



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**

GABRIEL NETO OLIVEIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DE TALITRÍDEOS
(CRUSTACEA: AMPHIPODA) AO LONGO DO LITORAL BRASILEIRO**

**MACAPÁ/AP
2022**

GABRIEL NETO OLIVEIRA

VARIABILIDADE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DE TALITRÍDEOS
(CRUSTACEA: AMPHIPODA) AO LONGO DO LITORAL BRASILEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Saúde Pública, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dr^a. Maíra Pombo

Co-Orientador: Dr^o. Emerson Augusto
Castilho Martins

MACAPÁ/AP
2022

GABRIEL NETO OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE TALITRÍDEOS
(CRUSTACEA: AMPHIPODA) AO LONGO DO LITORAL BRASILEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Saúde Pública, como requisito obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

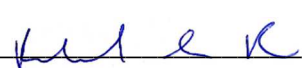
Orientadora: Dr^a. Maíra Pombo

Co-Orientador: Dr^o. Emerson Augusto
Castilho Martins

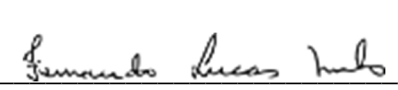
DATA DE APROVAÇÃO: 28/01/2022



Examinador: Prof.^a Dra. Camila Malta Romano
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP



Examinador: Prof. Dr. Rafael Lima Resque
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP



Examinador: Prof. Dr. Fernando Lucas de Melo
Universidade de Brasília – UnB



Orientador: Prof.^a Dra. Maíra Pombo
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

MACAPÁ/AP
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP) Biblioteca Central da Universidade Federal do
Amapá Elaborada por Jamile da Conceição da Silva –
CRB-2/1010

-
- O48v Oliveira Neto, Gabriel.
Variabilidade genética e identificação de Talitrídeos (crustacea: amphipoda) ao longo
dolitoral brasileiro / Gabriel Oliveira Neto – 2022.
1 recurso eletrônico. 134 folhas: ilustradas.
- Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Campus Marco Zero, Universidade Fe-
deral do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Ma-
capá, 2022.
Orientadora: Professora Doutora Maíra Pombo
Coorientador: Emerson Augusto Castilho Mar-
tins
- Modo de acesso: World Wide Web.
Formato de arquivo: Portable Document Format
- (PDF).Inclui referências.
1. Crustáceos. 2. Crustáceo - Identificação. 3. Praia arenosa. 4. Diversidade haplotípica.
I. Pombo, Maíra, orientadora. II. Martins, Emerson Augusto Castilho, coorientador. III.
Título.

Classificação Decimal de Dewey. 22 ed. 595.30981

OLIVEIRA NETO, Gabriel. **Variabilidade genética e identificação de Talitrídeos (crustacea: amphipoda) ao longo do litoral brasileiro**. Orientadora: Maíra Pombo. Coorientador: Emerson Augusto Castilho Martins. 2022. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Campus Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Macapá, 2022.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação de mestrado é o resultado de muitas horas de trabalho e é importante exprimir os meus sinceros agradecimentos a algumas pessoas que me ajudaram a passar por mais essa etapa da minha vida.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por me prover a proteção e força necessária para enfrentar esta intensa jornada.

Aos meus pais, Edilene e José Edson, meu infinito agradecimento. Por sempre acreditaram em minhas capacidades e por me fornecerem todo amparo emocional e apoio nas minhas decisões, mesmo naquelas que menos compreendiam. Obrigado pelo amor incondicional, seus inúmeros sacrifícios não foram em vão e me fizeram estar aqui.

A minha orientadora, Professora Doutora Maira Pombo, por toda paciência, disponibilidade e carinho, que foram fundamentais para que eu acreditasse que o andamento e conclusão deste fosse possível.

Ao meu co-orientador, o Professor Doutor Emerson Augusto Castilho Martins, por me ter sugerido este projeto e por ter me dado todo apoio, sabedoria e inspiração que foram, sem dúvida alguma, um pilar essencial para que este trabalho fosse possível. Acima de tudo, obrigado por me acompanhar nesta jornada e por sempre estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica.

Ao pessoal que integra e integrou o Laboratório de Biologia Molecular, que me recebeu tão bem e me acompanhou durante essa “aventura”. A técnica do laboratório, Jemima, pela amizade e pela disponibilidade e interesse em transmitir a sua sabedoria. Aos meus “veteranos”, Eduarda, Rafaela, Tainá Vanzeler, Gabriel Oliveira, Monizi Aires, Maiara, Rivelton e Iasmim, pelo apoio e momentos de aprendizagem e descontração.

Ao meu querido Amigo, Mateus Goes Quintela, com quem divido experiências de vida desde a graduação e nutro profunda e admiração. Obrigado por toda força e companheirismo nos momentos difíceis.

A Professora Doutora Ártemis do Socorro Nascimento Rodrigues, orientadora da graduação, que me apresentou ao universo da biologia molecular e me disponibilizou conhecimentos e espaço para que eu galgasse os primeiros passos dentro deste.

As minhas amigas que levo para vida desde a graduação, Beatriz Graça, Cleice Cristine e Natália Alves, que torceram e sempre acreditaram no meu potencial.

As minhas amigas que conheci durante o mestrado Juliana, Diovana e Darlene. Foi um prazer dividir com vocês as experiências, angústias e alegrias deste momento.

A todos os docentes do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (PGGCS), que com os ensinamentos, orientações e amizade, me ajudaram ativa ou passivamente neste projeto. Vocês também foram referenciais para mim!

Finalmente, gostaria de agradecer a Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), por abrir as portas para que eu pudesse realizar este sonho que era a minha dissertação de mestrado. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma LIÇÃO DE VIDA.

*“Dear God, I am just what you made me
and I appreciate everything you gave me”.*

Onika Tanya Maraj

RESUMO

Os talitrídeos são uma família (Talitridae) de crustáceos terrestres ou semi-terrestres, da ordem Amphipoda, pouco estudados no Brasil e com alto potencial de indicação de qualidade ambiental. São habitantes abundantes da região supralitoral, especialmente em praias arenosas. Esta região costeira é a mais sensível e ameaçada pelas atividades humanas, sendo o ecossistema mais rentável do planeta para a indústria do turismo e ameaçado de extinção devido à sua intensa urbanização e alterações climáticas. Dada a urgência de ações para a preservação da biodiversidade nesses habitats, este estudo teve por objetivo caracterizar a estrutura genética de espécies de talitrídeos encontradas ao longo de praias distribuídas em toda extensão do litoral brasileiro. Foram utilizadas 56 sequências parciais do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) para caracterização e análise da diversidade genética dos talitrídeos amostrados. Dentre os 397 indivíduos coletados, 2 espécies foram morfologicamente identificadas, *Atlantorchestoidea brasiliensis* (56%) e *Talocherastia tucurauna* (32%), enquanto 12% não tiveram identificação morfológica conclusiva. Das 60 amostras sequenciadas, diferentes OTUs se agruparam por região geográfica, sendo *A. brasiliensis* no Sudeste (SP, RJ e ES), *T. tucurauna* no Nordeste (BA e AL), ambas correspondentes à identificação morfológica, e 2 OTUs sem identidade compatível com as amostras do banco de dados (*GenBank*), 1 concentrada no PA e outra encontrada no AP e no RS. A maior diversidade haplotípica identificada foi para *A. brasiliensis*, sendo o estado do RJ responsável por este elevado índice enquanto os indivíduos do norte de SP apontando para um isolamento reprodutivo com os demais, aqui atribuído à alta antropização da região da Baía de Guanabara. Os indivíduos de *T. tucurauna* tiveram diversidade haplotípica moderada, igualmente diversa na BA e AL, mas também apontando para um isolamento de fluxo gênico entre as praias de cada estado, entre as quais o ponto de maior modificação antrópica é a Bahía de Todos os Santos. Para o PA e AP a amostragem de talitrídeos é inédita. No PA foi identificada uma OTU exclusiva sem correspondência satisfatória às do banco de dados, mais próxima ao gênero *Talorchestia*. O isolamento desta OTU deve decorrer de barreiras naturais, já que a região está compreendida entre fortes correntes leste-oeste e a foz do rio Tocantins a leste e pela foz do rio Amazonas a oeste. Indivíduos coletados nos estados do AP e RS apresentaram uma impressionante similaridade haplotípica, de uma OTU sem correspondência no GenBank em alto nível hierárquico. Os indivíduos do AP, o local mais pristino amostrado, apresentaram a maior distância genética identificada e maior complexidade da rede de haplótipos. Uma diversidade bem maior do que a registrada na bibliografia, novas OTUs de diferentes níveis hierárquicos taxonômicos, identificação de estruturação genética intrínsecas a OTUs distintas e o alto potencial de indicação de qualidade ambiental deste grupo, através de ferramentas genéticas, são importantes destaques e contribuições deste trabalho.

Palavras-chave: Citocromo oxidase. DNA mitocondrial. Diversidade haplotípica. Distância genética. Fluxo gênico; Praia arenosa.

ABSTRACT

Talitridae is a family of terrestrial or semi-terrestrial crustaceans, of the order Amphipoda, understudied in Brazil and with high potential as indicator of environmental quality. They are abundant inhabitants of the supralittoral region, especially in sandy beaches. These areas most sensitive and threatened by human activities, the most profitable ecosystem for the world tourism industry, and at high risk of extinction due to increasing urbanization and climate changes. Given the urgency of actions to preserve its biodiversity, this study aimed to characterize the genetic structure of Talitridae species in beaches along the Brazilian coast. Partial sequences of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene were used to perform analysis of genetic characterization diversity of the sampled talitrids. Among 397 individuals, 2 species were morphologically identified, *Atlantorchestoidea brasiliensis* (56%) and *Talorchestia tucurauna* (32%), while 12% were not conclusively identified. Of the 60 sequenced individual, distinct OTUs were spatially grouped; *A. brasiliensis* in Southeastern Brazil (SP, RJ e ES), *T. tucurauna* in the northeastern beaches (BA e AL), both OTUs in accordance with morphological identification, and 2 distinct OTUs, not identified morphologically and with no correspondence in the world genetic database (*GenBank*), one in PA (North Brazil) and 1 in AP and RS (furthest sampled points). The highest genetic diversity was within the species *A. brasiliensis*, specifically in RJ population, while individuals in north SP showed signs of high reproductive isolation from the other southeastern population, what is here ascribed to high levels of anthropogenic modification of the Guanabara Bay. *Talorchestia. tucurauna* showed moderated haplotypic diversity, similarly diverse at each sampling beaches, in BA and AL, but highly isolated from each other, between which the highest impacted area is Todos os Santos Bay. For AP and PA federal units, northernmost Brazil, the record of Talitridae is unprecedented. PA showed an exclusive OTU, without database correspondence, though close to *Talorchestia*. The isolation of this OTU is most likely natural features, as the area lies between a strong westward current flow and the Amazon river estuary. Individuals from AP and RS showed remarkable haplotypic similarity, of an exclusive OTU, without database correspondence in high hierarchical level. The beach in AP is the most pristine from all sampled beaches, and its individuals showed the highest within-group genetic distance and most complex haplotype network. A higher diversity of Talitridae than registered in the literature, new OTUs from distinct hierarchical taxonomic levels, the identification of intrinsic genetic OTU structures, and the high potential of indication of environmental quality of the group, through genetics, are emphasized contributions of this study.

Keywords: Cytochrome oxidase. Mitochondrial DNA. Haplotypic diversity. Genetic distance. Gene flow. Sandy beach.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Árvore filogenética com a representação simples da relação filogenética entre os principais grupos de malacostracas. Em destaque a ordem Amphipoda.....	25
Figura 2 - Morfologia geral e divisão do plano corpóreo dos amphipodas.....	26
Figura 3 - Árvore filogenética da superfamília Talitroidea proposta por Myers& Lowry (2020), baseada em análise de sinapormorfias e homoplasias.	29
Figura 4 - Localização do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 (COI, representada em destaque como <i>cox1</i>).	36
Figura 5 - Proporção entre espécies de Talitridae (Crustacea:Amphipoda) amostradas ao longo do litoral brasileiro, em janeiro e fevereiro de 2015. Até o momento 353 indivíduos foram identificados até o nível específico de acordo com a chave de identificação de espécies já registradas no litoral brasileiro (SEREJO, 2004); 48 indivíduos analisados não puderam ser identificados conformemente. A) AP: n=30, B) PA: n=8, C) RN: n=37, D) AL: n=68, E) BA n=42, F) ES: n=30, G) RJ: n=40, H) SP: n=66, I) PR: n=34, J) SC: n=33, K) RS: n=9.	45
Figura 6 - Diferentes morfotipos de Talitridae analisados dentre amostras realizadas ao longo do litoral brasileiro em janeiro e fevereiro de 2015. A): <i>Talorchestia tucurauna</i> ; local de coleta: AL; referência: B3AL. B): <i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i> ; local de coleta: SC; referência C6SC C) Morfotipo 1 (não identificado); local de coleta: AP; referência C2AP. D) Morfotipo 2 (não identificado); local de coleta: PA; referência A6PA. E) Morfotipo 3 (não identificado); local de coleta: RS referência A8RS.....	46
Figura 7 - Matriz representativa utilizada durante as PCR que utilizavam o gradiente de concentração de <i>primers</i> . F representando o <i>primer forward</i> e R representando o <i>primer reverse</i>	49
Figura 8 - Matriz representativa utilizada durante as PCR que utilizaram o gradiente de concentração de temperaturas.....	49
Figura 9 - Alinhamento das 4 sequências de mtDNA de amphipodas junto ao primer LCO1490 utilizados para o desenho de <i>primer</i>	51
Figura 10 - Gel de agarose 1,5% após eletroforese contendo produtos de PCR amplificadas utilizando-se os <i>primers</i> GNF_deg e COIrint, neste caso, todas vindas do estado do AP, que foram purificadas e sequenciadas. M =Marcador de peso molecular.	52

Figura 11 - Fragmento de alinhamento total realizado pelo CLC contendo um vislumbre de 3 amostras do AP com fração dos seus respectivos cromatogramas mais 11 amostras de talitrídeos coletados no banco de dados do *GenBank*. 56

Figura 12 - A árvore exploratória resultante pelo método NJ. As amostras com letras e números referem-se às amostras coletadas neste experimento, sendo as duas últimas letras do código a sigla do estado brasileiro onde a amostra foi coletada. Em preto, estão o código e o nome das espécies/gêneros de talitrídeos vindos do *GenBank*. Cores diferentes das amostras coletadas neste experimento foram usadas para cada estado de coleta, com intuito de facilitar a visualização dos agrupamentos. *Paracaprella tenuis* é um grupo externo (Caprellidae) aos talitrídeos. Os números entre os ramos referem-se as distâncias entre os indivíduos. 58

Figura 13 - Rede de haplótipos utilizando sequências fragmento do gene COI realizada com as amostras vindas dos estados do RJ, SP e ES. Os círculos menores em preto representam os haplótipos não amostrados ou extintos e as barras individuais que cruzam os ramos representam eventos mutacionais. 62

Figura 14 - Rede de haplótipos utilizando sequências fragmento do gene COI realizada com amostras vindas dos estados do PA, AL e BA. Os círculos menores em preto representam os haplótipos não amostrados ou extintos e as barras individuais que cruzam os ramos representam eventos mutacionais. 65

Figura 15 - Rede de haplótipos utilizando sequências fragmentos do gene COI realizada com amostras vindas dos estados do AP e RS. Os círculos menores em preto representam os haplótipos não amostrados ou extintos e as barras individuais que cruzam os ramos representam eventos mutacionais. 69

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 - Classificação ecológica dos representantes da superfamília Talitroidea proposta por Lowry & Myers (2019).	30
Tabela 2 - Espécies de talitrídeos registrados no Brasil e suas classificações de acordo com sinapomorfias e homoplasias morfológicas (Myers & Lowry, 2020) e de acordo com seus nichos ecológicos/habitat (Lowry & Myers, 2019). As linhas em destaque correspondem às espécies encontradas em praias arenosas.....	31
Tabela 3 - Pontos de coleta e coordenadas das 11 praias amostradas ao longo do litoral brasileiro.	39
Tabela 4 - Referência, nomes e sequências dos <i>primers</i> utilizados nos testes de amplificação.	41
Tabela 5 - Volumes e concentrações dos reagentes usados na reação de PCR para amplificação de fragmento do gene mitocondrial COI.	42
Tabela 6 - Condições utilizadas nas PCR após finalização das etapas testes.....	42
Tabela 7 - Condições utilizadas nas PCR durante os testes que utilizaram as matrizes de concentração de <i>primer</i> e temperatura.....	50
Tabela 8 - Identificação das sequências das espécies retiradas do <i>GenBank</i> utilizadas no alinhamento para confecção de um novo <i>primer</i>	50
Tabela 9 - BLAST das sequências vindas dos estados do RJ, SP e ES. As colunas “ID” (número de registro no laboratório de biologia molecular da UNIFAP), “Local” e “Tamanho” se referem aos dados de cada sequência consultada. As colunas “Valor E” e “Identidade” referem-se à relação encontrada entre a sequência consultada e a mais semelhante disponível no banco de dados. As colunas “Acesso” e “Espécie <i>GenBank</i> ” referem-se às respectivas sequências no banco de dados.	53
Tabela 10 - BLAST das sequências dos estados do AP e RS. As colunas “ID” (número de registro no laboratório de biologia molecular da UNIFAP), “Local” e “Tamanho” se referem aos dados de cada sequência consultada. As colunas “Valor E” e “Identidade” referem-se à relação encontrada entre a sequência consultada e a mais semelhante disponível no banco de dados. As colunas “Acesso” e “Espécie <i>GenBank</i> ” referem-se às respectivas sequências no banco de dados.	54
Tabela 11 - BLAST das sequências vindas dos estados do AL, BA e PA. As colunas “ID” (número de registro no laboratório de biologia molecular da UNIFAP), “Local” e “Tamanho” se referem aos dados de cada sequência consultada. As colunas “Valor E” e	

Identidade” referem-se à relação encontrada entre a sequência consultada e a mais semelhante disponível no banco de dados. As colunas “Acesso” e “Espécie *GenBank*” referem-se às respectivas sequências no banco de dados. 55

Tabela 12 - Análises das distancias genéticas do gene COI por meio do método K2, para os subgrupos de *A. brasiliensis* SP, RJ/ES e sequências depositadas no *GenBank*. A diagonal em cinza representa as distancias intragrupos e as demais células as distâncias entre grupos 61

Tabela 13 - Índice de diversidade nucleotídica e haplotípica para o gene COI nas amostras dos estados de ES, SP e RJ. 61

Tabela 14 - Análises das distancias genéticas do gene COI por meio do método K2 entre os grupos de BA, AL e PA e sequência depositadas no *GenBank*. A diagonal em cinza representa as distâncias intragrupos e as demais células representam as distâncias entre os grupos. 64

Tabela 15 - Índice de diversidade nucleotídica e haplotípica para o gene COI nas amostras dos estados do PA, AL e BA. 64

Tabela 16 - Análises das distancias genéticas do gene COI por meio do método K2 entre os grupos dos estados do AP e RS e sequências depositadas no *GenBank*. A diagonal em cinza representa as distancias intragrupos e as demais células representam as distâncias entre os grupos. 68

Tabela 17 - Índice de diversidade nucleotídica e haplotípica para o gene COI nas amostras dos estados do AP e RS. 68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

μl – Microlitro

μM – Micromolar

ng - Nanograma

Adpt – Adaptado

AP – Amapá

AL – Alagoas

AMOVA - Análise de Variância Molecular

BA – Bahia

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

CHCl₃ - Clorofórmio

COI – Citocromo Oxidase I

COX1 – Citocromo Oxidase I

cm - Centímetro

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo Trifosfato

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ES – Espírito Santo

EtOH – Etanol

h – Hora

Hap - Haplótipo

HQ – High Quality

Hz – Hertz

ID - Identidade

K2 - Kimura 2 parâmetros

Km – Quilômetros

LTDA – Sociedade Limitada

M – Mol

MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MgCl – Cloreto de Magnésio

ML - Máxima Verossimilhança

mM – Milimolar

mm – Milímetro

min. - Minutos

mL – Mililitro

mtDNA – DNA mitocondrial

N - Norte

NaCl – Acetato de Sódio

NaOAc – Acetato de Sódio

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NJ – Neighbor-Joining

OTU - Operational Taxonomic Unit

PA – Pará

pb – Pares de Base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH - Potencial Hidrogeniônico

PR – Paraná

qsp – quantidade suficiente para

s. - Segundo

S – Sul

sp - Espécie

RJ – Rio de Janeiro

RN – Rio Grande do Norte

RNA - Ácido Ribonucleico

rRNA - Ácido Ribonucleico Ribossomal

RS – Rio Grande do Sul

SC – Santa Catarina

SP – São Paulo

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

Tris - Hidroximetil Aminometano

TAE - Tris-Acetato

UV – Ultravioleta

V - Voltz

X- Vezes

xg – Força gravitacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. PRAIAS ARENOSAS, MEIO AMBIENTE E SAÚDE	21
1.2. BIOINDICADORES E AS PRAIAS ARENOSAS.	22
1.3. CARACTERIZAÇÃO DOS AMPHIPODAS E FAMÍLIA TALITRIDAE.....	24
1.4. EVOLUÇÃO E BIOGEOGRAFIA DA FAMÍLIA TALITRIDAE	27
1.5. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E ECOLÓGICA	28
2. JUSTIFICATIVA	32
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1. ECOLOGIA DE TALITRÍDEOS DE PRAIAS ARENOSAS.....	33
3.2. MARCADORES MOLECULARES, DNA MITOCONDRIAL E REGIÃO CONTROLE.....	34
5. OBJETIVOS.....	38
5.1. OBJETIVO GERAL.....	38
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
6. MATERIAL E MÉTODOS	39
6.1. AMOSTRAGEM.....	39
6.2. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA.....	40
6.3. EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO	40
6.4. CONDIÇÕES DA PCR.....	42
6.5. TRIAGEM E SEQUENCIAMENTO	43
6.6. ANÁLISE DOS DADOS	43
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
7.1. TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	45
7.2. TESTES MOLECULARES	48
7.2.1. Avaliação dos primer.....	48

7.2.2. PCR.....	52
7.2.3. Busca de sequências em banco de dados.....	52
7.2.4. Alinhamentos.....	56
7.2.5. Identificação genética de OTUs.....	57
7.2.5.1. Árvore exploratória.....	57
7.2.6. Relações intra-OTUs.....	60
7.2.6.1. Sudeste.....	60
7.2.6.1.1. <i>Análise das distâncias.....</i>	<i>60</i>
7.2.6.1.2. <i>Caracterização haplotípica.....</i>	<i>61</i>
7.2.6.1.3. <i>Rede de haplótipos.....</i>	<i>61</i>
7.2.6.2. Nordeste/PA.....	63
7.2.6.2.1. <i>Análise das distâncias.....</i>	<i>63</i>
7.2.6.2.2. <i>Caracterização haplotípica.....</i>	<i>64</i>
7.2.6.2.3. <i>Rede de haplótipos.....</i>	<i>65</i>
7.2.6.3. Amapá/Rio Grande do Sul.....	67
7.2.6.3.1. <i>Análise das distâncias.....</i>	<i>67</i>
7.2.6.3.2. <i>Caracterização haplotípica.....</i>	<i>68</i>
7.2.6.3.3. <i>Rede de haplótipos.....</i>	<i>68</i>
8. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

Considerado um dos espaços de maior dinamismo do país, o litoral brasileiro é extenso e variado. Abrange aproximadamente 9000 km de extensão, ao longo da qual é possível identificar diversos tipos de sistemas costeiros, como praias arenosas, falésias ígneas e sedimentares, estuários, costões e manguezais (NICOLODI; PETERMANN, 2010). Estas variadas paisagens possuem valor inestimável, provendo serviços ambientais específicos, e são altamente ameaçadas pela pressão humana (SHORT; KLEIN, 2016).

O ecossistema praia arenosa representa aproximadamente três quartos da costa mundial existente, sendo o mais valioso ecossistema para a indústria de turismo, uma das maiores do mundo, provendo sustento de regiões e até países inteiros (LERCARI; DEFEO, 2003; HOUSTON, 2008). Este ecossistema de transição entre o sistema terrestre e marinho é formado pelo contínuo fluxo de areia sob a ação de ondas e marés, tornando as praias ambientes de grande instabilidade e severos para a tolerância fisiológica de fauna e flora (MARQUES et al., 2003; ABSALONSEN; DEAN, 2011).

Apesar desta alta instabilidade e da aparente falta de vida, as praias arenosas são sistemas biológicos altamente diversos, abrigando elevado número de espécies altamente Adaptadas, chamadas bentônicas, referente ao modo de vida intimamente associado ao substrato, além de serem áreas de refúgio, reprodução e alimentação para grandes vertebrados (BAYED, 2003; DEFEO et al., 2009).

1.1. PRAIAS ARENOSAS, MEIO AMBIENTE E SAÚDE

Embora esses ambientes apresentem relativa resiliência a alterações naturais, mudando sua forma e extensão em respostas a tempestades, variações no clima e nas correntes das ondas, modificações humanas possuem a capacidade de limitar severamente essa flexibilidade, levando ao isolamento de habitats, à diminuição da conectividade genética entre populações e, eventualmente, à extinção de espécies (SCHLACHER et al., 2007; HOUSTON, 2008).

Além de colocar em risco a homeostase ecológica da biota natural desse ecossistema, impactos de diversas escalas também afetam diretamente a saúde humana. A poluição, por exemplo, entendida como desequilíbrio causado por acúmulo de elementos estranhos,

modificando o ambiente e afastando-o dos padrões iniciais ou desejáveis, é um dos fatores que mais ameaça a disponibilidade e o uso de recursos oriundos dos ecossistemas costeiros (RUSSELL, 1974; FIALKOWSKI et al., 2009). O esgoto jogado clandestinamente e de forma deliberada próximos a locais utilizados por banhistas, aliado a outros poluentes oriundos também da urbanização desenfreada, ameaçam a saúde de quem frequenta tais locais, pois o lixo despejado, além de atrair animais vetores de doenças como ratos, baratas e pombos, tornam o local propício a proliferação de fungos e bactérias nocivos à saúde humana, que podem causar doenças como micoses e problemas do trato gastrointestinal (DEFEO et al., 2009; WEISKERGER et al., 2019; LANDRIGAN et al., 2020).

Em uma maior escala espacial e de desequilíbrio, estão alterações induzidas pelo homem nos processos de abastecimento e transporte de sedimentos costeiros (AVOINE et al., 1981). O aumento do nível do mar, induzido pelas mudanças climáticas sociadas ao crescimento populacional mais expressivo nas áreas costeiras, está colocando as praias em uma situação de “aperto costeiro” em tal magnitude que previsões já indicam a perda de metade das praias arenosas do planeta até o final deste século (BROWN; MCLACHLAN, 2002; BROOKS, 2020), o que terá efeitos devastadores na qualidade de vida da nossa sociedade.

Dessa maneira, as atividades humanas possuem capacidades de gerar impactos globais que podem prejudicar a qualidade de vida, predispondo o surgimento de doenças e até mesmo, ameaçando os sistemas de suporte à vida (RIBEIRO, 2004). Assim, cada vez mais se faz necessário entender a saúde humana dentro de uma abordagem ecossistêmica, levando em consideração aspectos que envolvem o meio ambiente, pois esse tipo de abordagem se torna um meio para auxiliar os diferentes níveis de gestão a tomar medidas para gerir os assuntos humanos ao mesmo tempo que promove a saúde não só das pessoas, mas também do planeta (NIELSEN, 2001).

1.2. BIOINDICADORES E AS PRAIAS ARENOSAS.

Frente a essas ameaças, ao longo dos últimos anos, pesquisadores se apressam para conhecer mais intimamente a biodiversidade e seus serviços associados, que podem desaparecer rapidamente, e cada vez mais utilizam bioindicadores para avaliar o efeito real destes estressores para a biodiversidade. Os bioindicadores são indicativos biológicos de uma determinada condição ambiental. Esses indicativos podem ser desde respostas fisiológicas a alterações na estrutura da comunidade biológica, sendo que níveis diferentes

de resposta correspondem a diferentes impactos, representando assim, uma importante ferramenta na avaliação, previsão e controle de integridade ambiental (HOUSTON, 2008; HEINK; KOWARIK, 2010; LI; ZHENG; LIU, 2010).

Dentre os grupos de animais que podem ser utilizados como bioindicadores os invertebrados se destacam e, levando em consideração a avaliação da qualidade ambiental de praias arenosas, os táxons mais utilizados são crustáceos (SUCIU; TAVARES; ZALMON, 2018), gastrópodes (REGUERA; COUCEIRO; FERNÁNDEZ, 2018), bivalves (WAYKAR; DESHMUKH, 2012) e poliquetas (KIES et al., 2020). Esses grupos de invertebrados são considerados ótimos bioindicadores devido a um conjunto de características intrínsecos à sua biologia. São animais que possuem ciclo de vida relativamente longo (permitem avaliar o efeito de ciclos sazonais), com pouca mobilidade (mais fáceis de serem amostrados) e, o principal: existem subgrupos especificamente sensíveis a quaisquer alterações de habitat (MACHADO et al., 2017).

No supralitoral de praias, ou seja, a área acima da linha da maré alta, os organismos de maior relevância para esse tipo de análise são os caranguejos do gênero *Ocypode* e duas ordens de pequenos crustáceos, os Isopoda, popularmente conhecidos como tatuzinhos de praia, e os Amphipoda, conhecidos como pulga d'água ou da praia. Suas aplicações dependem muito do tipo de análise que se pretende realizar. Os ocypodes são muito empregados para avaliação de distúrbios de comportamento, em geral associados ao turismo, e de estrutura populacionais, associados a perda de habitat (GÜL; GRIFFEN, 2019; POMBO; TURRA, 2019). Os Isopoda e Amphipoda, diferentemente dos caranguejos, não possuem dispersão por larvas aquáticas, logo respondem de forma muito diferente a impactos semelhantes. Além dos tradicionais estudos comportamentais, cada vez mais a variabilidade genética entre populações destes grupos é usada como medida da extensão de degradação ambiental (VELOSO et al., 2010; VELOSO; NEVES; DE ALMEIDA CAPPER, 2011; MATTOS; SEIXAS; PAIVA, 2019). No Brasil existem poucos estudos focados na família Amphipoda, em partes devido ao número limitado de especialista no grupo, que acaba por resultar no baixo número de sequências gênicas presentes nos bancos de dados e na estimativa mais aproximada do número real de espécies existentes. A maioria das informações disponíveis sobre o grupo estão dispersas em trabalhos sobre ecologia, sendo tratada apenas como mais um táxon dentro da comunidade analisada. Paradoxalmente, é o grupo de maior diversidade, abundância e biomassa dentre os supracitados (BACHELET; DAUVIN; SORBE, 2003).

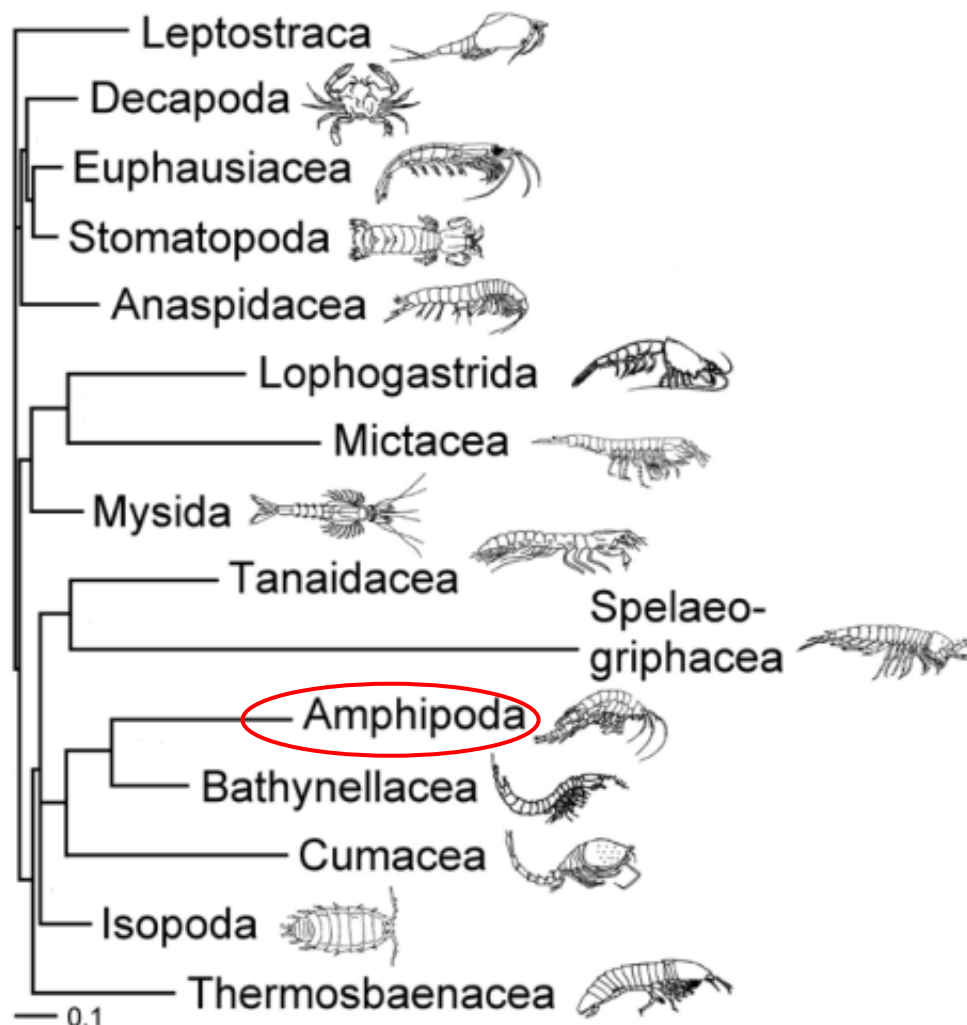
Estudos sobre Talitridae indicam uma enorme variabilidade genética e, consequentemente, morfológica (WILDISH et al., 2016; WILDISH, 2017; HORTON et al., 2021), demandando ainda muita investigação para entender padrões de distribuição das espécies para solidificar uma base de conhecimento da nossa biodiversidade e nos permite entender mais detalhadamente os variados tipos de eventos e distúrbios que afetam de forma diferente espécies diferentes.

Neste trabalho, apostamos no uso do sequenciamento genético como avaliador do fluxo gênico entre populações de Talitridae. O distanciamento genético entre populações de uma mesma espécie indicam a presença de barreiras, naturais ou antrópicas, neste último caso gerando uma quebra de conectividade propensa a diminuir a diversidade genética atual a ponto de extinguir populações locais e até espécies (AVISE, 2000; HOUSTON, 2008). Os resultados podem indicar pontos de fragilidade ambiental para os quais ações de gerenciamento, visando a garantia da sustentabilidade, sejam prioritárias.

1.3. CARACTERIZAÇÃO DOS AMPHIPODAS E FAMILÍLIA TALITRIDAE

A ordem Amphipoda compõe o maior grupo de crustáceos peracaridos (Figura 1), grupo que é caracterizado pela presença de um “marsúpio” na fêmea, apresentando desenvolvimento direto e cuidado parental, ou seja, sem estágio de dispersão larval independente (SPICER; MOORE; TAYLOR, 1987b). Com mais de 10.376 espécies no mundo, os Amphipoda são altamente heterogêneos quando se trata de morfologia, modo de vida e estratégias de alimentação (JACOBI, 1987).

Figura 1 - Árvore filogenética com a representação simples da relação filogenética entre os principais grupos de malacostracas. Em destaque a ordem Amphipoda.



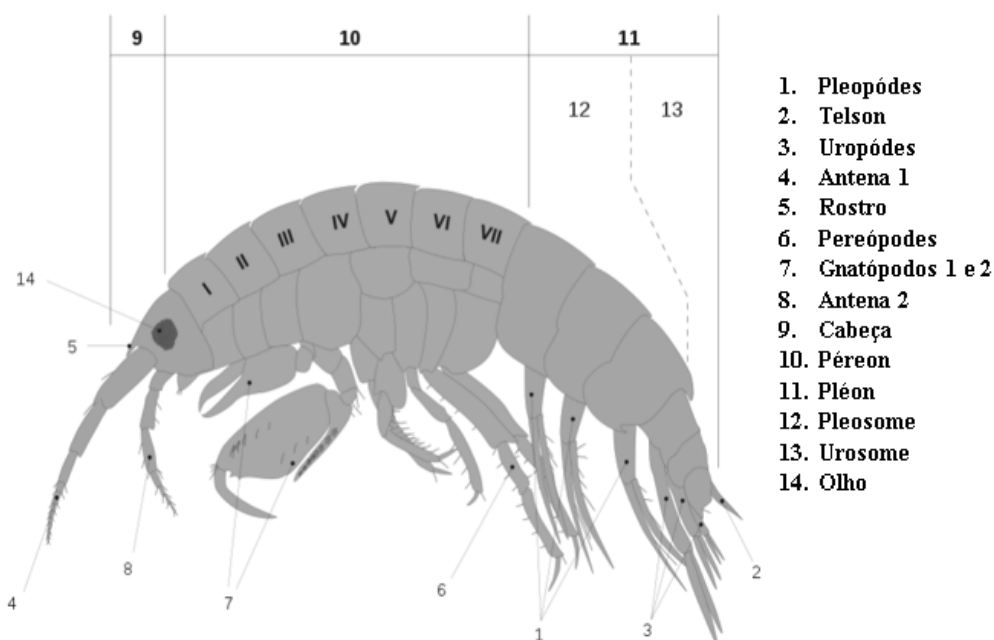
Fonte: Jenner et al., 2009

O nome Amphipoda significa "pés diferentes" e refere-se às diferentes formas que seus pereópodes (pernas) podem apresentar. Morfologicamente, os amphipodas são caracterizados por possuírem três pares de pleópodes e três pares de uropódos. Uma pequena parcela destes possui ainda uma redução secundária no abdômen, o que geralmente resulta na perda de um ou mais pares desses apêndices, como é o caso dos pertencentes à família Caprellidae (HORTON et al., 2021).

