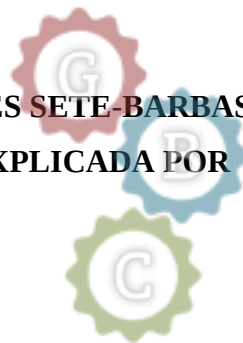
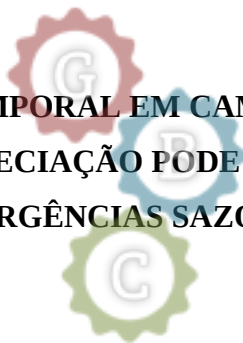
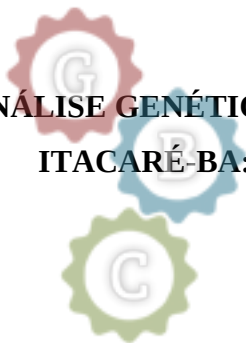




Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

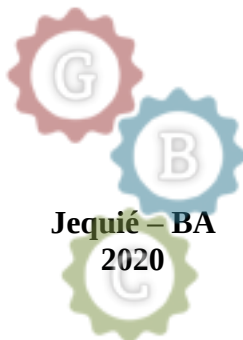
ANÁLISE GENÉTICA TEMPORAL EM CAMARÕES SETE-BARBAS DE ITACARÉ-BA: A ESPECIAÇÃO PODE SER EXPLICADA POR DIVERGÊNCIAS SAZONAIS?



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

SOMIRA SANTANA DE SOUZA



Jequié – BA
2020

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



SOMIRA SANTANA DE SOUZA

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**ANÁLISE GENÉTICA TEMPORAL EM CAMARÕES SETE-BARBAS DE
ITACARÉ-BA: A ESPECIAÇÃO PODE SER EXPLICADA POR
DIVERGÊNCIAS SAZONAIS?**



Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do Título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Cervini
Co-orientador(a): Prof.^a Dr.^a Ana Karina de Francisco

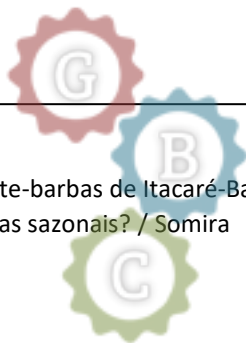
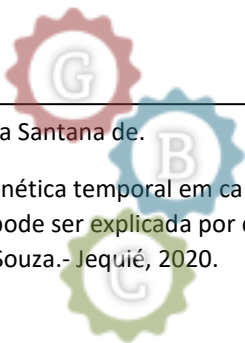
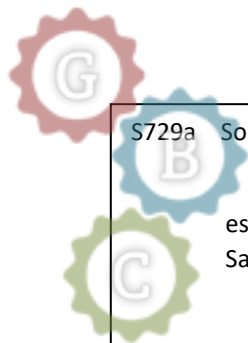


**Jequié - BA
2020**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



S729a Souza, Somira Santana de.

Análise genética temporal em camarões sete-barbas de Itacaré-Ba: a especiação pode ser explicada por divergências sazonais? / Somira Santana de Souza.- Jequié, 2020.

70f.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Cervini e coorientação da Prof.^a Dr.^a Ana Karina de Francisco)

1.Ciclo Reprodutivo 2.Conservação 3.Biodiversidade 4.Sazonalidade
I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 617.7

Rafaella Cândia Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB – Jequié



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “ANÁLISE GENÉTICA TEMPORAL EM CAMARÕES SETE-BARBAS DE ITACARÉ-BA: A ESPECIAÇÃO PODE SER EXPLICADA POR DIVERGÊNCIAS SAZONAIS?”.

Autor (a): Somira Santana de Souza

Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Cervini

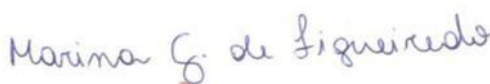
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:



Prof. Dr. Marcelo Cervini – UESB / Jequié, BA



Prof. Dr. Artur de Lima Preto – IFC campus Araquari/SC



Dra. Marina Gomes de Figueiredo – UESC/ Ilhéus, BA

Campus de Jequié

(73) 3528-9725 | ppggbc@uesb.edu.br

Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016



UESB



Governo do
Estado da Bahia

Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

Data de realização: 26 de agosto de 2020.

Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

AD PLENAM VITAM

Campus de Jequié

(73) 3528-9725 | ppggbc@uesb.edu.br

Campus de Itapetinga
Praça da Primavera, 40
Bairro Primavera
CEP 45.700-000
PABX: (77) 3261-8600

Campus de Jequié
Rua José Moreira Sobrinho, s/n
Bairro Jequiezinho
CEP 45.200-000
PABX: (73) 3528-9600

Campus de Vitória da Conquista
Estrada do Bem Querer, km 4
Bairro Universitário
CEP: 45031-300
PABX: (77) 3424-8600

Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Dedico este trabalho à
minha mãe, à minha filha,
a meu esposo, e aos meus
irmãos.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



GRATIDÃO

À Deus, por mais uma vez ter me sustentado e me erguido sempre que cair. Deus é meu socorro bem presente e me dar forças para prosseguir. Grata, Senhor JESUS!

Ao meu pastor Ap. Joselito Aragão, que me incentivou a fazer a prova de seleção do mestrado e orou por mim acreditando em minha capacidade. Muito grata!

Aos meus pais pelo apoio, carinho e amor. Mesmo estando longe, me acompanham de pertinho: ligando, incentivando e orando para que tudo desse certo.

Aos meus irmãos, José Carlos (in memória), Suely, Sulêde, Nilton, Jarlan e M^a Aparecida: vocês alegram os meus dias. Sou grata a Deus por ter me dado uma família tão linda. Obrigada por me apoiarem, me incentivarem e por todas as bênçãos que derramaram em minha vida. EU AMO VOCÊS!

Ao meu esposo Danilton, que nestes dias de correria, sempre esteve ao meu lado, não deixando que nada faltasse. Obrigada! Sem você eu não teria conseguido.

À minha filha Eloah, pelos belos sorrisos que me ajudaram a prosseguir... Obrigada minha princesa, você chegou no momento certo, no momento de Deus. EU TE AMO!

Uma enorme gratidão a uma pessoa que me surpreendeu ao longo dos anos, com sua carinha meiga, doce e que, quando estamos conversando, diz: “eu lhe entendo madrinha”. Meu muito obrigada Mary, você é muito especial para mim! Sou muito grata a Deus por ter colocado você em meu caminho e grata a você por tudo que fizeste por minha família nestes dias, principalmente cuidar da minha filha. Gratidão eterna!

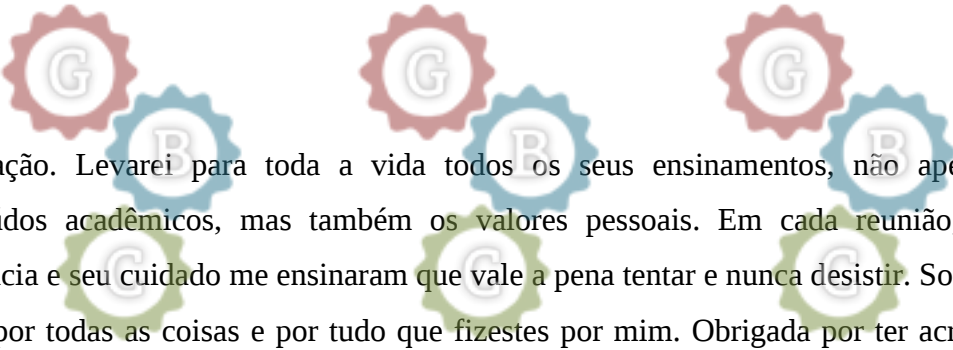
As minhas amigas Fernanda e Adriana, por todo apoio moral e emocional. Vocês são muito importantes para mim. Nesta minha caminhada, vocês fizeram toda a diferença.

À minha amiga e irmã de Laboratório Leticia. Na verdade, sempre falamos que somos amigas de laboratório, mas estamos sempre nos deparando nos caminhos da vida. E assim, Leticia, te agradeço por todo o apoio, ajuda e carinho, obrigada!

À minha líder de célula Eunice pelo carinho, pelo apoio e pelas orações. Deus te abençoe, amada.

Ao Prof. Dr. Marcelo Cervini, pela orientação e pela contribuição com a execução do projeto de pesquisa e pelo fornecimento de subsídios para o meu desenvolvimento acadêmico. Obrigada também pela paciência e pela confiança.

À minha co-orientadora Dra. Ana Karina de Francisco, pela orientação desde a



graduação. Leverei para toda a vida todos os seus ensinamentos, não apenas os conteúdos acadêmicos, mas também os valores pessoais. Em cada reunião, a sua paciência e seu cuidado me ensinaram que vale a pena tentar e nunca desistir. Sou muito grata por todas as coisas e por tudo que fizestes por mim. Obrigada por ter acreditado em minha capacidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação pelo apoio e pelos ensinamentos.

À universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, (UESB) pelo espaço.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado.

À Dra. Jamille de Araújo Bitencourt, pela ajuda com o banco de dados e pelas análises. Sua contribuição foi fundamental para a realização desse trabalho. Obrigada!

À Renata Vasconcellos, pela disponibilização do material, pelo apoio e por todas as vezes que me ajudastes nesta caminhada, desde a graduação. Obrigada pelos ensinamentos no laboratório, você foi essencial em minha formação.

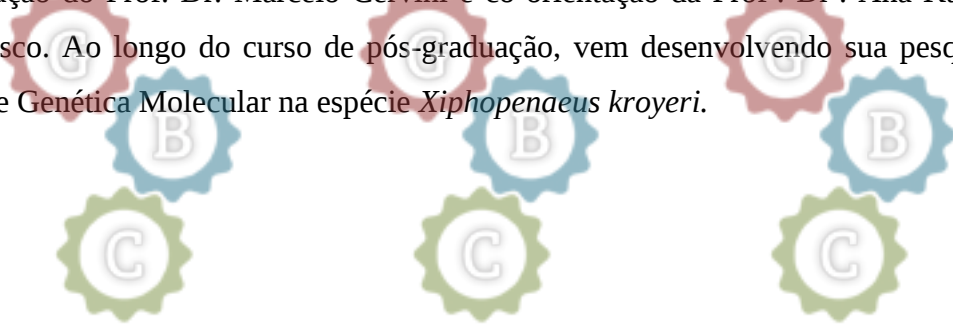
Obrigada aos colegas do Lab. Molecular e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Muito Obrigada!



BIOGRAFIA

Somira Santana de Souza, filha de Josezito Almeida de Souza e Maria Santana, nasceu em 22 de novembro de 1987, em Maracás, Bahia. Estudou o curso de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Genética pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB entre os anos de 2013 - 2017. Durante a graduação, foi monitora da disciplina Invertebrados II e foi bolsista de Iniciação Científica pela FAPESB (2014 - 2016) no Laboratório de Genética Molecular, sob orientação da Prof. Dr^a. Ana Karina de Francisco. Em junho de 2017, entregou a monografia intitulada: “Identificação de espécies de camarões pescados em Itacaré - Ba utilizando a técnica DNA barcode” sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Ana Karina de Francisco. Logo após a conclusão da graduação, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação – PPGGBC 2018.1, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Cervini e co-orientação da Prof^a. Dr^a. Ana Karina de Francisco. Ao longo do curso de pós-graduação, vem desenvolvendo sua pesquisa na área de Genética Molecular na espécie *Xiphopenaeus kroyeri*.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

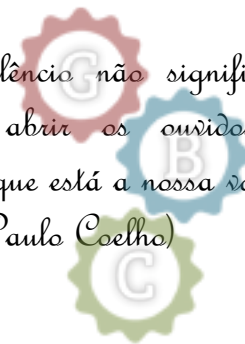


EPÍGRAFE

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



*Ficar em silêncio não significa não falar, mas abrir os ouvidos para escutar tudo que está a nossa volta.
(Paulo Coelho)*

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



RESUMO

Os camarões da família Penaeidae são de grande importância para as comunidades bentônicas, bem como para a economia em todo o mundo. *Xiphopenaeus kroyeri* é uma das espécies mais explorada no Brasil. Para diminuir o impacto da pesca sob essa espécie de camarão, foi criado o período de defeso que é definido como um período de proibição de pesca durante o ciclo reprodutivo desses organismos, bem como de outras espécies de camarões de valor comercial. No Oceano Atlântico, foram verificadas a presença de espécies crípticas de *Xiphopenaeus*, que são espécies morfologicamente semelhantes e geneticamente diferentes. As espécies crípticas podem possuir períodos reprodutivos distintos ao longo de sua distribuição geográfica. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética temporal de espécies crípticas de *Xiphopenaeus* do litoral de Itacaré – BA através da utilização dos genes mitocondriais Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e o 16S rRNA. As coletas foram realizadas sazonalmente, durante o período de um ano. As análises foram realizadas através de Máxima Verossimilhança (ML), Inferência Bayesiana (BI) e *Neighbor-Joining* (NJ). Para dar maior suporte as análises citadas acima, foram Delimitadas Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) e calculadas as distâncias genéticas intra e interespecíficas. Esta última objetivou verificar a presença de *barcode gap*. Os resultados mostraram a formação de dois grupos, os quais foram denominados X. sp1 e X. sp2. Pôde-se observar que o grupo formado pelos indivíduos de X. sp1, trata-se da espécie X. *kroyeri*, enquanto que X. sp2 corresponde a espécie X. *dincao*, descrita recentemente. A explicação para os resultados encontrados se deve a divergência sazonal, pois X. sp2 reproduz-se durante o verão enquanto que X. sp1 reproduz-se nas demais estações, o que provavelmente levou a uma incompatibilidade reprodutiva, causando o isolamento reprodutivo entre essas espécies. Portanto, o presente estudo apresenta grande relevância para as medidas de conservação e manejo das espécies do gênero *Xiphopenaeus*, visto que, essas duas espécies apresentam períodos reprodutivos diferentes, dessa forma, as medidas de conservação devem ser tomadas de forma distinta para cada espécie.

Palavras-Chave: Ciclo Reprodutivo – Conservação – Biodiversidade - Sazonalidade.



ABSTRACT

Shrimps from the Penaeidae family are of great importance for benthic communities, as well as for the economy around the world. *Xiphopenaeus kroyeri* is one of the most explored species in Brazil. In order to reduce the impact of fishing on this species of shrimp, the closed season was created, which is defined as a period of no fishing during the reproductive cycle of these organisms, as well as other shrimp species of commercial value. In the Atlantic Ocean, the presence of cryptic species of *Xiphopenaeus* were verified, which are morphologically similar and genetically different species. Cryptic species may have different reproductive periods throughout their geographic distribution. Therefore, this work aimed to evaluate the temporal genetic diversity of cryptic species of *Xiphopenaeus* from the coast of Itacaré - BA using the mitochondrial genes Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) and the 16S rRNA. The collections were carried out seasonally, during the period of one year. The analyzes were performed using Maximum Likelihood (ML), Bayesian Inference (BI) and Neighbor-Joining (NJ). To give greater support to the analyzes mentioned above, Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) were delimited and the intra and interspecific genetic distances were calculated. The latter aimed to verify the presence of a barcode gap. The results showed the formation of two groups, which were called X. sp1 and X. sp2. It was observed that the group formed by the individuals of X. sp1, is the species X. *kroyeri*, while X. sp2 corresponds to the species X. *dincao*, recently described. The explanation for the results found is due to seasonal divergence, since X. sp2 reproduces during the summer while X. sp1 reproduces in the other seasons, which probably led to a reproductive incompatibility, causing reproductive isolation between these species. Therefore, the present study has great relevance for the conservation and management measures of species of the genus *Xiphopenaeus*, since these two species have different reproductive periods, therefore, conservation measures must be taken differently for each species.

Keywords: Conservation – Biodiversity - Reproductive Cycle - Seasonality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição geográfica das espécies do gênero de *Xiphopenaeus*. A. mapa de distribuição geográfica das espécies adquiridas nos Bancos de Dados (GenBank e BOLD). B. Local de Coleta dos espécimes do presente estudo.....20

Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida de um espécime de camarão Decápode.....21

Figura 3. Modelo esquemático do mtDNA e seus genes.....25

Figura 4. Árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) Concatenada baseada em sequências dos genes mitocondriais Citocromo C Oxidase I (COI) e 16S rRNA de espécimes de *Xiphopenaeus* do litoral de Itacaré-Ba seguindo o modelo de evolução nucleotídica Kimura-2-paramêtros. Os números nos ramos são os valores de suporte de ML, BI e NJ, respectivamente.....59

Figura 5. Árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) baseada em sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) de *Xiphopenaeus*, seguindo o modelo de evolução nucleotídica Kimura-2-paramêtros. Os números nas bases dos ramos são os valores de *bootstrap* de ML, BI e NJ, respectivamente. Valores de suporte menores que 50 não foram amostrados. As barras verticais indicam a delimitação das espécies de acordo com os algoritmos. Os asteriscos indicam que não houve suporte para aquele grupo. X. sp2 são sequências coletadas durante o verão e X. sp1 foram sequências coletadas nas demais estações.....60

Figura 6. Árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) baseada em sequências do gene rRNA 16S de *Xiphopenaeus*, seguindo o modelo de evolução nucleotídica Kimura-2-paramêtros. Os números nas bases dos ramos são os valores de *bootstrap* de ML, BI e NJ, respectivamente. As barras verticais indicam a delimitação das espécies de acordo com os algoritmos. Os asteriscos indicam que não houve suporte para aquele grupo naquela respectiva análise.....61

Figura 7. Árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) concatenada baseada em sequências do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e 16S rRNA de espécimes do presente estudo e de Carvalho-Batista et. al. (2019) de *Xiphopenaeus*, seguindo o modelo de evolução nucleotídica Kimura-2-paramêtros. Os números nas bases dos ramos são os valores de *bootstrap* de ML, BI e NJ, respectivamente. Valores abaixo de 50 não foram amostrados.....62



