

DISSERTAÇÃO

ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DO POLVO *ELEDONE MASSYAE* (CEPHALOPODA: OCTOPODIDAE) NA COSTA SUL E SUDESTE DO BRASIL

Marina Mills Mattioli

Orientador:

Prof. Dr. Fernando Fernandes Mendonça

Co-orientador:

Prof. Dr. Acácio Ribeiro Gomes Tomás

BOTUCATU-SP
2016

MARINA MILLS MATTIOLI

**ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DO POLVO *ELEDONE*
MASSYAE (CEPHALOPODA: OCTOPODIDAE) NA COSTA SUL E SUDESTE
DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fernandes Mendonça

Co-orientador: Prof. Dr. Acácio Ribeiro Gomes Tomás

BOTUCATU-SP
2016

Mattioli, Marina Mills

Estrutura Genética Populacional do Polvo Eledone Massyae (Cephalopoda: Octopodidae) na costa sul e sudeste do Brasil / Marina Mills Mattioli. – Botucatu, 2016. 43f.

Dissertação de mestrado (Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia)) - Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, 2016.

Orientadora: Profª Drª Fernando Fernandes Mendonça

Coorientador: Profª Drª Acácio Ribeiro Gomes Tomás

1.populacional; 2.genética; 3.DNA; 4.COI; 5.eledone massyae; 6.conservação.

CDD

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARINA MILLS MATTIOLI

ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DO POLVO *ELEDONE* *MASSYAE* (CEPHALOPODA: OCTOPODIDAE) NA COSTA SUL E SUDESTE DO BRASIL

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fernandes Mendonça

Co-orientador: Prof. Dr. Acácio Ribeiro Gomes Tomás

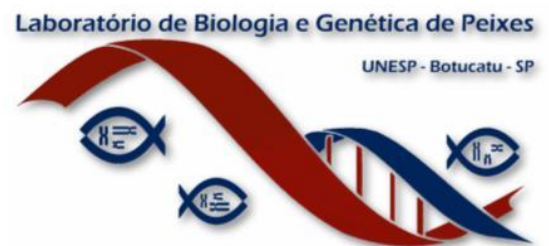
A banca examinadora da dissertação, em sessão pública realizada em ____/____/____, considerou o candidato:

1) Examinador:

2) Examinador:

3) Examinador:

4) Presidente:



*“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas;
é quem faz as verdadeiras perguntas”.*
(Claude Lévi-Strauss)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, meus irmãos Murilo e Marília e meus pais Grace e Carlos, por serem minha maior inspiração.

Em especial, agradeço muito meu marido, Victor Carrozza Barcellini, biólogo marinho, melhor amigo e grande parceiro em todos os momentos, por, além de me incentivar muito, contribuir sempre com seu grande conhecimento e paixão pela Biologia.

Agradeço também ao meu orientador Fernando Fernandes Mendonça, co-orientador Acácio Ribeiro Gomes Tomás e a todos os parceiros de laboratório, principalmente a Juliana (Jubs), por me passar todos os passos necessários para que eu chegasse até aqui.

Deixo também registrado meus agradecimentos à Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho com profissionais especializados e reconhecidos, à Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, por disponibilizar sua estrutura para que o projeto pudesse acontecer em Santos – SP e ao Instituto de Pesca pela grande contribuição nas coletas e principalmente no acesso as informações de cada embarcação.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ e, também, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio durante todo o período de desenvolvimento do projeto.

Muito obrigado!

Resumo

Embora o manejo de recursos tradicionalmente explorados tenha um histórico de aproximadamente um século de pesquisas, os primeiros estudos do ciclo de vida de cefalópodes foram iniciados pouco antes da década de 60 apresentando ainda muitas lacunas a serem investigadas. Com cerca de 87% dos recursos explorados ou sobreexplorados, a atividade pesqueira marinha enfrenta uma grave crise, podendo tornar-se em poucos anos uma atividade economicamente inviável sobre diversos estoques, além de comprometer a sustentabilidade do ambiente marinho. Os polvos do gênero *Eledone* englobam espécies bentônicas de pequeno a médio tamanho e sua distribuição geográfica concentra-se na costa sudeste da América do Sul começando no Brasil e chegando até a Argentina. Haplótipos de DNA mitocondrial (mtDNA) apresentam distribuição geográfica determinada em diversas espécies, tornando possível correlacionar uma dimensão filogenética com estruturas de populações, levando ao conceito de filogeografia. A partir dos fatos apresentados, este trabalho visou caracterizar a biodiversidade molecular, a estrutura populacional, e a identificação e distribuição dos estoques genéticos da espécie *E. massyae*, utilizando sequências do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) do mtDNA. Para isso, foram obtidas 133 amostras do litoral do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. A partir dos 602 pares de bases sequenciados, foram identificados 20 sítios polimórficos, originando 15 haplótipos. A diversidade haplotípica total foi de $H_d = 0,3021$ e diversidade nucleotídica $\pi = 0,00105$, mostrando uma diversidade relativamente alta. A Análise de Variância Molecular (AMOVA), apontou nível moderado de estruturação ($F_{ST} = 0,0784$ $p = 0,000001$) entre a região Sul e Sudeste. Diante disso, hipóteses relacionadas a influência da pluma do Rio da Prata e da Água Central do Atlântico Sul que ressurge na plataforma continental da região de Cabo Frio (RJ), são discutidas como um potencial determinante na estruturação destas populações. O presente estudo fornece assim, um melhor entendimento da dinâmica de dispersão, fluxo gênico e diversidade genética para que planos de conservação e manejo sejam propostos de maneira assertiva e de fato, alcancem níveis satisfatórios na preservação dos estoques naturais do *E. massyae*.

