinaram as relações filogenéticas dos *Octopodas* fundamentadas pelas informações das seqüências de DNA mitocondrial e seus resultados foram comparados com classificações e filogenias baseadas em análises morfológicas anteriores. Os resultados mostraram diferenças consideráveis de inferências retiradas de informações de padrões morfológicos.

Na última década muitos trabalhos foram realizados em várias partes do mundo com o objetivo de elucidar as lacunas existentes na sistemática dos octópodes, tais como: Villanueva et al. (1991); Stranks, (1996); Mangold, (1998); Toll, (1990); Guerra et al. (1999); Voss; Toll, (1998); O'Shea, (1999), sendo a fauna do Atlântico Sul ocidental a menos estudada (VOIGHT, 1998).

Embora esses estudos tenham proporcionado um entendimento maior a cerca da filogenia, este quadro permanece incompleto.

Figura 1 – Ovos de *Octopus vulgaris*
Fonte: <http://www.thecephalopodpage.org>

1. 2 ESTOQUES E POPULAÇÕES

A idéia de estoque, como unidade sobre a qual um esforço de pesca atua, está associada ao conceito de “sustainable yield” (LANNAN et al., 1987), isto é, por padrões de recrutamento e mortalidade de uma determinada espécie.

Esta proposição de estoque, portanto, não leva em consideração a possibilidade de espécies de organismos aquáticos formarem estoques ou populações isoladas dentro de uma mesma área. Estes estoques ou populações podem, então, responder de formas diversas aos esforços de pesca empreendidos.

Desta forma, faz-se necessária uma definição mais detalhada do conceito de estoque que possa integrar os vários parâmetros biológicos.

“Estoque” pode ser considerado como um grupo intraespecífico de organismos cujo fluxo gênico ocorre ao acaso com integridade temporal e espacial (IHESSEN et al., 1981), sendo o grau de integridade o que irá definir o tipo de estoque a ser explorado. Segundo Tomás (2002):

- ✓ Baixo grau de integridade: considerados como “estoques exploráveis”, um esforço de pesca aplicado em um recurso pesqueiro que não afete a abundância de outro adjacente;
- ✓ Alto grau de integridade: o conceito de estoque genético torna-se importante à medida que se leva em consideração o isolamento reprodutivo dos estoques.

Estes conceitos revelam o importante aspecto temporal dos estoques, visto que nos “estoques exploráveis” o manejo tem como fundamento, a perpetuação dos estoques locais evitando-se a sobrepesca.

Um manejo em longo prazo deve ter como ponto de partida a diversidade genética intra e interpopulacional. Assim, o conhecimento da estrutura genética populacional de determinada espécie consiste em um parâmetro importante para que estoques/populações presentes em uma mesma área, em caso de apresentarem diferenças genéticas, possam ser tratados como unidades diferentes em que a captura e esforços de pesca devem ser diferenciados (BEDDINGTON et al., 1990; WALDMAN, 1999).

A identificação da estrutura dos estoques é uma faceta importante para a avaliação e gerência da pesca (BEGG et al., 1999). Avanços significativos têm sido obtidos no campo de identificação genética de estoques (BEGG et al., 1999).

Marcadores genéticos vêm sendo utilizados na identificação de estoques de organismos aquáticos em trabalhos tais como os de Bartley et al., 1992; Beacham et al., 1995; Imsiridou et al., 1998; Shaklee et al., 1999; Katsarou; Naevdal, 2001; Smith et al., 2002. Porém, não é tão significativo o número de trabalhos com o uso de métodos genéticos em estudos populacionais de cefalópodes, a exemplo: Carvallo et al., 1992; Brierly et al., 1993; Norman et al., 1994; Shaw et al., 1999a,b e estudos genéticos focalizados principalmente na filogenia molecular, como: De Los Angeles Barriga Sosa et al., 1995; Bonnaud et al., 1997; Söller et al., 2000; Warnke et al. 2000.

1.3 FLUXO GÊNICO

O fluxo gênico pode ser definido como a troca de genes em populações e, portanto inclui todos os movimentos de gametas e indivíduos que efetivamente trocam genes na distribuição espacial (NEIGEL, 1997). De acordo com Slatkin (1981; 1985) fluxo gênico (ou fluxo alélico) é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população para outra.

O fluxo gênico tem sido amplamente discutido em relação à sua magnitude e influência na estrutura genética das populações. Sua importância, principalmente em populações naturais consiste na homogeneização das freqüências alélicas entre populações pequenas, sendo assim, mesmo que separadas geograficamente elas comportam-se como uma grande população panmítica, com freqüências alélicas que antes do fluxo gênico eram diferentes e, depois do fluxo tornaram-se homogêneas entre si.

A maior importância do fluxo gênico está na manutenção da diversidade genética e do polimorfismo.

A intensidade de fluxo gênico entre estoques/populações é uma das condições para que espécies exibam uma diferenciação genética intrapopulacional e/ou interpopulacional. Espécies marinhas possuem potencial para dispersão (PALUMBI, 1996), gametas liberados na água, larvas com estágio planctônico ou mesmo indivíduos adultos com migrações extensas são alguns dos fatores que

levam muitas espécies marinhas a uma troca de genes mesmo entre áreas distantes. Nos invertebrados marinhos, cujas larvas são freqüentemente planctônicas, ocorre a dispersão por longas distâncias (STRATHMANN, 1985; SCHELTEMA, 1986). Contudo, estudos sobre comportamento larval, predação e hidrodinâmica sugerem que a dispersão de larvas seja efetivamente muito menor do que o esperado (KNOWLTON; KELLER, 1986).

O fluxo gênico entre populações distantes pode ocorrer pelo transporte de larvas na água de lastro de navios, como no caso de espécies de invertebrados marinhos representantes do grupo dos cnidários, moluscos e anelídeos (CARLTON; GELLER, 1993). Outro fator que atua na manutenção do fluxo gênico independentemente da dispersão larval é o transporte de partes do adulto. Entretanto, este mecanismo, apesar de demonstrado em esponjas (MALDONADO; URIZ, 1999) e outros invertebrados, não parece ser um fenômeno muito comum (MACFADDEN; AYDIN, 1996).

A escolha da metodologia a ser utilizada para avaliar o grau de diferenciação é um importante passo para obtenção de resultados significativos (TOMÁS, 2002).

1. 3.1 MODELOS DE FLUXO GÊNICO

De acordo com Solé-Cava (2004), existem diversos modelos de fluxo gênico:

1. Modelo de isolamento por distância: o fluxo ocorre localmente entre os vizinhos, em uma população de distribuição contínua.
2. Modelo passo-a-passo ("*stepping-stone*"): a população recebe migrantes somente de populações vizinhas.
3. Modelo de ilhas: a migração ocorre ao acaso entre grupos de pequenas populações.
4. Modelo continente-ilha: existe um movimento unidirecional de uma população grande continental para uma população menor isolada.

Segundo Solé-Cava (2004), a estimativa do fluxo gênico nas populações naturais pode ser feita a partir da variância das freqüências gênicas entre diferentes localizações ou pela perda da heterozigosidade das subpopulações em relação à heterozigosidade total.

1.4 MARCADORES GENÉTICOS

1.4.1 ASPECTOS GERAIS

De acordo com Matioli e Passos-Bueno (2001), a variabilidade genética é um importante instrumento de investigação quando o objetivo é o de verificar afinidades e limites entre as espécies e estimar níveis de migração e dispersão nas populações. Os dados básicos para esses estudos são denominados marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares correspondem a trechos de DNA (*loci*) presentes nos cromossomos e em certas organelas citoplasmáticas. Têm gerado informações valiosas sobre a variabilidade genética de espécies para estudos populacionais, taxonomia, conservação de germoplasma, identificação de indivíduos e de espécies crípticas e formulação de hipóteses filogenéticas (CARVALHO; TORRES, 2002; CAIXETA et al., 2006; SOLÉ-CAVA, 2004).

As diferenças nas seqüências de DNA são causadas por eventos mutacionais, essas diferenças podem ser qualitativas ou quantitativas e permitem mensurar a variedade de alelos e genótipos dentro de uma população (FRANKHAM et al., 2002). Compreender a distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações é necessário para a conservação de espécies (SPRUELL et al., 2003).

O manejo dos recursos pesqueiros requer conhecimento da estrutura populacional, incluindo a existência de populações geneticamente distintas que podem ser acessadas por meio de eletroforese dos marcadores bioquímicos e/ou de DNA (ALLENDORF; UTTER, 1979; ALLENDORF et al, 1987), por sua vez, o manejo genético tende a ordenar a exploração, evitando a erosão do *pool* gênico e garantindo a produção de alimento em face ao crescimento populacional humano (FORESTI et al., 1992).

Avanços tecnológicos em biologia molecular e bioquímica levaram ao desenvolvimento de uma grande variedade de marcadores moleculares e este fato tem possibilitado a utilização de ferramentas visando à conservação de muitas espécies (FERGUSON; DANZMANN, 1998).

Diversas metodologias têm sido utilizadas para avaliar a estrutura populacional em espécies de invertebrados. Algumas destas incluem: diferenciação

morfométrica e merística, características fisio-comportamentais e marcadores genético-bioquímicos (KUMPF et al., 1987). Porém, foi por meio da utilização de fenótipos eletroforéticos de proteínas (STOCS, 1981) e a partir da intensa variabilidade encontrada nos ácidos nucleicos (HALLERMAN et al., 1988) que avanços significativos no estudo da estrutura populacional foram alcançados.

A análise por de métodos genéticos bioquímicos, isto é, por meio do polimorfismo de proteínas tem sido um dos métodos para elucidar problemas relacionados com a diferenciação de determinadas populações (MAY; KRUEGER, 1990; GRANT et al., 1984; REVALDAVES et al., 1997).

Os marcadores moleculares têm sido utilizados para estimar os níveis de hererozigosidade e estabelecer suas relações com importantes parâmetros na sobrevivência das espécies; análise de estruturas familiares; avaliação e estimativa do tipo de distribuição espacial e temporal das populações em relação ao fluxo gênico, entre outros (SOLÉ-CAVA, 2004).

Diversas ferramentas moleculares são conhecidas, entre as quais, os marcadores microssatélites que representam a classe mais polimórfica de marcadores disponíveis atualmente (GOFF et al., 1992; QUELLER et al., 1993).

1.4.2 MARCADORES MICROSSATÉLITES OU SSR ("SIMPLE SEQUENCE REPEAT" - SEQUÊNCIAS SIMPLES REPETIDAS)

Marcadores microssatélites ou seqüências simples repetidas (SSR - "Simple Sequence Repeat") (LITT; LUTY, 1989), são formados por seqüências de uma a seis bases nitrogenadas repetidas *in tandem* (JACOB et al., 1991). Podem ser encontrados em alta freqüência e com ampla distribuição nos genomas de eucariotos (HAMADA et al., 1982; TAUTZ; RENZ, 1984).

Estes marcadores foram descobertos no final da década de 1980 (LITT; LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; WEBER; MAY, 1989) e logo foi demonstrada sua ampla dispersão e abundância no genoma animal (STALLING et al., 1991).

A análise de *loci* microssatélites, é realizada por meio da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) (POWELL et al., 1996), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares (18 a 30 bases) às regiões que os flanqueiam (HOSHINO et al., 2002).

O polimorfismo em microssatélites está baseado nas diferenças de tamanho devido às variações no número de unidades de repetição em um dado *locus* (SCHLÖTTERER; PEMBERTON, 1998; ZANE et al., 2002; LIU; CORDES, 2004).

Correspondem a marcadores de herança mendeliana e são codominantes, sendo assim, indivíduos homozigotos e heterozigotos para um determinado *locus* podem ser distinguidos (SKIBINSK, 1994).

As taxas de mutação em microssatélites são freqüentemente da ordem de 10^{-3} a 10^{-4} eventos por *locus* por gameta por geração (SCHUG et al., 1997; ZANE et al., 2002). No entanto, essas taxas variam não só de acordo com o tipo de repetição (di, tri, tetra, etc.), composição de bases da repetição, tipo de microssatélite: **perfeito** se a seqüência de bases é repetida sem interrupções (CACACACACA); imperfeito se uma ou mais repetições apresentam uma base que não se encaixa na estrutura repetitiva (CACATCACACA); **composto** quando dois ou mais microssatélites estão justapostos (CACACACACAGTGTGT) e **interrompido** se há inserção de um pequeno número de bases que não se encaixam na estrutura repetitiva (CACACATTCACATTCA), mas também entre grupos taxonômicos (GOLDSTEIN; SCHLÖTTERER, 1999).

Em populações naturais, o polimorfismo de *loci* microssatélites é consequência de novas mutações, deriva genética e de seleção de regiões cromossômicas ligadas (SCHLÖTTERER; WIEHE, 1999). Dois modelos são descritos para explicar o modo de mutação nos microssatélites (SMITH, 1976):

1. “Crossing-over” desigual por erro no emparelhamento dos cromossomos homólogos na prófase I da meiose, o que incorreria em alteração no número original de repetições nas cromátides envolvidas com a troca;
2. “Escorregão” da DNA polimerase durante a replicação do DNA, o que acarretaria na diminuição ou no aumento de repetições.

Dentro de um mesmo *locus*, a taxa de mutação pode variar entre os alelos, com alelos maiores sendo mais propensos a mutações do que os menores (SCHLÖTTERER et al., 1998).

Devido a essa taxa de mutação, alelos que são idênticos por tamanho necessariamente não serão idênticos por descendência (ESTOUP et al., 2002).

Os microssatélites são considerados marcadores moleculares muito eficientes e têm auxiliado para o conhecimento sobre a variabilidade genética e a estrutura de populações em organismos aquáticos (REILLY et al., 1999; SHAW et al., 1999a,b;

TAYLOR; VERHEYEN, 2001; MATALA et al., 2004), estudos de mapas de ligação (SCHULER et al., 1996; KNAPIK et al., 1998) e mesmo para inferir sobre relações filogenéticas (RICO et al., 1996).

Os marcadores microssatélites têm sido também utilizados em estudos de genética da conservação como, por exemplo, em estudos de divergência entre populações (PAETKAU et al., 1995), sucesso reprodutivo e estrutura social (BOURKE et al., 1997).

Atualmente, várias publicações têm ressaltado a possibilidade de interpretações errôneas de dados populacionais em vista de não haver um modelo consolidado para a evolução dos microssatélites, a exemplo: Baloux; Lugon-Moulin, 2002; Estoup et al., 2002.

Existe uma classe de modelos (*“stepwise mutation model”* – SMM; *“generalized mutation model”* – GSM; *“K-allele model”* – KAM), que prediz que alelos microssatélites podem mutar em direção a estados alélicos já presentes na população e, portanto, podem gerar homoplasias de tamanho: indivíduos que partilham alelos idênticos em estado, porém não por herança.

Há ainda outro modelo: *“modelo de alelos infinitos”* – IAM, em que uma mutação envolve qualquer número de repetições *in tandem* e sempre resulta em um estado alélico não encontrado previamente na população.

Baloux e Lugon-Moulin (2002) propõem que diferentes métodos estatísticos de estimativa de diferenciação de populações, os quais assumem diferentes modelos de evolução, sejam utilizados para comparação crítica e interpretação cuidadosa dos resultados.

Os microssatélites predominantes em organismos aquáticos compreendem, até agora, repetições de duas bases usualmente (GT/AC)_n ou (CT/GA)_n (GOFF et al., 1992; ESTOUP et al., 1993; COLBOURNE et al., 1996; LEE; KOCHER, 1996), sendo úteis também para a análise de características quantitativas (KELLOGG et al., 1995; MOREIRA, 2003).

Dentre as vantagens do uso de microssatélites na análise de variabilidade genética há a detecção de *loci* únicos, utilizando-se condições altamente estridentes, como temperaturas de anelamento altas: 55,0 °C a 60,0 °C, o que proporciona a certeza de estar analisando um *loci* específico (HOSHINO et al., 2002).

Embora o desenvolvimento e caracterização de *loci* microssatélites necessitem de substanciais quantidades de recursos e esforços (LIU; CORDES, 2004), existe a possibilidade de que iniciadores desenhados para uma determinada espécie possam ser utilizados em outras, desde que proximamente relacionadas (ABILA et al., 2004; SALGUEIRO et al., 2003).

A principal área atualmente em crescimento em genética populacional de cefalópodes está no desenvolvimento e na aplicação de marcadores microssatélites (SHAW, 2002). Estudos de outros organismos nos últimos anos demonstraram que os microssatélites exibem níveis elevados de polimorfismo mesmo em espécies que mostram baixos níveis de variabilidade com outros marcadores (O'CONNELL; WRIGHT, 1997). Os níveis elevados de polimorfismo permitem uma análise estatística mais confiável para analisar as subdivisões de uma população (SHAW, 2002).

Como em outros grupos de animais, os microssatélites nos cefalópodes exibem números elevados de alelos e de heterozigosidade por *locus* (GREATOREX et al., 2000; SHAW; PÉREZ-LOSADA, 2000).

1. 4.3 DNA MITOCONDRIAL

As mitocôndrias, organelas que produzem energia nas células de plantas e de animais, possuem seu próprio genoma. Sequências de DNA mitocondrial têm sido utilizadas há vinte anos em estudos de diferenciação de espécies próximas de animais. Quatro características tornam o genoma mitocondrial especialmente útil na identificação de espécies (JAMESON et al., 2003, WOLSTENHOLME, 1992):

- ✓ Número de cópias. Em geral uma célula possui duas cópias de seqüências nucleares e de 100 a 10000 cópias do genoma mitocondrial. O sucesso de obtenção de seqüências mitocondriais é geralmente maior do que o de seqüências nucleares, especialmente em amostras diminutas ou degradadas. Maior sucesso com amostras limitadas resulta em menores custos de processamento.

- ✓ Maior diferenciação entre espécies. A diferença de seqüências entre espécies próximas são 5 a 10 vezes maiores em genes mitocondriais do que em genes nucleares. Assim, curtos segmentos de DNAm_t podem distinguir espécies e, como são curtas, são mais baratas.
- ✓ Poucas diferenças dentro da espécie. A variação intraespecífica do DNAm_t é pequena na maioria das espécies animais. Isso pode ser consequência da rápida perda de polimorfismos ancestrais devido à herança materna ou a varredura seletiva após a origem de mutações vantajosas. Diferenças intraespecíficas pequenas e interespecíficas grandes resultam em limites genéticos entre a maioria das espécies, permitindo a sua identificação precisa baseado em um código de barras mitocondrial.
- ✓ Ausência de íntrons. Os genes mitocondriais de animais raramente possuem íntrons (seqüências não codificadoras dispersas entre regiões codificadoras de um gene). Assim, é geralmente fácil obter a amplificação de DNA mitocondrial.

O DNA mitocondrial animal é uma molécula de fita dupla circular, fechada covalentemente, com tamanho variável, em geral de 14 a 26 kb e que codifica aproximadamente 5,0% de toda a maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

Na maioria dos genomas mitocondriais estudados, o conteúdo gênico é altamente conservado e consiste em dois genes que codificam as subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNAs) e 13 genes codificadores de enzimas envolvidas no processo de fosforilação oxidativa: as subunidades da citocromo oxidase (COI, COII e COIII), citocromo b, as subunidades 6 e 8 da ATPase e as sete subunidades da NADH desidrogenase, além de uma região rica em A+T (D-loop em vertebrados) que contém o controle da replicação e transcrição do genoma do DNAm_t (WOLSTENHOLME, 1992). Esta região é a que mais acumula mutações, podendo ser do tipo substituição de nucleotídeos ou inserção/deleção, com uma taxa evolutiva de duas a cinco vezes maior do que as demais regiões codificadoras do genoma mitocondrial (AQUADRO; GREENBERG, 1983).

Embora alguns casos de herança biparental tenham sido observados em moluscos do gênero *Mytilus* (ZOUROS et al., 1992), na maioria dos casos o DNAm_t

é de herança materna (GILES et al., 1980; WOLSTENHOLME, 1992), desta forma, mutações acumuladas não são dispersas por meio de recombinação (AVISE et al., 1987).

A alta taxa de mutação do DNAm_t deve-se ao fato de a molécula estar exposta aos metabólitos resultantes dos processos que ocorrem dentro da organela, como a fosforilação oxidativa e também, à ausência de enzimas de reparo eficientes (WILSON et al., 1985).

O polimorfismo mencionado compreende as translocações de genes, mais comuns entre os tRNAs (WOLSTENHOLME, 1992; DOWLING et al., 1996; SILVESTRE et al., 2002) e as substituições de bases nitrogenadas. De acordo com Boore et al. (1995), mudanças na ordem gênica do DNAm_t são filogeneticamente informativas e têm sido utilizadas em estudos de sistemática molecular de invertebrados.

A seqüência completa do genoma mitocondrial para o *Octopus vulgaris* foi determinada por Yokobori et al. (2004) e demonstra similaridades em relação ao genoma mitocondrial de outros moluscos (Figura 2).

O genoma mitocondrial do *Octopus vulgaris* apresenta 15.744 pares de bases e sua estrutura é bastante similar a seqüência do molusco da família *Mopaliidae*, *Katharina tunicata* (Figura 3), em comparação com outras espécies de *Octopus*, verifica-se conservação da ordem dos genes na molécula do DNAm_t, porém o mesmo não ocorre quando da comparação do genoma mitocondrial do *Octopus vulgaris* com exemplares de outras famílias de cefalópodes. Em comparação ao genoma mitocondrial de outros vertebrados, tais como o *Oreochromis mossambicus* (Figura 3), verifica-se desigual seqüência no arranjo dos genes ao longo da molécula.

Figura 2 – Exemplos de organização do genoma mitocondrial em cefalópodes

Nota: Os genomas circulares são apresentados linearmente a fim de facilitar a comparação da organização dos genes.

Fonte: <http://drake.physics.mcmaster.ca/ogre>

Figura 3 – Comparação entre as seqüências dos genes do DNAm de peixes e moluscos

Nota: Os genomas circulares são apresentados linearmente a fim de facilitar a comparação da organização dos genes.

Fonte: <http://drake.physics.mcmaster.ca/ogre>

A identificação de espécies é fundamental para a pesquisa nos campos da sistemática, zoogeografia, ecologia e conservação (ISLER et al. 1998), a discriminação exata da espécie pode somente ser obtida pelo uso de metodologias adequadas para a identificação de variações interespecíficas. Sabe-se que em alguns casos a análise morfológica não fornece definições suficientes para permitir uma identificação correta dos organismos (HEBERT et al., 2004a). Os marcadores moleculares foram usados como ferramentas complementares para a identificação taxonômica (HEBERT et al., 2003a).

As estratégias moleculares aceleram o processo de identificação taxonômica. Estas receberam maior atenção com a proposta de uma nova iniciativa denominada *DNA Barcoding* (HEBERT et al. 2003b; BLAXTER, 2004).

O Consórcio para o Código de Barras da Vida (www.barcodeinlife.org) é uma iniciativa mundial cuja proposta é o desenvolvimento de uma ferramenta molecular exata e confiável para a identificação de espécies.

Hebert et al. (2003b) demonstraram com sucesso que uma seqüência de 648 pb do gene citocromo oxidase subunidade I do DNA mitocondrial é uma ferramenta molecular perfeita para ser utilizada na identificação de espécies.

Outras iniciativas mostraram que o COI é uma solução para identificar a espécie de diversos grupos animais (HEBERT et al. 2004a, 2004b). As seqüências de COI diferem muito mais entre do que dentro de espécies. Por exemplo, 260 espécies de aves norte-americanas apresentavam, em média, diferenças entre espécies próximas 18 vezes maior do que as diferenças dentro das espécies (HEBERT et al.; 2004a). Ou seja, o COI permite a identificação da maioria dessas espécies.

Em outro estudo Hebert et al. (2004b) mostraram que este gene foi eficiente para identificar um complexo de 10 espécies de borboleta.

A região do COI que é utilizada como marcador é a primeira metade do gene e possui 648 pares de bases, um tamanho facilmente processado com a tecnologia disponível e, portanto, barato. Os resultados indicam que esta seqüência é fácil de ser obtida para vários táxons usando um número pequeno de oligonucleotídeos iniciadores; sendo facilmente alinhada para comparação de seqüências e é informativa para distinguir espécies próximas de animais (HEBERT et al.; 2003a).

1.4.4 MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DE ESPÉCIES DE CEFALÓPODES

Apesar dos benefícios da utilização dos marcadores baseados no DNA, até o final do século XX, seu emprego na biologia dos cefalópodes foi limitado (SHAW, 2002).

Sucesso substancial tinha sido obtido, desde os anos de 1980, em aplicar aloenzimas a fim de estudar a estrutura de populações, por exemplo: Brierley et al., 1995 e identificação e sistemática de espécies, a exemplo: Augustyn; Grant, 1988, sendo útil para identificar espécies crípticas, por exemplo: Yeatman; Benzie, 1994. Mas somente alguns estudos foram realizados usando a análise direta do DNA para a elucidação do gênero e filogenia dos cefalópodes, tais como: De Los Angeles Barriga-Sosa et al., 1995; Bonnaud et al., 1997; Bonnaud et al., 1994.

Nos últimos anos houve um aumento significativo no número dos estudos sobre os cefalópodes usando marcadores de DNA, nas áreas de genética de populações e filogenia: Anderson, 2000; Shaw; Pérez-Losada, 2000; Söller, 2000; Warnke et al., 2000, Carlini et al., 2000; Reichow; Smith, 1999; Reichow; Smith, 2001; Shaw, 1997.

Isto resultou primeiramente no desenvolvimento e aplicação de marcadores microsatélites para uma série de cefalópodes (SHAW et al., 1999b; SHAW; BOYLE, 1997). Em filogenia e sistemática, a expansão do uso de marcadores moleculares resultou na propagação dos estudos de novos grupos e regiões gênicas, a exemplo: Bonnaud et al., 1997; Carlini; Graves, 1999; Anderson, 2000; Söller et al., 2000.

Avanços significativos na aplicação de métodos genéticos em estudos populacionais e filogenéticos de espécies de *Octopus* têm sido reportados. Os estudos relacionados ao *Octopus vulgaris* focalizaram-se na região do gene do DNAm t COIII, com seqüências disponíveis dos indivíduos de diversas regiões (DE LOS ANGELES BARRIGA SOSA et al., 1995; BONNAUD et al., 1997; SÖLLER et al., 2000; WARNKE, 1999; WARNKE et al., 2000; TESKE et al., 2007).

2 OBJETIVOS

2. 1 GERAL

Avaliação genético populacional e filogenética dos estoques de *Octopus* cf. *vulgaris* das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul do litoral do Brasil.

2. 2 ESPECÍFICOS

Testar a hipótese sobre a presença de uma espécie críptica do gênero *Octopus*, atualmente incorporada à espécie *Octopus vulgaris* por análise de seqüenciamento do DNA mitocondrial.

Comparar as possíveis relações entre a distribuição geográfica e a variabilidade genética das populações distribuídas ao longo da Costa Brasileira e, com base na frequência de alelos microssatélites e de haplótipos do DNA mitocondrial, inferir sobre a dinâmica genética populacional do *Octopus* cf. *vulgaris*.

Comparar os dados obtidos pelo uso de marcadores baseados na variabilidade do DNA nuclear e na variabilidade DNA mitocondrial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

A amostragem foi realizada diretamente da pesca comercial e de capturas dirigidas fazendo-se uso potes dispostos em áreas ao longo da Costa dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Os locais de amostragem foram determinados pela facilidade de obtenção dos animais uma vez que estes Estados contribuem com os maiores índices de produção da pesca extrativa marinha.

A captura dos animais foi realizada com a colaboração do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento da Secretária de Agricultura e Abastecimento, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (SAA – APTA), Instituto de Pesca, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Marinho do Estado de São Paulo.

Amostras obtidas junto ao desembarque pesqueiro do porto de Bragança, no Estado do Pará, foram cedidas pelo Núcleo de Estudos Costeiros da Universidade Federal do Pará a fim de serem utilizadas nos estudos de filogenia.

Em colaboração com o Instituto de Investigação da Pesca e do Mar (IPIMAR; Lisboa, Portugal) amostras de animais provenientes da Região de Açores - Portugal, caracterizados como exemplares de *Octopus vulgaris*, foram incorporadas à análise filogenética.

Para o presente estudo foi utilizado um total de 518 amostras conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1 – Regiões de captura do polvo e número de animais

LOCALIDADE	ESTADO	Nº de ANIMAIS
*Bragança	Pará	05
Fortaleza	Ceará	35
Natal	Rio Grande do Norte	35
Barra Grande	Bahia	35
Tamandaré	Pernambuco	35
Cabo Frio	Rio de Janeiro	35
Itaipu		35
Ubatuba	São Paulo	35
Alcatrazes – Farol do Boi		29
Juréia		35
Queimada Grande		35
Ilha Bela		35
Guaratura	Paraná	11
Paranaguá		35
Ganchos	Santa Catarina	23
Cabo de Santa Marta		35
*Açores	Portugal	30
TOTAL		518

* Amostras utilizadas na filogenia

As figuras a seguir ilustram os potes utilizados nas capturas do polvo (Figura 4), a embarcação utilizada para o lançamento de espinhéis com os potes de captura (Figura 5), lançamentos de espinhéis (Figura 6) e potes de captura contendo ovos do polvo e animal adulto (Figura 7).