LISTA DE TABELAS

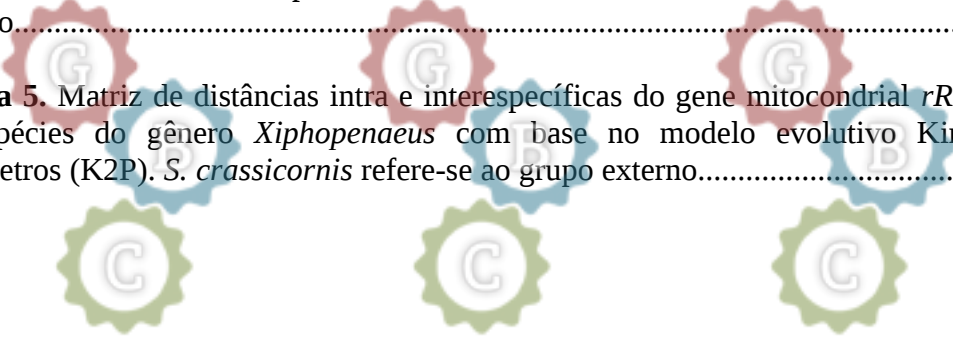
Tabela 1. Códigos dos espécimes de *Xiphopenaeus kroyeri* utilizados nas análises dos genes 16S rRNA e Citocromo C Oxidase subunidade I (COI) do presente estudo.....62

Tabela 2. Espécies do gênero *Xiphopenaeus* adquiridas do BOLD e GenBank para o gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e seus respectivos números de acesso, locais de coleta e referências.....63

Tabela 3. Espécies do gênero *Xiphopenaeus* adquiridas do BOLD e GenBank para o gene rRNA 16S e seus respectivos números de acesso, locais de coleta e referências.....65

Tabela 4. Matriz de distâncias intra e interespecíficas do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) de espécies do gênero *Xiphopenaeus* com base no modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros (K2P). Os símbolos L1 e L2 refere-se a linhagem 1 e 2 da espécie *Xiphopenaeus riveti*, respectivamente. *S. crassicornis* trata-se do grupo externo.....65

Tabela 5. Matriz de distâncias intra e interespecíficas do gene mitocondrial rRNA 16S de espécies do gênero *Xiphopenaeus* com base no modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros (K2P). *S. crassicornis* refere-se ao grupo externo.....66



LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP - Trifosfato de Adenosina

ATPase – Adenosinatrifosfatases

A + T - Adenina/Timina

ABBI - *All Birds Barcode Initiative*

BA - Bahia

BOLD – *Barcode of Life Data Systems*

pPTP - *Bayesian Poisson Tree Process*

CAUNESP – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista

CEPENE - Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira do Nordeste

COI - Citocromo C Oxidase Subunidade I

DNA - *Desoxirribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

16S rRNA - *Small Subunit Ribosomal RNA*

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO – *Food and Agricultural Organization* (Organização de Alimentação e Agricultura)

FISH-BOL - *Fish Barcode of Life*

GMAYC - *General Mixed Yule-Coalescent analysis*

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

BI - Inferência Bayesiana

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ML - Máxima Verossimilhança

MMA - Ministério do Meio Ambiente

MOTUs - Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura

M. – *Macrobrachium*

mtDNA – DNA mitocondrial

mPTP - *multiple Poisson Tree Processes*

NADH – *Nicotinamide adenine dinucleotide*

NJ - *Neighbor-Joining*

OTUs – Unidades Taxonômicas Operacionais

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PTP – *Poisson Tree Processes*

PHYLOMAP – Mapa Filogenético

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA_t - RNA transportador

X. - *Xiphopenaeus*

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Ordem Decapoda.....	17
2.2.1 Aspectos Gerais	17
2.2.2 Gênero <i>Xiphopenaeus</i>	18
2.2.3 Ciclo de vida.....	20
2.2 Atividade Pesqueira.....	22
2.3 Marcadores Moleculares (DNA mitocondrial - COI e 16S).....	24
2.4 A Genética na Conservação da Biodiversidade.....	28
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
6. CAPÍTULO 1: Influência das divergências sazonais na variação genética de espécies do gênero <i>Xiphopenaeus</i> (Decapoda: Penaeidae).....	41
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	67

1. INTRODUÇÃO

A variação genética presente nas espécies é de grande importância para a sobrevivência e adaptação a possíveis mudanças do ambiente. Compreender os padrões de distribuição da diversidade genética e o nível de diferenciação intra-específico favorece a criação de medidas de conservação e uso consciente dos recursos naturais nos diferentes ambientes.

Os marcadores moleculares são bastante utilizados para esses fins. Em camarões, por exemplo, os genes mitocondriais Citocromo Oxidase subunidade I (COI) e 16S rRNA têm se mostrado eficientes em diferentes análises genéticas, principalmente envolvendo espécies de valor comercial, como é o caso de *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). No comércio, *Xiphopenaeus kroyeri* possui grande importância econômica, pois representa uma parcela significativa de toda a pesca de camarão do litoral brasileiro.

A divergência genética encontrada em animais marinhos, assim como em peneídeos é explicada pelas barreiras geográficas que impedem o fluxo gênico entre os indivíduos, levando ao surgimento de novas espécies. No entanto, os resultados do presente estudo mostram que a divergência genética pode ser causada por diferenças no padrão do ciclo reprodutivo dos organismos.

O gênero *Xiphopenaeus* tinha duas espécies descritas, *X. kroyeri* e *X. riveti*. Ambas as espécies possuíam considerável similaridade morfológica e por isso, durante uma revisão taxonômica, *X. riveti* foi considerada sinônimo júnior de *X. kroyeri* (Farfante & Kensley, 1997). Através de dados moleculares, foi identificada espécies crípticas em populações de *X. kroyeri* no Oceano Atlântico, as quais foram denominadas *Xiphopenaeus* sp. 1 e *Xiphopenaeus* sp. 2 (Gusmão *et al.*, 2006). Em 2020 uma das espécies crípticas foi descrita como *X. dincao* (*Xiphopenaeus* sp. 2) e uma nova espécie foi denominada como *X. baueri*, totalizando, juntamente com *X. kroyeri* e *X. riveti*, quatro espécies dentro do gênero.

Devido a exploração excessiva em *X. kroyeri*, a mesma foi considerada sobre explorada ou ameaçada de sobre exploração (Ministério do Meio Ambiente, 2004). Para que os estoques pesqueiros sejam consumidos de forma responsável, a Instrução Normativa MMA nº 014, de 15 de outubro de 2004 determinou o período de proibição de pesca (período de defeso). O fato de ocorrência de espécies crípticas e novas espécies em *Xiphopenaeus* e o ciclo reprodutivo das espécies que pode ser diferente em cada

localidade, torna necessário que as medidas de proteção reavaliem os períodos de defeso estabelecidos para verificar se estão adequadas para preservar todas as varrições genéticas desse gênero.

A espécie *X. kroyeri* possui dois picos reprodutivos principais ao longo de sua distribuição geográfica. Em Itacaré - BA, foi encontrado dois grupos com períodos reprodutivos distintos. Por tanto, as informações presentes aqui são de grande relevância para o desenvolvimento de políticas de conservação e manejo. Além disso, são incentivados estudos genéticos sazonais em outros grupos de animais, visto que este fator pode ser mais frequente do que se imagina na natureza.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ordem Decapoda

2.2.1 Aspectos Gerais

A ordem Decapoda é considerada um dos maiores grupos do filo Arthropoda (Brusca & Brusca, 2007), sendo composta por organismos popularmente conhecidos como lagostas, siris, caranguejos e camarões.

Os decápodes possuem uma carapaça bem desenvolvida que recobre a câmara branquial, possuindo três pares de maxilípedes e cinco pares de pereópodes unirremes ou birremes (Brusca & Brusca, 2007). Esses são membros muito importantes das comunidades bentônicas tropicais, incluindo os estuários: além de servirem de alimento para os humanos, possuem importância nas atividades econômicas, sociais e culturais de inúmeras comunidades (Ahyong, 2001; Brusca & Brusca, 2007), desempenhando um papel importante na complexidade, no tamanho e no funcionamento dos ecossistemas (Hendrickx, 1995).

A ordem Decapoda possui duas subordens: Dendrobranchiata e Pleocyemata, as quais diferenciam-se pelo tipo de reprodução: as fêmeas de Dendrobranchiata liberam os ovos na água, enquanto as fêmeas de Pleocyemata incubam os ovos fertilizados nas cerdas pleopodiais (Pinheiro & Hebling, 1998; Cintra *et al.*, 2003). Sete infra-ordens (Stenopodidea, Caridea, Astacidea, Thalassinidea, Palinura, Anomura e Brachyura) fazem parte da subordem Pleocyemata, sendo que dentro dos Carídeos, a família que mais se destaca é a Palaemonidae devido as inúmeras espécies que ela abriga, compreendendo organismos de água doce, estuários e marinhos (Pinheiro & Hebling, 1998).

Na subordem Dendrobranchiata os camarões da família Penaeidae são os mais abundantes e os mais conhecidos (Dall *et al.*, 1990; Dutra *et al.*, 2014), os quais são importantes para a pesca e aquicultura em todo o mundo e estão distribuídos por todos os continentes. Quando juvenis os peneídeos, habitam estuários, e quando adultos migram para o mar, exceto os camarões da espécie *X. kroyeri*, (Bauer, 2004; Lopes *et al.*, 2010).

Os camarões peneídeos representam um grupo bastante diversificado, com aproximadamente 14.335 espécies, ocorrendo em todas as profundidades dos ambientes aquáticos e algumas espécies vivendo em ambiente terrestre (De Grave *et al.*, 2009).

As famílias Palaemonidae e Penaeidae são os recursos econômicos mais importantes dentro da ordem Decapoda, sendo comercializado internacionalmente no mercado central do Japão, Estados Unidos e Europa (FAO, 2009). Na família Penaeidae encontram-se os camarões pertencentes ao gênero *Xiphopenaeus*, do qual se refere o presente estudo.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

2.2.2 Gênero *Xiphopenaeus*

O gênero *Xiphopenaeus* possuía uma única espécie: *Xiphopenaeus kroyeri*, a qual pertencia ao gênero *Penaeus* (*P. kroyeri*) (Heller, 1862). No entanto, ela foi descrita por Smith (1869) como *X. hartii* (Smith, 1869). Porém, Smith (1869) comparou espécimes de *Penaeus kroyeri* (Heller, 1862), com *X. hartii* e observou que eram a mesma espécie. Diante disso, a espécie *X. hartii* passou a se chamar *X. kroyeri* e o gênero continuou com seu caráter monotípico.

Em 1907 Bouvier descreveu uma nova espécie, *X. riveti*, encontrada no Sudeste do Oceano Pacífico (Peru). Depois disso, o gênero *Xiphopenaeus* passou a ter duas espécies: uma do Atlântico (*X. kroyeri*) e outra do Pacífico (*X. riveti*). Estas duas espécies foram divididas pelo estabelecimento do Istmo do Panamá durante o Plioceno (Dall *et al.*, 1990), porém, devido a semelhança em suas características morfológicas, *X. riveti* foi considerado sinônimo júnior de *X. kroyeri* (Pérez-Farfante & Kensley, 1997).

Posteriormente, Gusmão & Solé-Cava (2002), ao analisarem marcadores PCR/RFLP específicos, baseados em sequências parciais do gene mitocondrial COI (Citocromo Oxidase Subunidade I), mostraram dois diferentes haplótipos em populações de *X. kroyeri* do litoral brasileiro, demonstrando a presença de duas possíveis espécies crípticas (espécies morfológicamente semelhantes e geneticamente diferentes) de *Xiphopenaeus*. Gusmão *et al.* (2006), utilizando dados COI e aloenzimas, confirmaram as espécies crípticas de *Xiphopenaeus kroyeri* no Atlântico. Os autores denominaram as espécies crípticas de *Xiphopenaeus* sp. 1 e *Xiphopenaeus* sp. 2, as quais se tratavam dos mesmos padrões encontrados por Gusmão & Solé-Cava (2002). Além disso, Gusmão *et al.* (2006), legitimaram a espécie *X. riveti* do Pacífico.

Francisco (2009) realizou um estudo de identificação molecular por PCR para identificar as duas espécies de *Xiphopenaeus* da costa brasileira, e analisou populações de *Xiphopenaeus* sp.1 nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, utilizando marcadores microssatélites. Além de encontrar resultados semelhantes aos estudos citados acima,

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

encontrou a espécie *Xiphopenaeus* sp. II em Cananéia/SP. Nos anos seguintes, Bissaro *et al.* (2012); Gusmão *et al.* (2013) e Piergiorgio *et al.* (2014) reafirmaram a existência das espécies crípticas de *Xiphopenaeus*, conhecido também por camarão sete-barbas. Entretanto, apenas em 2020 novas espécies do gênero foram descritas. Carvalho-Batista *et al.* (2019) utilizaram uma abordagem integrativa e caracteres morfológicos para diferenciar as espécies de *X. kroyeri* do Atlântico e do Pacífico. Os autores identificaram cinco grupos que divergiram geneticamente. Eles denominaram os grupos como A1, A2 e A3 encontradas no Atlântico, e P1 e P2 encontradas no Pacífico. Segundo os mesmos autores, A1 seria a espécie *X. kroyeri* e A2 e A3 as novas espécies *X. dincao* e *X. baueri*, respectivamente. P1 seria *X. riveti*, já descrita anteriormente e P2 se trataria de uma provável nova espécie de *X. riveti*, no entanto, como só tinha um representante da espécie, os autores não puderam descrevê-la como nova espécie. Dessa forma, o gênero *Xiphopenaeus* passou a ter três espécies no Atlântico (*X. kroyeri*, *X. dincao* e *X. baueri*) e uma no Pacífico (*X. riveti*) (Carvalho-Batista *et al.*, 2020).

Nos estudos de Carvalho-Batista *et al.* (2019), foi verificado que a espécie *Xiphopenaeus* sp. 1 se trata de *X. kroyeri* e *Xiphopenaeus* sp. 2 se trata de *X. dincao*. No Atlântico, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862), pode ser encontrada da Virgínia – US (~36°N) até o Rio Grande do Sul – BR (~32°S) (D’Incao, 1999; Costa *et al.*, 2003). De acordo com Carvalho-Batista *et al.* (2019), *X. kroyeri*, é uma espécie abundante, encontrada em aproximadamente todas as localidades do Norte, Sul e Sudeste do Brasil (fig. 1A). Já *X. dincao* e *X. baueri* só foram encontradas no Norte do Brasil, entre Caracas (Venezuela) e São Luís, no Maranhão. Além disso, Kerkhorve *et al.* (2019) encontrou *Xiphopenaeus* sp. 2 (*X. dincao*) na Guiana Francesa, Suriname e Colômbia (fig. 1A). Vale ressaltar que as espécies *X. dincao* e *X. baueri* foram devidamente validadas para cumprir as normas da International Code of Zoological Nomenclature (ICZN) (Carvalho-Batista *et al.*, 2020).

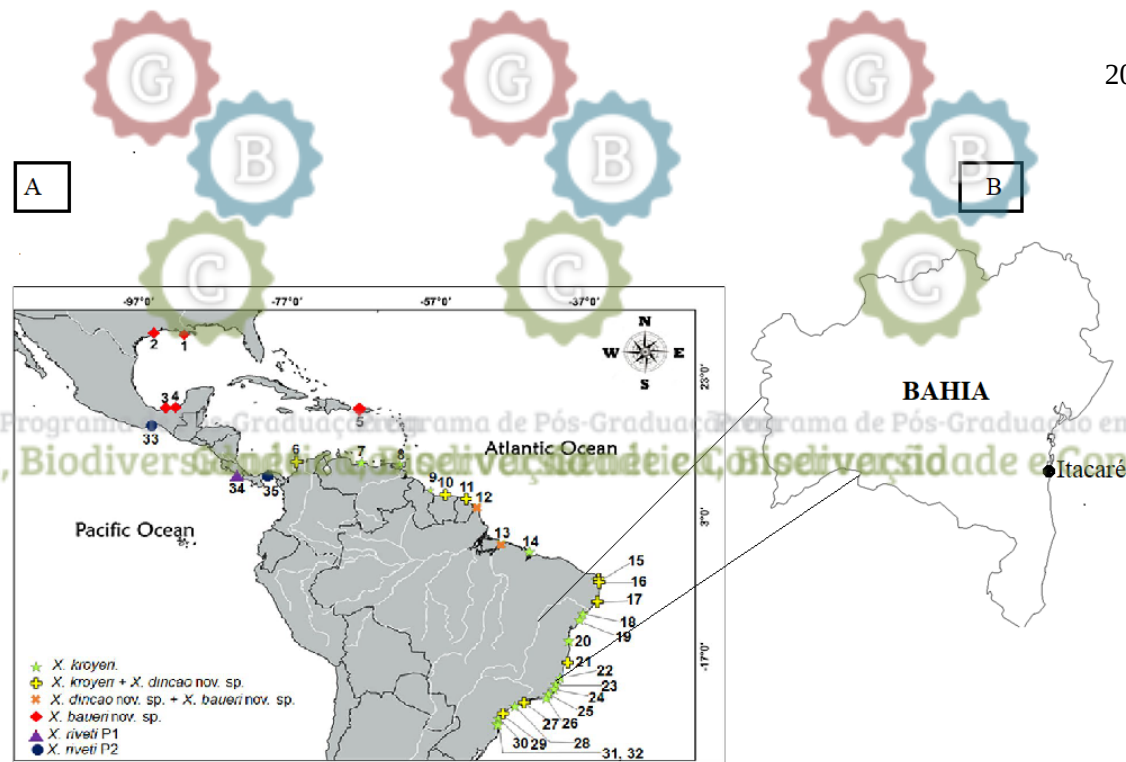


Figura 1. Mapa da distribuição geográfica das espécies do gênero de *Xiphopenaeus*. A. mapa de distribuição geográfica das espécies adquiridas nos Bancos de Dados (GenBank e BOLD); B. Local de Coleta dos espécimes do presente estudo. Fonte: A. Carvalho-Batista et al. (2019); B. Diva Gis v. 7.5.0 (HUMAN et al., 1998). Elaborado por: SANTOS, R.A.

2.2.3 Ciclo de vida

O camarão sete-barbas possui um ciclo de vida que dura aproximadamente 17 meses (Branco, 2005), sendo composto por seis fases: as fases larvais que correspondem a três etapas (náuplio, protozoa e mysis), posteriormente a fase pós-larval, juvenil e adulta. Na fase adulta ocorre a reprodução desses organismos (Mota-Alves & Rodrigues, 1977) (fig. 2). Diferente de outros camarões peneídeos, adultos e juvenis de *X. kroyeri*, são encontrados no mesmo ambiente, demonstrando que não existe dependência de estuários para desenvolvimento dos juvenis (Castro *et al.*, 2005).