Palavras-chave: Populacional, Genética, DNA, COI, *Eledone massyae*, Conservação.

Abstract

Although the management of resources traditionally exploited has a history of nearly a century of research, first studies of cephalopod life cycle were started just before the 60s still presenting many gaps to be investigated. With about 87% of the resources exploited or overexploited, the marine fishing industry faces a serious crisis, may become in a few years an economically unviable activity on several stocks, in addition to compromising the sustainability of the marine environment. Octopuses from the *Eledone* genus include benthic species of small to medium size and its geographical distribution is concentrated on the southeast coast of South America starting in Brazil and coming to Argentina. Haplotype of mtDNA from populations presents a determined geographic distribution in many species, making it possible to introduce a phylogenetic dimension in discussions related to population structure, leading to the concept of phylogeography. From the facts presented, this study aimed to characterize the molecular biodiversity, population structure and the identification and distribution of the *E. massyae* genetic stocks in the study areas, using sequences of Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) from mitochondrial DNA (mtDNA). For this, 133 samples were obtained from the states of Rio de Janeiro, São Paulo and Paraná. There were obtained 602 base pairs, 20 polymorphic sites and 15 haplotypes. Total haplotype diversity was $H_d = 0.3021$, nucleotide equal to $\pi = 0.00105$, showing a high diversity, as well as other species of octopus. The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) showed moderate level of structure ($F_{ST} = 0.0784$, $P = 0.00000$) between the South and Southeast. Thus, hypotheses concerning the influence of the plume from the Prata River and the resurgence of the South Atlantic Central Water in areas on the continental shelf in the region of Cabo Frio are discussed in order to better understand the dynamics in the dispersal and gene flow to better propose management and conservation plans that indeed achieve satisfactory levels in the preservation of natural stocks of *E. massyae*.

Keywords: Population, genetics, DNA, COI, *Eledone massyae*, Conservation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Pesca Marinha – Exploração	1
1.2 Pesca Marinha – Comércio	3
1.3. Classe, gênero e a espécie <i>Eledone massyae</i>	4
1.4. Biologia Molecular e Conservação de Espécies	8
2. OBJETIVO.....	10
2.1. Objetivos específicos.....	10
3. Material e Métodos	11
3.1. Área de Estudo.....	11
3.2. Obtenção das amostras	12
3.3. Protocolos para extração, amplificação e sequenciamento do DNA.....	13
3.4. Análises genético-populacionais	14
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO	20
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
7. REFERÊNCIAS	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de <i>E. massyae</i> (Fonte: Própria autora).....	7
Figura 2. Distribuição Geográfica da Espécie <i>E. massyae</i> . Fonte: FAO (2016).	7
Figura 3. Distribuição das áreas onde foram obtidos os exemplares de <i>Eledone massyae</i> (Elaborado pelo autora).	11
Figura 4. Identificação dos exemplares. Fonte: Própria autora.	12
Figura 5. Extração do tecido de <i>E. massyae</i> . Fonte: Própria autora.	12
Figura 6. Armazenamento do tecido em solução de etanol (95%). Fonte: Própria autora.	13
Figura 7. Rede de haplótipos do polvo <i>Eledone massyae</i> calculada pelo método Median-Joining. ...	18
Figura 8. Árvore de haplótipos do polvo <i>Eledone massyae</i> construída utilizando o método Neighbor-Joining, com modelo evolutivo e com 1000 réplicas de bootstrap.	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exportações brasileiras de polvo congelado (2001-2007).	3
Tabela 2. Exportações brasileiras de polvo congelado por unidade federativa (2001-2007).	4
Tabela 3. Sítios polimórficos localizados nos 15 haplótipos da espécie <i>Eledone massyae</i>	16
Tabela 4. Estatística populacional da espécie <i>Eledone massyae</i> (Legenda: n = número de indivíduos; P = sítios polimórficos; Nh = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica).	17
Tabela 5. Distribuição geográfica de haplótipos da espécie <i>Eledone massyae</i>	17
Tabela 6. Diferenciação genética (F_{ST}) entre os pares das regiões estudadas. Nível de significância de $p < 0,05$ (+).	18

1. INTRODUÇÃO

Embora o manejo de recursos tradicionalmente explorados tenha um histórico de aproximadamente um século de pesquisas (DIEGUES, 1983), os primeiros estudos do ciclo de vida de cefalópodes foram iniciados pouco antes da década de 60 apresentando ainda muitas lacunas a serem investigadas (CADDY, 1983). De maneira geral, conhecimentos básicos sobre a composição específica das capturas das diversas artes de pesca e a estrutura das populações por tamanho, sexo e aspectos da reprodução também foram pouco abordados. Apesar dos estudos relacionados à distribuição, reprodução e alimentação nas regiões Sul (PEREZ, 1990; PEREZ et al., 1990; PEREZ e HAIMOVICI, 1991; PEREZ et al., 1997), morfologia do sistema reprodutor e maturação sexual de machos no Rio de Janeiro (BARBOSA, 2004) e estrutura da população e reprodução em São Paulo (CARVALHO, 2007), até o presente momento não foram identificados trabalhos utilizando ferramentas moleculares que possibilitem recomendações de manejo considerando a existência de estoques diferenciados de *E. massyae*, permanecendo dúvidas sobre a ocorrência de mais de uma população nas regiões sul e sudeste do país.