Figura 4 – Potes de captura utilizados na pesca comercial para a coleta do polvo

Figura 5 – Embarcação utilizada na pesca comercial do polvo

Figura 6 – Lançamento de espinhéis de potes durante a captura de polvos na pesca comercial

Figura 7 – Pote de captura contendo ovos do polvo e animal adulto sendo retirado do pote de captura pela adição de querosene

3. 2 ORGANIZAÇÃO DOS ESTOQUES

As amostras de polvo foram divididas e classificadas de acordo com as regiões em que foram coletadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Organização dos estoques de polvo

Regiões	Amostras
Norte – Nordeste	Bragança (PA); Fortaleza (CE); Natal (RN); Barra Grande (BA) e Tamandaré (PE)
Sudeste – Sul	Cabo Frio e Itaipu (RJ); Ubatuba, Alcatrazes, Farol do Boi, Juréia, Queimada Grande e Ilha Bela (SP); Guaratuba e Paranaguá (PR) e Ganchos e Cabo de Santa Marta (SC)
*Portugal	Açores (PT)

* Amostras utilizadas na análise filogenética pelo uso do gene Citocromo Oxidase Subunidade I do DNA Mitocondrial (COI)

3. 3 BIÓPSIA

As capturas podem trazer animais já mortos e, nestes casos, a qualidade do DNA é dependente do tempo de coleta e das condições de armazenamento das amostras.

Amostras de musculatura esquelética de aproximadamente 1,0 cm³ foram retiradas da região do manto, imediatamente colocadas em etanol 95,0% e levadas ao laboratório para os procedimentos de isolamento do DNA. As figuras a seguir ilustram alguns procedimentos realizados para a biópsia.

Figura 8 – Preparação para biópsia histológica em alto mar

Figura 9 – Biópsia histológica realizada em alto mar

Figura 10 – Obtenção de tecido muscular em laboratório

3. 4 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

A extração de DNA total foi realizada pela aplicação do método do fenol-clorofórmio com a adaptação do protocolo descrito por Winnepenninckx et al. (1993), modificado pelo uso de tampão STE (0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl e 0,001 M EDTA, pH 8,0). Neste tampão usam-se menores quantidades de EDTA, visto que este pode reagir com o $MgCl_2$ e reduzir a eficiência de amplificação por PCR.

Cerca de 200,0 mg de tecido conservado em etanol 95,0% foram lavados e hidratados com tampão TE (10,0 mM de Tris-HCl, 1,0 mM de EDTA, pH 7,5) por duas vezes e mantidos neste meio por 90,0 min. Em seguida a amostra foi secada, misturada a 500,0 μ L de tampão STE (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,01 M e NaCl 0,1 M, pH 8,0), 30,0 μ L de SDS 10,0% e 10,0 μ L de proteinase K (20,0 mg.mL⁻¹ de ddH₂O), agitada vigorosamente por 10,0s e incubada a 60,0°C por 60,0min. Após a incubação, acrescentou-se à mistura, 3,0 μ L de RNase (10,0 mg.mL⁻¹ em Tris-HCl 10,0 mM, pH 7,5 e NaCl 15,0 mM) e esta foi incubada a 37,0 °C por 90,0min.

Ao término, adicionou-se 250,0 μ L de fenol e 250,0 μ L de clorofórmio isoamílico (clorofórmio: álcool isoamílico, 1:1), centrifugou-se por 10,0min a 13400 rpm, e coletou-se o sobrenadante, cerca de 500,0 μ L, adicionando-se a esse 600,0 μ L de clorofórmio isoamílico. Centrifugou-se novamente por 10,0min a 14000 rpm, sendo a fase superior transferida para outro tubo e o DNA foi precipitado com acetato de sódio 0,3 M, pH 5,2 e 1,5 volume de etanol 100% a -20 °C por 18,0h, recuperado por centrifugação a 14000 rpm por 30,0min a 4,0 °C.

Após a secagem total, foi acrescentado ao DNA, 10,0 μ L de TE e este foi armazenado a 4,0 °C por 48,0h para a completa ressuspensão.

3. 5 DNA MITOCONDRIAL

3. 5.1 DNA MITOCONDRIAL: ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para o presente estudo foi utilizado um total de 26 amostras (25 *Octopus* e 01 grupo externo), conforme mostrado na tabela 3.

TABELA 3 – Espécimes e procedência dos polvos analisados no presente estudo

CÓDIGO	PROCEDÊNCIA
PA08, PA20	PARÁ (Bragança)
CE04, CE05	CEARÁ
RN56, RN57	RIO GRANDE DO NORTE
BA01, BA05	BAHIA (Maraú)
PE02, PE03	PERNAMBUCO (Tamandaré)
RJ178	RIO DE JANEIRO (Itaipú)
RJ280	RIO DE JANEIRO (Cabo Frio)
SP12	SÃO PAULO (Ilha Bela)
SP31	SÃO PAULO (Ubatuba)
SP43, SP44	SÃO PAULO (Juréia)
PR03, PR43	PARANÁ (Guaratuba)
SC02	SANTA CATARINA (Cabo de Santa Marta)
SC12	SANTA CATARINA (Ganchos)
PT10, PT11	PORTUGAL (Açores)
* <i>Octopus bimaculoides</i>	USA (Pacífico)
* <i>Octopus californicus</i>	USA (Pacífico)
* <i>Octopus dofleini</i>	USA (Pacífico)
*# <i>Katharina tunicata</i>	USA (Pacífico)

* Sequências obtidas do site: www.barcodinelife.org (BOLD SYSTEMS)

Grupo externo

Para o entendimento das relações filogenéticas do gênero *Octopus* construídas neste trabalho foi escolhida, entre as regiões de genes codificadores para proteína, a citocromo oxidase subunidade I (COI).

3. 5.1.1 AMPLIFICAÇÃO E SEQÜENCIAMENTO

Os oligonucleotídeos iniciadores LCO1490 (5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3') e HCO2198 (5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3') (FOLMER et al., 1994) foram utilizados para amplificar um fragmento de aproximadamente 658 pb do gene de COI. Ao coquetel da reação da polimerase em cadeia (PCR) foram adicionados os seguintes componentes para um volume final de 25,0 μ L: 17,0 μ L de água milli-Q autoclavada, 1,2 μ L de DNA genômico (25,0 ng/ μ L), 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5 unidades/ μ L), 1,3 μ L de dNTPs (2,5 mM), 0,8 μ L de $MgCl_2$ (25,0 mM), 1,0 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador (0,9 μ M) em 2,5 μ L de tampão de PCR 10x (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4). As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador programado para uma etapa de desnaturação a 95,0 °C por 3,0 min, seguida por 40 ciclos a 94,0 °C por 1,0min, 45,0 °C por 1,0min, e 72,0 °C por 1,5min, e uma etapa final de 4,0min de extensão a 72,0 °C. Controles negativos, consistindo de reações sem DNA genômico, foram incluídos em todas as amplificações.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5 x (TBE 10 x: 0,9 M H_3BO_3 , 1,0 M Tris-Base, 0,01 M EDTA), corrida em tampão TBE 0,5 x sob 60 W, 1300 V e 46 mA, por aproximadamente 1h e 20min. O ladder 100 pb foi utilizado como marcador de peso molecular. O ácido nucléico foi corado com brometo de etídio (0,7 μ L/mL), observado e fotografado em transiluminador de UV.

A purificação dos produtos amplificados foi feita usando o kit Wizard® SV (Promega), adicionou-se 17,0 μ L de acetato de amônio 7,5 M e 60,0 μ L de etanol 96,0%, deixando-os em repouso por 5,0min. Em seguida foram centrifugados por 15,0 min a 14.000 rpm e o sobrenadante foi retirado. Após a adição de 100,0 μ L de etanol 70,0%, os produtos foram centrifugados por 15,0min a 14.000 rpm. Novamente foi retirado o sobrenadante e os produtos foram colocados para secar por 15,0min, sendo ressuspensos com água milli-Q autoclavada.

O seqüenciamento direto da molécula de DNA amplificado foi feito utilizando o protocolo do kit de seqüenciamento BigDye (Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) em seqüenciador automático (ABI 3100 – Applied Biosystems).

A reação de seqüência foi realizada para um volume total de 10,0 µL, contendo por 2,0 µL de DNA amplificado, 3,0 µL de Save Money, 10 mM do oligonucleotídeo HCO2198 (5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'), 2,0 µL de Big Dye (Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) e 2,0 µL de água milli-Q autoclavada.

As reações de seqüência foram conduzidas em termociclador programado para uma etapa de desnaturação a 96,0 °C por 2,0min, seguida por 25 ciclos a 96,0 °C por 45,0s, 52,0 °C por 30,0s e 60,0 °C por 4,0min.

Para a purificação das reações de seqüência, seguiram-se as seguintes etapas:

1. Adição de 80,0 µL de isopropanol 75,0% e repouso por 20,0min à temperatura ambiente.
2. Centrifugação a 13.000 rpm por 30,0min e posterior descarte do sobrenadante.
3. Adição de 200 µL de etanol 70,0%.
4. Centrifugação a 13.000 rpm por 5,0min e posterior descarte do sobrenadante.
5. Secagem em centrífuga a vácuo por 15,0min.
6. Ressuspensão em 10,0 µL de formamida seguida de manutenção de temperatura a 96,0 °C por 5,0min.
7. Transferência para a microplaca de seqüenciamento.

Cada amostra foi seqüenciada por duas vezes para o alinhamento e obtenção de uma seqüência consenso.

As seqüências consenso foram obtidas pelo uso do programa Codon Code v.1.1.1 (2005).

3. 5.1.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA E FILOGENÉTICA

As seqüências de DNA foram inspecionadas visualmente com o auxílio do programa BioEdit v. 7.0 (HALL, 1999), ajustadas manualmente e alinhadas utilizando o método Clustal W.

Para as análises estatísticas (composição média de nucleotídeos, proporção de transições (ts) pelo número total de substituições de bases (ts) e distâncias genéticas) e filogenéticas utilizou-se os programas MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), a checagem dos resultados foi realizada por meio do programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). As análises foram conduzidas usando o método de Tamura-Nei (1993). As posições de códon incluídas foram *1st+2nd+3rd+Noncoding*, as que continham dados faltantes foram eliminadas da série de dados (opção completa do apagamento), para um total de 306 posições. A relação filogenética entre os grupos analisada por “Neighbor-joining” (SAITOU, NEI, 1987), ambos utilizando o programa MEGA v. 4.0 (TAMURA et al., 2007). A robustez dos resultados foi estimada por “*bootstrap*” (FELSENSTEIN, 1985) com 5000 replicações utilizando suportes maiores que 50,0 % (HEBERT et al., 2003).

O teste de Mantel (MANTEL, 1967), com 10.000 permutações, foi utilizado para acessar a correlação entre a distância genética e a distância geográfica entre as populações de *Octopus* coletados na Costa Brasileira, utilizando o programa GENETIX versão 4.02 (BELKHIR, 2001). A matriz da distância genética foi obtida por meio do método Tamura e Nei (1993) e a matriz da distância geográfica foi construída pela transformação da latitude das coordenadas geográficas das regiões onde foram coletadas as amostras em quilômetros.

3. 5.2 DNA MITOCONDRIAL: ANÁLISE POPULACIONAL

Com o objetivo de se estabelecer uma comparação entre os resultados obtidos pelo uso de marcadores nucleares e mitocondriais, para a análise populacional dos estoques coletados na Costa Brasileira, este estudo utilizou seqüências da região controle do DNA mitocondrial (A+T). Um segmento de DNA mitocondrial, que compreende a parte hipervariável da região A+T, a extremidade do gene citocromo oxidase subunidade III (COIII) e os genes dos RNAs transportadores (tRNAs) dos aminoácidos Metionina, Cisteína, Tirosina, Triptofano, Glutamina, Glicina e Ácido Glutâmico foi utilizado para a análise populacional (Figura 11).

A amplificação por meio da PCR, foi realizado com os oligonucleotídeos OvATF (5' CGA GGT ATG AAC CCA ATA GCT TAC TTA GC 3') e OvATR (5' GGC TCT TAT GGA TCC TGT TAA TGG TCA GGG 3') desenhados para este trabalho com o uso de um programa disponível no endereço eletrônico:
<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3www.cgi>.

Figura 11 – Representação esquemática do DNA mitocondrial de *Octopus vulgaris*. A seta indica a Região de Controle (A+T)

Fonte: <http://drake.physics.mcmaster.ca/ogre>

3. 5.2.1 AMPLIFICAÇÃO E SEQÜENCIAMENTO

Os oligonucleotídeos iniciadores OvATF (5' CGA GGT ATG AAC CCA ATA GCT TAC TTA GC 3') e OvATR (5' GGC TCT TAT GGA TCC TGT TAA TGG TCA GGG 3') foram utilizados para amplificar um fragmento de aproximadamente 1100 pb do gene da Região de Controle do DNAm^t. As reações de PCR para um sistema com o volume final de 35,0 µL foram montadas com a seguinte composição: 21,8 µL de água milli-Q autoclavada, 2,5 µL de DNA genômico (25,0 ng/µL), 0,8 µL de Taq DNA polimerase (5 unidades/ µL), 2,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 1,5 µL de MgCl₂ (25,0 mM), 1,2 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (1,2 µM) em 3,5 µL de tampão de PCR 10x (200 mM Tris-HCL, 500 mM KCl, pH 8,4).

As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador programado para uma etapa de desnaturação a 94,0 °C por 3,0min, seguida por 30 ciclos a 94,0 °C por 1,0min, 58,0 °C por 1,0min, e 72,0 °C por 1,5min, e uma etapa final de 5,0min de extensão a 72,0 °C. Controles negativos, consistindo de reações sem DNA genômico, foram incluídos em todas as amplificações.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 0,5 x (TBE 10 x: 0,9 M H₃BO₃, 1,0 M Tris-Base, 0,01 M EDTA), corrida contendo tampão TBE 0,5x sob 60 W, 1250 V e 45,0 mA por cerca de 1,0h e 15,0min. O ladder 100 bp foi utilizado como marcador de peso molecular. O ácido nucléico foi corado com brometo de etídio (0,7 µL.mL⁻¹), observado e fotografado em transiluminador de UV.

A purificação dos produtos amplificados foi feita usando o kit Wizard® SV (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. O seqüenciamento direto da molécula de DNA amplificado foi feito utilizando o protocolo do kit de seqüenciamento Big Dye v.3 Terminator mix (Applied Biosystems) em seqüenciador automático (ABI 3100 – Applied Biosystems).

A reação de seqüência foi realizada para um volume final de 10,0 µL, composto por 2,0 µL de DNA amplificado, 1,5 µL de Save Money, 10 mM do oligonucleotídeo OvATR (5' GGC TCT TAT GGA TCC TGT TAA TGG TCA GGG 3'), 1,0 µL de Big Dye (Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) e 4,5 µL de água milli-Q autoclavada.

As reações de seqüência foram conduzidas em termociclador programado para uma etapa de desnaturação a 96,0 °C por 1,0min, seguida por 40 ciclos a 96,0 °C por 15,0s, 50,0 °C por 15,0s e 60,0 °C por 4,0min.

Para a purificação das reações de seqüência, seguiram-se as mesmas etapas utilizadas para o gene COI do DNA mitocondrial.

Cada amostra foi seqüenciada por duas vezes para o alinhamento e obtenção de uma seqüência consenso.

As seqüências consenso foram obtidas pelo uso do programa Codon Code v.1.1.1 (2005).

3. 5.2.2 ANÁLISE GENOTÍPICA E POPULACIONAL

As seqüências de DNA foram inspecionadas visualmente com o auxílio do programa BioEdit v.5.0 (HALL, 1999) e alinhadas usando o método Clustal W.

O teste estatístico Tajima D (TAJIMA, 1983) foi estimado com programa DnaSP v.4.1 (ROZAS et al., 2003) e aplicado para testar a existência de pressão seletiva agindo sobre as substituições (LÓPEZ-LEGENTIL et al., 2006).

Com o programa DnaSP v.4.1 (ROZAS et al., 2003) foram medidas as diversidades nucleotídicas (π) e haplotípicas (Hd) dentro de cada população (NEI, 1977). O programa foi utilizado para testar a hipótese de distribuição não-aleatória dos haplótipos sob a hipótese de panmixia.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992), que permite inferir sobre a distância entre e dentro de populações locais utilizando uma estratégia semelhante à realizada na ANOVA convencional, mas parte de uma matriz de distância euclidiana calculada entre indivíduos com base na frequência dos haplótipos, foi utilizada para testar a heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos do DNAm_t utilizando o programa Arlequin 3.01 (EXCOFFIER et al., 2006) que utiliza a estatística *F* de Wright (1951; 1965) denominado como Φ -

estatística, que incorpora as frequências alélicas e as distâncias evolutivas entre os haplótipos.

A significância da Φ – estatística foi determinada pelas permutações não-paramétricas (EXCOFFIER et al., 1992) com 1000 permutações.

O componente de variância inter-populacional é extraído por equações das esperanças de quadrado médio (QMD), conforme a análise de variância convencional das frequências alélicas, utilizadas para estimar o F_{ST} (COCKERHAM, 1969; 1973). O mesmo procedimento pode ser empregado com base no desdobramento da soma de quadrado entre as distâncias, utilizando as estatísticas- Φ . Neste caso, Φ_{ST} é interpretado como a correlação de haplótipos aleatórios dentro de populações.

Entre as diferentes localidades geográficas foi executado o teste exato para diferenciação de populações (RAYMOND; ROUSSET, 1995) e sua significância foi estimada a partir de 10.000 permutações aleatórias. Foram calculados os valores pareados de F_{ST} e suas significâncias (teste de permutação, 1000 replicações) entre as localidades geográficas. O teste de Mantel (10.000 permutações) testou o isolamento pela distância entre as populações (ROUSSET, 1997).

3. 6 DNA NUCLEAR: MARCADORES MICROSSATÉLITES

Para as inferências sobre a estrutura populacional das espécies de *Octopus* distribuídas ao longo da Costa Brasileira, este trabalho utilizou marcadores microssatélites desenhados por Greatedorex et al. (2000) (Tabela 4).

Tabela 4 – Características dos *loci* microssatélites selecionados para a avaliação molecular das amostras de polvo

Locus	Tamanho do Produto	Unidades de Repetição	Acesso no “GenBank”
μOct03	147 pb	(AT) ₁₆ (GT) ₁₅	AF197130
μOct08	160 pb	(TG) ₃₆	AF197132
μOv04	126 pb	(TTA) ₂₂	AF197131
μOv06	146 pb	(ATT) ₂₄	AF197133
μOv10	122 pb	(GA) ₁₄	AF197134
μOv12	176 pb	(GATA) ₂₀	AF197135

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) liofilizados (Tabela 5) foram diluídos em H₂O Milli-Q a uma concentração de 1,0 μg/μL. Para a solução de trabalho utilizou-se 30,0 μL de cada oligonucleotídeo iniciador em 140,0 μL H₂O Milli-Q.

As amplificações pela reação em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction”, PCR) foram realizadas para um volume final de 25,0 μL contendo 25,0 ng de DNA genômico, 1,0 μL da mistura de oligonucleotídeos iniciadores 2,5 μL de dNTPs (2,5 mM), 1,5 mM (*loci* μOv04 e μOv10) 2,0 mM (*loci* μOct3 e μOv06) 2,5 mM (*locus* μOct8) e 3,0 mM (*locus* μOv12) de MgCl₂ (25mM) e 0,5 μL de Taq DNA polimerase.

Tabela 5 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (Forward e Reverse) para os *loci* microssatélites

<i>Locus</i>	*Primers (5' – 3')
μ Oct3	F: CTCCCTAGTTTTGAATCACG R: GCCACTAATACTTTTCAAGG
μ Oct8	F: AGGGAGAGAAAATAGAAAAAC R: TAAACTGAATAATACATACATACG
μ Ov04	F: ATACCAGGCCTTGTGCCTTTAG R: CAGCACCGTAATACATCTTCAG
μ Ov06	F: GGGCCTTATTCTTAAGCAG R: CCATTTGCATTTGAATATTTTAAAG
μ Ov10	F: GCAATAAAGGAGAAAACAAAAACA R: GCTATTGTCACAATAAGGCTCTCC
μ Ov12	F: GCATAATGTGCCGCTAAATGGAAC R: GCCTCGTCGGTATTCCTCTTTCA

*Greatest et al. (2000).

As amplificações envolveram 30,0 ciclos de desnaturação; anelamento e extensão; e extensão final a 72,0 °C. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5 x (TBE 10,0 x: 0,9 M H₃BO₃, 1,0 M Tris-Base, 0,01 M EDTA), corrida em tampão TBE 0,5 x sob 65,0 W, 1400,0 V e 48,0 mA, por aproximadamente 45,0min. O ladder 100,0 pb e o ladder 10,0 pb foram utilizados como marcadores de peso molecular. O ácido nucléico foi corado com brometo de etídio (0,7µL/mL), observado e fotografado em transiluminador de UV.

Após a separação por eletroforese, os *loci* microssatélites foram analisados em gel de poliácridamida 12,0% (Acrilamida e Metilenobisacrilamida 30,0% [29:1]; 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8; SDS 10,0%, água milli-Q autoclavada; TEMED e Persulfato de Amônio 10,0%) em tampão TBE 10,0 x, utilizando como marcadores 10,0 pb, 50,0 pb e 100,0 pb DNA, corado e revelado com solução de AgNO₃ (2,0 g/L) de acordo com o protocolo descrito por Blum et al. (1987).

Para aumento da confiabilidade dos dados utilizados para a genotipagem, após cada separação eletroforética dos fragmentos amplificados pela PCR em gel de poliacrilamida, os alelos identificados foram ancorados no gel seqüencial, ou seja, após a certificação da ocorrência de determinado alelo, o mesmo foi novamente amplificado e depositado no gel de poliacrilamida seguinte a fim de servir como referencial para os demais alelos a serem nomeados por meio de sua identificação.

A genotipagem foi realizada pela identificação dos indivíduos homozigotos e heterozigotos e pelo estabelecimento do número e do tamanho dos alelos em cada *loci* microsatélite.

A análise do padrão de corrida dos *loci* microsatélites em géis de poliacrilamida é bastante complexa, até mesmo em géis de considerável resolução. Uma característica comum é a presença de sombras nos géis (NAISH; SKIBINSK, 1998); nessas condições, os alelos para os *loci* microsatélites foram identificados pela maior intensidade da banda no gel (TAUTZ, 1989). Cerca de 50,0 % das amostras de todas as populações e de todos os *loci* microsatélites foram reavaliados para a confirmação dos resultados em géis de poliacrilamida 12,0%. Controles negativos foram incorporados a todas as análises.

3. 6.1 ANÁLISE GENOTÍPICA E POPULACIONAL

O tamanho dos alelos, em pares de bases (pb) foi determinado pelo uso do programa “Alpha Index 6.5” (“*AlphamagerTM*: Alpha Inotech Corporation”), que estima o peso molecular das bandas no gel de poliacrilamida pela área total do mesmo.

A diversidade genética dentro das populações foi caracterizada pelas frequências alélicas, heterozigosidade observada (**H_o**), diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (**H_e**), número de alelos por *locus* (**A**), porcentagem de *locus* polimórficos (**P**) e índices de fixação de Wright (1965) (***F**) segundo a metodologia de Nei (1977); estimativas obtidas pelo uso dos programas FSTAT (GOUDET, 2002), TFGA (MILLER, 1999) ARLEQUIN ver 3.01 (EXCOFFIER et al., 2006) e GENEPOP Software (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

O número efetivo de alelos por *locus* (**Ae**) foi estimado por meio da equação:

$$\mathbf{Ae} = 1/1-H_e$$

A máxima diversidade possível (**h_{máx}**) em cada locus microssatélite foi calculada a partir do número de alelos observados segundo a equação:

$$\mathbf{h_{máx}} = (\mathbf{A} - 1) / \mathbf{A}$$

A aderência das freqüências genotípicas às proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada por meio do teste exato de Fisher. As probabilidades exatas menores que o nível de significância ($\alpha = 0,05$ ou $\alpha = 0,01$) indicam desvios significativos nas proporções de Hardy-Weinberg. Os testes foram conduzidos pelo uso dos programas ARLEQUIN ver 3.01 (EXCOFFIER et al., 2006) e TFPGA 1.3 (MILLER, 1999).

Para cada alelo identificado, foram computados os valores das estatísticas **F** de Wright (COCKERHAM; WEIR, 1993), com respectivos testes de permutação a fim de verificar suas significâncias, pelo uso dos programas FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2002) e ARLEQUIN ver 3.01 (EXCOFFIER et al., 2006).

Os intervalos de confiança foram calculados por meio de procedimentos de reamostragem do tipo *bootstrap* sobre os *loci*, para a média dos mesmos, e pela aplicação de *jackknifing* sobre as amostras para cada *locus*.

As freqüências alélicas foram estimadas por:

$$\mathbf{P_{ij}} = \mathbf{n_{ij}} / \mathbf{n_j}$$

onde:

P_{ij} = freqüência do alelo **i** na população **j**;

n_{ij} = número de ocorrência do alelo **i** na variedade **j**;

n_j = número total de alelos amostrados na variedade **j**.

A **Ho** para cada *locus* foi obtida por:

$$\mathbf{Ho} = 1 - \Sigma \mathbf{P_{ij}}$$

onde:

P_{ij} = frequência do homozigoto ii

A H_e para cada *locus* foi obtida por:

$$H_e = 1 - \sum P_i^2$$

onde:

P_i = frequência alélica estimada do i -ésimo alelo.

A estimativa média sobre os *locus* de H_o e H_e foi obtida pela média aritmética entre todos os *locus* analisados.

Os valores $*F$ foram estimados, no nível de *locus* e média entre *locus* para cada população, pelas expressões:

$$*F = 1 - \frac{H_o}{H_e} \quad (\text{nível de } locus)$$

$$*F_{\text{média}} = 1 - \frac{\sum H_o}{\sum H_e} \quad (\text{média ponderada entre os } locus)$$

O índice $*F$ é o valor individualizado de F_{IS} .

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi caracterizada pelas estatísticas F de Wright (1965), segundo a metodologia de Nei (1977). Esta estatística admite que todos os desvios de panmixia sejam exclusivamente devido aos efeitos da deriva genética e do sistema reprodutivo.

Assim, as estatísticas F podem ser obtidas a partir dos conceitos de heterozigosidade observada e esperada, onde: H_o é a heterozigosidade média observada dentro das populações; H_e é a heterozigosidade média esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações e H_T é a heterozigosidade média esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg para o conjunto das populações. Assim define-se F_{IS} como:

$$F_{IS} = \frac{H_e - H_o}{H_e} \quad (-1 \leq F_{IS} \leq 1)$$

Onde: F_{IS} é o desvio da proporção de heterozigotos observados do esperado segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro das populações, ou o índice médio de fixação de alelos dentro das populações. Este parâmetro corresponde a média do índice F individual de cada população.

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_o}{H_T}, \quad (-1 \leq F_{IT} \leq 1)$$

Onde: F_{IT} é o desvio da proporção de heterozigotos observados dentro das populações do esperado segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg para o conjunto das populações, ou o índice médio de fixação dos alelos para o conjunto das populações.

O valor de F_{IT} considerando todos os *locus* e todas as populações foi calculado por:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{ST}) \cdot (1 - F_{IS})$$

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_e}{H_T}, \quad (0 \leq F_{ST} \leq 1)$$

Onde: F_{ST} é o desvio da proporção de heterozigotos esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg para o total das populações, da proporção de heterozigotos esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro das populações, sendo também a medida de divergência genética entre as populações.

Os cálculos dos índices de fixação F de Wright (1969) foram realizados de acordo com as fórmulas de WEIR e COCKERHAM (1984). Este procedimento fornece a estimativa do F_{IS} médio sobre o conjunto das populações, o F_{ST} e o F_{IT} . Eles valores são calculados no âmbito do modelo em ilhas, em que a diferenciação entre as populações não depende da distância entre elas.

F_{IT} , [$F = 1 - C/(A+B+C)$] considera a correlação dos genes nos indivíduos;

F_{IS} , [$f = 1 - C/(B+C)$] considera a correlação dos genes nos indivíduos em uma população;

F_{ST} , [$i = A/(A+B+C)$] considera a correlação dos genes entre indivíduos em uma população em relação ao conjunto das populações.

A relação entre estes três parâmetros é $f = (F - i)/(1 - i)$

O significado dos parâmetros para um alelo i é o seguinte:

A_i = componente interpopulacional da variante das frequências alélicas;

B_i = componente, entre indivíduos dentro de cada população, da variante das frequências alélicas;

C_i = componente, entre gametas dentro de cada indivíduo, da variante das frequências alélicas;

Os cálculos de A , de B e de C são detalhados em Weir e Cockerham (1984) e Weir (1990).