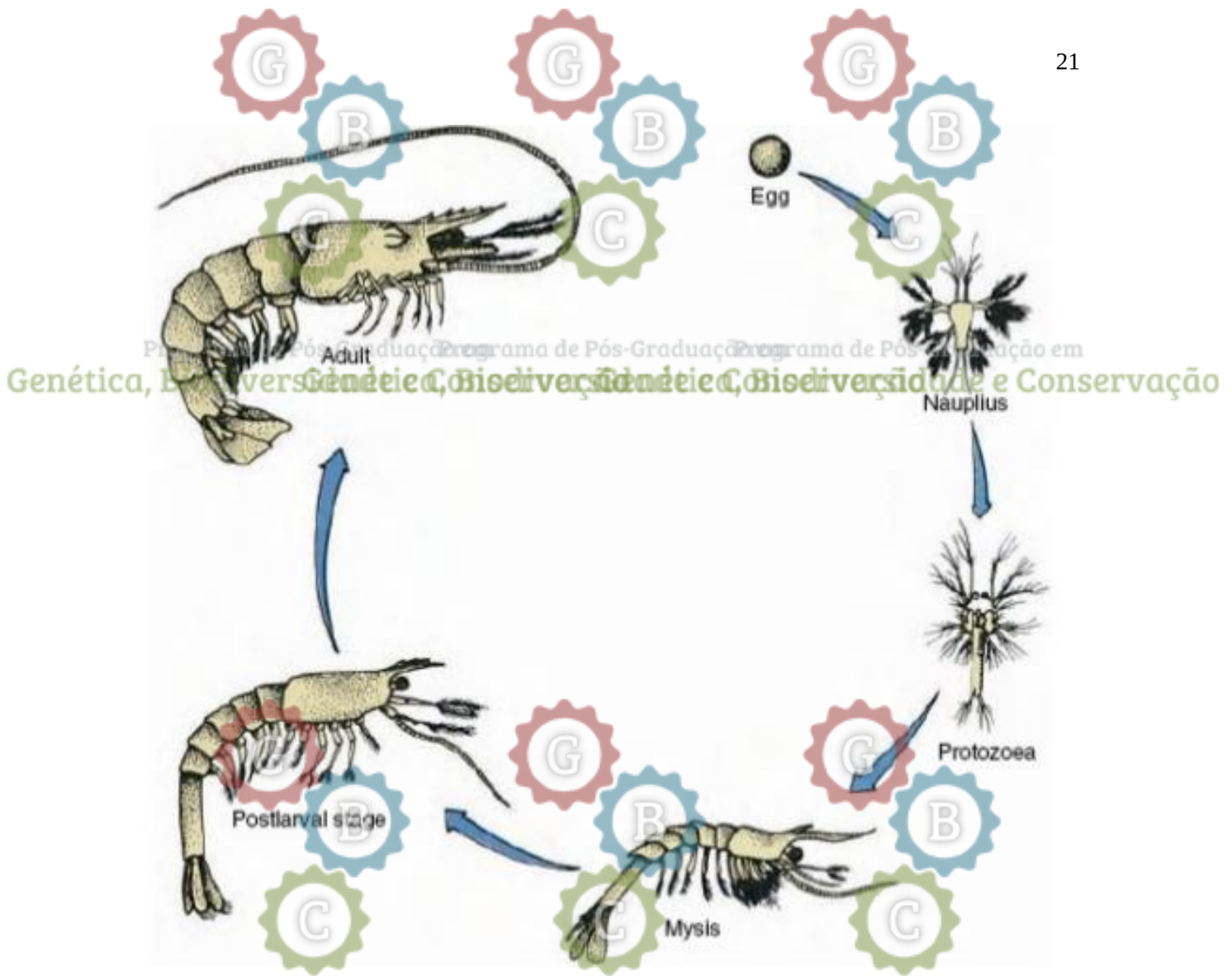


Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida de um espécime de camarão Decápode.

Fonte: [https://www.unisanta.br/materialdidaticorm/arquivos/crustaceaaula9malacostraca parteIIIa105003.pdf](https://www.unisanta.br/materialdidaticorm/arquivos/crustaceaaula9malacostraca%20parteIIIa105003.pdf)

Quanto ao ciclo reprodutivo de *X. kroyeri*, desde 1990 foi descrito como sendo tropical/subtropical por Dall *et al.* significando possuir dois picos reprodutivos ao longo do ano e esse padrão não mudou ao longo dos tempos, pois os autores Branco (2005) e Graça-Lopes *et al.* (2007) também verificaram esse padrão no ciclo de vida de *X. kroyeri* na costa Sudeste-Sul do Brasil. Castro *et al.* (2005) descreveram que o principal pico reprodutivo de *X. kroyeri* é na primavera, com um pico menor no outono. Martins *et al.* (2013), no Espírito Santo, encontrou um padrão na atividade reprodutiva do camarão sete-barbas contínua, com um período intenso no verão. Já o período de recrutamento sendo no outono e na primavera (Graça-Lopes *et al.*, 2007). Para Martins *et al.* (2013) o pico de recrutamento principal foi durante o inverno (julho, agosto) e início da primavera (setembro).

O início do estágio de maturação também é um evento crítico no ciclo de vida dos animais marinhos. Em camarões peneídeos este processo pode ser definido como uma medida de tamanho, variando entre as espécies e entre populações de uma mesma espécie em diferentes localidades (Martins *et al.*, 2013). Em *X. kroyeri* as fêmeas podem ser encontradas em estágio de maturação, maduras e desovadas (Eutrópio *et al.*, 2013). A primeira maturação, em *X. kroyeri*, variou com aproximadamente 6 a 14 cm em São Paulo (Castro *et al.*, 2005) e no Ceará (Mota-Alves & Rodrigues, 1977), respectivamente. Nos estudos de Martins *et al.* (2013), o tamanho de primeira maturação foi 9 cm, corroborando com os estudos de Branco (2005) em Santa Catarina (7,9 e 9,0 cm) e Silva *et al.* (2007), que foi em torno de 10 cm.

2.2 Atividade Pesqueira

A atividade pesqueira é praticada por muitas pessoas, possuindo importância comercial e social em todo o mundo. No Brasil, a pesca ocorre por mais de 8.500 km de Costa (MAPA, 2019).

Atualmente, a pescaria é regulamentada pela Lei nº 11.959, de 29 de junho de 2009, que atua sobre a Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca (MAPA, 2019). Segundo a EMBRAPA (2019) o marco da lei pesqueira se deu em 2003 com a Medida Provisória, correspondendo atualmente a lei 10.683, responsável por criar o órgão encarregado pelas políticas voltadas ao setor pesqueiro.

A pesca é dividida em duas categorias: pesca industrial e artesanal. A pesca industrial é feita através de embarcações de pequeno, médio e grande porte e exige uma infraestrutura de porto apropriada, possuindo fins comerciais. Já a pesca artesanal, de acordo com o artigo 8º da Lei nº 11.959/09 é “aquela praticada diretamente por pescador profissional, de forma autônoma ou em regime de economia familiar, com meios de produção próprios ou mediante contrato de parceria, desembarcado, podendo utilizar embarcações de pequeno porte” (Brasil, 2009).

A exploração de camarões é uma atividade antiga, tradicional e mundialmente difundida nas regiões tropicais e subtropicais do Brasil (Leite & Petrere, 2006). Estas regiões apresentam condições ambientais com temperatura e salinidade altas, e baixas concentrações de nutrientes, mas possuem também zonas de ressurgência que se

associam as correntes marinhas, estas por sua vez, são ricas em nutrientes, o que tornam os recursos pesqueiros abundantes (Rodrigues & Giudice, 2011).

A pesca de animais marinhos, incluindo os camarões, chegou a 79,3 milhões de toneladas no ano de 2016, apresentando uma diminuição de aproximadamente dois milhões de toneladas quando comparado ao ano de 2015 (FAO, 2018). De acordo com a FAO (2014), nos últimos dez anos o declínio das capturas de animais marinhos, é devido principalmente à pesca excessiva e isso gera escassez de pescado para atender a demanda da sociedade.

A captura marinha total mundial foi de 79,3 milhões de toneladas em 2016, representando uma diminuição de quase 2 milhões de toneladas em comparação com 2015. As capturas de anchoveta (peixe) no Peru e no Chile, que muitas vezes são altamente variáveis devido à influência do El Niño, representaram 1,1 milhão de toneladas, com outras espécies principais também mostrando capturas reduzidas entre 2015 e 2016. A diminuição das capturas afetou 64 por cento dos 25 principais países produtores.

Segundo os dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2011), os peixes apresentaram 87% da produção total, seguido pelos crustáceos com 10% e moluscos com 3%. Sendo que, as espécies de camarões mais capturadas no Brasil foi a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* com cerca de 15.417,8 t e as espécies do gênero *Farfantepenaeus* (*F. paulensis*, *F. brasiliensis* e *F. subtilis*) que atingiram cerca de 10.331,2 t. Em 2005 a maior produção de camarão sete-barbas chegou a 5.408 t (CEPENE, 2007; IBAMA, 2007), enquanto que em 2013, *Xiphopenaeus kroyeri* foi o principal alvo da produção marinha de crustáceos. O volume total extraído foi de aproximadamente 27% (MPA, 2013). Porém, em outros locais, a produção da pesca artesanal dessa espécie de camarão chegou a ser superior a 90% (Santos & Ivo, 2000; Santos *et al.*, 2007).

A efetivação da pesca do camarão-sete-barbas, e o monitoramento do mesmo, torna-se extremamente custoso nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, pelo fato de ser multiespecífica, principalmente pelo tamanho da rede utilizada pelos pescadores (Franco *et al.*, 2009) que contribui com o declínio da capacidade de produção ao longo dos anos (Pérez *et al.*, 2001; Graça-Lopes *et al.*, 2007; Castello, 2007). Por isso, foram constituídas as leis ambientais: definição de tamanhos mínimos de captura; períodos de defeso (proibi a pesca em uma determinada época do ano); proibição do emprego de métodos predatórios de captura; determinação de tamanho de malha da rede de pesca;

dentre outras, estabelecendo, assim as medidas de ordenamento pesqueiro (Pereira, 2012).

Em Itacaré, a pesca é artesanal e comum entre os moradores locais (Alarcon *et al.*, 2009). Este município está localizado no litoral sul da Bahia, Nordeste do Brasil (fig. 1B) e de acordo com o Decreto Estadual nº 2.186, de sete de junho de 1993, faz parte da Área de Proteção Ambiental (APA) Costa de Itacaré - Serra Grande, possuindo uma área total de 730 km² (Eça, 2009). O litoral de Itacaré-BA sofre influência da massa de Água Costeira (AC) e da massa de Água Tropical (AT) as quais apresentam elevadas temperaturas ($T > 20^{\circ}\text{C}$) e de acordo com Eça (2009), possui um ambiente propício para a realização de análises sazonais. Essas altas temperaturas podem refletir na biologia dos animais marinhos, como os camarões. Dessa forma, informações sobre essas problemáticas pode contribuir para a criação de medidas preventivas e mitigadoras de pesca (MPA, 2011).

Neste município são encontradas embarcações externas, como saveiros com guinchos para capturar camarões, gerando conflitos entre empresários da pesca e pescadores locais (Burda *et al.*, 2007). No entanto a criação de medidas preventivas pode aplacar esses conflitos, como por exemplo a criação da Resex Marinha de Itacaré ou o estabelecimento de acordos de pesca (Alarcon *et al.*, 2009).

O processo de criação da Reserva Extrativista (RESEX) Marinha de Itacaré-BA teve início em 1998 (Alcantara & Schiavetti, 2005), sendo proposto uma área de aproximadamente 43.519,57 ha, abrangendo rios até onde são influenciados pelo mar e com limite de até oito milhas náuticas de distância da costa marinha. Esta reserva engloba quase toda a plataforma continental no trecho de Itacaré (Weigand & Lopes, 2001).

A criação da RESEX de Itacaré visa discutir principalmente as questões da pesca, já que a atividade pesqueira gera impactos no ambiente marinho e pode levar a sobrepesca e o desrespeito a períodos de defeso (Burda *et al.*, 2007).

2.3 Marcadores Moleculares (DNA mitocondrial - COI e 16S)

O DNA mitocondrial (mtDNA) é circular, de origem extranuclear (fig. 3), seu genoma é encontrado em grande quantidade nas células (Jobim *et al.*, 2006) e possui aproximadamente 14 a 26 mil pares de bases (Moritz *et al.*, 1987). De acordo com a teoria endossimbionte o mtDNA originou-se de uma célula eucariótica que fagocitou

uma α -protobactéria e esta se diferenciou em mitocôndria; neste processo, parte do genoma da α -protobactéria foi transferido para o núcleo celular, originando-a (Gray *et al.*, 2001).

A mitocôndria possui uma função importante nas células: está envolvida na oxidação de açúcares e gorduras relacionados a respiração celular (Matioli, 2012). O conteúdo gênico do mtDNA apresenta um gene para o citocromo B, dois genes para as subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 genes para os RNA transportadores (RNAt), dois para as subunidades da ATPase (6 e 8), sete para as subunidades da NADH desidrogenase e três para as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, II e III) (fig. 3). Além disso, há uma região não codificadora, rica em A+T que é responsável pela origem da replicação e transcrição da molécula (Wostenholme, 1992). Essa molécula (mtDNA) é responsável por codificar 5% de toda a maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria. Em se tratando de genes, o DNA mitocondrial é extremamente conservado, porém são observadas diferenças em organismos que divergiram há muito tempo (Matioli & Passos-Bueno, 2001).

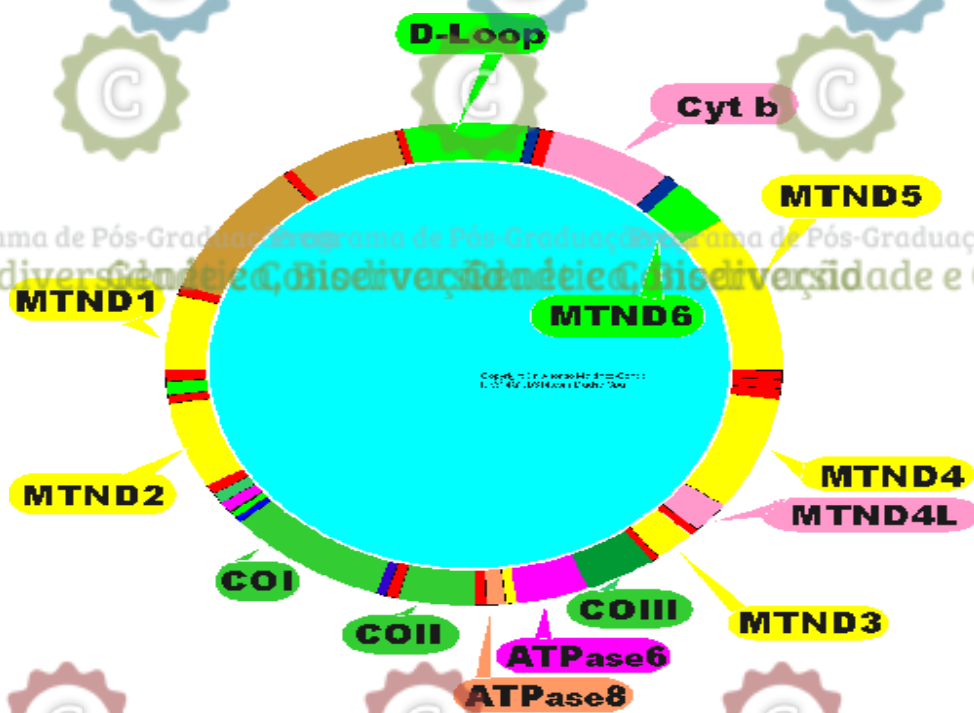


Figura 3. Modelo esquemático do mtDNA e seus genes.
Fonte: <http://www.lab314.com/mitocondria/mapas/mRNAs.htm>

O DNA mitocondrial é um gene molecular que tem se tornado eficiente para

estudos de caracterização populacional, de delimitação de espécies e subespécies, além de estudos de caráter filogenético e evolutivo: não seguem os padrões mendelianos de segregação, por isso não sofre recombinação; apresenta herança materna; possui taxa de mutação relativamente rápida, o que pode ser devido ausência de mecanismos de reparo durante a replicação; possui estrutura gênica simples (não possui DNA repetitivo, transposons, íntrons ou pseudogenes) e apresenta alta taxa de evolução por mutação se comparado com o gene nuclear (Liu *et al.*, 2007; Baker *et al.*, 2008; Vergamini *et al.*, 2011).

De acordo com Arias *et al.* (2003), as translocações de genes codificadores de tRNA são bastante frequentes e isso gera alterações na ordem gênica entre organismos filogeneticamente relacionados. Além disso, a abundância das mitocôndrias nas células junto com a facilidade de purificação, tornaram o mtDNA uma ferramenta eficaz no estudo das relações evolutivas entre indivíduos, espécies e populações (Frankham *et al.*, 2008; Matioli, 2012).

No mtDNA pode-se detectar a diversidade genética através de várias metodologias moleculares, como por exemplo, análise com enzimas de restrição (RFLP-“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”); construção de mapa de restrição para todo o genoma; ampliação via PCR continuado por digestão com endonucleases e sequenciamento (Arias *et al.*, 2003; Frankham *et al.*, 2008). Nas análises genéticas, um dos genes mitocondriais bastante utilizados é o Citocromo C Oxidase I (COI). Hebert *et al.* (2003a) propuseram a amplificação desse gene como uma ferramenta de “código de barras” genético (DNA barcode) para delimitação de espécies.

Por este motivo foram criados bancos de dados que relaciona as referências, como por exemplo, o BOLD (*Barcode of Life Data Systems*), onde os dados de cada indivíduo (geografia, fotografias, taxonomia, localização das coletas, etc.) são combinados com dados moleculares para posteriores comparações (Hebert *et al.*, 2003a); o FISH-BOL (*Fish Barcode of Life*) e o ABBI (*All Birds Barcode Initiative*) são bancos de dados mais específicos para depósito de sequências de peixes e pássaros, respectivamente (Carvalho, 2007) e o CBOL (*The Consortium for the Barcode of Life*) que foi fundado como parte de uma organização internacional e também tem se mostrado uma ferramenta facilitadora para a identificação e a delimitação das espécies de animais (Hebert *et al.*, 2003a, b).

Estes bancos de dados possibilitam identificar os “códigos de barras” de DNA sequenciado de amostras desconhecidas através da comparação com as sequências

dessas bibliotecas de referência. Com isso é possível reforçar a taxonomia clássica, permitir a descoberta de novas espécies, contribuindo para a caracterização da diversidade taxonômica e genética de diferentes regiões geográficas e resoluções de complexos de espécies crípticas, que mesmo sendo morfologicamente similares, possuem unidades evolutivas independentes ou com isolamento reprodutivo (Hebert & Gregory, 2005; Costa *et al.*, 2007; Frankham *et al.*, 2008).