1.1 Pesca Marinha – Exploração

A pesca marinha tem grande importância socioeconômica no âmbito global. Além de ser uma fonte de alimento, esta atividade emprega milhões de pessoas em todo o mundo (FAO, 2011). Segundo o relatório da FAO (op. cit.), os alimentos provenientes da pesca são fonte de proteínas de alta qualidade e complementam a nutrição de mais de três bilhões de pessoas. Nos últimos 60 anos a pesca e a aquicultura vêm sofrendo com um desenvolvimento dramático em sua produção. Em 1950 a produção mundial totalizava 19,3 milhões de toneladas, alcançando em 2014, aproximadamente 167 milhões (FAO, 2015).

Com cerca de 87% dos recursos explorados ou sobreexplorados (FAO, 2015), a pesca marinha enfrenta uma grave crise, podendo tornar-se em poucos anos uma atividade economicamente

inviável sobre diversos estoques, além de comprometer a sustentabilidade do ambiente marinho. Devido a este cenário, diversos recursos antes não avaliados como de potencial interesse passaram então, a ser considerados. Dentre estes, houve o aumento gradativo na captura de cefalópodes como alternativa aos recursos pesqueiros tradicionais (DIAS-NETO e DORNELLES, 1996).

A pesca de cefalópodes no Sul e Sudeste do Brasil ocorre em ecossistemas costeiros, na plataforma continental e até mesmo no talude. Esta atividade apresenta uma importância crescente, onde concentrações significativas de cefalópodes e outras espécies de fauna acompanhante complementam os recursos pesqueiros retirados nesta região (COSTA e HAIMOVICI, 1990; PÉREZ, 1990, GASALLA e MARQUES, 2000). A fauna acompanhante pode ser definida como os organismos capturados incidentalmente com as capturas-alvo (SAILA, 1983). Uma parte da fauna acompanhante pode ser um subproduto da pesca e o que não se aproveita é descartado no mar (KELLEHER, 2005). A captura incidental de peixes e invertebrados é um dos principais problemas do manejo pesqueiro contemporâneo (DAVIES et al., 2009). Esta captura é gerada por uma diversidade de técnicas, sendo o arrasto uma das mais impactantes, tendo em vista a baixa seletividade e a alta proporção de fauna acompanhante em relação à espécie alvo (ANDREW e PEPPERELL, 1992). Além da mortalidade incidental de juvenis de peixes e invertebrados bentônicos, o arrasto também é responsável pela mortalidade acidental de espécies com alta longevidade e baixa taxa reprodutiva, tais como as tartarugas marinhas e algumas espécies de raias e tubarões (HALL et al., 2000).

Nos desembarques de pesca dos estados de Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul ocorrem comercialmente duas espécies de polvos: o polvo comum (*Octopus vulgaris*) e o polvo-saquinho (*Eledone massyae*), sendo a primeira predominante na pesca de arrasto de porta e a segunda capturada como fauna acompanhante, também através da pesca de arrasto, porém quando realizada a mais de 50 metros de profundidade (CARVALHO, 2007). A ocorrência de *E. massyae* no Sudeste foi apontada inicialmente por Costa e Haimovici (1990) no Rio de Janeiro. Posteriormente, Tomás et al. (1996) registraram a espécie em atividades pesqueiras realizadas no

litoral de São Paulo, onde não raramente eram descartadas, dado o seu menor porte em relação ao polvo comum (*O. vulgaris*). Ainda segundo Cost e; Haimovici (1990), devido ao aumento nos desembarques de *E. massyae* na região Sudeste, a espécie tornou-se a segunda mais capturada e consumida, demandando assim, estudos biológicos e ecológicos que visem a sustentabilidade desses estoques.

3.2 Pesca Marinha – Comércio

O comércio de cefalópodes ocorre no mundo todo, dentre as principais espécies comercializadas estão as lulas (76%), seguida dos polvos (7,5%) e das sépias (7%), além dos “não especificados” (9,5%). Marrocos, China, Espanha, Ilhas Falkland (Malvinas), Tailândia, Mauritânia e Peru destacam-se nas capturas mundiais, enquanto que os maiores consumidores do mundo são: Japão, Itália e Espanha. A importação mundial de cefalópodes em 2014, apenas nestes três países, representou cerca de 312.600 toneladas, sendo 181.100 toneladas de lula (58%), 89.000 de polvo comum (28%) e 42.500 de sépias (14%; FAO, 2015).

Atualmente, o Brasil figura em 7º lugar no ranking dos produtores americanos de cefalópodes. Archidiacono e Tomás (2009) avaliaram que no período entre 2001 e 2007, o Brasil alcançou um volume físico de 4.120.516 Kg e valor monetário de US\$ 16.198.611,00 em exportações, sendo a exportação do polvo congelado a mais expressiva (Tabela 1).