A estimativa para um *locus* todos os alelos i é dado de acordo com Weir e Cockerham (1984):

$$F_{ST} = \sum (A_i) / \sum (A_i + B_i + C_i)$$

Para as estimativas multilocus (WEIR; COCKERHAM, 1984), foi utilizado o estimador ponderado de acordo com Robertson e Hill (1984) que atribui maior significância aos alelos raros que o ponderado de acordo com Weir e Cockerham (1984).

A ponderação de Robertson e Hill (1984) é justificada pelo fato de a variante do seu estimador ser menor para valores baixos de F_{ST} , no entanto, Raufaste e Bonhomme (2000) propõem uma correção a esta obliquidade quando o número de alelos é superior a 2.

Este estimador, por conseguinte não é enviesado e possui uma variante mínima quando o F_{ST} é inferior a 0,05; o que corresponde a um domínio de validade aplicável aos níveis de variabilidade freqüentemente observados com indicadores multialélicos como é o caso de microssatélites.

Assim:

$$RH = \sum \frac{A_i (1 - P_i)}{(A_i + B_i + C_i)}$$

onde:

Pi = frequência de i

Nei (1977; 1973) propôs uma redefinição do F_{ST} de Wright, chamado G_{ST} , que representa o índice de medida da diferenciação genética que se escreve em função das diversidades genéticas para vários *locus* multialélicos:

$$G_{ST} = 1 - H_s / H_t$$

onde:

Hs = média dos **hs** (média aritmética sobre o conjunto das subpopulações da diversidade genética monolocus por subpopulação) sobre o conjunto dos *locus*;

Ht = média aritmética dos **ht** (diversidade genética monolocus sobre a população total) sobre o conjunto dos *locus*.

Este índice é freqüentemente utilizado, sem correção, como estimador de F_{ST} . (WARD et al., 1994; JARNE, 1996). Contudo, tal estimador apresenta várias obliquidades, relativas à amostragem de indivíduos, de subpopulações, ou mesmo do *locus*.

Correções de obliquidades são propostas por Nei e Chesser (1983) e por Chakraborty e Leimar (1987). Os estimadores construídos necessitam de ter acesso aos dados genotípicos. O estimador não corrigido (G_{ST}) continua a ser útil a título de comparação com a literatura, quando só os dados de frequências alélicas estão disponíveis. Ward et al. (1994) propõem um método de estimativa da variante de amostragem de G_{ST} através de *bootstrap*.

Foram utilizados dois estimadores: G_{ST} (estimador não corrigido) e $G_{ST} (nc)$ (estimador corrigido de acordo com NEI; CHESSER, 1983):

$$G_{ST}(nc) = 1 - H_s (nc) / H_t (nc)$$

onde:

$$Hs(nc) = N(Hs - Ho / 2N) / (N-1)$$

na qual Ho = média aritmética, sobre o conjunto das subpopulações, das heterozigosidades observadas;

N = média harmônica das dimensões das amostras, e

$$Ht(nc) = Ht + (Hs(nc) - Ho / 2) / Nn$$

onde:

n = número de subpopulações.

Uma estimativa análoga ao F_{ST} , o R_{ST} , que comporta em seu cálculo o *stepwise model* (SLATKIN, 1995), em que a mutação para um novo alelo de um determinado marcador microssatélite ocorre em passos, assim alelos com tamanhos próximos são considerados mais similares do que os alelos com tamanhos mais distintos. Esta estimativa foi calculada a partir do programa RST Calc (GOODMAN, 1997). Enquanto que os valores de F_{ST} derivam da variância das frequências alélicas, os valores de R_{ST} levam em consideração a variância do tamanho dos alelos (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). As estimativas de R_{ST} podem ser calculadas por:

$$R_{ST} = \frac{(S - S_W)}{S}$$

Onde: S corresponde à média da diferença ao quadrado no tamanho dos alelos entre todos os pares de alelos e; S_W equivale à soma média dos quadrados das diferenças no tamanho dos alelos dentro de cada população.

Locus que apresentam frequências semelhantes em diferentes populações apresentam baixos valores de R_{ST} , enquanto que aqueles que apresentam frequências gênicas muito distintas entre populações exibem valores altos.

Os cálculos dos valores dos parâmetros F_{ST} (WEIR; COCKERHAM, 1984), do Nm (estimativa do fluxo gênico de acordo com WRIGHT, 1969):

$$Nm = (1 - F_{ST}) / 4.F_{ST}$$

e de D (distância genética de acordo com REYNOLDS et al., 1983);

$$D = - \ln(1-F_{ST})$$

por pares de populações são úteis quando se pretende discutir a possibilidade de uma diferenciação pela distância geográfica entre populações, ou para destacar diferenças com o modelo em ilhas. Todos os cálculos fazem-se sobre os valores de F_{ST} de acordo com Weir e Cockerham (1984).

Os índices de distância genética têm por objetivo, quantificar as divergências genéticas entre unidades taxonômicas próximas, a partir dos dados de freqüências alélicas. Este trabalho utilizou o índice de Nei (1972), que calcula as distâncias genéticas entre populações:

$$D = \ln \left(\frac{\sum_m \sum_i P_{1mi} P_{2mi}}{\sqrt{\sum_m \sum_i P_{1mi}^2} \times \sqrt{\sum_m \sum_i P_{2mi}^2}} \right)$$

onde:

m = número de *locus*;

P_{1mi} = freqüência do alelo i do *locus* m para a população 1;

$\sum_m$ = soma sobre os *locus* e

$\sum_i$ = soma sobre os alelos.

Para os cálculos de AMOVA, previamente foi utilizado o programa STRUCTURE 2.2 (FALUSH et al., 2007) a fim de verificar o número de populações para cada agrupamento.

Os programas BOTTLENECK (CORNUET; LUIKART, 1996) e HW-QUICKCHECK (KALINOWSKI, 2006) foram utilizados para a verificação da significância dos dados obtidos em relação ao desvio das proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Em casos em que o desvio de equilíbrio foi detectado, realizou-se o “teste U” (ROUSSET; RAYMOND, 1995) para verificar excesso ou deficiência de heterozigotos. O algoritmo utilizado nesses cálculos foi o método da cadeia de Markov (10.000 “dememorizations”, 1.000 “batches” e 10.000 “iterations per batch”), que estima o valor exato de P desse teste (GUO; THOMPSON, 1992). O método da cadeia de Markov é um caminho para gerar uma distribuição de probabilidade exata sob a hipótese nula, que não é afetada por alelos raros ou pelo pequeno tamanho amostral (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

A verificação da presença ou ausência de alelos nulos foi realizada por meio do uso do programa ML-NullFreq (KALINOWSKI; TAPER, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Às seqüências de COI da presente análise foram incorporadas seqüências de *Octopus bimaculoides* (GBCPH0209-06), *Octopus californicus* (GBCPH0210-06) e *Octopus dofleini* (GBCPH0008-06), acessadas no Consórcio BARCODE (BOLD Systems) a fim de se estabelecer comparações com os trabalhos de Warnke et al. (2004) e Söller et al. (2000). Como grupo externo para enraizar a árvore filogenética utilizou-se a seqüência do molusco da família *Mopaliidae*, *Katharina tunicata* (GBML077-07), acessada no Consórcio BARCODE (BOLD Systems).

A figura 12 apresenta os resultados da amplificação do fragmento de, aproximadamente, 658 pb do gene do DNAm citocromo oxidase subunidade I (COI) (FOLMER et al., 1994).

A composição de bases nitrogenadas das amostras de polvo provenientes das regiões Norte e Nordeste foi: A = 26,8%, T = 36,9%, C = 21,8% e G = 14,5%. Para as amostras de polvo procedentes das regiões Sudeste e Sul, esta composição foi: A = 27,3%, T = 37,5%, C = 22,1% e G = 13,1%.

As relações entre as taxas de transição e transversão (ts / tv) para as amostras das regiões Norte e Nordeste e Sudeste e Sul foram 1,20 e 1,06, respectivamente.

Para os pares de comparações entre as amostras provenientes das regiões Norte e Nordeste e Sudeste e Sul analisadas conjuntamente, a relação entre as taxas de transição e transversão (ts/tv) foi da ordem de 1,07 para o gene mitocondrial COI, e ao serem agrupadas com as amostras de Portugal, *Octopus bimaculoides*, *Octopus californicus* e *Octopus dofleini*, essa taxa apresentou o valor de 1,35 indicando que este gene é útil para discutir distinções entre espécies de *Octopus* (TESKE, 2007).

Warnke et al. (2004) encontraram uma relação média de 0,92 para *Octopus vulgaris* e *Octopus mimus* pelo seqüenciamento do gene mitocondrial COIII e de 0,62 com o gene mitocondrial 16S. Söller et al. (2000) relatam uma relação igual a

1,0 com o gene mitocondrial COIII, para comparação entre amostras de *Octopus mimus* e de *Octopus vulgaris* procedentes do norte do Chile e da Costa Rica.

FIGURA 12 – Gel de agarose 0,8% com produtos da amplificação, por PCR do fragmento de, aproximadamente, 658 pb do gene do DNAm citocromo oxidase subunidade I (COI) de polvos capturados no Estado de Pernambuco. M=Marcador de peso molecular 100 pb; 01-19 representam indivíduos da amostra. A banda de 500 pb está indicada pelo símbolo ❖

A matriz da divergência nucleotídica construída pelo uso do método de Tamura e Nei (1993) para os dados do seqüenciamento do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) do DNA mitocondrial utilizado no presente estudo é mostrada por meio da tabela 6. A divergência nucleotídica para cada amostra foi menor que 1,0%.

A análise dos resultados indica que as amostras exibiram seqüências de similaridade próxima a 100,0%, sugerindo que não há nenhuma barreira que impeça o fluxo gênico entre as populações dentro de cada grupo (Norte e Nordeste e Sudeste e Sul).

As diferenças nucleotídicas das seqüências individuais do gene mitocondrial COI entre as amostras de *Octopus vulgaris* do Mediterrâneo (Portugal) e as das regiões Sudeste e Sul foram baixas (0,04%), corroborando com os resultados apresentados por Warnke et al. (2004).

TABELA 6 – Matriz de divergência nucleotídica estimada de acordo com Tamura–Nei (1993) baseada em seqüências do gene mitocondrial COI para 25 seqüências de *Octopus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1																								
2	0.25																							
3	0.22	0.13																						
4	0.14	0.25	0.19																					
5	0.14	0.25	0.19	0.00																				
6	0.13	0.25	0.19	0.01	0.01																			
7	0.13	0.25	0.19	0.01	0.01	0.00																		
8	0.13	0.25	0.19	0.01	0.01	0.00	0.00																	
9	0.13	0.25	0.19	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00																
10	0.14	0.24	0.20	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01															
11	0.15	0.24	0.20	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00														
12	0.14	0.24	0.20	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00													
13	0.14	0.24	0.20	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00												
14	0.18	0.25	0.22	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14											
15	0.18	0.25	0.22	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.00										
16	0.18	0.25	0.22	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.00	0.00									
17	0.18	0.25	0.22	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.00	0.00	0.00								
18	0.18	0.25	0.22	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00							
19	0.18	0.25	0.22	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00						
20	0.18	0.25	0.22	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00					
21	0.18	0.25	0.22	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00				
22	0.19	0.26	0.23	0.15	0.15	0.14	0.14	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01			
23	0.18	0.25	0.22	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	
24	0.19	0.24	0.24	0.16	0.16	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15	0.15	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03
25	0.20	0.24	0.24	0.17	0.16	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.16	0.16	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04

1 = *Octopus bimaculoides*, 2 = *Octopus californicus*, 3 = *Octopus dofleini*, 4 = PA08, 5 = PA20, 6 = CE04, 7 = CE05, 8 = RN56, 9 = RN57, 10 = BA01, 11 = BA05, 12 = PE02, 13 = PE03, 14 = RJ178, 15 = RJ280, 16 = SP12, 17 = SP31, 18 = SP43, 19 = SP44, 20 = PR03, 21 = PR43, 22 = SC02, 23 = SC12, 24 = PT10, 25 = PT11.

A análise da árvore filogenética (Figura 13) indica que as populações das regiões Norte e Nordeste da Costa Brasileira (Pará, Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia e Pernambuco), formam nitidamente um grupo geneticamente distinto.

Verifica-se uma distribuição com três agrupamentos, sendo o primeiro composto pelos animais pertencentes aos Estados de Bahia e Pernambuco, o segundo pelos animais capturados nos Estado do Ceará e Rio Grande do Norte e o terceiro é representado pelos animais provenientes do Estado do Pará, demonstrando possíveis separações entre essas populações.

Os animais provenientes das regiões Sudeste e Sul da Costa Brasileira (Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina), formam um clado bem estruturado e alinham-se às amostras procedentes de Portugal, classificadas como *Octopus vulgaris*.

Os resultados obtidos corroboram com a topologia gerada com os dados do citocromo oxidase subunidade III (COIII) do DNA mitocondrial apresentados por Warnke et al. (2004) e Söller et al. (2000), mostrando a ocorrência de dois grupos geneticamente distintos.

No presente trabalho, o primeiro grupo (clado 1) é formado por indivíduos que possuem conjunto de haplótipos similares aos espécimes da Venezuela, França e Sudeste e Sul do Brasil, classificados na árvore filogenética de Warnke et al. (2004) como *Octopus vulgaris*, dados que também corroboram com os obtidos por Söller et al. (2000), onde amostras de *Octopus* capturadas na Costa Sul do Brasil agrupam-se com o *Octopus vulgaris* do Mediterrâneo.

O segundo grupo (clado 2), formado por animais representantes das regiões Norte e Nordeste apresentam a mesma topologia do trabalho realizado com o gene do DNA mitocondrial COIII, que na filogenia proposta por Warnke et al. (2004) é denominado *Octopus* sp e, o padrão de enraizamento da filogenia em relação aos exemplares de *Octopus bimaculoides*, *Octopus californicus* e *Octopus dofleini* utilizados no presente estudo, seguem o mesmo padrão do obtido por Warnke et al. (2004) e Söller et al. (2000).

Depois de alinhadas as seqüências foram analisadas por meio da equação de Tamura-Nei (1993), para que a diversidade nucleotídica entre e dentro dos grupos fosse determinada. A diversidade nucleotídica calculada pelo teste de neutralidade

entre os clados 1 e 2 foi de 17,0% e a distância genética apontou

para um valor de 12,9%. Estes níveis de diferenciação genética indicam a presença de duas espécies de *Octopus* que aparentemente não apresentam diferenças morfológicas.

Quando foram comparadas entre si, as populações das regiões Norte e Nordeste apresentaram uma diversidade nucleotídica intraespecífica de 0,83% (dados não mostrados), e para as populações das regiões Sudeste e Sul a diversidade nucleotídica interna foi de 0,11%, diversidades estas consideradas baixas entre populações de uma mesma espécie (SIMMONS, 2004).

De acordo com Juan et al. (1995) e Funk, (1999) uma divergência de 2,3% entre seqüências de DNAm é alcançada a cada 1 milhão de anos. Já Hebert et al. (2003a), adotaram como padrão para a taxa de evolução molecular do gene COI o valor de 3,0% para cada milhão de anos. Embora este valor sofra as limitações comuns às estimativas baseadas em relógio molecular (HILLIS et al., 1996), o valor de divergência encontrado entre os dois clados para os representantes das regiões da Costa Brasileira (17,0 %) indica que há um período de tempo considerável de divergência.

FIGURA 13 – Relações filogenéticas inferidas por “*Neighbor-joining*” (NJ) para as amostras de *Octopus* sp, construídas pelo alinhamento de ≈ 658 pb do gene mitocondrial COI. A escala indica a distância de Tamura-Nei. Valores de “*bootstrap*”, baseados em 1000 replicações, maiores que 50%, são apresentados nos ramos da árvore. O molusco *Katharina tunicata* foi utilizada

Estudos taxonômicos empregando marcadores moleculares freqüentemente conduzem à divisão da espécie reconhecida em duas ou mais espécies crípticas (BASTROP et al., 1998; DAWSON; JACOBS, 2001; ZHANG et al., 2004). Embora a fronteira genética entre as espécies de polvo não seja bem conhecida, estudos moleculares relevantes já foram conduzidos com diversos gêneros: Söller et al. (2000); Warnke et al. (2004), e Strugnell et al. (2005).

Leite et al. (2008) relatam a ocorrência de uma nova espécie de polvo por eles denominada *Octopus insulares*; de acordo com estes autores, esta espécie encontra-se distribuída na região de Fernando de Noronha e áreas vizinhas, tendo sido também encontrada no Rio Grande do Norte.

Os dois grupos, *Octopus vulgaris* e *Octopus* sp, no presente trabalho formam clados monofiléticos, significativamente apoiados por “bootstraps” de 93,0%.

Os dados moleculares obtidos neste estudo indicam a presença de duas espécies muito semelhantes morfologicamente de *Octopus* para a Costa atlântica Brasileira. Uma, a ser classificada e provisoriamente denominada *Octopus* sp, distribuída nas regiões Norte e Nordeste e outra, o *Octopus vulgaris*, habitante das regiões Sudeste e Sul da Costa Brasileira (Figura 14).

FIGURA 14 – Mapa de distribuição de duas espécies de polvo identificadas neste estudo. As regiões indicadas em vermelho representam as áreas de distribuição do *Octopus* sp e, as indicadas em azul, apontam para as áreas de distribuição do *Octopus vulgaris*. O mapa foi criado pelo uso do site: www.aquarius.geomar.de/omc

4. 2 ANÁLISE POPULACIONAL

4. 2.1 *Octopus* sp

4. 2.1.1 MARCADORES MICROSSATÉLITES

4. 2.1.1.1 DIVERSIDADE GENÉTICA

Após a aplicação dos protocolos para extração de DNA, verificou-se que as amostras apresentavam material degradado. A figura 15, a exemplo, apresenta esta degradação nas amostras do DNA total de polvos capturados no Estado do Ceará. Porém, o nível de degradação não impossibilitou a aplicação das técnicas utilizadas.

Figura 15 – DNA total extraído de 20 animais capturados no Estado do Ceará.

As figuras 16 e 17 ilustram os resultados da PCR dos *loci* microssatélites μ Ov10 (122 pb) e μ Ov12 (176 pb), utilizando o DNA genômico de indivíduos capturados nos Estados do Rio Grande do Norte e Bahia, respectivamente. As setas utilizadas nas figuras indicam a banda de 100 pb do 100 pb DNA Ladder.

Figura 16 – Gel de agarose 0,8% com produtos de amplificação por PCR do *locus* microsatélite μ Ov10 para polvos capturados no Estado do Rio Grande do Norte. M=Marcador de peso molecular 100 pb; B=branco; 02-26 representam indivíduos da amostra. Bandas de, aproximadamente, 130 pb. A banda de 100 pb está indicada pelo símbolo ♦

Figura 17 – Gel de agarose 0,8% com produtos de amplificação por PCR do *locus* microsatélite μ Ov12 para polvos capturados no Estado da Bahia. M=Marcador de peso molecular 100 pb; B=branco; 01-37 representam indivíduos da amostra. Bandas de, aproximadamente, 180 pb. A banda de 100 pb está indicada pelo símbolo ♦

Após o estabelecimento das condições de amplificação dos *loci* microssatélites (Tabela 7), procedeu-se a genotipagem dos 140 indivíduos distribuídos por entre as quatro populações: Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Bahia, para todos os *loci* microssatélites utilizados.

Tabela 7 – Condições de amplificação do DNA para cada *locus* microssatélite

Etapas*	Anelamento	Extensão	Extensão final
<i>Locus</i>			
μOct3	57 °C / 40 s	72 ° C / 90 s	72 ° C / 10 min
μOct8	56 °C / 35 s	72 ° C / 90 s	72 ° C / 10 min
μOv04	57 °C / 40 s	72 ° C / 60 s	72 ° C / 08 min
μOv6	44 °C / 30 s	72 ° C / 45 s	72 ° C / 10 min
μOv10	57 °C / 30 s	72 ° C / 45 s	72 ° C / 08 min
μOv12	58 °C / 40s	72 ° C / 60 s	72 ° C / 10 min

* “Hot Start” = 95 °C / 05 min; Desnaturação 94 °C / 45 s

A genotipagem foi realizada pela identificação dos indivíduos homozigotos e heterozigotos e pelo estabelecimento do número e do tamanho dos alelos em cada *loci* microssatélite. Para os 140 animais estudados nas quatro populações de *Octopus* sp foram encontrados 39 alelos (Tabela 8).

Tabela 8 – Genética descritiva dos *loci* microssatélites considerando os indivíduos de todas as populações conjuntamente. A = número de alelos, Ae = número efetivo de alelos por *locus*, He = diversidade gênica, $h_{\text{máx}}$ = diversidade máxima, $He / h_{\text{máx}}$ = proporção de diversidade máxima (em %)

<i>LOCI</i>	A	Ae	He	$h_{\text{máx}}$	$He / h_{\text{máx}}$
μOv04	07	3,846	0,740	0,857	86,35 %
μOv06	07	4,525	0,779	0,857	90,90 %
μOv10	05	2,513	0,602	0,800	75,25 %
μOv12	06	2,584	0,613	0,833	73,59 %
μOct03	05	2,551	0,608	0,800	76,00 %
μOct08	09	2,584	0,613	0,889	68,95 %

A figura 18 ilustra resultados dos produtos da amplificação fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,0 %.

Figura 18 – Fracionamento em gel de poliacrilamida 12,0% de fragmentos amplificados do *locus* $\mu\text{Ov10} - (\text{GA})_{14}$ de *Octopus* sp. M= Marcador de peso molecular 10 pb, sendo a banda mais intensa (❖), corresponde a 100 pb. Verifica-se a presença de duas bandas próximas, indicando que as amostras utilizadas são heterozigotas. Raias 02 e 03: fragmentos de 118 e 133 pb, respectivamente. Raias 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13 e 14: fragmentos de 122 e 133 pb, respectivamente.

Embora o *locus* μOct08 tenha apresentado o maior número de alelos, o número efetivo de alelos nesse *locus* ($A_e = 2,584$) indica que esse valor é quase cinco vezes menor que o número de alelos observados. Essa diferença ocorre devido à distribuição desigual das freqüências alélicas.

O *locus* μOv06 foi o que apresentou maiores valores para a diversidade gênica ($H_e = 0,779$) e proporção de diversidade máxima ($H_e / h_{\text{máx}} = 0,909$), indicando que a diversidade gênica observada representa 90,90 % da máxima diversidade possível para esse *locus*, caso todos os alelos tivessem exatamente a

mesma frequência.

Murphy et al. (2002) revelaram a ocorrência de altos níveis de variabilidade (média: $H_e = 0,91$) entre amostras de *Octopus vulgaris* pela análise de três *loci* microssatélites ($\mu Ov04$, $\mu Ov10$ e $\mu Ov12$).

Cabranes et al. (2007) também encontraram altos índices de variabilidade genética em populações de *Octopus vulgaris* coletadas na Península Ibérica.

Shaw et al. (1999b) trabalhando com populações de *Loligo forbesi* provenientes da Costa Noroeste do Oceano Atlântico, encontraram valores variáveis entre 0,55 e 0,91 para a heterozigosidade em sete *loci* microssatélites.

Os *loci* microssatélites em cefalópodes parecem ser muito mais variáveis do que marcadores de aloenzimas; Pérez-Losada et al. (2002) reportam para *Sepia officinalis* médias de $H_e = 0,057$; Brierley et al. (1995) encontraram em *Loligo forbesi* média de $H_e = 0.08$.

Estudos realizados com aloenzimas em populações de *Loligi gahi* provenientes do Oceano Atlântico, revelaram baixas heterozigosidades médias, da ordem de $H_e = 0,07$ (CARVALHO; LONEY, 1989) e em *Loligo opalescens*, heterozigosidades médias de $H_e = 0.037$ a $H_e = 0.052$ (CHRISTOFFERSON et al., 1978; AUGUSTYN; GRANT, 1988). Os baixos níveis de variabilidade genética encontrados em lulas (CARVALHO et al., 1992; BRIERLY et al., 1993) podem estar associados ao poder limitado dos métodos aplicados para a detecção de polimorfismo.

Os baixos índices de variabilidade encontrados nos *loci* microssatélites nas populações analisadas neste estudo podem ser resultado de os oligonucleotídeos iniciadores utilizados serem específicos para a espécie *Octopus vulgaris*. Ou ainda, indicarem que as populações de *Octopus* sp estão impactadas por ações antrópicas devido à elevada exploração desses estoques.

As médias da diversidade genética dentro de cada população (Tabela 9) apontam para uma maior diversidade na população proveniente do Ceará. Isto está em concordância com as maiores taxas de heterozigosidade observadas ($H_o = 1,000$) (Tabela 18).

TABELA 9 – Índices de diversidade entre as populações de *Octopus* sp analisadas

População	Diversidade Gênica (σ)	Diferenças entre os pares
Ceará	0,674 $\pm$ 0,377	4,042 $\pm$ 2,042
Rio Grande do Norte	0,603 $\pm$ 0,339	3,614 $\pm$ 1,838
Pernambuco	0,603 $\pm$ 0,339	3,618 $\pm$ 1,842
Bahia	0,541 $\pm$ 0,311	3,251 $\pm$ 1,685

O tamanho alélico máximo encontrado entre todos os *loci* analisados foi de 193 pb no *locus* μ Ov12 [alelo (GATA)₂₄] e, o tamanho mínimo encontrado foi de 105 pb no *locus* μ Ov04 [alelo (TTA)₁₅]. Estes dados corroboram com os apresentados por Murphy et al. (2002) e por Cabranes et al. (2007).

A variação alélica máxima verificada foi de 09 alelos por *locus* (μ Oct08) e a mínima variação verificada concentrou-se nos *loci* μ Ov10 e μ Oct08, ambos com 05 alelos. A maior diversidade alélica encontrada ($G_{ST} = 0,304$) foi para o *locus* μ OCT08 e a menor diversidade alélica ($G_{ST} = 0,150$) foi verificada no *locus* μ Ov10 (Tabela 10).

Tabela 10 – Tamanho em pares de bases (pb), número de alelos e diversidade alélica para cada *locus* microsatélite

<i>Loci</i>	Variação de tamanho dos alelos (pb)	Número de alelos	Diversidade alélica (G_{ST}) *
μ Ov04	105 – 168	07	0,279
μ Ov06	120 – 153	07	0,171
μ Ov10	110 – 138	05	0,150
μ Ov12	125 – 193	06	0,271
μ Oct03	127 – 147	05	0,175
μ Oct08	125 – 184	09	0,304

* Nei, 1973

As tabelas 11 (*locus* μOv04); 12 (*locus* μOv06); 13 (*locus* μOv10); 14 (*locus* μOv12); 15 (*locus* μOct03) e 16 (*locus* μOct08) apresentam os alelos encontrados nos seis *loci* microssatélites utilizados neste estudo seguindo os critérios de tamanho em pares de base (pb) e número de repetições.