Além disso, o COI pode ser utilizado para identificar ovos e larvas de animais que a identificação através das metodologias tradicionais não consegue (Frankham *et al.*, 2008). Ainda de acordo com Frankham *et al.* (2008), as análises do gene COI podem ser utilizadas para examinar fezes ou substâncias do estômago com o objetivo de definir teias alimentares (Frankham *et al.*, 2008).

Um exemplo de estudo com o gene COI é o de Teodoro *et al.* (2016), que diferenciaram espécies de camarões *Farfantepenaeus brasiliensis* e *F. paulensis* em estágios juvenis, diferentemente dos métodos tradicionais (características morfológicas), que não foram eficazes, já que nessa fase de desenvolvimento as características sexuais secundárias (características geralmente usadas para diferenciar as espécies de camarões) não estão maduras.

Atualmente existem sistemas que auxiliam o DNA barcode na identificação de espécies, são os chamados Delimitação de Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs), as quais são realizadas em plataformas *online* e contribuem para melhor confiabilidade dos dados (Barreto *et al.*, 2015). Alguns deles são: o GMYC (*General Mixed Yule-Coalescent analysis*), que faz uso de uma árvore ultramétrica utilizada como arquivo de entrada, a qual dispõe de uma taxa evolutiva definida e usa o método coalescente de Yule. Os agrupamentos (OTUs) são identificados por meio de mudanças na taxa de ramificação na árvore de entrada (Esselstyn *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Fujisawa & Barraclough, 2013); o bPTP (*Bayesian Poisson Tree Process*), que se baseia na análise de dados, partindo de uma árvore filogenética de máxima verossimilhança, em que cada ramo se difere em tamanho, e essa diferença representa um número de substituição nucleotídica. O bPTP é bastante confiável devido à exaustão de busca das árvores prováveis. Nos ramos da árvore de entrada, são atribuídos valores de suporte de inferência Bayesiana, contribuindo para a eficiência do método (Zhang *et al.*, 2013).

O PTP (*Poisson Tree Processes*) é outro sistema que colabora na delimitação de espécies, em que não necessita de uma árvore ultramétrica para delimitar as espécies,

como o GMYC, pois a taxa de especiação utilizada pelo mesmo é modelada usando diretamente o número de substituições nucleotídicas (Zhang *et al.*, 2013). O PTP é baseado nas diferenças significativas, possuindo valor estatístico dos relacionamentos dentro e entre as espécies que são reconstruídos. Neste caso, as diferenças irão se refletir nos comprimentos dos ramos. Sendo assim, é fundamental que o número de substituições dentro das espécies seja significativamente menor que entre as espécies.

Existe também o mPTP (*multiple Poisson Tree Processes*), método desenvolvido de múltiplas taxas que ajusta múltiplas distribuições exponenciais para cada espécie delimitada de forma independente (Kapli *et al.*, 2017) e o PhyloMap (mapa filogenético) que combina o PCoA, quantização vetorial e construção filogenética usando um grande conjunto de dados e capturando as relações precisas entre eles. Enquanto as análises das árvores filogenéticas tradicionais podem usar um conjunto máximo de centenas de sequências, o PhyloMap usa milhares de sequências ao mesmo tempo. Primeiro o PhyloMap descreve as principais convergências a partir do PCoA e depois usa a abordagem “*Neural-Gas*” com o objetivo de obter centros múltiplos representando seu conjunto de dados da melhor forma possível (Zhang *et al.*, 2011).

Outro marcador molecular bastante utilizado nas análises genéticas é o 16S *rRNA* (*Small Subunit Ribosomal RNA*) que é um gene estrutural não codificante e que possui regiões variáveis e conservadas. Pode ser utilizado para reconstruções filogenéticas bem como para estudos de taxonomia. Sua análise permite inferir tanto as relações filogenéticas antigas, quanto eventos recentes (Schubart *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009). Os pesquisadores Mantelatto *et al.* (2007) mostraram que a porção conservada do gene 16S *rRNA* foi eficaz em seus estudos filogenéticos com organismos decápodes. Além disso, o grande número de *primers* disponíveis para as análises moleculares em invertebrados faz com que muitos pesquisadores se sintam atraídos para utilizar esse gene (Schubart *et al.*, 2000).

2.4 A Genética na Conservação da Biodiversidade

A genética da Conservação é uma ciência multidisciplinar. Esta ciência baseia suas pesquisas em genética molecular para elucidar pontos voltados à biologia das espécies para uso sustentável e conservação das mesmas (Frankham *et al.*, 2002).

A biodiversidade é fundamental para a sobrevivência das gerações futuras, como a criação de estratégias para a segurança econômica, alimentar e ecológica (Leite,

2001). A extinção das espécies implica na perda da diversidade genética e na redução da biodiversidade de uma região, sendo que a informação perdida não pode ser recuperada (Féral, 2002).

Para os programas de conservação, a variação genética presente em uma espécie é de fundamental importância para sobrevivência e adaptação a possíveis mudanças do ambiente. Por isso compreender os padrões de distribuição da diversidade genética, o nível de diferenciação intra-específico e a identificação genética de populações é importante na criação de estratégias de conservação e uso sustentado dos recursos (Gribel, 2001). Em camarões, os marcadores moleculares como DNA mitocondrial e nuclear, alozimas, microssatélites, etc. vêm sendo bastante utilizados, principalmente envolvendo espécie de interesse comercial (Vaseeharan *et al.*, 2012). Guerra (2011), analisando sequências dos genes mitocondriais COI e 16S rRNA de duas espécies de camarões do gênero *Macrobrachium* (*M. amazonicum* e *M. jelskii*), coletadas em diferentes localidades, observou que as populações de *Macrobrachium jelskii* de Mendonça e de Jaboticabal (SP) apresentaram valores de divergência genética elevados, em relação as demais localidades amostradas pela autora, sugerindo um desequilíbrio na estruturação genética das mesmas. Ainda de acordo com Guerra (2011) a taxa de divergência interespecífica para os indivíduos coletados em Mendonça foi elevada (5,5%), mostrando que se trata de um ambiente perturbado por interferência antrópica.

Os marcadores moleculares também vêm se mostrando eficientes nos estudos de variação genética temporal e espacial. Borrel *et al.* (2007), estudando populações cubanas de *Litopenaeus schmitti*, através de análises de alozimas e microssatélites, verificaram que a diferenciação genética encontrada é devida a restrições ao fluxo gênico, tais como, variação espacial, variação na estrutura populacional da espécie e variação temporal. Gusmão *et al.* (2006) analisaram populações das espécies *Xiphopenaeus Kroyeri* e *X. riveti* através da utilização dos genes nuclear (alozimas) e mitocondrial (Citocromo Oxidase Subunidade I). Os autores observaram que as duas entidades de *Xiphopenaeus*, encontrada no Oceano Atlântico, vivem em simpatria em Natal e Ubatuba. Outros estudos evidenciaram a simpatria das espécies do gênero *Xiphopenaeus*, tais como, Piergiorgio *et al.* (2014), onde os autores descreveram que as espécies *X. kroyeri* e *X. dincao* vivem simpatricamente em Cananéia (SP) e Caravelas (BA). Carvalho-Batista *et al.* (2019) demonstraram que essas mesmas espécies se sobrepõem em Baía Formosa e Maragogi. Além disso, Carvalho-Batista *et al.* (2019) relataram que as novas espécies *X. dincao* e *X. baueri* também vivem em simpatria na

Vigia e Oiapoque.

Simpatria é um mecanismo evolutivo necessário para a formação das espécies simpátricas. O conceito de simpatria, de acordo com Ricklefs (1993), se trata de áreas de sobreposição em que as espécies simpátricas estão distribuídas, e estas, por sua vez, ocorrem na mesma área. Dessa forma, a especiação simpátrica ocorre quando há isolamento reprodutivo entre indivíduos de uma mesma população através de fatores ecológicos ou genéticos em um mesmo ambiente, como resultado de padrões comportamentais e reprodutivos (Abbott *et al.*, 2013).

Dentro da especiação simpátrica, existe um caso especial, a alocronia. A especiação alocrônica foi criada por Alexander e Bigelow (1960), que segundo o autor, se trata do isolamento reprodutivo temporal e não apresentam outros mecanismos de isolamento prévios.

Assim, a condição de simpatria alocrônica pode constituir um parâmetro importante para a diferenciação das espécies crípticas de animais marinhos (Kekkonen e Hebert, 2014), bem como de *Xiphopenaeus*. Segundo Allison *et al.* (2003), alguns fatores criam ambientes instáveis que influenciam o ciclo reprodutivo de uma espécie, como mudanças climáticas, furacões, secas e outros fatores perturbadores naturais ou não, podendo levar a uma variação significativa da estrutura genética e variabilidade da população.

Dessa forma, a identificação genética temporal de populações e estoques pode contribuir para a preservação da mesma (Valles-Jimenez *et al.*, 2005). De acordo com Frankham *et al.* (2008), em populações panmíticas a gestão deve ser unificada, já os estoques diferentes, para cada unidade, devem-se tomar medidas distintas; os marcadores moleculares também auxiliam no manejo de população dessa magnitude.

Os mecanismos acerca da biologia sazonal em *Xiphopenaeus* é de grande relevância para compreensão dos processos de diversificação e especiação, bem como pode contribuir para a criação de medidas de proteção e manejo. Mesmo havendo evidências de que a seleção atua sobre as diferenças no tempo reprodutivo nas populações, poucos estudos analisaram a variação nos processos genéticos subjacentes a mudanças ou divergências no tempo sazonal dos organismos marinhos (Bauer *et al.*, 2018). Diante disso, as informações geradas pelas análises genéticas nas populações de espécies de animais marinhos são relevantes para o manejo e conservação dos organismos (Guerra *et al.*, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a diversidade genética temporal de espécies crípticas de *Xiphopenaeus* do litoral de Itacaré - BA, comparando-as com sequências do BOLD e do GenBank, através da utilização dos genes mitocondriais Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e o 16S rRNA.

3.2 Objetivos específicos

Analisar a diversidade genética sazonal das espécies *X. kroyeri* e *X. dincao* na Costa de Itacaré - BA;

Analisar se a especiação pode ser explicada por divergências sazonais;

Analisar se os períodos de defeso atuais estão sendo efetivos para a proteção das espécies de *Xiphopenaeus* na região de Itacaré - BA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta dissertação foi constituída de um capítulo, escrita em forma de artigo, o qual foi submetido a revista *Biological Journal of the Linnean Society* (<https://academic.oup.com/biolinnean>).

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R, Butlin RK, Dieckmann U, Eroukhmanoff F, Grill A, Cahan SH, Hermansen JS, Hewitt G, Hudson AG, Jiggins C, Jones J, Keller B, Marczemwski T, Mallet J, Martinez-Rodriguez P, Möst M, Mullen S, Nichols R, Nolte AW, Parisod C, Pfenning K, Rice AM, Ritchie MG, Seifert B, Smadja CM, Stelkens R, Szymura JM, Väinölä R, Wolf JBW and Zinner D. 2013. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 26: 229-246.

Ahyong ST. 2001. Revision of the Australian Stomatopod Crustacea. *Records of the Australian Museum, Supplement* 26: 1–326.

Alcântara CN, Schiavetti A. 2005. A Implantação de Reservas Extrativistas Marinhas e a Exploração de Petróleo no Mar. *Revista de Direito Ambiental* n. 39.

Allison GW, Gaines SD, Lubchenco J, Possingham HP. 2003. Ensuring persistence of marine reserves: catastrophes require adopting an insurance factor. *Ecological Applications*, Supplement, 13: S8–S24.

Alarcon DT, Dâmaso RC da SC, Schiavetti A. 2009. Abordagem etno ecológica da pesca e captura de espécies não-alvo em Itacaré, Bahia (Brasil). *Boletim do Instituto de Pesca* 35: 675 – 686.

Alexander RD, Bigelow RS. 1960. Especiação alocrônica em grilos de campo e uma nova espécie, *Acheta veletis*. *Evolution* 14: 334-346.

Arias MC, Francisco F de O, Silvestre D. 2003. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. *Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. Criciúma: Editora UNESC.

Barcia AR, López GE, Hernández D†, García-Machado E. 2005. Temporal variation of the population structure and genetic diversity of *Farfantepenaeus notialis* assessed by allozyme loci. *Molecular Ecology* 14: 2933–2942.

Baker N, De Bruyn M, Mather PB. 2008. Patterns of molecular diversity in wild stocks of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) from northern Australia and Papua New Guinea: impacts of Plio-Pleistocene landscape evolution. *Freshwater Biology* 53: 1592-1605.

Barreto SB, Nunes LA, Silva AT, Juca-Chagas R, Diniz D, Sampaio I, Schneider H, Affonso PRAM. 2015. Is *Nematocharax* (Actinopterygii, Characiformes) a monotypic fish genus? *Genome*. 58: 191-192.

Bauer RT. 2004. Remarkable Shrimps: Adaptations and Natural History of the Carideans. Oklahoma University Press: Norman. 285: 316.

Bauer† CM, Fudickar† AM, Anderson-Buckingham S, Abolins-Abols M, Atwell JW, Ketterson ED, Greives TJ. 2018. Seasonally sympatric but allochronic: differential expression of hypothalamic genes in a songbird during gonadal development. *Royal*

Society Publishing. 285: 2018-1735.

Bissaro FG, Gomes-JR JL, Beneditto APMDI. 2012. Morphometric variation in the shape of the cephalothorax of shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* on the east coast of Brazil. *Journal of the Marine Biological Association* 93: 683–691.

Bouvier EL. 1907. Crustaces Decapodes nouveaux recueillis a Païta (Peru) par M. le Dr. Rivet. *Bulletin du Museum D'Histoire Naturelle, Paris* 13: 113-116.

Barrell YJ, Arenal F, Mbemba ZM, Santana O, Díaz-Fernández R, Vázquez E, Blanco G, Sánchez JA, Espinosa G. 2007. Spatial and temporal genetic analysis of the Cuban White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) schmitti*. *Aquaculture* 272: 125-138.

Brasil, República Federativa. Lei 11.959 de 29 de junho de 2009. Política Nacional do Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato20072010/2009/Lei/L11959.htm>. Acesso em: <18 de dezembro de 2019>.

Branco JO. 2005. Biologia e pesca do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) (Crustacea, Penaeidae), na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22: 1050–1062.

Brusca RC, Brusca GJ. 2007. Invertebrados. Segunda edição. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. ISBN 852771258X: 531-605.

Burda CL, Polette M, Schiavetti A. 2007. Análise da cadeia causal para a criação de unidade de conservação: Reserva Extrativista Marinha de Itacaré (BA) – Brasil. *Revista de Gestão Costeira Integrada, Faro* 7: 57-67.

Castello JP. 2007 Gestão sustentável dos recursos pesqueiros, isto é realmente possível? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 2: 47-52.

Castro RH, Costa RC, Fransozo A, Mantelatto FLM. 2005 Population structure of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea: Penaeoidea) in the littoral of São Paulo, Brasil. *Scientia Marina* 69: 105 -112.

Carvalho-Batista A, Terossi M, Zara FJ, Mantelatto FL, Costa RC. 2019. A multigene and morphological analysis expands the diversity of the seabob shrimp *Xiphopenaeus* Smith, 1869 (Decapoda: Penaeidae), with descriptions of two new species. *Scientific Reports* 9:15281.

Carvalho-Batista A, Terossi M, Zara FJ, Mantelatto FL, Costa RC. 2020. Validation of *Xiphopenaeus dincao* Carvalho-Batista, Terossi, Zara, Mantelatto e Costa and *Xiphopenaeus baueri* Carvalho-Batista, Terossi, Zara, Mantelatto e Costa (Decapoda: Penaeidae) from western Atlantic. *Zootaxa* 4772: 597–599.

CEPENE. 2007. Boletim estatístico da pesca marítima e estuarina do nordeste do Brasil 2005. Tamandaré. 79p. Disponível em: <Acesso em: 10 de Nov. de 2019> Disponível em <<http://www.icmbio.gov.br/cepenne/images/stories/publicacoes/btc/vol18/btc-vol18.pdf>>

Chen RT, Tsai CF, Tzeng WN. 2009. 16S and 28S rDNA sequences in phylogenetic analyses of freshwater prawns (*Macrobrachium* BATE, 1868) from Taiwan. *Journal of Crustacean* 29: 400 - 412.

Cintra IHA, Silva KC de A, Muniz APM. 2003. Ocorrência de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) em áreas estuarinas do estado do Pará (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). CEPNOR. *Boletim Técnico Científico* 3: 219-227.

Costa RC, Fransozo A, Melo GAS, Freire FAM. 2003. Chave ilustrada para identificação dos camarões Dendrobranchiata do litoral do estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* 3: 1-12.

Costa FO, Carvalho GR. 2007. The barcode of life initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of fish. *Genomics, Society and Policy* 3: 29-40.

Costa FO, Waard JR de, Boutillier J, Ratnasingham S, Dooh RT, Hajibabaei M, Hebert PDN. 2007. Biological identifications through DNA barcode: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatics Sciences*. 64: 272-295.

Dall W, Hill BJ, Rothlisberg PC, Staples DJ. 1990. The biology of the Penaeidae. In: Blaxter J.H.S, Southward A.J. Edição London, Academic Press. *Advances in Marine Biology* 27: 1- 489.

D'INCAO, F. 1999. Subordem Dendrobranchiata (camarões marinhos). 275-299.

De Grave S, Pentcheff ND, Ah Yong ST, Chan TY, Crandall KA, Dworschak PC, Felder DL, Feldmann RM, Franssen CHJM, Goulding LYD, Lemaitre R, Low MEY, Martin JW, Peter KLNg, Schweitzer CE, Tan SH, Tshudy D, Wetzer R. 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *National University of Singapore* 21: 1-109.

Dutra FM, Forneck SC, Ballester ELC. 2014. Suscetibilidade dos estágios ontogenéticos: padrão osmorregulatório em camarões peneídeos e palaemonídeos. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR* 17: 209-215.

Eça GF. 2009. Biogeoquímica de nutrientes e clorofila-a na plataforma continental rasa entre Itacaré e Canavieiras – Bahia. Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz. Dissertação de Mestrado em Sistemas Aquáticos Tropicais. 56 p.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). 2019. Pesca e Aquicultura. Acesso em: <16/12/2019. Disponível em <<https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/nota-tecnica>>

Esselstyn JA, Evans BJ, Sedlock JL, Ali F, Khan A, Lawrence R, Heaney LR. 2012. Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 279: 3678–3686.