Tabela 1. Exportações brasileiras de polvo congelado (2001-2007).

Ano	US\$/FOB	Kg
2001	605.370	265.784
2002	349.430	116.923
2003	1.036.729	295.679
2004	5.323.715	1.241.437
2005	3.813.863	881.568
2006	2.814.428	787.378
2007	2.255.076	531.747
Total	16.198.611	4.120.516

Fonte: ARCHIDIACONO e TOMÁS (2009)

O estado de São Paulo respondeu por quase a metade do volume físico das exportações, seguido por Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Pernambuco (Tabela 2).

Tabela 2. Exportações brasileiras de polvo congelado por unidade federativa (2001-2007).

Ano	São Paulo		Santa Catarina		Rio Grande do Sul		Pernambuco	
	US\$/FOB	Kg	US\$/FOB	Kg	US\$/FOB	Kg	US\$/FOB	Kg
2001	345.581	141.870	104.177	61.308	992	1.127	-	-
2002	230.592	70.240	29.239	13.638	-	-	-	-
2003	321.430	71.423	19.392	8.380	-	-	319.757	100.904
2004	2.451.728	659.966	2.692.500	539.913	96.415	19.370	65.376	19.660
2005	2.141.569	529.500	1.588.187	314.389	84.107	37.679	-	-
2006	813.168	364.046	1.609.583	325.957	364.882	92.804	-	-
2007	338.415	123.937	1.917.483	408.669	-	-	-	-
Total	6.642.483	1.960.982	7.960.561	1.672.254	546.396	150.980	385.133	120.564

Fonte: ARCHIDIACONO e TOMÁS (2009)

A Espanha destaca-se como o principal comprador do polvo congelado comercializado pelo Brasil (81,43%), seguida da Argentina (9,70%) e Portugal (5,72%). Uruguai, Itália, Japão e França participam com o restante (3,15%); (IGARASHI, 2010).

3.3. Classe, gênero e a espécie *Eledone massyae*

A Classe Cephalopoda compreende cerca de 812 espécies (VASKE e COSTA, 2011). Com exceção das espécies da subclasse Nautiloidea, os cefalópodes pertencem à subclasse Coleioidea, caracterizada por apresentar concha interna ou ausente, um único par de brânquias e um total de 8 a 10 apêndices (ROPER et al., 1984; HANLON e MESSENGER, 1996). Os cefalópodes compartilham determinadas características com vertebrados bem desenvolvidos, tais como olhos com lente, pupila e um sistema nervoso bem desenvolvido (DE GROOT, 1995). A maior parte das espécies é monocíclica podendo haver ou não sincronia na desova, possuem breve ciclo de vida, apresentam características tanto “r” como “k” estrategistas (BOYLE, 1991) e algumas espécies (mais especificamente os polvos) apresentam cuidado parental, tendo seu tamanho populacional regulado pela disponibilidade de alimento e por condições abióticas, (CADDY, 1983). Assim, é comum que

ocorram períodos de explosões populacionais intercalados por períodos com populações de menor tamanho para toda Classe (CAVERIVIERE et al., 1999). Oportunistas, os cefalópodes predam ativamente crustáceos, peixes e moluscos, inclusive outros cefalópodes, e são fontes alimentares importantes para grupos de vertebrados marinhos (AMARATUNGA, 1987).

Os polvos do gênero *Eledone* englobam espécies bentônicas de pequeno a médio tamanho que habitam substratos areno-lodosos e rochosos até 300 m de profundidade (VOSS, 1988). Entre as espécies mais estudadas e de maior importância econômica estão *Eledone moschata* e *E. cirrhosa* provenientes do Oceano Atlântico e Mar Mediterrâneo (PEREZ, 1990).

Classificação taxonômica:

Filo: Mollusca

Classe: Cephalopoda (CUVIER, 1797)

Ordem: Octopoda (LEACH, 1818)

Sub-ordem: Incirrata (GRIMPE, 1916)

Família: Octopodidae (D'ORBIGNY, 1845)

Sub-família: Eledoninae (GRIMPE, 1921)

Gênero: *Eledone* (LEACH, 1817)

Espécie: *Eledone massyae* (VOSS, 1964)

A espécie *E. massyae* completa todo o ciclo de vida no ambiente bentônico e pode não estar associada a um único tipo de fundo, embora tenha costume de enterrar-se em sedimentos finos e procurar fundos rochosos para a desova, em maiores profundidades, fora da plataforma (PEREZ, 1990). Possui manto oval sem constrição do pescoço e 8 braços com uma única fileira de ventosas. Apresentam brânquias com 8 a 10 lamelas, rádula e 7 fileiras de dentes, além de placas marginais. Nos extremos dos braços dos machos, as ventosas apresentam-se transformadas em papilas, com

exceção do 3º direito, hectocotilizado, mais curto, com uma lígula simples e membrana lateral. Sua cor é marrom acinzentada no dorso e clara ventralmente (HAIMOVICI e ANDRIGUETTO, 1986). O comprimento máximo registrado (CM), no Brasil, em capturas no estado de São Paulo, é de 10,5cm (KNOELLER et al., 2014).