Tabela 11 – Relação dos alelos encontrados no *locus* microssatélite μOv04 [(TTA)₂₂] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições ()_n

Alelo	Tamanho (pb)	Número de repetições
$\mu\text{Ov04} - 1$	105	(TTA) ₁₅
$\mu\text{Ov04} - 2$	115	(TTA) ₁₈
$\mu\text{Ov04} - 3$	122	(TTA) ₂₁
$\mu\text{Ov04} - 4$	135	(TTA) ₂₅
$\mu\text{Ov04} - 5$	145	(TTA) ₂₈
$\mu\text{Ov04} - 6$	155	(TTA) ₃₁
$\mu\text{Ov04} - 7$	168	(TTA) ₃₆

Tabela 12 – Relação dos alelos encontrados no *locus* microssatélite μOv06 [(ATT)₂₄] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições ()_n

Alelo	Tamanho (pb)	Número de repetições
$\mu\text{Ov06} - 1$	120	(ATT) ₁₅
$\mu\text{Ov06} - 2$	127	(ATT) ₁₇
$\mu\text{Ov06} - 3$	130	(ATT) ₁₉
$\mu\text{Ov06} - 4$	135	(ATT) ₂₀
$\mu\text{Ov06} - 5$	139	(ATT) ₂₂
$\mu\text{Ov06} - 6$	142	(ATT) ₂₃
$\mu\text{Ov06} - 7$	153	(ATT) ₂₆

Tabela 13 – Relação dos alelos encontrados no *locus* microssatélite μOv10 [(GA)₁₄] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições ()_n

Alelo	Tamanho (pb)	Número de repetições
$\mu\text{Ov10} - 1$	110	(GA) ₀₈
$\mu\text{Ov10} - 2$	118	(GA) ₁₂
$\mu\text{Ov10} - 3$	122	(GA) ₁₄
$\mu\text{Ov10} - 4$	133	(GA) ₁₉
$\mu\text{Ov10} - 5$	138	(GA) ₂₂

Tabela 14 – Relação dos alelos encontrados no *locus* microssatélite μOv12 [(GATA)₂₀] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições ()_n

Alelo	Tamanho (pb)	Número de repetições
$\mu\text{Ov12} - 1$	125	(GATA) ₀₇
$\mu\text{Ov12} - 2$	130	(GATA) ₀₉
$\mu\text{Ov12} - 3$	154	(GATA) ₁₅
$\mu\text{Ov12} - 4$	170	(GATA) ₁₉
$\mu\text{Ov12} - 5$	184	(GATA) ₂₂
$\mu\text{Ov12} - 6$	193	(GATA) ₂₄

Tabela 15 – Relação dos alelos encontrados no *locus* microssatélite μOct03 [(AT)₁₆ (GT)₁₅] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições ()_n

Alelo	Tamanho (pb)	Número de repetições
$\mu\text{Oct03} - 1$	127	(ATGT) ₁₀
$\mu\text{Oct03} - 2$	131	(ATGT) ₁₁
$\mu\text{Oct03} - 3$	136	(ATGT) ₁₃
$\mu\text{Oct03} - 4$	140	(ATGT) ₁₄
$\mu\text{Oct03} - 5$	147	(ATGT) ₁₆

Tabela 16 – Relação dos alelos encontrados no *locus* microssatélite μOct08 [(TG)₃₆] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições ()_n

Alelo	Tamanho (pb)	Número de repetições
$\mu\text{Oct08} - 1$	125	(TG) ₁₈
$\mu\text{Oct08} - 2$	130	(TG) ₂₁
$\mu\text{Oct08} - 3$	137	(TG) ₂₄
$\mu\text{Oct08} - 4$	155	(TG) ₃₃
$\mu\text{Oct08} - 5$	160	(TG) ₃₆
$\mu\text{Oct08} - 6$	165	(TG) ₃₈
$\mu\text{Oct08} - 7$	170	(TG) ₄₁
$\mu\text{Oct08} - 8$	174	(TG) ₄₃
$\mu\text{Oct08} - 9$	184	(TG) ₄₈

4. 2.1.1.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

Os padrões das frequências alélicas (Tabela 17) apresentaram variação entre as populações, especialmente para a população de animais capturados no Estado do Rio Grande do Norte que apresentou 05 alelos exclusivos.

O *locus* μ Oct08 foi o que apresentou maior número de alelos privados e, nesse *locus*, a população de animais capturados no Estado de Pernambuco revelou a existência de 03 alelos exclusivos, o maior número de alelos exclusivos por *locus* por população. A maior riqueza alélica foi encontrada na população do Ceará, exibindo 23 alelos pela análise conjunta de todos os *loci* microssatélites, esta também foi a população que apresentou menor número de alelos exclusivos (01).

Tabela 17 – Frequência dos alelos (indicados pelo número de repetições) nos seis *loci* microssatélites nucleares nas populações de *Octopus* sp estudadas. Em negrito, os alelos exclusivos em cada população

ALELO	POPULAÇÃO			
	CE	RN	PE	BA
<i>locus</i> μOv04				
(TTA) ₁₅	0,000	0,004	0,000	0,014
(TTA) ₁₈	0,300	0,086	0,000	0,043
(TTA) ₂₁	0,300	0,211	0,500	0,043
(TTA) ₂₅	0,200	0,286	0,500	0,443
(TTA) ₂₈	0,200	0,164	0,000	0,457
(TTA) ₃₁	0,000	0,125	0,000	0,000
(TTA) ₃₆	0,000	0,125	0,000	0,000
<i>locus</i> μOv06				
(ATT) ₁₅	0,071	0,000	0,043	0,000
(ATT) ₁₇	0,100	0,000	0,071	0,000
(ATT) ₁₉	0,100	0,000	0,000	0,500
(ATT) ₂₀	0,300	0,043	0,329	0,000
(ATT) ₂₂	0,043	0,400	0,171	0,000
(ATT) ₂₃	0,314	0,157	0,271	0,500
(ATT) ₂₆	0,071	0,000	0,114	0,000
<i>locus</i> μOv10				
(GA) ₀₈	0,000	0,100	0,500	0,100
(GA) ₁₂	0,000	0,000	0,071	0,343
(GA) ₁₄	0,357	0,400	0,429	0,486
(GA) ₁₉	0,143	0,100	0,000	0,014
(GA) ₂₂	0,500	0,400	0,000	0,057
<i>locus</i> μOv12				
(GATA) ₀₇	0,000	0,000	0,000	0,443
(GATA) ₀₉	0,000	0,000	0,000	0,443
(GATA) ₁₅	0,000	0,500	0,000	0,000
(GATA) ₁₉	0,500	0,500	0,500	0,057
(GATA) ₂₂	0,329	0,000	0,500	0,029
(GATA) ₂₄	0,171	0,000	0,000	0,029
<i>locus</i> μOct03				
(ATGT) ₁₀	0,157	0,500	0,357	0,000
(ATGT) ₁₁	0,000	0,000	0,429	0,357
(ATGT) ₁₃	0,500	0,343	0,071	0,500
(ATGT) ₁₄	0,000	0,000	0,143	0,143
(ATGT) ₁₆	0,343	0,157	0,000	0,000
<i>locus</i> μOct08				
(TG) ₁₈	0,329	0,000	0,000	0,000
(TG) ₂₁	0,171	0,000	0,000	0,500
(TG) ₂₄	0,500	0,000	0,000	0,500
(TG) ₃₃	0,000	0,000	0,287	0,000
(TG) ₃₆	0,000	0,000	0,400	0,000
(TG) ₃₈	0,000	0,000	0,429	0,000
(TG) ₄₁	0,000	0,500	0,000	0,000
(TG) ₄₃	0,000	0,257	0,143	0,000
(TG) ₄₈	0,000	0,243	0,000	0,000

Total	23	22	21	22
Exclusivos	01	05	03	02

4. 2.1.1.3 VARIAÇÃO GENÉTICA

Entre as populações de *Octopus* sp estudadas, a heterozigosidade observada (H_o) variou desde 0,938 (Pernambuco) a 1,000 (Ceará e Bahia). A menor heterozigosidade esperada (H_e) foi de 0,579 (Bahia) e a população correspondente ao Estado do Ceará foi a que apresentou maior valor desta estimativa ($H_e = 0,669$) (Tabela 18).

Cabranes et al. (2007) encontraram valores de heterozigosidade observada variando de 0,666 a 0,837 e, de heterozigosidade esperada variando de 0,835 a 0,909 em populações de *Octopus vulgaris* provenientes da Península Ibérica.

Murphy et al. (2002) relatam altos valores de polimorfismo com heterozigosidade observada variando de 0,640 a 0,900 e, de heterozigosidade esperada variando de 0,830 a 0,960 em populações de *Octopus vulgaris* capturados na Costa Nordeste da África.

Por meio do Teste Exato de Fisher (Tabela 19) verificou-se que todas as populações apresentaram desvios significativos das proporções esperadas pelo modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estes desvios são atribuídos a um excesso significativo de heterozigose com respeito àqueles esperados sob circunstâncias propostas pelo EHW.

Tabela 18 – Diversidade genética para seis loci microssatélites em quatro populações de *Octopus* sp: Número de alelos (A); Número efetivo de alelos por locus (Ae); Riqueza alélica (A_R); Heterozigosidade observada (H_o); Heterozigosidade esperada (H_e); diversidade máxima ($h_{máx}$) e coeficiente de endogamia (F_{IS}). Os números em () indicam o desvio padrão

	Locus	A	Ae	A_R	H_o	H_e	p	$h_{máx}$	F_{IS}
CE	μOv04	4,000	4,000	4,000	1,000	0,750	0,0000	0,750	-0,545
	μOv06	7,000	4,761	7,000	1,000	0,790	0,0001	0,857	-0,565
	μOv10	3,000	2,564	3,000	1,000	0,610	0,0000	0,667	-0,481
	μOv12	3,000	2,631	3,000	1,000	0,620	0,0000	0,667	-0,185
	μOct03	3,000	2,631	3,000	1,000	0,620	0,0000	0,667	-0,483
	μOct08	3,000	2,631	3,000	1,000	0,620	0,0000	0,667	-0,485
	Média	3,833	3,021	3,833	1,000	0,669	0,0000	0,739	-0,503
	(dp)	(0,002)	(0,011)	(0,012)	(0,000)	(0,046)		(0,014)	(0,006)
RN	μOv04	7,000	2,041	2,000	1,000	0,510	0,0000	0,857	-0,595
	μOv06	3,000	2,941	4,000	0,890	0,660	0,0012	0,667	-0,722
	μOv10	4,000	3,030	4,000	1,000	0,670	0,0000	0,750	-0,685
	μOv12	2,000	2,041	2,000	1,000	0,510	0,0000	0,500	-0,594
	μOct03	3,000	2,631	3,000	1,000	0,620	0,0000	0,667	-0,654
	μOct08	3,000	2,703	3,000	1,000	0,630	0,0000	0,667	-0,664
	Média	3,667	2,494	3,000	0,981	0,599	0,0000	0,727	-0,646
	(dp)	(0,005)	(0,009)	(0,008)	(0,046)	(0,074)		(0,009)	(0,011)
PE	μOv04	2,000	2,041	2,000	1,000	0,510	0,0000	0,500	-0,468
	μOv06	6,000	4,545	6,000	1,000	0,780	0,0001	0,833	-0,609
	μOv10	3,000	2,326	3,000	1,000	0,570	0,0000	0,667	-0,498
	μOv12	2,000	2,041	2,000	1,000	0,510	0,0000	0,500	-0,468
	μOct03	4,000	3,030	4,000	1,000	0,670	0,0000	0,750	-0,551
	μOct08	4,000	2,778	4,000	0,630	0,640	0,4900	0,750	-0,662
	Média	3,500	2,584	3,500	0,938	0,613	0,0000	0,714	-0,532
	(dp)	(0,003)	(0,015)	(0,006)	(0,151)	(0,107)		(0,001)	(0,026)
BA	μOv04	5,000	2,500	4,972	1,000	0,600	0,0000	0,800	-0,755
	μOv06	2,000	2,041	2,000	1,000	0,510	0,0000	0,500	-0,700
	μOv10	5,000	2,778	4,970	1,000	0,640	0,0000	0,800	-0,783
	μOv12	5,000	2,564	4,999	1,000	0,610	0,0000	0,800	-0,763
	μOct03	3,000	2,564	3,000	1,000	0,610	0,0000	0,667	-0,762
	μOct08	2,000	2,041	2,000	1,000	0,510	0,0000	0,500	-0,699
	Média	3,667	2,375	3,657	1,000	0,579	0,0000	0,727	-0,740
	(dp)	(0,007)	(0,004)	(0,014)	(0,000)	(0,057)		(0,006)	(0,005)

Tabela 19 – Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

	μOv04	μOv06	μOv10	μOv12	μOct03	μOct08
Ceará	0,015	0,014	0,000	0,000	0,000	0,005
Rio Grande do Norte	0,001	0,008	0,001	0,000	0,001	0,048
Bahia	0,005	0,000	0,000	0,005	0,000	0,005
Pernambuco	0,005	0,002	0,000	0,003	0,002	0,008

$P < 0,05$

Murphy et al. (2002) encontraram desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg para o *locus* μOv12 em populações de *Octopus vulgaris*.

Cabranes et al. (2007) relatam a ocorrência de desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg para todas as populações estudadas e atribuem este fato à um significativo déficit de heterozigossidade.

Reichow e Smith (2001) relatam desvios significativos das proporções previstas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em *loci* microssatélites utilizados para a determinação da estrutura genética populacional em populações de *Loligo opalescens*, porém, esses autores afirmam que os desvios não mostraram nenhuma associação entre *locus* ou entre amostras.

Desvios significativos das expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg devido a deficiência de heterozigossidade também foram encontrados em estudos populacionais com aloenzimas em amostras de *Illex argentinus* (CARVALHO et al., 1992) e em *Martialia hyadesi* (BRIERLEY et al., 1993). O déficit total de heterozigossidade nesses trabalhos foi atribuído ao efeito Wahlund.

A utilização de marcadores microssatélites em populações de *Loligo forbesi* revelou uma tendência similar com um menor número de heterozigotos observados do que o esperado em quase todas as amostras (SHAW et al., 1999b).

Há relativamente poucos estudos utilizando marcadores microssatélites em cefalópodes, de modo que é incerto se desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg representam um traço geral nesta Classe. Greathorex et al. (2000) relatam que o valor da heterozigossidade observada foi consideravelmente mais elevado do que o previsto em populações de *Octopus vulgaris* em quatro de seis *loci* microssatélites.

O desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg pode ser causado também pela presença de alelos nulos. Estes alelos são encontrados freqüentemente em *loci* microsatélites (PEMBERTON et al., 1995), entretanto, se esta fosse a causa dos desvios, os alelos nulos indicariam um excesso de homozigose.

Alelos nulos provavelmente não são os responsáveis pelos resultados observados, já que a maior parte dos *locus* precisaria apresentá-los e seria necessária uma forte ação favorecendo os heterozigotos nulos a fim de manter a alta freqüência desses alelos (GAFFNEY et al., 1990) e o que se observa é um excesso de heterozigotos. De qualquer modo, foi utilizado o programa ML-NullFreq (KALINOWSKI; TAPER, 2006) para a verificação de alelos nulos. Os resultados gerados indicaram a ausência de alelos nulos nos *loci* microsatélites utilizados para todas as populações, como já era o esperado (ROUSSET; RAYMOND, 1995; GUO; THOMPSON, 1992).

Os pressupostos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg são populações infinitas, com ausência de mutação, migração, seleção e ocorrência de cruzamentos ao acaso (WEIR, 1996). Considerando que os *loci* microsatélites são teoricamente neutros e a taxa de mutação seja elevada em comparação com outros marcadores genéticos, os desvios são ainda baixos para serem avaliados como suficientes para afetar as freqüências alélicas de uma população.

A ausência de equilíbrio pode ser explicada pelo tamanho pequeno da população, cruzamentos não aleatórios ou efeitos de seleção e/ou migração (WEIR, 1996), embora existam casos de padrões de seleção (LEWONTIN; COCKERHAM, 1959) e cruzamentos não aleatórios (LI, 1988); ou ainda que as populações estudadas possam estar sob efeito de um gargalo genético de modo que os alelos raros foram eliminados das mesmas aumentando a heterozigosidade de outros alelos.

O programa STRUCTURE 2.2 (FALUSH et al., 2007) foi utilizado com o objetivo de verificar o número de populações para os agrupamentos das populações de *Octopus* sp da região Nordeste (Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia e Pernambuco) a fim de se realizar o melhor agrupamento para os cálculos de Análise Molecular de Variância (AMOVA).

Sem informação prévia sobre a estruturação populacional, este programa infere sobre o número de populações (k) mais provável, onde cada uma contém um conjunto de indivíduos. Deste modo, as informações fornecidas pelos genótipos definem a estruturação.

Estes dados foram gerados por meio dos resultados da genotipagem dos 140 animais capturados na Costa Brasileira.

Para a região Nordeste foram propostos valores referenciais de, no mínimo três e, no máximo, onze unidades populacionais a fim de se verificar possíveis subdivisões das amostras.

A figura 19 apresenta os resultados dos cálculos para obtenção dos valores da maior verossimilhança para as populações de polvo capturadas nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Bahia.

A figura 20 indica os valores de Delta k para estas populações revelando o número mais provável de populações em cada conjunto de dados.

FIGURA 19 – Valores de k (maior verossimilhança) para o conjunto de dados dos animais capturados nos Estados da região Nordeste da Costa Brasileira. A seta indica o valor com menor desvio-padrão ($K=4$)

FIGURA 20 – Valores de Delta k para o conjunto de dados dos animais capturados nos Estados da região Nordeste da Costa Brasileira, indicando o valor provável do número de populações representado pela seta ($\Delta k = 4$)

Os resultados fornecidos pelo programa STRUCTURE 2.2 (FALUSH et al., 2007) apontaram para a presença de quatro populações de *Octopus* sp distribuídas ao longo da Costa Nordeste (Figura 21). Os parâmetros se estabilizaram antes do final de um “burn-in” de comprimento igual a 100.000 com 500.000 repetições.

A variabilidade genética existente entre as quatro populações de *Octopus* sp foi medida tendo por base seis *locus* microssatélites nucleares. Verificou-se que 30,91% da variabilidade genética estão representados entre as populações de modo que 69,09% concentraram-se dentro das mesmas (Tabela 20). Nesta tabela os parâmetros: Φ_{ST} refere-se à fração da variação total que é devida a população considerando a espécie como um todo e, Φ_{FS} corresponde à fração da variação dentro de populações em nível de populações individualmente.

FIGURA 21 – “Bar plot” representativo da alocação dos 140 animais capturados nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia e Pernambuco em quatro populações indicadas pelas cores amarela, vermelha, verde e azul. Os resultados foram obtidos pela aplicação de uma extensão de corrida de “burn-in” de 100.000 de comprimento e 500.000 repetições. A fusão de cores representa indivíduos que possuem características genotípicas que podem ser compartilhadas com indivíduos de outra população que não a qual os mesmos foram alocados

Tabela 20 – Resultado da análise de variância molecular (AMOVA)

Fonte de Variação	GL	SQ	Porcentagem de variação	Estatística Φ
Entre as populações	3	396.957	30,91	$\Phi_{ST} = 0,309$
Dentro das populações	353	1021.000	69,09	$\Phi_{FS} = 0,691$
Total	358	1417.957		

Baseado em 10.000 permutações ($P < 0,001$)

4. 2.1.1.4 ESTRUTURA GENÉTICA E FLUXO GÊNICO

Os valores da estimativa de diferenciação populacional F_{ST} e R_{ST} foram diferentes de zero e indicaram níveis significativos de variação genética, apontando para a ocorrência de estruturação entre as populações (Tabela 21). Os valores foram elevados indicando variabilidade nos *loci* microssatélites nucleares estudados, de modo que a probabilidade de que dois alelos retirados ao acaso das populações sejam idênticos é baixa.

Tabela 21 – Estimativa de F_{ST} (acima da linha diagonal) e R_{ST} (abaixo da linha diagonal) entre pares de populações de *Octopus* sp

	CE	RN	PE	BA
CE	-----	0,207	0,301	0,334
RN	0,219	-----	0,256	0,332
PE	0,321	0,282	-----	0,219
BA	0,387	0,359	0,236	-----

$P < 0,05$

As medidas do efeito da subdivisão populacional que representa a redução da heterozigosidade em uma subpopulação devido ao efeito da deriva genética e avalia a divergência genética total entre subpopulações foi calculada por meio de dois parâmetros: F_{ST} (WRIGHT, 1965) e R_{ST} (SLATKIN, 1995). Estes parâmetros apresentaram valores significativamente diferentes de zero ($P < 0,05$) (Tabela 22).

As estimativas de F_{ST} e de R_{ST} indicaram que a diferenciação genética entre amostras de *Octopus* sp foram significativas no nível de 5,0 % após as correções de Bonferroni ($F_{ST} = 0,277$ e $R_{ST} = 0,293$) demonstrando uma estruturação genética altamente significativa entre as populações pelo uso do teste de permutação ($P \leq 0,05$).

Murphy et al. (2002) relatam a ocorrência de baixos valores para F_{ST} (0,0095) em populações de *Octopus vulgaris*.

Cabranes et al. (2007) encontraram valores significantes estatisticamente para a diferenciação genética entre populações de *Octopus vulgaris*.

Tabela 22 – Estimativa das estatísticas F de Wright (1965), de R_{ST} de Slatkin (1995) e do número de migrantes por geração (Nm) em quatro populações de *Octopus* sp. Intervalo de confiança (IC) de 95,0 % de probabilidade

	F_{ST}	R_{ST}	Nm
Estimativa	0,277	0,293	0,682
Limite Superior	0,328	0,352	0,776
Limite Inferior	0,222	0,268	0,432

$P < 0,05$

As diferenças nos modelos mutacionais para os parâmetros F_{ST} e R_{ST} e a utilidade destas medidas para estimar a diferenciação das populações foram discutidas por Wright (1978); Weir e Cockerham (1984); Slatkin (1995); Garza e Freimer (1996); Michalakis e Excoffier (1996); Rousset (1996; 1997); Wenburg et al. (1998); Gaggiotti et al. (1999); Brooker et al. (2000). Algumas características das mutações dos microssatélites podem afetar a interpretação dos dados da frequência alélica em estudos populacionais, por exemplo: mutações bidirecionais

podem produzir alelos de tamanhos idênticos contribuindo assim para a homogeneização dessas frequências (DI RIENZO et al., 1994; GARZA et al., 1995; NAUTA ; WEISSING, 1996; HEDRICK, 1999).

O significado deste processo dependerá do valor relativo da mutação gênica (NAUTA; WEISSING, 1996). Não são conhecidas as estimativas que avaliam as mutações em *loci* microssatélites em cefalópodes. As estimativas da taxa de mutação em peixes são da ordem de 10^{-4} por *locus* microssatélite por geração (ANGERS; BERNATCHEZ, 1998). Por não haver informações sobre a frequência da recorrência das mutações e das restrições no tamanho dos *loci* microssatélites no gênero *Octopus*, o impacto destes processos não pode ser estimado em *Octopus* sp.

O parâmetro N_m (número de migrantes por geração) estimado com base na estimativa de R_{ST} , resultou no valor de 0,682 indivíduo. Este valor pode ser um indício de que as populações encontram-se em um processo de diferenciação.

A habilidade de dispersão larval do gênero *Octopus* não está bem compreendida, animais adultos têm capacidade migratória limitada (GUERRA, 1992). As correntes marinhas que transportam larvas de peixes também podem transportar as paralarvas de polvo, deste modo haveria dispersão dos *Octopus* em estágios de vida mais adiantados (MANGOLD, 1983).

Sendo assim, pode-se supor que os efeitos potenciais das mutações nas populações estudadas excedam as taxas de migração. Ou ainda, que fatores oceanográficos, físicos e químicos, possam estar atuando como agentes impeditivos da dispersão das paralarvas de *Octopus* sp.

Características oceanográficas das regiões de estudo podem apontar elementos impeditivos da dispersão do *Octopus* sp.

Em Fortaleza, as capturas ocorrem ao longo dos “bench-rocks” costeiros do Município de Camocim (Norte de Fortaleza) e em bancos rochosos nos seus arredores que têm influência direta do ramo Norte da Corrente Sul Equatorial e, em menor escala, das poucas contribuições dos rios que limitam esse Município. Sendo assim, pode-se supor que a tendência de dispersão das paralarvas de polvos resultantes de desovas ocorrentes seja orientada para a direção Noroeste, acompanhando o litoral na direção dos Estados do Piauí e Maranhão, impedindo

deste modo o fluxo gênico entre as populações de *Octopus* sp localizadas mais ao Sul da Costa Brasileira.

Em Natal (litoral central do Estado do Rio Grande do Norte), a região do Rio do Fogo, onde a intensidade de pesca de polvos é originária de capturas empregando mergulho com compressor, inicialmente orientada para a pesca da lagosta; situa-se latitudinalmente em um divisor da Corrente Sul Equatorial, sendo aceito que as correntes oceânicas predominantes, responsáveis pela dispersão das paralarvas, possam seguir tanto para a direção Norte como para a direção Sul. Deste modo é compreensível que possa haver recrutas oriundos das desovas na região tanto ao Norte quanto ao Sul, porém com limitada capacidade de dispersão.

Tamandaré, localizada no litoral sul do Estado de Pernambuco, possui linha de corais paralela à Costa que se estende até Alagoas, as correntes predominantes cursam de Norte para Sul.

Barra Grande (Ponta do Mutá, Município de Barra Grande, litoral centro-sul do Estado da Bahia), situa-se na saída de um grande estuário onde a Ponta do Mutá é o acidente geográfico mais Oriental. A tendência das correntes que banham a Costa é de Norte para Sul.

Desde modo é provável que o fluxo gênico entre as populações de *Octopus* sp esteja sendo interrompido pela ação das correntes marítimas.

Cabranes et al. (2007) relatam em seus estudos a existência de uma estruturação espacial entre populações de *Octopus vulgaris* sugerindo um modelo de isolamento por distância entre as populações, porém seus resultados não apontaram para diferenças significativas entre amostras separadas por cerca de 200 km de distância.

As distâncias genéticas de Nei (1978) calculadas entre as populações variaram de 0,318; entre as populações do Estados da Bahia e Pernambuco a 1,030 entre as populações dos Estados do Ceará e Bahia. O respectivo dendograma está apresentado na figura 22.

A análise da figura 22 revela que as populações provenientes dos Estados da Bahia e Pernambuco são as mais semelhantes entre si.

A correlação matricial entre as distâncias genéticas de Nei (1972) e as distâncias geográficas foi positiva ($r = 0,464$) e significativa a 1,0 % de

probabilidade (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967). Este resultado sugere que não há um padrão espacial da variabilidade genética entre as populações que as estructure no espaço.

FIGURA 22 – Padrão de divergência genética entre quatro populações de *Octopus* sp, definido pelo agrupamento UPGMA, com base na identidade genética obtida a partir das distâncias genéticas de Nei (1978), Valores de *bootstrap*, baseados em 1000 replicações

Uma explicação possível para a divergência populacional observada consiste na forma de dispersão das paralarvas de *Octopus* sp que, de acordo com Guerra et al. (1992) têm capacidade limitada de dispersão, estando em função das correntes marítimas. A integração de informações oceanográficas destas regiões com os dados genéticos podem fornecer informações a respeito dos processos que resultam na conservação da estrutura genética dessas populações.

Os resultados não mostram diferenças significativas entre pares das amostras separadas por distâncias aproximadas de 400 km. O modelo de isolamento-por-distância parece explicar a dinâmica das populações dos *Octopus* sp, embora nenhuma associação significativa entre a distância geográfica e a diferenciação genética tenha sido encontrada.

Deste modo, para futuras avaliações sobre o esforço de pesca atuante sobre este importante recurso pesqueiro, os estoques populacionais do *Octopus* sp da região Nordeste da Costa Brasileira podem fornecer subsídios para a implantação de manejo sustentado e para a adoção de estratégias de conservação.

4. 2.2 *Octopus* sp

4. 2.2.1 REGIÃO A+T do DNAm

O alinhamento final das seqüências da região controle do DNA mt, com 538 pares de bases de comprimento cada, obtidas das 40 amostras de quatro populações de *Octopus* sp analisadas: Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Bahia, gerou uma matriz de dados que definiu um total de 12 haplótipos ($h = 12$) (Tabela 23) considerando haplótipo como o conjunto de seqüências que compartilham a mesma composição e ordenamento de nucleotídeos (TEMPLETON, 2001). Vinte e seis sítios polimórficos foram encontrados (Tabela 24).

TABELA 23 – Distribuição das amostras de acordo com as localidades geográficas e haplótipo do *Octopus* sp. (-) haplótipos não encontrados

População	Haplótipos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CE (10)	8	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RN (10)	-	-	3	1	4	1	1	-	-	-	-	-
PE (10)	-	-	-	-	-	-	-	1	1	8	-	-
BA (10)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	1
Total	8	2	3	1	4	1	1	1	1	8	9	1

O alinhamento das seqüências indicou a presença de 42,0% de Adenina, 38,0% de Timina, 16,9% de Guanina e 3,1% de Citosina, evidenciando a prevalência de AT na composição genética dessa região.

Transições contabilizaram aproximadamente 54,0% das substituições, sendo que 61,7% ocorreram na segunda posição e 38,3% ocorreram na primeira posição.

O teste estatístico Tajima D e F_s de Fu (FU, 1997), para os dados totais não mostraram desvio significativo da expectativa neutra das mutações para as populações estudadas (Tajima's $D = 0,472$; $P > 0,100$; $F_s = 0,579$; $P > 0,100$) indicando que os haplótipos são seletivamente equivalentes e sugerindo que as populações se encontram em equilíbrio em relação a esses haplótipos do DNAm (HARTL; CLARK, 1997).