Eutrópio FJ, Mariante FLF, Junior PDF, Krohling W. 2013 Population parameters of

the shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea, Penaeidae), caught by artisanal fisheries in Anchieta, Espírito Santo State. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 35: 141-147.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2009. The state of world fisheries and aquaculture 2008. Rome: FAO *Fisheries and Aquaculture Department*. p 176.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture: opportunities and challenges. Rome. E-ISBN 978-92-5-108276-8 p243.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2018. Fishery and Aquaculture Statistics 2016. ISBN 978-92-5-130636-9. Rome. FAO *Fisheries and Aquaculture Department* p104.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. SBG (Sociedade Brasileira de Genética). Ribeirão Preto, SP. 7: 280.

Franco ACNP, Junior RS, Pierri N, Santos GC dos. 2009. Levantamento, sistematização e análise da legislação aplicada ao defeso da pesca de camarões para as regiões sudeste e sul do Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca* 35:687–699.

Francisco AK de. 2010. Caracterização genética populacional do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) no litoral Sudeste-Sul do Brasil. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos. Tese de Doutorado Genética e Evolução. 101 p.

Fujisawa T, Barraclough TG. 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Systematic Biology* 62: 707–724.

Graca-Lopes R, Santos EP, Severino-Rodrigues E, Braga FMS, Puzzi A. 2007. Aportes ao conhecimento da biologia e da pesca do camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri* Heller, 1862) no litoral do Estado de São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto da Pesca* 33: 63-84.

Gray MW, Burger G B, Lang F. 2001. The origin and evolution of mitochondria. *Genome Biology* 2: 1018.1-1018.5.

Gribel R. 2001. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, o manejo e a conservação dos recursos naturais. *Humanidades Biologia*. 48: 111-117.

Gruenthal KM, Acheson LK, Burton RS. 2007. Genetic structure of natural populations of California red abalone (*Haliotis rufescens*) using multiple genetic markers. *Marine Biology* 152: 1237–1248.

Guerra AL, Lima AVB, Taddei FG, Castiglioni L. 2010. Genetic polymorphism, molecular characterization and relatedness of *Macrobrachium* species (Palaemonidae) based on RAPD-PCR. *Genetics and Molecular Research* 9: 2317-2327.

Guerra AL. 2011. Caracterização molecular da estrutura genética de populações e espécies de camarões palemonídeos do gênero *Macrobrachium*. São José do Rio Preto - SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Dissertação de Mestrado em Genética Animal e Evolução. 53 p.

Gusmão J, Solé-Cava AM. 2002. Um sistema de diagnóstico molecular para a identificação de espécies comerciais de camarões marinhos brasileiros. In: *I Congresso Ibero americano Virtual de Aquicultura*. CIVA: 754-764.

Gusmão J, Lazoski C, Monteiro FA, Solé-Cava AM. 2006. Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. *Marine Biology* 149: 491 - 502.

Gusmão J, Piergiorgio RM, Tavares C. 2013. The Contribution of Genetics in the Study of the Sea-Bob Shrimp Populations from the Brazilian Coast. *Boletim do Instituto de Pesca* 39: 323 – 338.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. 2003a. Biological Identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society* 270: 313–321.

Hebert PDN, Ratnasingham S, Waard JR. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society* 270: 96–99.

Hebert PDN, Gregory TR. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology* 54: 852-859.

Hendrickx ME. 1995. Checklist of brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda) from the eastern tropical Pacific. Royal Belgian Institute of Natural Sciences. 65:125-150.

Heller C. 1862. Beiträge zur näheren Kenntnis der Macrouren. Sonder-Abdruck aus dem XLV. Sonder-Abdruck aus dem XLV. Bde. der Sitzungsab. der kais. Akad. der Wissenschaften 390 - 426.

IBAMA 2007. Estatística da pesca 2007 - Brasil: grandes regiões e unidades da federação. Brasília, 113p. Acesso em: <10 de Nov. de 2019> Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/documentos-recursos-pesqueiros/estatistica-pesqueira>.

Jobim LF, Costa LR, Silva da M. 2006. Identificação humana pelo DNA in: Identificação humana volume II. Tochetto, D. coord., Campinas/SP:Millennium. Parte I: 7-97.

Kapli P, Lutteropp S, Zhang J, Kobert K, Pavlidis P, Stamatakis A, Flouri T. 2017. Multi-rate Poisson tree processes for singlelocus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*. 33:1630–1638.

Kerkhove TRH, Boyen J, Backer ADE, Mol JH, Volckaert FAM, Leliaert F, Troch MDE. 2019. Multilocus data reveal cryptic species in the Atlantic seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea: Decapoda). *Biological Journal of the Linnean Society* 127: 847–862.

Kekkonen M, Hebert PDN. 2014. DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows. *Molecular ecology resources* 4: 706-715.

Leite-Junior NO. 2001. Dinâmica Populacional do Camarão-Rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Farfantepenaeus paulensis* da Região Sudeste do Brasil (23° a 28° S). São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. Dissertação de Mestrado. 130 p.

Lopes, JBBS, Vasques RO R, Guimaraes FJ, Cetra M, Couto E da CG. 2010. Proporção Sexual do Camarão Sete-Barbas *Xiphopenaeus kroyeri* na Costa de Ilhéus, Bahia, BRASIL. São Paulo. *Boletim do Instituto de Pesca* 36: 251 - 262.

Liu MY, Cai YX, Tzeng CS. 2007. Molecular systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian species. *Zoological Studies* 46: 272-289.

Mantelatto FL, Robles R, Felder DL. 2007. Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus *Portunus* (Crustacea: Brachyura, Portunidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 150: 211–220.

Martins AS, Pinheiro HT, Leite-Júnior N de O. 2013. Biologia reprodutiva do camarão sete-barbas no litoral centro Sul e Sul do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca* 39: 205-215.

Matioli SR, Passos-Bueno MRS. 2001. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. *Biologia Molecular e Evolução*, Cap. 15. Editora Holos.

Matioli SR, Fernandes FMC. 2012. *Biologia Molecular e Evolução*. Sociedade Brasileira de Genética. Editora Holos - Ribeirão Preto. p.256.

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). 2011. Estatística da aquicultura e pesca no Brasil. <Disponível em <http://www.mpa.gov.br/publicacoes> <http://www.mpa.gov.br/#info-estatistica/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>>. Acesso em <02 de dezembro de 2019>.

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). 2013. Boletim estatístico da pesca e aquicultura, 2011. Brasília, 60p. Acesso em: <20 de dez. de 2019. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/>>.

Ministério do Meio Ambiente (MMA). 2004. GABINETE DA MINISTRA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 14, DE 14 DE Outubro DE 2004. < Acesso em 03 de janeiro de 2020. Disponível em <https://www.mpma.mp.br/arquivos/COCOM/arquivos/centros_de_apoio/cao_meio_a_mambiente/calendario_pesca/IN14_2004.pdf>.

Moritz C.; Dowling TE.; Brown WM. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 269–292.

Mota-Alves MI, Rodrigues MM. 1977. Aspectos da reprodução do camarão-sete barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) (Decapoda, Macrura), na costa do Estado do Ceará. *Arquivos de Ciências do Mar* 17:29-35.

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294-307.

Pesca no Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2019. Acesso em <16 /12/2019> Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/aquicultura-e-pesca/pesca-no-brasil>>.

Pinheiro MAA, Hebling NJ. 1998. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), in Valenti WC (ed.) Carcinicultura de água doce. Tecnologia para produção de camarões. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasília. 21-46.

Pérez-Farfante I, Kensley B. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Mémoires du Muséum National d'Histoire naturelle*. 175: 1-233.

Pérez-Ramírez M, Lluch-Cota S. 2010. Fisheries certification in latin America: recent issues and perspectives. *Interciência*. 35: 855-861.

Perez JAA, Pezzuto PR, Rodrigues LF, Valentini H, Vooren, CM. 2001. Relatório da Reunião Técnica de Ordenamento da Pesca de Arrasto nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil. Notas Técnicas da FACIMAR. 5: 1-34.

Pereira, LG de C. 2012. Pesca e aquicultura no Brasil. Câmara dos Deputados Consultoria Legislativa Anexo III - Térreo Brasília – DF. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/documentos-e-pesquisa/publicacoes>>.

Piergiorgio RM, Pontes MN, Duarte AVB, Gusmão J. 2014. Haplotype-Specific Single Locus Multiplex PCR Assay for Molecular Identification of Sea-bob Shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862), cryptic species from the Southwest Atlantic using a DNA pooling strategy for simultaneous identification of multiple samples. *Biochemical Systematics and Ecology*. 54: 348-353.

Ricklefs RE. 1993. Economia da Natureza. Rio de Janeiro. 3ª edição. Editora Guanabara Koogan.

Rodrigues JÁ, Giudice DAS. 2011. Pesca marítima artesanal como principal atividade socioeconômica: o caso de Conceição de Vera Cruz, BA. *Cadernos do Logepa*. 6:115-139.

Santos MCF, Ivo CTC. 2000. Pesca, biologia e dinâmica populacional do camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae), capturado em frente ao município de Caravelas (Bahia-Brasil). *Boletim Técnico Científico – CEPENE*. Tamandaré. 8:131-164.

Santos MCF, Silva JCR, Matos TA. 2007. Aspectos da biologia pesqueira do camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda, Penaeidae), em área de influência do terminal marítimo de Belmonte (Belmonte – Bahia, Brasil). *Boletim Técnico Científico – CEPENE*. Tamandaré. 15: 69-79.

Schubart CD, Neigel JE, Felder DL. 2000. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. *Crustacean Issues*. 12: 817– 830.

Silva AC, Fernandes LP, DI Beneditto APM. 2007. Biologia populacional do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) no litoral norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu. MG. Anais Caxambu.

Smith SI. 1869. Notice of the Crustacea collected by prof. C. F. Hartt on the coast of Brazil in 1867. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Science*. 2: 1-41.

Tauber CA, Tauber MJ, Nechols JR. 1977. Two Genes Control Seasonal Isolation in Sibling Species American Association for the Advancement of Science 197: 592-593.

Teodoro SSA, Terossi M, Mantelatto FL, Costa RC. 2016. Discordance in the identification of juvenile pink shrimp (*Farfantepenaeus brasiliensis* and *F. paulensis*: Family Penaeidae): An integrative approach using morphology, morphometry and barcoding. *Fisheries Research* 183: 244–253.

Vaseeharan B, Rajakamaran P, Jayaseelan D, Vincent A. 2012. Molecular markers and their application in genetic diversity of penaeid shrimp. *Aquaculture International*. 21.

Valles-Jimenez R, Cruz P, Perez-Enriquez R. 2005. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology* 6: 475-484.

Vergamini FG, Pileggi LG, Mantelatto FL. 2011. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contributions to Zoology* 80:67-83.

Weigand JrR, Lopes R. (editores). 2001. Reserva Extrativista Marinha de Itacaré: diagnóstico socioeconômico e ambiental da área proposta e das comunidades extrativistas beneficiárias. Itacaré: Grupo de trabalho pela criação da Reserva Extrativista Marinha de Itacaré; Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz, 142 p.

Wolstenholme DR. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. “In” *Mitochondrial Genomes* (eds. D.R. Wolstenholme E K.W. Jeon). San Diego. Academic Press 141: 173-216.

Zhang C, Zhang D, Zhu T, Yang Z. 2011. Evaluation of a Bayesian coalescent method of species delimitation. *Systematic Biology* 60:747–761.

Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A. 2013. A General Species Delimitation Method with Applications to Phylogenetic Placements. *Bioinformatics* 29: 2869-2876.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



6. CAPÍTULO 1



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Influência das divergências sazonais na variação genética de espécies do gênero *Xiphopenaeus* (Decapoda: Penaeidae)

SOMIRA S. DE SOUZA^{1*}, RENATA O. VASCONCELOS¹, LETICIA O. BARBOSA¹, JAMILLE DE A. BITENCOURT¹, MARCELO CERVINI¹, ANA K. DE FRANCISCO²

^{1*}Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e conservação, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Avenida José Moreira sobrinho, S/N.45205-490, Jequié, Bahia, Brasil

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Avenida José Moreira sobrinho, S/N.45205-490, Jequié, Bahia, Brasil.

Divergências sazonais em *Xiphopenaeus* (DECAPODA: PENAEIDAE)

*Correspondência do autor: solsouzabio@gmail.com

Resumo

O gênero *Xiphopenaeus* vem sendo caracterizado pela descoberta de novas espécies no Atlântico e o entendimento desse processo é de grande valia para a conservação das espécies. Dessa forma, o presente estudo objetivou analisar a diversidade genética temporal de *X. kroyeri* no litoral de Itacaré - BA, através de análises dos genes mitocondriais Citocromo Oxidase I (COI) e o 16S rRNA e comparar com as espécies descritas recentemente. Foram analisados indivíduos coletados nas diferentes estações do ano. Os resultados mostraram dois grupos na costa de Itacaré - BA (*X. sp1* e *X. sp2*). O grupo *X. sp1* corresponde a *X. kroyeri* e *X. sp2* corresponde à espécie descrita recentemente como *X. dincao*. De acordo com a análise temporal, pode-se verificar que a separação dessas duas espécies pode ser explicada pela divergência sazonal no ciclo reprodutivo, pois identificamos que *X. sp2* se reproduz durante o verão, enquanto *X. sp1* se reproduz nas demais estações. As informações aqui apresentadas, possuem extrema importância, visto que a espécie *X. dincao* possui período reprodutivo diferente da espécie *X. kroyeri*. As medidas de defeso podem não estar protegendo essa variedade genética. Por isso, esses resultados podem contribuir para criação de novas medidas de conservação e manejo das espécies de *Xiphopenaeus*.

Palavras-Chave: Alocronia - Camarões Decápodes - Ciclo reprodutivo - Conservação - DNA barcode – Defeso – Simpatría.

INTRODUÇÃO

Os camarões são organismos importantes para a natureza por atuarem na cadeia trófica e contribuírem para a estabilidade das comunidades bentônicas (Pires, 1992), além de serem fundamentais para a sobrevivência de muitas famílias, pois possuem grande relevância nas atividades sociais, econômicas (pesca) e culturais em todo o mundo (Lima & Velasco, 2012; MPA, 2014).

No Brasil, aproximadamente 40% da pesca inclui a espécie de camarão *Xiphopenaeus kroyeri* (FAO, 2014) conhecida como camarão sete-barbas, a qual distribui-se no Atlântico Ocidental, desde a Virgínia (Estados Unidos) até o Rio Grande do Sul (Brasil) (D’Incao 1999; Costa *et al.*, 2003; Simões *et al.*, 2010). Contudo, vários estudos têm relatado problemas com sua classificação taxonômica. De fato, trabalhos anteriores utilizando sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e análise de locos enzimáticos, identificaram a existência de dois clados na espécie, denominados *Xiphopenaeus* sp. 1 e *Xiphopenaeus* sp. 2 (Gusmão *et al.*, 2006). Posteriormente, espécies crípticas foram relatadas no gênero *Xiphopenaeus*, assim como uma segunda espécie na população do Atlântico denominada de *Xiphopenaeus* sp. II e encontrada em Caravelas (Brasil) (Piergiorgio *et al.*, 2014).

Um estudo mais recente confirmou a presença da espécie críptica *Xiphopenaeus* sp. 2 no Brasil, na Guiana Francesa, Suriname e Colômbia, demonstrando sua ampla distribuição geográfica. Os espécimes, foram diferenciados por características morfológicas encontradas em análises de microscopia eletrônica de varredura e óptica integrada com dados moleculares. Assim, a espécie *Xiphopenaeus* sp. 2/ *Xiphopenaeus* sp. II, corresponde a nova espécie *Xiphopenaeus dincao* (Carvalho-Batista *et al.*, 2020). Este estudo de Carvalho-Batista *et al.* (2020) também traz a descrição de uma terceira espécie denominada *Xiphopenaeus baueri*, a qual ocorre no Atlântico Norte e América do Sul.

O surgimento das espécies *X. riveti* e *X. Kroyeri*, bem como de outras espécies de animais marinhos pode ser explicado pelo surgimento do Istmo do Panamá. O Istmo do Panamá é uma faixa de terra que conecta as Américas do Norte e do Sul (Bacon *et al.*, 2015) e seu fechamento ocorreu durante o Plioceno causando o isolamento entre os Oceanos Atlântico e Pacífico. Este evento (fechamento do Istmo do Panamá), constitui uma das principais barreiras geográficas que impede o fluxo gênico entre os organismos

(Bowen e Karl, 2007). No entanto, estudos apontam a existência de variação temporal e espacial e variação na estrutura populacional de *X. kroyeri* ao longo de sua distribuição geográfica e também apresenta diferentes níveis de isolamento reprodutivo (Gruenthal *et al.*, 2007; Gusmão *et al.*, 2006).

A diversidade genética temporal pode ser um fator importante para explicar as variações encontradas e estudar esses processos, principalmente em animais de interesse econômico, como é o caso dessa espécie, é crucial para a criação de estratégias adequadas de manejo e conservação, além de contribuir para o conhecimento da biodiversidade (França *et al.*, 2019). Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar se a diversidade genética temporal pode influenciar na delimitação de espécies de *Xiphopenaeus*, utilizando os genes mitocondriais Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e o 16S rRNA.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material biológico

Foram analisados um total de 44 indivíduos da espécie *X. kroyeri*, coletados na cidade de Itacaré-BA (latitude 14° 16' 39" S e longitude 38° 59' 48" W). As coletas foram realizadas nos meses de março (verão), junho (outono), setembro (inverno) e dezembro (primavera), durante o ano de 2014. Para a realização das coletas foram utilizados barcos camaroneiros motorizados de pequeno porte equipados com redes de arrasto em profundidades entre 5 e 20 m. Cada arrasto durou em média quatro horas.

Após as coletas todos os indivíduos foram etiquetados, identificados, sexados, acondicionados em frascos contendo etanol 70% e armazenados no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Jequié. Todos os espécimes foram identificados como *Xiphopenaeus kroyeri* segundo a chave de classificação proposta por Costa *et al.* (2003).

Extração de DNA, PCR e Sequenciamento

Foi realizada a extração do DNA genômico da espécie *X. kroyeri* utilizando o kit de extração *Wizard Genomic DNA Purification* (PROMEGA) seguindo as normas do fabricante, em seguida as amostras foram quantificadas em gel de agarose 0,8 % e coradas com azul de bromofenol e GelRed (Invitrogen) na proporção de 3:1.