Estima-se que o período de acasalamento ocorra entre setembro e meados de fevereiro. Em Carvalho (2007), esta estimativa evidenciou-se a partir da ocorrência de espermatóforos em ovários de fêmeas a partir de setembro e a proporção sexual entre machos e fêmeas de 1:1 durante esse período (primavera/verão). Os machos já apresentam espermatóforos completamente formados e mesmo que as fêmeas não estejam suficientemente maduras, pode ocorrer o acasalamento, pois estas possuem adaptação reprodutiva para armazenamento de esperma, permitindo a fertilização dos ovócitos apenas quando a vitelogênese estiver completa (PEREZ et al., 1990). A desova provavelmente ocorre em zonas rochosas no talude ou em rochas soltas sobre a plataforma (PEREZ, 1990), entre meados de dezembro e março, com provável pico em janeiro e fevereiro. Os jovens adotam o ambiente bentônico logo após a eclosão e se deslocam em direção à plataforma onde ocorre a maturação e o acasalamento (COSTA e HAIMOVICI, 1990). Acredita-se que por um curto período, que compreende o fim do verão/início do outono, ocorra a sobreposição de gerações, onde fêmeas desovadas encontram-se na região do talude e fêmeas e machos juvenis permanecem na plataforma em início de maturação (CARVALHO, 2007). Boyle (1983) comenta que a consequência mais importante para a biologia populacional de cefalópodes com expectativa de vida inferior a 450 dias é a sobreposição de gerações de espécies que desovam sazonalmente, como *E. massyae* (Figura 1).



Figura 1. Exemplos de *E. massyae* (Fonte: Própria autora).

Sua distribuição geográfica concentra-se na costa sudeste da América do Sul começando no Brasil, com registros até a Argentina (20° S a 43° S; Figura 2).



Figura 2. Distribuição Geográfica da Espécie *E. massyae*. Fonte: FAO (2016).

3.4. *Biologia Molecular e Conservação de Espécies*

Atualmente, parte da comunidade científica mundial se dedica ao conhecimento relacionado à diversidade biológica e à conservação dos recursos genéticos, utilizando inovações biotecnológicas 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, biogeografia¹, caracterizações de estruturas populacionais, sistemática molecular, inferência de relações filogenéticas e identificação específica de espécimes processados, entre outras (AVISE et al., 1987; BRIERLEY e THORPE, 1994; SANJUAN et al., 1997; ORTÍ et al., 1996; ALLCOCK et al., 1997; MALTAGLIATI et al., 2002; STRUGNELL e NISHIGUCHI, 2007; SALES et al., 2013; LÜ et al., 2013; DE LUCA et al., 2014). Padrões de diversificação do DNA mitocondrial (mtDNA) vem sendo reconhecidos como ferramentas importantes nos estudos de linhagens comerciais de diversos táxons de animais aquáticos (FERRIS e BERG, 1987; TOLEDO-FILHO et al., 1992), possibilitando assim a distinção de populações geográficas de maneira eficaz através da identificação de haplótipos (BERMINGHAM e MARTIN, 1998; PATARNELLO et al., 2003; PERDICES et al., 2004).

O mtDNA fornece marcadores moleculares eficientes em análises intra e interespecíficas. Entre suas possíveis aplicações incluem-se estimativas do grau de variabilidade genética (AVISE et al., 1987; MORITZ et al., 1987; BECKENBACH et al., 1990), análises de zonas de contato entre espécies (FERRIS et al., 1983; SZYMURA et al., 1986), de fluxo gênico (BROWN e CHAPMAN, 1991; ONG et al., 1996; SANETRA; CROZIER, 2003), de biogeografia histórica (BERMINGHAM e MARTIN, 1998; SIVASUNDAR et al., 2001) e de caracterizações da estrutura populacional

¹ A biogeografia compreende o estudo da história dos seres vivos e sua distribuição geográfica no espaço (Crisci et al., 2000), podendo ser dividida em dois principais ramos: a biogeografia histórica e a biogeografia ecológica. A primeira enfoca o efeito dos eventos de grande escala temporal (evolutivos, tectônicos) sobre os padrões de distribuição e história das espécies e táxons supra-específicos. Enquanto que a biogeografia ecológica analisa padrões nos níveis populacional e específico, enfatizando os efeitos dos processos ecológicos (temperatura, umidade, salinidade, disponibilidade de alimento) que ocorrem em escalas mais curtas de tempo.

(GRAVES, 1998; STEPIEN e FABER, 1998; PESTANO e BROWN, 1999). Além do seu emprego crescente no campo da sistemática molecular, para inferência de relações filogenéticas (ALVES-GOMES, et al., 1995; ALVES-GOMES, 1998; ORTÍ et al., 1996; SAITOH et al., 2003; THACKER, 2003) e aplicações em conservação biológica (BEHEREGARAY et al., 2003; LI et al., 2005).

Haplótipos de mtDNA de populações apresentam distribuição geográfica determinada em diversas espécies, possibilitando inferências de dimensão filogenética em discussões relacionadas a estrutura de populações, introduzindo o conceito de “filogeografia” (AVISE et al., 1987). AVISE (2000) propôs categorias filogeográficas capazes de caracterizar áreas de ocupação, distribuição de populações, existência de barreiras ao fluxo gênico ou extinção de genótipos intermediários, ocorrência de zonas híbridas, taxa de migração e inferências cladísticas, com base na distribuição geográfica de haplótipos do mtDNA e, também, no grau de divergência dos segmentos genômicos.