TABELA 24 – Variação das seqüências entre os 12 haplótipos da Região Controladora (A+T) do DNAm de *Octopus* sp. Os números no topo indicam os sítios polimórficos. O número de indivíduos pertencentes a cada haplótipo é mostrado entre parênteses após o nome do haplótipo

		4	8	8	8	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	4	
		4	3	4	5	8	7	9	6	8	2	3	4	5	6	8	7	9	0	1	3	4	9	1	2	6	0
Haplótipo 1	(8)	A	T	G	A	T	A	A	A	A	A	G	T	T	G	T	A	T	T	A	A	A	G	A	G	T	C
Haplótipo 2	(2)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	A	.	.	
Haplótipo 3	(3)	.	.	.	.	A	G	.	T	T	T	A	C	A	T	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	
Haplótipo 4	(1)	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	
Haplótipo 5	(4)	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Haplótipo 6	(1)	.	A	T	C	A	G	.	T	T	T	A	C	A	T	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	
Haplótipo 7	(1)	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Haplótipo 8	(1)	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	A	G	G	G	.	.	.	.	
Haplótipo 9	(1)	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	A	A	G	G	G	.	.	.	.	
Haplótipo 10	(8)	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	A	G	G	G	.	.	.	T	
Haplótipo 11	(9)	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	A	G	G	G	.	.	.	A	T
Haplótipo 12	(1)	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	A	G	G	G	A	.	.	A	T

TABELA 25 – Frequências haplotípicas, número de seqüências (N), diversidade nucleotídica (π) e diversidade haplotípica (Hd), dentro das populações e nos dados totais de *Octopus* sp

	População de <i>Octopus</i> sp				Total
	Ceará	Rio Grande do Norte	Pernambuco	Bahia	
Haplótipos					
1	8	---	---	---	8
2	2	---	---	---	2
3	---	3	---	---	3
4	---	1	---	---	1
5	---	4	---	---	4
6	---	1	---	---	1
7	---	1	---	---	1
8	---	---	1	---	1
9	---	---	1	---	1
10	---	---	8	---	8
11	---	---	---	9	9
12	---	---	---	1	1
N	10	10	10	10	40
π	0,0061	0,0262	0,0021	0,0015	
Hd	0,3556	0,8000	0,3778	0,2000	
Nº de sítios polimórficos	05	22	16	03	

Os resultados da Análise Molecular de Variância (AMOVA) para todas as populações revelaram elevados valores: $\Phi_{ST} = 0,490$; $P < 0,001$ e dentro das populações: $\Phi_{SC} = 0,510$; $P < 0,001$, evidenciado que as populações estão estruturadas geneticamente e que a maior porcentagem de diversidade encontra-se dentro da população como um todo. Os dados foram obtidos pelo agrupamento das populações como um único conjunto de dados (Tabela 26).

TABELA 26 – Análise da Variância Molecular (AMOVA) no conjunto de populações de *Octopus* sp

Fonte da Variação	Componentes variantes	Porcentagem de variação (%)	
Entre as populações	7,231	49,03	$\Phi_{ST} = 0,490$
Dentro das populações	7,512	50,97	$1 - \Phi_{ST} = 0,510$
Total			

Baseado em 1000 permutações ($P < 0,001 \pm 0,000$)

Os valores de F_{ST} verificados (Tabela 27) indicam elevada estruturação genética com baixo fluxo gênico entre as populações estudadas (GROSBERG; CUNNINGHAM, 2001). O menor valor de F_{ST} (0,419) foi verificado entre os Estados do Ceará e Rio Grande do Norte, distantes, aproximadamente, 500 km, enquanto, o maior valor (0,866) foi observado entre os Estados do Ceará e Bahia, distantes cerca de 1.400 km, indicando a possibilidade de que fluxo gênico e distância geográfica estejam relacionados, porém os resultados obtidos pela aplicação do teste de Mantel ($p = 0,55$) não permitem fazer tal inferência. Todavia, é preciso ressaltar que, dado o número de seqüências obtidas, provavelmente não houve a plena amostragem dos haplótipos em cada região de captura.

Valores de F_{ST} foram significativos ($p < 0,05$) para todas as comparações par a par entre populações indicando divergência genética.

TABELA 27 – Valores de F_{ST} entre as populações de *Octopus* sp estudadas (acima da linha diagonal) e os valores das probabilidades (abaixo da linha diagonal)

	CE	RN	PE	BA
CE	-----	0,419	0,797	0,866
RN	0,485	-----	0,987	0,743
PE	0,286	0,530	-----	0,663
BA	0,306	0,368	0,169	-----

Baseado em 110 permutações, $P > 0,05$

A relação dos haplótipos de *Octopus* sp indicada pela Inferência Bayesiana (IB) apontou os haplótipos 3 e 6, encontrados na população de animais coletados no Estado do Rio Grande do Norte, como sendo os mais distantes, geneticamente, dos demais haplótipos (Figuras 23 e 24). Observando a árvore não enraizada (Figura 25) pode-se verificar a formação de três haplogrupos. O primeiro, envolvendo os haplótipos 1, 2, 4, 5 e 7; o segundo formado pelos haplótipos 8, 9, 10, 11 e 12 e, o terceiro constituído pelos haplótipos 3 e 6. O haplogrupo um é marcado pela presença das populações das localidades dos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte, o haplogrupo dois indica a presença das populações das localidades dos Estados de Pernambuco e Bahia e o haplogrupo três é composto por animais capturados no Estado do Rio Grande do Norte.

O método Neighbor-joining (NJ) gerou uma árvore com topologia idêntica à obtida pela Inferência Bayesiana, reforçando o distanciamento dos haplótipos 3 e 6 em relação aos outros haplótipos (Figura 24).

As distâncias genéticas entre os 12 haplótipos estão apresentadas na tabela 28, os haplótipos 3 e 6 apresentaram, comparativamente, os mais elevados valores, com médias de $0,050 \pm 0,003$ e $0,073 \pm 0,005$, respectivamente (média $\pm$ DP).

FIGURA 23 – Relação entre os haplótipos de *Octopus* sp obtida pela análise de Inferência Bayesiana (IB). Árvore não-enraizada. Haplótipos 1 e 2: Ceará; haplótipos 3, 4, 5, 6 e 7: Rio Grande do Norte; haplótipos 8, 9 e 10: Pernambuco e haplótipos 11 e 12: Bahia

FIGURA 24 – Filograma dos haplótipos de *Octopus* sp obtido pela análise de Inferência Bayesiana (IB). Números entre os ramos representam os valores de “bootstrap”. São mostrados apenas os suportes maiores que 50,0%. Haplótipos 1 e 2: Ceará; haplótipos 3, 4, 5, 6 e 7: Rio Grande do Norte; haplótipos 8, 9 e 10: Pernambuco e haplótipos 11 e 12: Bahia

TABELA 28 – Distância genética absoluta entre os haplótipos

	Hap 1	Hap 2	Hap 3	Hap 4	Hap 5	Hap 6	Hap 7	Hap 8	Hap 9	Hap 10	Hap 11
Hap1	----										
Hap2	0,01	----									
Hap3	0,04	0,04	----								
Hap4	0,02	0,03	0,04	----							
Hap5	0,01	0,02	0,04	0,02	----						
Hap6	0,05	0,06	0,01	0,06	0,05	----					
Hap7	0,01	0,02	0,04	0,01	0,01	0,05	----				
Hap8	0,03	0,04	0,06	0,03	0,03	0,07	0,03	----			
Hap9	0,03	0,04	0,06	0,03	0,04	0,08	0,04	0,01	----		
Hap10	0,04	0,05	0,07	0,04	0,04	0,08	0,04	0,01	0,01	----	
Hap11	0,04	0,05	0,07	0,04	0,04	0,08	0,04	0,01	0,01	0,00	----
Hap12	0,04	0,04	0,06	0,04	0,05	0,08	0,04	0,01	0,02	0,00	0,00

A identificação dos 26 sítios polimórficos e dos 12 haplótipos permitiu a estimativa da diversidade haplotípica ($H_d = 0,869 \pm 0,027$) e da diversidade nucleotídica ($\pi = 0,023 \pm 0,019$) considerando todas as amostras (Tabela 25). Os maiores índices de diversidade nucleotídica foram verificados na população proveniente do Estado do Rio Grande do Norte, onde os haplótipos 3 e 6, altamente diferenciados, foram amostrados ($\pi = 0,0262 \pm 0,005$).

Os resultados do teste exato para diferenciação das populações (RAYMOND; ROUSSET, 1995), baseado na frequência haplotípica entre as localidades revelaram significativa heterogeneidade na distribuição dos haplótipos ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos com os dados moleculares permitem inferir sobre a existência de uma estruturação geográfica.

Padrões geográficos de variação genética em invertebrados marinhos têm demonstrado que o isolamento pela distância ocorre em ambientes marinhos, mas somente em grandes escalas geográficas (PALUMBI, 1994). Os haplótipos encontrados neste estudo não são compartilhados pelas populações das diferentes regiões geográficas, corroborando com os trabalhos de Cabranes et al. (2007) e Guerra (1992) que inferem sobre a limitada capacidade de dispersão das paralarvas de animais do gênero *Octopus*.

A diversidade haplotípica encontrada foi baixa para três das quatro populações estudadas: Ceará, Pernambuco e Bahia, o que indica baixo fluxo gênico entre estas populações.

Estudos taxonômicos empregando marcadores moleculares frequentemente conduzem à divisão da espécie reconhecida em duas ou mais espécies crípticas (BASTROP et al., 1998; DAWSON; JACOBS, 2001; ZHANG et al., 2004). Embora a fronteira genética entre as espécies de polvo não seja bem conhecida, estudos moleculares relevantes já foram conduzidos com diversos gêneros: Söller et al. (2000); Warnke et al. (2004), e Strugnell et al. (2005).

Comparando os dados obtidos neste estudo, verifica-se moderada diferença nucleotídica entre os haplótipos 3 e 6 e os demais.

A quebra na relação de haplótipos, que separa os haplótipos 3 e 6 dos demais haplótipos com um nível de confiança de 99,0 % e as relações obtidas pela Inferência Bayesiana e por Neighbor-joining indicam que estes haplótipos

estão geneticamente distintos dos demais, permitindo inferir sobre uma possível espécie críptica do complexo *Octopus vulgaris*.

Os resultados encontrados no presente estudo apontam para a presença desta espécie na população proveniente do Estado do Rio Grande do Norte que apresenta os haplótipos 3 e 6 como exclusivos.

Uma possibilidade que parece melhor explicar a obtenção de moderada diferença nucleotídica entre os haplótipos 3 e 6 e os demais é a de que estes haplótipos pertenceriam a uma espécie distinta. Leite et al. (2008) relatam a ocorrência de uma nova espécie de polvo por eles denominada *Octopus insulares*; de acordo com estes autores, esta espécie encontra-se distribuída na região de Fernando de Noronha e áreas vizinhas, tendo sido também encontrada no Estado do Rio Grande do Norte.

O modelo de isolamento-por-distância parece explicar a dinâmica das populações dos *Octopus* sp, embora nenhuma associação significativa entre a distância geográfica e a diferenciação genética tenha sido encontrada.

De um modo geral, as populações de *Octopus* sp estudadas estão estruturadas geneticamente e diferenciam-se entre si, de modo que serão necessárias medidas de manejo específicas para estas localidades visando preservar o patrimônio genético dessas populações.

4. 2.3 *Octopus vulgaris*

4. 2.3.1 MARCADORES MICROSSATÉLITES

4. 2.3.1.1 DIVERSIDADE GENÉTICA

Após a aplicação dos protocolos para extração de DNA, verificou-se que as amostras apresentavam material degradado. A figura 25, a exemplo, apresenta esta degradação nas amostras do DNA total extraído de polvos capturados no Estado do Rio de Janeiro. Porém, o nível de degradação não impossibilitou a aplicação das técnicas utilizadas.

Figura 25 – DNA total extraído de 30 animais capturados no Estado do Rio de Janeiro. Marcador de peso molecular 100 pb (M). (❖) indica a banda de 100 pb.

Os protocolos desenvolvidos para a amplificação das regiões alvo por meio da PCR são apresentados na tabela 29.

Tabela 29 – Condições de amplificação do DNA para cada *locus* microsatélite

<i>Locus</i>	Etapas*	Anelamento	Extensão	Extensão final
μOct3		57 °C / 40 s	72 ° C / 90 s	72 ° C / 10 min
μOct8		56 °C / 35 s	72 ° C / 90 s	72 ° C / 10 min
μOv04		57 °C / 40 s	72 ° C / 60 s	72 ° C / 08 min
μOv6		44 °C / 30 s	72 ° C / 45 s	72 ° C / 10 min
μOv10		57 °C / 30 s	72 ° C / 45 s	72 ° C / 08 min
μOv12		58 °C / 40s	72 ° C / 60 s	72 ° C / 10 min

* “Hot Start” = 95 °C / 05 min; Desnaturação 94 °C / 45 s

As figuras 26 e 27 ilustram os resultados da PCR dos *loci* microsatélites μOv04 (126 pb), e μOct8 (160 pb), utilizando o DNA genômico de indivíduos capturados nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, respectivamente. As setas utilizadas nas figuras indicam a banda de 100,0 pb do 100,0 pb DNA Ladder.

Após o estabelecimento das condições de amplificação dos *loci* microsatélites (Tabela 29), procedeu-se a genotipagem dos 343 indivíduos distribuídos por entre cinco populações: Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, para todos os seis *loci* microsatélites utilizados.

A genotipagem foi realizada pela identificação dos indivíduos homozigotos e heterozigotos e pelo estabelecimento do número e do tamanho dos alelos em cada *loci* microsatélite.

Cerca de 50,0% das amostras de todas as populações de *Octopus vulgaris* e de todos os *loci* microsatélites foram reavaliados para a confirmação dos resultados em géis de poliacrilamida 12,0%. A figura 28 ilustra resultados da separação dos fragmentos amplificados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,0%.

Figura 26 – Gel de agarose 0,8% com produtos de amplificação por PCR do *locus* microssatélite μ Ov04 para polvos capturados no Estado de São Paulo. M=Marcador de peso molecular 100 pb; B=branco; 01-19 representam indivíduos da amostra. Bandas de, aproximadamente, 125 pb. A banda de 100 pb está indicada pelo símbolo ♦

Figura 27 – Gel de agarose 0.8% com produtos de amplificação por PCR do *locus* microssatélite μ Oct08 de polvos capturados no Estado do Rio de Janeiro. M=Marcador de peso molecular 100 pb; 01-37 representam indivíduos da amostra. Bandas de, aproximadamente, 125 pb. A banda de 100 pb está indicada pelo símbolo ♦

Figura 28 – Fracionamento em gel de poliacrilamida 12% de fragmentos amplificados do *locus* $\mu\text{Oct03} - (\text{AT})_{16}(\text{GT})_{15}$ de *Octopus vulgaris*. M = Marcador de peso molecular 10 pb, sendo a banda mais intensa (❖), correspondente a 100 pb. A exceção das raias 05 e 07, que evidenciam a presença de duas bandas próximas (131 e 136 pb, respectivamente) apontando para amostras heterozigotas, verifica-se a presença de uma banda de 131 pb, indicando que as amostras utilizadas são homozigotas

Para os 343 animais estudados nas quatro populações de *Octopus vulgaris* foram encontrados 55 alelos (Tabela 30).

Nenhum desequilíbrio significativo de ligação foi encontrado entre os *loci* ou entre as populações. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Murphy et al. (2000).

O *locus* μOct08 foi o que apresentou maiores valores para a diversidade gênica ($H_e = 0,880$) e proporção de diversidade máxima ($H_e / h_{\text{máx}} = 0,923$), indicando que a diversidade gênica observada representa 92,30 % da máxima diversidade possível para esse *locus*, caso todos os alelos tivessem exatamente a mesma frequência.

Tabela 30 – Genética descritiva dos loci microssatélites considerando os indivíduos de todas as populações de *Octopus vulgaris* conjuntamente: A = número de alelos; Ae = número efetivo de alelos por *locus*; Ho = heterozigosidade observada; He = heterozigosidade esperada, P = probabilidade associada; $h_{\max}$ = diversidade máxima; $He/h_{\max}$ = proporção de diversidade máxima (em %)

<i>Locus</i>	A	Ae	Ho	He	P	$h_{\max}$	$He/h_{\max}$
$\mu\text{Ov}04$	06	5,000	1,000	0,800	0,0000	0,833	83,33
$\mu\text{Ov}06$	10	6,667	0,960	0,850	0,0000	0,900	90,00
$\mu\text{Ov}10$	03	2,632	1,000	0,620	0,0000	0,667	66,70
$\mu\text{Ov}12$	09	5,263	1,000	0,810	0,0000	0,889	88,90
$\mu\text{Oct}03$	14	7,692	0,990	0,870	0,0000	0,829	82,90
$\mu\text{Oct}08$	13	8,333	0,960	0,880	0,0000	0,923	92,30

Murphy et al. (2002) revelaram a ocorrência de altos níveis de variabilidade (média: $He = 0,91$) entre amostras de *Octopus vulgaris* pela análise de três *loci* microssatélites ($\mu\text{Ov}04$, $\mu\text{Ov}10$ e $\mu\text{Ov}12$).

Cabranes et al. (2007) apontaram para médias de $He = 0,837$ em populações de *Octopus vulgaris*, cujos níveis de variabilidade genética foram avaliados por meio de microssatélites.

Shaw et al. (1999) trabalhando com populações de *Loligo forbesi* provenientes da Costa noroeste do Oceano Atlântico, encontraram valores variáveis entre 0,55 e 0,91 para a heterozigosidade em sete *loci* microssatélites.

Os *loci* microssatélites em cefalópodes parecem ser muito mais variáveis do que marcadores de aloenzimas; Pérez-Losada et al. (1999) reportam para *Sepia officinalis* médias de $He = 0,057$. Brierley et al. (1995) encontraram em *Loligo forbesi* média de $He = 0,08$.

Estudos realizados com aloenzimas em populações de *Loligo gahi* provenientes do Oceano Atlântico, revelaram baixas heterozigosidades médias, da ordem de 0,07 (CARVALHO; LONEY, 1989) e em *Loligo opalescens*, heterozigosidades médias de 0,037 a 0,052 (CHRISTOFFERSON et al., 1978; AUGUSTYN; GRANT, 1988). Os baixos níveis de variabilidade genética encontrados em lulas (CARVALHO et al., 1992; BRIERLY et al., 1993) podem estar associados ao poder limitado dos métodos aplicados para a detecção de polimorfismo.

O tamanho máximo alélico encontrado entre todos os *loci* analisados foi de 193 pb no *locus* $\mu\text{Ov}12$ [alelo (GATA)₂₄] e, o tamanho mínimo encontrado foi de 110

pb no *locus* $\mu\text{Ov}10$ [alelo (GA)₀₅]. A variação alélica máxima verificada foi de 14 alelos por *locus* ($\mu\text{Oct}03$) e a mínima variação verificada concentrou-se nos *locus* $\mu\text{Ov}10$ com 03 alelos. A maior diversidade alélica encontrada ($G_{ST} = 0,138$) foi para o *locus* $\mu\text{Ov}04$ e a menor diversidade alélica ($G_{ST} = 0,044$) foi verificada no *locus* $\mu\text{Oct}03$ (Tabela 31).

Tabela 31 – Tamanho em pares de bases (pb), número de alelos e diversidade alélica para cada *locus* microssatélite

<i>Loci</i>	Variação de tamanho dos alelos (pb)	Número de alelos	Diversidade alélica (G_{ST}) *
$\mu\text{Ov}04$	115 – 180	06	0,138
$\mu\text{Ov}06$	120 – 170	10	0,073
$\mu\text{Ov}10$	110 – 138	03	0,086
$\mu\text{Ov}12$	130 – 193	09	0,109
$\mu\text{Oct}03$	120 – 200	14	0,044
$\mu\text{Oct}08$	125 – 195	13	0,099

* Nei, 1973

As tabelas 32 (*locus* $\mu\text{Ov}04$); 33 (*locus* $\mu\text{Ov}06$); 34 (*locus* $\mu\text{Ov}10$); 35 (*locus* $\mu\text{Ov}12$); 36 (*locus* $\mu\text{Oct}03$) e 37 (*locus* $\mu\text{Oct}08$) apresentam os alelos encontrados nos seis *loci* microssatélites utilizados neste estudo seguindo os critérios de tamanho em pares de base (pb) e número de repetições.

Os dados encontrados neste estudo, quanto à variação de tamanho dos alelos nos *loci* microssatélites, corroboram com os apresentados por Murphy et al. (2002) e Cabranes et al. (2007).

Tabela 32 – Relação dos alelos encontrados no *locus* microssatélite μOv04 [(TTA)₂₂] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições ()_n

Alelo	Tamanho (pb)	Número de repetições
$\mu\text{Ov04} - 1$	126	(TTA) ₂₂
$\mu\text{Ov04} - 2$	135	(TTA) ₂₅
$\mu\text{Ov04} - 3$	145	(TTA) ₂₈
$\mu\text{Ov04} - 4$	155	(TTA) ₃₁
$\mu\text{Ov04} - 5$	168	(TTA) ₃₆
$\mu\text{Ov04} - 6$	180	(TTA) ₄₀

Tabela 33 – Relação dos alelos encontrados no *locus* microssatélite μOv06 [(ATT)₂₄] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições ()_n

Alelo	Tamanho (pb)	Número de repetições
$\mu\text{Ov06} - 1$	120	(ATT) ₁₅
$\mu\text{Ov06} - 2$	127	(ATT) ₁₇
$\mu\text{Ov06} - 3$	130	(ATT) ₁₉
$\mu\text{Ov06} - 4$	135	(ATT) ₂₀
$\mu\text{Ov06} - 5$	139	(ATT) ₂₂
$\mu\text{Ov06} - 6$	142	(ATT) ₂₃
$\mu\text{Ov06} - 7$	146	(ATT) ₂₄
$\mu\text{Ov06} - 8$	153	(ATT) ₂₆
$\mu\text{Ov06} - 9$	157	(ATT) ₂₇
$\mu\text{Ov06} - 10$	163	(ATT) ₃₀

Tabela 34 – Relação dos alelos encontrados no *locus* microssatélite μOv10 [(GA)₁₄] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições ()_n

Alelo	Tamanho (pb)	Número de repetições
$\mu\text{Ov10} - 1$	110	(GA) ₀₈
$\mu\text{Ov10} - 2$	118	(GA) ₁₂
$\mu\text{Ov10} - 3$	122	(GA) ₁₄

Tabela 35 – Relação dos alelos encontrados no *locus* microssatélite μOv12 [(GATA)₂₀] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições ()_n

Alelo	Tamanho (pb)	Número de repetições
$\mu\text{Ov12} - 1$	130	(GATA) ₀₉
$\mu\text{Ov12} - 2$	136	(GATA) ₁₀
$\mu\text{Ov12} - 3$	148	(GATA) ₁₃
$\mu\text{Ov12} - 4$	154	(GATA) ₁₅
$\mu\text{Ov12} - 5$	167	(GATA) ₁₈
$\mu\text{Ov12} - 6$	170	(GATA) ₁₉
$\mu\text{Ov12} - 7$	176	(GATA) ₂₀
$\mu\text{Ov12} - 8$	184	(GATA) ₂₂
$\mu\text{Ov12} - 9$	193	(GATA) ₂₄

Tabela 36 – Relação dos alelos encontrados no *locus* microssatélite μOct03 [(AT)₁₆ (GT)₁₅] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições ()_n

Alelo	Tamanho (pb)	Número de repetições
$\mu\text{Oct03} - 1$	120	(ATGT) ₀₉
$\mu\text{Oct03} - 2$	127	(ATGT) ₁₀
$\mu\text{Oct03} - 3$	147	(ATGT) ₁₆
$\mu\text{Oct03} - 4$	150	(ATGT) ₁₇
$\mu\text{Oct03} - 5$	156	(ATGT) ₁₈
$\mu\text{Oct03} - 6$	160	(ATGT) ₁₉
$\mu\text{Oct03} - 7$	165	(ATGT) ₂₀
$\mu\text{Oct03} - 8$	170	(ATGT) ₂₁
$\mu\text{Oct03} - 9$	174	(ATGT) ₂₂
$\mu\text{Oct03} - 10$	177	(ATGT) ₂₃
$\mu\text{Oct03} - 11$	180	(ATGT) ₂₄
$\mu\text{Oct03} - 12$	187	(ATGT) ₂₅
$\mu\text{Oct03} - 13$	195	(ATGT) ₂₇
$\mu\text{Oct03} - 14$	200	(ATGT) ₂₉

Tabela 37 – Relação dos alelos encontrados no *locus* microssatélite μOct08 [(TG)₃₆] classificados quando ao tamanho em pares de base (pb) e número de repetições ()_n

Alelo	Tamanho (pb)	Número de repetições
$\mu\text{Oct08} - 1$	125	(TG) ₁₈
$\mu\text{Oct08} - 2$	130	(TG) ₂₁
$\mu\text{Oct08} - 3$	137	(TG) ₂₄
$\mu\text{Oct08} - 4$	141	(TG) ₂₆
$\mu\text{Oct08} - 5$	147	(TG) ₂₉
$\mu\text{Oct08} - 6$	155	(TG) ₃₃
$\mu\text{Oct08} - 7$	160	(TG) ₃₆
$\mu\text{Oct08} - 8$	165	(TG) ₃₈
$\mu\text{Oct08} - 9$	170	(TG) ₄₁
$\mu\text{Oct08} - 10$	174	(TG) ₄₃
$\mu\text{Oct08} - 11$	184	(TG) ₄₈
$\mu\text{Oct08} - 12$	190	(TG) ₅₁
$\mu\text{Oct08} - 13$	195	(TG) ₅₃

4. 2.3.1.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

Os padrões das frequências alélicas (Tabela 38) apresentaram variação entre as populações, especialmente para a população de *Octopus vulgaris* capturados no Estado do Rio de Janeiro foi a que apresentou maior número de alelos exclusivos (03).

A maior riqueza alélica foi encontrada na população de São Paulo, exibindo 44 alelos pela análise conjunta de todos os *loci* microssatélites, com 02 alelos exclusivos.

Cabranes et al. (2007) também encontraram altos índices de polimorfismo em cinco *loci* microssatélites utilizados para a verificação da estruturação populacional em *Octopus vulgaris*.

Murphy et al. (2002) relatam altos índices de polimorfismo em quatro *loci* microssatélites utilizados para estudos populacionais com *Octopus vulgaris*.

Tabela 38 – Frequência dos alelos (indicados pelo número de repetições) nos seis *loci* microsatélites nucleares nas populações estudadas

POPULAÇÃO				
ALELO	Rio de Janeiro	São Paulo	Paraná	Santa Catarina
<i>locus</i> μOv04				
(TTA) ₂₂	0,150	0,142	0,000	0,000
(TTA) ₂₅	0,200	0,183	0,000	0,000
(TTA) ₂₈	0,350	0,112	0,000	0,121
(TTA) ₃₁	0,250	0,000	0,000	0,147
(TTA) ₃₆	0,050	0,317	0,500	0,500
(TTA) ₄₀	0,000	0,246	0,500	0,233
<i>locus</i> μOv06				
(ATT) ₁₅	0,064	0,063	0,000	0,241
(ATT) ₁₇	0,000	0,026	0,034	0,103
(ATT) ₁₉	0,036	0,101	0,148	0,121
(ATT) ₂₀	0,279	0,146	0,193	0,138
(ATT) ₂₂	0,093	0,336	0,455	0,138
(ATT) ₂₃	0,071	0,097	0,034	0,060
(ATT) ₂₄	0,314	0,160	0,000	0,000
(ATT) ₂₆	0,086	0,015	0,000	0,198
(ATT) ₂₇	0,036	0,056	0,136	0,000
(ATT) ₃₀	0,021	0,000	0,000	0,000
<i>locus</i> μOv10				
(GA) ₀₈	0,000	0,213	0,000	0,345
(GA) ₁₂	0,500	0,287	0,500	0,500
(GA) ₁₄	0,500	0,500	0,500	0,156
<i>locus</i> μOv12				
(GATA) ₀₉	0,000	0,049	0,000	0,000
(GATA) ₁₀	0,000	0,082	0,171	0,000
(GATA) ₁₃	0,000	0,000	0,170	0,000
(GATA) ₁₅	0,250	0,369	0,329	0,000
(GATA) ₁₈	0,250	0,000	0,000	0,353
(GATA) ₁₉	0,000	0,082	0,000	0,000
(GATA) ₂₀	0,179	0,216	0,329	0,500
(GATA) ₂₂	0,000	0,000	0,000	0,095
(GATA) ₂₄	0,071	0,000	0,000	0,051
<i>locus</i> μOct03				
(ATGT) ₀₉	0,000	0,060	0,000	0,009
(ATGT) ₁₀	0,000	0,000	0,000	0,043
(ATGT) ₁₆	0,000	0,056	0,000	0,052
(ATGT) ₁₇	0,000	0,060	0,034	0,121
(ATGT) ₁₈	0,000	0,056	0,000	0,069
(ATGT) ₁₉	0,029	0,071	0,114	0,215
(ATGT) ₂₀	0,250	0,104	0,307	0,112
(ATGT) ₂₁	0,186	0,250	0,159	0,259
(ATGT) ₂₂	0,200	0,090	0,250	0,000
(ATGT) ₂₃	0,200	0,030	0,045	0,000
(ATGT) ₂₄	0,079	0,216	0,079	0,121
(ATGT) ₂₅	0,029	0,000	0,000	0,000
(ATGT) ₂₇	0,029	0,000	0,000	0,000
(ATGT) ₂₉	0,000	0,007	0,011	0,000
Total	28	33	22	27
Exclusivos	03	02	01	02

Tabela 38 – Continuação

ALELO	POPULAÇÃO			
	Rio de Janeiro	São Paulo	Paraná	Santa Catarina
		<i>locus</i> μ Oct08		
(TG) ₁₈	0,200	0,071	0,000	0,000
(TG) ₂₁	0,243	0,119	0,000	0,000
(TG) ₂₄	0,029	0,011	0,000	0,000
(TG) ₂₆	0,150	0,060	0,171	0,000
(TG) ₂₉	0,000	0,086	0,102	0,000
(TG) ₃₃	0,000	0,000	0,171	0,000
(TG) ₃₆	0,171	0,153	0,227	0,405
(TG) ₃₈	0,000	0,101	0,102	0,000
(TG) ₄₁	0,057	0,187	0,227	0,086
(TG) ₄₃	0,093	0,075	0,000	0,509
(TG) ₄₈	0,000	0,038	0,000	0,000
(TG) ₅₁	0,043	0,000	0,000	0,000
(TG) ₅₃	0,014	0,101	0,000	0,000
Total	09	11	06	03
TOTAL				
GERAL	37	44	28	30
EXCLUSIVOS	03	02	01	02

4. 2.3.1.3 VARIAÇÃO GENÉTICA

Entre as populações de *Octopus vulgaris* estudadas, a heterozigosidade observada (H_o) variou desde 0,990 (Rio de Janeiro) a 0,992 (Paraná), sendo a média igual a 0,948. A menor heterozigosidade esperada (H_e) foi de 0,628 (Santa Catarina) e a população correspondente ao Estado de São Paulo foi a que apresentou maior valor para esta estimativa ($H_e = 0,787$) (Tabela 39).