Possuem notoriamente um corpo achatado lateralmente, com um perfil mais ou menos curvado, semelhante a um gancho. Geralmente possuem um par de olhos compostos laterais sésseis (embora a maioria das espécies subterrâneas e algumas que habitam águas profundas não tenham olhos) e formações de três pares de apêndices birremes, com um

comprimento corporal de adultos que varia dos 2 a 40 mm, mais comumente entre 5 e 15 mm (Figura 2) (STOCK, 1975; VÄINÖLÄ et al., 2008).

Figura 2 - Morfologia geral e divisão do plano corpóreo dos amphipodas



© Hans Hillewaert

Fonte: Adpt. Hans Hillewaert.

A maioria das espécies apresenta dimorfismo sexual. No macho, a diferença mais aparente se encontra na forma e tamanho avantajado do segundo par de gnatópodos, utilizado para conduzir a fêmea durante comportamento pré-copulatório, e nas fêmeas a presença do marsúpio, formado pelos oostegitos localizados na superfície ventral do tórax (KRUSCHWITZ, 1978; MORRITT; SPICER, 1996). Na literatura internacional os Amphipoda são referidos pelos nomes populares de “scuds”, “shrimp” ou “sideswimmers”. Já os representantes terrestres são chamados de “landhoppers” em geral. Os que habitam áreas de praias são denominados pelo termo específico “sand fleas”, “beach fleas” ou ainda “sandhoppers” (HORTON et al., 2021). No Brasil, devido a maioria dos seus representantes serem habitantes de praias arenosas, são mais conhecidos como “pulgas-do-mar” ou “pulgas-da-areia”.

Dentre as cerca de 237 famílias de Amphipoda conhecidas, a grande maioria habita ambientes marinhos, mas muitos vivem em ambiente de água doce e estuários, com uma única superfamília (Talitroidea) terrestre (SEREJO, 1998; AHYONG et al., 2015; HORTON et al., 2021). Essa por sua vez, se distribui nos trópicos e subtropicais, onde geralmente se

encontram em águas rasas, entre marés e até mesmo no supralitoral. Dentre as 2 epifamílias, 6 famílias e 134 gêneros pertencentes ao grupo, cerca de metade está classificada na família Talitridae. Esta família possui uma enorme radiação Adaptativa (SEREJO, 2004b) e é composta por 4 subfamílias, 48 gêneros e mais de 300 espécies descritas até o momento (HORTON et al., 2021).

São diversos os gêneros e espécies que compõe a família Talitridae e, em linhas gerais, a diferenciação morfológica desses indivíduos se dá através da análise das formas e contagem de seus apêndices, com destaque para os gnatapódos 1 e 2 (CHAPMAN, 2007). A característica mais marcante deste grupo (Talitridae) é, juntamente aos seus hábitos terrestres, a morfologia das antenas, na qual a primeira é sempre muito mais curta que a segunda, porém não muito menor que a sua cabeça.

1.4. EVOLUÇÃO E BIOGEOGRAFIA DA FAMÍLIA TALITRIDAE

Os talitrideos são os únicos Amphipoda que invadiram com sucesso o ambiente terrestre em todo o mundo (BOUSFIELD, 1984), exceto nas regiões polares (HURLEY, 1968). Dada essa distribuição global, alguns autores sugerem uma origem pangeana para o grupo (BOUSFIELD, 1984; LOWRY; MYERS, 2019). Os autores embasam essa afirmação no fato dos Arcitalitridae (grupo monofilético de talitróides terrestre) serem encontrados tanto no continente Australiano quanto no Sul da África, os quais se separaram no fim do jurássico, não possuindo conexão terrestre há pelo menos 138 milhões de anos. Logo, hipóteses de uma radiação mais recente de anfípodes terrestres não seriam compatíveis com a existência de talitrideos terrestres compartilhados entre estes continentes, lembrando que sua dispersão é relativamente baixa devido à falta de uma fase de dispersão larval (aquática) em suas histórias de vida (MYERS; LOWRY, 2020).

Também já foi considerado que a transição terrestre dos talitrideos dependeu intimamente da disponibilidade de angiospermas (utilizadas como fonte de proteção e alimento), logo não deveria ser mais antiga que a radiação cretácea deste grupo de plantas (BARBA-MONTOYA et al., 2018; COPILAȘ-CIOCIANU; BORKO; FIŠER, 2020). Embora o Cretáceo seja posterior ao Jurássico, o surgimento das angiospermas também é atribuído a cerca de 140 milhões de anos atrás, logo não há grande discrepância entre as hipóteses. Vale lembrar que muitos talitrideos litorâneos se associam a detritos

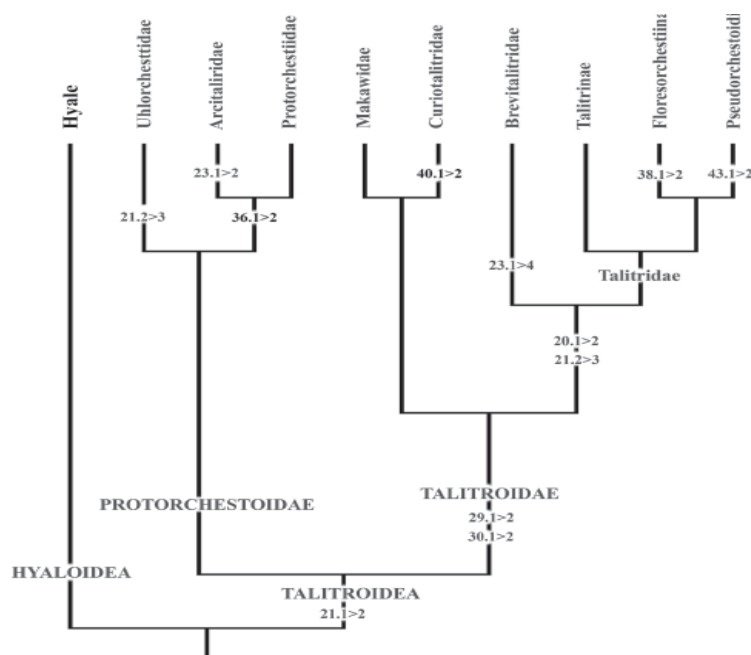
constantemente depositados pelo mar, que podem ser grandes volumes de algas e rochas coralíneas, por exemplo.

Outros autores de um grande estudo filogenético molecular, Copilaș-Ciocianu; Borko e Fišer (2020), também sugerem que apesar dos talitrídeos apresentarem a transição ecológica mais radical entre todos os amphipodas, seria também um dos grupos mais recentes, aparecendo aproximadamente durante o paleogeno. As evidências que sustentam esta hipótese são seus estágios menos avançados de especialização terrestre e baixa diversidade taxonômica quando comparados com os isópodes oniscoideanos (BOUSFIELD, 1984; SPICER; MOORE; TAYLOR, 1987a), que colonizaram este habitat desde o fim do paleozoico (BROLY; DEVILLE; MAILLET, 2013). Uma origem mais recente dos Talitridae implicaria que a mudança para a vida semiterrestre ocorreu várias vezes dentro da linhagem Talitroidea (COPILAȘ-CIOCIANU; BORKO; FIŠER, 2020), o que necessita ser ainda testado usando uma amostragem de táxon mais abrangente. Dessa forma, tanto o tempo de divergência quanto as histórias evolutivas do grupo ainda permanecem incertas.

1.5. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E ECOLÓGICA

A classificação taxonômica mais aceita atualmente para o grupo é a disponibilizada no trabalho de Myers & Lowry (2020) em que, baseando-se em uma análise morfológica juntamente com uma avaliação cuidadosa de sinapomorfias e homoplasias dentro de diversos gêneros, modificaram parte da classificação anteriormente vigente. Neste estudo, a superfamília Talitroidea foi dividida em duas epifamílias, Protorchestoidae e Talitroidae, que somam no total 7 famílias (Uhlorchestiidae, Protorchestiidae, Arcitalitridae, Brevitalitridae, Makawidae, Curiotalitridae e Talitridae). Por sua vez, a família Talitridae é dividida em 3 subfamílias, Talitrinae, Floresorchestiinae e Pseudorchestoideinae (Figura 3).

Figura 3 - Árvore filogenética da superfamília Talitroidea proposta por Myers & Lowry (2020), baseada em análise de sinapomorfias e homoplasias.



Fonte: Myers & Lowry, 2020

Além desta classificação baseada de apomorfias morfológicas, existem também a classificação dos talitrídeos baseada em suas preferências de habitats. Bousfield (1982) fez a primeira categorização agrupando os talitrídeos em 4 grupos, “*palustral talitrids*”, “*beach fleas*”, “*sand hoppers*” e “*land hoppers*”. Esse agrupamento ecológico foi alterado no estudo subsequente de Lowry & Myers (2019), que divide os talitrídeos em 10 tipos (Tabela 1), dos quais apenas 4 são encontrados no Brasil (Tabela 2). Estudiosos fazem distinção entre os termos *beach-hopper* e *sand-hoppers*, para distinguir espécies não modificadoras e modificadoras (cavadores) do substrato de praias, respectivamente. Apesar de ambas as classificações serem robustas (LOWRY; MYERS, 2019; MYERS; LOWRY, 2020) uma espinha dorsal filogenética molecular para este grupo ainda não foi estabelecida.

Tabela 1 - Classificação ecológica dos representantes da superfamília Talitroidea proposta por Lowry & Myers (2019).

Grupo Ecológicos	Tradução Literal	Descrição
<i>Marsh-hoppers</i>	Saltadores do Pântano	Talitrídeos palustres semi-aquáticos que vivem em pântanos salgados e manguezais.
<i>Beach-hoppers</i>	Saltadores da praia	Talitrídeos encontrados em zonas de supralitorais/intertidais sob "destroços" de algas marinhas encalhadas em praias arenosas e que não modificam o substrato.
<i>Driftwood-hoppers</i>	Saltadores de troncos flutuantes	Talitrídeos de praias especializados que se encontram confinados a troncos apodrecidos onde vivem em galerias, consumindo troncos apodrecidos e reproduzindo-se com ninhadas relativamente pequenas.
<i>Sand-hoppers</i>	Saltadores da areia	Talitrídeos modificadores de substrato, comuns e difundidos nas praias arenosas
<i>Field-hoppers</i>	Saltadores do campo	Talitrídeos encontrados entre a vegetação costeira, em prados, pastagens, pastagens e jardins urbanos, entre a faixa de serapilheira sob pedras e troncos.
<i>Ground-hoppers</i>	Saltadores do chão	Talitrídeos morfologicamente Adaptados para cavar em solos soltos e bem drenados.
<i>Riparian-hoppers</i>	Saltadores ribeirinhos	Talitrídeos encontrados as margens de lagos sob pedras ou vegetação muito úmida, próximo (ou dentro) de riachos, rios, riachos, cascatas e cachoeiras.
<i>Forest-hoppers</i>	Saltadores da floresta	Talitrídeos não modificadores de substrato que vivem entre a serapilheira em pisos úmidos de florestas em florestas nativas e matagais
<i>Moss-hoppers</i>	Saltadores do musgo	Talitrídeos que ocorrem em troncos de árvores e trepadeiras lenhosas, em musgos no solo, folha de árvores e entre arbustos nativos até vários metros acima das árvores.
<i>Cave-hoppers</i>	Saltadores da caverna	Talitrídeos não modificadores de substrato que vivem em cavernas

Fonte: Adapt: Lowry & Myers, 2019

No Brasil, a superfamília Talitroidea possui, até o momento, somente 5 gêneros registrados: *Atlantorchestoidea* sp., *Chelorchestia* sp., *Platorchestia* sp., *Talorchestia* sp. e *Talitroides* sp., somando 6 espécies (SEREJO; SIQUEIRA, 2018). Destes, os 4 primeiros gêneros habitam o litoral (SEREJO, 2004a), sendo 3 habitantes do ecossistema praia arenosa (Tabela 2).

Tabela 2 - Espécies de talitrídeos registrados no Brasil e suas classificações de acordo com sinapomorfias e homoplasias morfológicas (Myers & Lowry, 2020) e de acordo com seus nichos ecológicos/habitat (Lowry & Myers, 2019). As linhas em destaque correspondem às espécies encontradas em praias arenosas.

Gênero	Espécies	Classificação morfológicas	Classificação ecológica
<i>Atlantorchestoidea</i> sp.		<i>Talitridae</i>	
• <i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>		• <i>Talitrinae</i>	<i>Sand-hoppers</i>
<i>Chelorchestia</i> sp.		<i>Talitridae</i>	<i>Marsh-hoppers</i>
• <i>Chelorchestia darwinii</i>		• <i>Talitrinae</i>	<i>Field-hoppers</i>
<i>Platorchestia</i> sp.		<i>Talitridae</i>	
• <i>Platorchestia monodi</i>		• <i>Talitrinae</i>	<i>Beach-hoppers</i>
<i>Talorchestia</i> sp.		<i>Talitridae</i>	
• <i>Talorchestia tucurauna</i>		• <i>Talitrinae</i>	<i>Beach-hoppers</i>
<i>Talitroides</i> sp.			
• <i>Talitroides alluaudi</i>		<i>Brevitalitridae</i>	<i>Field-hoppers</i>
• <i>Talitroides topitotum</i>			

Fonte: Adapt: Myers & Lowry, 2020 e Lowry & Myers, 2019

Destes, a espécie mais recorrente é *Atlantorchestoidea brasiliensis*, considerada endêmica do litoral brasileiro, mas chegando também ao Uruguai. É encontrada de origem terrestre (ex: serapilheira da vegetação) ou marinha (ex: macroalgas) no pós praia, possuindo registro de distribuição em diversas praias do litoral brasileiro, especialmente nos estados do Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (SEREJO, 2004a).

A segunda espécie mais representativa é *Talorchestia tucurauna*. Registros mostram que a espécie encontra-se distribuída desde o litoral do estado de Santa Catarina até o Rio Grande do Norte, incluindo o Atol das Rocas (SEREJO, 2004a). Sua abundância é associada aos aglomerados de algas e rochas coralíneas aportadas na praia, apresentando comportamento semelhante às demais espécies presentes em regiões temperadas e subtropicais, como *Talitrus saltator*, *Bollorchestia quoyana* e *Orchestoidea tuberculata* (FALLACI et al., 1999; DUGAN et al., 2003).

Por fim, a espécie *Platorchestia monodi* aparece documentada como ocorrente em várias praias que vão do Nordeste ao Sul do Brasil. Tem preferência por praias protegidas e também pode ser encontrado em áreas estuarinas e manguezais (SEREJO, 2004a).

2. JUSTIFICATIVA

São diversos os que fatores impactam os ecossistemas do mundo e a sua biodiversidade. Nos ambientes de praias arenosas também não é diferente, pelo contrário, os mesmos são ambientes extremamente sensíveis e vêm sofrendo cada vez mais com as consequências oriundas da atividade humana. A perda de área, com intensificação de processos erosivos e a contínua expansão da urbanização costeira, além de outros impactos como a utilização das praias para fins recreativos, o aumento do aporte de lixo e esgoto lançado deliberadamente nos ambientes marinhos são alguns exemplos dessas práticas. (GARCIA; GIANUCA, 1997; BARCELLOS et al., 2009; DEFEO et al., 2009).

Assim como outros representantes da macrofauna bentônica (pequenos invertebrados aquáticos que perturbam/modificam o substrato, onde vivem), as populações de talitrídeos desempenham um papel ecológico fundamental nesses ambientes (FIALKOWSKI et al., 2009; OTEGUI; BLANKENSTEYN; PAGLIOSA, 2012) sendo considerados espécies chaves na manutenção da estrutura da comunidade ecológica e no equilíbrio deste ecossistema (SCAPINI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2009).

As alterações ou oscilações nas populações desses animais, bem como no comportamento destes indivíduos, são em sua maioria potenciais indicadores de mudança ou instabilidade ambiental. (VELOSO et al., 2006, UNGHERESE; UGOLINI, 2009, FANINI; CANTARINO; SCAPINI, 2005; SCAPINI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2009). Aliado a isso, as espécies de talitrídeos apresentam algumas características que as tornam excelentes bioindicadores em praias arenosas, como representação de populações muito abundantes e de fácil amostragem, fácil manutenção em laboratório, ciclo de vida relativamente longo para acompanhamento e tamanho razoável, permitindo possíveis extrações de tecidos para análises (WENNER, 1988).

Entendida a importância desses organismos e a escassez de estudos relacionados no nosso país, analisar o perfil genético e a distribuição dessas populações ao longo do litoral brasileiro nos ajudará a entender em um cenário bastante amplo o padrão de distribuição de talitrídeos na costa brasileira e, potencialmente, efeitos de modificação neste padrão causados por grandes focos de perturbação antrópica, os quais em última instância evidenciam o grau de deterioração da saúde dos nossos ecossistemas costeiros.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ECOLOGIA DE TALITRÍDEOS DE PRAIAS ARENOSAS

Os talitrídeos possuem Adaptações comportamentais específicas para terem sucesso na colonização do ambiente terrestre (SEREJO; SITTROP, 2009), como apresentar hábitos noturnos, o que minimiza a desidratação (FRIEND; RICHARDSON, 1986). Nas regiões de supralitoral, vivem enterrados no solo ou na interface solo-serapilheira de restingas, além buscarem abrigo em detritos depositados pela maré (HURLEY, 1968). São sensíveis à atividade humana e estão cada vez mais ameaçados devido à intensa urbanização costeira, decorrente do aumento da atratividade e da magnitude da indústria turística nos ecossistemas de praias (VELOSO et al., 2010).

São os talitrídeos um dos mais importantes táxons da comunidade em relação à diversidade, abundância e biomassa em praias arenosas, especialmente na zona supralitoral (BACHELET; DAUVIN; SORBE, 2003). Decorrente disto, os talitrídeos influenciam consideravelmente a dinâmica das comunidades onde vivem, participando da dinâmica do solo, aumentando as taxas de oxigenação através de sua locomoção e acelerando os processos de decomposição (LAM; MA, 1989; ALVAREZ; WINFIELD; CHÁZARO, 2000; LOPES; MASUNARI, 2004). Podem ser consumidores primários, predadores ou até mesmo saprófitos. São também presas de crustáceos, poliquetas, peixes e aves, constituindo portanto um importante elo trófico nos ecossistemas costeiros (AIKINS; KIKUCHI, 2001).

A história de vida dos talitrídeos, assim como a de outros crustáceos, tende a variar de acordo com latitude, onde geralmente, os indivíduos com grande tamanho corpóreo, reprodução bianual ou perianual, baixo potencial reprodutivo são encontrados nas regiões temperadas e as espécies de pequeno tamanho corpóreo, reprodução semi-anual ou anual e elevado potencial reprodutivo são encontradas nos trópicos (SASTRY; VERNBERG; VERNBERG, 1983).

Os embriões de talitrídeos são carregados pela fêmea na bolsa incubadora até a eclosão, momento em que são liberados no ambiente para atingirem a maturidade (WILDISH, 1988). Sem larvas planctônicas, possuem dispersão limitada entre praias, e consequentemente fluxo gênico, acentuando as diferenças genéticas entre as populações (CRISP, 1978).

A presença de correntes oceânicas e de diferenças no período de duração da larva pelágica, entre outros argumentos, tem sido usada, por exemplo, para explicar a

diferenciação genética de populações em espécies marinhas (ROCHA et al., 2005; MATTOS; SEIXAS; PAIVA, 2019). Logo, espécies costeiras com capacidade de dispersão reduzida, como é o caso dos peracáridos terrestres, tendem a ser enquadrar no conceito de metapopulação, ou seja, populações que estão espacialmente isoladas, mas mantêm uma conexão funcional via fluxo migratório (LEVINS, 1969). Uma vez que o intervalo de dispersão de juvenis de Talitridae ainda é pouco conhecido e a conectividade entre populações é um elemento essencial para manutenção de metapopulações, permanece a questão de como é que diferentes cenários de isolamento entre populações podem romper a dinâmica migratória e, consequentemente, a diversidade genética.

Apesar de ainda pouco explorado dentro desse grupo animal, já foram encontrados padrões contrastantes de estruturação genética em espécies Talitridae, o que indica que características intrínsecas de cada espécie também desempenham um papel na determinação de sua estrutura genética (PAVESI; KETMAIER, 2013). Algumas espécies estudadas não eram suficientemente conectadas e não conseguiam evitar o isolamento genético, apresentando numerosas populações bastante distintas geneticamente ao longo do espaço (HENZLER; INGÓLFSSON, 2008; PAVESI et al., 2011; FANINI et al., 2017b). Já outras espécies um padrão genético mais homogêneo mesmo em uma ampla área geográfica, indicando maior fluxo gênico entre suas populações (KETMAIER et al., 2010).

3.2. MARCADORES MOLECULARES, DNA MITOCONDRIAL E REGIÃO CONTROLE

Nas últimas décadas, uma parcela da comunidade científica mundial tem se dedicado ao conhecimento relacionado à diversidade biológica e à conservação dos recursos genéticos, através do uso de ferramentas de biologia molecular, utilizando desde as tradicionais técnicas, surgidas no início da década de 80 como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o uso de enzimas de restrição, para os estudos de DNA até as mais recentes inovações biotecnológicas, como os sequenciamentos genéticos de nova geração e outras técnicas surgidas pós o ano de 2005 (MOSS, 2019), aplicadas em análises intra- e interespecíficas para avaliação de processos evolutivos, estimativas do grau de variabilidade genética, análises de zonas de contato entre espécies, fluxo gênico,

biogeografia histórica, caracterizações de estruturas populacionais, sistemática molecular, inferência de relações filogenéticas e identificação específica de espécimes processados (AVISE et al., 1987; ORTÍ et al., 1996).

Aqui, usamos a ferramenta biomolecular em uma abordagem filogeográfica, para verificar a diversidade e conectividade entre populações de talitrídeos ao longo do litoral brasileiro. O conceito de filogeografia nasceu através das observações de que os haplótipos de DNA mitocondrial (mtDNA) de populações de muitas espécies apresentam uma distribuição geográfica determinada, o que permitiu que a dimensão filogenética adentrasse nas discussões sobre estrutura de populações. O termo foi introduzido por AVISE e colaboradores (1987), e se designa como o estudo da distribuição da variabilidade genética de uma espécie em uma escala espacial e temporal, e objetiva revelar a história evolutiva de uma linhagem, relacionando-a com sua distribuição geográfica, através, principalmente, das diferenças entre sequências de mtDNA, a qual abrange conhecimentos de microevolução (genética de populações) e macroevolução (filogenias) alinhadas pela biologia molecular.

Assim, a utilização das ferramentas da sistemática molecular para a compreensão da conectividade das populações é capaz de não só estabelecer diferenças genéticas entre populações separadas geograficamente, mas também acessar e entender informações quanto à estrutura das populações, fluxo gênico, relações filogenéticas, padrões biogeográficos, análises de paternidade e parentesco (FÉRAL, 2002), possibilitando assim, a distinção de populações geográficas com grande eficiência através da identificação de haplótipos (DAVOLOS; MACLEAN, 2005; SEIDEL; LANG; BERG, 2009), gerando um aumento do conhecimento sobre os processos históricos biogeográficos.

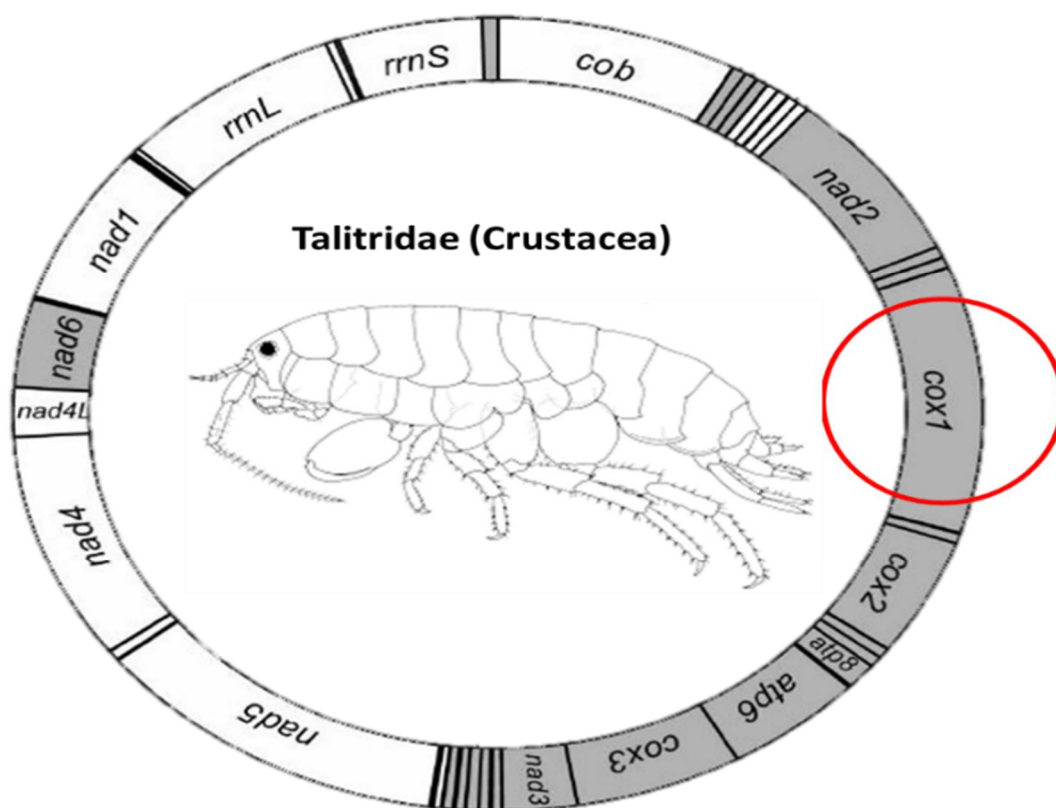
Dessa maneira, o sequenciamento do mtDNA tornou-se uma ferramenta comum e eficiente para elucidar as relações entre indivíduos em diferentes escalas evolutivas, devido suas propriedades peculiares, como ter herança exclusivamente materna, não sofrer recombinação, conter inúmeras cópias por célula, e em algumas regiões, apresentar acúmulos de mutações de forma mais rápida quando comparada ao DNA nuclear (NEDBAL; FLYNN, 1998).

Já há algum tempo, os padrões de diversificação do DNA mitocondrial (mtDNA) de amphipodas (KETMAIER et al., 2010; KNOX et al., 2012; WILDISH et al., 2016) vêm possibilitando a diferenciação de populações geográficas com grande eficiência através da identificação de haplótipos (DAVOLOS; MACLEAN, 2005; BROWNE;

HADDOCK; MARTINDALE, 2007; SEIDEL; LANG; BERG, 2009). São diversos os trabalhos com espécies pertencentes à família Talitridae, ou com hábitos semelhantes, como alguns isópodes e caranguejos (MATTOS; SEIXAS; PAIVA, 2019), que utilizam regiões do mtDNA para estudos populacionais desses indivíduos (KETMAIER et al., 2010; PAVESI et al., 2011; WILDISH; PAVESI; KETMAIER, 2012; FANINI et al., 2017b)

Dessa forma, com base nestes conceitos analisamos a estrutura genética de talitrídeos, ao longo do litoral brasileiro utilizando uma região codificante do mtDNA, pertencente à subunidade 1 da citocromo oxidase (COI) (Figura 4), já que região tem se mostrado suficientemente variável para o estudo de genética de populações destes peracáridos litorâneos. A análise de fragmentos desta região nos permite estimar graus de isolamento populacional bem como diferenciar espécies além das limitações impostas pela identificação morfológica.

Figura 4 - Localização do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 (COI, representada em destaque como *cox1*).



Fonte: Adapt: Bauz-Ribot et al., 2009

4. HIPÓTESE

A análise do tipo “*barcode*” de sequência parcial da Citocromo Oxidase I diferencia com sucesso espécies e populações de talitrídeos de praias ao longo do litoral brasileiro. A diferenciação entre espécies deve refletir, minimamente, os padrões de distribuição descritos na literatura através de identificação morfológica, além de o método permitir a estimativa de graus de isolamento dentro de unidades operacionais taxonômicas, inclusive eventualmente desconhecidas, que devem diferir entre setores diferentes da costa brasileira.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

- Analisar a estrutura e diversidade genética de talitrídeos (Crustacea: Amphipoda) amostrados ao longo do litoral brasileiro.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as espécies de talitrídeos amostrados ao longo do litoral brasileiro;
- Adaptar a técnica de amplificação do gene mitocondrial COI para talitrídeos;
- Associar informações genéticas à identificação morfológica dos indivíduos amostrados;
- Avaliar aspectos filogenéticos e análises de distâncias genéticas intragrupos para talitrídeos amostrados ao longo do litoral brasileiro.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. AMOSTRAGEM

As coletas realizadas para a execução deste trabalho têm a autorização do Ministério de Meio Ambiente – MMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA; Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio) registrado sob a licença 50823-3 (Anexo I).

Coletamos os espécimes ao longo da costa brasileira, de janeiro a fevereiro de 2015, entre 2,507, -50,832 e -32,515, -52,384, incluindo a ilha oceânica Atol das Rocas (Tabela 3). O número amostral foi pré definido de acordo com o trabalho de Waples e Gaggiotti (2006) Em cada praia amostrada, cerca de 30 indivíduos foram coletados através de busca ativa simples e recolha manual, sendo imediatamente identificados e armazenados em recipiente com álcool comercial. Posteriormente, em laboratório, as amostras foram mantidas em freezer a -20°C.

Tabela 3 - Pontos de coleta e coordenadas das 11 praias amostradas ao longo do litoral brasileiro.

LOCAIS DE COLETA		
Estado	Praia	Coordenadas
ES	Marataízes	-21,093, -40,844
RJ	Saquarema	-22,936, -42,397
RN	Atol das Rocas	-3,857, -33,814
BA	Canavieira	-15,695, -38,925
AL	Jarapatinga	-9,132, -35,285
PR	Guaratuba	-25,965, -48,594
RS	Cassino	-32,515, -52,384
PA	Salinas (Corvina)	-0,603, -47,372
SP	Praia Vermelha do Norte	-23,416, -45,035
SC	Gamboa	-27,952, -48,625
AP	Goiabal	2,507, -50,832

Fonte: Autor

6.2. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Em laboratório, os exemplares de cada unidade amostral foram separados e contados em laboratório sob um microscópio estereoscópio *ZEISS-(Stemi-508)*, equipado com oculares micrométricas, de acordo com o sexo e estágio de desenvolvimento. A identificação se deu por meio da comparação dos indivíduos com as informações contidas nas chaves morfológicas de Serejo (2004), elaborada para as espécies já identificadas no Brasil.

6.3. EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO

As técnicas de extração de DNA consistem de um conglomerado de processos físicos, químicos e mecânicos fundamentados na lise celular, limpeza (eliminação de proteínas, lipídios e RNA), e precipitação (EGUIARTE; SOUZA; AGUIRRE, 2007). Para este trabalho, utilizamos a técnica Adaptada de digestão por proteinase K, seguida de extração orgânica com fenol-clorofórmio e precipitação com Etanol 100%, conforme metodologia descrita por Sambrook & Russell (2001) detalhada a seguir.

Cada espécime foi individualmente processado em *Tissuelyser* da *Qiagen*®, por 5 min a 50Hz, em microtubos de 2,0mL contendo 500µL de solução de lise (NaCl 2µM, SDS 10%, EDTA 1µM, Tris 1M, Proteinase K 50U/µL) e esfera de aço inoxidável de 5mm de diâmetro. O macerado passou então por digestão com proteinase K e posterior incubação *overnight* a 42°C em banho-maria.

Seguiram-se então as etapas: adição, à solução prévia, de 500µL de CHCl₃ (Clorofórmio), agitação em *vortex* por 1 min, centrifugação por 5 min a 1600xg em 4°C e recuperação do sobrenadante (fase aquosa). Deste sobrenadante foi precipitado o DNA com a adição de 50µL de NaOAc 3M e 1mL de EtOH 100% a -20°C na solução, nova agitação em *vortex* por 30s e incubação a -20°C por no mínimo 1h.

Dado este período, a solução com a amostra foi levada à centrífuga por 15min à 16000xg a 4°C, o sobrenadante descartado, e o precipitado de DNA lavado através de adição de 500µL de EtOH 70% a -20°C e centrifugação de 5 min a 16000xg a 4°C. O

sobrenadante foi novamente descartado e o material foi deixado para a secagem na bancada em temperatura ambiente por 5min. Por fim, o material genético obtido foi ressuspenso em 100µL de água ultrapura, agitado em *vortex* por 10s e mantido em freezer a -20°C até o próximo procedimento.

Neste estudo com os talitrideos, o gene mitocondrial alvo escolhido para amplificação foi Citocromo Oxidase I (COI). Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) inicialmente escolhidos para a amplificação dos fragmentos foram os *primers* LCO1490 (5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG'3) e HCO2198 (5'TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA'3), conhecidos como *primers* universais para invertebrados, descritos por Folmer e colaboradores (1994), que em seu trabalho conseguiu amplificar utilizando os mesmos mais de 11 filos diferentes.

Devido à dificuldade de amplificação do nosso material, foram testados outros 9 pares de *primers*, além de 1 *primer reverse* criado neste trabalho (Tabela 4). Para cada *primer* foram utilizadas as condições de PCR descritas em seus respectivos artigos de origem. Diferentes combinações entre os *primers forward* e *reverse* citados anteriormente também foram testadas a partir de matrizes de concentração (0,5 a 2,0 µL) e temperatura (40 a 70°C) para o estabelecimento da quantidade ótima dos *primers*.

Tabela 4 - Referência, nomes e sequências dos *primers* utilizados nos testes de amplificação.

Referência	Nome	Sequência
Pavesi & de Mattheis (2009)	CoiF	5'- ACYTCNGGRTGNCCRAARARYCA-3'
	CoiR	5'- TCWACNAAYCAYAARGAYTTGG-3'
	CoiFint	5'-GGGACAGCHCTKAGVRTAAT-3'
	CoiRint	5'-GCYCCYGCYAAWACAGGKARDGA-3'
Ketmaier; Iuri; Mattheis (2005)	COIf	5'-TTT TTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3'
	COIr	5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'
Seidel; Lang; Berg, (2009)	CBL4f	5'- GTGAAGAGAGAAAATAGCTA -3'
	CBL4r	5'-ATYATAATTGGGGGGTTC-3'
Tafari et al. (2004)	COI-SL	5'-ACAGTTGGTATAGACATTGATAC-3'
	TAL-FW	5'-CATATTGTTAGTCAAGAACAGG-3'
Davolos & Maclean, (2005)	SUBIF-CAV	5'-AAGCGGAATGCCTCGCCGATACTC-3'
	COII-TAL2	5'-ATGATTTCGATTGTTTGGTTTTGTA-3'
	COII-CROZ	5'-CCACAAATTTCTGAACATTGACC-3'
	SUBIF	5'-AAGAGGCATACCTCGACGATACTC-3'
	SUBIR	5'-GTATCGTCGAGGTATGCCTCTTAA-3'
Knox et al. (2012)	BI-COI	5'-GATACCCGAGCTTATTTTAC-3'
	CrustDF1	5'-GGTCWACAAAYCATAAAGAYATTGG-3'
Presente trabalho	CrustDR1	5'-TAAACYTCAGGRTGACCRAARAAYCA-3'
	GNF_deg	5'-TTTCHACHAAYCAYAAAGATATYGG-3'

Fonte: Autor

6.4. CONDIÇÕES DA PCR

O *primer forward* GNF_deg (5'-TTTCHACHAAYCAYAAAGATATYGG-3') (desenvolvido neste trabalho) e o *reverse* COIRint (5' ACYTCNGGRTGNCCRAARARYCA 3') (FANINI et al., 2017c) ao final dos testes, foram os escolhidos e utilizados para amplificar aproximadamente 590pb deste gene mitocondrial. O fragmento do gene COI foi amplificado com *GoTaq® Hot Start Master Mix* (Promega, Madison, WI, Buffer A). Foi incluído em todas as baterias de reações um controle negativo para o descarte das possibilidades de contaminações. A reação de PCR foi realizada a um volume total de 25uL de acordo com a Tabela 5. Os ciclos de amplificação foram Adaptados de (FANINI et al., 2017b) e estão descritos na Tabela 6. As amostras não amplificantes foram submetidas a nova PCR, utilizando 1,5μL do produto da primeira PCR, diluídos 10X em água ultrapura, nas respectivas condições anteriormente citadas.

Tabela 5 - Volumes e concentrações dos reagentes usados na reação de PCR para amplificação de fragmento do gene mitocondrial COI.

Reagentes	Concentração Stock	Para 1 reação: 25μL
H ₂ O	-	qsp 25μL
<i>GoTaq® Hot Start Master Mix</i>	2X	12,5 μL
<i>Primer reverse</i>	10mM	1μL
<i>Primer forward</i>	10mM	1μL
DNA	±150ng/μl	300 ng

Fonte: Autor

Tabela 6 - Condições utilizadas nas PCR após finalização das etapas testes.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	10min	1 X
94°C	40s	5 X
45°C	40s	
72°C	1min	
94°C	40s	35 X
51°C	40s	
72°C	1min	
72°C	2min	1X

Fonte: Autor

6.5. TRIAGEM E SEQUENCIAMENTO

Os produtos de PCR amplificados nesse estudo foram separados em gel de agarose a 1,5% para volume de 150mL, em tampão TAE (Tris-Acetato), corado com Brometo de etídeo (10ng/μl). O gel com as amostras fica dentro da cuba de eletreforese por 25min a 15V/cm, e o seu resultado é visualizado em um trans-iluminador de luz ultra-violeta. Os géis foram fotografados e o tamanho do fragmento de DNA é estimado pela comparação com o padrão *Ladder 100pb* (*Ludwig Biotec*).