A região do DNA mitocondrial COI (citocromo c oxidase subunidade I) foi amplificada utilizando os *primers* universais LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') descritos por Folmer *et al.* (1994), enquanto que para a amplificação do gene 16S rRNA foi utilizado os *primers* 16Sar-5' (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e 16Sbr-3' (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (Palumbi, 1996). Ambas foram realizadas seguindo os passos descritos no protocolo de Jeffery *et al.* (2011), com algumas modificações. Para isso utilizou-se as concentrações de 2,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,05 mM de dNTP (Invitrogen), buffer 1x (Invitrogen – 10xPCR Buffer: 200mM Tris-HCl com pH 8.4, 500mM KCl), 1U de taq *platinum* (Invitrogen), 0,3µM de cada iniciador e 1 µl de DNA, tendo um volume final da reação de 12,5 µl.

As amplificações foram realizadas seguindo as seguintes condições: 1 ciclo de 94°C a 60 segundos (s), seguido de 5 ciclos de 94°C a 60 s; 45°C a 40 s e 72°C a 60 s, mais 35 ciclos de 94°C a 60 s; 51°C a 40 s e 72°C a 60 s e uma extensão final de 72°C a 5 min. Para a visualização dos produtos de PCR foi utilizado gel de agarose 1,2 %, os quais foram em seguida purificados com polietilenoglicol (PEG) 20%. As reações de sequenciamento (*forward e reverse*) foram realizadas com *Big Dye*v3.1 (*Applied Bio system*) e as amostras foram encaminhadas para a leitura em sequenciador automático na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal-SP.

Análise dos dados do DNA mitocondrial

Foram adquiridas as sequências consenso de cada indivíduo para os genes COI e 16S rRNA (tabela 1) a partir da edição e alinhamento realizados no programa *Bio Edit Sequence Alignment Editor* v.7.2.5 (Hall, 1999), utilizando a ferramenta *Clustal W Multiple Alignment*.

Para efeitos comparativos e para avaliar a real diversidade genética no gênero, foram adicionadas a análise 103 sequências de *Xiphopenaeus* referentes às espécies *X. kroyeri*, *X. riveti*, *X. dincao*, *X. baueri* e espécies sem identificação morfológica prévia mas inseridas nos BINs do gênero (Tabelas 2 e 3), provenientes das plataformas gratuitas online *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) (<https://v4.boldsystems.org/>) das mesmas regiões genômicas. Foram analisadas um total de 136 sequências para o gene COI e 51 sequências para o

16S rRNA, sendo que do presente estudo, foram 33 sequências do gene COI e 30 do 16S rRNA. Como grupo externo foi escolhido a espécie da família Penaeidae: *Solenocera crassicornis* (tabelas 2 e 3).

A árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) (Nei & Kumar, 2000), assim como as distâncias intra e interespecíficas calculadas para verificação da presença de *barcode gap* (entre as espécies Lineanas e as MOTUs aqui delimitadas), foram realizadas no software MEGA v. 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) com 1.000 réplicas de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), conforme preconizado na metodologia do DNA barcode.

Adicionalmente, foram realizadas as análises filogenéticas por meio da Inferência Bayesiana (BI) e Máxima Verossimilhança (ML) para verificar o grau de confiabilidade dos agrupamentos entre as sequências. A árvore gerada pela BI foi feita através do programa MrBayes on XSEDE e a ML pelo programa RAxML-HPC Black Box, com 1000 réplicas de *bootstrap*, ambos implementados na plataforma online CIPRES Science (<https://www.phylo.org/portal2>).

Os critérios de análise para a BI foram: duas séries independentes com 4 cadeias Markov e 10.000.000 de gerações, com 10% de burn-in e modelo de evolução nucleotídica HKY85 gama para o gene COI e 16S, obtidos no Kakusan v. 3.5 (Tanabe, 2007). O desempenho dessa análise foi verificado no programa Tracer v. 1.6 (Rambaut *et al.*, 2013) e as árvores geradas foram editadas nos programas FigTree v.1.4.2 (Rambaut, 2014) e Adobe Photoshop CC v.14.0 para a construção de uma árvore resumo.

Em seguida, os dados com ambas as regiões genômicas foram submetidos a análises de delimitação de Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) por meio dos algoritmos de delimitação de espécies: *Bayesian implementation of the PTP model* (bPTP) (Zhang *et al.*, 2013), *Phylogenetic Map PTP* (PhyloMap) (Zhang *et al.*, 2011), *Poison Tree Processes* (PTP) e *Multi-rate Poison Tree Processes* (mPTP) (Kapli *et al.*, 2017), *General Mixed Yule-Coalescent analysis multiple and simple* (mGMYC e GMYC) (Fujisawa & Barraclough, 2013). Para estas análises foi utilizado um subconjunto de dados contendo o seguinte: para haplótipos compartilhados com mais de dois indivíduos, foram escolhidos dois ou três indivíduos de um mesmo haplótipo e para haplótipos exclusivos, foi utilizado um indivíduo por haplótipo. Os haplótipos foram selecionados no DnaSP (DNA sequence Polymorphism) v. 5.10 (Rozas *et al.*, 2010).

Para os algoritmos bPTP, PhyloMap, PTP e mPTP foi utilizado uma árvore de ML como *input* nas respectivas plataformas da web <https://species.h-its.org/> e <https://mptp.h-its.org/#/tree>.

A análise do sGMYC e mGMYC foi realizada na plataforma *online* <https://species.h-its.org/gmyc/> e utilizou-se como arquivo de entrada uma árvore filogenética ultramétrica, obtida no BEAST 1.8.2 (Drummond *et al.*, 20123) segundo os critérios: modelo de substituição HKY para ambos os genes 16S e COI, relógio molecular estrito, taxa de mutação arbitrária (1,0 substituição/sítio/Ma), método de coalescência de Yule a priori, 10 milhões de gerações com amostragem a cada 1.000 gerações para o gene COI e para o 16S foi utilizado 50 milhões de gerações com amostragem a cada 5.000 gerações. Foi utilizado o programa Tracer v. 1.6 (Rambaut *et al.*, 2013) para verificar se os valores dos parâmetros Tamanho Efetivo da Amostra (ESS) ficaram acima de 200 e as árvores foram sumarizadas utilizando o programa Tree Anotator 1.8.2 (Rambaut & Drummond, 2015b).

Análises concatenadas

As sequências do presente estudo, COI e 16S combinadas numa única matriz utilizando o software SeaViewversion4 (Gouy *et al.*, 2010), foram submetidas às análises de *Neighbor-Joining*, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana, seguindo os mesmos critérios descritos para as regiões genômicas separadas. Em seguida foi adicionada sequências disponíveis no *GenBank* referentes ao trabalho de Carvalho-Batista *et al.* (2019) que incluiu espécies de *Xiphopenaeus* da costa do Brasil, seguindo os mesmos critérios descritos acima. Para o grupo externo foi adicionada sequências da espécie *Rimapenaeus constrictus* (Tabelas 2 e 3).

RESULTADOS

O alinhamento final das espécies de *Xiphopenaeus* incluiu 610 pares de bases (pb) para o gene COI e 560 pb para o 16S rRNA. Para melhor compreensão, os indivíduos coletados durante o inverno, outono e primavera foram denominados X. sp1 e os indivíduos coletados no verão foram denominados X. sp2. No entanto, ressalta-se que dois indivíduos coletados na primavera e um indivíduo coletado no outono, foi agrupado junto com os indivíduos do verão e por este motivo, foram considerados X.

sp2.

As árvores concatenadas dos genes COI e 16S rRNA de sequências do presente estudo mostraram a formação de dois grupos (*X. sp1*) e (*X. sp2*) apoiadas com 1 e 99 de suporte (BI e NJ, respectivamente) (fig. 4), mostrando a real separação dos indivíduos coletados durante o verão dos indivíduos coletados na demais estações.

As árvores ML, BI e NJ baseadas em sequências do gene COI do presente estudo e dos bancos de dados (GenBank/BOLD) compartilharam a mesma topologia, com valores de suporte ≥ 99 de *bootstrap* e ≥ 0.99 de probabilidade posterior (Fig. 5). Em todos os três métodos foram delimitadas cinco espécies, sendo que *X. sp1* foi agrupada com *X. kroyeri* com valores máximos de suporte (1 e 100%), enquanto *X. sp2* se agrupou com *X. dincao* com 100% na ML, 99 na NJ e 1 na BI, embora a maioria dos indivíduos de *X. sp2* tenham formado um subgrupo, o suporte foi baixo. A espécie *X. riveti* formou duas linhagens distintas com altos valores de suporte em todas as análises (1 e 100%) e *X. baueri* também foi confiavelmente delimitada em todas as análises com altos valores de suporte (100% na ML, 99 na NJ e 1 na BI). Ressalta-se que os indivíduos identificados como *Penaeidae* sp. (BOLD), foram agrupados com *X. kroyeri* + *X. sp1* e apoiados por quatro algoritmos, exceto pelo mGMAYC e mPTP, portanto sugere-se que esses indivíduos pertencem a espécie *X. kroyeri* (fig. 5).

Os algoritmos PTP, bPTP, GMYC e PhyloMap apoiaram o agrupamento formado por *X. kroyeri* e *X. sp1* (fig. 5), contudo, o suporte para o algoritmo bPTP foi de apenas 0.701. O algoritmo mGMYC apoiou um agrupamento formado pela maioria dos indivíduos de *X. kroyeri* + *X. sp1*, no entanto alguns indivíduos de *X. kroyeri* foram separados em três linhagens distintas. As duas linhagens de *X. riveti* (L1 e L2) foram apoiadas por todos os algoritmos, exceto pelo mPTP. O agrupamento formado por *X. sp2* + *X. dincao* foi apoiado pelos algoritmos GMYC e mGMYC, no entanto o subgrupo com a maioria dos indivíduos de *X. sp2* foram separados desse agrupamento pelos algoritmos PTP, bPTP e PhyloMap, porém no algoritmo bPTP, o suporte foi baixo (0.680). A espécie *X. baueri* também foi apoiada por todos os algoritmos, exceto pelo mPTP (fig. 5).

Para o gene rRNA 16S, as árvores de ML, BI e NJ compartilharam a mesma topologia, com valores de suporte ≤ 92 de *bootstrap* e ≥ 0.98 de probabilidade posterior (fig. 6). Em todos os três métodos foram delimitadas 4 espécies, no entanto, todos os indivíduos de *X. sp2* foram agrupados com *X. dincao*. A espécie *X. riveti* apresentou baixo suporte para o gene 16S rRNA e um indivíduo adquirido do GenBank,

identificado morfologicamente como *X. kroyeri*, foi agrupado com a espécie *X. baueri*, na época em que a sequência foi depositada no banco de dados (2008), a espécie *X. baueri* ainda não havia sido descrita, portanto, este indivíduo pertence a *X. baueri* suportada por 1 de probabilidade posterior e pelos algoritmos PTP e PhyloMAp (fig. 6).

Os algoritmos de delimitação GMYC e mGMYC apoiaram *X. kroyeri* + *X. sp1*, enquanto que os algoritmos PTP e PhyloMAp apoiaram *X. sp2* + *X. dincao* (fig. 6). O Algoritmo bPTP apoiou todas as 4 espécies formadas pela ML, BI e NJ, no entanto, um indivíduo de *X. sp1*, um indivíduo de *X. sp2* e um indivíduo de *X. baueri* foram separados de seus respectivos grupos, porém o suporte foi baixo (0.609, 0.615 e 0.615, respectivamente) (fig. 6).

As árvores concatenadas dos genes COI e 16S rRNA de espécimes do presente estudo com sequências de Carvalho et al. (2019) confirmam os agrupamentos formado por *X. sp1* + *X. kroyeri* e *X. sp2* + *X. dincao*, sendo que, *X. sp1* + *X. kroyeri* foram apoiadas com 0.99 e 100 de suporte (BI e NJ, respectivamente) e *X. sp2* + *X. dincao* com 0.99 de probabilidade posterior e 99 de bootstrap. Embora separadas, o suporte que agrupa *X. sp2* + *X. Dincao* é maior que o suporte que as separam (89 na ML, 0.96 na BI e 97 na NJ). As espécies *X. riveti* (0.99-BI) e *X. baueri* (99-ML/NJ, 1-BI) também foram bem apoiadas (fig. 7).

As distâncias genéticas intraespecíficas para o gene COI, com base nos agrupamentos formados na árvore (fig. 5) variaram de 0% para *X. dincao* e *X. riveti* L1a 0.2% em *X. Kroyeri*, com uma média de 0.1%. A distância interespecífica mínima foi de 1.5% entre *X. dincao* e *X. sp2* e a máxima foi 14.4% entre *X. baueri* e *X. kroyeri*, obtendo uma média de 12.1% (tabela 4).

Para o gene 16SrRNA, com base nos agrupamentos formados na árvore (fig. 6), a distância intraespecífica variou de 0.1% para as espécies *X. kroyeri* e *X. dincao* a 0.9% para *X. riveti* obtendo uma média de 0.3%. A distância interespecífica variou de 1.4% entre *X. kroyeri* e *X. riveti* a 4.4% entre *X. baueri* e *X. riveti* com uma média de 8.3% (tabela 5). Ambos os genes COI e rRNA 16S apresentaram valores médios de distâncias interespecífica superior a 10 vezes a média intraespecífica caracterizando a presença de *barcode gap*.

DISCUSSÃO

Através das análises realizadas no presente estudo com gene COI e 16S rRNA, verificamos que *X. sp1* corresponde a *X. kroyeri* e *X. sp2* corresponde a espécie críptica identificada por Gusmão *et al.* (2006) (*Xiphopenaeus* sp. 2) e descrita por Carvalho-Batista *et al.* (2020) como *X. dincao*. No estudo de Carvalho-Batista *et al.* (2019), os autores reavaliaram o gênero *Xiphopenaeus* e descreveram duas novas espécies (*X. dincao* e *X. baueri*) (Carvalho-Batista *et al.*, 2020), dessa forma, o gênero *Xiphopenaeus* passou a ser constituído por quatro espécies descritas (*X. dincao*, *X. baueri* e *X. kroyeri*) do Atlântico e (*X. riveti*) do Pacífico.

De acordo com Gusmão *et al.* (2006), as espécies *Xiphopenaeus* sp. 2 e *X. riveti*, assim como as espécies *X. kroyeri* e *X. riveti*, foram isoladas devido à elevação do Istmo do Panamá durante o Plioceno e, neste período, um ancestral do Atlântico deu origem a *X. riveti*. Assim, a maioria dos estudos explicam que a especiação em camarões peneídeos ocorre devido ao surgimento de barreiras geográficas (Gusmão *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2019). No entanto, o presente estudo mostra que a divergência sazonal também contribui para a diferenciação genética das espécies. No estudo de Carvalho-Batista *et al.* (2019), os autores reafirmam a diferenciação das espécies *X. kroyeri* x *X. riveti* e *X. kroyeri* x *X. baueri* (nova sp.) pelas diversas aberturas e fechamentos do Istmo do Panamá.

Nossos resultados mostraram que o Gene COI foi eficiente para a separação dos grupos, visto que a distância genética intraespecífica média (0.1%) foi menor do que a distância média interespecífica (12.1%), caracterizando a presença de *barcode gap*. A menor distância interespecífica foi entre o subgrupo formado por alguns indivíduos de *X. sp2* e *X. dincao* (1.5%). No estudo de Carvalho-Batista *et al.* (2019), as menores distâncias genéticas interespecíficas foi de 2.7 a 3.3% entre *X. dincao* e *X. baueri*, ou seja, maiores do que a menor distância interespecífica encontrada no presente estudo. Dessa forma, verifica-se que *X. sp2* e *X. dincao* representa uma mesma unidade taxonômica.

De acordo com Carvalho-Batista *et al.* (2019), as maiores distâncias interespecíficas foi de 12.9 a 13.5% entre *X. kroyeri* e *X. riveti* (P2). No presente estudo, a maior distância interespecífica foi entre os grupos formados por *X. kroyeri* + *X. sp1* e *X. baueri* (14.4%) e também entre *X. kroyeri* + *X. sp1* e *X. dincao* (11.1%).

O gene 16S rRNA, também apresentou o limiar de *barcode gap*, tendo a distância média interespecífica (8.3%) superior a 10 vezes a média intraespecífica (0.3%). A menor distância intraespecífica foi de 0.1% em *X. kroyeri* e a maior foi de

0.9% em *X. riveti*. As distâncias genéticas encontradas por Carvalho-Batista *et al.* (2019), para o gene 16S rRNA, dentro dos grupos, variaram de 0 a 0.4%. Vale ressaltar que as duas linhagens de *X. riveti* (L1 e L2) foram colocadas no mesmo grupo, por isso a distância genética dentro desse grupo foi maior do que o encontrado no trabalho de Carvalho-Batista *et al.* (2019) para este gene.

Ainda de acordo com Carvalho-Batista *et al.* (2019), as distâncias genéticas interespecíficas menores para o gene 16S rRNA, foram entre *X. kroyeri* e *X. riveti* (P1) (1.0 – 1.2%) e as maiores foram entre *X. baueri* e *X. riveti* (P2) (3.2 – 3.6%), corroborando com nossos resultados, onde a menor distância interespecífica foi entre *X. kroyeri* + *X. sp1* e *X. riveti* (1.4%) e as maiores foram entre *X. baueri* e *X. riveti* (4.4%). Semelhantemente, a distância entre os grupos formados por *X. kroyeri* + *X. sp1* e *X. dincao* + *X. sp2* foi de 3.7%. Assim, tanto o COI, como o 16S rRNA, corroboram a separação de todas as espécies do gênero *Xiphopenaeus* nas análises de ML, BI e NJ.

No presente trabalho, verificou-se que a divergência genética encontrada entre *X. sp2* (*X. dincao*) e *X. sp1* (*X. kroyeri*), está relacionada ao padrão no ciclo reprodutivo do gênero *Xiphopenaeus*, visto que os indivíduos de *X. sp2* foram coletados durante o verão e *X. sp1* foram coletados nas demais estações (primavera, outono e inverno). Segundo Dall *et al.* (1990), *Xiphopenaeus* apresenta ciclo reprodutivo denominado como tropical/subtropical, tendo alternância nos picos reprodutivos da primavera com picos do outono, e que, neste caso, os indivíduos que desovam na primavera contribuem para o estoque de outono, mas, os indivíduos que desovam no outono não contribuem para o estoque da primavera. Os principais picos reprodutivos encontrados no presente estudo para *X. sp1* e *X. sp2* corrobora com os dados de Santos & Ivo (2000); Graça-Lopes *et al.* (2007) e Martins *et al.* (2013) onde os autores descrevem dois principais picos reprodutivos para o camarão sete-barbas, sendo um no verão e o outro na primavera. No entanto, nos estudos de Branco (2005) um dos picos reprodutivos de *X. kroyeri*, em Itapocoroy (SC) ocorre durante o outono.