Cabranes et al. (2007) encontraram valores de heterozigosidade observada variando de 0,666 a 0,837 e, de heterozigosidade esperada variando de 0,835 a 0,909 em populações de *Octopus vulgaris* provenientes da Península Ibérica.

Murphy et al. (2002) relatam altos valores de polimorfismo com heterozigosidade observada variando de 0,640 a 0,900 e, de heterozigosidade esperada variando de 0,830 a 0,960 em populações de *Octopus vulgaris* capturados na Costa Nordeste da África.

Perez-Losada et al. (2002) encontraram resultados similares em seus estudos com *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda).

Os resultados obtidos no presente trabalho também corroboram com os relatados por Casu et al. (2002).

Tabela 39 – Estimativa de parâmetros genéticos para as quatro populações de *Octopus vulgaris*, sendo: n = número de indivíduos amostrados; H_o = heterozigosidade observada; H_e = heterozigosidade esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg

POPULAÇÃO	n	H_o	H_e	P
RIO DE JANEIRO	70	0,990 (0,017)	0,750 (0,124)	0,0000
SÃO PAULO	169	0,978 (0,029)	0,787 (0,092)	0,0000
PARANÁ	46	0,992 (0,018)	0,683 (0,143)	0,0000
SANTA CATARINA	58	0,988 (0,026)	0,628 (0,119)	0,0000
MÉDIA	85,75	0,948 (0,073)	0,726 (0,116)	0,0000

() = desvio padrão; $\alpha = 0,05$; $P = 0,95$.

As médias da diversidade genética dentro de cada população (Tabela 40) apontam para uma maior diversidade na população proveniente de São Paulo.

TABELA 40 – Índices de diversidade entre as populações de *Octopus vulgaris* analisadas

População	Diversidade Gênica	Diferenças entre os pares
Rio de Janeiro	$0,754 \pm 0,411$	$4,525 \pm 2,229$
São Paulo	$0,785 \pm 0,425$	$4,712 \pm 2,308$
Paraná	$0,676 \pm 0,373$	$4,053 \pm 2,025$
Santa Catarina	$0,683 \pm 0,377$	$4,099 \pm 2,044$

O resumo dos parâmetros da diversidade genética está apresentado na tabela 41.

Por meio do Teste Exato de Fisher (Tabela 42) verificou-se que o *locus* $\mu\text{Ov}12$, para todas as populações estudadas, apresentou desvios significativos das proporções esperadas pelo modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg, assim como o *locus* $\mu\text{Ov}10$. Todos os desvios foram atribuídos a um excesso significativo de heterozigose com relação aos esperados sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Murphy et al. (2002) encontraram desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg para o *locus* $\mu\text{Ov}12$ em populações de *Octopus vulgaris*.

Cabranes et al. (2007) relatam a ocorrência de desvios significativos das proporções esperadas pelo modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg para o *locus* $\mu\text{Ov}12$ em populações de *Octopus vulgaris*.

Reichow e Smith (2001) relatam desvios significativos das proporções previstas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em *loci* microssatélites utilizados para a determinação da estrutura genética populacional em populações de *Loligo opalescens*, porém, esses autores afirmam que os desvios não mostraram nenhuma associação entre *locus* ou entre amostras.

Desvios significativos das expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg devido a deficiência de heterozigosidade foram encontrados em estudos populacionais com aloenzimas em amostras de *Illex argentinus* (CARVALHO et al., 1992) e em *Martialia hyadesi* (BRIERLEY et al., 1993). O déficit total de heterozigose foi atribuído ao efeito Wahlund.

A utilização de marcadores microssatélites em populações de *Loligo forbesi* revelou uma tendência similar com um menor número de heterozigotos observados do que o esperado em quase todas as amostras (SHAW et al., 1999b).

Há relativamente poucos estudos utilizando marcadores microssatélites em cefalópodes, de modo que é incerto se desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg representam um traço geral nesta Classe. Greatorex et al. (2000) relatam que o valor da heterozigosidade observada foi consideravelmente mais elevado do que o previsto em populações de *Octopus vulgaris* em quatro de seis *loci* microssatélites.

A presença de alelos nulos é indicada como a principal causa dos desvios de equilíbrio Hardy-Weinberg (SHAW et al., 1999; PEREZ-LOSADA et al., 2002) em populações de cefalópodes. Estes alelos são encontrados freqüentemente em *loci* microssatélites (PEMBERTON et al., 1995).

Casu et al. (2002) encontraram desvios significativos das proporções de Hardy-Weinberg em populações de *Octopus vulgaris* em relação ao locus μOv06 e os atribuíram a presença de alelos nulos.

Se os desvios fossem o resultado da presença de alelos nulos, seriam encontrados provavelmente em todas as amostras, mas no estudo atual, o locus μOv06 estava em equilíbrio Hardy-Weinberg para todas as populações.

Alelos nulos provavelmente não são os responsáveis pelos resultados observados neste estudo, já que a maior parte dos loci precisaria apresentá-los (GAFFNEY et al., 1990). Os resultados gerados pelo uso do programa ML-NullFreq (KALINOWSKI; TAPER, 2006) indicaram a ausência de alelos nulos nos loci microssatélites utilizados para todas as populações (ROUSSET; RAYMOND, 1995; GUO; THOMPSON, 1992).

Os pressupostos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg são populações infinitas, com ausência de mutação, migração, seleção e ocorrência de cruzamentos ao acaso (WEIR, 1996). Considerando que loci microssatélites são teoricamente neutros e a taxa de mutação seja elevada em comparação com outros marcadores genéticos, os desvios são ainda baixos para serem avaliados como suficiente para afetar as frequências alélicas de uma população.

A ausência de equilíbrio pode ser explicada pelo tamanho pequeno da população, cruzamentos não aleatórios ou efeitos de seleção e/ou migração (WEIR, 1996), embora existam casos de padrões de seleção (LEWONTIN; COCKERHAM, 1959) e cruzamentos não aleatórios (LI, 1988) que podem levar ao equilíbrio de Hardy-Weinberg; ou ainda que as populações estudadas possam estar sob efeito de um gargalo genético de modo que os alelos raros foram eliminados das mesmas aumentando a heterozigosidade de outros alelos.

Tabela 41 – Diversidade genética para seis *loci* microssatélites em quatro populações de *Octopus vulgaris*: Número de alelos (A); Número efetivo de alelos por locus (Ae); Riqueza alélica (A_R); Heterozigosidade observada (Ho); Heterozigosidade esperada (He); diversidade máxima ($h_{\max}$) e coeficiente de endogamia (F_{IS}). Os números em () indicam o desvio padrão

	Locus	A	Ae	A_R	Ho	He	p	$h_{\max}$	F_{IS}
RJ	μ Ov04	5	4,167	4,000	1,000	0,760	0,0000	0,800	-0,339
	μ Ov06	9	5,000	7,817	0,960	0,800	0,0001	0,889	-0,270
	μ Ov10	2	2,000	3,998	1,000	0,500	0,0000	0,500	-0,653
	μ Ov12	5	4,545	5,000	1,000	0,780	0,0000	0,800	-0,623
	μ Oct03	8	5,556	7,968	0,990	0,820	0,0000	0,875	-0,637
	μ Oct08	9	6,250	6,000	1,000	0,840	0,0000	0,889	-0,623
	Média	6,333	4,000	5,797	0,992	0,750	0,0000	0,974	-0,503
	(dp)	(0,210)	(0,021)	(0,011)	(0,013)	(0,079)		(0,009)	(0,006)
SP	μ Ov04	5	4,545	5,000	1,000	0,780	0,0000	0,800	-0,689
	μ Ov06	9	5,556	8,843	0,940	0,820	0,0000	0,889	-0,956
	μ Ov10	3	2,632	3,000	1,000	0,620	0,0000	0,667	-0,570
	μ Ov12	6	4,167	5,948	1,000	0,760	0,0000	0,833	-0,650
	μ Oct03	11	7,143	9,878	0,990	0,860	0,0000	0,909	-0,653
	μ Oct08	11	9,091	11,653	0,940	0,890	0,0267	0,909	-0,968
	Média	7,500	4,717	7,387	0,978	0,788	0,0000	0,978	-0,740
	(dp)	(0,015)	(0,025)	(0,008)	(0,029)	(0,092)		(0,012)	(0,005)
PR	μ Ov04	2	2,041	2,000	1,000	0,510	0,0000	0,500	-0,964
	μ Ov06	6	3,571	6,000	0,950	0,720	0,0000	0,833	-0,287
	μ Ov10	2	2,041	2,000	1,000	0,510	0,0000	0,500	-0,776
	μ Ov12	4	3,704	4,000	1,000	0,730	0,0000	0,750	-0,962
	μ Oct03	8	5,000	7,000	1,000	0,800	0,0000	0,875	-0,497
	μ Oct08	6	5,882	6,000	1,000	0,830	0,0003	0,833	0,025
	Média	4,667	3,155	4,500	0,992	0,683	0,0000	0,964	-0,531
	(dp)	(0,041)	(0,034)	(0,013)	(0,028)	(0,119)		(0,011)	(0,026)
SC	μ Ov04	4	3,030	4,000	1,000	0,670	0,0000	0,750	-0,982
	μ Ov06	7	6,250	7,000	1,000	0,840	0,0000	0,857	-0,343
	μ Ov10	3	2,564	3,000	1,000	0,610	0,0000	0,667	-0,504
	μ Ov12	4	2,632	4,000	1,000	0,620	0,0000	0,750	-0,961
	μ Oct03	9	6,250	8,758	1,000	0,840	0,0000	0,889	-0,637
	μ Oct08	3	2,326	3,000	0,930	0,570	0,0000	0,667	-0,591
	Média	5,000	3,247	4,960	0,988	0,692	0,0000	0,967	-0,646
	(dp)	(0,002)	(0,039)	(0,015)	(0,277)	(0,098)		(0,015)	(0,011)

Tabela 42 – Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

	μOv04	μOv06	μOv10	μOv12	μOct03	μOct08
Rio de Janeiro	0,000*	0,812	0,000**	0,000**	0,167	0,002*
São Paulo	0,138	0,712	0,000**	0,010*	1,000	0,568
Paraná	0,011	0,457	0,010	0,010*	0,155	0,102
Santa Catarina	0,000*	0,155	0,000**	0,000**	0,269	0,001**

*P<0,05; **P<0,01.

O programa STRUCTURE 2.2 (FALUSH et al., 2007) foi utilizado com o objetivo de verificar o número de populações para os agrupamentos das populações de *Octopus vulgaris* das regiões Sudeste e Sul (Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina) da Costa Brasileira, a fim de se realizar o melhor agrupamento para os cálculos de Análise Molecular de Variância (AMOVA).

Sem informação prévia sobre a estruturação populacional, este programa infere sobre o número de populações (k) mais provável, onde cada uma contém um conjunto de indivíduos, deste modo, as informações fornecidas pelos genótipos definem a estruturação.

Estes dados foram gerados por meio dos resultados da genotipagem dos 343 animais capturados na Costa Brasileira.

Para ambas as regiões Sudeste e Sul, foram propostos valores referenciais de, no mínimo quatro e, no máximo, doze unidades populacionais a fim de se verificar possíveis subdivisões das amostras.

A figura 29 apresenta os resultados dos cálculos para obtenção dos valores da maior verossimilhança para as populações de polvo capturadas nos Estados das regiões Sudeste e Sul. A figura 30 indica os valores de Delta k para estas populações, revelando o número mais provável de populações no conjunto de dados.

FIGURA 29 – Valores de k (maior verossimilhança) para o conjunto de dados dos animais capturados nos Estados das regiões Sudeste e Sul da Costa Brasileira. A seta indica o valor com menor desvio-padrão ($k=4$)

FIGURA 30 – Valores de Delta k para o conjunto de dados dos animais capturados nos Estados das regiões Sudeste e Sul da Costa Brasileira, indicando o valor provável do número de populações representado pela seta (Δk)

Para os animais capturados nos Estados das regiões Sudeste e Sul, a análise dos dados resultantes do uso do programa STRUCTURE 2.2 (FALUSH et al., 2007), apontou para a alocação dos 343 indivíduos em quatro populações: Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Os animais capturados em Juréia, no litoral do Estado de São Paulo, foram alocados conjuntamente aos polvos capturados no Estado do Paraná. Os parâmetros se estabilizaram antes do final de um “burn-in” de comprimento igual a 100.000 com 500.000 repetições.

A figura 31 apresenta os dados da distribuição dos animais nas quatro populações citadas.

A variabilidade genética existente entre as quatro populações de *Octopus vulgaris* foi medida tendo por base seis *locus* microssatélites nucleares. Verificou-se que 12,23% da variabilidade genética estão representados entre as populações de modo que 87,78% concentraram-se dentro das mesmas (Tabela 43). Nesta tabela os parâmetros: Φ_{ST} refere-se à fração da variação total que é devida a população considerando a espécie como um todo e, Φ_{FS} corresponde à fração da variação dentro de populações em nível de populações individualmente.

Logo, em relação à espécie *Octopus vulgaris* como um todo foi verificado que 12,23% ($\Phi_{ST} = 0,122$) da variação total é devida às populações, portanto 87,78% da variação total está dentro de populações ($1 - \Phi_{ST} = 0,878$).

Tabela 43 – Resultado da análise de variância molecular (AMOVA)

Fonte de Variação	GL	SQ	Percentagem de variação	Estatística Φ
Entre as populações	3	396.957	12,23	$\Phi_{ST} = 0,122$
Dentro das populações	378	1137.000	87,78	$\Phi_{FS} = 0,878$
Total	381	1533,957		

Baseado em 10 000 permutações ($P < 0,001$)

FIGURA 31 – “Bar plot” representativo da alocação de animais capturados nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina em quatro populações indicadas pelas cores vermelha, verde, azul e amarela. Os resultados foram obtidos pela aplicação de uma extensão de corrida de “burn-in” de 100.000 de comprimento e 500.000 repetições. A fusão de cores representa indivíduos que possuem características genótípicas que podem ser compartilhadas com indivíduos de outra população que não a qual o mesmo foi alocado

Figura 31 – Continuação

4. 2.3.1.4 ESTRUTURA GENÉTICA E FLUXO GÊNICO

Em termos de diferenciação genética entre as populações, os valores da estimativa de diferenciação populacional F_{ST} e R_{ST} foram estatisticamente significativos e diferentes de zero, o que indica que há estruturação entre as populações (Tabela 44). Os valores foram elevados indicando alta variabilidade nos *loci* microssatélites nucleares estudados, de modo que a probabilidade de que dois alelos retirados ao acaso das populações sejam idênticos é baixa.

Estes resultados corroboram com os obtidos por Cabranes et al. (2007) em suas análises populacionais com *Octopus vulgaris* provenientes da Península Ibérica.

Tabela 44 – Estimativa de F_{ST} (acima da diagonal) e R_{ST} (abaixo da diagonal) entre pares de populações de *Octopus vulgaris*

	RJ	SP	PR	SC
RJ	-----	0,071	0,137	0,150
SP	0,081	-----	0,056	0,113
PR	0,142	0,062	-----	0,144
SC	0,156	0,142	0,164	-----
PT	0,173	0,154	0,204	0,215

$P < 0,05$

As estimativas de F_{ST} e de R_{ST} indicaram que a diferenciação genética entre amostras de *Octopus* sp foram significativas no nível de 5,0% após as correções de Bonferroni ($F_{ST} = 0,117$ e $R_{ST} = 0,122$) demonstrando uma estruturação genética significativa entre as populações pelo uso do teste de permutação ($P < 0,05$).

Murphy et al. (2002) relatam a ocorrência de baixos valores para F_{ST} (0,0095) em populações de *Octopus vulgaris*.

As medidas do efeito da subdivisão populacional que representa a redução da heterozigosidade em uma subpopulação devido ao efeito da deriva genética e avalia a divergência genética total entre subpopulações foi calculada por meio de dois

parâmetros: F_{ST} (WRIGHT, 1965) e R_{ST} (SLATKIN, 1995). Estes parâmetros apresentaram valores significativamente diferentes de zero ($P < 0,05$) (Tabela 45).

Tabela 45 – Estimativa das estatísticas F de Wright (1965) e de R_{ST} de Slatkin (1995) em quatro populações de *Octopus vulgaris*. Intervalo de confiança (IC) de 95,0 % de probabilidade

	F_{ST}	R_{ST}
Estimativa	0,117	0,122
Limite Superior	0,148	0,151
Limite Inferior	0,084	0,096
$P < 0,05$		

O parâmetro Nm (número de migrantes por geração) estimado com base na estimativa de R_{ST} indicou uma taxa média de migrantes de grandeza altamente significativa (Tabela 46).

TABELA 46 – Número de migrantes – Nm (acima da diagonal) e Distância genética (REYNOLDS et al., 1983) (abaixo da diagonal) estimadas para cinco populações de *Octopus vulgaris*

	RJ	SP	PR	SC	PT
RJ	-----	3,280	1,580	1,420	1,260
SP	0,073	-----	4,090	1,950	1,430
PR	0,147	0,059	-----	1,480	1,060
SC	0,162	0,156	0,120	-----	1,000
PT	0,181	0,161	0,212	0,224	-----

A correlação matricial entre as distâncias genéticas de Nei (1972) distâncias geográficas foi positiva ($r = 0,564$) e significativa a 1,0% de probabilidade (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967) quando as populações de *Octopus vulgaris* provenientes da Costa Brasileira foram analisadas. Este resultado sugere que não há um padrão espacial da variabilidade genética entre as populações que as estructure no espaço.

A habilidade de dispersão larval em *Octopus vulgaris* não está compreendida, sendo assim, pode-se supor que os efeitos potenciais das mutações nas populações estudadas excedam as taxas de migração. Ou ainda, que fatores oceanográficos, físicos e químicos, possam estar atuando como agentes impeditivos dessa dispersão.

Estudos avaliando a estrutura genética de populações de *Octopus vulgaris* procedentes do mar Mediterrâneo usando aloenzimas (MALTAGLIATI et al., 2002) e microsatélites (CASU et al., 2002) excluíram o modelo de isolamento por distância.

Esses autores sugeriram a dispersão das paralarvas como a explicação para o elevado fluxo gênico encontrado nestas populações.

O dendograma apresentado na figura 32 revela que as populações provenientes da Costa Brasileira estão agrupadas entre si.

FIGURA 32 – Padrão de divergência genética entre cinco populações de *Octopus vulgaris*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base na identidade genética obtida a partir das distâncias genéticas de Nei (1978), Valores de *bootstrap*, baseados em 5.000 replicações

Uma explicação possível para a divergência populacional observada consiste na forma de dispersão das paralarvas de *Octopus vulgaris* que, de acordo com Guerra et al. (1992) têm capacidade limitada de dispersão, estando em função das correntes marítimas. A integração de informações oceanográficas destas regiões com os dados genéticos podem fornecer informações a respeito dos processos que resultam na conservação da estrutura genética dessas populações.

Os resultados não mostram diferenças significativas entre pares das amostras separadas por distâncias aproximadas de 300 km.

O modelo de isolamento-por-distância parece explicar a dinâmica das populações dos *Octopus vulgaris*, embora nenhuma associação significativa entre a distância geográfica e a diferenciação genética tenha sido encontrada.

Deste modo, para futuras avaliações sobre o esforço de pesca atuante sobre este importante recurso pesqueiro, os estoques populacionais do *Octopus vulgaris* das Regiões Sudeste e Sul da Costa Brasileira podem fornecer subsídios para a implantação de manejo sustentado e para a adoção de estratégias de conservação.

4. 2.3 *Octopus vulgaris*

4. 2.3.2 REGIÃO A+T DO DNA MITOCONDRIAL

O alinhamento final das seqüências da região controle do DNAm, com 544 pares de bases de comprimento cada, obtidas das 45 amostras de quatro populações de *Octopus vulgaris* analisadas: Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, gerou uma matriz de dados que definiu um total de sete haplótipos ($h = 07$) considerando haplótipo como o conjunto de seqüências que compartilham a mesma composição e ordenamento de nucleotídeos (TEMPLETON, 2001). Dez sítios polimórficos foram encontrados (Tabela 47).

TABELA 47 – Variação das seqüências entre os 04 haplótipos da região controladora (A+T) do DNAm de *Octopus vulgaris*. Os números no topo indicam os sítios polimórficos. O número de indivíduos pertencentes a cada haplótipo é mostrado entre parênteses após o nome do haplótipo

		2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
		3	6	7	2	2	2	2	2	3	4
		6	1	5	1	2	3	4	7	2	7
Haplótipo 1	(21)	G	G	A	A	T	A	A	A	T	A
Haplótipo 2	(01)	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C
Haplótipo 3	(19)	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
Haplótipo 4	(01)	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.
Haplótipo 5	(01)	.	A	.	.	.	T	T	.	.	.
Haplótipo 6	(01)	.	A	C	T	A	T	.	C	.	.
Haplótipo 7	(01)	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.

O alinhamento das seqüências indicou a presença de 40,1% de Adenina, 44,6% de Timina, 9,1% de Guanina e 6,2% de Citosina, evidenciando a prevalência de AT na composição genética dessa região.

O teste estatístico Tajima D para os dados totais não mostraram desvio significativo da expectativa neutra das mutações para as populações estudadas (Tajima's $D = -1,792$; $0,10 > P > 0,05$) indicando que os haplótipos são seletivamente equivalentes e sugerindo que as populações se encontram em equilíbrio em relação a esses haplótipos do DNAm (HARTL; CLARK, 1997).

A identificação dos dez sítios polimórficos e dos quatro haplótipos permitiu a estimativa da diversidade haplotípica ($H_d = 0,615 \pm 0,043$) e da diversidade nucleotídica ($\pi = 0,005 \pm 0,001$) considerando todas as amostras (Tabela 48).

TABELA 48 – Frequências haplotípicas, número de seqüências (N), diversidade nucleotídica (π), diversidade haplotípica (H_d) e F_{ST} . Entre () os valores de P, para as quatro populações e nos dados totais de *Octopus vulgaris*

	População de <i>Octopus vulgaris</i>				Total
	Rio de Janeiro	São Paulo	Paraná	Santa Catarina	
Haplótipos					
1	6	4	2	2	14
2	1	6	8	2	17
3	2	2	---	2	6
4	1	1	---	1	3
5	1	1	---	1	3
6	---	---	---	1	1
7	---	---	---	1	1
N	11	14	10	10	45
π	0,0072	0,0061	0,0010	0,0148	
H_d	0,709	0,607	0,356	0,844	
F_{ST}	0,192 (0,003)	0,269 (0,007)	0,189 (0,011)	0,262 (0,002)	

$P < 0,05$

A maior diversidade haplotípica foi encontrada na população de Santa Catarina ($H_d = 0,844$), assim como a maior diversidade nucleotídica ($\pi = 0,0148$).

A relação filogenética dos haplogrupos de *Octopus vulgaris* indicada pela Inferência Bayesiana (IB) apontou o haplótipo 6 como sendo o mais distante, geneticamente, dos demais haplótipos.

Observando-se a árvore não enraizada (Figura 33) pode-se verificar a formação de dois haplogrupos. O primeiro, envolvendo os haplótipos 1 (RJ, SP, PR e SC), 2 (RJ, SP, PR e SC) e 7 (SC) e o segundo formado pelos haplótipos 3, 4, 5; encontrados nas populações de animais coletados nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina e o haplótipo 6 (SC).

Em ambos os haplogrupos foram encontrados animais de todas as populações das Regiões Sudeste e Sul estudadas.

O método de *Neighbor-joining* (NJ) gerou uma árvore com topologia idêntica à obtida pela Inferência Bayesiana, reforçando o distanciamento genético do haplótipo 6 em relação aos outros haplótipos e sua relação de proximidade com o haplótipo 5 (Figura 34).

FIGURA 33 – Relação entre os haplótipos de *Octopus vulgaris* obtida pela análise de Inferência Bayesiana (IB). Árvore não-enraizada. Haplótipo 1: RJ; SP; PR e SC; Haplótipo 2: RJ; Haplótipo 3: RJ; SP; PR e SC; Haplótipo 4: RJ; Haplótipo 5: RJ; Haplótipo 6: PR e Haplótipo 7: SC

FIGURA 34 – Filograma dos haplótipos de *Octopus* sp obtido pela análise de Inferência Bayesiana (BI). Números entre os ramos representam os valores de “bootstrap”. Haplótipo 1: Rio de Janeiro; São Paulo; Paraná e Santa Catarina; Haplótipo 2: Rio de Janeiro; Haplótipo 3: Rio de Janeiro; São Paulo; Paraná e Santa Catarina; Haplótipo 4: Rio de Janeiro; Haplótipo 5: Rio de Janeiro; Haplótipo 6: Paraná e Haplótipo 7: Santa Catarina

As distâncias genéticas entre os haplótipos foram de baixas (Hap 1 x Hap 3 = 0,001) a moderadas (Hap 1 x Hap 6 = 0,042), e o haplótipo 6 apresentou, comparativamente, os mais elevados valores (Tabela 49), com uma média equivalente a $0,035 \pm 0,005$ (média $\pm$ DP).

TABELA 49 – Distância genética absoluta entre os haplótipos

	Hap 1	Hap 2	Hap 3	Hap 4	Hap 5	Hap 6	Hap 7
Hap1	----						
Hap2	0,018	----					
Hap3	0,001	0,029	----				
Hap4	0,018	0,031	0,018	----			
Hap5	0,018	0,035	0,018	0,022	----		
Hap6	0,042	0,041	0,033	0,032	0,026	----	
Hap7	0,001	0,021	0,011	0,020	0,018	0,033	----

A diversidade nucleotídica (π) considerando todas as amostras foi de $0,005 \pm 0,001$ (média $\pm$ DP) e a diversidade haplotípica (H_d) foi de $0,615 \pm 0,043$ (média $\pm$ DP).

Os maiores índices de diversidade nucleotídica foram verificados na população composta por animais coletados no Estado de Santa Catarina, onde o haplótipo 6, altamente diferenciado, foi amostrado.

O haplótipo 2 foi o mais freqüente e apresentado por todas as populações das Regiões Sudeste e Sul estudadas.

Os resultados do teste exato para diferenciação das populações (RAYMOND; ROUSSET, 1995), baseado na freqüência haplotípica entre as localidades, não revelaram heterogeneidade significativa na distribuição dos haplótipos ($p > 0,05$).

Não foram verificadas evidências de isolamento pela distância entre as regiões geográficas (teste de Mantel $p = 0,65$). Todavia, é preciso ressaltar que, dado o número de seqüências obtidas, provavelmente não houve a plena amostragem dos haplótipos em cada área de captura.

Os resultados da Análise Molecular de Variância (AMOVA) para todas as populações revelaram elevados valores: $\Phi_{ST} = 0,277$; $P < 0,001$ e dentro das populações: $\Phi_{SC} = 0,723$; $P < 0,001$, evidenciado que as populações estão estruturadas geneticamente e que a maior porcentagem de diversidade encontra-se dentro da população como um todo (72,3%). Os dados foram obtidos pelo agrupamento das populações como um único conjunto de dados (Tabela 50).

TABELA 50 – Análise da Variância Molecular (AMOVA) no conjunto de populações de *Octopus vulgaris*

Fonte da Variação	Componentes variantes	Porcentagem de variação (%)	
Entre as populações	1,508	27,715	$\Phi_{ST} = 0,277$
Dentro das populações	3,934	72,285	$1 - \Phi_{ST} = 0,723$
Total	5,442		

Baseado em 1000 permutações ($P < 0,001 \pm 0,000$)

Os valores de F_{ST} verificados (Tabela 51) indicam a presença de estruturação genética entre as populações estudadas (GROSBERG; CUNNINGHAM, 2001). O menor valor de F_{ST} (0,011) foi verificado entre os Estados de São Paulo e Paraná, enquanto, o maior valor (0,414) foi observado entre os Estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina. Valores de F_{ST} foram significativos ($p < 0,05$) para todas as comparações par a par entre populações indicando divergência genética.