Os produtos amplificados foram purificados com o *kit* de purificação *MEBEP BIOSCIENCE – PCR Products Purification Kit*, conforme orientações do fabricante. Em síntese, as bandas de DNA foram cortadas do gel de agarose, e o fragmento foi pesado em um microtubo de 1,5mL. Foi adicionado 3X o valor do peso (em mg) em volume do *buffer* de diluição. As amostras foram então incubadas a 60°C em banho-maria a 12 min. Em seguida, as amostras foram transferidas para um tubo de coluna para passarem pela etapa de lavagem duas vezes, adicionando 600μL de tampão de lavagem, centrifugação a 16000xg e descarte do precipitado. A ressuspensão das amostras foi feita em 50μL de água ultrapura.

Após a purificação, foi feita a seleção visual, em gel de agarose, das amostras de qualidade razoável para sequenciamento do tipo “Sanger” pela empresa ACTGene (Análises Moleculares LTDA (CNPJ: 10579265000140); uso do equipamento *3500XL Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) e *primer COIrint* (5'-ACYTCNGGRTGNCCRAARARYCA-3') em sentido *reverse*).

6.6. ANÁLISE DOS DADOS

A qualidade dos cromatogramas foi analisada de acordo com o valor da porcentagem de qualidade (*Height Quality*; HQ%), sendo que amostras com HQ<50% foram desconsideradas. Para o alinhamento e edição de sequências foi utilizando o *software CLC Genomics Workbench®* (versão teste 21.0.3) A confirmação da identidade das sequências obtidas foi realizada pela comparação com sequências disponíveis no banco de dados do NCBI, o *GenBank*, com o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search*

Tool)+ 2.2.29 (ZHANG et al., 2000). Já a eficácia da identificação molecular foi avaliada por análise de distâncias genéticas com o método *Kimura 2-Parameter* (K2) (KIMURA, 1980) utilizando o programa MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2007).

As aferições dos índices de diversidade haplotípica e nucleotídica foram realizadas no programa *Arlequin* 3.5.2 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). As sequências alinhadas também foram utilizadas juntas ao programa TCS v.1.21 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000) por meio do *software PopART* v. 1.7 para gerar uma rede de haplótipos. A rede foi criada considerando o modelo de parcimônia estatística com índice de veracidade igual a 95%, e com tamanho das representações gráficas de cada haplótipo proporcional a sua frequência na amostral.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Somando todos os espécimes coletados nas 11 praias, um total de 397 indivíduos passaram pela identificação morfológica inicial, dentre os quais 2 espécies foram identificadas: *Atlantorchoidea brasiliensis*, que correspondeu a 56% do total, e *Talocherastia tucurauna*, correspondendo a 32% (Figuras 5 e 6). Os outros 12% não puderam ser identificados de acordo com a chave de identificação de espécies de Talitridae registradas no Brasil (SEREJO, 2004a).

Figura 5 - Proporção entre espécies de Talitridae (Crustacea:Amphipoda) amostradas ao longo do litoral brasileiro, em janeiro e fevereiro de 2015. Até o momento 353 indivíduos foram identificados até o nível específico de acordo com a chave de identificação de espécies já registradas no litoral brasileiro (SEREJO, 2004); 48 indivíduos analisados não puderam ser identificados conformemente. A) AP: n=30, B) PA: n=8, C) RN: n=37, D) AL: n=68, E) BA n=42, F) ES: n=30, G) RJ: n=40, H) SP: n=66, I) PR: n=34, J) SC: n=33, K) RS: n=9.

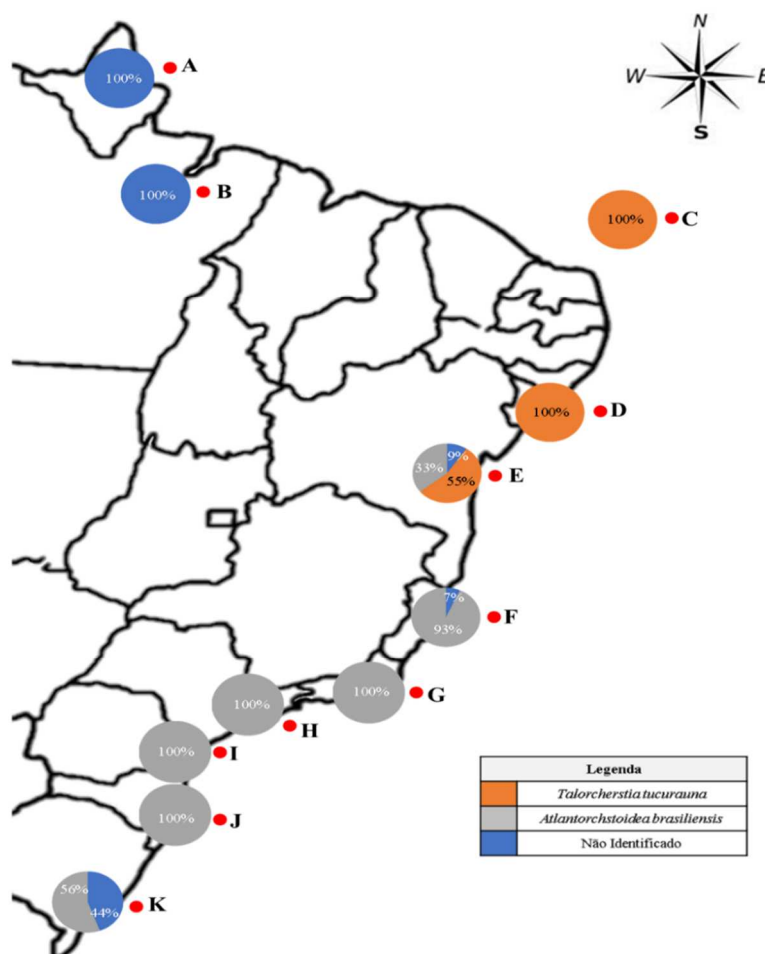
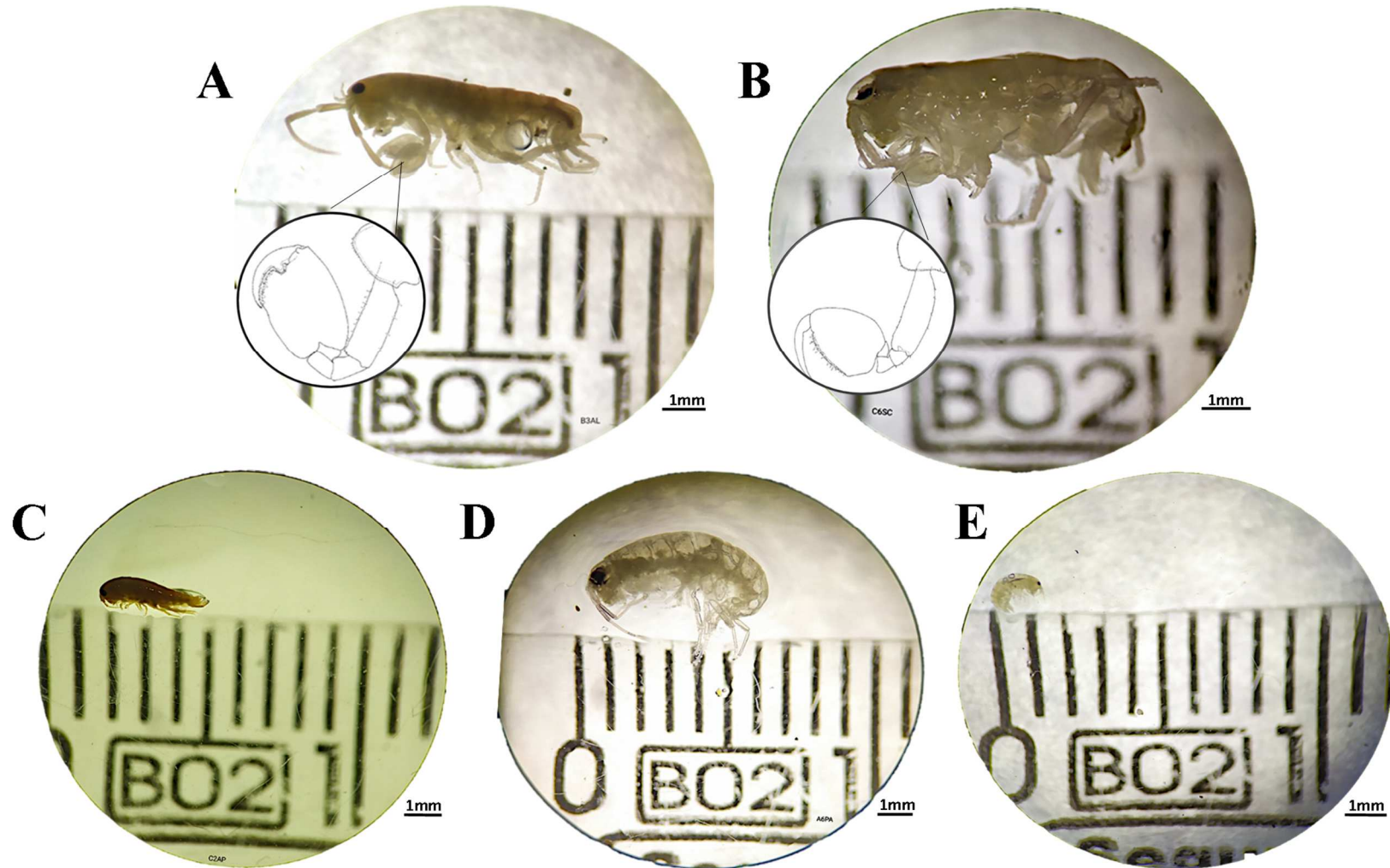


Figura 6 - Diferentes morfotipos de Talitridae analisados dentre amostras realizadas ao longo do litoral brasileiro em janeiro e fevereiro de 2015. A): *Talorchestia tucurauna*; local de coleta: AL; referência: B3AL. B): *Atlantorchestoidea brasiliensis*; local de coleta: SC; referência C6SC C) Morfotipo 1 (não identificado); local de coleta: AP; referência C2AP. D) Morfotipo 2 (não identificado); local de coleta: PA; referência A6PA. E) Morfotipo 3 (não identificado); local de coleta: RS referência A8RS.



Nos 2 pontos de coleta do Norte brasileiro, AP e PA, os indivíduos amostrados não puderam ser identificados de acordo com a chave utilizada. Na região Nordeste 3 pontos foram amostrados: no Atol das Rocas/RN e em Alagoas foram detectados somente exemplares de *T. tucurauna*; na Bahia, dentre 42 indivíduos analisados, *T. tucurauna* foi reconhecido e também indivíduos de *A. brasiliensis*, além de 4 indivíduos não identificados. No Sudeste e Sul, somando 6 pontos amostrados, a única espécie reconhecida dentre os indivíduos foi *A. brasiliensis*. Apenas no ponto mais ao norte, ES no Sudeste, e no ponto mais ao sul, RS no Sul, outro morfotipo não identificado apareceu juntas às demais.

A espécie de maior representatividade neste estudo, *A. brasiliensis*, vem sendo citada como típica e muito abundante em praias do sudeste brasileiro (RJ, SP e SC), especialmente as reflexivas, onde passam o dia enterrada sob o sedimento e emergem a noite para alimentar-se (CARDOSO; VELOSO, 1996; CARDOSO, 2002). No PR a ocorrência de *A. brasiliensis* é considerada esporádica devido a fatores que desfavoreceriam sua permanência, como influência estuarina e ausência de ambientes reflexivos (BARROS; BORZONE; ROSSO, 2001; BORZONE, 2003; L C ROSA, R ALUIZIO, 2007). Serejo, (2004a) também registrou a espécie no RN. Dentre estes estados com registro de ocorrência, não amostramos a espécie no RN, mas em todos os estados do RS à BA, corroborando e complementando as informações disponíveis para esta espécie.

A segunda espécie mais amostrada, *T. tucurauna*, também possui ampla ocorrência no litoral brasileiro, ocorrendo do nordeste (RN) ao sul do país (SC), além de ser apontada como o único talitrídeo que conseguiu colonizar as ilhas oceânicas Atol das Rocas (RN) e Fernando de Noronha (PE) (SEREJO, 2004; IWASA-ARAI et al., 2020). Serejo (2004) relata que a espécie é comumente encontrada junto à *A. brasiliensis* em praias do RJ, no entanto, em nosso estudo, essa relação só foi observada nas amostras coletadas no estado da BA. De fato, neste nosso estudo, houve uma nítida separação da amostragem das duas espécies, com *A. brasiliensis* no Sul e Sudeste e *T. tucurauna* nas estações do Nordeste. Poucos estudos foram realizados sazonalmente para talitrídeos na costa de Brasil, assim como amostragens específicas e/ou probabilísticas. Logo, não é possível descartar flutuações sazonais e má representação da composição da comunidade, fatores que podem ser responsáveis pela discrepância entre registros de ocorrência da espécie.

Quanto aos espécimes não identificados a nível específico, foi perceptível a semelhança na forma dos caracteres dos indivíduos do RS e do AP, os dois extremos latitudinais amostrados. Este estudo é o primeiro a registrar os talitrídeos no Norte do país. No Pará, onde há estudos sobre a comunidade da macrofauna do supralitoral, é frequentemente considerado não ocorrer espécies de Talitridae nas praias do estado, uma vez que não há registros oficiais da espécie (ROSA FILHO et al., 2006; PETRACCO et al., 2012). Aqui, 8 indivíduos foram capturados na praia das Corvinas, PA, no centro da região de dunas e a uma profundidade incomum para o grupo (~30cm). A presença de muitos artefatos nas amostras impossibilitou uma identificação morfológica precisa dos espécimes.

Das espécies de anfípodes talitrídeos registradas para o litoral brasileiro, *Platorchestia monodi* não foi amostrada em nosso estudo (SEREJO, 2004b). É possível que, por estar associado a ambientes mais protegidos e menos salinos que as demais, nossos pontos amostrais de fato não contemplem seus principais locais de ocorrência.

7.2. TESTES MOLECULARES

7.2.1. Avaliação dos *primers*

A utilização de *primers* universais é empregada com sucesso para sequenciamento de grupos de animais para os quais não há *primers* específicos. descritos, tendo sucesso De invertebrados a vertebrados, os *primers* universais conseguem amplificar vários táxons, porém o reconhecimento de espécies dentro de um determinado táxon se torna mais difícil usando apenas *primers* universais, especialmente quando são universais para uma maior abrangência de táxons (MEYER; PAULAY, 2005; GELLER et al., 2013). Estudos mais recentes têm mostrado que importantes *primers* universais, de Folmer e colaboradores (1994), não são tão universais assim, na falhando na amplificação de fragmentos de diversos táxons de invertebrados (SHARMA; KOBAYASHI, 2014). O fracasso é relatado em trabalhos filogenéticos de assembleias de Amphipoda, que precisaram desenvolver *primers* internos para maximizarem as amplificações de suas PCR (SEIDEL; LANG; BERG, 2009; KNOX et al., 2012). Uma das causas possíveis apontadas para esse problema é a incompatibilidade nas posições de associação

(GELLER et al., 2013; MIODUCHOWSKA et al., 2018; SHARMA; KOBAYASHI, 2014).

Dito isto, após a dificuldade de realizar a amplificação das amostras utilizando os *primers* universais descritos por Folmer et al. (1994), uma bateria de 9 novos pares de *primers* descritos para espécies de grupos semelhantes foram testadas, utilizando as condições de PCR recomendadas por cada artigo (Tabela 4). Após testes, os resultados não foram satisfatórios, com nenhum deles amplificando os fragmentos conforme o esperado.

A partir dessa coleção de *primers* já confeccionada, uma nova bateria de teste foi iniciada, aqui resumida a fim de descrever o novo primer resultante deste estudo. Cada par de *primers* foi testado em 3 diferentes amostras (para eliminar o viés do problema estar na extração). Esse conjunto sistemático de reações de PCR foi montado combinando uma matriz de gradiente de concentrações entre *primers forward* e *reverse* (5, 10 e 20 µL adicionados a um mesmo volume de reação) a outra de temperatura (40, 50, 55, 60 e 70°C) (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Matriz representativa utilizada durante as PCR que utilizavam o gradiente de concentração de *primers*. F representando o *primer forward* e R representando o *primer reverse*.

R F	0,5µL (5 µL)	1,0 µL (10 µL)	2,0 µL (20 µL)
0,5 µL (5 µL)	1	2	3
1,0µL (10µL)	4	5	6
2,0 µL (20 µL)	7	8	9

Fonte: Autor.

Figura 8 - Matriz representativa utilizada durante as PCR que utilizaram o gradiente de concentração de temperaturas.

40°C	50°C	55°C	60°C	70°C
1	1	1	1	1
2	2	2	2	2
3	3	3	3	3
4	4	4	4	4
5	5	5	5	5
6	6	6	6	6
7	7	7	7	7
8	8	8	8	8
9	9	9	9	9

Fonte: Autor

Os ciclos de PCR foram os mesmos durante toda essa etapa. Em todos os testes, foram inseridas amostras de controle negativo, para avaliar possíveis contaminações (Tabela 7).

Tabela 7 - Condições utilizadas nas PCR durante os testes que utilizaram as matrizes de concentração de *primer* e temperatura

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	10min	1 X
94°C	30s	35 X
40°C a 70°C	30s	
72°C	1min	
72°C	10min	1X

Fonte: Autor

Os resultados obtidos após os testes utilizando as matrizes de gradiente e concentração também não foram bem sucedidos, pois apesar de obtermos amplificação em algumas amostras, por algum motivo, a reprodutibilidade não se mostrava exitosa. Dados esses percalços, o desenho de novos *primers* se apresentou como alternativa.

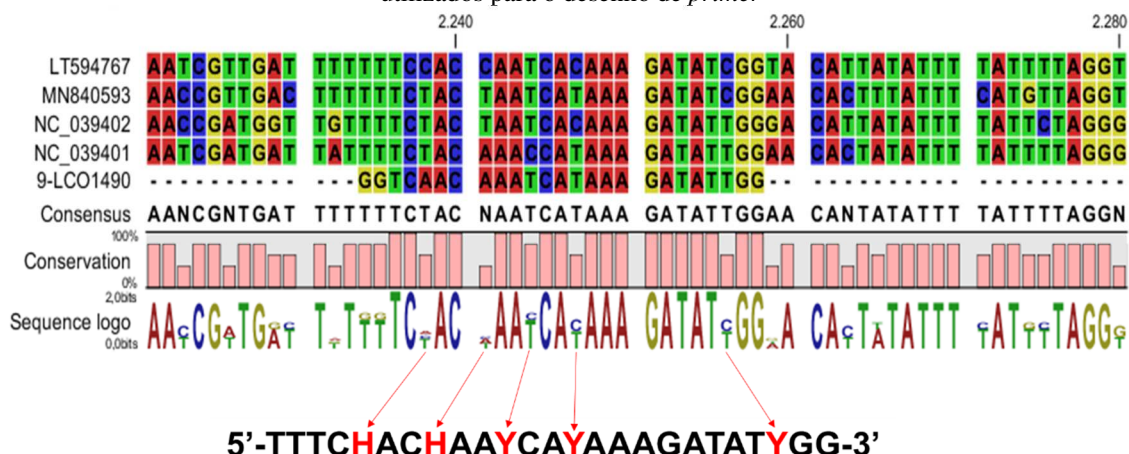
Utilizando o *software* CLC Genomics Workbench® (versão teste 21.0.3), alinhamentos com diversas sequências de DNA mitocondrial de diversos gêneros de Amphipoda, obtidas através dos bancos de dados do NCBI (*GenBank*) (Tabela 8), foram realizadas juntas ao *primer* LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') de Folmer (FOLMER et al., 1994). As bases não complementares obtidas neste alinhamento foram então substituídas por bases degeneradas correspondentes as inconsistências observadas, o que resultou na seguinte sequência (5'-TTTCHACHAAYCAYAAAGATATYGG-3') (Figura 9). Esta sequência foi então sintetizada e utilizada para a criação do *primer forward*.

Tabela 8 - Identificação das sequências das espécies retiradas do *GenBank* utilizadas no alinhamento para confecção de um novo *primer*.

GenBank	Espécie
MN840593	<i>Haustorioides koreanus</i>
LT594767	<i>Hyaella lucifugax</i>
NC_039402	<i>Parhyale hawaiiensis</i>
NC_039401	<i>Trinorchestia longiramus</i>

Fonte: Autor

Figura 9 - Alinhamento das 4 sequências de mtDNA de amphipodas junto ao *primer* LCO1490 utilizados para o desenho de *primer*



Fonte: Autor

Quanto ao *primer reverse*, visto que já tínhamos uma biblioteca de outros *primers reverse* em laboratório, combinações de pares de *primers* utilizando o novo *primer forward*, desenvolvido junto aos *reverses* já em estoque, foram criadas e testadas, utilizando as condições de PCR expressas em seus artigos de origem.

Ao final desses testes, o *primer forward* GNF_deg (5'-TTTCHACHAAYCAYAAAGATATYGG-3') (desenvolvido neste trabalho) e o *primer reverse* COIRint (5' ACYTCNGGRTGNCCRAARARYCA 3') (FANINI et al., 2017c) foi a combinação que apresentou maior eficiência de amplificação, aproximadamente 590pb do gene COI.

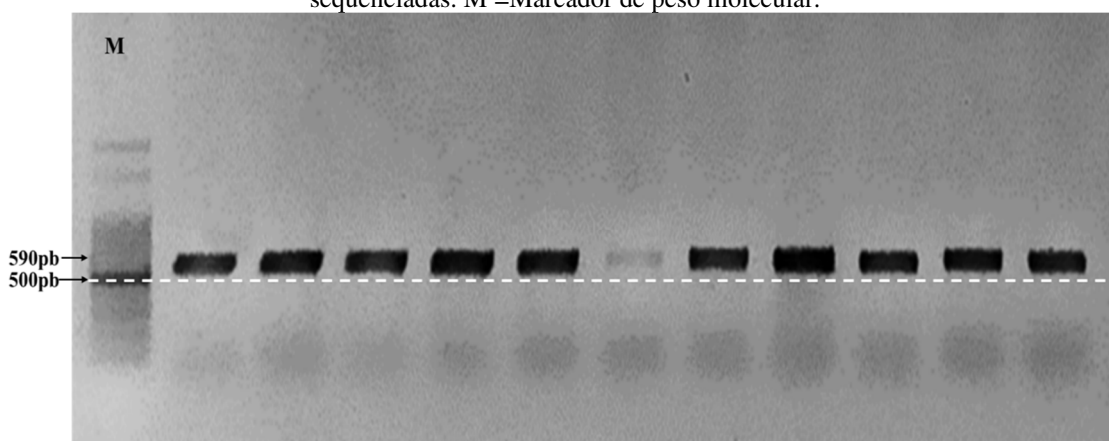
A alta degenerescência, uma maior quantidade bases compatíveis presentes no *primer forward* e a uma região de ligação única mais interna presente no *primer reverse* são os três principais fatores que respondem pela diferença na eficiência entre as diferentes combinações testadas.

A melhora no sucesso da amplificação de COI em talitrídeos pode facilitar a aplicação de códigos de barras de DNA na investigação da diversidade desses animais, dado o alto potencial do COI para realizar a identificação e descoberta de novas espécies (HEBERT et al., 2004). Um conjunto mais eficiente de *primers* para amplificar a região, aumentará a velocidade do avanço no que tange o estudo do grupo, facilitando trabalhos que envolvessem sua diversidade, filogenia e distribuição geográfica.

7.2.2. PCR

Dos 397 indivíduos que passaram pelo processo de extração de DNA, tivemos êxito na amplificação de 120. A seleção para o sequenciamento foi realizada através da análise visual dos produtos de suas respectivas PCR em gel de agarose, na qual foram priorizadas aquelas que tiveram melhor banda de amplificação (Figura 10). Assim, neste primeiro momento, as amostras (indivíduos) enviadas para sequenciamento são dos estados: AP (n=29), PA (n=3), AL (n=7), BA (n=3), ES (n=1), RJ (n=9) SP (n=5) e RS (n=3), somando 60 indivíduos.

Figura 10 - Gel de agarose 1,5% após eletroforese contendo produtos de PCR amplificadas utilizando-se os primers *GNF_deg* e *COIrint*, neste caso, todas vindas do estado do AP, que foram purificadas e sequenciadas. M = Marcador de peso molecular.



Fonte: Autor

7.2.3. Busca de seqüências em banco de dados

Das 60 amostras sequenciadas, na análise dos cromatogramas foram excluídas 4 (3 do AL e 1 do AP) devido à baixa qualidade das seqüências (HQ <50%). As seqüências amplificadas após os cortes, conforme descrito nos métodos, tiveram tamanhos que variavam de 501 a 571pb e foram submetidas à plataforma BLAST para identificação das seqüências mais similares no *GenBank*. Vale ressaltar que a plataforma BLAST em si não mede homologias entre as seqüências, mas o processo de alinhamento BLAST gera parâmetros de pontuação de similaridade, entre a seqüência consultada e a do banco de dados, que medem a provável correspondência verdadeira entre as seqüências, através do que é ou não inferida a homologia. Aqui usamos a “porcentagem de identidade”

(representando a correspondência de posição de entre a sequência de interesse e o banco de dados) e o Valor E (expectativa de que as correspondências encontradas sejam fruto do acaso, ou seja, valor inversamente proporcional à chance de similaridade real) (KERFELD; SCOTT, 2011).

A sequência do gene COI resultantes para os indivíduos de RJ, SP e ES indicaram uma similaridade que variou de 94,63 a 98,47% com sequências prévias de *A. brasiliensis* (Tabela 9), corroborando com a identificação morfológica. As sequências obtidas variaram de 508pb até 567pb, com valor E insignificantes, arredondados para 0, indicando que os alinhamentos entre as sequências geradas e as sequências do banco de dados não ocorreram ao acaso; o percentual de identidade refere-se ao número de sítios de bases nitrogenadas iguais às das amostras depositada no NCBI/*GenBank*.

Tabela 9 - BLAST das sequências vindas dos estados do RJ, SP e ES. As colunas “ID” (número de registro no laboratório de biologia molecular da UNIFAP), “Local” e “Tamanho” se referem aos dados de cada sequência consultada. As colunas “Valor E” e “Identidade” referem-se à relação encontrada entre a sequência consultada e a mais semelhante disponível no banco de dados. As colunas “Acesso” e “Espécie *GenBank*” referem-se às respectivas sequências no banco de dados.

ID	Local	Tamanho (pb)	Valor E	Identidade (%)	Acesso	Espécie <i>GenBank</i>
A1	ES	566	0,0	94,63	MT240034.1	<i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>
A3	SP	565	0,0	98,27	MT240052.1	<i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>
A12	SP	567	0,0	98,46	MT240052.1	<i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>
B1	SP	566	0,0	98,28	MT240052.1	<i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>
B6	SP	564	0,0	98,47	MT240052.1	<i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>
A2	RJ	504	0,0	96,66	MT239979.1	<i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>
A3	RJ	506	0,0	96,88	MT239979.1	<i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>
A9	RJ	517	0,0	96,48	MT239979.1	<i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>
C2	RJ	507	0,0	96,66	MT239979.1	<i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>
C5	RJ	508	0,0	97,10	MT239979.1	<i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>
C9	RJ	501	0,0	97,40	MT239979.1	<i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>

Fonte: Autor

As sequências definidas para AP (n=27) e RS (n=3) apresentaram 80,00 a 84,58% de identidade com sequências prévias do gênero *Platorchestia*, predominantemente *P. parapacífica*, com exceção de 2 indivíduos do AP, para qual os BLAST mais coincidentes foram para outros gêneros, *Paralicella* e *Orchestoidea*. Os tamanhos destas sequências

variaram de 561pb até 571pb e apresentaram valor E ficando entre 2×10^{-133} a 7×10^{-99} (Tabela 10). A similaridade entre indivíduos do AP e do RS, os 2 extremos latitudinais amostrados, corrobora a similaridade dos morfotipos observada na análise morfológica.

O gênero *Platorchestia* já foi registrado da Paraíba a Santa Catarina, embora não especificamente *P. parapacifica*, que foi a mais sequência mais semelhante disponível no *GenBank*. De qualquer forma, a similaridade observada é muito baixa para considerar que os espécimes analisados sejam esta espécie, logo consideramos mais provável que não haja depósito em bancos de dados de espécies deste gênero mais semelhantes àquela dos indivíduos em questão. Diferente dos outros 2 gêneros que ocorrem em praias brasileiras, ambos já apresentados neste trabalho, este gênero ocorre mais comumente associado a manguezais e estuários. De fato, com poucas exceções, as ocorrências descritas por Serejo (2004) são nesses ambientes e em praias abrigadas, ou seja, protegidas de ondas de alta energia e tendência a grãos de menor tamanho, característicos de praias dissipativas. Dentre as praias aqui amostradas, as do AP e RS não são abrigadas, pelo contrário são bastante expostas, mas são aquelas com maior tendência dissipativa. Outro fato que chama a atenção é o tamanho diminuto dos indivíduos sequenciados destes estados.

Tabela 10 - BLAST das sequências dos estados do AP e RS. As colunas “ID” (número de registro no laboratório de biologia molecular da UNIFAP), “Local” e “Tamanho” se referem aos dados de cada sequência consultada. As colunas “Valor E” e “Identidade” referem-se à relação encontrada entre a sequência consultada e a mais semelhante disponível no banco de dados. As colunas “Acesso” e “Espécie *GenBank*” referem-se às respectivas sequências no banco de dados.

(continua)

ID	Local	Tamanho (pb)	Valor E	Identidade (%)	Acesso	Espécie <i>GenBank</i>
A1	AP	567	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
A3	AP	567	2×10^{-119}	82,61	MG010370.1	<i>Platorchestia japonica</i>
A5	AP	566	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
A6	AP	569	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
A7	AP	562	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
A8	AP	566	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
A9	AP	568	2×10^{-133}	83,33	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
A10	AP	567	4×10^{-121}	82,51	KX360563.1	<i>Platorchestia</i>
B1	AP	565	4×10^{-121}	82,52	KX360563.1	<i>Platorchestia sp.</i>
B2	AP	565	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
B3	AP	563	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
B4	AP	561	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
B5	AP	562	2×10^{-124}	83,07	LC566476.1	<i>Platorchestia pacifica</i>
B6	AP	565	4×10^{-121}	82,52	KX360563.1	<i>Platorchestia sp.</i>
B7	AP	570	1×10^{-130}	83,05	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
B8	AP	566	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
B9	AP	571	4×10^{-121}	82,52	KX360563.1	<i>Platorchestia sp.</i>

ID	Local	Tamanho (pb)	Valor E	Identidade (%)	Acesso	Espécie <i>GenBank</i>
B10	AP	566	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
B11	AP	563	2×10^{-118}	83,55	KX360563.1	<i>Platorchestia sp.</i>
B12	AP	567	4×10^{-128}	84,58	JX129948.1	<i>Orchestoidea tuberculata</i>
C1	AP	564	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
C2	AP	568	4×10^{-121}	82,52	KX360563.1	<i>Platorchestia sp.</i>
C3	AP	566	2×10^{-119}	82,61	MG010370.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
C4	AP	567	7×10^{-99}	80,00	MW056945.1	<i>Paralicella caperesca</i>
C5	AP	567	1×10^{-131}	83,24	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
C6	AP	563	4×10^{-121}	82,52	KX360563.1	<i>Platorchestia sp.</i>
C7	AP	568	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
A8	RS	567	4×10^{-121}	82,52	KX360563.1	<i>Platorchestia sp.</i>
A10	RS	565	3×10^{-132}	83,08	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>
A11	RS	564	8×10^{-133}	83,43	MG010371.1	<i>Platorchestia parapacifica</i>

Fonte: Autor

Já as sequências dos indivíduos dos estados PA, e AL e BA, indicaram as menores identidade, de 79,32 a 82,68%, e maior heterogeneidade de táxons correspondentes: os gêneros *Talorchestia*, *Notorchestia*, 3 espécies de *Platorchestia* e, em 3 casos, o menor nível taxonômico correspondente foi a própria família, Talitridae (Tabela 11). As sequências obtidas variaram de 562pb até 567pb, com o valor E relativamente distantes de 0. A baixa identidade das destas sequências com as disponíveis no banco de dados pode ter ocorrido, parcialmente, em razão da inexistência de sequências de *T. tucurauna* no banco de dados, embora não se possa descartar a possibilidade de ocorrência de uma nova espécie de *Talorchestia* e, até mesmo, de um novo gênero, na costa brasileira.

Tabela 11 - BLAST das sequências vindas dos estados do AL, BA e PA. As colunas “ID” (número de registro no laboratório de biologia molecular da UNIFAP), “Local” e “Tamanho” se referem aos dados de cada sequência consultada. As colunas “Valor E” e “Identidade” referem-se à relação encontrada entre a sequência consultada e a mais semelhante disponível no banco de dados. As colunas “Acesso” e “Espécie *GenBank*” referem-se às respectivas sequências no banco de dados.

(continua)

ID	Local	Tamanho (pb)	Valor E	Identidade (%)	Acesso	Espécie <i>GenBank</i>
A6	AL	567	3×10^{-92}	79,32	MG655915.1	<i>Talorchestia sp.</i>
A8	AL	565	4×10^{-91}	80,39	KX812492.1	<i>Notorchestia quadrimana</i>
A11	AL	566	1×10^{-85}	82,75	MG655915.1	<i>Talorchestia sp.</i>
B7	AL	564	1×10^{-90}	79,35	KX360569.1	<i>Platorchestia monodi</i>
C3	AL	508	4×10^{-75}	82,08	AB741777.1	<i>Talorchestia martensii</i>
B4	BA	565	2×10^{-119}	82,30	KX054867.1	<i>Talitridae sp.</i>
B7	BA	562	1×10^{-121}	82,68	KX054867.1	<i>Talitridae sp.</i>
B12	BA	567	7×10^{-118}	82,28	KX054867.1	<i>Talitridae sp.</i>
A4	PA	568	4×10^{-110}	81,84	LC566316.1	<i>Platorchestia japonica</i>

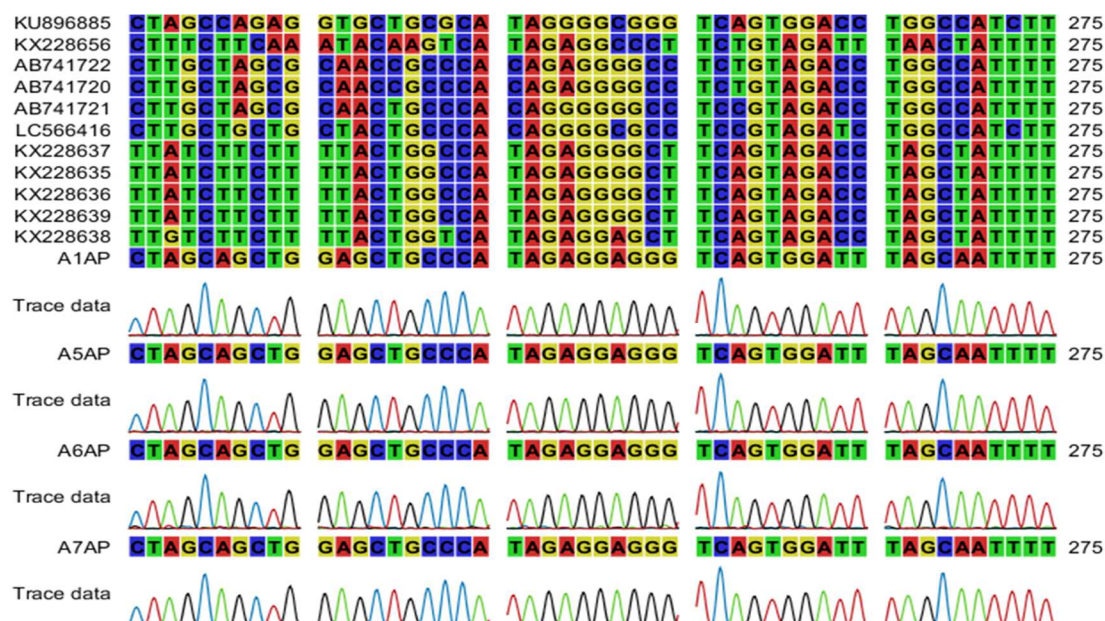
ID	Local	Tamanho (pb)	Valor E	Identidade (%)	Acesso	Espécie <i>GenBank</i>
A5	PA	564	3×10^{-112}	82,04	LC566316.1	<i>Platorchestia japonica</i>
A7	PA	565	4×10^{-110}	82,07	AB741742.1	<i>Platorchestia paludosus</i>

Fonte: Autor

7.2.4. Alinhamentos

Após a análise dos BLAST, foi criado um alinhamento das 56 sequências obtidas no presente trabalho com mais 116 sequências COI de diferentes talitrídeos obtidas do banco de dados do *GenBank*, utilizando o algoritmo do CLC, que considera GAP'S, inserções e deleções, a fim de criar uma árvore exploratória pra verificação das localizações em clados das nossas sequências resultantes. A figura 11 mostra 3 destes alinhamentos; o resultado completo, de todas as amostras encontra-se no Anexo II.