A existência de poucas barreiras à migração faz com que a estruturação genética em espécies marinhas seja menos pronunciada do que em espécies de água doce (WARD et al., 2005). Porém, a generalização sobre a homogeneidade genética em ambientes marinhos pode muitas vezes estimular a sobreexploração das espécies, reduzir ainda mais os níveis de variabilidade e eliminar estoques locais (SMITH et al., 1990, KUUSIPALO, 1999). Assim, entende-se que métodos de conservação devem ser adotados com base na estrutura das populações. Populações estruturadas dependem da conservação local de sua diversidade, uma vez que, suas adaptações locais correm o risco de se perder caso esta população venha a se combinar com indivíduos de outras populações. Enquanto se tratando de populações não estruturadas, os esforços para proteção podem ser concentrados em uma determinada área utilizando espécies já existentes como matrizes para re-colonização em áreas impactadas (HAIG, 1998).

Variabilidade e diferenciação populacional podem ser resultados de vários fatores como: seleção natural favorecendo genótipos ou alelos diferentes em cada subpopulação, processos aleatórios na transmissão dos alelos à cada geração (deriva genética); diferenças ao acaso nas

frequências alélicas dos fundadores das subpopulações e; fluxo gênico entre as subpopulações (SLATKIN, 1987). Dentre estes, o fluxo gênico exerce influência importante na caracterização da estrutura populacional de uma espécie, pois determina até que ponto cada população local pode ser considerada uma unidade evolutiva independente. O grau e a direção do fluxo gênico entre populações separadas podem agir como força poderosa atuando na manutenção ou na homogeneização das diferenças genéticas (SLATKIN, 1993).

2. OBJETIVO

A partir dos fatos apresentados, este trabalho visou caracterizar a biodiversidade molecular, a estrutura populacional e a identificação e distribuição dos estoques genéticos da espécie *Eledone massyae*, nas áreas de estudo, utilizando sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI).

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a diversidade genética da espécie *E. massyae* ao longo de sua distribuição nas áreas de estudo utilizando a região COI do mtDNA;
- Identificar o número e a distribuição geográfica dos haplótipos de mtDNA da espécie nas áreas de estudo;
- Testar hipóteses de estruturação populacional e filogeográfica estabelecendo relações entre as possíveis populações nas áreas estudadas;
- Propor planos de conservação e manejo para a espécie.

3. Material e Métodos

O tópico a seguir, tem o objetivo de detalhar os procedimentos utilizados para o desenvolvimento deste estudo. Para melhor compreensão, será apresentado em subtópicos que detalharão as etapas desenvolvidas em: (i) *descrição da Área de Estudo*; (ii) *obtenção das amostras*; (iii) *extração, amplificação e sequenciamento do DNA* e; (iv) *Análises genético-populacionais*.

3.1. Área de Estudo

Os espécimes de *Eledone massyae* utilizados neste estudo foram obtidos em diferentes regiões: (i) região de Paranaguá, ao largo da costa do Estado do Paraná, região sul do Brasil; (ii) região de Santos, ao largo da costa central do Estado de São Paulo e; (iii) região de Saquarema, litoral centro-norte do Estado do Rio de Janeiro, as últimas localizadas na região sudeste do Brasil.