TABELA 51 – Valores de F_{ST} entre as populações de *Octopus vulgaris* estudadas (acima da linha diagonal) e os valores das probabilidades (abaixo da linha diagonal)

	RJ	SP	PR	SC
Rio de Janeiro	-----	0,036	0,333	0,414
São Paulo	0,015	-----	0,011	0,271
Paraná	0,043	0,003	-----	0,081
Santa Catarina	0,056	0,059	0,021	-----

Baseado em 110 permutações, * $P < 0,05$

Os resultados obtidos com os dados moleculares permitem inferir sobre a existência de uma estruturação geográfica.

A diversidade haplotípica encontrada foi elevada em todas as populações estudadas, o que indica presença de fluxo gênico entre estas populações.

O modelo de isolamento-por-distância parece explicar a dinâmica das populações de *Octopus vulgaris*, embora nenhuma associação significativa entre a distância geográfica e a diferenciação genética tenha sido encontrada.

De um modo geral, as populações de *Octopus vulgaris* estudadas estão estruturadas geneticamente e diferenciam-se entre si, de modo que serão necessárias medidas de manejo específicas para estas localidades visando preservar o patrimônio genético dessas populações.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expansão e diversificação das atividades do homem na Terra tornaram importante e desejável a correta administração dos recursos naturais de nosso planeta. Entendem-se como recursos naturais todos os produtos utilizados pelo homem e por ele extraídos diretamente dos estoques naturais, sem intervenção direta em sua produção. Os recursos naturais vivos têm a capacidade de se reproduzirem. Dessa forma, se a atividade extrativa se mantiver dentro de certos limites, a parcela extraída será reposta por meio da reprodução e crescimento dos indivíduos restantes.

Nessa qualidade, as populações de organismos aquáticos são capazes de propiciar um rendimento sustentável, sendo o tamanho do estoque definido pelas condições ambientais, características biológicas da espécie, e intensidade de pesca.

A importância dos recursos vivos do mar advém não apenas de sua exploração com a finalidade de produção de alimentos, sob enfoque de recursos pesqueiros, mas também de sua biodiversidade, enquanto patrimônio genético, e como fonte potencial para utilização na biotecnologia (VPSRM, 1999).

Atualmente os recursos biológicos aquáticos representam fonte de alimento e emprego para diversas comunidades em todo o mundo. A manutenção dos estoques em níveis aceitáveis depende de várias ações, entre elas, a conservação dos ecossistemas aquáticos, o manejo sustentado dos estoques e a manutenção da variabilidade genética intrapopulacional e interpopulacional. A conservação da variabilidade genética das populações de organismos aquáticos é, portanto uma etapa fundamental para a manutenção da viabilidade destas populações em médio e longo prazo.

A necessidade de explorar os recursos pesqueiros tropicais e subtropicais impõe o desafio de se conhecer cientificamente essas comunidades de alta complexidade e diversidade, antes que o avanço tecnológico determine uma sobre-exploração aos recursos, na maioria das vezes, pouco conhecidos (CASTRO, 2000).

Ao considerar espécies diferentes, exploradas comercialmente, como se fossem apenas uma espécie corre-se um grande risco de se extinguir a espécie ecologicamente mais frágil. Se o controle de estoques pesqueiros depende muito da delimitação dos estoques, ele depende ainda mais da detecção de espécies crípticas, que podem ser vistas como um caso mais extremo de diferenciação populacional. A exemplo, no Brasil foi descoberto, por análises moleculares, que a espécie de camarão comercialmente mais importante da Costa Brasileira (*Penaeus subtilis*) é, na verdade, uma mistura de duas espécies diferentes (GUSMÃO et al., 2000).

Em seus estudos, Santos et al. (2003), trabalhando com populações de *Macrodon ancylodon* (pescada-gó) do Litoral do Brasil, sugerem que as populações já alcançaram uma fase de diferenciação genética suficiente para serem consideradas como espécies distintas. A evidência apresentada no trabalho indica que a taxonomia para o gênero *Macrodon* deve ser revisada, e que estratégias para administração e conservação destes recursos pesqueiros devem ser repensadas.

Portanto, definir a identidade dos estoques do polvo é de grande importância para o manejo da pesca deste importante recurso pesqueiro.

Dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (2005) apontam para uma produção Brasileira de 1518,0 toneladas de polvo obtidas da pesca extrativa marinha Brasileira, das quais 86,0% são provenientes das Regiões Sudeste e Sul, observando-se um claro exemplo da necessidade de dimensionar o tamanho dos estoques em exploração.

As pescarias de polvos têm atingido elevado valor comercial, principalmente na Europa e Ásia, e embora o esforço de pesca tenha se intensificado nos últimos anos, as capturas estão em declínio, havendo grande necessidade de suprir a demanda dos mercados consumidores (GLOBEFISH, 2006). Neste sentido, o Brasil se apresenta com grande potencial para preencher parte da demanda dos países consumidores.

Um dos objetivos deste estudo foi a avaliação filogenética dos estoques de *Octopus cf. vulgaris* das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul do litoral do Brasil a fim de se investigar a existência de espécies crípticas incorporadas ao complexo *Octopus cf. vulgaris*.

A árvore filogenética gerada pelo alinhamento das seqüências do gene mitocondrial COI revelou dois conjuntos principais, formando clados monofiléticos sustentados por *bootstraps* superiores a 93,0%. Um clado contendo os indivíduos provenientes das regiões Sudeste e Sul da Costa Brasileira, similares aos haplótipos de Portugal, que são taxonomicamente classificados como *Octopus vulgaris*, e outro conjunto formado pelos indivíduos coletados em várias localidades das regiões Norte e Nordeste da Costa Brasileira. A divergência nucleotídica entre os clados foi de 17,0%.

Este nível de diferenciação genética sugere a presença de duas espécies de *Octopus* que aparentemente não apresentam diferenças morfológicas, sendo o grupo Sudeste/Sul, o *Octopus vulgaris* verdadeiro e o grupo do Norte e Nordeste, uma outra espécie a ser classificada.

Estes resultados permitem inferir que estes dois grupos alcançaram um estágio de diferenciação genética suficiente para serem considerados como espécies distintas e não apenas como uma única espécie como são descritas tomando por base apenas características morfológicas e morfométricas.

No presente estudo objetivou-se também caracterizar a estruturação populacional do gênero *Octopus* nas regiões da Costa Brasileira onde as pressões de exploração são maiores.

Os dados obtidos com a utilização dos dois marcadores moleculares para a detecção da estruturação das populações de *Octopus sp* e *Octopus vulgaris* apontaram para a existência de relativa congruência entre as estimativas dos parâmetros populacionais, embora exista algumas discrepâncias, uma vez que os marcadores microssatélites não apontaram para a presença de uma espécie críptica entre as populações da Região Nordeste da Costa Brasileira, esta sim revelada pelos dados gerados pela Região A+T do DNA mitocondrial.

O maior número de alelos encontrados nas populações de *Octopus vulgaris* das Regiões Sudeste e Sul pode ser explicado também pelo fato de que os *loci* microssatélites utilizados neste estudo foram desenhados para esta espécie, possivelmente comprometendo a amplificação dos mesmos nas populações de *Octopus sp* capturadas na Região Nordeste.

Os dados gerados pelo estudo da Região Controle (A+T) apontaram para uma maior diversidade haplotípica nas populações de *Octopus* sp do que naquelas compostas por animais pertencentes à espécie *Octopus vulgaris*, tais resultados podem estar associados à presença de uma espécie críptica do gênero *Octopus* capturada no Estado do Rio Grande do Norte.

Neste estudo, a estruturação da variabilidade genética, visualizada pelos agrupamentos realizados, foi congruente nos dendogramas obtidos pelos diferentes marcadores. Todas as correlações matriciais encontradas entre distâncias genéticas e geográficas, obtidas com os dois marcadores foram significativas a 1,0%. O modelo de isolamento-por-distância parece explicar a dinâmica das populações dos *Octopus*, embora nenhuma associação significativa entre a distância geográfica e a diferenciação genética tenha sido encontrada.

A aparente limitação de dispersão larval entre as populações pode ser uma explicação para a diferenciação interpopulacional dos estoques.

Avise (1998) propõe um aspecto paradoxal para a explicação da variação genética de espécies que possuem sucesso reprodutivo, como é o caso do polvo. Este autor sugere o termo “chaotic patchiness” para fazer inferências sobre o aumento temporal e espacial da variabilidade genética intrapopulacional, ou seja, os dados obtidos no presente trabalho para o excesso de heterozigosidade nos seis *loci* microssatélites que acarretaram desvios das proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg, podem ser explicados pela presença temporal de representantes com elevada variabilidade genética individual.

Assim, trabalhos futuros sobre a dinâmica populacional dos estoques do polvo devem ser conduzidos por análises moleculares em escalas temporais proporcionais aos testes dos padrões genéticos das populações.

De acordo com Wright (1965), as populações de *Octopus* sp e de *O. vulgaris* apresentam de moderada a elevada estruturação genética, porém o esforço de pesca sobre a exploração das populações de *Octopus vulgaris* das regiões Sudeste e Sul da Costa Brasileira deve respeitar as diferenças genéticas populacionais, principalmente nos Estados de São Paulo e Paraná, onde as populações de polvo já apresentam sinais da presença de estoques depauperados pela ação antrópica.

Os dados apresentados neste trabalho sugerem que o status taxonômico do *Octopus* necessita de revisão e que o manejo deve ter como ponto de partida a diversidade genética intrapopulacional, sendo o conhecimento da estrutura genético-populacional da espécie um parâmetro importante para que os estoques presentes em uma mesma área, apresentando diferenças genéticas, como é o caso das populações das regiões Norte e Nordeste da Costa Brasileira, possam ser tratados como unidades diferentes em que a captura e esforços de pesca devam ser diferenciados.

REFERÊNCIAS

ABILA, R.; BARLUENGA, M.; ENGELKEN, J.; MEYER, A.; SALZBURGER, W. Population-structure and genetics diversity in a haplochromine fish cichlid of a satellite lake of Lake Victoria. **Molecular Ecology**, v.13, p. 2589-2602, 2004.

AQUADRO, C.F.; GREENBERG, B.D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. **Genetics**, v. 103, p. 287-312, 1983.

ALLENDORF, F.W.; UTTER, F.M. Population Genetics. In: HOAR, W.S.; RANDAL, D.J.; BRETT, J.R. (Ed). **Fish Physiology**. Washington: Academic Press, 1979.

ALLENDORF, F.W.; UTTER, F.M. Genetics and fishery management: past, present and future. In: RYMAN, N.; UTTER, F.M. (Ed.). **Population Genetics & Fishery Management**. Washington: University of Washington Press, 1987.

AMARATUNGA, R. Population biology. In: BOYLE, P. R. **Cephalopod Life Cycles**, Comparative Reviews. London: Academic Press, p. 239-252, 1987.

ANDERSON, R.C.; HUGHES, P.D.; MATHER, J.A.; STEELE, C.W. Determination of the diet of *Octopus rubescens* Berry, 1953 (Cephalopoda: Octopodidae), through examination of its beer bottle dens in Puget sound. **Malacologia**, v. 41, p. 455– 460, 1999.

ANDERSON, F.E. Phylogeny and historical biogeography of the loliginid squids (Mollusca:Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v.15, p. 191-214, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANDREU-MOLINER, E.S.; CACHAZA, A.N. Técnica para el mantenimiento de *Octopus vulgaris* en acuarios marinos con circulación cerrada de agua. Inf. Téc. **Instituto Español Oceanográfico**, v. 28, 11 p., 1984.

ANGERS, B.; BERNATCHEZ, L. Combined use of SMM and non- SMM methods to infer fine structure and evolutionary history of closely related brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidae) populations from microsatellites. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p. 143–159, 1998.

ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismo no DNA. In: MATIOLI, S.R. (Org). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

AUGUSTYN, C.J.; GRANT, W.S. Biochemical and morphological systematic of *Loligo vulgaris vulgaris* Lamarck and *Loligo vulgaris reynaudii* D'Orbigny Nov. Com. (Cephalopoda: Myopsida). **Malacologia**, v.29, p.215-233, 1988.

AVISE, J.C. Conservation Genetics in the Marine Realm. **The American Genetic Association**, v. 89, p. 377-382, 1998.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NIEGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraespecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.18, p.489-522, 1987.

BALGUERÍAS, E.; QUINTERO, M.E.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, C.L. The origin of the Saharan Bank cephalopod fishery. **ICES Journal Marine Science**, v.57, p. 15–23, 2000.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v.11, p.155-165, 2002.

BARÓN, P.J. **Evaluacion de las aguas costeras norte patagónicas, entre los 42° S y 44° S, como área reproductiva de calamares Loliginidos**. 164 f. Ph.D. Thesis. Universidad Nacional del Comahue, Argentina, 2001.

BARTLEY, D.M.; BENTLEY, B.; OLIN, P.G.; GAL, G.A.E. Population genetics structure of the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in California. **California Fish and Game**, v. 78, p. 88-104, 1992.

BASON, M.; BEDDINGTON, J.R.; CROMBIE, J.A.; HOLDEN, S.J.; PURCHASE, L.V.; TINGLEY, G.A. Assessment and management techniques for migratory annual squid stocks: the *Illex argentinus* fishery in the Southwest Atlantic as an example. **Fisheries Research**, v.28, p. 3-27, 1996.

BASTROP, R.; JÜRSS, K.; STURMBAUER, C. Cryptic Species in a Marine Polychaete and Their Independent Introduction from North America to Europe. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p. 97-103, 1998.

BEACHAM, T.D.; WITHLER, R.E.; GOULD, A.P. Biochemical genetic stock identification of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in southern British Columbia. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 42, p. 437-448, 1995.

BEDDINGTON, J.R.; ROSENBERG, A.A.; CROMBIE, J.A.; KIRKWOOD, G.P. Stock assessment and the provision of management advice for the short fin squid fishery in Falkland Islands waters. **Fisheries Research**, v.8, p.351-365, 1990.

BEGG, G.A.; FRIEDLAND, K.D.; PEARCE, J.B. Stock identification and its role in assessment and fisheries management: an overview. **Fisheries Research**, v. 43, p. 1-8, 1999.

BELKHIR, K. GENETIX, Logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, **Université de Montpellier II**, Montpellier (France), 2001.

- BLAXTER, M. L. The promise of a DNA taxonomy. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Science**, v. 359, p. 669-679, 2004.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.
- BOLD SYSTEMS. www.barcodeinlife.org. Acesso em 02 de julho de 2007.
- BONNAUD, L.; BOUCHER-RODONI, R.; MONNEROT, M. Phylogeny of cephalopods inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v.7, p. 44-54, 1997.
- BONNAUD, L.; BOUCHER-RODONI, R.; MONNEROT, M. Phylogeny of decapod cephalopods based on partial 16S rRNA nucleotide sequences. C.R. Acad. Sci. Paris, **Sciences de la vie/Life Sciences**, v.317, p. 581-588, 1994.
- BOORE, J.L.; COLLINS, T.M.; STANTON, D.; DAEHLER, L.L.; BROWN, W.M. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. **Nature**, v.376, p. 163-165, 1995.
- BOURKE, A.F.G.; GREEN, H.A.A.; BRUFORD, M.W. Parentage, reproductive skew and queen turnover in a multiple-queen ant analyzed with microsatellite. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 264, p. 277-283, 1997.
- BOYLE, P.R.; PIERCE, G.J. Fishery biology of northeast Atlantic squid: an overview. **Fisheries Research**, v. 21, p. 1-15, 1994.
- BOYLE, P.R. Home occupancy by male *Octopus vulgaris* in a large seawater tank. **Animals Behaviors**, v. 28, p. 1123– 1126, 1980.
- BRAVO DE LAGUNA, J. Managing an international multispecies fishery: the Saharan trawl fishery for cephalopods. In: CADDY, J.F. (Ed.) **Marine Invertebrate Fisheries. Their Assessment & Management**. New York: John Wiley & Sons Incorporation, 1989.

- BREY, T.; GAGE, J.D. Interactions of growth and mortality in benthic invertebrates populations: empirical evidence for a mortality-growth continuum. **Archive of Fishery and Marine Research**, v. 45, p. 45-49, 1997.
- BRIERLY, A.S.; THORPE, J.P.; PIERCE, G.J.; CLARKE, M.R.; BOYLE, P.R. Genetic variation in the neritic squid *Loligo forbesi* (Myopsida: Loliginadae) in the northeast Atlantic Ocean. **Marine Biology**, v.122, p. 79-86, 1995.
- BRIERLY, A.S.; RODHOUSE, P.G.; THORPE, J.P.; CLARKE, M.R. Genetic evidence of population heterogeneity and cryptic speciation in the ommastrephid squid *Martialia hyadesi* from the Patagonian shelf and Antarctic Polar Frontal Zone. **Marine Biology**, v. 116, p. 593-602, 1993.
- BROOKER, A.L.; BENZIE, J.A.H.; BLAIR, D.; VERSINI, J.J. Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers. **Marine Biology**, v.136, p.149–157, 2000.
- CABRANES, C.; FERNANDEZ-RUEDA, P.; MARTÍNEZ, J.L. Genetic structure of *Octopus vulgaris* around the Iberian Peninsula and Canary Islands as indicated by microsatellite DNA variation. **ICES Journal of Marine Science**, v. 65, p.12–16, 2007.
- CADDY, J.F. The cephalopods: factors relevant to their population dynamics and to the assessment and management of stocks. **FAO Fishery Technical Papers**, v. 231, 452 p., 1983.
- CADDY, J.F.; GULLAND, J.A. Historical patterns of fish stocks. **Marine Policy**, v.7, p. 267-278, 1983.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2006.

CARLTON, J.T.; GELLER, J.B. Ecological roulette - the global transport of no indigenous marine organisms. **Science**, v. 261, p. 78-82, 1993.

CARLINI, D.B.; YOUNG, R.E.; VECCHONET, M. A Molecular Phylogeny of the Octopoda (Mollusca: Cephalopoda) Evaluated in Light of Morphological Evidence **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.21, p. 388–397, 2001.

CARLINI, D.B.; REECE, K.S.; GRAVES, J.E. Actin gene family evolution and the phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda). **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 1353-1370, 2000.

CARLINI, D.B.; GRAVES, J. E. Phylogenetic analysis of cytochrome c oxidase I sequences to determine higher-level relationships within the coleoid cephalopods. **Bulletin of Marine Science**, v. 64, p. 57-76, 1999.

CARVALHO, D.; TORRES, G.A. **Marcadores Moleculares**. Lavras: UFLA, FAEPE, 2002.

CARVALLO, G.R.; THOMPSON, A.; STONER, A.L. Genetic diversity and population differentiation of the short fin squid *Illex argentinus* in the south-west Atlantic. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 158, p.105-121, 1992.

CARVALHO, G.R.; LONEY, K.H. Biochemical genetic studies on the Patagonian squid *Loligo gahi* d'Orbigny, I: electrophoresis survey of genetic variability. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 126, p.231–241, 1989.

CASTRO, P. M. G. **Estrutura e dinâmica da frota de paelhas do Estado de São Paulo e aspectos biológicos dos principais recursos pesqueiros demersais costeiros da região Sudeste/Sul do Brasil (23°S-29°S)**. 122 f. Tese (Doutorado em Oceanografia) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

- CASU, M.; MALTAGLIATI, F.; MELONI, M.; CASU, D.; COSSU, P.; BINELLI, G.; CURINI-GALLETI, M. Genetic structure of *O. vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) from the Mediterranean Sea as revealed by a microsatellite locus. **Italian Journal of Zoology**, v. 69, p. 295–300, 2002.
- CAVALLI-SFORZA, L.L.; EDWARDS, A.W.F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **Evolution**, v. 32, p. 550–570, 1967.
- CAVERIVIERE, A.; DOMAIN, F.; DIALLO, A. Observations on the influence of temperature on the length of embryonic development in *Octopus vulgaris* (Senegal). **Aquatic Living Research**, v. 12, p. 151–154, 1999.
- CAVERIVIERE, A. Étude de la pêche du poulpe (*Octopus vulgaris*) dans les eaux côtières de la Gambie et du Sénégal. L'explosion démographique de l'été 1986. **Rapport Centre de Recherches Océanographiques de Dakar-Thiaroye, Senegal**, 42 p., 1992.
- CHAKRABORTY, R.; LEIMAR, O. Genetic variation in subpopulations. In: RYMAN, U.; UTTER, F. (Ed.). **Population genetics and fishery management. Washington Sea Grant Program**. Seattle: University of Washington Press, 1987.
- CHRISTOFFERSON, J.P.; FOSS, A.; LAMBERT, W.E.; WELGE, B. An electrophoretic study of select proteins from the market squid, *Loligo opalescens* Berry. **Fisheries Bulletin**, Dublin, v. 169, p. 123–134, 1978.
- COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Estimation of gene flow from F-statistics. **Evolution**, v. 47, p. 855–863, 1993.
- COCKERHAM, C.C. Analyses of gene frequencies. **Genetics**, v. 74, p. 679–700, 1973.
- COCKERHAM, C.C. Variance of Gene Frequencies. **Evolution**, v. 23, p. 72–84, 1969.
- CODONCODE v.1.4.1. Corporation Software for DNA Sequencing, 2005.

- COLBOURNE, J.K.; NEFF, B.D.; WRIGHT, J.M.; GROSS, M.R. DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment of mating success. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 53, p. 342-349, 1996.
- CORNUET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 1996.
- COSTA, P.A.S.; HAIMOVICI, M. A pesca de polvos e lulas no litoral do Rio de Janeiro. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 42, p. 1124-1130, 1990.
- CUNHA, M.M.; PEREIRA, J.M.F. *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 from São Miguel (Azores) a biometrical approach. **Proceedings of the Second International Workshop of Malacology and Marine Ecology**. Açoreana (Supplement 1995). Sociedade de Estudos Açoreanos "Afonso Chaves", Azores, Portugal, p. 297-311, 1995.
- DAWSON, M.N.; JACOBS, D.K. Molecular Evidence for Cryptic Species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). **The Biological Bulletin**, v. 200, p. 92-96, 2001.
- DE GROOT, S.J. Edible species. In: RUITER, A. (Ed.). **Fish and Fishery Products: Composition, Nutritive Properties and Stability**. UK: CAB International, 1995.
- DE LOS ANGELES BARRIGA SOSA, I.; BECKENBACH, K.; HARTWICK, E.B.; SMITH, M.J. The molecular phylogeny of five eastern North Pacific octopus species. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 4, p. 163-174, 1995.
- DEFEO, O.; CASTILLA, J.C. Harvesting and economic patterns in the artesian *Octopus mimus* (Cephalopoda) fishery in a northern Chile cove. **Fisheries Research**, v. 38, p. 121-130, 1998.

DI RIENZO, A.; PETERSON, A.C.; GARZA, J.C.; VALDES, A.M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 91, p. 3166–3170, 1994.

DOWLING, T.E.; MORITZ, C.; PALMER, J.D.; RIESEBERG, L.M. Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996.

ESTOUP, A; JARNE, P.; CORNUET, J.M. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. **Molecular Ecology**, v.11, p. 1591-1604, 2002.

ESTOUP, A.; PRESSA, P.; KRIEG, F.; VAIMAN, D.; GUYOMARD, R. (CT)_n and (GT)_n microsatellites; a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). **Heredity**, v. 71, p. 488-496, 1993.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **ARLEQUIN version 3.01, An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis**, 2006.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, 2007.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p.783-791, 1985.

- FERGUSON, M.M.; DANZMANN, R.G. Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting? **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.55, p.1553-1563, 1998.
- FOGARTY, M.J. Forecasting yield and abundance of exploited invertebrates. In: CADDY, J.F. (Ed.). **Marine Invertebrate Fisheries. Their Assessment & Management**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1989. p. 701-725.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.A.; VRIJENHOEK, R.C. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, p. 294–299, 1994.
- FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Manejo de recursos genéticos em populações naturais. In: AGOSTINHO, A.A.; CECÍLIO, E.B. (Ed.), **Situação atual e perspectivas da Ictiologia no Brasil**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1992. p.58-67.
- FORSYTHE, J.W.; HANLON, R.T. Behavior, body patterning and reproductive biology of *Octopus bimaculoides* from California. **Malacologia**, v.29, p. 41-55, 1988.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- FU, Y-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v.147, p. 915–925, 1997.
- FUNK, D.J. Molecular systematics of cytochrome oxidase I and 16S from *Neochlamisus* leaf beetles and the importance of sampling. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p.67-82, 1999.
- GAFFNEY, P.M.; SCOTT, T.M.; KOEHN, R.K. E D.; DIEHL, W.J. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiency in the cool clam, *Mulinia lateralis*. **Genetics**, v.124, p. 687-699, 1990.

GAGGIOTTI, O.E.; LANGE, O.; RASSMANN, K.; GLIDDON, C.A. Comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1513–1520, 1999.

GARZA, J.C.; FREIMER, N.B. Homoplasmy for size at microsatellite loci in humans and chimpanzees. **Genome Research**, v.6, p.211–217, 1996.

GARZA, J.C.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B. Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, p. 594–603, 1995.

GILES, R.E.; BLANC, H.; CANN, H.M.; WALLACE, D.C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.77, p. 6715-6719, 1995.

GLOBEFISH (2006). Octopus Market Report – Junho de 2007. www.globefish.org

GOFF, D.J.; GALVIN, K.; KATZ, H.; WESTERFIELD, M.; LANDER, E.S.; TABIN, C.J. Identification of polymorphic simple sequence repeats in the genome of the zebrafish. **Genomics**, v.14, p. 200-202, 1992.

GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites**: evolution and applications. New York: Oxford University Press, 1999. 351 p.

GOODMAN, S.J. A collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data. **Molecular Ecology**, v.6, p.881-885, 1997.

GOUDET, J. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2)**. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995), 2002.

- GRANT, W.S.; TEEL, D.J.; KOBAYASHI, T. Biochemical population genetics of Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) comparison with Atlantic halibut (*H. hippoglossus*). **Canadian Journal of Fishery and Aquatic Science**, v.41, p.1083-1088, 1984.
- GREATOREX, E.C.; JONES, C.S.; MURPHY, J.; KEY, L.N.; EMERY, A.M.; BOYLE, P.R. Microsatellite markers for investigating population structure in *Octopus vulgaris* (Mollusca:Cephalopoda). **Molecular Ecology**, v.9, p.629-644, 2000.
- GROSBERG, R.; CUNNINGHAM, C.W. Genetic structure in the sea: from populations to communities. In: BERTNESS, M. D. (Ed.). **Marine community ecology**. Sunderland: Sinauer, 2001. p. 61-84.
- GUERRA, A.; CORTEZ, T.; ROCHA, F. Redescrición Del pulpo de los Changos, *Octopus mimus* Gould, 1852, Del litoral chileno-peruano (Mollusca, Cephalopoda). **Sociedade Española de Malacologia Iberus**, v.17, p. 37-57, 1999.
- GUERRA, A. Mollusca, Cephalopoda. In: Ramos, M. A. (Ed.) **Fauna Ibérica. Museo Nacional de Ciencias Naturales**. Madrid: CSIC, 1992.
- GUERRA, A.; MANRIQUEZ, M. Parâmetros biométricos de *Octopus vulgaris*. **Investigacion Pesquera**, v.44, p.177– 198, 1980.
- GUERRA, A. Fitting a von Bertalanffy expression to *Octopus vulgaris* growth. **Investigacion Pesquera**, v. 41, p. 319-326, 1979.
- GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, p.361-372, 1992.
- GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A.M. A new species of *Penaeus* (Crustacea-Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. **Marine Biology**, v.137, p.435-446, 2000.

- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAIMOVICI, M.; ANDRIGUETTO FILHO, J.M. Cefalópodes costeiros capturados na pesca de arrasto do litoral sul do Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.29, p.473-495, 1986.
- HALLERMAN, E.M.; BECKMANN, J.S. DNA-Level polymorphism as a tool in fisheries science. **Canadian Journal of Fishery and Aquatic Sciences**, v. 45, p.1075-1087, 1988.
- HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.79, p. 6465-6469, 1982.
- HANLON, R.T.; MESSENGER, J.B. **Cephalapodes Behaviour**. Great britan, Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of Population Genetics**. Sunderland: Sinauer, 1997.
- HATANAKA, H. Studies on the fisheries biology of common octopus off northwestern coast of Africa. **Bulletin Far Seas Fisheries Research Laboratory**, v. 17, p.13-124, 1979.
- HEBERT, P.D.N.; STOECKLE, M.Y.; ZEMLAK, T.S.; FRANCIS, C. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**, v.10, p. 1657– 1663, 2004a.
- HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN, D.H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 101, p. 14812–14817, 2004b.

HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S.; WAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 270, p. 596-599, 2003a.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; WAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 270, p. 313–321, 2003b.