Figura 11 - Fragmento de alinhamento total realizado pelo CLC contendo um vislumbre de 3 amostras do AP com fração dos seus respectivos cromatogramas mais 11 amostras de talitrídeos coletados no banco de dados do *GenBank*



Fonte: Autor

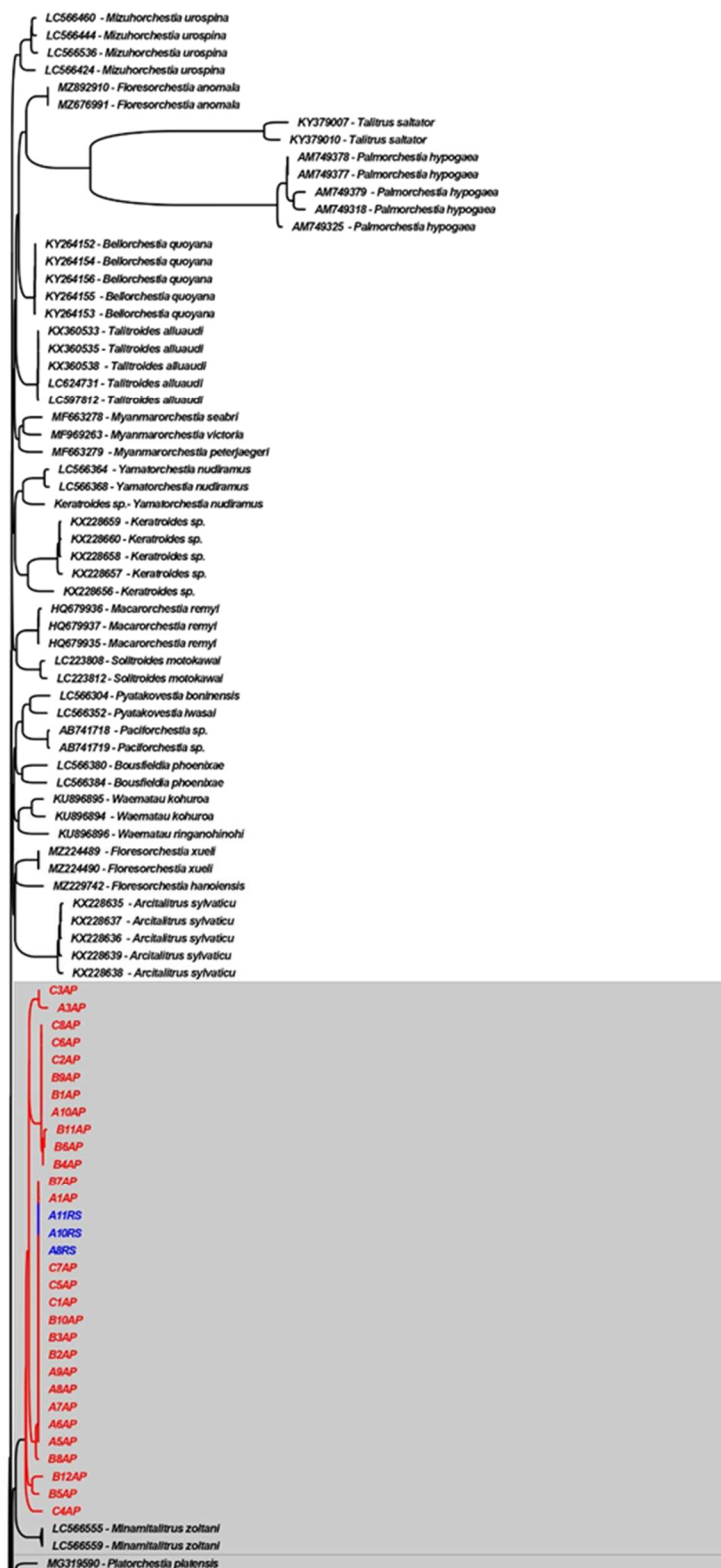
7.2.5. Identificação genética de OTUs

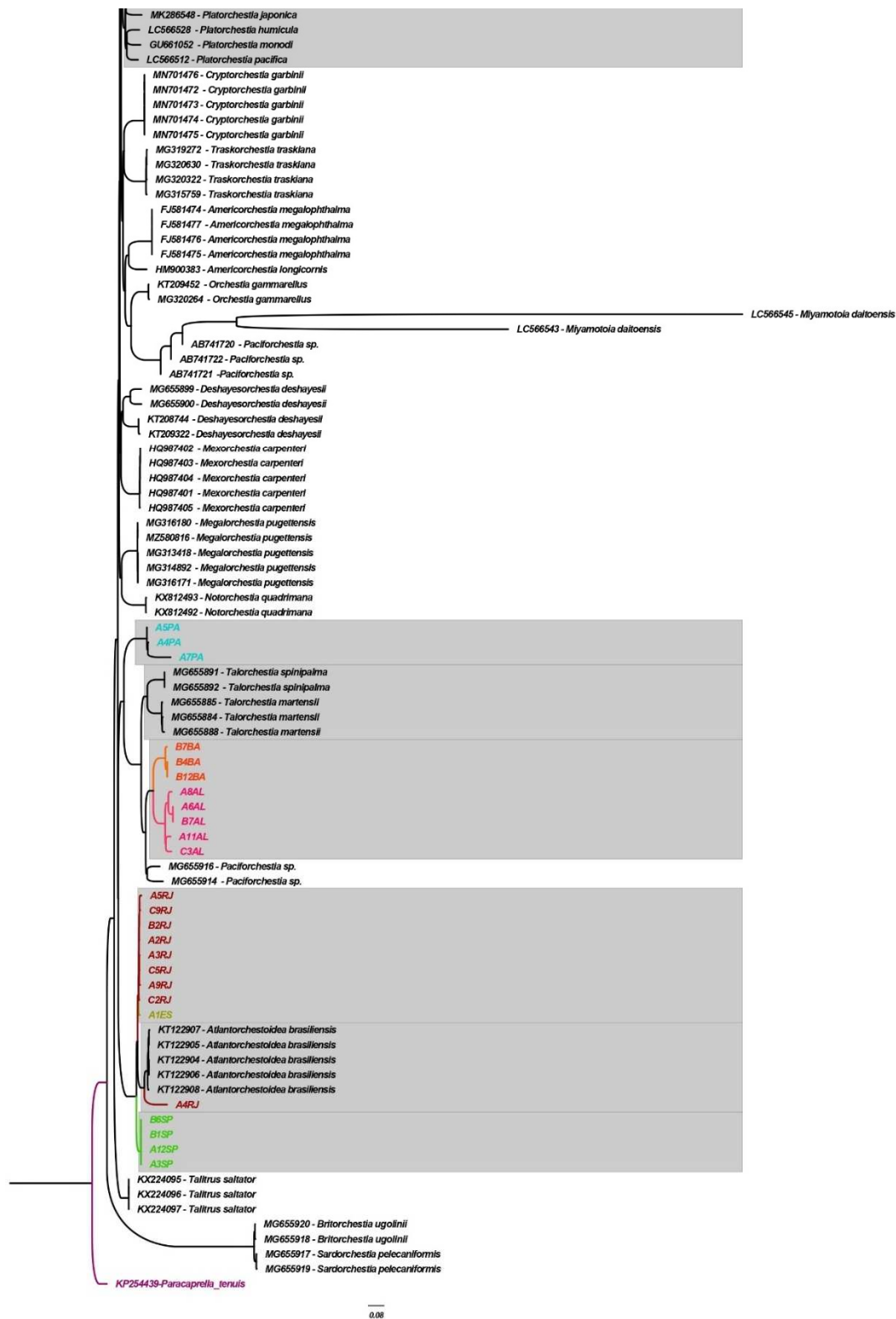
7.2.5.1. Árvore exploratória

Partindo do alinhamento supracitado, foi criada a árvore exploratória geral, afim de estabelecer agrupamentos em clados das sequências do presente trabalho com as sequências selecionadas no *GenBank*. Foram identificados 3 grandes grupos a serem explorados individualmente, com análises direcionadas (Figura 12). Estes grandes clados agruparam claramente os indivíduos de uma mesma região geográfica, mas nem em todos os casos houve correspondência a uma OTU bem definida. Por este motivo, os grupos foram nomeados de acordo com as regiões neles contidas: Sudeste (compreendendo as amostras de SP, RJ e ES), Nordeste/PA (compreendendo as amostras da BA, AL e PA) e AP/RS (compreendendo as amostras do AP e RS).

Figura 12 - A árvore exploratória resultante pelo método NJ. As amostras com letras e números referem-se às amostras coletadas neste experimento, sendo as duas últimas letras do código a sigla do estado brasileiro onde a amostra foi coletada. Em preto, estão o código e o nome das espécies/gêneros de talitrídeos vindos do *GenBank*. Cores diferentes das amostras coletadas neste experimento foram usadas para cada estado de coleta, com intuito de facilitar a visualização dos agrupamentos. *Paracaprella tenuis* é um grupo externo (Caprellidae) aos talitrídeos. Os números entre os ramos referem-se às distâncias entre os indivíduos.

(continua)





Fonte: Autor

7.2.6. Relações intra-OTUs

Para cada grupo estabelecido foi criada uma nova árvore filogenética, mais focal. Cada árvore, por sua vez, subsidiou a identificação de subgrupos, para os quais foram realizadas análises das distâncias genéticas, dentro e entre os subgrupos, e feita a caracterização haplotípica de cada caso.

7.2.6.1. Sudeste

O agrupamento referente ao grupo Sudeste indica que todos os exemplares amostrados para os estados de SP, RJ e ES compõem de uma OTU única, *A. brasiliensis*, visto que ambos se ramificam a partir de um mesmo nó, agrupando-se com as sequências de *A. brasiliensis* usadas (Figura 12). A partir desta árvore foi identificada uma nítida separação de um clado correspondente aos indivíduos de SP com relação aos demais, RJ e ES, que se misturam em um mesmo grupo. Logo, as análises subsequentes consideram 2 subgrupos de *A. brasiliensis*, um correspondente à população de SP e um grupo que inclui as populações, mais próximas, do RJ e ES. Análise das distâncias

7.2.6.1.1. Análise das distâncias

Os resultados das análises das distâncias genéticas não indicaram variação entre as sequências da praia de SP, já o percentual de diferenciação entre as sequências RJ/ES foi de 0,01. Quanto à variação desta OTU entre os subgrupos foi de 0,02. Usando 25 sequências de *A. brasilienses* vindas do *GenBank*, observou-se uma variação de 0,04 entre estas e SP e também 0,04 entre estas e RJ/ES. O percentual de diferenciação dentre as sequências do *GenBank* foi de 0,01. Considerando que o *barcode gap* consiste em uma lacuna entre as diferenças intra e interespecífica, cujo valor é aproximadamente 10 vezes a diferença intraespecífica (HEBERT et al., 2004), todos os espécimes analisados correspondem a *A. brasiliensis* (Tabela 12).

Tabela 12 - Análises das distâncias genéticas do gene COI por meio do método K2, para os subgrupos de *A. brasiliensis* SP, RJ/ES e sequências depositadas no *GenBank*. A diagonal em cinza representa as distâncias intragrupos e as demais células as distâncias entre grupos

	SP Vermelha do Norte	RJ - Saquarema ES - Marataízes	<i>Atlantorchoidea brasiliensis</i> (GeneBank)
SP Vermelha do Norte	0,00		
RJ - Saquarema ES - Marataízes	0,02	0,01	
<i>Atlantorchoidea brasiliensis</i> (GeneBank)	0,04	0,04	0,01

Fonte: Autor

7.2.6.1.2. Caracterização haplotípica

Das 14 sequências alinhadas vindas do grupo Sudeste, encontramos 9 haplótipos com 8 sítios polimórficos distintos. Não foi observada diversidade haplotípica para SP, onde os 4 indivíduos analisados apresentaram o mesmo haplótipo. Já para RJ/ES a diversidade foi alta, 0,95 (Tabela 13). Com relação à diversidade nucleotídica, índice que representa o número médio de diferenças entre duas sequências (por sítio) retiradas ao acaso da amostra total, SP não apresentou sítios polimórficos nas 5 sequências amostradas, tendo, portanto, valor 0, enquanto para RJ/SP o valor foi 0,12 +/-0,09.

Tabela 13: Índice de diversidade nucleotídica e haplotípica para o gene COI nas amostras dos estados de ES, SP e RJ.

Local	Número Indivíduos	Sítios Polimórficos	Número haplótipos	Diversidade haplotípica (h)	Diversidade nucleotídica (π)
SP Vermelha do Norte	4	0	1	0	0,00
RJ - Saquarema ES - Marataízes	9	8	8	0,95	0,12 +/-0,09

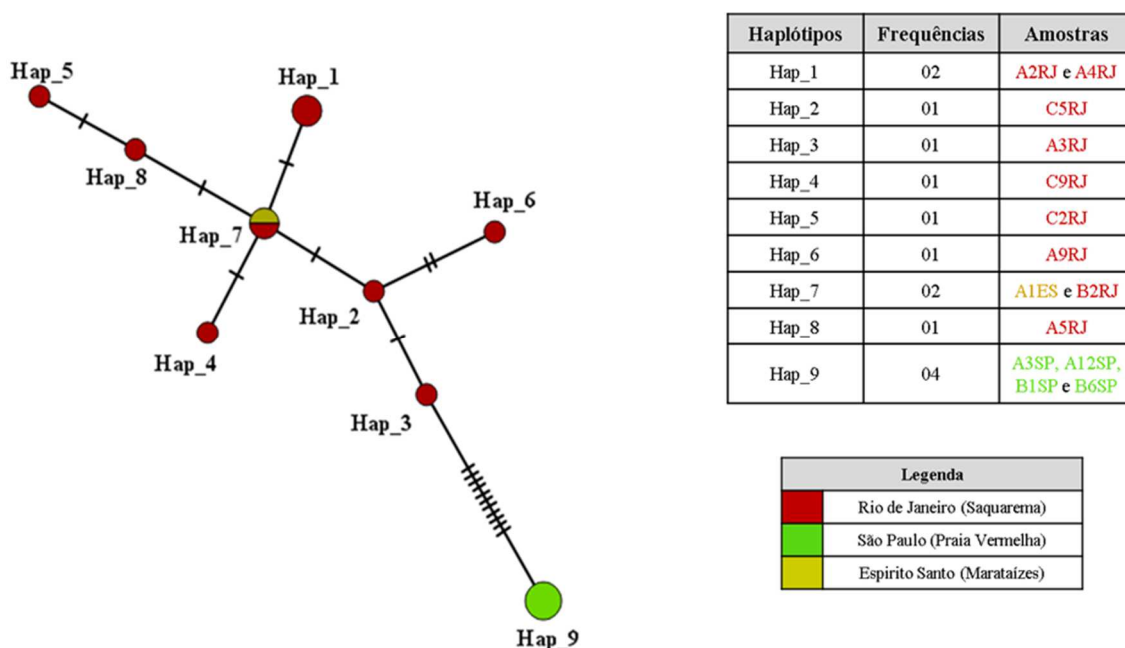
Fonte: Autor

7.2.6.1.3. Rede de haplótipos

A análise de todas as sequências alinhadas com o programa TCS 1.2., por meio de parcimônia estatística, gerou para o grupo Sudeste uma rede com 9 haplótipos, apresentando um formato de estrela, refletindo um possível evento de expansão populacional (AVISE, 2000) centrado ao norte da região Sudeste. O haplótipo central (Hp_7) representado pelo círculo com duas cores, presente nos estados de RJ (1

indivíduo) e ES (1 indivíduo), representa cerca de $\pm 14\%$ dos exemplares descritos e possui 4 haplótipos derivados. O haplótipo mais conservado ocorreu no estado de SP (Hap_9), correspondendo a $\pm 28\%$ dos exemplares amostrados. Foram observados apenas dois grupos distintos pelas distâncias dos ramos da rede e dos eventos mutacionais hipotéticos necessários para formação de um determinado haplótipo (Figura 13).

Figura 13 - Rede de haplótipos utilizando sequências fragmento do gene COI realizada com as amostras vindas dos estados do RJ, SP e ES. Os círculos menores em preto representam os haplótipos não amostrados ou extintos e as barras individuais que cruzam os ramos representam eventos mutacionais.



Fonte: Autor

Levando em consideração todos os dados, não resta dúvida que todos os indivíduos amostrados no grupo Sudeste pertencem a espécie *A. brasiliensis*. A alta semelhança genética encontrada para o único exemplar sequenciado do ES junto a amostras do RJ (representado pelo Hap_7), indica um considerável fluxo gênico entre estas populações. Tal fato faz sentido se levarmos em consideração a pequena distância geográfica (aproximadamente 333 km) e a semelhança geomorfológica das praias do RJ e ES (MUEHE; CARVALHO, 1993; MACHADO, 2001). Já a diferença genética entre os indivíduos de SP com os demais estados do Sudeste pode representar um alto grau de isolamento por impacto antrópica, o que dificultar o fluxo gênico, assim como já proposto para outros amphipodas (KETMAIER; SCAPINI; DE MATTHAEIS, 2003; JABŁOŃSKA et al., 2020).

A semelhança entre o haplótipo de SP com o estado imediatamente ao sul, PR, precisa ser investigada a fim de determinar o grau de isolamento de populações de SP (ao menos do seu litoral norte, onde houve amostragem), já que a região está compreendida entre 2 dos pontos de maior modificação antrópica da costa brasileira, a região da baía de Guanabara, ao norte, e o porto de Santos ao sul, ambos associados a um alto grau de urbanização circundante. Como temos posse de indivíduos coletados no PR e SC, poderemos em breve testar esta hipótese, de alto comprometimento de fluxo gênico de talitrídeos confinados entre essas duas áreas de alto impacto.

7.2.6.2. Nordeste/PA

Os ramos resultantes que formaram o grupo do Nordeste/PA indicam que os exemplares amostrados para os estados de BA e AL sejam ao menos uma OTU relacionada ao gênero *Talorchestia* sp. Ambas se ramificam a partir de um mesmo nó contendo sequências de *Talorchestia* de três espécies diferentes. Já os indivíduos vindos do PA, apesar de mais próximo à sequência do gênero *Talorchestia* agrupam-se em um clado bem mais distante do que a diferença entre clados de espécies de *Talorchestia* disponíveis no banco de dados, sugerindo que estamos diante de uma OTU ainda não descrita, filogeneticamente mais próxima a *Talorchestia* (Figura 12). A população de cada estado será tratada como um subgrupo para análises de distância e diversidade.

7.2.6.2.1. Análise das distâncias

A distância dentro de cada subgrupo foi de 0,01 em AL e 0,05 na BA. Independente de qual OTU foi amostrada no PA, não houve diferenciação genética expressiva entre os indivíduos. Quanto à variação entre os locais amostrados, os valores foram 0,16 (BA x AL), 0,27 (BA x PA) e 0,28 (AL x PA). Usando 3 sequências disponíveis para o gênero *Talorchestia*, nenhuma correspondente à espécie *T. tucurauna* do *GenBank* para a comparação, observou-se uma variação de 0,22 (*Talorchestia* sp *GenBank* x BA), 0,26 (*Talorchestia* sp.*GenBank* x AL) e 0,23 (*Talorchestia* sp.*GenBank*

x PA) (Tabela 14). Mas, como a variação genética do próprio banco de dados é alta, 0,19, essas comparações não são muito informativas.

Tabela 14 - Análises das distâncias genéticas do gene COI por meio do método K2 entre os grupos de BA, AL e PA e sequência depositadas no *GenBank*. A diagonal em cinza representa as distâncias intragrupos e as demais células representam as distâncias entre os grupos.

	BA Canavieira	AL Jarapatinga	PA Salinas	<i>Talorchestia</i> sp. (<i>GenBank</i>)
BA Canavieira	0,01			
AL Jarapatinga	0,16	0,05		
PA Salinas	0,27	0,28	0,00	
<i>Talorchestia</i> sp. (<i>GenBank</i>)	0,22	0,26	0,23	0,19

Fonte: Autor

7.2.6.2.2. Caracterização haplotípica

As 11 sequências alinhadas, resultaram em 7 haplótipos com 42 sítios polimórficos distintos com a menor diversidade haplotípica sendo encontrada no estado do PA (0) AL, seguido pela BA (0,66) e por fim, o estado de AL com (0,90). Com relação à diversidade nucleotídica, as amostras do estado da BA (0,01 +/- 0,009) foram as que apresentaram o maior valor seguidas posteriormente do estado de AL (0,06 +/- 0,04). O resultado deste índice referente ao estado do PA foi 0, devido à ausência de sítios polimórficos nas somente 3 sequências analisadas (Tabela 15).

Tabela 15 - Índice de diversidade nucleotídica e haplotípica para o gene COI nas amostras dos estados do PA, AL e BA.

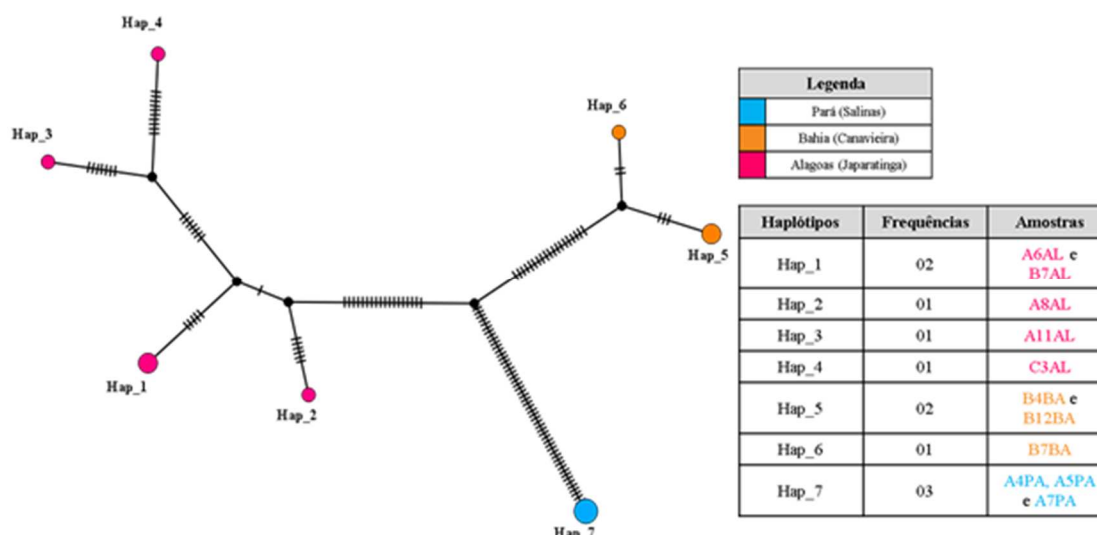
Local	Número Indivíduos	Sítios Polimórficos	Número de haplótipos	Diversidade haplotípica (<i>h</i>)	Diversidade nucleotídica (π)
BA Canavieira	3	6	2	0,66	0,01 +/- 0,009
AL Jarapatinga	5	36	4	0,90	0,06 +/- 0,04
PA Salinas	3	0	1	0	0,00

Fonte: Autor

7.2.6.2.3. Rede de haplótipos

A rede haplótipos resultante do grupo Nordeste/PA apresentou um formato linear, refletindo possivelmente uma expansão populacional mais contida (AVISE, 2000). A rede não apresenta nenhum haplótipo centralizado, o que indica fluxos gênicos limitados. O haplótipo mais conservado é o Hap_7, com três indivíduos, correspondendo a $\pm 23\%$ dos exemplares amostrados, todos eles sendo representantes do estado do PA. Foram observados 3 grupos distintos restritos aos seus respectivos estados (Figura 14).

Figura 14 - Rede de haplótipos utilizando sequências fragmento do gene COI realizada com amostras vindas dos estados do PA, AL e BA. Os círculos menores em preto representam os haplótipos não amostrados ou extintos e as barras individuais que cruzam os ramos representam eventos mutacionais.



Fonte: Autor

É possível inferir que a espécie *T. tucurauna* foi amostrada nos estados do Nordeste, correspondendo à identificação morfológica prévia dos indivíduos. Levando em conta as limitações referentes ao banco de dados, que não possui sequências dessa espécie depositada, associado à identificação e registros prévios desta espécie na região, não há razões para questionar a ocorrência desta OTU específica com base nas informações disponíveis até o momento. Mas, justamente por não possuir sequências depositadas nos bancos de dados, quando se avalia a ramificação que ocorre entre as amostras do AL e BA, não é possível descartar totalmente a ocorrência de OTU críptica.

Considerando tratar-se de uma mesma OTU, *T. tucurauna*, a diferença interpopulacional observada entre os indivíduos de BA e AL podem ser resultantes de uma quebra de conectividade gênica, causadas por exemplo, pela alta modificação causada pelo homem na Baía de Todos os Santos, o que representaria um alto grau de isolamento por fatores como urbanização, poluição, aporte turístico. Há, entretanto, uma considerável diversidade genética em cada um dos estados, evidenciando que, embora isoladas entre si, as populações não estão confinadas em um espaço que ameace sua diversidade gênica, como observado para o norte de SP.

A análise morfológica das amostras que foram sequenciadas para os estados da BA e AL já apontavam que as mesmas eram pertencentes a espécie *T. tucurauna*, mas para os indivíduos do PA esta identificação ficou vaga. Porém, a grande quantidade de pontos mutacionais que separam as amostras na rede de haplótipos e a estruturação haplotípica bem definida para ambos estados do Nordeste aliada ao posicionamento das sequências gênicas observados na árvore exploratória, nos levam a crer que as amostras do PA são de OTU consideravelmente diferente de todas as demais.

A presença de artefatos (ressecamento e desmembramento de apêndices) dificultou a identificação morfológica precisa dos indivíduos do PA, mas, ainda assim, houve notável diferença morfológica entre destes e os demais indivíduos analisados para todo o litoral brasileiro, o que chamou muita atenção de antemão. Os resultados das sequências, aplicados aos testes e a sua posição na árvore exploratória, nos faz crer que estamos diante de uma nova OTU que pode ser uma espécie diferente ou mesmo um táxon diferente do gênero *Talorchestia*, embora gênero *Talorchestia* seja mega diverso (HORTON et al., 2021) Corroborando essa hipótese, há a grande diferença geomorfológica entre o litoral de BA/AL e PA, além da peculiaridade do local onde os indivíduos do PA foram encontrados: alta profundidade em região de duna. A presença de espécies novas de talitrídeos para os estados da região Norte não seria surpreendente visto a atual falta de registro do grupo na região (SEREJO; SIQUEIRA, 2018).

7.2.6.3. Amapá/Rio Grande do Sul

Para o grupo AP/RS, a árvore exploratória indica que os exemplares amostrados para estes estados não pertencem ao gênero *Platorchestia*, mais próximo no BLAST, e, provavelmente, nem ao gênero *Minamitalitrus*, apesar deste último parecer ser mais próximo filogeneticamente. Vale ressaltar que estes indivíduos não foram identificados morfológicamente. Considerando que os indivíduos destes estados se agruparam em clados distantes das espécies disponíveis no *GenBank* na árvore generalista, é provável estarmos diante de uma nova OTU, de nível taxonômico maior que espécie, dada a tamanha distância observada entre o grupo de indivíduos e as demais sequências no banco de dados (Figura 12). Houve ramificação notável para indivíduos do AP, que não ocorre, entretanto, devido às limitações espaciais de fluxo gênico. Não houve uma separação clara entre as sequências do RS com algumas do AP, mas como a distância entre os dois locais amostrados é enorme, a maior dentro de todo o conjunto amostral deste estudo, as análises de distâncias e diversidade serão feitas considerando subgrupos AP e RS.

7.2.6.3.1. Análise das distâncias

Não houve diferenciação intragrupo das sequências do RS, enquanto para o AP, este índice foi de 0,07 (Tabela 16). Entre os estados o valor foi menor, 0,05, reforçando que há maior similaridade entre indivíduos do AP e RS do que dentro das amostras do AP como um todo. A espécie *Platorchestia platensis*, mais próxima ao grupo AP/RS identificada pelo BLAST, foi usada nesta análise de distância e para ambos os estados a distância foi superior a 0,20, com variabilidade dentro das sequências do banco de dados igual inferior a 0,01.

Tabela 16 - Análises das distancias genéticas do gene COI por meio do método K2 entre os grupos dos estados do AP e RS e sequências depositadas no *GenBank*. A diagonal em cinza representa as distancias intragrupos e as demais células representam as distâncias entre os grupos.

	AP Goiabal	RS Cassino	<i>Platorcherstia platensis</i> (<i>GeneBank</i>)
AP Goiabal	0,07		
RS Cassino	0,05	0,00	
<i>Platorcherstia platensis</i> (<i>GeneBank</i>)	0,21	0,20	<0,01

Fonte: Autor

7.2.6.3.2. Caracterização haplotípica

As 31 sequências do grupo AP/RS resultaram em 7 haplótipos com 83 sítios polimórficos distintos. No RS apenas 1 haplótipo foi identificado, sem sítios polimórficos, com diversidade nucleotídica e haplotípica igual a 0,0. Já no estado do AP a diversidade nucleotídica foi de 0,06 (+/-0,03) e a haplotípica 0,70 (Tabela 17).

Tabela 17 - Índice de diversidade nucleotídica e haplotípica para o gene COI nas amostras dos estados do AP e RS.

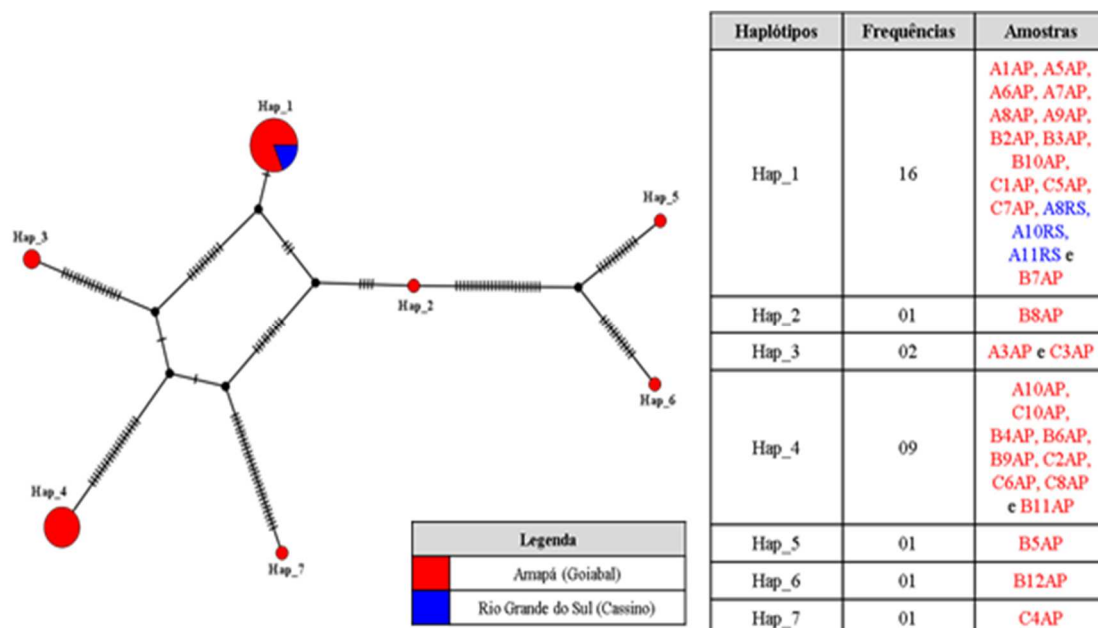
Local	Número Indivíduos	Sítios Polimórficos	Número de Haplótipos	Diversidade haplotípica (<i>h</i>)	Diversidade nucleotídica (π)
AP Goiabal	28	83	7	0,70	0,06+/-0,03
RS Cassino	3	0	1	0	0,00

Fonte: Autor

7.2.6.3.3. Rede de haplótipos

A rede respectiva ao grupo AP/RS também apresentou um formato de estrela, refletindo um possível evento de expansão populacional (AVISE, 2000), porém sem os haplótipos centrais amostrados. O haplótipo maior e mais conservado foi o Hap_1, representado pelo círculo vermelho e azul, haplótipo este presente nos dois estados, AP (13 indivíduos) e RS (3 indivíduos), representando $\pm 51\%$ dos exemplares analisados. Foram observados 3 grupos distintos, onde observa-se que 2 deles estão restritos ao estado do AP (Figura 15).

Figura 15 - Rede de haplótipos utilizando sequências fragmentos do gene COI realizada com amostras vindas dos estados do AP e RS. Os círculos menores em preto representam os haplótipos não amostrados ou extintos e as barras individuais que cruzam os ramos representam eventos mutacionais.



Fonte: Autor

Dessa forma, levando em conta todos os dados aqui apresentados, tanto a OTU à qual pertencem as amostras do AP e RS e a relação entre elas, ainda se mostram como uma icógnita. As diferentes localizações observadas na árvore exploratória encontrada para os indivíduos do estado do AP pode ser decorrente da alta preservação ambiental e pouca pressão antrópica que a praia do Goiabal sofre (SANTOS; SHORT; MENDES, 2016). Não podemos descartar também o caráter inédito do estudo desses indivíduos na região Norte, o que certamente facilita o encontro de OTU inéditas. A alta semelhança genética entre os três indivíduos sequenciados do RS junto a 13 indivíduos do AP, representados pelo hap_1, poderia ser fruto da amostragem inédita da espécie em questão para ambos os estados, já que diferente dos demais talitrídeos amostrados no presente trabalho, estes apresentavam o menor tamanho, o que talvez explicaria a sua até então não amostragem para os demais estados do litoral brasileiro, incluindo o RS.

Essa alta conexão genética entre talitrídeos geograficamente tão distantes é pouco descrita na literatura, porém, tal comportamento já foi observado por Fanini e colaboradores. (2017) , por exemplo, em trabalho que buscou entender a modelagem preditiva e a distribuição de uma espécie de talitrídeo ao longo do litoral do Uruguai, analisou as sequências COI do mtDNA em três diferentes pontos da costa e identificou que as populações coletadas nos sítios intermediários diferiram significativamente das

duas localidades mais distantes, com seus resultados sugerindo um potencial de interconectividade maior do que o esperado para outros talitrídeos.

Existem semelhanças entre as praias do Cassino e do Goiabal: proximidade a um grande estuário, alta energia, terreno plano, extenso com sedimento compacto e de grãos finos. Algum fator ambiental pode ter sido essencial para manutenção da espécie nestes locais. Mas, são necessários esforços de investigação direcionados, para averiguar a ocorrência da espécie em outros pontos ao longo da costa, já que existe a possibilidade de esta não ter sido amostrada em locais onde ocorre. Ainda, há a possibilidade de que a espécie seja exótica ao RS, tendo sido introduzida através de embarcações que fazem grandes rotas marítimas, as quais de fato incluem a bacia do Amazonas e pontos ao sul do país, inclusive a bacia do rio da Prata. Como estes animais não possuem dispersão larval no oceano, uma dispersão através de grandes embarcações estaria associada a destroços à deriva e contato com embarcações menores.

OTU diferentes podem possuir características intrínsecas determinante quanto a sua estruturação genética. Tourinho e colaboradores. (2021), em seu estudo que comparou sequências COI de diferentes espécies de invertebrados habitantes de praias arenosas da costa Uruguaia (entre eles uma espécie de talitrídeo) com histórias de vida e estratégias de dispersão contrastantes. Eles observaram que, apesar dos isópodes (*Excirolana braziliensis* e *E. armata*) apresentarem histórias de vida e estratégias de dispersão semelhantes ao talitrídeo (*A. brasiliensis*), os primeiros apresentaram alta homogeneidade genética ao longo dos pontos amostrais, enquanto que o segundo apresentou alta variabilidade.

Essas características de padrões de estruturação genética diferentes para OTUs distintas ocorrem em outras escalas taxonômicas, e este trabalho agrega esta informação para Talitridae. No litoral da Itália, Pavesi e colaboradores (2011) trabalharam com a espécie *Macarorchestia remyi*. Eles constataram que as populações apresentaram um alto grau de divergência genética, com substancial falta de fluxo gênico, tanto localmente quanto em ampla escala geográfica, sugerindo que a espécie está em equilíbrio dinâmico sob baixos níveis de fluxo gênico (diversidade haplotípica entre 0,39 a 0,33). Já Ketmaier e colaboradores (2010), também no litoral da Itália, mas com a espécie *Talitrus saltator*, analisaram quatro subpopulações ao longo de 3 km de uma praia arenosa e constataram uma elevada diferença genética nas subpopulações amostradas, cerca de 0,90 em cada uma delas. No presente trabalho, em apenas um ponto de coleta foi identificada uma

diversidade haplotípica desta mesma magnitude, para a espécie *A. brasiliensis*. Essa diversidade não foi observada para nenhuma outra OTU, indicando que *A. brasiliensis* tenha uma tendência intrínseca de maior diversidade genética do que as outras espécies do litoral brasileiro. Logo, embora seja um bom indicador intraespecífico de conectividade de fluxo gênico, este índice não deve ser usado como indicador entre espécies. O parâmetro que, de forma global, mais se associou ao grau de qualidade ambiental foi a distância intrapopulacional dos haplótipos e complexidade da rede de haplótipos, tendo sido a maior observada no AP, o ponto m mais pristino aqui avaliado.

Em contrapartida temos 2 locais com graus muito diferentes de impacto antrópico com baixa diversidade haplotípica intra OTU, SP e PA. Assim, essa baixa diversidade é pode ser atribuída a fatores associados tanto a barreiras naturais, como as direções das correntes marinhas e a influência da foz do rio Amazonas para o estado do PA a elevada antropização presente na região amostrada para o estado de SP.

Os dados também reforçam o conceito de que a distribuição da variabilidade genética nem sempre reflete a estrutura populacional contemporânea, e que é importante considerarmos a história evolutiva das espécies ao estudarmos a conectividade em populações de praias arenosas. A ocorrência de espécies crípticas não é incomum para talitrídeos (CHENG et al., 2011; BALDANZI et al., 2016), tão pouco para amphipodas (WESTRAM et al., 2011), e aqui confirmamos a presença de pelo menos 2 OTU ainda desconhecidas, além de analisar padrões de estruturação genética de populações de espécies já descritas.

Nossos dados também apontam para a eficiência da utilização da dos talitrídeos para avaliação de diferentes níveis de impactos ambientais, visto que, suas populações tendem a responder geneticamente frente a estressores, tanto de origem antrópica ou natural. Assim, as análises resultantes desses tipos de estudo podem amparar gestores a tomar medidas que auxiliem na preservação e conservação desses ambientes e consequentemente, também na promoção da saúde humana, visto que desde 1993, a saúde humana não é apenas entendida como a ausência de doença, mas também está relacionada aspectos da saúde ambiental (WHO, 1993).