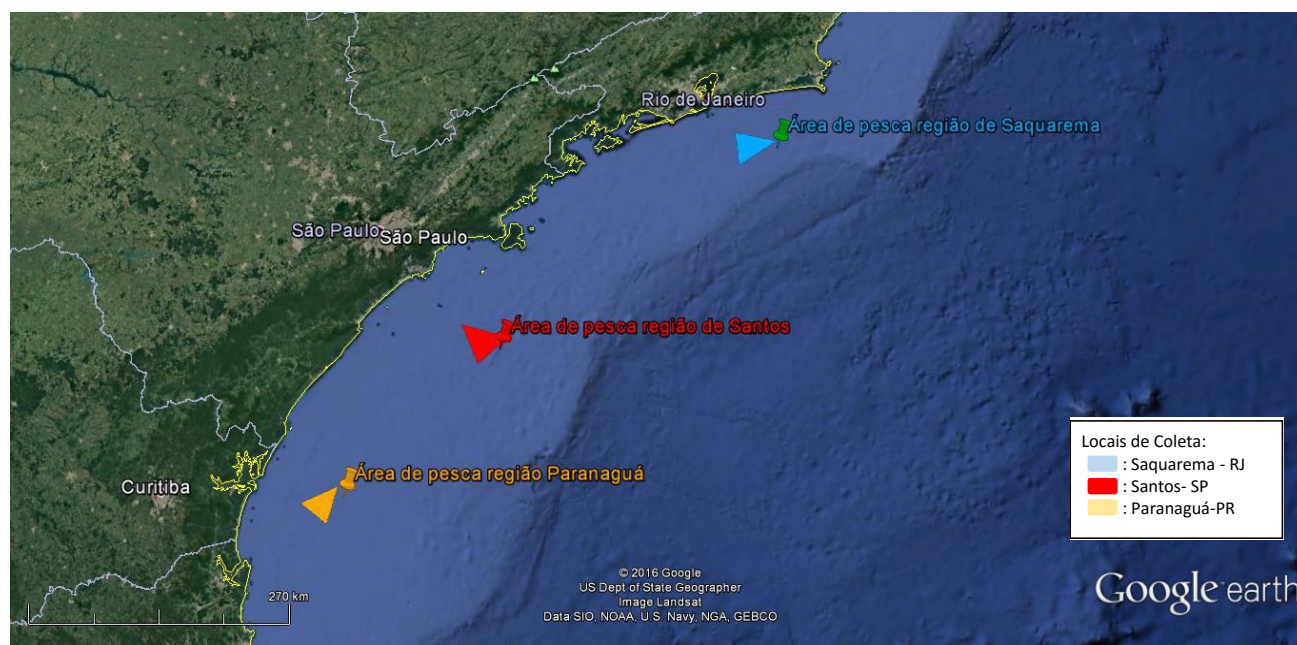


Figura 3. Distribuição das áreas onde foram obtidos os exemplares de *Eledone massyae* (Elaborado pelo autora).

3.2. Obtenção das amostras

No momento da coleta os indivíduos foram refrigerados e após seu desembarque foram realizadas as extrações de fragmentos de tecidos musculares, os quais foram conservados em solução de etanol a 95% e acondicionados em tubos individuais devidamente identificados (Figuras 4 a 6). Ao todo, foram obtidas 133 amostras sendo, 41 pertencentes ao estado do Rio de Janeiro; 47 de São Paulo e; 45 do Paraná. O período de amostragem teve início em agosto de 2014 e encerrou-se em novembro de 2015. Todas as amostras foram depositadas na coleção do Laboratório de Genética Pesqueira e Conservação do Departamento de Ciências do Mar – UNIFESP Baixada Santista. Para controle da localização, foram solicitados mapas de bordo das embarcações correspondentes, contendo data, coordenada geográfica e profundidade dos arrastos realizados durante as capturas.



Figura 4. Identificação dos exemplares. Fonte: Própria autora.



Figura 5. Extração do tecido de *E. massyae*. Fonte: Própria autora.

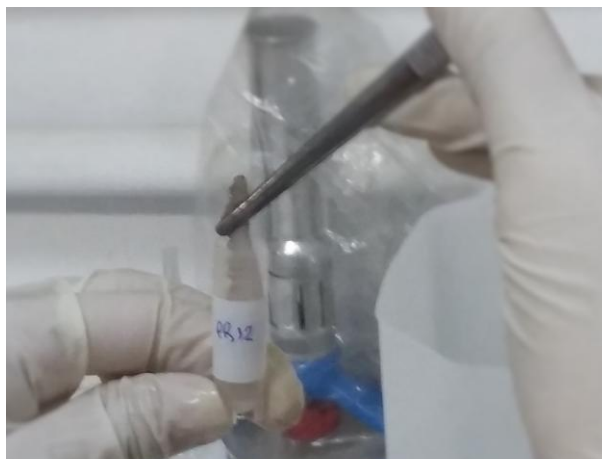


Figura 6. Armazenamento do tecido em solução de etanol (95%). Fonte: Própria autora.

3.3. Protocolos para extração, amplificação e sequenciamento do DNA

O material genético total, dos espécimes coletados, foi extraído utilizando o protocolo de extração e kit NucleoSpin[®] Tissue. A amplificação do DNA extraído foi feita através de uma Reação de Cadeia de Polimerase (PCR), seguindo o protocolo do kit Platinum[®] Taq DNA Polymerase, através da seguinte reação: 5µl 10X PCR Buffer, 1,5µl MgCl₂ (50mM), 1µl dNTP mix (10mM), 1µl Primer mix (10µl), 0,2µl Platinum[®] Taq DNA Polymerase, 1µl DNA e completar o volume até 50µl ddH₂O autoclavada. A reação de PCR seguiu o seguinte protocolo no termociclador: 1º: 94°C por 3 minutos para a denaturação da dupla fita de DNA, 2º: 35 ciclos de 94°C por 45 segundos de denaturação, 52°C por 30 segundos de anelamento dos primers e 72°C por 1 minuto por kb. Após o término da reação de PCR as reações foram armazenadas a uma temperatura de 4°C. Os primers utilizados foram F: 5' para 3' - TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA e R: 5' para 3' - GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G (FOLMER, 1994). A constatação da amplificação foi realizada em gel de agarose a 1%, com o uso do corante para ácidos nucleicos Blue Green Loading Dye I e visualizados em luz ultravioleta.

Para a reação de sequenciamento, os produtos do PCR foram, primeiramente, purificados em uma reação que utiliza uma exonuclease e uma fosfatase alcalina, seguindo o protocolo de Illustra[™] ExoProStar 1-Step. Em seguida, os produtos do PCR purificados foram submetidos a

uma PCR de sequenciamento, em um termociclador, seguindo os protocolos do BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As sequências de DNA foram geradas na plataforma de sequenciamento ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer pelo método de sequenciamento de Sanger et al. (1977).