As espécies *X. kroyeri* e *X. dincao* apresentam sobreposição em sua distribuição geográfica. Essa distribuição foi relatada, primeiramente, em Natal (RN) e Ubatuba (SP), e posteriormente, em Cananéia (SP) e Caravelas (BA) pelos autores Gusmão *et al.* (2006); Piergiorgio *et al.* (2014) e Carvalho-Batista *et al.* (2019). No presente estudo essas duas espécies foram coletadas em diferentes estações do ano na costa de Itacaré-BA. A variação genética somada ao padrão na sazonalidade reprodutiva, revela que as divergências encontradas entre as duas espécies são oriundas de variação reprodutiva

sazonal que levaram a um isolamento reprodutivo, ou seja, especiação simpátrica aloclônica, visto que o ambiente marinho da cidade de Itacaré-BA, em que os indivíduos coexistem não possui barreira geográfica ou física.

Nos estudos de Tauber *et al.* (1977) ao analisar duas populações de insetos que vivem em simpatria (*Chrysopa carnea* e *Chrysopa downesi*), os autores evidenciam que estas duas espécies se hibridizam em condições de laboratório, mas na natureza há isolamento reprodutivo devido às diferenças nos períodos sazonais. Seus resultados comprovaram que o isolamento sazonal entre *Chrysopa carnea* e *Chrysopa downesi* refletem em pequenas diferenças genéticas.

A especiação simpátrica oriunda do ciclo reprodutivo sazonal em *X. kroyeri* e *X. dincao* pode ser explicada por fatores ambientais que impedem a reprodução entre os indivíduos, por exemplo, Jackson & Burford, (2003), verificaram que o desenvolvimento das larvas da espécie de camarão *Penaeus semisulcatus* entre os estágios de náuplio e mysis I, foi influenciado pela temperatura. Quando expostas a temperaturas entre 20 a 32°C as larvas cresceram mais rápido sob temperaturas mais altas. Preston (1985), analisou três espécies de peneídeos, *Melicerus plebejus*, *Metapenaeus macleayie* e *Metapenaeus bennettiae*, e verificou que em temperaturas mais altas (34°C) os estágios de náuplio I e protozoa I levaram menos tempo (entre 30 e 32 horas) para completar seu desenvolvimento, enquanto que, em temperaturas menores (19°C), levaram cerca de 66 e 72 horas. Visto estas características de atraso ou aceleração nos estágios iniciais do desenvolvimento em camarões marinhos, este comportamento pode ocorrer em *Xiphopenaeus* influenciando no ciclo reprodutivo, favorecendo, dessa maneira, a especiação simpátrica devido a reprodução sazonal.

A partir das variações sazonais existentes no ciclo reprodutivo para o gênero *Xiphopenaeus*, os nossos resultados indicam que os dois grupos (*X. sp1* e *X. sp2*), foram isolados pelos dois períodos reprodutivos, sendo que *X. sp2* se reproduz apenas no verão, pois a temperatura da água acelera a maturação e *X. sp1* se reproduz nos outros períodos do ano, tendo a maturação mais lenta, favorecendo a especiação simpátrica por incompatibilidade no período reprodutivo. Ou seja, um grupo pode representar os indivíduos que apresentam pico reprodutivo na primavera e o outro, os que se reproduzem no verão. No entanto, nota-se que alguns indivíduos da primavera e do outono foram agrupados com indivíduos do verão, estes indivíduos podem ter sido capturados no momento da pesca ao se dispersarem do estoque.

Considerando que *X. sp2* possui um período reprodutivo no verão, no litoral de

Itacaré - BA, o período de defeso estipulado (1º de abril a 15 de maio - outono), não abrange esses organismos. No entanto os indivíduos de *X. sp1* são protegidos pelo período de defeso estipulado que vai de 15 de setembro a 31 de outubro (primavera). Matos, 2013 encontrou períodos reprodutivos do camarão sete-barbas na primavera e no verão na Armação do Itapocoroy, Penha, SC, segundo a autora, os períodos de defeso estabelecidos para a região é de 1º de março a 31 de maio e a legislação vigente não contempla os estoques pesqueiros de camarões do verão, abrangendo apenas os do outono.

Dessa forma fica evidente a importância deste trabalho na região de Itacaré – BA, onde fornecemos dados sobre a genética temporal em *Xiphopenaeus*, além de relatarmos, pela primeira vez, a espécie *X. dincao*, nesta região. Fica também a ressalva da importância da realização de mais estudos sobre a biologia e pesca da espécie *X. dincao* na região, uma vez que estes camarões são alvos de pesca juntamente com *X. kroyeri* e o não reconhecimento destas espécies distintas, pode levar a perda da diversidade genética ou até mesmo a extinção local.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao programa de pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pelo espaço para realização da pesquisa; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (FAPESB) pela bolsa concedida; aos pescadores de Itacaré-BA pelas coletas e Jarlan S. de Souza pela contribuição na leitura e organização do artigo.

REFERÊNCIAS

Baldwin JD, Bass AOL, Bowen BW, Clark WH. 1998. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. *Molecular Phylogenetics Evolution* 10: 399–407.

Branco JO. 2005. Biologia e pesca do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) (Crustacea, Penaeidae), na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22: 1050–1062.

Bacon CD, Silvestro D, Jaramillo C, Smith BT, Chakrabarty P, Antonelli A. 2015. Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 6110–6115.

BOWEN B W, KARL SA. 2007. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology*. 16: 4886 – 4907.

Campos BR, Dumont LFC, D’Incao F, Branco JO. 2009. Ovarian development and length at first maturity of the sea-bob-shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) based on histological analysis. *Nauplius* 17:9-12.

Carvalho-Batista A, Terossi M, Zara FJ, Mantelatto FL, Costa RC. 2019. A multigene and morphological analysis expands the diversity of the seabod shrimp *Xiphopenaeus* Smith, 1869 (Decapoda: Penaeidae), with descriptions of two new species. *Scientific Reports Nature Research* 9:15281.

Carvalho-Batista A, Terossi M, Zara FJ, Mantelatto FL, Costa RC. 2020. Validation of *Xiphopenaeus dincao* Carvalho-Batista, Terossi, Zara, Mantelatto e Costa and *Xiphopenaeus baueri* Carvalho-Batista, Terossi, Zara, Mantelatto e Costa (Decapoda: Penaeidae) from western Atlantic. *Zootaxa* 4772: 597–599.

Castilho AL, Costa RC, Fransozo A, Boschi EE. 2007. Reproductive pattern of the South American endemic shrimp *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae), off the coast of São Paulo state, Brazil. San José. *International Journal of Tropical Biology and Conservation* 55: 39-48.

Costa RC, Fransozo A, Melo GAS, Freire FAM. 2003. Chave ilustrada para identificação dos camarões Dendrobranchiata do litoral do estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* 3:1 – 12.

Costa FO, Waard JR de, Boutillier J, Ratnasingham S, Dooh RT, Hajibabaei M, Hebert PDN. 2007. Biological identifications through DNA barcode: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatics Sciences* 64: 272-295.

Dall W, Hill BJ, Rothlisberg PC, Staples DJ. 1990. The biology of the Penaeidae, In: Blaxter JHS, Southward AJ. London, Academic Press. *Advances in Marine Biology* 27: 1-489.

D’Incao, F. 1999. Subordem Dendrobranchiata (camarõesmarinhos). 275-299.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian hylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. 29: 1969–1973.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture: opportunities and challenges. Rome. E-ISBN 978-92-5-108276-8 p243.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.

França FFC, Moraes AB de, Carvalho-Batista A, Melo MCRB de, Greco-Lopes L, Mantelatto FL, Freire FA de M. 2019. *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967) and *F. brasiliensis* (Latreille, 1817) (Decapoda, Penaeidae): Ontogenetic comparison using the combined analysis of secondary sexual characters and molecular markers. *Fisheries Research* 216: 89–95.

Fransozo V, Santos DC dos, López-Greco, LS, Júnior, EAB. 2011. Development of secondary sexual characters in the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller 1862) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae): a scanning electron microscope study. *Invertebrate Reproduction and Development* 55: 37-41.

Fujisawa T, Barraclough TG. 2013. Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. *Systematic Biology* 62: 707–724.

Graça-Lopes R, Santos EP, Severino-Rodrigues E, Braga FMS, Puzzi A. 2007. Aportes ao conhecimento da biologia e da pesca do camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri* Heller, 1862) no litoral do Estado de São Paulo, Brasil. *Boletim Instituto da Pesca* 33: 63-84.

Gruenthal KM, Acheson, LK, Burton, RS. 2007. Genetic structure of natural populations of California red abalone (*Haliotis rufescens*) using multiple genetic markers. *Marine Biology* 152: 1237–1248.

Gusmão J, Solé-Cava A.M. 2002. Um sistema de diagnóstico molecular para a identificação de espécies comerciais de camarões marinhos brasileiros. I CONGRESO IBERO AMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA. (<http://www.civa2002.org>). 754-764.

Gusmão J, Lazoski C, Monteiro FA, Solé-Cava AM. 2006. Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. *Marine Biology* 149: 491 – 502.

Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27: 221-224.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *NucleicAcids. Symposium. Series.* 41: 95-98.

IBAMA 2007. Estatística da pesca 2007 - Brasil: grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, 113p. Acesso em: <10 de Nov. de 2019> Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/documentos-recursos-pesqueiros/estatistica-pesqueira>.

Jackson CJ, Burford MA. 2003. The effects of temperature and salinity on growth and survival of larval shrimp *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeoidea). *Journal of Crustacean Biology* 23: 819-826.

Jeffery, NW, Elías-Gutiérrez M, Adamowicz SJ. 2011. Species Diversity and Phylo geographical Affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba,

Canadá. PLoS ONE 6: e18364.

Kapli P, Lutteropp S, Zhang J, Kobert K, Pavlidis P, Stamatakis A, Flouri T. 2017. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics* 33:1630–1638.

Kerkhove TRH, Boyen J, Backer A de, Mol JH, Volckaert FAM, Leliaert F, Troch M de. 2019. Multilocus data reveal cryptic species in the Atlantic seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea: Decapoda). *Biological Journal of the Linnean Society*. 127: 847–862.

Lima BB, Velasco G. 2012. Estudo piloto sobre autoconsumo de pescado entre pescadores artesanais do estuário da Lagoa dos Patos, RS, BRASIL. *Boletim do Instituto de Pesca* 38: 357 – 367.

Marko PB. 2002. Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the Isthmus of Panama. *Molecular Biology Evolution* 19: 2005-2021.

Martins AS, Pinheiro HT, Leite-Júnior N de O. 2013. Biologia reprodutiva do camarão sete-barbas no litoral centro Sul e Sul do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca* 39: 205 – 215.

Matzen da SJ, Creer S, dos Santos A, Costa AC, Cunha MR, Costa FO, Carvalho GR. 2011. Systematic and Evolutionary Insights Derived from mtDNA COI Barcode Diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). PLoS ONE 6: e19449.

MPA - MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2014. Pesca artesanal brasileira. Aspectos conceituais, históricos, institucionais e prospectivos. Embrapa Pesca e Aquicultura ISSN 2358-6273.

Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University. p.103.

Palumbi SR. 1996. Microspatial genetic structure and speciation in marine taxa with high dispersal abilities. In: *Molecular Zoology, Advances, Strategies and Protocols*, Ferraris JD, Palumbi SR. edição New York, NY: Wiley-Liss. 101–117.

Pérez-Farfante I, Kensley B. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera - *Mémoires du Muséum National d'Histoire naturelle* 175: 1-233.

Piergiorgio RM, Pontes MN, Duarte AVB, Gusmão J. 2014. Haplotype-Specific Single Locus Multiplex PCR Assay for Molecular Identification of Sea-bob Shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862), cryptic species from the Southwest Atlantic using a DNA pooling strategy for simultaneous identification of multiple samples. *Biochemical Systematics and Ecology*. 54: 348-353.

Preston N. 1985. The effects of temperature and salinity on survival and growth of larval *Penaeus plebejus*, *Metapenaeus macleaya* and *M. bennettiae*. In: Rothlisberg PC,

Hill BJ, Staples DJ. Second Australian National Prawn Seminar (NPS2), Cleveland, Australia 31-40.

Pires AMS. 1992. Structure and dynamics of benthic megafauna on the continental shelf offshore of Ubatuba, southeastern, Brazil. *Marine Ecology Progress Series* 86: 63-76.

Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G. 2012. ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21: 1864-1877.

Rambaut A, Suchard MA, Xie W, Drummond AJ. 2013. Tracer v.1.6.0: MCMC Trace Analysis Tool. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.

Rambaut A. 2014. Figtree, a graphical viewer of phylogenetic trees. 1.4.2 ed. Edinburgh: The author, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.

Rambaut A, Drummond AJ. 2015b. Tree Annotator v1.8.2: MCMC Output analysis. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.

Rocha SS da, Barbosa R de J. 2017. Population biology of *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Decapoda, Palaemonidae) from an artificial pond in Bahia, Brazil. *Nauplius The Journal of the Brazilian Crustacean Society* 25: 2353-2936.

Rozas J, Librado P, Sánchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2010. DnaSP, DNA Sequence Polymorphism version 5.10. Universitat de Barcelona. <http://www.ub.edu/dnasp/>.

Santos MCF, Ivo CTC. 2000. Pesca, biologia e dinâmica populacional do camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae), capturado em frente ao município de Caravelas (Bahia-Brasil). *Boletim Técnico-Científico CEPENE*, Tamandaré 8:131-164.

Santos MCF, Silva CGM da. 2008. Aspectos biológicos do camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (CRUSTACEA, DECAPODA, PENAEIDAE), no Município de Caravelas (Bahia – Brasil). *Boletim Técnico-Científico do Cepene*. Tamandaré – PE. 16: 85-97.

Simões SM, Costa RC, Fransozo A, Castilho AL. 2010. Diel variation in abundance and size of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea, Penaeoidea) in the Ubatuba region, Southeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 82.

Tauber CA, Tauber MJ, Nechols JR. 1977. Two Genes Control Seasonal Isolation in Sibling Species American Association for the Advancement of Science. 197: 592-593.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Tanabe AS. 2007. KAKUSAN: A computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Molecular Ecology Notes* 7: 962 – 964.

Teodoro SSA, Terossi M, Mantelatto FL, Costa RC. 2016. Discordance in the identification of juvenile pink shrimp (*Farfantepenaeus brasiliensis* and *F. paulensis*: Family Penaeidae): An integrative approach using morphology, morphometry and barcoding. *Fisheries Research* 183: 244–253.

Zacharia S, Kakati, VS. 2004. Optimal salinity and temperature for early developmental stages of *Penaeus monodon* De man. *Aquaculture* 232: 373–382.

Zhang C, Zhang D, Zhu T, Yang Z. 2011. Evaluation of a Bayesian coalescent method of species delimitation. *Systematic Biology* 60:747–761.

Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bio informatics* 29: 2869–2876.

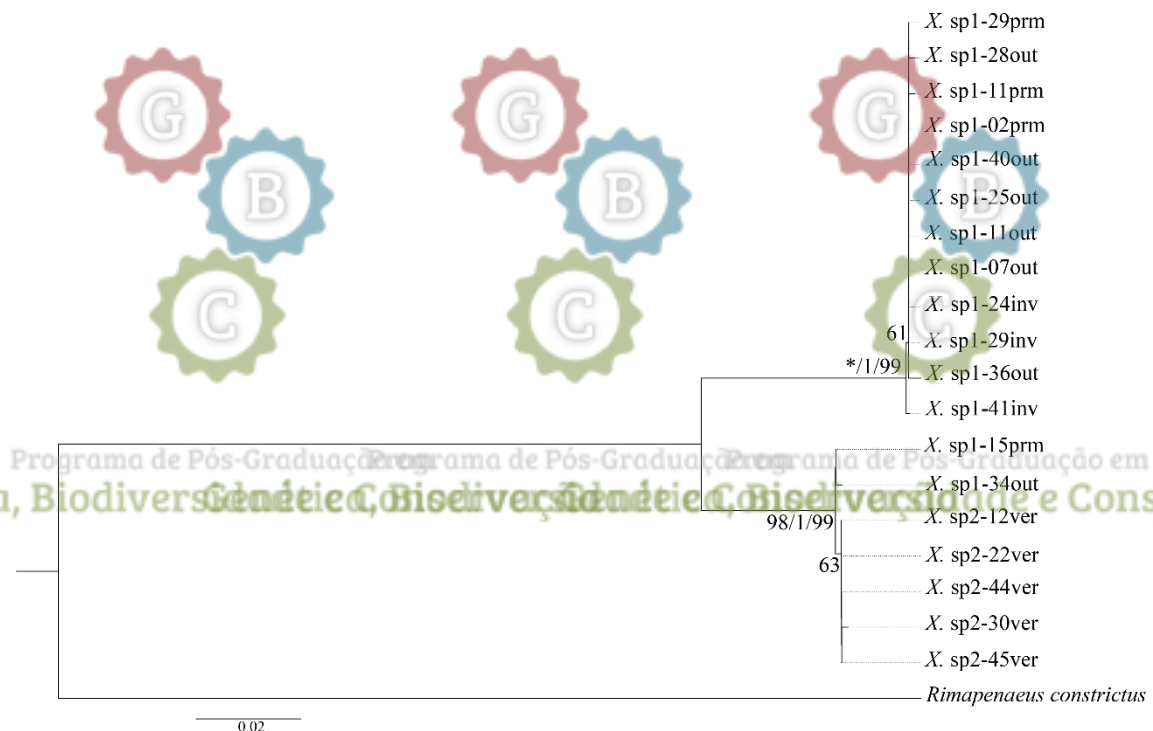


Figura 4. Árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) concatenada baseada em sequências dos genes mitocondriais Citocromo Oxidase subunidade I (COI) e 16S rRNA de espécimes de *Xiphopenaeus* do litoral de Itacaré-BA, seguindo o modelo de evolução nucleotídica Kimura-2-paramêtos. Os números nos ramos são os valores de suporte de ML, BI e NJ, respectivamente.