8. CONCLUSÃO

As análises morfológica e das sequências gênicas mitocondriais, de fragmentos da subunidade I do citocromo oxidase (COI), em praias de oito estados brasileiros (AP, PA, AL, BA, ES, RJ, SP e RS), em anfípodes da família Talitridae, nos permitiu obter as seguintes conclusões:

- Foram identificados morfológicamente duas espécies de Talitrídeos ao longo do litoral brasileiro, sendo elas *Atlantorchestoidea brasiliensis* e *Talorchestia tucurauna*.
- Os *primers* universais para invertebrados não foram adequados para amplificação destes talitrídeos, logo uma nova combinação e desenho de primer foram desenvolvidos.
- Os dados sugerem que o gene mitocondrial COI consegue corroborar de forma satisfatória a hipótese de que processos de estruturações filogeográficas para as espécies de talitrídeos encontradas ao longo do litoral brasileiro, estão associados a pontos de alto potencial de quebra de conectividade espacial.
- Todos os espécimes amostrados para o grupo Sudeste pertencem a espécie *Atlantorchestoidea brasiliensis*, a qual mostrou a maior diversidade haplotípica entre as OTU identificadas. A presença dos 2 *pools* gênicos que fomentaram a diversidade de *A. brasiliensis* encontrados nos 3 estados amostrados sugerem que pode ter ocorrido uma diferenciação haplotípica entre os indivíduos de SP e dos do RJ e ES, necessitando de estudos suplementares para definir o tempo de separação e grau de isolamento das populações desta região de SP.
- Os resultados atribuídos ao grupo Nordeste/PA agrupam toda as amostras em 3 OTU diferentes restritas a seus respectivos estados, entretanto é provável que essa separação entre AL e BA esteja apenas a nível populacional de *Talorchestia tucurauna*, indicando que essas populações estão isoladas, provavelmente pela antropização da Baía de Todos os Santos, a um bom tempo, tempo esse que ainda necessita ser estimado. Já os indivíduos do PA, são uma OTU bem distinta geneticamente das demais encontradas, sendo até então, melhor relacionada com o gênero *Talorchestia*, estando isolada provavelmente devido a fatores naturais
- Quanto ao grupo AP/RS, infere-se a presença de um táxon inédito. O motivo da alta semelhança encontrada entre localidades tão distantes ainda precisa ser esclarecida.

A maior distância e grande complexidade haplotípica encontrada no AP coincide com o fato desse ser o ponto mais pristino amostrado.

- Os dados mostraram uma diversidade de espécies de talitrídeos para o litoral brasileiro bem maior do que a descrita na literatura, ressaltando a importância da existência de estudos moleculares para a ampliação dos conhecimentos sobre a riqueza e diversidade desses animais. A estruturação genética dentro de OTU semelhantes mostrou alto potencial de identificação de barreiras de fluxo gênico associadas tanto a modificações antrópicas quanto a barreiras naturais, salientando a importância do grupo como indicador de qualidade ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSALONSEN, L.; DEAN, R. G. Characteristics of the shoreline change along florida sandy beaches with an example for Palm Beach County. **Journal of Coastal Research**, v. 27, n. 6 A, p. 16–26, 2011.

AHYONG, S. T. et al. Animal biodiversity. **Environmental Science and Engineering (Subseries: Environmental Science)**, v. 145, n. 2008, p. 245–352, 2015.

AIKINS, S.; KIKUCHI, E. Studies on habitat selection by amphipods using artificial substrates within an estuarine environment. **Hydrobiologia**, v. 457, 2001.

ALVAREZ, F.; WINFIELD, I.; CHÁZARO, S. Population study of the landhopper *Talitroides topitotum* (Crustacea: Amphipoda: Talitridae) in central Mexico. **Journal of Natural History**, v. 34, n. 8, p. 1619–1624, ago. 2000. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00222930050117512>>.

AVISE, J. C. et al. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, n. 1, p. 489–522, nov. 1987. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>>.

AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. [s.l.] Harvard university press, 2000.

AVOINE, J. et al. Suspended-sediment transport in the Seine estuary, France: Effect of man-made modifications on estuary-shelf sedimentology. **Marine Geology**, v. 40, n. 1–2, p. 119–137, 1981.

BACHELET, G.; DAUVIN, J.-C.; SORBE, J.-C. An updated checklist of marine and brackish water Amphipoda (Crustacea: Peracarida) of the southern Bay of Biscay (NE Atlantic). **Cah. Biol. Mar.**, v. 44, p. 121–151, 2003.

BALDANZI, S. et al. Molecular evidence of distinct evolutionary units in the sandhopper *Talorchestia capensis* (Amphipoda, Talitridae) along South African coasts. **Hydrobiologia**, v. 779, n. 1, p. 35–46, 12 out. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10750-016-2797-4>>.

BARBA-MONTOYA, J. et al. Constraining uncertainty in the timescale of angiosperm evolution and the veracity of a Cretaceous Terrestrial Revolution. **New Phytologist**, v. 218, n. 2, p. 819–834, 2018.

BARCELLOS, C. et al. Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, n. 3, p. 285–304, set. 2009. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742009000300011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

BARROS, F.; BORZONE, C. A.; ROSSO, S. Macroinfauna of Six Beaches near

Guaratuba Bay, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 4, p. 351–364, dez. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132001000400005&lng=en&tlng=en>.

BAUZ-RIBOT, M. M. et al. The complete mitochondrial genome of the subterranean crustacean *Metacrangonyx longipes* (Amphipoda): A unique gene order and extremely short control region. **Mitochondrial DNA**, v. 20, n. 4, p. 88–99, 2009.

BAYED, A. Influence of morphodynamic and hydroclimatic factors on the macrofauna of Moroccan sandy beaches. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 58, n. SUPPL., p. 71–82, 2003.

BORZONE, C. Macrobenthic Intertidal Communities From Wave to Tide Dominated Beach Environments. A Case Study in Two Brazilian Beaches. **Journal of coastal research: An international forum for the littoral sciences**, n. 19, p. 472–480, 2003.

BOUSFIELD, E. L. Recent advances in the systematics and biogeography of land hoppers (Amphipoda: Talitridae) of the Indo-Pacific region. **Bernice P. Bishop Museum Special Publication**, v. 72, p. 171–210, 1984.

BOUSFIELD, E. L.; EL, B. The amphipod superfamily Talitroidea in the northeastern Pacific region. I: Family Talitridae: Systematics and distributional ecology. 1982.

BROLY, P.; DEVILLE, P.; MAILLET, S. The origin of terrestrial isopods (Crustacea: Isopoda: Oniscidea). **Evolutionary Ecology**, v. 27, n. 3, p. 461–476, 2013.

BROOKS, S. Disappearing beaches. **Nature Climate Change**, v. 10, n. 3, p. 188–190, 2 mar. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41558-020-0714-3>>.

BROWN, A. C.; MCLACHLAN, A. Sandy shore ecosystems and the threats facing them: Some predictions for the year 2025. **Environmental Conservation**, v. 29, n. 1, p. 62–77, 2002.

BROWNE, W. E.; HADDOCK, S. H. D.; MARTINDALE, M. Q. Phylogenetic analysis of lineage relationships among hyperiid amphipods as revealed by examination of the mitochondrial gene, cytochrome oxidase I (COI). **Integrative and Comparative Biology**, v. 47, n. 6, p. 815–830, 22 maio 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/icb/article-lookup/doi/10.1093/icb/icm093>>.

CARDOSO, R. Behavioural strategies and surface activity of the sandhopper *Pseudorchestoidea brasiliensis* (Amphipoda: Talitridae) on a Brazilian beach. **Marine Biology**, v. 141, n. 1, p. 167–173, 1 jul. 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00227-002-0784-y>>.

CARDOSO, R.; VELOSO, V. Population biology and secondary production of the sandhopper *Pseudorchestoidea brasiliensis* (Amphipoda: Talitridae) at Prainha Beach, Brazil. **Marine Ecology Progress Series**, v. 142, n. 1989, p. 111–119, 1996. Disponível em: <<http://www.int-res.com/abstracts/meps/v142/p111-119/>>.

CHAPMAN, J. W. Amphipoda: Gammaridea. **The Light and Smith Manual: Intertidal**

Invertebrates from Central California to Oregon, p. 545–611, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1957/4776>>.

CHENG, Y. T. et al. Cryptic diversity of the semi-terrestrial amphipod *Platorchestia japonica* (Tattersall, 1922) (Amphipoda: Talitrida: Talitridae) in Japan and Taiwan, with description of a new species. **Zootaxa**, v. 18, n. 2787, p. 1–18, 2011.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1657–1659, 2000.

COPILAȘ-CIOCIANU, D.; BORKO, Ș.; FIȘER, C. The late blooming amphipods: Global change promoted post-Jurassic ecological radiation despite Palaeozoic origin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 143, n. October 2019, 2020.

CRISP, D. J. Genetic consequence of different reproductive strategies in marine invertebrates. **Marine Organisms, Genetics, Ecology and Evolution**, p. 257–273, 1978.

DAVOLOS, D.; MACLEAN, N. Mitochondrial COI-NC-COII sequences in talitrid amphipods (Crustacea). **Heredity**, v. 94, n. 1, p. 81–86, 6 jan. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/6800529>>.

DEFEO, O. et al. Threats to sandy beach ecosystems: A review. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 81, n. 1, p. 1–12, jan. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2008.09.022>>.

DUGAN, J. E. et al. The response of macrofauna communities and shorebirds to macrophyte wrack subsidies on exposed sandy beaches of southern California. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 58, n. SUPPL., p. 25–40, 2003.

EGUIARTE, L.; SOUZA, V.; AGUIRRE, X. La ecología molecular de plantas y animales. **INE/Conabio, México, DF**, p. 592, 2007.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 1, p. 117693430500100, 2005.

FALLACI, M. et al. Differences in behavioural strategies between two sympatric talitrids (Amphipoda) inhabiting an exposed sandy beach of the French Atlantic coast. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 48, n. 4, p. 469–482, 1999.

FANINI, L. et al. Population traits of *Atlantorchestoidea brasiliensis* (Dana, 1853) (Talitridae) along the coastline of Uruguay: combined information from demography, behaviour and Cytochrome Oxidase I. **Biodiversity Journal**, v. 8, n. 2, p. 419–420, 2017a.

FANINI, L. et al. Life-history, substrate choice and Cytochrome Oxidase I variations in sandy beach peracaridans along the Rio de la Plata estuary. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 187, p. 152–159, mar. 2017b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272771417300239>>.

FANINI, L. et al. Life-history, substrate choice and Cytochrome Oxidase I variations in sandy beach peracaridans along the Rio de la Plata estuary. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 187, p. 152–159, mar. 2017c. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272771417300239>>.

FANINI, L.; CANTARINO, C. M.; SCAPINI, F. Relationships between the dynamics of two *Talitrus saltator* populations and the impacts of activities linked to tourism. **Oceanologia**, v. 47, n. 1, p. 93–112, 2005. Disponível em: <<http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-article-3eae69f-2f93-459f-8c8a-7b1235435b1e>>.

FÉRAL, J.-P. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 268, n. 2, p. 121–145, fev. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022098101003823>>.

FIALKOWSKI, W. et al. The sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda) as a biomonitor of trace metal bioavailabilities in European coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 1, p. 39–44, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.09.013>>.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular marine biology and biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294–299, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7881515>>.

FRIEND, J. A.; RICHARDSON, A. M. M. Biology of terrestrial amphipods. **Annual review of entomology**. Vol. 31, p. 25–48, 1986.

GARCIA, V. M. T.; GIANUCA, N. M. The beach and surfzone. **Subtropical Convergence Environments: The Coast and Sea in the Southwestern Atlantic**, p. 166–170, 1997.

GELLER, J. et al. Redesign of <sc>PCR</sc> primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit <sc>I</sc> for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 5, p. 851–861, 13 set. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1755-0998.12138>>.

GONÇALVES, S. C. et al. Sandy beach macrofaunal communities on the western coast of Portugal - Is there a steady structure under similar exposed conditions? **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 81, n. 4, p. 555–568, 2009.

GÜL, M. R.; GRIFFEN, B. D. Combined impacts of natural and anthropogenic disturbances on the bioindicator *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 519, n. June, 2019.

HEBERT, P. D. N. et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fuligator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 41, p. 14812–14817, 2004.

HEINK, U.; KOWARIK, I. What are indicators? On the definition of indicators in ecology and environmental planning. **Ecological Indicators**, v. 10, n. 3, p. 584–593, 2010.

HENZLER, C. M.; INGÓLFSSON, A. The biogeography of the beachflea, *Orchestia gammarellus* (Crustacea, Amphipoda, Talitridae), in the North Atlantic with special reference to Iceland: A morphometric and genetic study. **Zoologica Scripta**, v. 37, n. 1, p. 57–70, 2008.

HORTON, T. et al. **World Amphipoda Database**. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/amphipoda>>. Acesso em: 11 ago. 2021.

HOUSTON, J. R. The economic value of beaches. **Shore & Beach**, v. 76, n. 1, p. 22–26, jan. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470160X05000701>>.

HURLEY, D. E. Transition from water to land in decapod crustaceans. **Integrative and Comparative Biology**, v. 8, n. 3, p. 355–392, 1968.

IWASA-ARAI, T. et al. First Record of the Beach-Hopper *Speziorchestia tucurauna* (Crustacea: Amphipoda) in the Oceanic Island of Fernando de Noronha, Northeastern Brazil. **Thalassas**, n. November 2018, 2020.

JABŁOŃSKA, A. et al. Long-term within-basin isolation patterns, different conservation units, and interspecific mitochondrial DNA introgression in an amphipod endemic to the ancient Lake Skadar system, Balkan Peninsula. **Freshwater Biology**, v. 65, n. 2, p. 209–225, 2020.

JACOBI, C. Spatial and temporal distribution of Amphipoda associated with mussel beds from the Bay of Santos (Brazil). **Marine Ecology Progress Series**, v. 35, p. 51–58, 1987. Disponível em: <<http://www.int-res.com/articles/meps/35/m035p051.pdf>>.

JENNER, R. A. et al. Eumalacostracan phylogeny and total evidence: Limitations of the usual suspects. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 1–20, 2009.

KERFELD, C. A.; SCOTT, K. M. Using BLAST to Teach “E-value-tionary” Concepts. **PLoS Biology**, v. 9, n. 2, p. e1001014, 1 fev. 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1001014>>.

KETMAIER, V. et al. Variation of genetic and behavioural traits in the sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea Amphipoda) along a dynamic sand beach. **Ethology Ecology & Evolution**, v. 22, n. 1, p. 17–35, 10 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03949370903515919>>.

KETMAIER, V.; IURI, V.; MATTHAEIS, E. D. E. Genetic resources and molecular markers in *Talitrus saltator* (Amphipoda , Talitridae) from the beach of Smir. p. 55–59, 2005.

KETMAIER, V.; SCAPINI, F.; DE MATTHAEIS, E. Exploratory analysis of talitrid population genetics as an indicator of the quality of sandy beaches. **Estuarine, Coastal**

and Shelf Science, v. 58, n. SUPPL., p. 159–167, out. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272771403000374>>.

KIES, F. et al. Assessment of the coastal and estuarine environment quality of western Algeria using the bioindicator Polychaeta; the genus Nereis. **J. Mater. Environ. Sci**, v. 2020, n. 9, p. 1472–1481, 2020. Disponível em: <<http://www.jmaterenvironsci.com>>.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KNOX, M. A. et al. Mitochondrial DNA (COI) analyses reveal that amphipod diversity is associated with environmental heterogeneity in deep-sea habitats. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 19, p. 4885–4897, out. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-294X.2012.05729.x>>.

KRUSCHWITZ, L. G. Environmental Factors Controlling Reproduction of the Amphipod *Hyaella azteca*. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, v. 58, n. 15, p. 16–21, 1978.

L C ROSA, R ALUIZIO, C. A. B. Talitridae (Amphipoda , Crustacea) Nas Praias Estuarinas Da Baía De Paranaguá, Sul Do Brasil: Distribuição Espacial E Abundância. **Braz. J. Aquat. Sci. Technol.**, v. 11, n. 1, p. 37–41, 2007.

LAM, P. K. S.; MA, H. H. T. Some observations on the life cycle and population dynamics of talitroides topitotum (Burt) (Amphipoda: Talitridae) in hong kong. **Journal of Natural History**, v. 23, n. 5, p. 1087–1092, 1989.

LANDRIGAN, P. J. et al. Human health and ocean pollution. **Annals of Global Health**, v. 86, n. 1, p. 1–64, 2020.

LERCARI, D.; DEFEO, O. Variation of a sandy beach macrobenthic community along a human-induced environmental gradient. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 58, n. SUPPL., p. 17–24, 2003.

LEVINS, R. THE EFFECT OF RANDOM VARIATIONS OF DIFFERENT TYPES ON POPULATION GROWTH. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 62, n. 4, p. 1061–1065, 1 abr. 1969. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.62.4.1061>>.

LI, L.; ZHENG, B.; LIU, L. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends. **Procedia Environmental Sciences**, v. 2, p. 1510–1524, 2010.

LOPES, O. L.; MASUNARI, S. Distribuição de abundância de Talitroides topitotum (Burt) (Crustacea, Amphipoda, Talitridae) na área de entorno da Usina Hidroelétrica de Guaricana, Serra do Mar, Guaratuba, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 2, p. 219–227, jun. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-81752004000200009&lng=pt&tlng=pt>.

LOWRY, J. K.; MYERS, A. A. New genera of Talitridae in the revised Superfamily Talitroidea Bulycheva 1957 (Crustacea, Amphipoda, Senticaudata). **Zootaxa**, v. 4553, n. 1, p. 1, 6 fev. 2019. Disponível em: <<https://biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.4553.1.1>>.

MACHADO, A. P. Geomorfologia, tipologia, vulnerabilidade erosiva e ocupação urbana das praias do litoral do Espírito Santo, Brasil. **Geografares**, 2001.

MACHADO, P. M. et al. Tourism impacts on benthic communities of sandy beaches. **Marine Ecology**, v. 38, n. 4, p. e12440, ago. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/maec.12440>>.

MARQUES, J. C. et al. Comparison of *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) biology, dynamics, and secondary production in Atlantic (Portugal) and Mediterranean (Italy and Tunisia) populations. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 58, n. SUPPL., p. 127–148, out. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272771403000428>>.

MATTOS, G.; SEIXAS, V. C.; PAIVA, P. C. Comparative phylogeography and genetic connectivity of two crustacean species with contrasting life histories on South Atlantic sandy beaches. **Hydrobiologia**, v. 826, n. 1, p. 319–330, 25 jan. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10750-018-3744-3>>.

MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. **PLoS Biology**, v. 3, n. 12, p. e422, 29 nov. 2005. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0030422>>.

MORRITT, D.; SPICER, J. I. The culture of eggs and embryos of amphipod crustaceans: Implications for brood pouch physiology. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 76, n. 2, p. 361–376, 1996.

MOSS, P. History and development of molecular biology. In: **Molecular Hematology 4e**. [s.l.] Wiley, 2019. p. 353–362.

MUEHE, D.; CARVALHO, V. G. de. Geomorfologia, cobertura sedimentar e transporte de sedimentos na plataforma continental interna entre a Ponta de Saquarema e o Cabo Frio (RJ). **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 41, n. 1–2, p. 01–12, 1993.

MYERS, A. A.; LOWRY, J. K. A phylogeny and classification of the Talitroidea (Amphipoda, Senticaudata) based on interpretation of morphological synapomorphies and homoplasies. **Zootaxa**, v. 4778, n. 2, p. 281–310, 2020.

NEDBAL, M. A.; FLYNN, J. J. Do the combined effects of the asymmetric process of replication and DNA damage from oxygen radicals produce a mutation-rate signature in the mitochondrial genome? **Molecular biology and evolution**, v. 15, n. 2, p. 219–223, 1998.

NICOLODI, J. L.; PETERMANN, R. M. Mudanças Climáticas e a Vulnerabilidade da Zona Costeira do Brasil: Aspectos ambientais, sociais e tecnológicos. **Revista de Gestão**

Costeira Integrada, v. 10, n. 2, p. 151–177, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.aprh.pt/rgci/rgci206.html>>.

NIELSEN, N. O. Ecosystem approaches to human health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. suppl, p. S69–S75, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2001000700015&lng=en&tlng=en>.

ORTÍ, G. et al. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, n. 2, p. 169–182, 1996.

OTEGUI, M. B. P.; BLANKENSTEYN, A.; PAGLIOSA, P. R. Population structure, growth and production of *Thoracophelia furcifera* (Polychaeta: Opheliidae) on a sandy beach in Southern Brazil. **Helgoland Marine Research**, v. 66, n. 4, p. 479–488, 2012.
PAVESI, L. et al. Temporal population genetics and coi phylogeography of the sandhopper *macarorchestia remyi* (Amphipoda: Talitridae). **Zoological Studies**, v. 50, n. 2, p. 220–229, 2011.

PAVESI, L.; DE MATTHAEIS, E. Life history of the talitrid amphipod *Macarorchestia remyi* (Schellenberg, 1950) on a Tyrrhenian sandy beach, Italy. **Hydrobiologia**, v. 635, n. 1, p. 171–180, 5 nov. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10750-009-9909-3>>.

PAVESI, L.; KETMAIER, V. Patterns of genetic structuring and levels of differentiation in supralittoral talitrid amphipods: an overview. **Crustaceana**, v. 86, n. 7–8, p. 890–907, 2013. Disponível em: <https://brill.com/view/journals/cr/86/7-8/article-p890_8.xml>.

PETRACCO, M. et al. Brazilian sandy beach macrofauna production: A review. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 60, n. 4, p. 473–484, 2012.

POMBO, M.; TURRA, A. The burrow resetting method, an easy and effective approach to improve indirect ghost-crab population assessments. **Ecological Indicators**, v. 104, n. May, p. 422–428, set. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.05.010>>.

REGUERA, P.; COUCEIRO, L.; FERNÁNDEZ, N. A review of the empirical literature on the use of limpets *Patella* spp. (Mollusca: Gastropoda) as bioindicators of environmental quality. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. November 2017, p. 593–600, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.004>>.

RIBEIRO, H. Saúde Pública e meio ambiente: evolução do conhecimento e da prática, alguns aspectos éticos. **Saúde e Sociedade**, v. 13, n. 1, p. 70–80, abr. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12902004000100008&lng=pt&tlng=pt>.

ROCHA, L. A. et al. Ecological speciation in tropical reef fishes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1563, p. 573–579, 22 mar. 2005. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/2004.3005>>.

ROSA FILHO, J. S. et al. Macrofauna bentonica de zonas entre-mares nao vegetadas do estuario do rio Caete, Braganca, Para. **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi Ciencias Naturais**, v. 1, n. 3, p. 85–96, 2006.

RUSSELL, V. S. Pollution: Concept and definition. **Biological Conservation**, v. 6, n. 3, p. 157–161, 1974.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual, the third edition** Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York, , 2001.

SANTOS, V. F. dos; SHORT, A. D.; MENDES, A. C. Beaches of the Amazon Coast: Amapá and West Pará. In: **Coastal Research Library**. [s.l: s.n.]17p. 67–93.

SASTRY, A. N.; VERNBERG, F. J.; VERNBERG, W. B. Ecological aspects of reproduction. **The biology of Crustacea**, v. 8, p. 170–179, 1983.

SCAPINI, F. et al. The role of the biological clock in the sun compass orientation of free-running individuals of *Talitrus saltator*. **Animal Behaviour**, v. 69, n. 4, p. 835–843, 2005.

SCHLACHER, T. A. et al. Sandy beaches at the brink. **Diversity and Distributions**, v. 13, n. 5, p. 556–560, 2007.

SEIDEL, R. A.; LANG, B. K.; BERG, D. J. Phylogeographic analysis reveals multiple cryptic species of amphipods (Crustacea: Amphipoda) in Chihuahuan Desert springs. **Biological Conservation**, v. 142, n. 10, p. 2303–2313, out. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.05.003>>.

SEREJO, C. S. Gammaridean and caprellidean fauna (Crustacea) associated with the sponge *Dysidea fragilis* Johnston at Arraial do cabo, Rio de Janeiro, Brazil. **Bulletin of Marine Science**, v. 63, n. 2, p. 363–385, 1998.

SEREJO, C. S. Talitridae (Amphipoda, Gammaridea) from the Brazilian coastline. **Zootaxa**, v. 646, n. 1, p. 1, 16 set. 2004a. Disponível em: <<https://biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.646.1.1>>.

SEREJO, C. S. Cladistic revision of talitroidean amphipods (Crustacea, Gammaridea), with a proposal of a new classification. **Zoologica Scripta**, v. 33, n. 6, p. 551–586, nov. 2004b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.0300-3256.2004.00163.x>>.

SEREJO, C. S.; SIQUEIRA, S. G. L. Catalogue of the Order Amphipoda from Brazil (Crustacea, Peracarida): Suborders Amphilochidea, Senticaudata and Order Ingolfiellida. **Zootaxa**, v. 4431, n. 1, p. 1, 8 jun. 2018. Disponível em: <<https://biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.4431.1.1>>.

SEREJO, C. S.; SITROP, D. J. Hyalidae. **Zootaxa**, v. 2260, n. 1, p. 440–452, 8 out. 2009. Disponível em: <<https://www.biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.2260.1.24>>.

SHARMA, P.; KOBAYASHI, T. Are “universal” dna primers really universal? **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 4, p. 485–496, 2014.

SHORT, A. D.; KLEIN, A. H. da F. **Brazilian beach systems**. [s.l.] Springer, 2016. v. 17

SPICER, J. I.; MOORE, P. G.; TAYLOR, A. C. The physiological ecology of land invasion by the Talitridae (Crustacea: Amphipoda). **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 232, n. 1266, p. 95–124, 1987a.

SPICER, J. I.; MOORE, P. G.; TAYLOR, A. C. The physiological ecology of land invasion by the Talitridae (Crustacea: Amphipoda). **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 232, n. 1266, p. 95–124, 22 out. 1987b. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.1987.0063>>.

STOCK, J. H. Shallow-water gammaridean Amphipoda of New England. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 2, p. 326–326, 1 fev. 1975. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/f75-040>>.

SUCIU, M. C.; TAVARES, D. C.; ZALMON, I. R. Comparative evaluation of crustaceans as bioindicators of human impact on Brazilian sandy beaches. **Journal of Crustacean Biology**, v. 38, n. 4, p. 420–428, 3 ago. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcb/article/38/4/420/4992874>>.

TAFANI, B. et al. Phylogenetic relationships among Mediterranean sandhoppers. **Journal of Natural History**, v. 38, n. 4, p. 499–508, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0022293021000045145>>.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596–1599, 2007.

TOURINHO, J. L. et al. Life history and demographic evolution: Comparative population genetics in sandy beach crustaceans. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 251, n. January, p. 107189, abr. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272771421000251>>.

UNGHERESE, G.; UGOLINI, A. Sandhopper solar orientation as a behavioural biomarker of trace metals contamination. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 4, p. 1360–1364, abr. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.038>>.

VÄINÖLÄ, R. et al. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 241–255, 18 jan. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10750-007-9020-6>>.

VELOSO, V. G. et al. Comparison between the macroinfauna of urbanized and protected beaches in Rio de Janeiro State, Brazil. **Biological Conservation**, v. 127, n. 4, p. 510–515, fev. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006320705003885>>.

VELOSO, V. G. et al. *Atlantorchestoidea brasiliensis* (Crustacea: Amphipoda) as an indicator of disturbance caused by urbanization of a beach ecosystem. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. 1, p. 13–21, mar. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-87592010000100002&lng=en&tlng=en>.

VELOSO, V. G.; NEVES, G.; DE ALMEIDA CAPPER, L. Sensitivity of a cirolanid isopod to human pressure. **Ecological Indicators**, v. 11, n. 3, p. 782–788, 2011.

WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 6, p. 1419–1439, 2006.

WAYKAR, B.; DESHMUKH, G. Evaluation of bivalves as bioindicators of metal pollution in freshwater. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, n. 1, p. 48–53, 2012.

WEISKERGER, C. J. et al. Impacts of a changing earth on microbial dynamics and human health risks in the continuum between beach water and sand. **Water Research**, v. 162, p. 456–470, 2019.

WENNER, A. M. Crustaceans and Other Invertebrates as Indicators of Beach Pollution. **Marine Organisms as Indicators**, p. 199–229, 1988.

WESTRAM, A. M. et al. Spatial distribution of cryptic species diversity in European freshwater Amphipods (*Gammarus fossarum*) as revealed by pyrosequencing. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–6, 2011.

WHO. Definition of Environmental Health developed at WHO consultation in Sofia, Bulgaria. **World Health Organization**, 1993.

WILDISH, D. J. Ecology and natural history of aquatic Talitroidea. **Canadian Journal of Zoology**, v. 66, n. 11, p. 2340–2359, 1988.

WILDISH, D. J. et al. Diversity and dispersal history of the talitrids (Crustacea: Amphipoda: Talitridae) of Bermuda. **Journal of Natural History**, v. 50, n. 29–30, p. 1911–1933, 10 ago. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/00222933.2016.1180719>>.

WILDISH, D. J. Evolutionary ecology of driftwood talitrids: a review. **Zoosystematics and Evolution**, v. 93, n. 2, p. 353–361, 15 nov. 2017. Disponível em: <<https://zse.pensoft.net/articles.php?id=12582>>.

WILDISH, D. J.; PAVESI, L.; KETMAIER, V. Talitrid amphipods (Crustacea: Amphipoda: Talitridae) and the driftwood ecological niche: A morphological and molecular study. **Journal of Natural History**, v. 46, n. 43–44, p. 2677–2700, 2012.

ZHANG, Z. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1–2, p. 203–214, 2000.

ANEXOS

ANEXO I



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50823-3	Data da Emissão: 07/03/2016 16:31	Data para Revalidação*: 06/04/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: MAÍRA POMBO	CPF: 219.631.408-00
Título do Projeto: Potencial de dispersão e caracterização de fluxo gênico entre populações do caranguejo Ocypode quadrata da costa brasileira: organismo de elevado potencial bioindicativo e de monitoramento de praias arenosas	
Nome da Instituição : INSTITUTO OCEANOGRÁFICO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0037-15

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Paola Franzan Sanches	Coleta de material	368.145.778-60	33832267 SSP-SP-SP	Brasileira
2	Fernando Lucas Melo	Coleta; interpretação das sequências; montagem das árvores	216.083.448-35	32598094-9 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CALCOENE	AP	Goiaíba	Fora de UC Federal
2	LUCENA	PB	Praias diversas	Fora de UC Federal
3		PE	Praias diversas	Fora de UC Federal
4		SE	Praias diversas	Fora de UC Federal
5		AL	Praias diversas	Fora de UC Federal
6		BA	Praias diversas	Fora de UC Federal
7		ES	Praias diversas	Fora de UC Federal
8		RJ	Praias diversas	Fora de UC Federal
9		SP	Praias diversas	Fora de UC Federal
10		PR	Praias diversas	Fora de UC Federal
11		SC	Praias diversas	Fora de UC Federal
12		RS	Praias diversas	Fora de UC Federal
13		PA	Praias diversas	Fora de UC Federal
14		MA	Praias diversas	Fora de UC Federal
15		CE	Praias diversas	Fora de UC Federal
16		RN	Praias diversas	Fora de UC Federal
17		PE	PARQUE NACIONAL MARINHO DE FERNANDO DE NORONHA	UC Federal
18		PE	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DE FERNANDO DE NORONHA - ROCAS - SÃO PEDRO E SÃO PAULO	UC Federal
19	BARRA DE SANTO ANTONIO	AL	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL COSTA DOS CORAIS	UC Federal
20		MA	RESERVA EXTRATIVISTA DE CURURUPU	UC Federal
21		MA	PARQUE NACIONAL DOS LENÇÓIS MARANHENSES	UC Federal
22		MA	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DELTA DO PARNAIBA	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Ocypode quadrata
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Ocypode quadrata
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Bledius ("Qtde: 600"), Talitridae ("Qtde: 600")

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Invertebrados Aquáticos)	Outras amostras biológicas (apA*ndice)
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Aquáticos)	Outros petrechos (nao ha sao todos terrestres), Captura manual
3	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Coleta manual, Captura manual, Puça

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 34196931

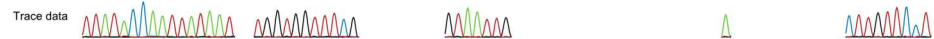


Alinhamento Geral



100 120 140 160

HO987403 -TAAACCTATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TAGTACCA
HO987402 -TAAACCTATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TAGTACCA
HO987405 -TAAACCTATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TAGTACCA
HO987404 -TAAACCTATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TAGTACCA
HO987401 -TAAACCTATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TAGTACCA
GU661052 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGATTGG-----GAAATTG- -TGGTTCCG
LC566512 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGATTGG-----GTAATTG- -TGGTTCCG
MK286548 -TTATGCTATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TGGTTCCG
LC566528 -TAAACCTATTATAA-TGGGGGATTGG-----GTAATTG- -TAGTACCG
MG319590 -TAAACCTATTATAA-TGGGGGATTGG-----GTAATTG- -TTGTTCCG
LC624731 -TTTACCTATTATAA-TGGTGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTACCG
KX360538 -TTTACCTATTATAA-TGGTGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTACCG
KX360535 -TTTACCTATTATAA-TGGTGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTACCG
KX360533 -TTTACCTATTATAA-TGGTGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTACCG
LC597812 -TTTACCTATTATAA-TGGTGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTACCG
KT209322 -TTTACCTATTATGA-TGGGGGTTTGG-----GTAATTG- -TAGTACCG
KT208744 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGTTTGG-----GTAATTG- -TAGTACCG
M2224490 -TTTACCTATTATAA-TGGAGGTTTGG-----GTAATTG- -TAAATCCA
M2224489 -TTTACCTATTATAA-TGGAGGTTTGG-----GTAATTG- -TAAATCCA
LC566448 -TGATACCTATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TTATTCCT
MG655900 -TAAACCTATTATAA-TGGGGGATTGG-----GTAATTG- -TGGTTCCG
MG655899 -TGATACCTATGATAA-TGGGGGATTGG-----GTAATTG- -TAGTACCG
KY264156 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTCCCT
KY264154 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTCCCT
KY264152 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTCCCT
KY264155 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTCCCT
KY264153 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTCCCT
LC566536 -TGATACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTTCCT
LC566444 -TAAACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTTCCT
LC566460 -TAAACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTTCCT
LC566424 -TAAACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TTGTTCCG
LC566368 -TTTACCAATTATGAT-TGGGGGGTTTGG-----GAAATTG- -TTATTCCT
LC566364 -TTTACCAATTATGAT-TGGTGGTTTGG-----GAAATTG- -TTATTCCT
MF986263 -TGATACCTATTATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TAAATTCCT
MF663278 -TAAACCAATTATAA-TGGGGGATTGG-----GTAATTG- -TAAATTCCT
KX224097 -TAAACCAATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GAAATTG- -TAGTTCCT
KX224096 -TAAACCAATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GAAATTG- -TAGTTCCT
KX224095 -TAAACCAATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GAAATTG- -TAGTTCCT
AB741719 -TTTACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TGGTCCCA
AB741718 -TTATGCCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TGGTCCCA
HM900383 -TAAAGCTATGATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TTGTTCCG
FJ581475 -TAAACCAATTATGAT-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TGGTACCG
FJ581476 -TAAACCAATTATGAT-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TGGTACCG
FJ581477 -TAAACCAATTATGAT-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TGGTACCG
FJ581474 -TAAACCAATTATGAT-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TGGTACCG
MZ580816 -TTTACCTATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TAGTACCA
MG316171 -TTTACCTATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TAGTACCA
MG314892 -TTTACCTATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TAGTACCA
MG313418 -TTTACCTATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TAGTACCA
MG316180 -TTTACCTATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TAGTACCA
MN701475 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGGTTTGG-----GAAATTG- -TGGTTCCG
MN701474 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGGTTTGG-----GAAATTG- -TGGTTCCG
MN701473 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGGTTTGG-----GAAATTG- -TGGTTCCG
MN701472 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGGTTTGG-----GAAATTG- -TGGTTCCG
MN701476 -TTTACCTATTATAA-TGGGGGGTTTGG-----GAAATTG- -TGGTTCCG
KU896896 -TAAAGCTATGATAA-TGGGGGATTGG-----GAAATTG- -TTTTCCTA
MZ676991 -TAAACCTATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TTGTTCCG
MZ892910 -TAAACCTATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TTGTTCCG
LC566352 -TAAACCTATTATAA-TGGGGGTTTGG-----GAAATTG- -TAGTTCCT
LC566304 -TAAAGCTATTATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TGGTACCG
KU896894 -TTTACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TGGTTCCT
KU896895 -TTTACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TGGTTCCT
KX812492 -TTTACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TGGTTCCT
KX812493 -TTTACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TGGTTCCT
LC566384 -TTTACCTATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TAGTACCT
LC566559 -TGATGCCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TAGTTCCT
LC566555 -TGATGCCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TAGTTCCT
LC223812 -TAAACCTATCATGAT-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TTGTTCCCA
LC223808 -TGATACCTATGATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TTGTTCCCA
MF663279 -TAAACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TAGTTCCT
HO679937 -TGATACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TAGTTCCT
HO679935 -TGATACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TAGTTCCT
HO679936 -TGATACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TAGTTCCT
M2229742 -TAAACCTATTATAA-TGGAGGATTGG-----GTAATTG- -TTGTTCCG
LC566380 -TTTACCTATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GAAATTG- -TTGTTCCG
MG320630 -TAAACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TTGTTCCG
MG319272 -TAAACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TTGTTCCG
MG315759 -TAAACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TTGTTCCG
MG320322 -TAAACCAATTATAA-TGGAGGATTGG-----GAAATTG- -TTGTTCCG
KT122908 -TTTACCAATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TTGTTCCG
KT122905 -TTTACCAATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TTGTTCCG
KT122907 -TTTACCAATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TTGTTCCG
KT122906 -TTTACCAATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TTGTTCCG
KT122904 -TTTACCAATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TTGTTCCG
A3SP -TTTACCAATTATAA-TGGTGGTTTGG-----GTAATTG- -TTGTTCCG