HEDRICK, P.W. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, v. 53, p. 313–318, 1999.

HERNÁNDEZ-GARCIA, V.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.L.; CASTRO-HDEZ, J.J. On the reproduction of *Octopus vulgaris* of the coast of the Canary Islands. **Fisheries Research**, v. 57, p. 197–203, 2002.

HERNÁNDEZ-GARCIA, V.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.L.; CASTRO, J.J. The octopus (*Octopus vulgaris*) in the small-scale trap fishery off the Canary Islands (Central-East Atlantic). **Fisheries Research**, v. 35, p.183-189, 1998.

HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular Systematic**. Massachusetts: Sinauer, 1996.

HOSHINO, A.A.; PALMIERI, D.A.; BRAVO, J.P.; PEREIRA, T.E.B.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Marcador Microssatélite na Conservação de Germoplasma Vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.146-150, 2002.

IBAMA. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Diretoria de Fauna e Recursos Pesqueiros-DIFAP. Estatística da Pesca 2004. **Grandes Regiões e Unidades da Federação**. Brasília: Coordenação Geral de Gestão de Recursos Pesqueiros, 2005.

ICES. Report of the Working Group on Cephalopod Fisheries and Life History (WGCEPH), By correspondence, ICES CM 2005/G:14. 59 p., 2005.

IGLESIAS, J.; SÁNCHEZ, F.J.; OTERO, J.J.; MOXICA, C. Culture of octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier): present knowledge, problems and perspectives. Recent advances in Mediterranean Aquaculture Finfish Species Diversification. **Cahiers Options Méditerranéennes**, v. 47, p. 313– 322, 2000.

IHESSEN, P. E.; BOOKE, H.E.; CASSELMAN, J.M.; McGLADE, J.M.; PAYNE, N.R.; UTTER, F.M. Stock identification: material and methods. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 38, p. 1838-1855, 1981.

IMSIRIDOU, A.; APOSTOLISDIS, A. P.; DURAND, J.D.; BRIOLAY, J.; BOUVET Y.; TRIANTAPHYLIDIS, C. Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek Chub *Leuciscus cephalus* L. (pisces, Cyprinidae) populations as revealed by RFLP analysis of mitochondrial DNA. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 415-429, 1998.

ISLER, M.L.; ISLER, P.R.; WHITNEY, B.M. Use of vocalizations to establish species limits in antbirds (Passeriformes:Thamnophilidae). **Auk**, v. 115, p. 577–590, 1998.

JACOB, H.J.; LINDPAINTNER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, Y.P.; GANTEN, D.; DZAU, V.J.; LANDER, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, v.67, p. 213-224, 1991.

JAMESON, D.; GIBSON, A.P.; HUDELOT, C.; HIGGS, P.G. ORGe: a relational database for comparative analysis of mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 202-206, 2003.

JARNE, P. Selfing rates, bottlenecks and genetic polymorphism in hermaphroditic animals. **Genetic Research**, v. 65, p. 193-207, 1996.

JUAN, C.; OROMI, P.; HEWITT, G.M. Mitochondrial DNA phylogeny and sequential colonization of Canary Islands by darkling beetles of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae). **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 261, p. 173-180, 1995.

- KALINOWSKI, S.T. HW-QUICKCHECK: an easy-to-use computer program for checking genotypes for agreement with Hardy–Weinberg expectations. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p. 974–979, 2006.
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. **Conservation Genetics**, v.7, p. 991-995, 2006.
- KATSANEVAKIS, S.; VERRIOPOULOS, G. Abundance of *Octopus vulgaris* on soft sediment. **Scientia Marina**, v. 68, p. 553–560, 2004.
- KATSAROU, E.; NAEVDAL, G. Population genetics of the rough head grenadier, *Macrourus berglax* L., in the North Atlantic Ocean. **Fisheries Research**, v. 51, p. 207-215, 2001.
- KELLOGG, K.A.; MARKERT, J.A.; STAUFER, J.R.; KOCHER, T.D. Microsatellite variation demonstrates multiple paternity in lekking cichlid fishes from Lake Malawi, Africa. **Proceedings of Royal Society of London B.**, v. 260, p. 79-84, 1995.
- KNAPIK, E.W.; GOODMAN, A.; EKKER, M. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). **Nature Genetics**, v.18, p. 338-343, 1998.
- KNOWLTON, N.; KELLER, B.D. Larvae which fall far short of their potential - Highly localized recruitment in an aphid shrimp with extended larval development. **Bulletin Marine Science**, v. 39, p. 213-223, 1986.
- KUMPF, H.E.; VAUGHT, R.N.; GRIMES, C. B.; JOHNSON, A. G.; NAKAMURA, E. L. Proceedings of the stock identification workshop. **NOAANMFS-SEFC**, 199. Seattle: US Dep. Commerce, 1987.
- LANNAN, J.E.; GALL, G.A.E.; THORPE, J.E; NASH, C.E.; NAKAMURA, E.L. Genetic resource management of fish. **Genome**, v. 31, 798-804, 1987.
- LEE, W.J.; KOCHER, T.D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, v. 49, p. 169-171, 1996.

- LEITE, T.S.; HAIMOVICI, M.; MOLINA, W.; WARNKE, K. Morphological and genetic description of *Octopus insularis*, a new cryptic species in the *Octopus vulgaris* complex (CEPHALOPODA: OCTOPODIDAE) from the tropical Southwestern Atlantic. **Journal of Molluscan Studies**, v.74, p. 63–74, 2008.
- LEWONTIN, R.C.; COCHERHAM, C.C. The goodness-of-fit test for detecting natural selection in random mating populations. **Evolution**, v.13, p. 561-564, 1959.
- LI, C.C. Pseudo-random mating populations. In celebration of the 80th anniversary of the Hardy-Weinberg law. **Genetics**, v. 119, p. 735-737, 1988.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetic**, v. 44, p. 398-401, 1989.
- LIU, Z.J.; CORDES, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, p. 1-37, 2004.
- LÓPEZ-LEGENTIL, S.; TURON, X.; PLANES, S. Genetic structure of the star sea squirt, *Botryllus schlosseri* introduced in southern European harbours. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 3957-3967, 2006.
- MACFADDEN, C.S.; AYDIN, K.Y. Spatial autocorrelation analysis of small-scale genetic structure in a clonal soft coral with limited larval dispersal. **Marine Biology**, v. 126, p. 215-224, 1996.
- MALDONADO, M.; URIZ, M.J. Sexual propagation by sponge fragments. **Nature**, v. 398, p.476-476, 1999.
- MALTAGLIATI, F.; BELCARI, P.; CAU, D.; CASU, M.; SARTOR, P.; VARGIU, G.; CASTELLI, A. Allozyme genetic variability and gene flow in *O. vulgaris* (Cephalopoda, Octopodidae) from the Mediterranean Sea. **Bulletin of Marine Science**, v. 71, p.473-486, 2002.

MANGOLD, K. The Octopodinae from the Eastern Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. In: VOSS, N.A.; VECCHIONE, M.; TOLL, R.B. **Systematic and Biogeography of Cephalopods**. Washington, DC: Smithsonian Contributions to Zoology. 1998. v. II, p. 521-528.

MANGOLD, K. *Octopus vulgaris*: Review of the Biology. IN: LANG, M.A.; HOCHBERG, F.G.; AMBROSE, R.A.; ENGLE, J.M. (Ed.). **Proceedings of the Workshop on the Fishery and Market Potential of Octopus in California**. Washington, DC: Smithsonian Institution, 1997. p. 34-39.

MANGOLD, K.; HOCHBERG, F.G. Defining the genus *Octopus*: redescription of *Octopus vulgaris*. **Bulletin Marine Science**, v. 49, p. 665, 1991.

MANGOLD, K. Reproduction. In: BOYLE, P.R. (Ed.). **Cephalopod Life Cycles: Comparative Reviews**. Londres: Academic Press, 1986. v. II, p. 157-200.

MANGOLD, K. *Octopus vulgaris*. In: **Cephalopod Life Cycles**. New York: Academic Press, 1983. p.335–364.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220, 1967.

MATALA, A.P.; GRAY, A.K.; HEIFETZ, J.; GHARRETT, A.J. Population structure of Alaska shorttraker rockfish, *Sebastes borealis*, inferred from microsatellite variation. **Environmental Biology of Fisheries**, v.69, p. 201-210, 2004.

MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R.S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 153-161, 2001.

MAY, B.; KRUEGER, C.C. Use of allozyme for population analysis. In: Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management. **WHITMORE**, p.157-171, 1990.

MICHALAKIS, Y.; EXCOFFIER, L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special interest to microsatellite loci. **Genetics**, v. 142, p. 1061–1064, 1996.

MILLER, M.P. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A Windows programs for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, 1999.

MOREIRA, A.A. **Variabilidade Genética e Desempenho de Duas Variedades de *Oreochromis niloticus* (Red-Stirling e Chitralada) e de seu Híbrido Intraespecífico**. 157 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Núcleo de Ciências Ambientais, Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, 2003.

MURPHY, J.M.; BALGUERÍAS, E.; KEY, L.N.; BOYLE, P.R. Microsatellite DNA markers discriminate between two *Octopus vulgaris* (Cephalopoda:Octopoda) fisheries along the northwest African coast. **Bulletin of Marine Science**, v.71, p. 545-553, 2002.

NAISH, K.A.; SKIBINSKI, D.O.F. Tetranucleotide microsatellite loci for Indian major carp. **Journal of Fish Biology**, v. 53, p. 886-889, 1998.

NAUTA, M.J.; WEISSING, F.J. Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. **Genetics**, v. 143, p. 1021–1032, 1996.

NEI, M. Genetic Distanced between populations. **American Naturalist**, v.106, p. 283-292. 1972.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.70, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annual of human genetics**, v. 41, p. 225-233. 1977.

- NEI M, Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p.583-590, 1978.
- NEI, M.; CHESSER, R.K. Estimation of fixation indices and gene diversities. **Annals of Human Genetics**, v. 47, p.253-259, 1983.
- NEIGEL, J.E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review Ecology Systematics**, v. 28, p. 105-128, 1997.
- NIXON, M. Changes in body weight and intake of food by *Octopus vulgaris*. **Journal of Zoology**, v.150, p. 1– 9, 1966.
- NIXON, M. Some parameters of growth in *Octopus vulgaris*. **Journal of Zoology**, v.163, p. 277– 284, 1970.
- NORMAN, J.; MURPHY, J.M.; PIERCE, G.; BOYLE P.R. Preliminary molecular genetic analysis of stock structure in the squid *Loligo forbesi* (Steenstrup). **ICES Shellfish Committee**, v. 23, p. 8, 1994.
- O'CONNELL, M.; WRIGHT, J.M. Microsatellite DNA in fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.7, p. 331-363, 1997.
- O'SHEA, S. **The Marine Fauna of New Zealand: Octopoda** (Mollusca: Cephalopoda). New Zealand: NIWA Biodiversity Memoir, 1999.
- PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of populations structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v. 4, p. 347-354, 1995.
- PALUMBI, S.R. Macrospatial genetic structure and speciation in marine taxa with high dispersal abilities. In: FERRARIS, J.D.; PALUMBI, S.R. (Ed.). **Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols**. New York : Wiley-Liss, 1996. p. 101-117.

PALUMBI, S. R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 25, p. 547-572, 1994.

PEMBERTON, J.M.; SLATE, J.; BANCROFT, D.R.; BARRETT, J.A. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. **Molecular Ecology**, v.4, p. 249-252, 1995.

PEREIRO, J.A.; BRAVO DE LAGUNA, J. Dinamica de la población y evaluación de los recursos del pulpo del Atlantico Centro Oriental. **Boletin Instituto Español de Oceanografia**, v. 275, p. 71-105, 1979.

PEREZ-LOSADA, M.; GUERRA, A.; CARVALHO, G. R.; SANJUAN, A.; SHAW, P.W. Extensive population subdivision of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) around the Iberian Peninsula indicated by microsatellite DNA variation. **Heredity**, v. 89, p. 417–424, 2002.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAM, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v.1, p. 215-222, 1996.

QUELLER, D.C.; STRASSMANN, J.E.; HUGHES, C.R. Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology Evolution**, v. 8, p. 285-288, 1993.

QUETGLAS, A.; ALEMANY, F.; CARBONELL, A.; MERELLA, P., SÁNCHEZ, P. Biology and fishery of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, caught by trawlers in Mallorca (Balearic Sea, Western Mediterranean). **Fisheries Research**, v. 36, p. 237-249, 1998.

QUETGLAS, A.; CARBONELL, A.; SÁNCHEZ, P. Demersal Continental Shelf and Upper Slope Cephalopod Assemblages from the Balearic Sea (North-Western Mediterranean). Biological Aspects of Some Deep-Sea Species. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 50, p. 739–749, 2000.

RAUFASTE, N.; BONHOMME, F. Properties of bias and variance of two multiallelic estimators of Fst. **Theoretical Population Biology**, v. 26, p. 129-136, 2000.

- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop (Version 12): Population genetics software for exact tests and ecumenism. **Journal of Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.
- REICHOW, D.; SMITH, M.J. Microsatellites reveal high levels of gene flow among populations of the California squid *Loligo opalescens*. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1101–1109, 2001.
- REICHOW, D.; SMITH, M.J. Highly Variable Microsatellites in the California Market Squid *Loligo opalescens*. **Marine Biotechnology**, v.1, p. 403–406, 1999.
- REILLY, A.; ELLIOT, N.E.; GREWE, P.M.; CLABBY, C. POWELL, R.; WARD, R.D. Genetic differentiation between Tasmanian culture Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their ancestral Canadian population: comparison of microsatellite and allozyme and mitochondrial DNA variation. **Aquaculture**, v.173, p. 459-469, 1999.
- REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, p. 381-388, 1997.
- REYNOLDS, J.; WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. **Genetics**, v.105, p.767-779, 1983.
- RICO, C.; RICO, I.; HEWITT, G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 263, p. 549-557, 1996.
- RIOS, E.C. **Seashells of Brazil**. Rio Grande do Sul: Ed. da FURG, 1994. 338 p.
- ROBERTSON, A.; HILL, W.G. Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. **Genetics**, v. 107, p. 703-718, 1984.

- RODRÍGUEZ-RÚA, A.; POZUELO, I.; PRADO, M.A.; GÓMEZ, M.J.; BRUZÓN, M.A. The gametogenic cycle of *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) as observed on the Atlantic coast of Andalusia (South Spain). **Marine Biology**, v. 147, p. 927–933, 2005.
- ROPER, C.; SWEENEY, M.; NAUEN, C. FAO species catalogue. Cephalopods of the world an annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. **FAO Species Catalogue**, v. 3, 277 p, 1984.
- ROPER, C.F.E.; HOCHBERG, F.G. Behavior and systematic of cephalopods from Lizard Island, Australia, based on color and body patterns. **Malacologia**, v.29, p.153-193, 1988.
- ROUSSET, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics Under Isolation by Distance. **Genetics**, v. 145, p. 1219-1228, 1997.
- ROUSSET, F. Equilibrium values of measure of population subdivision for stepwise mutation processes. **Genetics**, v. 142, p. 1357–1362, 1996.
- ROUSSET, F.; RAYMOND, M. Testing heterozygote excess and deficiency. **Genetics**, v. 140, p.1413-1419, 1995.
- ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, p. 2496-2497, 2003.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SALGUEIRO, P.; CARVALHO, G.; COLLAES-PEREIRA, M.J.; COELHO, M.M. Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered cyprinid *Anaocypris hispanica* in Portugal: implications for conservation. **Biological Conservation**, v.109, p. 47-56, 2003.

- SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.151-161, 2003.
- SÁNCHEZ, P.; OBARTI, R. The biology and fishery of *Octopus vulgaris* caught with clay pots on the Spanish Mediterranean coast. **Recent Advances in Fisheries Biology**, p. 477-487, 1993.
- SCHELTEMA, R.S. On dispersal and planktonic larvae of benthic invertebrates - An eclectic overview and summary of problems. **Bulletin of Marine Science**, v. 39, p. 290-322, 1986.
- SCHLÖTTERER, C.; WIEHE, T. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites: Evolution and Applications**. New York: Oxford University Press, 1999.
- SCHLÖTTERER, C.; PEMBERTON, J. The use of microsatellite for genetic analysis of natural populations – a critical review. In: DESALE, R.; SCHIERWATER, B. (Ed.). **Molecular Approaches to Ecology and Evolution**. Birkhäuser: Verlag Basel, 1998. p. 71-86.
- SCHUG, M.D.; MACKEY, T.F.C.; AQUADRO, C.F. Low mutation rates of microsatellite *loci* in *Drosophila melanogaster*. **Nature Genetics**, v. 15, p. 99-102, 1997.
- SCHULER, G.P.; BOGUSKI, M.S.; STEWART, E.A. A gene map of the human genome. **Science**, v. 274, p. 540-546, 1996.
- SEMMENS, J. M.; PECL, G. T.; VILLANUEVA, R.; JOUFFRE, D.; SOBRINO, I.; WOOD, J. B.; RIGBY, P. R. Understanding octopus growth: patterns, variability and physiology. **Marine and Freshwater Research**, v. 55, p. 367-377, 2004.

SHAKLEE, J.B.; BEACHAM, T.D.; SEEB, L.; WHITE, B.A. Managing fisheries using genetic data: case studies from four species of Pacific salmon. **Fisheries Research**, v. 43, p.45-78, 1999.

SHAW, P.W. Past, Present and Future Applications of DNA-Based Markers in Cephalopod Biology: Workshop Report. **Bulletin of Marine Science**, v. 71, p. 67-78, 2002.

SHAW, P.W.; PEREZ-LOSADA, M. Polymorphic microsatellites in the common cuttlefish *Sepia officinalis* (Cephalopoda). **Molecular Ecology**, v. 9, p. 237-238, 2000.

SHAW, P.W.; TURAN, C.; WRIGHT, J.M.; O'CONNELL, M.; CARVALHO, G.R. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*) with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analysis. **Heredity**, v. 83, p. 490-499, 1999a.

SHAW, P.W.; PIERCE, G.J.; BOYLE, P.R. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. **Molecular Ecology**, v.8, p. 407-417, 1999b.

SHAW, P.W. Polymorphic microsatellite markers in a cephalopod: the veined squid *Loligo forbesi*. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 297-298, 1997.

SHAW, P.W.; BOYLE, P.R. Multiple paternity within the brood of single females of *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae), demonstrated with microsatellite DNA markers. **Marine Ecology Progress Series**, v. 160, p. 279-282, 1997.

SILVESTRE, D. **Seqüenciamento e análise do genoma mitochondrial de *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. São Paulo. 119 f., Dissertação (Mestrado em Biologia/Genética) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

- SIMMONS, R.B.; SCHEFFER, S.J. Evidence of Cryptic Species Within the Pest *Capitarsia decolora* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). **Annual Entomology Society American**, v. 97, p. 675-680, 2004.
- SKIBINSKI, D.O.F. The potential of DNA techniques in the population and evolutionary genetics of aquatic invertebrates. In: BEAUMONT, A.R. (Ed.). **Genetics and Evolution of Aquatic Organisms**. London: Chapman and Hall, 1994. p. 177-199.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v.139, p.457-462, 1995.
- SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, v.39, p. 53-65, 1985.
- SLATKIN, M. Estimating level of gene flow in natural population. **Genetics**, v. 99, p. 323-335, 1981.
- SMALE, M.J.; BUCHAN, P.R. Biology of *Octopus vulgaris* off east coast of South Africa. **Marine Biology**, v. 65, p. 1-12, 1981.
- SMITH, P.J.; ROBERTSON, S.G.; HORN, P.L.; BULL, B.; ANDERSON, O.F.; STANTON, B.R.; OKE, C.S. Multiple techniques for determining stock relationships between orange roychy, *Hoplostethus atlanticus*, fisheries in the eastern Tasman Sea. **Fisheries Research**, v. 58, p.119-140, 2002.
- SMITH, G.P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science**, v. 191, p. 528-535, 1976.
- SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. São Paulo: Holos, 2004. 202 p.

- SÖLLER, R.; WARNKE, K.; SAINT-PAUL, U.; BLOHM, D. Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae). **Marine Biology**, v. 136, p. 29-35, 2000.
- SPRUELL, P.; HEMMINGSEN, A.R.; HOWELL, P.J.; KANDAL, N.; ALLENDORF, F.W. Conservation genetics of bull trout: geographic distribution of variation at microsatellite *loci*. **Conservation Genetics**, v.4, p. 17-29, 2003.
- STALLING, R.L.; FORD, A.F.; NELSON, D.; TORNEY, D.C.; HILDEBRAND, C.E.; MOYZIS, R.K. Evolution and distribution of (GTR)_n repetitive sequences in mammalian genomes. **Genomics**, v. 10, p. 897-915, 1991.
- STOCS, A. Stock concept international symposium. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 38, p. 1457-921, 1981.
- STRANKS, T.N. Biogeography of the *Octopus* species (Cephalopoda: Octopodidae) from southeastern Australia. **American Malacological Bulletin**, v.12, p. 145-151, 1996.
- STRATHMANN, R.R. Feeding and nonfeeding larval development and life-history evolution in marine invertebrates. **Annual Review of Ecology Systematics**, v.16, p. 339-361, 1985.
- STRUGNELL, J.; NORMAN, M.; JACKSON, J.; DRUMMOND, A.J.; COOPER, A. Molecular phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) using a multigene approach; the effect of data partitioning on resolving phylogenies in a Bayesian framework. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, p. 1-16, 2005.
- SWEENEY, M.J.; ROPER, C.F.E. Classification, type localities and type repositories of recent cephalopoda. In: VOSS, N.A.; VECCHIONE, M.; TOLL, R.B. **Systematic and Biogeography of Cephalopods**. Washington, DC: Smithsonian Contributions to Zoology, 1998. v. II, p.561-582.

TAJIMA, F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, v. 105, p. 437-460, 1983.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p.1596-1599, 2007.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512–526, 1993.

TANAKA, J. On the stock of *Octopus vulgaris* Lamarck, on the east coast of Boso Peninsula, Japan. **Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography**, v. 24, p. 601-607, 1958.

TAUTZ, D. Hyper variability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v.17, p. 6463-6471, 1989.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v.12, p.4127-4138, 1984.

TAYLOR, M.I.; VERHEYEN, E. Microsatellite data reveals weak population on sub structuring in *Copa dichromis* sp., a demersal cichlid from lake Malawi, Africa. **Journal of Fish Biology**, v. 59, p. 593-604, 2001.

TEMPLETON, A.R. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. **Molecular Ecology**, v.10, p.779-791, 2001.

TESKE, P.R.; OOSTHUIZEN, A.; PAPADOPOULOS, I.; BARKER, N.P. Phylogeographic structure of *Octopus vulgaris* in South Africa revisited: identification of a second lineage near Durban harbour. **Journal of Molluscan Studies**, v. 73, p.223-228, 2007.

TOLL, R.B. A reaffirmation of the nomenclatural status of *Octopus hummelinck* Adam, 1936. **Nautilus**, v.104, p.26-28, 1990.

TOMÁS, A.R.G. **Dinâmica Populacional e Avaliação de Estoques do Polvo comum *Octopus* cf. *vulgaris* Cuvier,1797 (Mollusca, Cephalopoda, Octopodidae) no Sudeste-Sul do Brasil**. 464 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, São Paulo, 2002.

VILLANUEVA, R.; SÁNCHEZ, P.; ROELEVELD, M. *Octopus magnificus* (Cephalopoda: Octopodidae) a new species of large octopod from the southeastern Atlantic. **Bulletin of Marine Science**, v. 49, p.39-56, 1991.

VILLANUEVA, R.; NOZAI, C.; BOLETZKY, S. Swimming behavior and food searching in planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, p 169-184. 208p, 1996.

VOIGHT, J.R. An overview of shallow- water octopus biogeography. In: VOSS, NA; VECCHIONE, M.; TOLL, R.B. **Systematic and Biogeography of Cephalopods**. Washington, DC: Smithsonian Contributions to Zoology, 1998. v. II, p. 549-559.

VOIGHT, J. R. Cladistic analysis of the octopods based on anatomical characters. **Journal of Molluscan Studies**, v. 63, p.311–325, 1997.

VOIGHT, J.R. Morphological variation in shallow-water octopuses (Mollusca: Cephalopoda). **Journal of Zoology**, London, v.232, p.491-504, 1994.

VOIGHT, J.R. The association between distribution and octopodid morphology: implications for classification. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.108, p.209-223, 1993a.

VOIGHT, J.R. A cladistic reassessment of octopodid classification. **Malacologia**, v. 35, p.343–349, 1993b.

- VOIGHT, J.R. Morphological variation in octopod specimens: reassessing the assumption of preservation-induced deformation. **Malacologia**, v.33, p.241-253, 1991.
- VOSS, G.L.; TOLL, R.B. The Systematics and Nomenclatural Status of the Octopodinae Described from Western Atlantic Ocean. In: VOSS, N.A.; VECCHIONE, M.; TOLL, R.B. **Systematic and Biogeography of Cephalopods**, Washington, DC: Smithsonian Contributions to Zoology, 1998. v. II, p. 457-474.
- VOSS, G.L. *Octopus defillipi* Verany, 1851, an addition to the cephalopod fauna of the Western Atlantic. **Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean**, v.14, p.554-560, 1964.
- VPSRM. **V Plano Setorial para os Recursos do Mar (1999 - 2003)**. Brasília: Comissão Interministerial para os Recursos do Mar, 1999.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p. 1-16, 2002.
- ZHANG, D.; LIN, K.; HANSKI, I. Coexistence of cryptic species. **Ecology Letters**, v. 7, p. 165-169, 2004.
- ZOUROS, E.; FREEMAN, K.R.; BALL, A.O.; POGSON, G.H. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. **Nature**, v.359, p. 412-414, 1992.
- WALDMAN, J.R. The importance of comparative studies in stock analysis. **Fisheries Research**, v.43, p. 237-246, 1999.
- WARD, R.D.; WOODWARK, M.; SKIBINSKI, D.O.F. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 44, p. 213-232, 1994.

- WARNKE, K.; SÖLLER, R.; BLOHM, D.; SAINT-PAUL, U. A new look at geographic and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda): indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 42, p.306–312, 2004.
- WARNKE, K.; SÖLLER, R.; BLOHM, D.; SAINT-PAUL, U. Rapid differentiation between *Octopus vulgaris* Cuvier (1797) and *Octopus mimus* Gould (1852), using randomly amplified DNA. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.38, p. 119-122, 2000.
- WARNKE, K. **Diversität des Artenkomplexes *Octopus cf vulgaris* Cuvier, 1797 in beziehung zu seiner Verbreitung an der Ost- und Westküstes Lateinamerikas**. 141f. Ph.D. Thesis - Universität Bremen, Shaker Verlag, Aachen, 1999.
- WEBER, J.L.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p. 388-396, 1989.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer, 1996.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis**. Sunderland: Sinauer, 1990.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p.1358-1370. 1984.
- WENBURG, J.K.; BENTZEN, P.; FOOTE, C.J. Microsatellite analysis of genetic population structure in an endangered salmonid: the coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*). **Molecular Ecology**, v. 7, p. 733–749, 1998.
- WHITAKER, D.J.; DELANCEY, L.B.; JENKIS, J.E. Aspects of the biology and fishery potential for *Octopus vulgaris* off the coast of South Carolina. **Bulletin of Marine Science**, v.49, p. 482-493, 1991.

WILSON, A.C.; CANN, R.L.; GEORG, M.; GYLLENSTEN, U.B.; HELMBYCHOWSKI, K.M.; HIGUSHI, R.G.; PALUMBIE, M.; SAGE, R.D.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.26, p. 375-400, 1985.

WINNEPENNINCKX, B.; BACKELJAU, T.; DE WACHTER, R. Extraction of high weight DNA from mollusks. **TIG**, v.12, p. 407, 1993.

WOLSTENHOLME, D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. In: WOLSTENHOLME, D.R.; JEON, K.W. **Mitochondrial genomes**. San Diego: Academic Press, 1992.

WRIGHT, S. **Evolution and Genetics of Populations, Variability within and Among Natural Populations**. Chicago: The University of Chicago Press, 1978.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: The theory of gene frequencies**. Chicago: University of Chicago Press, 1969.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, p. 395-420, 1965.

WRIGHT, S. The genetically structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.

YEATMAN, J.; BENZIE, J.A.H. Genetic structure and distribution of *Pliotololigo* spp. in Australia. **Marine Biology**, v. 118, p. 79-87, 1994.

YOKOBORI, S.; FUKUDA, N.; NAKAMURA, M.; AOYAMA, T.; OSHIMA, T. Long-Term Conservation of Six Duplicated Structural Genes in Cephalopod Mitochondrial Genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, p. 2034-2046, 2004.

YOUNG, R. E.; VECCHIONE, M. Analysis of morphology to determine primary sister taxon relationships within coleoid cephalopods. **Bulletin of the American Malacological Union Incorporated**, v. 12, p.91-112, 1996.