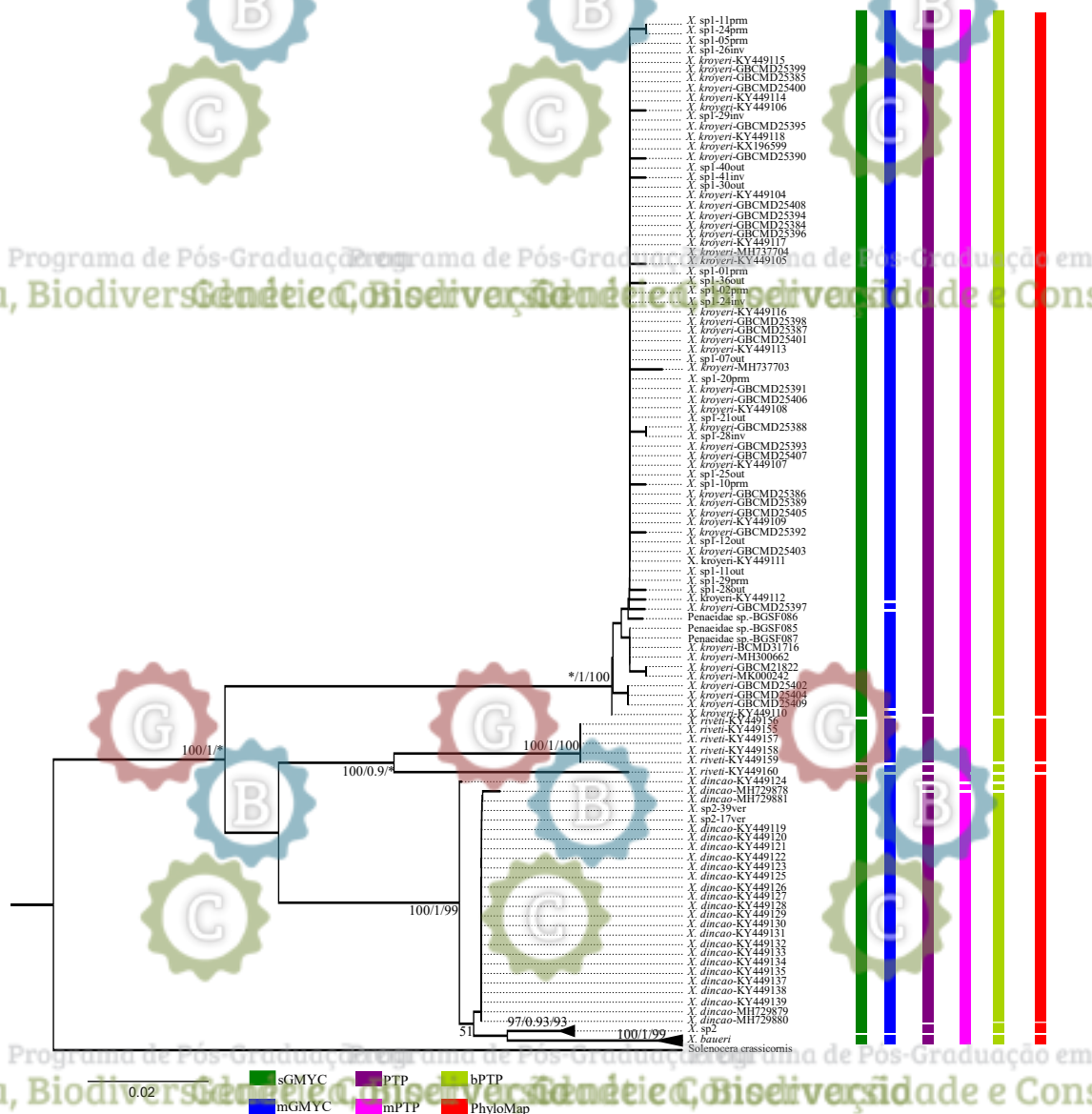


Figura 5. Árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) baseada em seqüências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) de *Xiphopenaeus*, seguindo o modelo de evolução nucleotídica Kimura-2-paramêtros. Os números nas bases dos ramos são os valores de *bootstrap* de ML, BI e NJ, respectivamente. Valores de suporte menores que 50 não foram amostrados. As barras verticais indicam a delimitação das espécies de acordo com os algoritmos. Os asteriscos indicam que não houve suporte para aquele grupo. X. sp2 são seqüências coletadas durante o verão e X. sp1 foram seqüências coletadas nas demais estações.

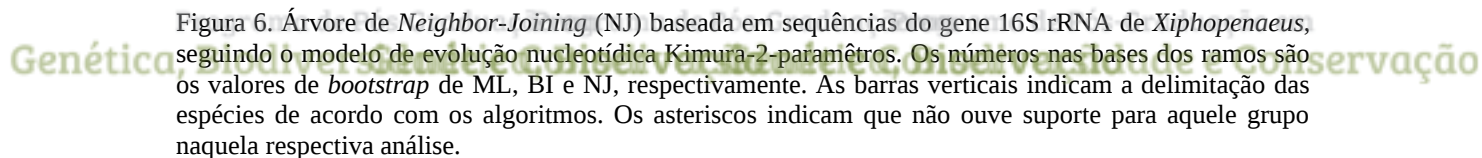


Figura 6. Árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) baseada em sequências do gene 16S rRNA de *Xiphopenaeus*, seguindo o modelo de evolução nucleotídica Kimura-2-parâmetros. Os números nas bases dos ramos são os valores de *bootstrap* de ML, BI e NJ, respectivamente. As barras verticais indicam a delimitação das espécies de acordo com os algoritmos. Os asteriscos indicam que não houve suporte para aquele grupo naquela respectiva análise.

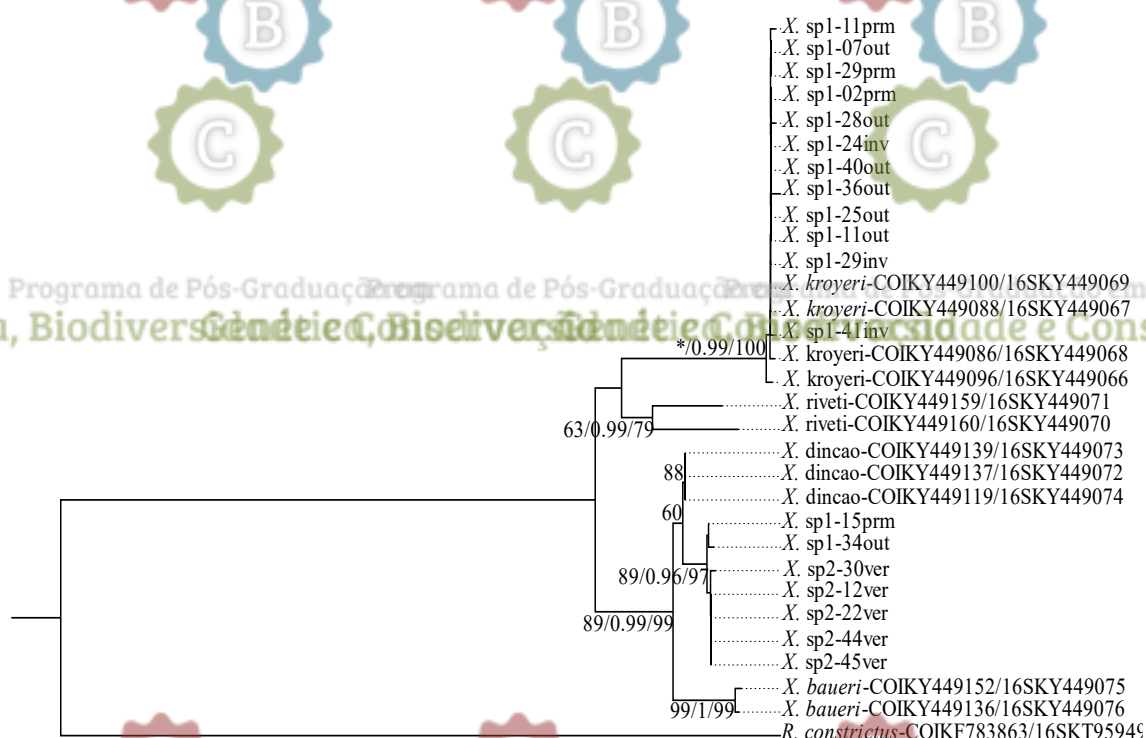


Figura 7. Árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) concatenada baseada em sequências do gene Citocromo Oxidase I (COI) e 16S rRNA de espécimes do presente estudo e de Carvalho-Batista *et al.* (2019) de *Xiphopenaeus*, seguindo o modelo de evolução nucleotídica Kimura-2-paramêtros. Os números nas bases dos ramos são os valores de *bootstrap* de ML, BI e NJ, respectivamente.

Tabela 1 – Códigos dos espécimes de *Xiphopenaeus kroyeri* utilizados nas análises dos genes 16S rRNA e Citocromo Oxidase subunidade I (COI) do presente estudo.

Verão	Outono			Inverno			Primavera				
COI	16S	COI	16S	COI	16S	COI	16S				
03ver	-	X	07out	X	X	19inv	-	X	01prm	X	-
04ver	-	X	11out	X	X	24inv	X	X	02prm	X	X
12ver	X	X	12out	X	-	26inv	X	-	05prm	X	-
17ver	X	-	21out	X	-	28inv	X	-	09prm	-	X
21ver	-	X	25out	X	X	29inv	X	X	10prm	X	-
22ver	X	X	28out	X	X	33inv	-	X	11prm	X	X
28ver	X	-	30out	X	-	38inv	-	X	14prm	X	-
30ver	X	X	34out	X	X	39inv	-	X	15prm	X	X
39ver	X	-	36out	X	X	41inv	X	X	20prm	X	-
40ver	-	X	40out	X	X	42inv	-	X	24prm	X	-
44ver	X	X				45inv	-	X	29prm	X	X
45ver	X	X									
Total	8	9	10	7	5	9	10	5			

Legenda: X região amplificada; - região não amplificada

Tabela 2. Espécies do gênero *Xiphopenaeus* adquiridas do BOLD e GenBank para o gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e seus respectivos números de acesso, locais de coleta e referências.

Espécies	Acesso BOLD/GenBank	Local de Coleta	Autores
<i>X. kroyeri</i>	GBCM19981-19; GBCM19982-19; GBCM19983-19.	Egypt: Mediterranean Sea	Abbas E & Sharawy Z
<i>Penaeidae</i> sp.	BGSF085-15; BGSF086-15; BGSF087-15.	Germany	Guenther <i>et al.</i>
<i>X. kroyeri</i>	GBCM21822-19	Germany	Spielmann G.
<i>X. kroyeri</i>	GBCMD25392-19; GBCMD25396-19; GBCMD25395-19; GBCMD25394-19; GBCMD25393-19.	Brasil: Aracaju, SE	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	GBCMD25384-19; GBCMD25391-19; GBCMD25390-19; GBCMD25389-19; GBCMD25388-19; GBCMD25387-19; GBCMD25386-19; GBCMD25385-19.	Brasil: Ubatuba, SP	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	GBCMD25406-19; GBCMD25408-19; GBCMD25407-19.	Brasil: Macaé, RJ	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	GBCMD25397-19; GBCMD25405-19; GBCMD25404-19; GBCMD25403-19; GBCMD25402-19; GBCMD25401-19; GBCMD25400-19; GBCMD25399-19; GBCMD25398-19.	Brasil: Baía Formosa, RN	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	GBCMD25409-19	Brasil: Marataízes, ES	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	GBCMD31716-19	-	Spielmann G.
<i>X. dincao</i>	MH729880.1; MH729878.1; MH729879.1; MH729881.1	Brasil: Baía Formosa, RN	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. riveti</i>	KY449160.1; KY449155.1; KY449156.1; KY449157.1; KY449158.1; KY44915.1	Mexico: Tehuantepec, Oaxaca	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. dincao</i>	KY449119.1; KY449129.1; KY449128.1; KY449127.1; KY449125.1; KY449124.1; KY449123.1; KY449122.1; KY449121.1; KY449120.1.	Brasil: Maragogi, AL	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. dincao</i>	KY449119.1; KY449129.1; KY449128.1; KY449127.1; KY449125.1; KY449124.1; KY449123.1; KY449122.1; KY449121.1; KY449120.1.	Brasil: Maragogi, AL	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. dincao</i>	KY449130.1; KY449135.1; KY449134.1; KY449133.1; KY449132.1; KY449131.1	Brasil: Cananéia, SP	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. baueri</i>	KY449136.1	Brasil: Oiapoque, AP	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. dincao</i>	KY449137.1	Brasil: Oiapoque, AP	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. dincao</i>	KY449138.1; KY449139.1	Brasil: Vigia, PA	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)

<i>X. baueri</i>	KY449140.1	Brasil: Vigia, PA	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. baueri</i>	KY449141.1; KY449149.1; KY449148.1; KY449147.1; KY449146.1; KY449145.1; KY449144.1; KY449143.1; KY449142.1.	México: Tabasco	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. baueri</i>	KY449150.1; KY449151.1.	México: Carmen, Campeche	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. baueri</i>	KY449152.1; KY449153.1; KY449154.1	EUA: Galveston, Texas	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	KY449118.1; KY449112.1; KY449113.1; KY449114.1; KY449115.1; KY449116.1; KY449117.1	Brasil: Maragogi, Al	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	KY449111.1; KY449107.1; KY449108.1; KY449109.1; KY449110.1	Brasil: Santos, SP	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	KY449106.1; KY449104.1; KY449105.1.	Brasil: Marataízes, ES	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	MK000242.1	-	Spielmann G.
<i>X. kroyeri</i>	MH300662.1	-	Spielmann G.
<i>X. kroyeri</i>	KX196599.1	Brasil	Rossi N & Mantelatto FL.
<i>X. baueri</i>	MH737707.1; MH737705.1; MH737706.1.	México: Laguna Terminos	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	MH737704.1; MH737703.1	Brasil: Ilhéus	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>S. crassicornis</i>	KC545792.1	-	Liu H.
<i>R. constrictus</i>	KF783863	-	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)

Legenda: - ausência de informação nos bancos de dados

Tabela 3. Espécies do gênero *Xiphopenaeus* adquiridas do BOLD e GenBank para o gene rRNA 16S e seus respectivos números de acesso, locais de coleta e referências.

Espécies	Acesso BOLD/GenBank	Local de Coleta	Autores
<i>X. kroyeri</i>	MH300629.1	-	Spielman G.
<i>X. kroyeri</i>	KY449069.1	Brasil: Macaé, RJ	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	KY449068.1	Brasil: Aracaju, SE	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	KY449067.1	Brasil: Penha, SC	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	KY449066.1	Brasil: Baía Formosa, RN	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	KY449065.1	Brasil: Ubatuba, SP	Carvalho-Batista, <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	AY622217.1	-	Chan <i>et al.</i> (2008)
<i>X. kroyeri</i>	AF192093.1	-	Maggioni <i>et al.</i> (2001)
<i>X. kroyeri</i>	AF192092.1	-	Maggioni <i>et al.</i> (2001)
<i>X. kroyeri</i>	AF192091.1	-	Maggioni <i>et al.</i> (2001)
<i>X. kroyeri</i>	AF192090.1	-	Maggioni <i>et al.</i> (2001)
<i>X. kroyeri</i>	MK000274.1	-	Spielmann G.
<i>X. kroyeri</i>	MK000260.1	-	Spielmann G.
<i>X. kroyeri</i>	MH300643.1	-	Spielmann G.
<i>X. kroyeri</i>	KY449074.1	Brasil: Maragogi, Al	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. kroyeri</i>	KY449073.1	Brasil: Vigia, PA	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. baueri</i>	KY449076.1	Brasil: Oiapoque, AP	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. baueri</i>	KY449075.1	USA: Galveston, TX	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. riveti</i>	KY449071.1	Costa Rica: Sierpe, Puntarenas	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. riveti</i>	KY449070.1	México: Tehuantepec, Oaxaca	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>X. dincao</i>	KY449072.1	Brasil: Oiapoque, AP	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)
<i>S. crassicornis</i>	KC545791.1	-	Liu H.
<i>R. constrictus</i>	KT959496.1	-	Carvalho-Batista <i>et al.</i> (2019)

Legenda: - ausência de informação nos bancos de dados

Tabela 4. Matriz de distâncias intra e interespecíficas do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) de espécies do gênero *Xiphopenaeus* com base no modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros (K2P). Os símbolos L1 e L2 refere-se a linhagem 1 e 2 da espécie *Xiphopenaeus riveti*, respectivamente. *S. crassicornis* trata-se do grupo externo.

Espécies	Distância intraespecífica	Distância interespecífica						
		<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
<i>X. baueri</i>	0.001							
<i>X. kroyeri</i>	0.002	0.144						
<i>X. dincao</i>	0.000	0.037	0.111					
<i>X. riveti</i> L2	n/c	0.122	0.133	0.096				
<i>X. riveti</i> L1	0.000	0.095	0.129	0.076	0.070			
<i>X. sp2</i>	0.001	0.036	0.126	0.015	0.110	0.094		
<i>S. crassicornis</i>	n/c	0.195	0.201	0.177	0.202	0.184	0.193	

Tabela 5. Matriz de distâncias intra e interespecíficas do gene mitocondrial 16S rRNA de espécies do gênero *Xiphopenaeus* com base no modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros (K2P). *S. crassicornis* refere-se ao grupo externo.

<u>Espécies</u>	<u>Distância intraespecífica</u>	<u>Distância interespecífica</u>				
		<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
<i>X. kroyeri</i>	0.001					
<i>X. baueri</i>	0.003	0.039				
<i>X. dincao</i>	0.001	0.037	0.021			
<i>X. riveti</i>	0.009	0.014	0.044	0.036		
<i>S. crassicornis</i>	n/c	0.162	0.164	0.152	0.165	



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



7. CONCLUSÕES GERAIS

- Através das análises realizadas utilizando os genes COI e 16S rRNA foi possível identificar dois grupos geneticamente distintos entre as estações: X. sp1(X. *kroyeri*) e X. sp2 (X. *dincao*), as quais diferenciaram-se devido as variações sazonais existentes no ciclo reprodutivo. Por tanto, conclui-se que as divergências genéticas também podem ser explicadas por variações na sazonalidade no padrão do ciclo vida dos organismos.
- Devido ao fato de X. sp2 possuir período reprodutivo no verão e X. sp1 nas demais estações, ou seja, períodos reprodutivos distintos, verifica-se que o período de proibição de pesca não abrange todas as variedades de *Xiphopenaeus* na região estudada. Por tanto, sugere-se mais estudos nesta região para o desenvolvimento de políticas de conservação e manejo mais adequado.
- Os genes mitocondriais COI e 16S rRNA foram eficientes na identificação e separação das espécies de *Xiphopenaeus*.