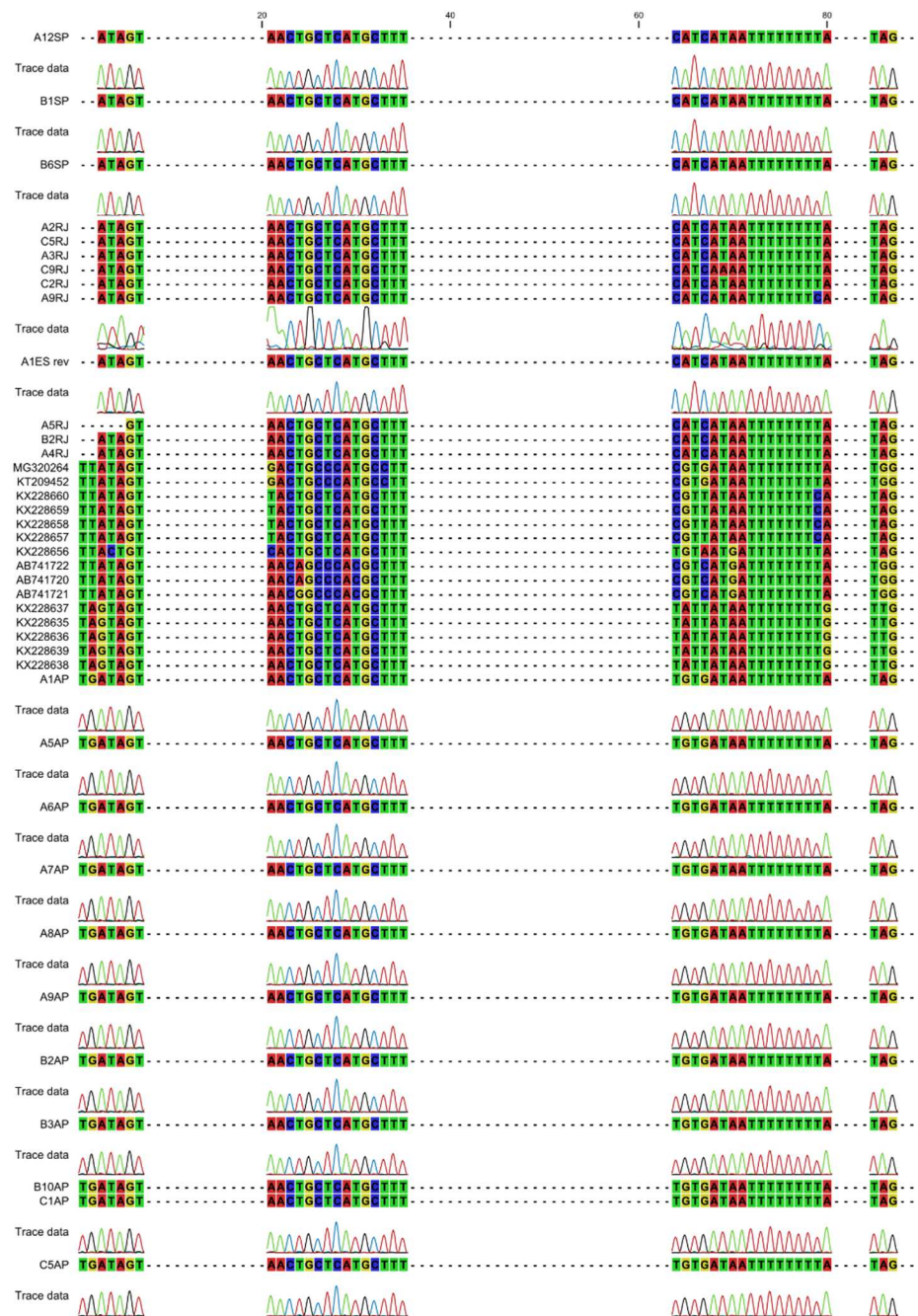


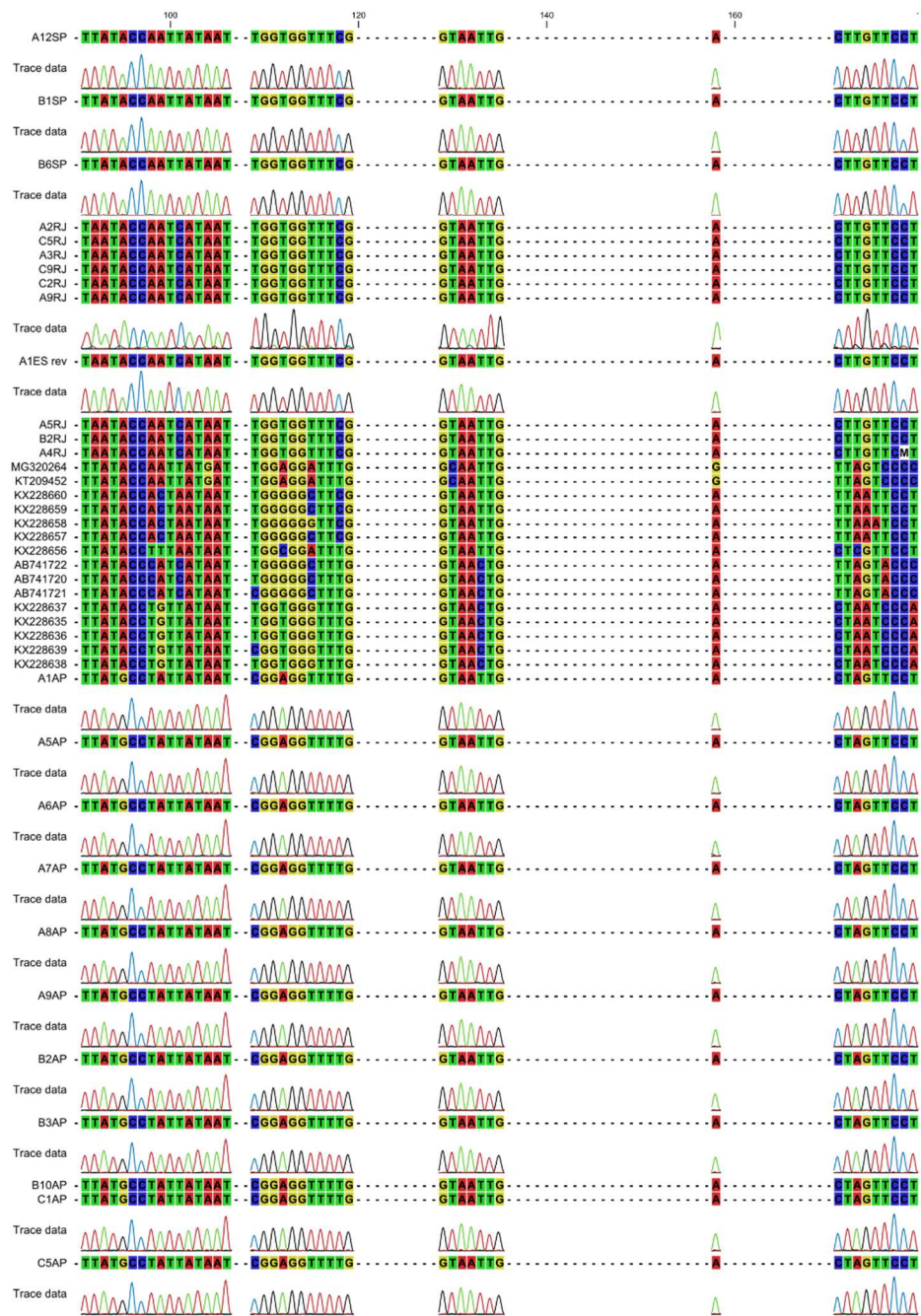
180 200 220 240 260
HO987403 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
HO987402 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
HO987405 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
HO987404 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
HO987401 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
GU661052 TTAATAGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGG--
LC566512 TTAATGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
MK286548 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
LC566528 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
MG319590 TTAATATTAGGTAGTCCAG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
LC624731 TTAATATTAGGTAGGCCAG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
KX360538 TTAATATTAGGTAGGCCAG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
KX360535 TTAATATTAGGTAGGCCAG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
KX360533 TTAATATTAGGTAGGCCAG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
LC597812 TTAATATTAGGTAGGCCAG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
KT209322 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGG--
KT208744 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGG--
M2224490 TTAATGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
M2224489 TTAATGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
LC566448 TTAATAGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGG--
MG655900 TTAATAGTTAGGTAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGG--
MG655899 TTAATAGTTAGGTAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGG--
KY264156 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
KY264154 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
KY264152 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
KY264155 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGT--
KY264153 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
LC566536 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
LC566444 TTAATATTAGGTAGGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
LC566460 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
LC566424 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TGAGA--
LC566368 TTGATAGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATGGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
LC566364 TTAATAGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATGGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
MF969263 TTAATGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
MF663278 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGA--
KX224097 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATGAACAATA--TAAGA--
KX224096 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATGAACAATA--TAAGA--
KX224095 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATGAACAATA--TAAGA--
AB741719 CTATATAGTGGGTAGACCCAG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
AB741718 CTATATAGTGGGTAGACCCAG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
HM900383 TTAATAGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
FJ581475 TTAATAGTTGGTATGCTCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
FJ581476 TTAATAGTTGGTATGCTCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
FJ581477 TTAATAGTTGGTATGCTCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
FJ581474 TTAATAGTTGGTATGCTCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
MZ580816 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
MG316171 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
MG314892 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
MG313418 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
MG316180 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
MN701475 TTAATATTAGGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATGAACAATA--TAAGA--
MN701474 TTAATATTAGGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATGAACAATA--TAAGA--
MN701473 TTAATATTAGGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATGAACAATA--TAAGA--
MN701472 TTAATATTAGGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATGAACAATA--TAAGA--
MN701476 TTAATATTAGGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATGAACAATA--TAAGA--
KU896896 TTAATGTTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGG--
MZ676991 TTAATATTAGGTAGGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TGAGA--
MZ7892910 TTAATATTAGGTAGGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TGAGA--
LC566352 CTATAGTTGGTATGCTCCAG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TGAGA--
LC566304 CTATGCTGGTATGCTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
KU896894 TTAATAGTTGGTATGCTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAATAACA--TGAGT--
KU896895 TTAATAGTTGGTATGCTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAATAACA--TAAGT--
KX812492 CTGATAGTTGGTATGCTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
KX812493 CTGATAGTTGGTATGCTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
LC566384 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TGAGA--
LC566559 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGG--
LC566555 TTAATATTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAATAACA--TAAGG--
LC223812 TTAATATTAGGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATGAACAATA--TAAGA--
LC223808 TTAATAGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
MF663279 TTAATAGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGG--ATAAATAACA--TAAGA--
HO679937 TTAATAGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAATAACA--TAAGA--
HO679935 TTAATAGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAATAACA--TAAGA--
HO679936 TTAATAGTTAGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAATAACA--TGAGA--
M2229742 TTAATGTTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
LC566380 TTAATATTAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGA--ATAAACAATA--TAAGA--
MG320630 TTAATGTTAGGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
MG319272 TTAATGTTAGGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
MG315759 TTAATGTTAGGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
MG320322 TTAATGTTAGGGAAGCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAACAATA--TAAGA--
KT122908 ATATATAAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAATAACA--TAAGT--
KT122905 ATATATAAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAATAACA--TAAGT--
KT122907 ATATATAAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAATAACA--TAAGT--
KT122906 ATATATAAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAATAACA--TAAGT--
KT122904 ATATATAAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAATAACA--TAAGT--
A3SP ATATATAAGGTAGTCCCTG --AT-- --ATAGCTTTTC-- --TTTGT--ATAAATAACA--TAAGT--

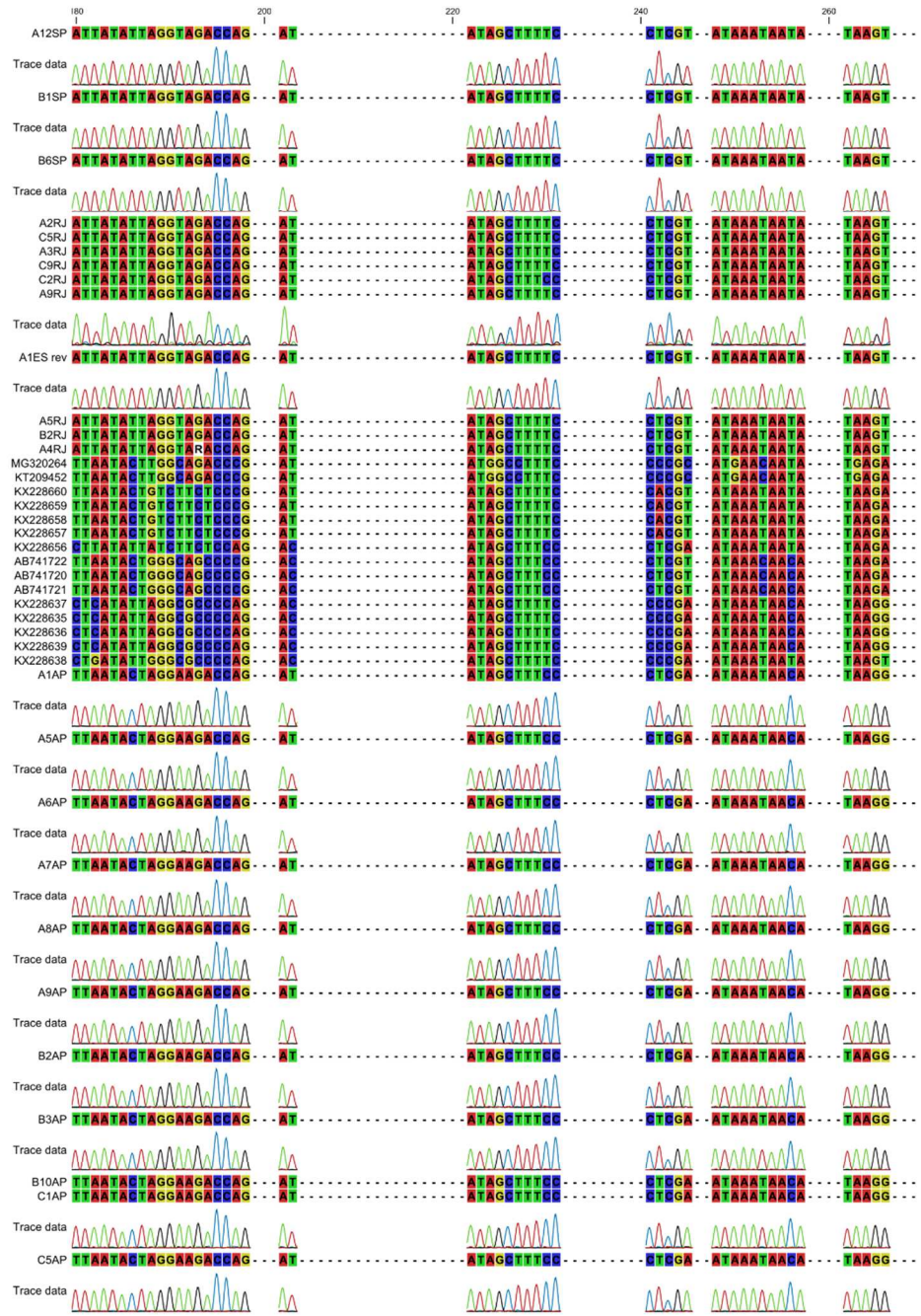


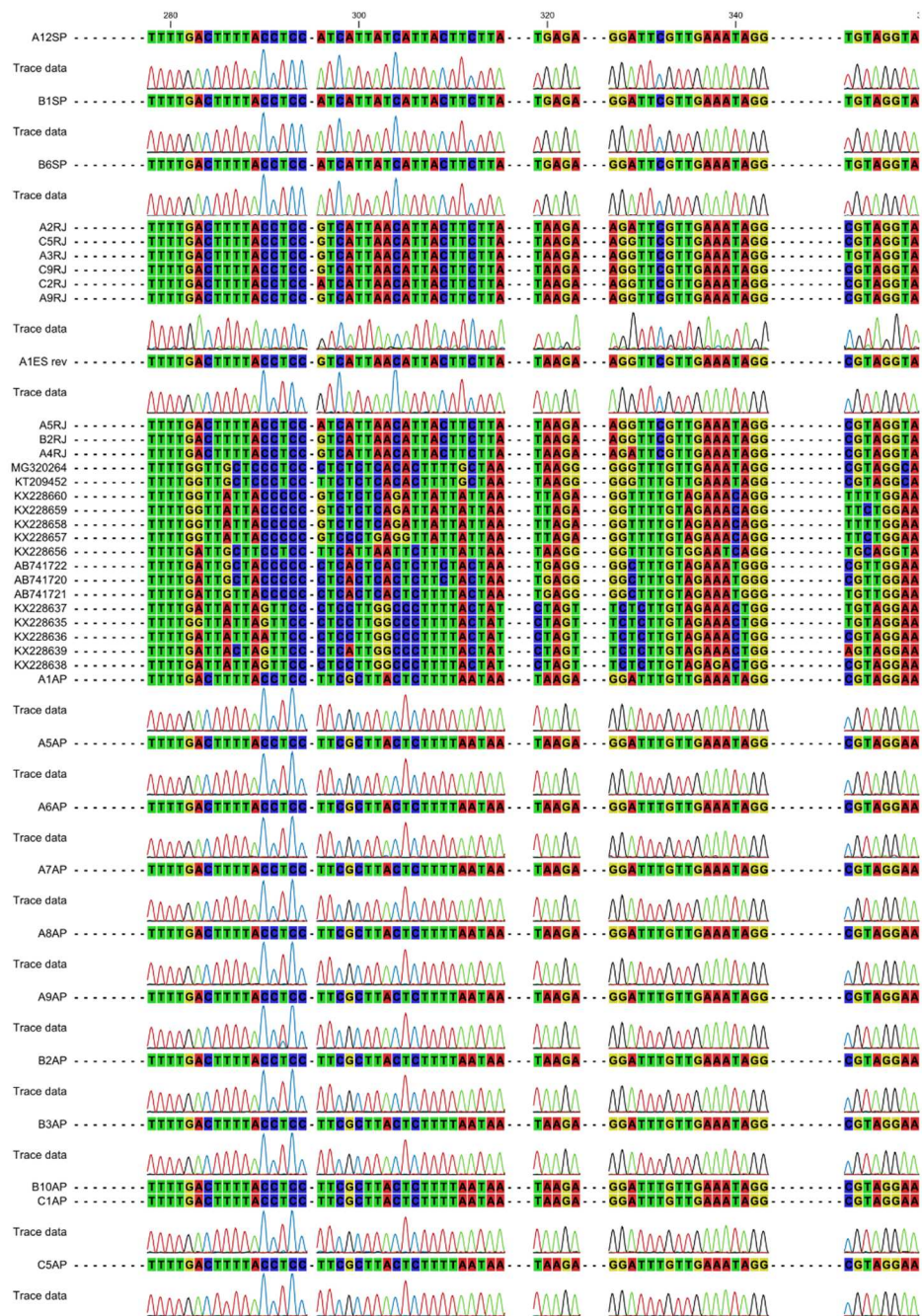
40
1
HQ987403 T C C T T T A T T T G T T T 390
HQ987402 T C C T T T A T T T G T T T 390
HQ987405 T C C T T T A T T T G T T T 390
HQ987404 T C C T T T A T T T G T T T 390
HQ987401 T C C T T T A T T T G T T T 390
GU661052 T C C T T T A T T T G T T T 390
LC566512 A C C T T T A T T T G T T A 390
MK286548 A C C T T T G T T T G T G 390
LC566528 T C C T T T A T T T G T T T 390
MG319590 T C C T T T A T T T G T C 390
LC624731 C C C C T T A T T T G T T T 390
KX360538 C C C C T T A T T T G T T T 390
KX360535 C C C C T T A T T T G T T T 390
KX360533 C C C C T T A T T T G T T T 390
LC597812 C C C C T T A T T T G T T T 390
KT209322 A C C T T T A T T T G T T T 390
KT208744 A C C T T T A T T T G T T T 390
MZ224490 C C C T T A T T T G T C 390
MZ224489 C C C T T A T T T G T C 390
LC566448 T A C T T T A T T T G T T T 390
MG655900 A A C T T T G T T T G T T T 390
MG655899 G C C T T T A T T T G T T T 390
KY264156 A C C C C T T T T T G T T T 390
KY264154 A C C C C T T T T T G T T T 390
KY264152 A C C C C T T T T T G T T T 390
KY264155 A C C C C T T T T T G T T T 390
KY264153 A C C C C T T T T T G T T T 390
LC566536 C C C C T T A T T T G T A T 390
LC566444 C C C C T T A T T T G T A T 390
LC566460 C C C C T T A T T T G T A T 390
LC566424 A C C A T T A T T T G T T T 390
LC566368 T A G T T T A T T T A T T T 390
LC566364 T A G T T T A T T T A T T T 390
MF989263 A C C T T T A T T T G T A T 390
MF663278 T C C T T T A T T T A T T T 390
KX224097 G C C C A T T T T T G T T T 390
KX224096 G C C A C T T T T T G T T T 390
KX224095 G C C A C T T T T T G T T T 390
AB741719 A T C T T T A T T C G T T T 390
AB741718 A T C T T T A T T C G T T T 390
HM900383 C C C T T T A T T T G T A T 390
FJ581475 C C C C C T C T T T G T A T 390
FJ581476 C C C C C T C T T T G T A T 390
FJ581477 C C C C C T C T T T G T A T 390
FJ581474 C C C C C T C T T T G T A T 390
MZ580816 A C C T C T A T T T G T T T 390
MG316171 A C C T C T A T T T G T T T 390
MG314892 A C C T C T A T T T G T T T 390
MG313418 A C C T C T A T T T G T T T 390
MG316180 A C C T C T A T T T G T T T 390
MN701475 C C C T T T A T T C G T T T 390
MN701474 C C C T T T A T T C G T T T 390
MN701473 C C C T T T A T T C G T T T 390
MN701472 C C C T T T A T T C G T T T 390
MN701476 C C C T T T A T T C G T T T 390
KU896896 A C C C T T A T T T G T G T 390
MZ676991 A C C T T T A T T T G T G T 390
MZ892910 A C C T T T A T T T G T G T 390
LC566352 T C A T T T A T T T G T A T 390
LC566304 T T C C C T C T T T G T C T 390
KU896894 A C C T T T A T T T G T A T 390
KU896895 C C C C T T A T T T G T G T 390
KX812492 C C C C C T T T T T G T T T 390
KX812493 C C C C C T T T T T G T T T 390
LC566384 A C C T C T T T T T G T T T 390
LC566559 C C C C T T G T T C G T T T 390
LC566555 C C C C T T G T T C G T T T 390
LC223812 T C C T T T A T T C G T A T 390
LC223808 T C C T T T A T T C G T C T 390
MF663279 A A C T T T A T T T G T G T 390
HQ679937 T C C T T T A T T T G T G T 390
HQ679935 T C C T T T A T T T G T G T 390
HQ679936 T C C T T T A T T T G T G T 390
MZ229742 T C C T T T A T T T G T C 390
LC566380 T C C T T T A T T T G T C T 390
MG320630 T C C T T T A T T C G T T T 390
MG319272 T C C T T T A T T C G T T T 390
MG315759 T C C T T T A T T C G T T T 390
MG320322 T C C T T T A T T C G T T T 390
KT122908 - - - - - - - - - - - - - 374
KT122905 - - - - - - - - - - - - - 374
KT122907 - - - - - - - - - - - - - 374
KT122906 - - - - - - - - - - - - - 374
KT122904 - - - - - - - - - - - - - 374
A3SP T C C T T T A T T T G T A T 388

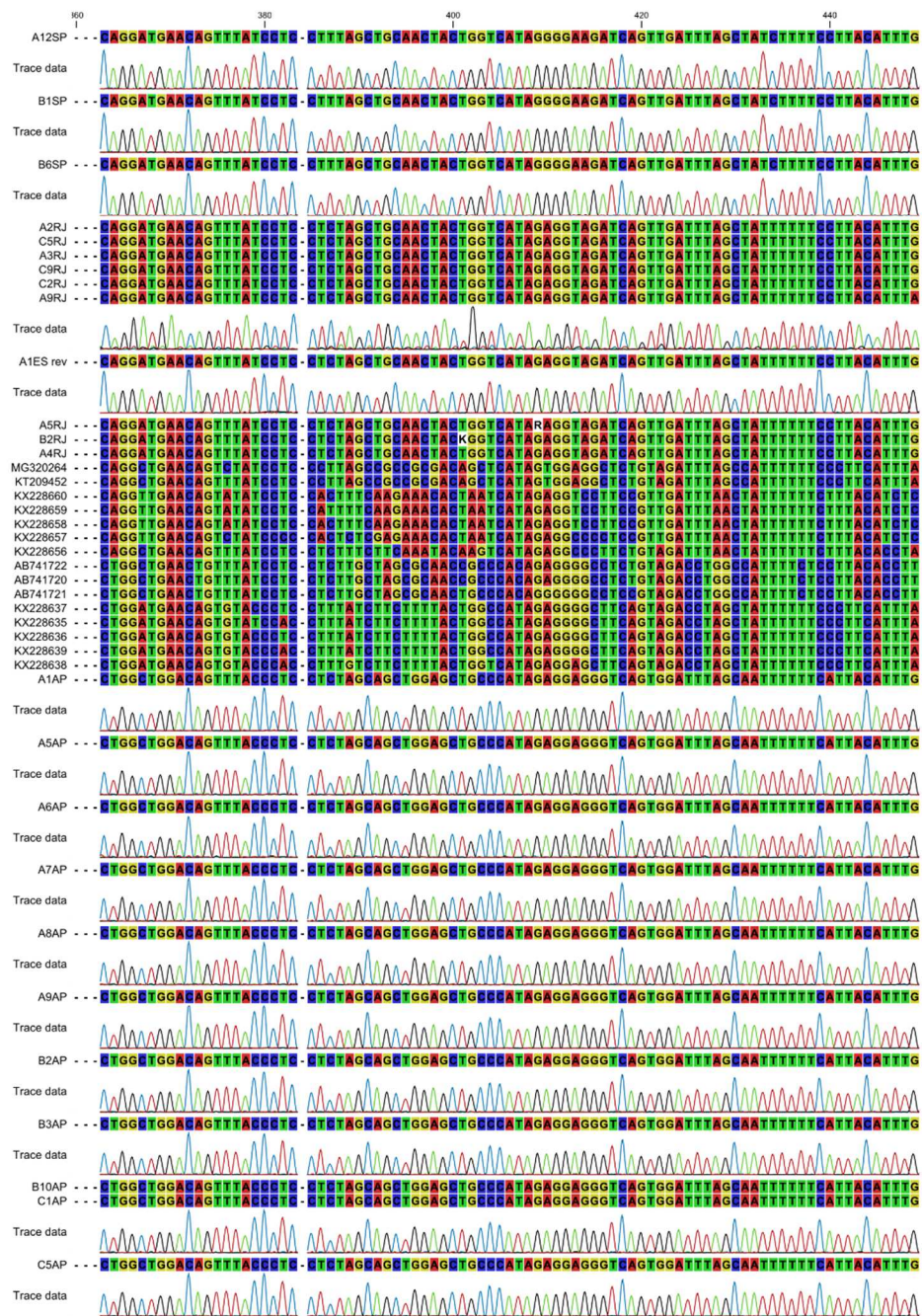


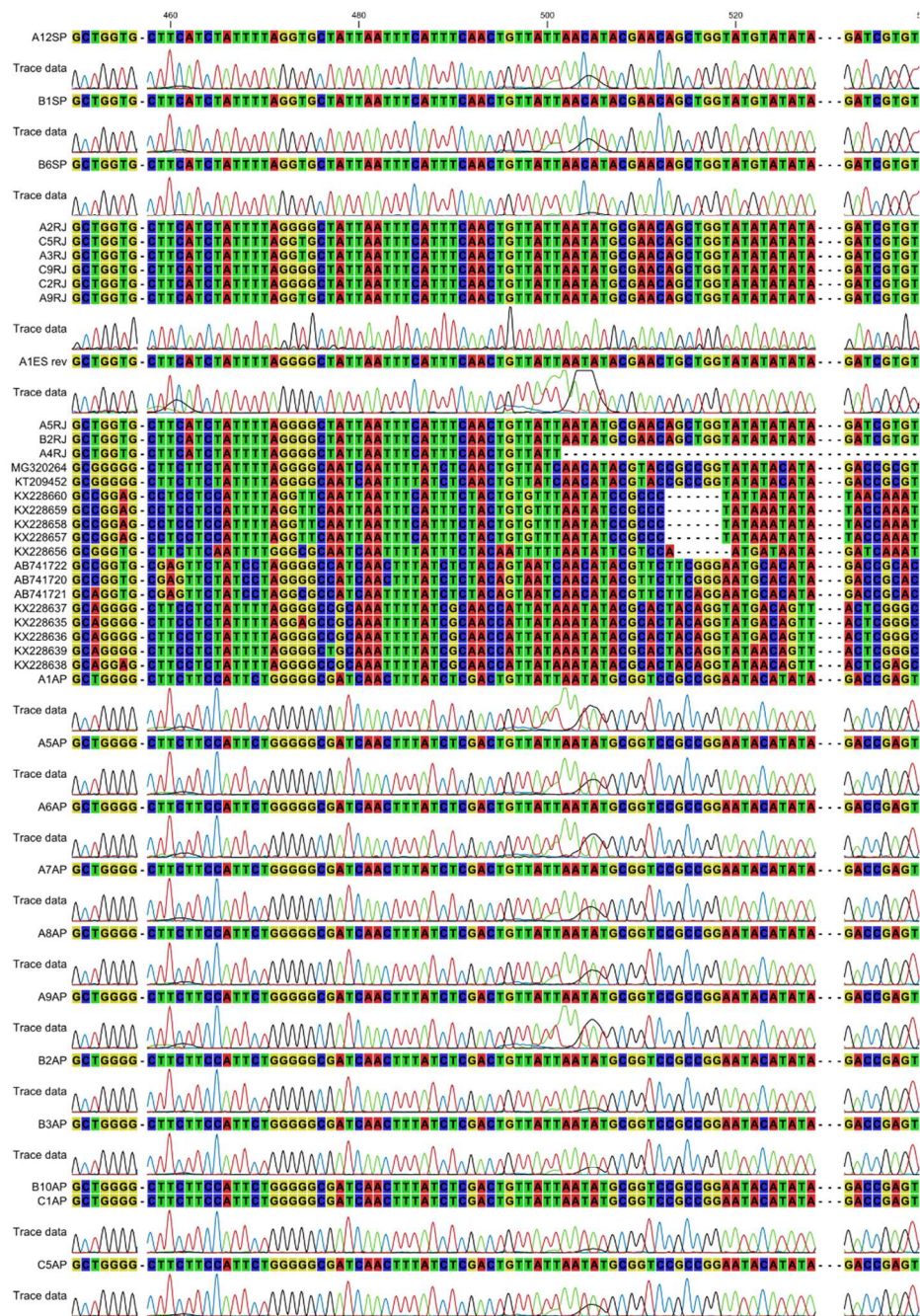


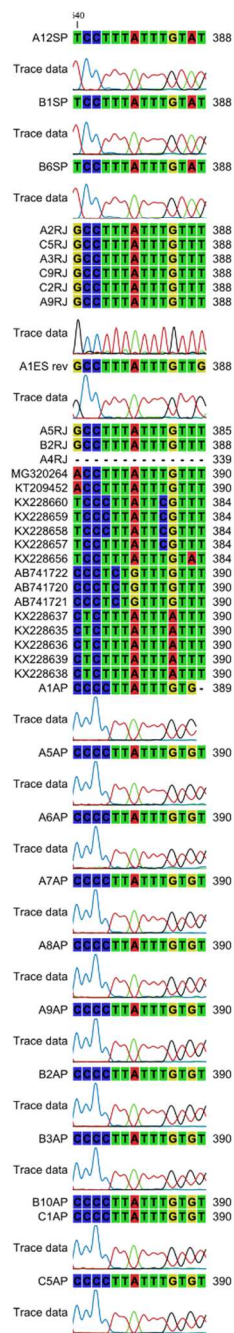


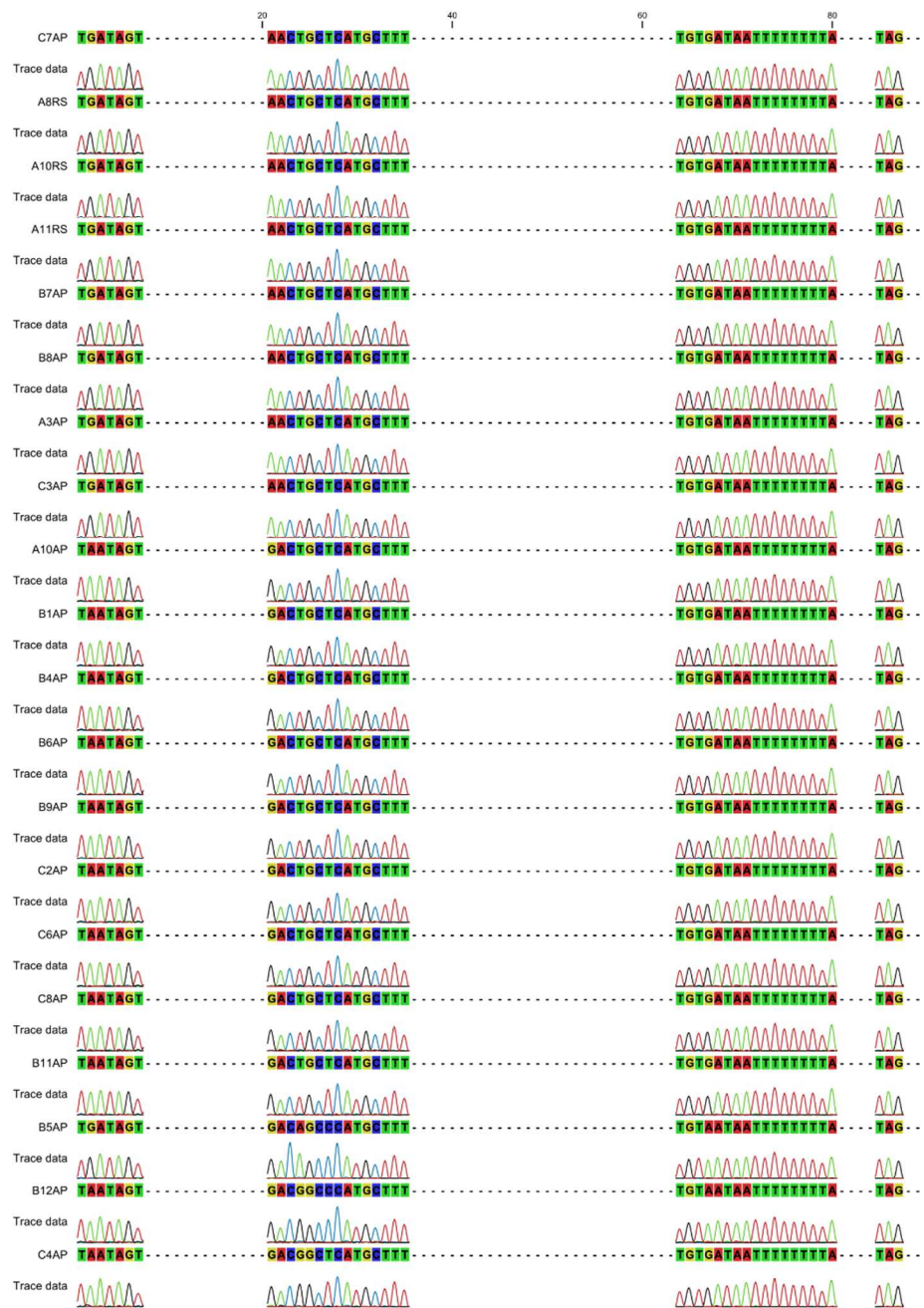






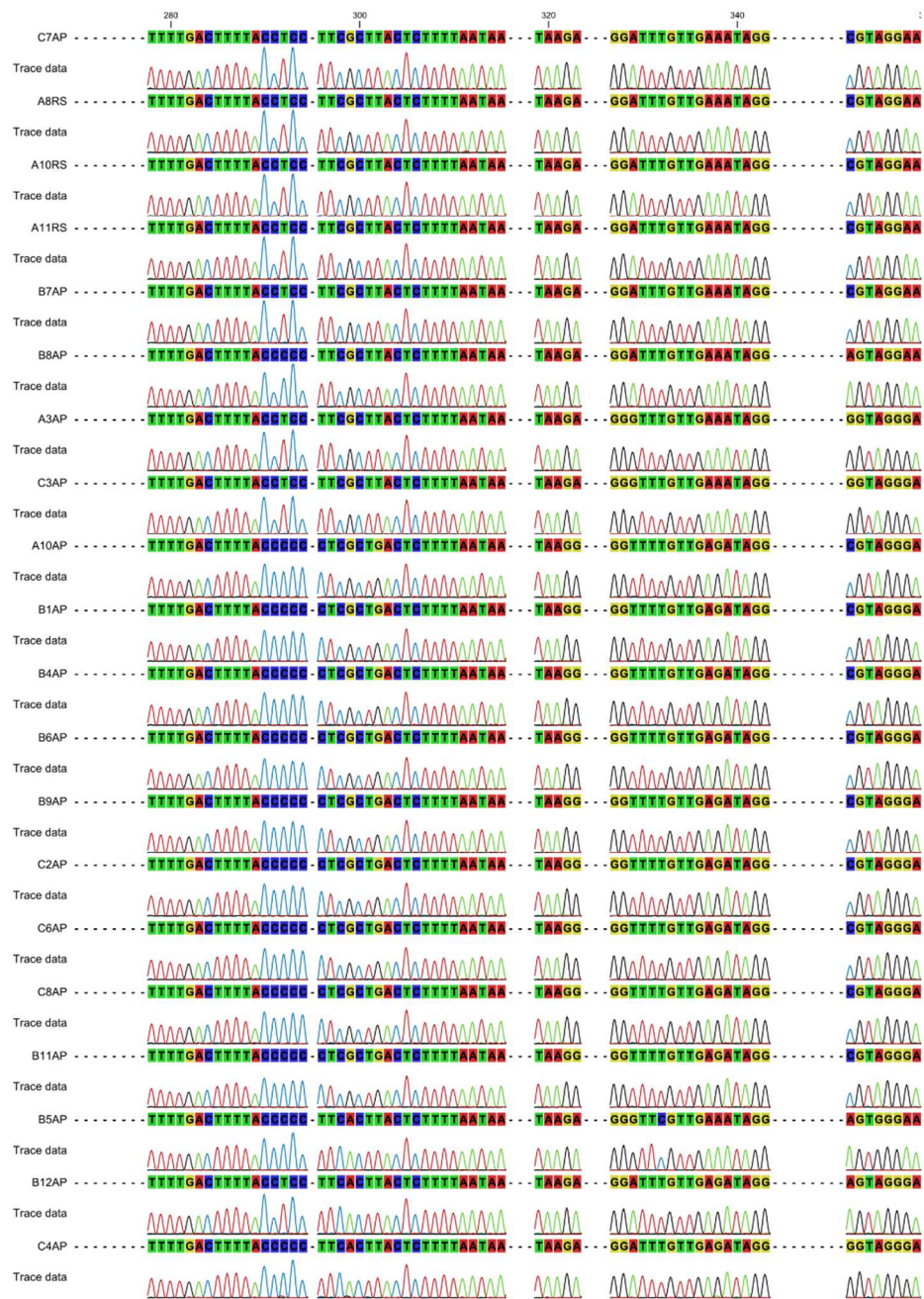


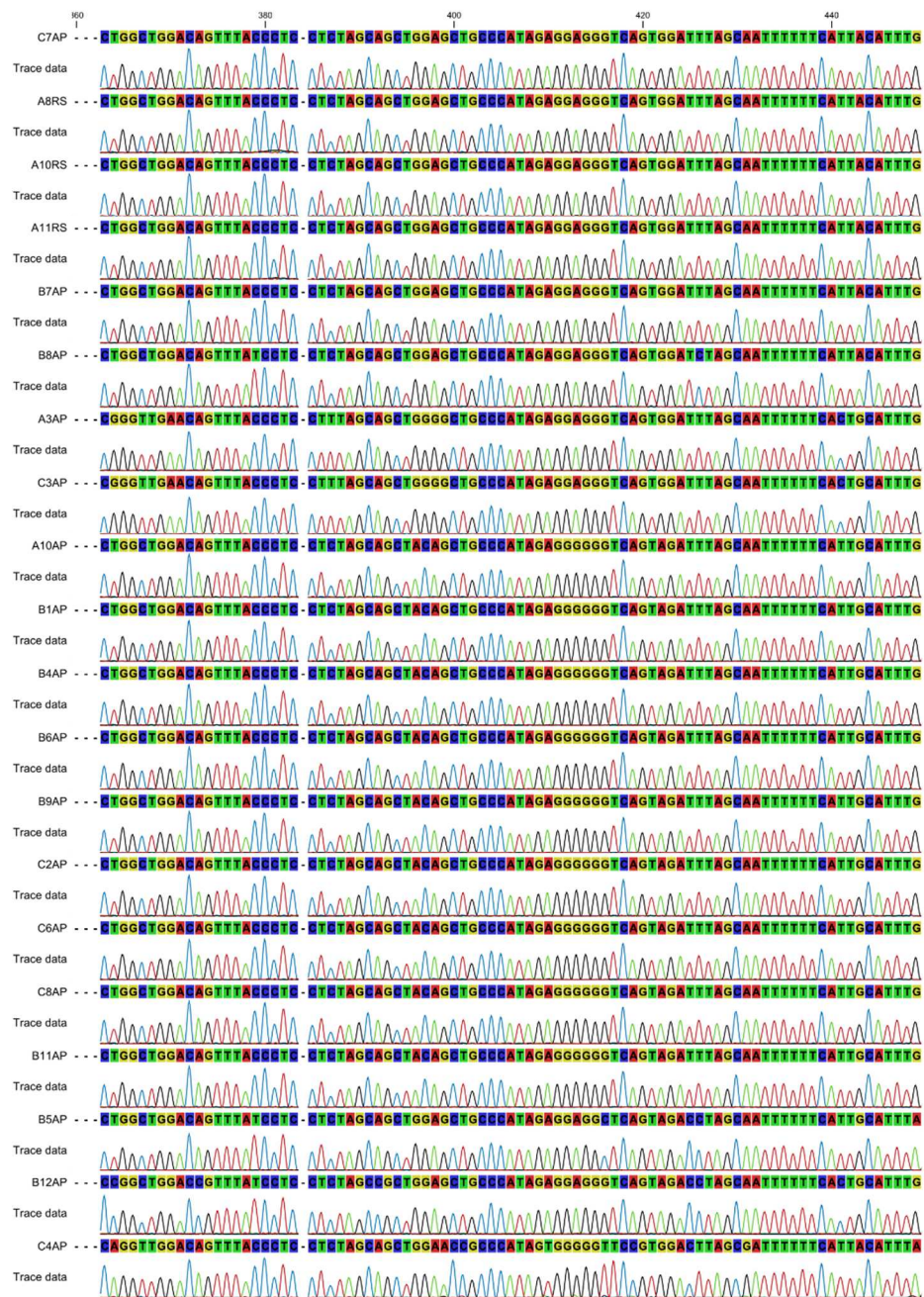


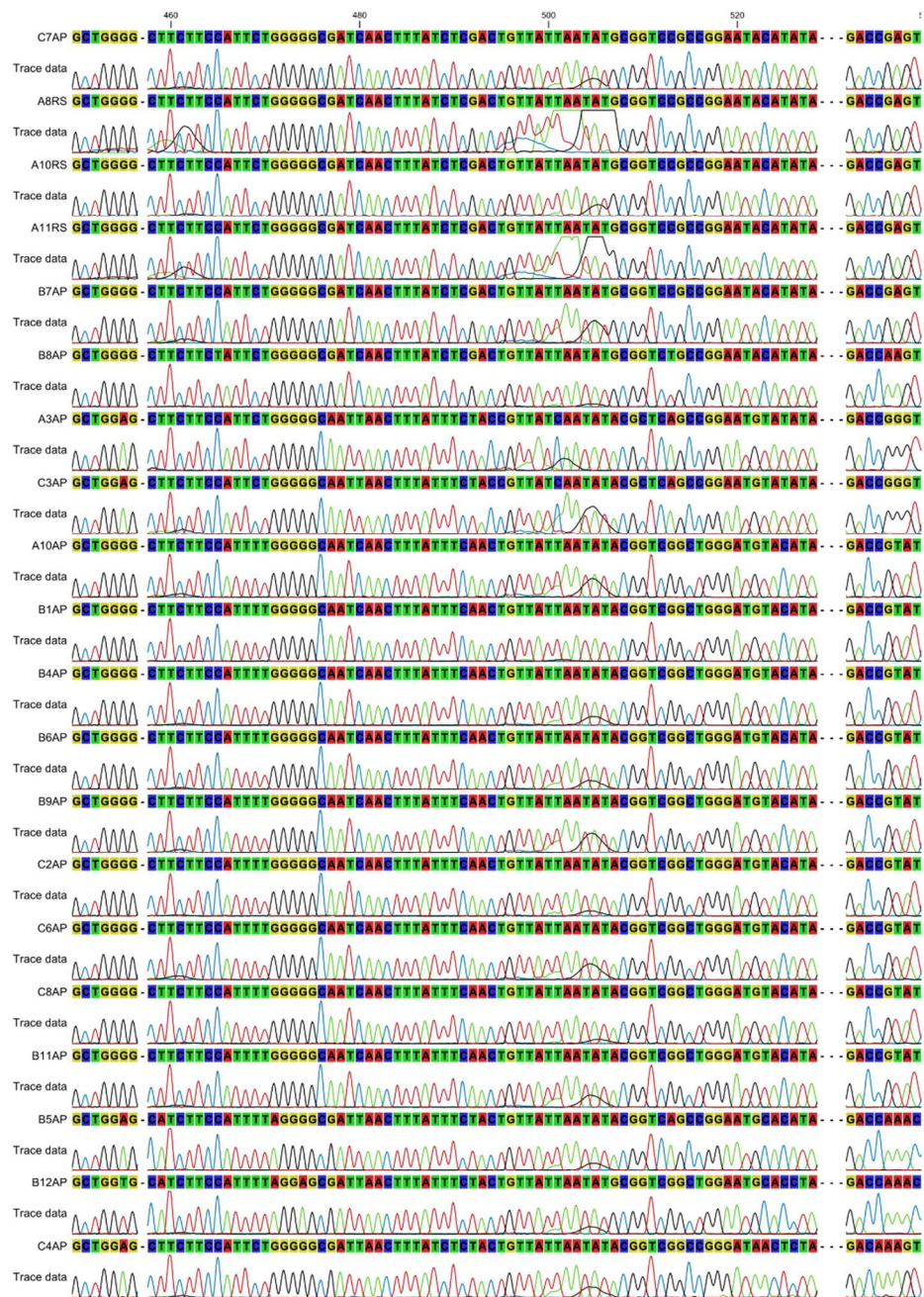


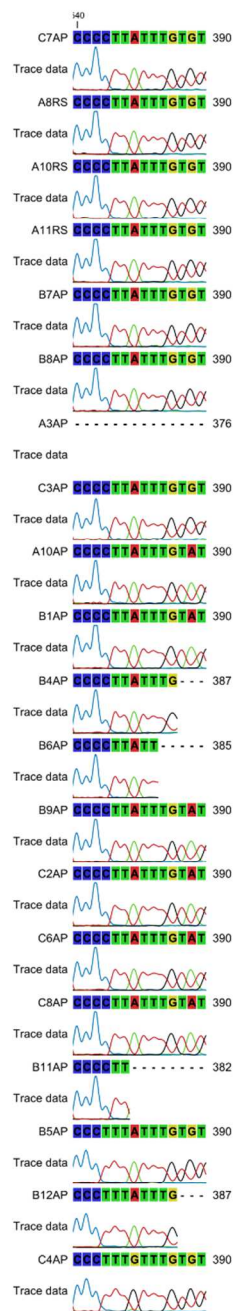


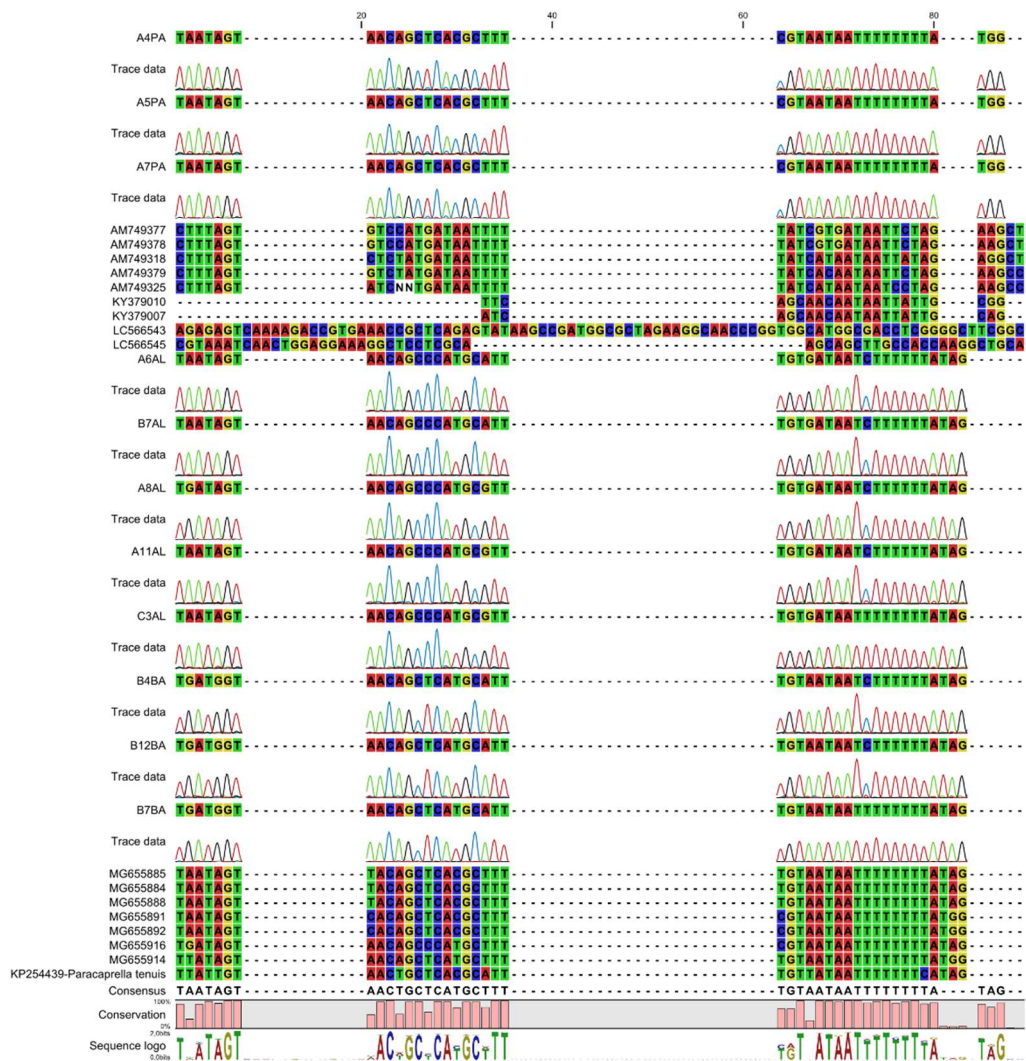


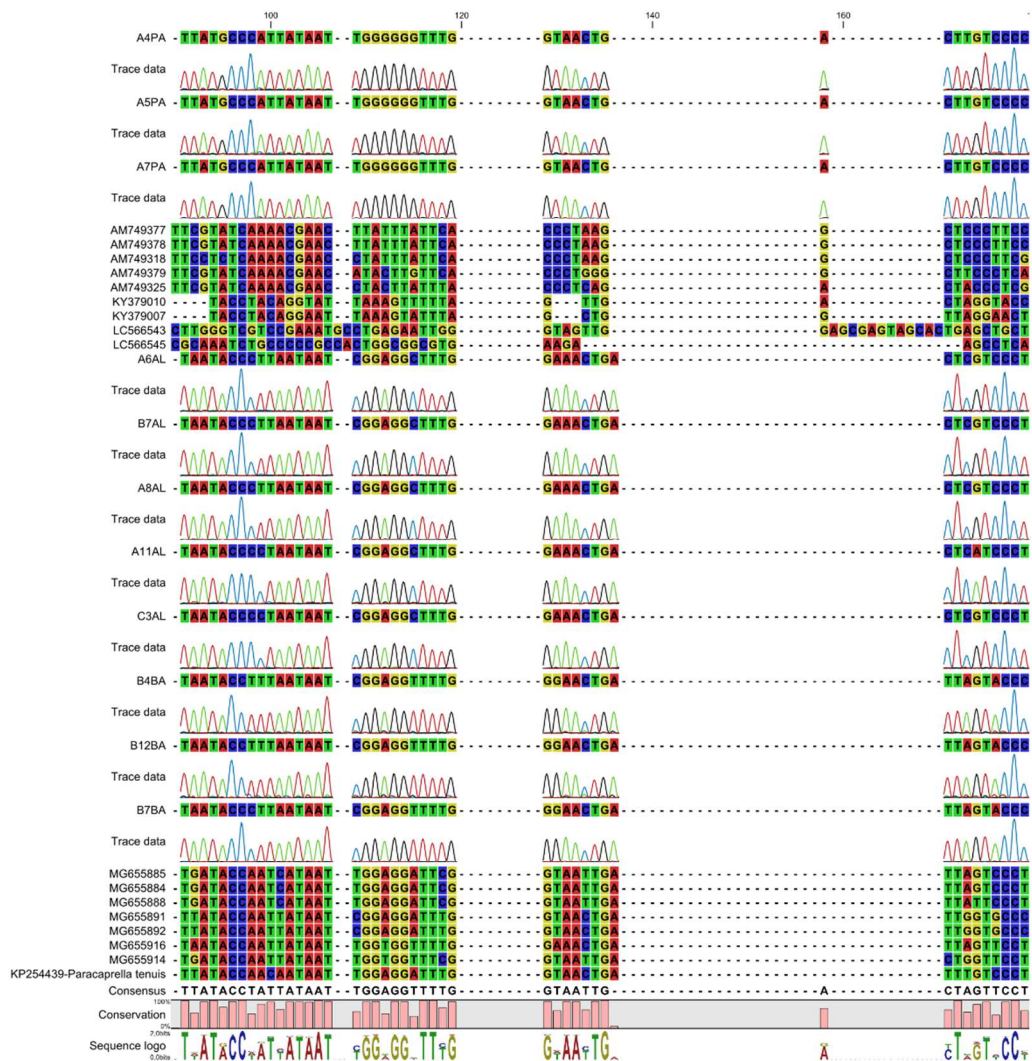


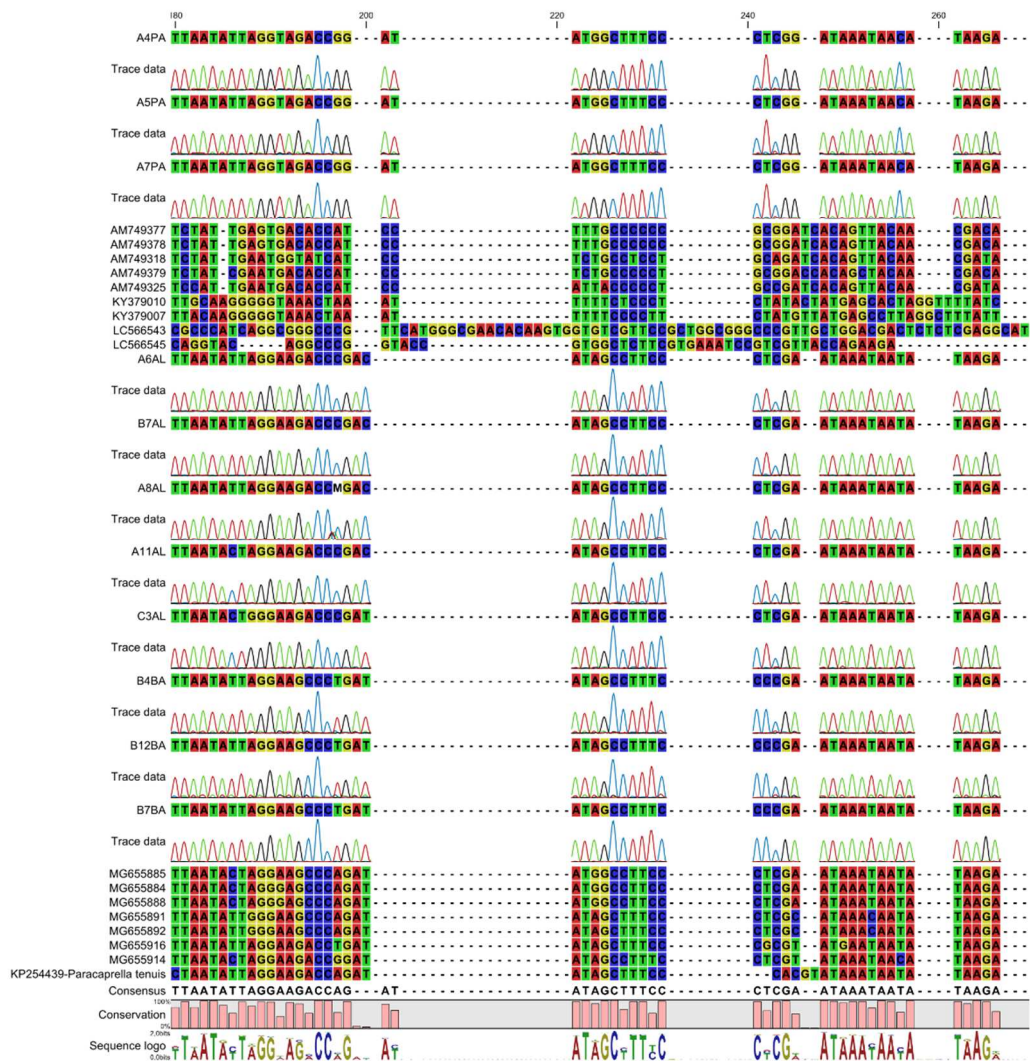


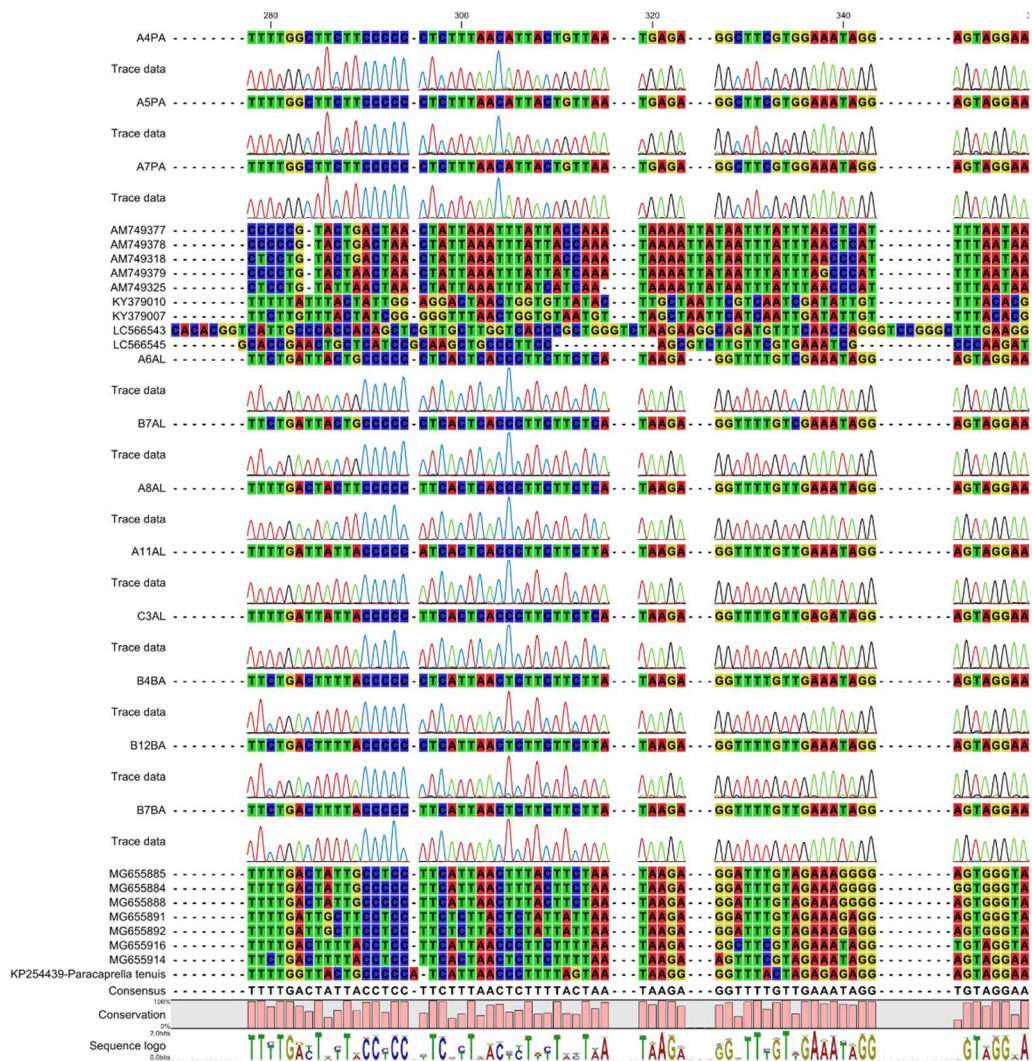


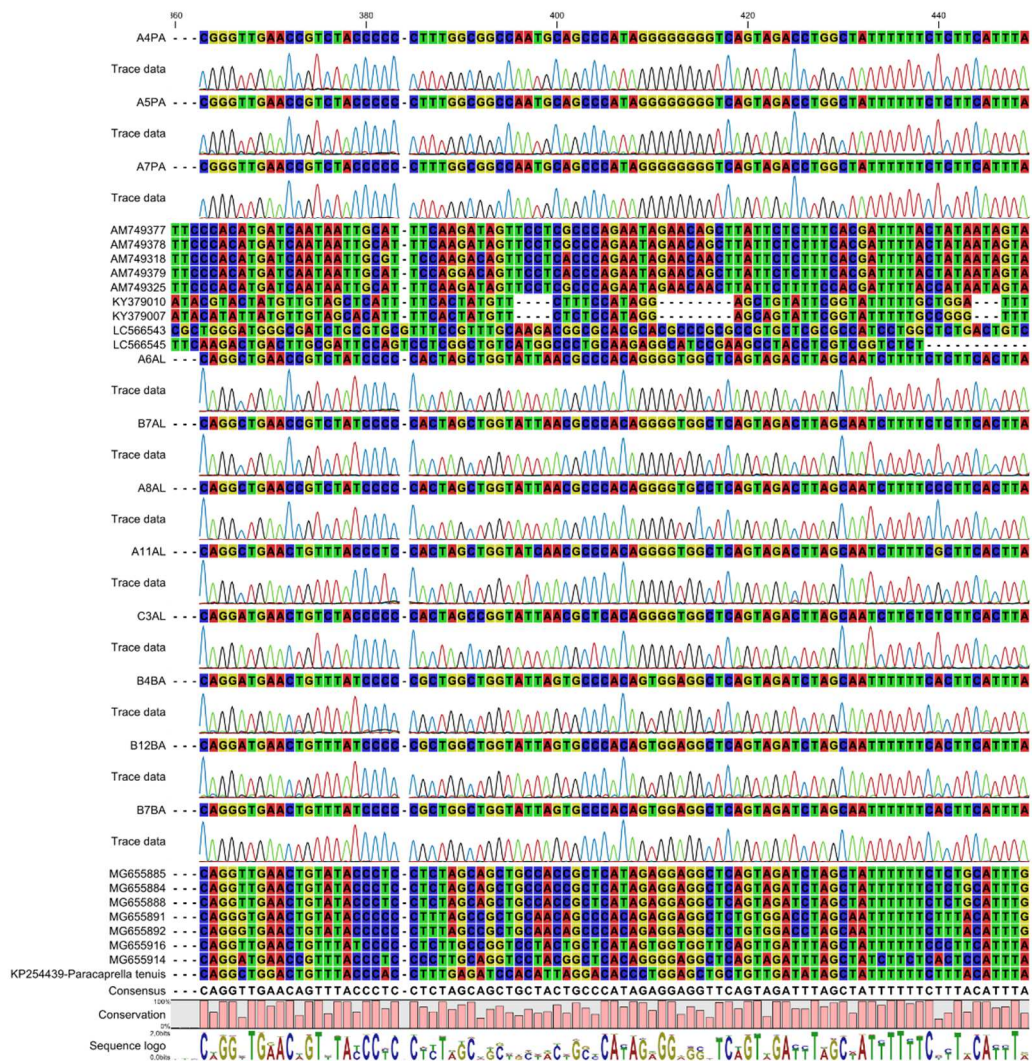


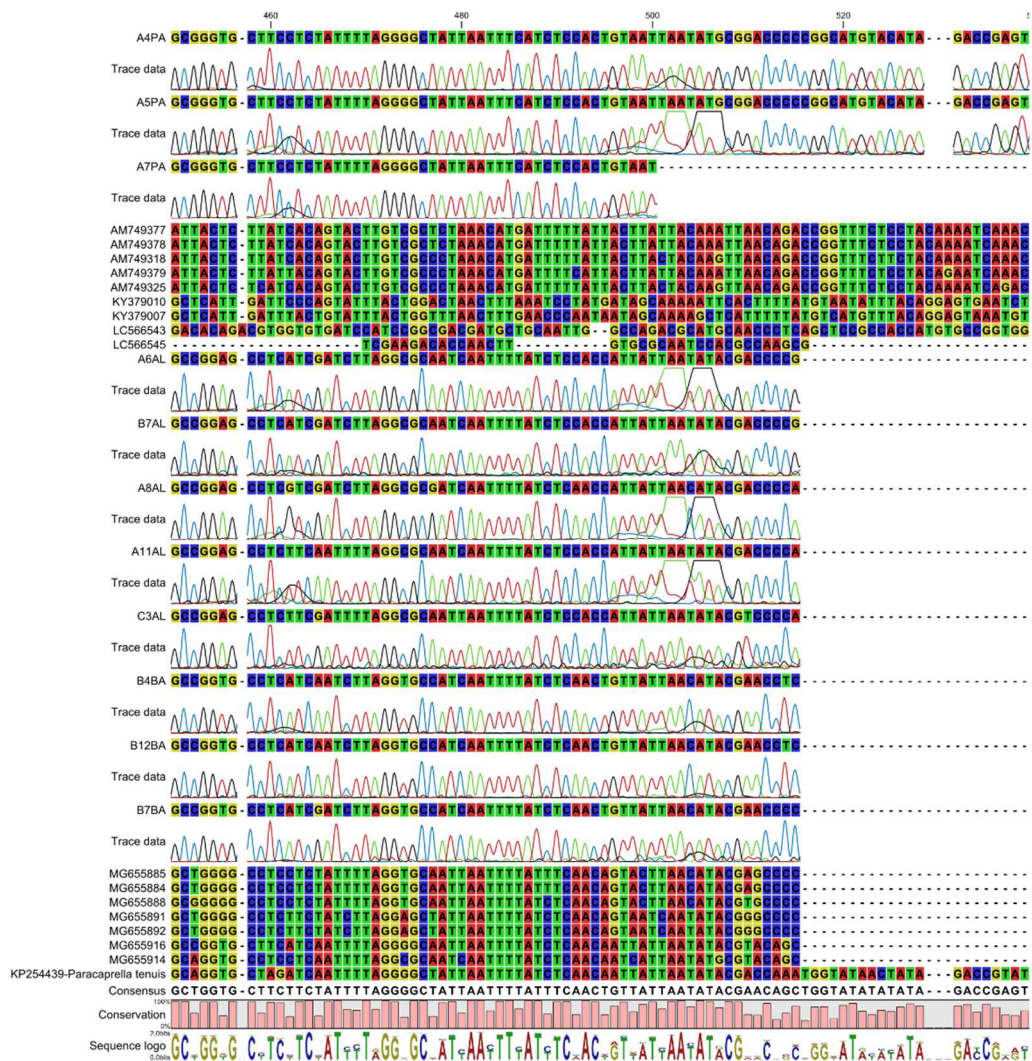








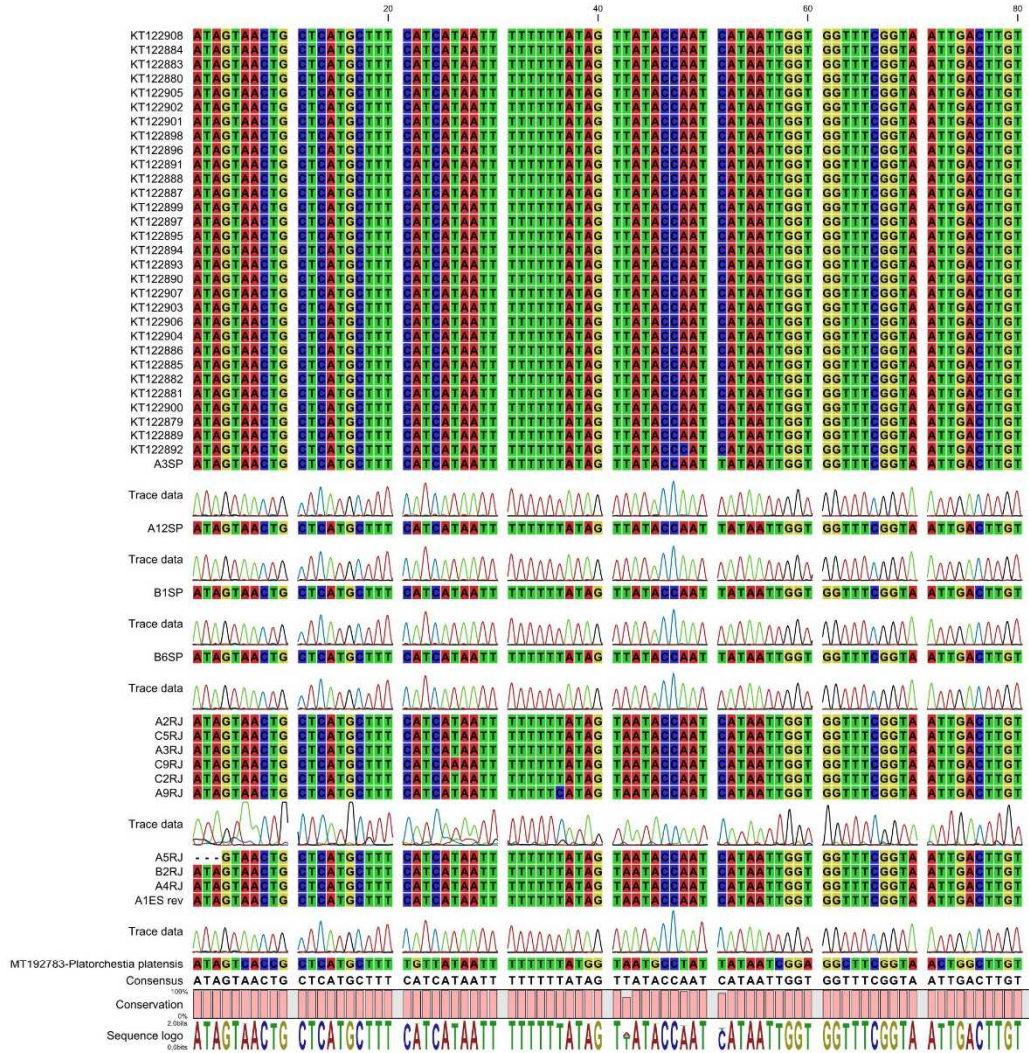


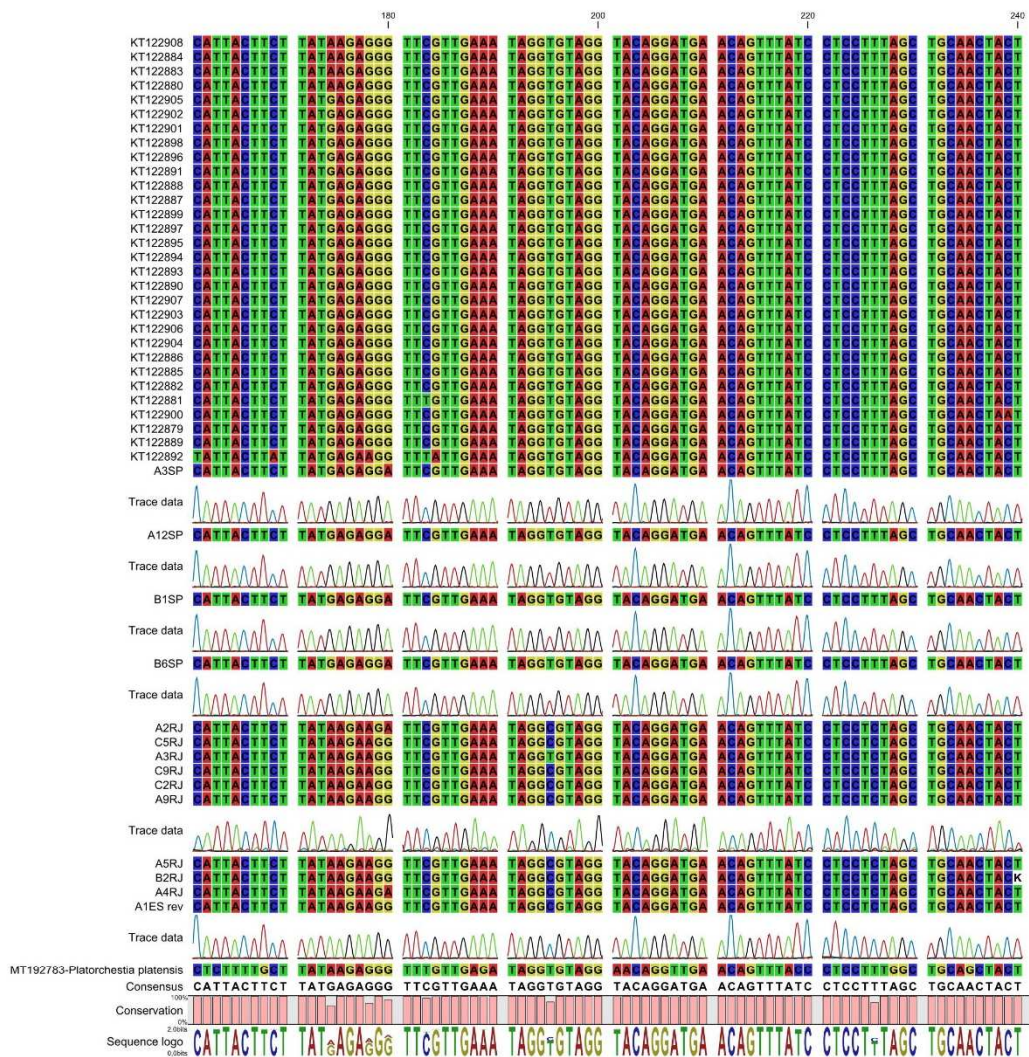


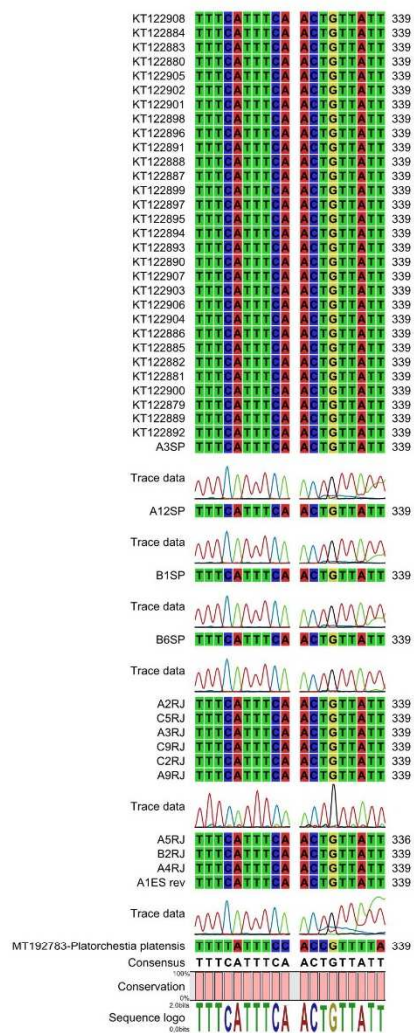


ANEXO III

Alinhamento Grupo Sudeste

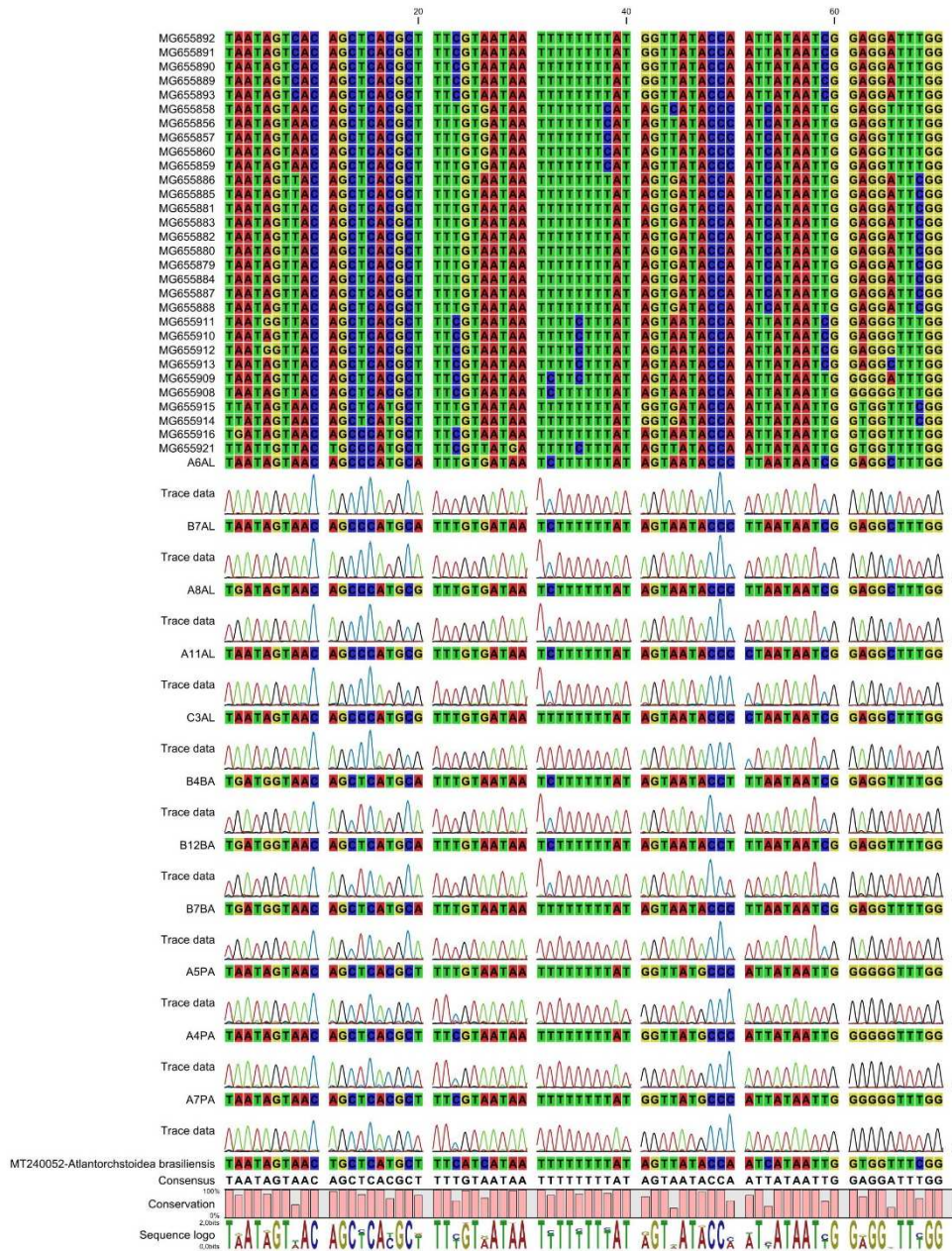


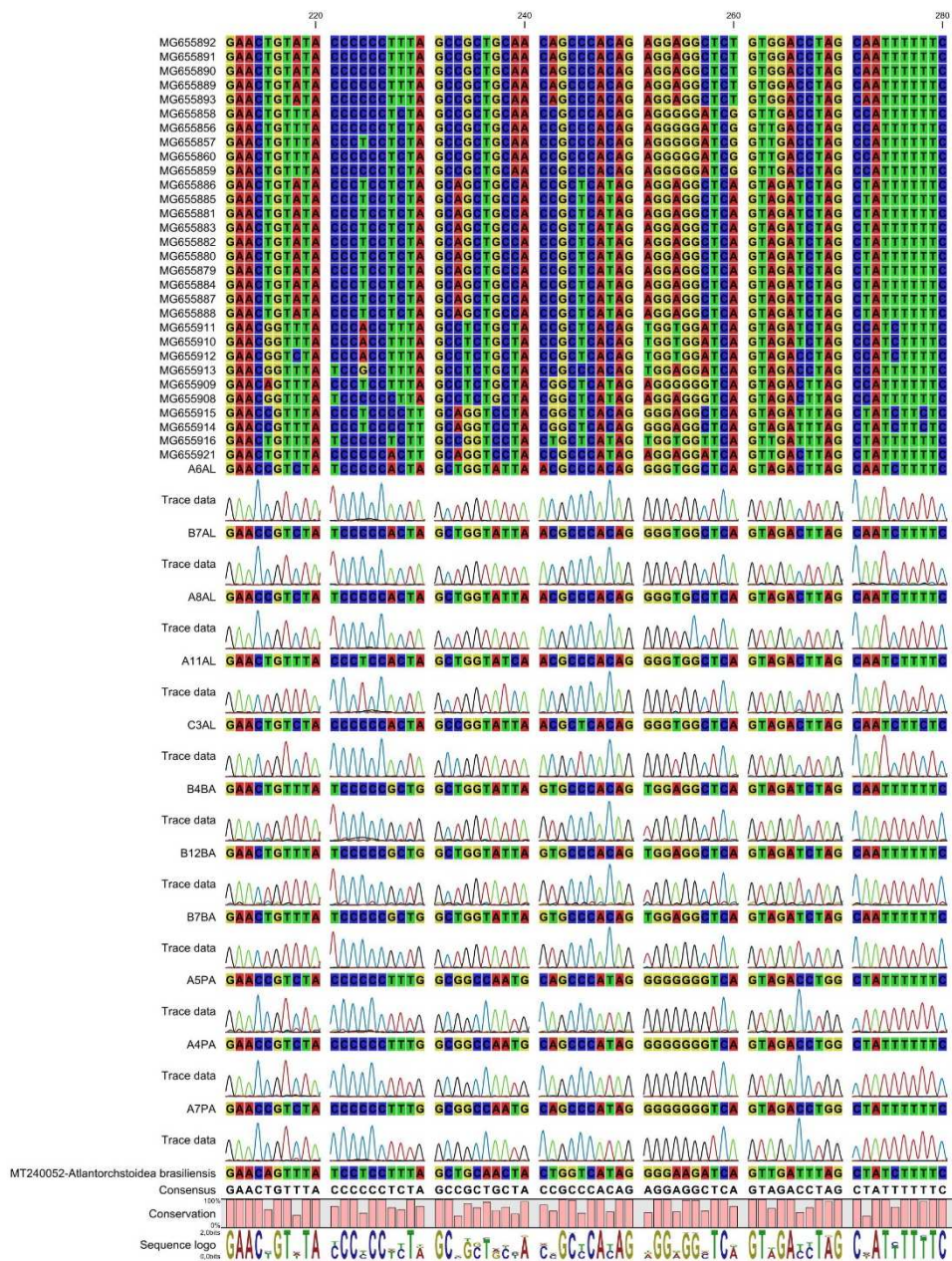


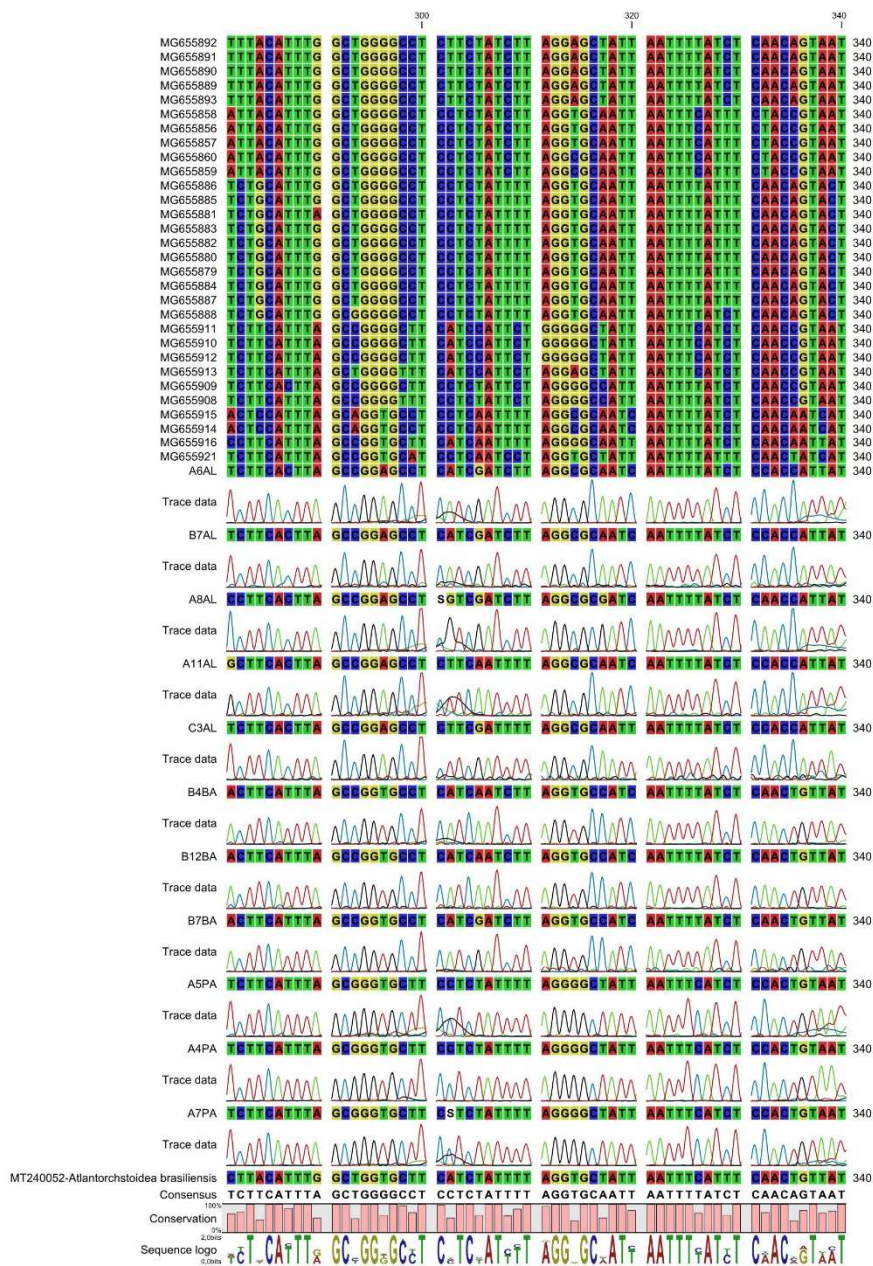


ANEXO IV

Alinhamento grupo Nordeste/PA

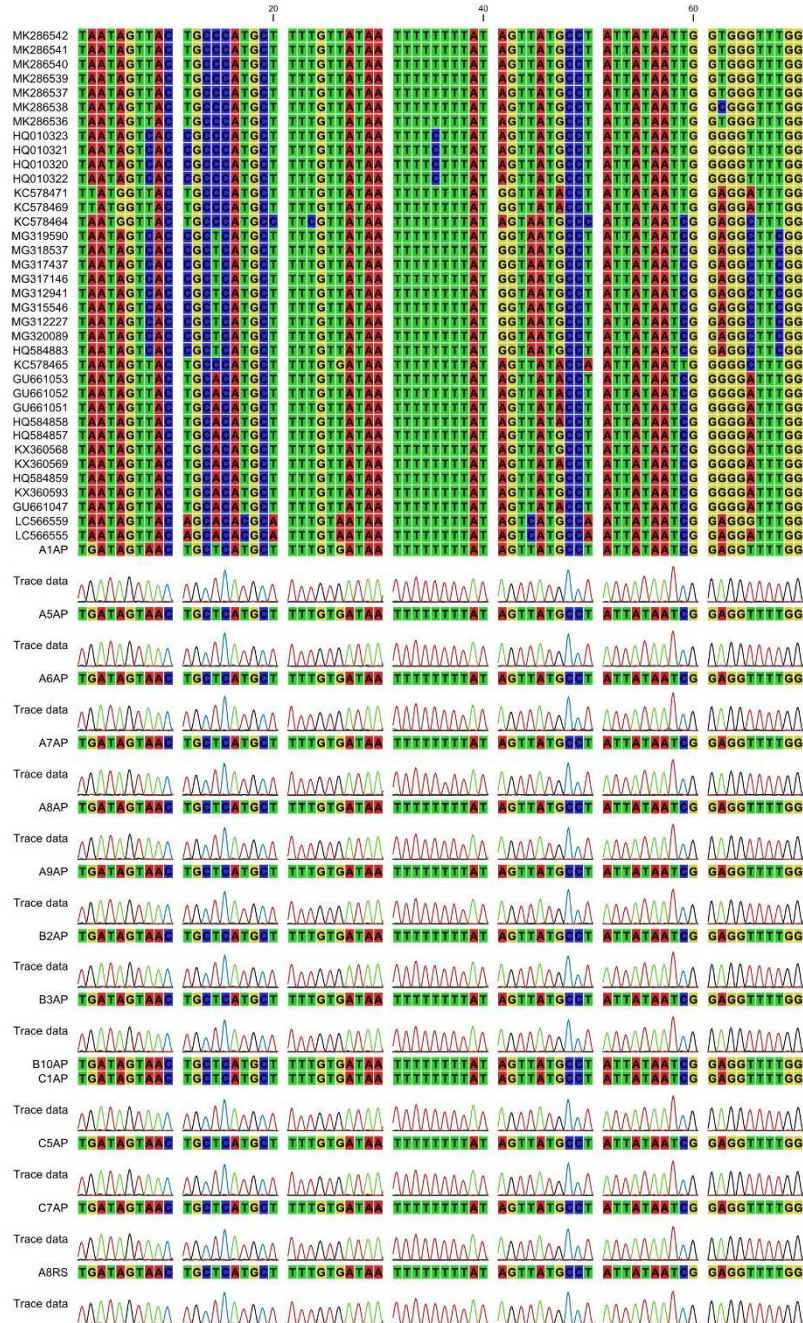


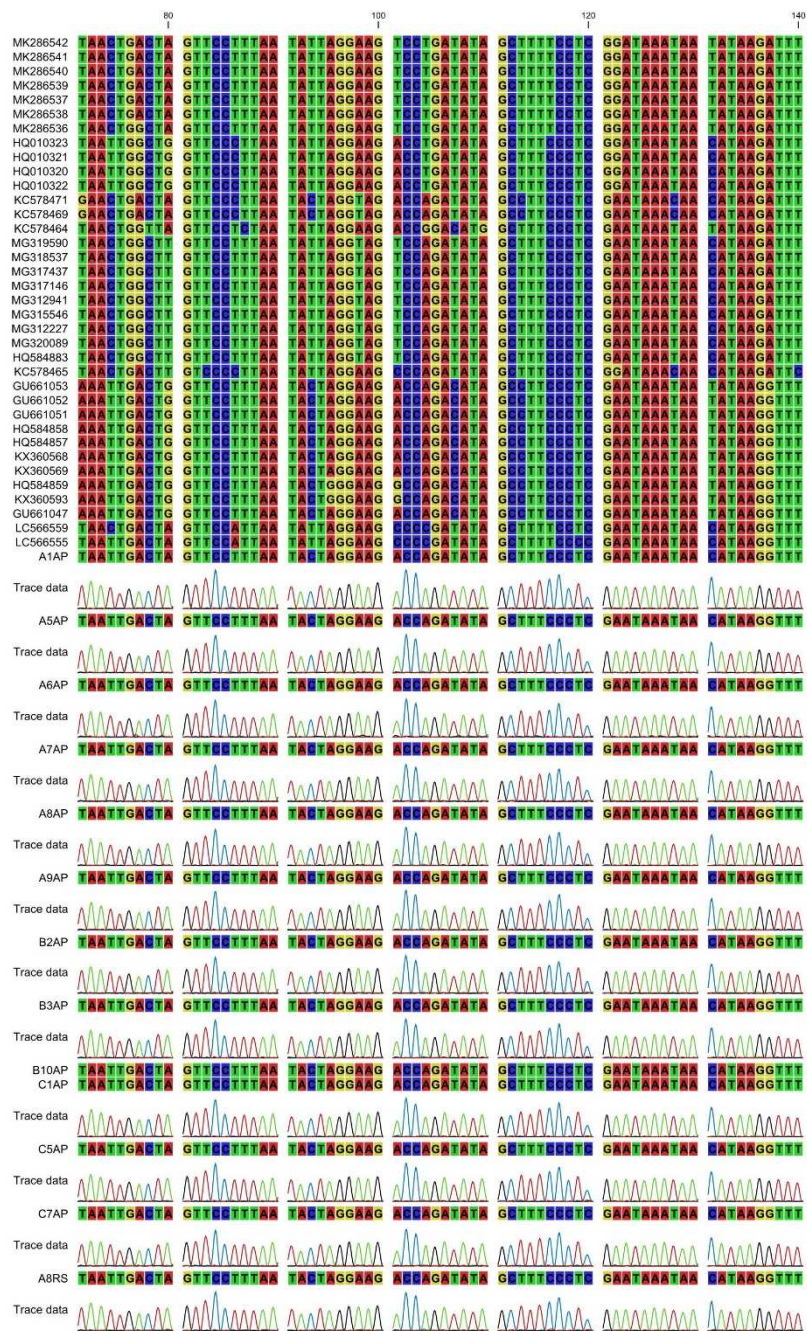




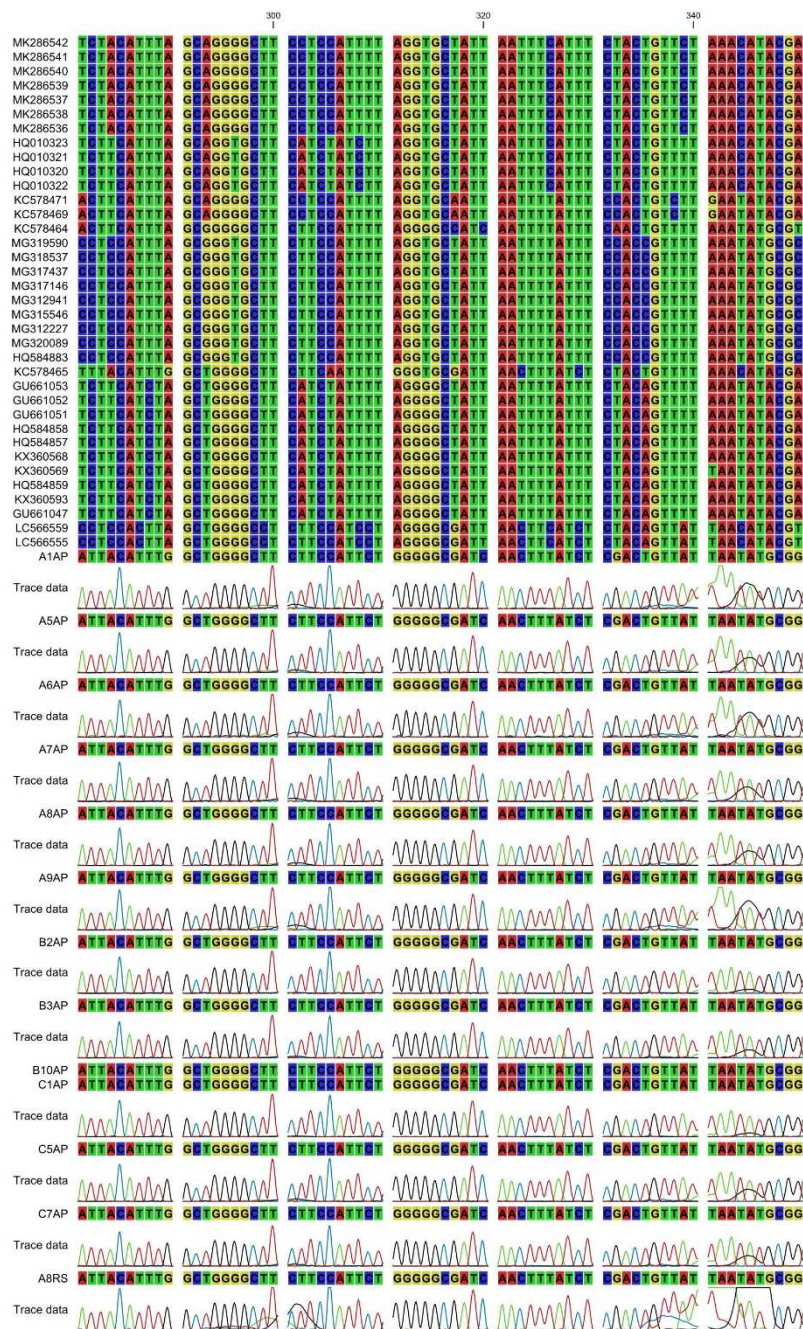
ANEXO VI

Alinhamento grupo AP/RS



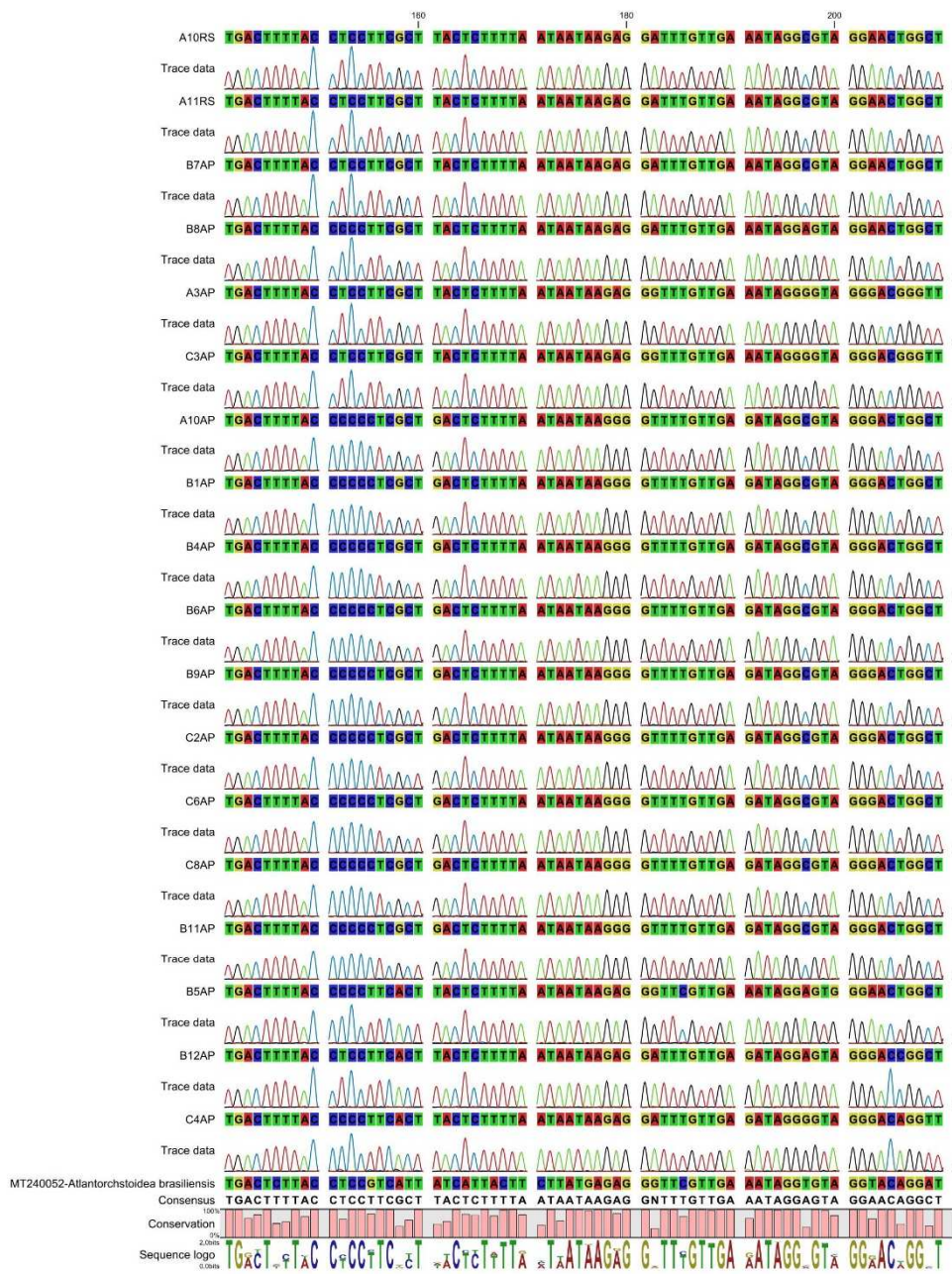


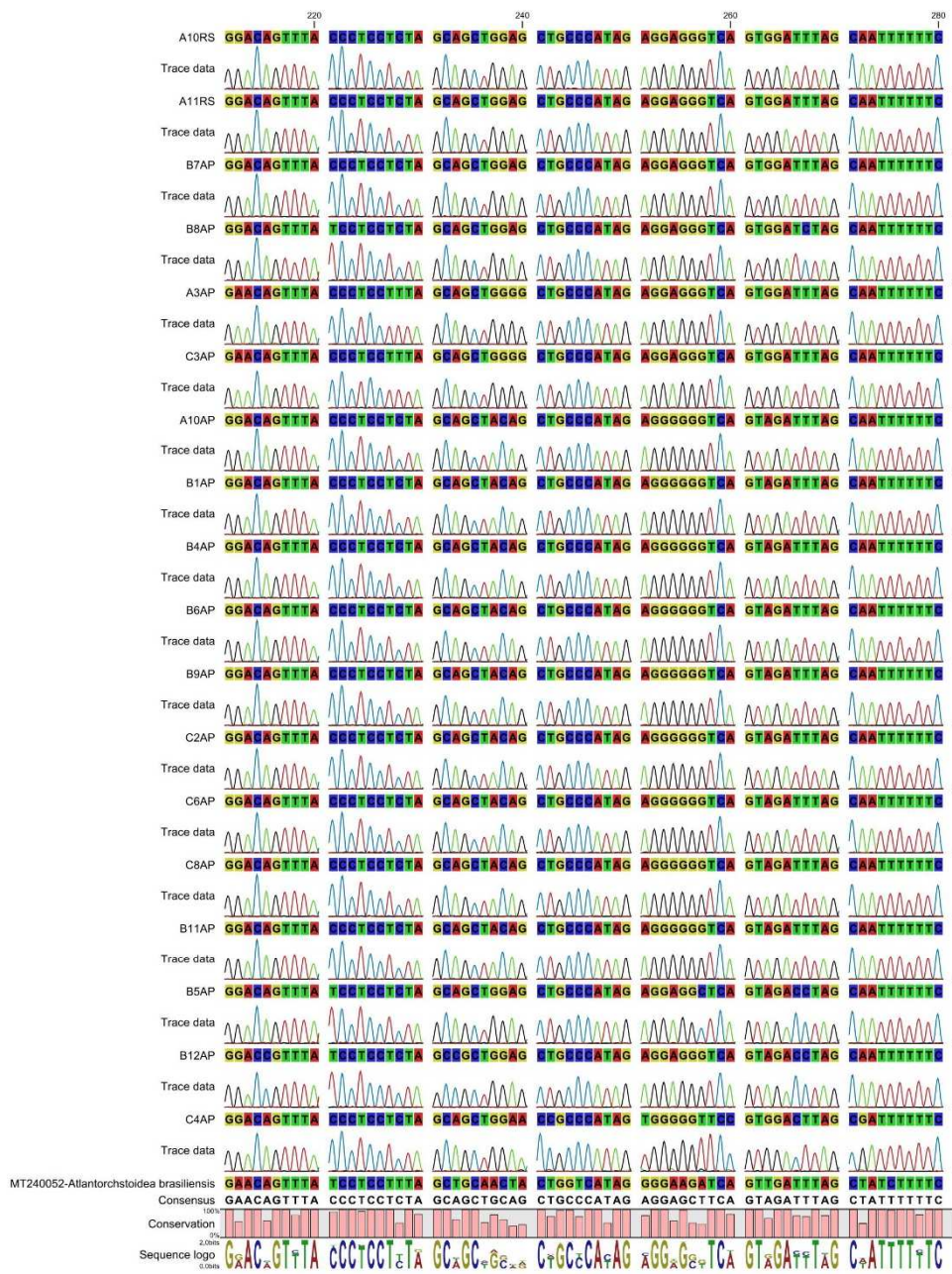


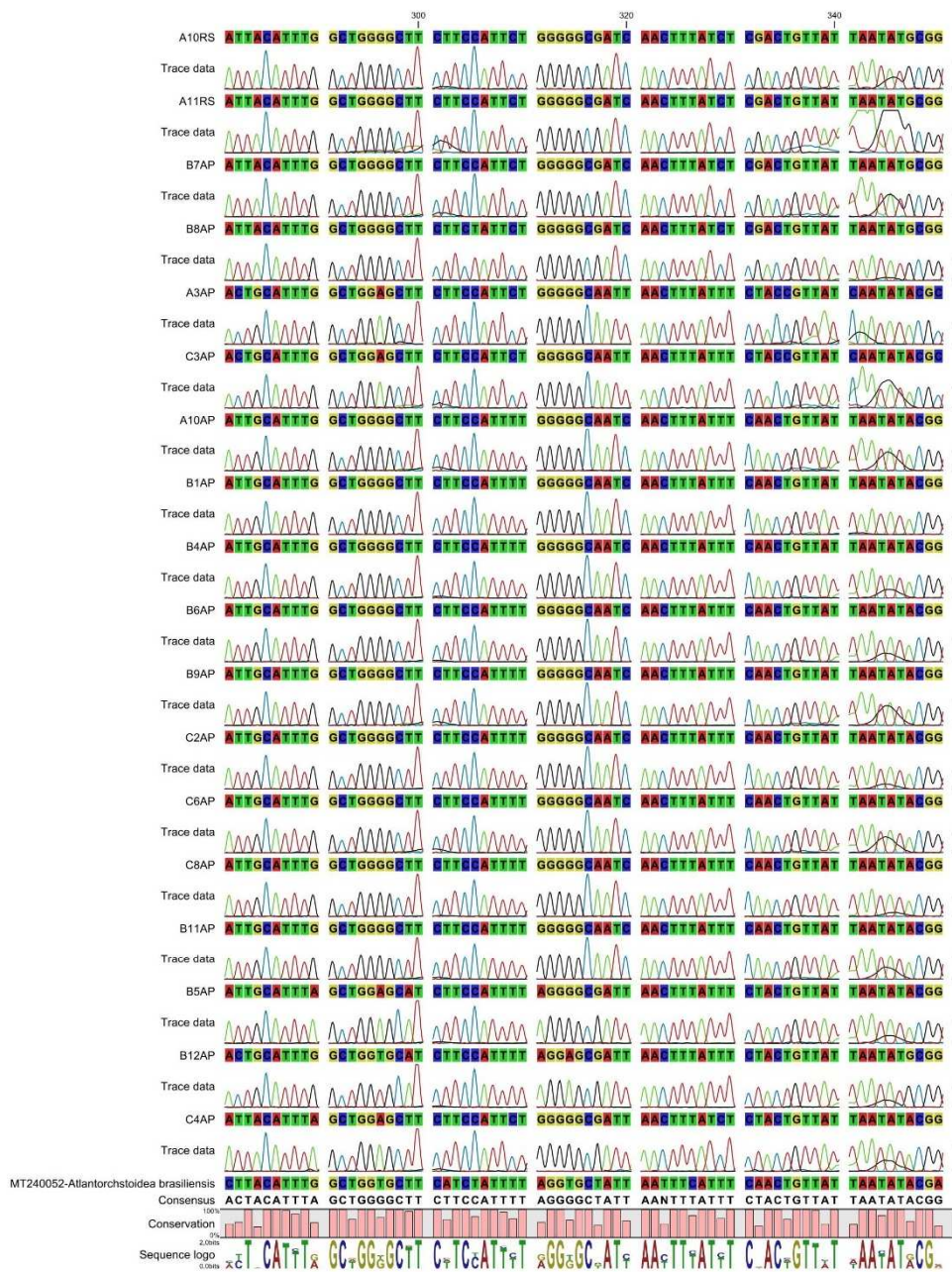


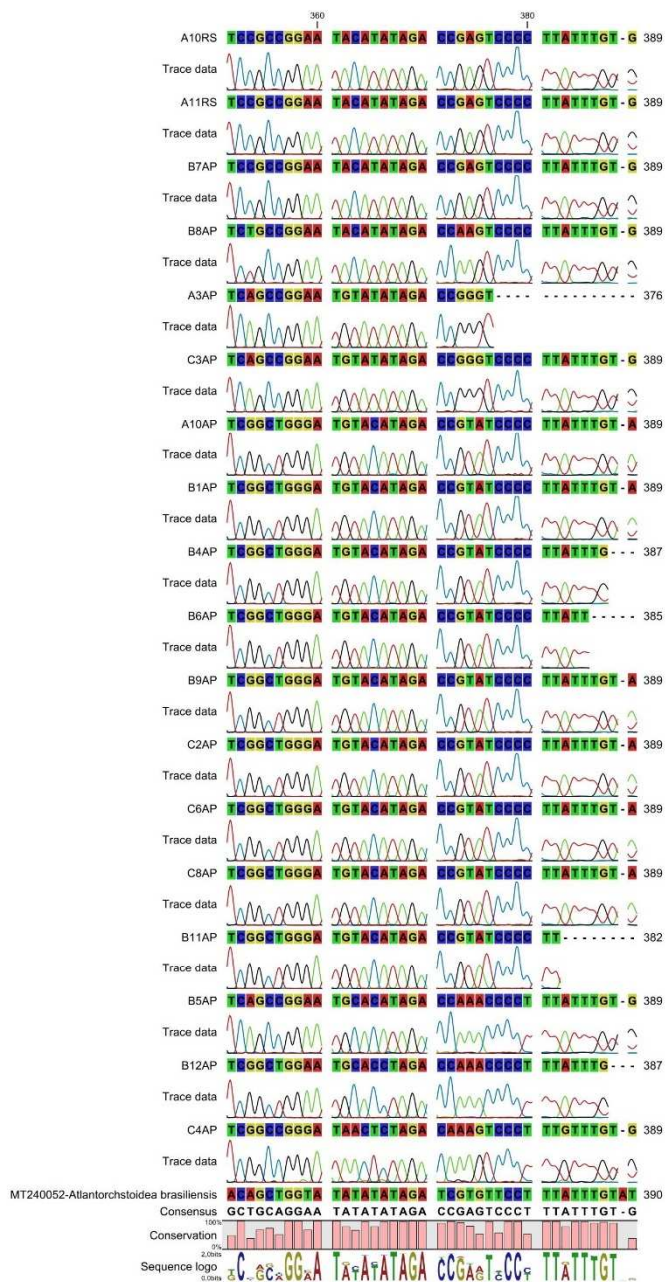














ATA 02/2022 DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO(A) MESTRANDO(A) GABRIEL NETO OLIVEIRA

Ao vigésimo oitavo dia do mês de janeiro do ano de dois mil e vinte e dois, às 14h horas, por vídeoconferência através do link <https://meet.google.com/uug-trje-kzg> realizou-se a defesa da dissertação do acadêmico **GABRIEL NETO OLIVEIRA**, do Programa de Mestrado em Ciências da Saúde - PPGCS. A Comissão Examinadora da defesa da dissertação, obedecendo ao disposto no Regimento Interno do PPGCS, foi constituída pelos Doutores: Dra. Maíra Pombo, Orientador(a) e Presidente sem direito à avaliação, Dra. Camila Malta Romano (USP), Dr. Fernando Lucas de Melo (UnB) e Rafael Lima Resque (PPGCS-UNIFAP). O tema arguido foi: **“CARACTERIZAÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DE TALITRÍDEOS (CRUSTACEA: AMPHIPODA) AO LONGO DO LITORAL BRASILEIRO”** Após apresentação e arguição, o mestrando respondeu às perguntas formuladas e, posteriormente, a Comissão Examinadora reuniu-se para proceder à avaliação, sendo atribuídos os seguintes pareceres (aprovado/reprovado): Dra. Camila Malta Romano - *aprovado*, Dr. Fernando Lucas de Melo - *aprovado* e Dr. Rafael Lima Resque - *aprovado*. Assim sendo, a Comissão Examinadora APROVOU a dissertação do aluno **Gabriel Neto Oliveira**, ressaltando as considerações abaixo. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão Examinadora deu por encerrado os trabalhos, sendo lavrada e conferida a presente ata, que depois de lida e achada conforme, vai devidamente assinada por quem é de direito.

Considerações da banca:

Dra. Maíra Pombo
Presidente

Dra. Camila Malta Romano
Membro Externo

Dr. Fernando Lucas de Melo
Membro Externo

Dr. Rafael Lima Resque
Membro Titular

Gabriel Neto Oliveira

Mestrando