3.4. Análises genético-populacionais

As sequências de DNA geradas foram visualizadas, editadas e alinhadas pelo software Geneious 4.8.5 (<http://www.geneious.com>; Kearse et al., 2012). A identidade das sequências foi confirmada pelo algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; Altschul et al., 1990) no NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). O conjunto de amostras foi alinhado entre si gerando um arquivo, que foi utilizado na realização dos testes estatísticos.

Para as análises genético-populacionais calculou-se a composição nucleotídica, a diversidade das sequências, o número de sites polimórficos, a composição das bases, a frequência e a diversidade de haplótipos usando o programa ARLEQUIN versão 3.5.1.3 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010). O método utilizado para quantificar a diferenciação genética entre populações foi baseado na estatística F , a qual quantifica o efeito de endocruzamento da subdivisão populacional denominado índice de fixação (Wright, 1965). Segundo Wright (1978), valores de F_{ST} entre 0 e 0,05 indicam uma baixa estruturação genética, entre 0,05 e 0,15 estruturação moderada, entre 0,15 e 0,25 alta e acima disso uma forte estruturação genética.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada para testar a heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos do mtDNA utilizando o programa ARLEQUIN 3.5.1.3 que utiliza a estatística F de Wright (1949, 1965), sendo a significância da F_{ST} - estatística determinada pelas permutações não-paramétricas (EXCOFFIER et al., 1992) com 1000 permutações. As regiões geográficas mais próximas foram agrupadas para avaliar a heterogeneidade genética dentro e entre as

regiões e em pares de regiões. Árvores de haplótipos foram obtidas utilizando o programa MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 (TAMURA et al., 2013) e as redes de haplótipos foram elaboradas com critério de parcimônia estatística utilizando o programa Network 4.1.1.2 (BANDELT et al., 1999). O teste de “Mismatch Distribution” foi realizado na avaliação da história demográfica da espécie (ROGERS e HARPENDING, 1992).

4. RESULTADOS

Considerando as 133 amostras de *Eledone massyae* analisadas, obtivemos um total de 602 pares de bases (pb) com 20 sítios polimórficos (S), originando 15 haplótipos (hp) (Tabela 3). O conjunto gênico sequenciado é composto por 30,4% de Timina, 38% de Adenina, 14,2% de Citosina e 17,4% de Guanina.

Tabela 3. Sítios polimórficos localizados nos 15 haplótipos da espécie *Eledone massyae*.

Haplótipos	Sítios Polimórficos																			
	17	217	227	266	281	284	341	385	457	459	471	476	479	485	508	518	521	578	593	594
Hap1	T	G	G	A	T	T	C	C	T	A	G	T	A	A	G	T	T	A	G	T
Hap2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
Hap3	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap4	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap5	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap6	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	C	.	C	C	.	.	.	.	.	.
Hap7	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	C	.	.	.	.	G	T	C
Hap8	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.
Hap9	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	C	C	T	.	.	G	T	C
Hap10	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap11	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap12	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
Hap14	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.

O conjunto total das amostras apresentou índice de diversidade haplotípica $H_d = 0,3021$ e diversidade nucleotídica $\pi = 0,00105$. O maior nível de diversidade foi encontrado no Paraná ($H_d = 0,4270$, $\pi = 0,00214$), enquanto a menor diversidade foi observada no Rio de Janeiro ($H_d = 0,1720$, $\pi = 0,00037$); (Tabela 4).

Tabela 4. Estatística populacional da espécie *Eledone massyae* (Legenda: n = número de indivíduos; P = sítios polimórficos; Nh = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica).

Localidade	n	P	Nh	Hd	π
Rio de Janeiro	41	5	5	0,1720	0,00037
Paraná	45	13	9	0,4270	0,00214
São Paulo	47	3	4	0,2690	0,00046

Dentre os 15 haplótipos identificados, o haplótipo de número um (h1) destacou-se como o mais abundante, sendo comum as três regiões estudadas. O haplótipo de número doze (h12) é o segundo mais abundante, porém, é compartilhado por duas regiões apenas, São Paulo e Rio de Janeiro, como observado na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição geográfica de haplótipos da espécie *Eledone massyae*

Haplótipos	Rio de Janeiro (n=41)	Paraná (n=45)	São Paulo (n=47)	Total (133)
h1	37	32	42	111
h2	.	4	.	4
h3	.	1	.	1
h4	.	1	.	1
h5	.	1	.	1
h6	.	1	.	1
h7	.	1	.	1
h8	.	1	.	1
h9	.	1	.	1
h10	1	.	.	1
h11	1	.	.	1
h12	1	.	5	6
h13	1	.	.	1
h14	.	1	.	1
h15	.	1	.	1

Na estimativa de diferenciação genética, realizada através do método de Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre grupos, foram testadas hipóteses de estruturação seguindo combinações de agrupamentos que levam em consideração as possibilidades de um número máximo e um número mínimo de populações, apontando um nível moderado de estruturação entre o grupo 1 (Rio de

Janeiro e São Paulo) e o grupo 2 (Paraná), onde obteve-se um $F_{ST} = 0,0784$ ($p = 0,000001$). Enquanto que a análise detalhada dos índices de estruturação por pares apontam valores significativos entre Rio de Janeiro e Paraná e entre São Paulo e Paraná ($p < 0,05$); (Tabela 6).

Tabela 6. Diferenciação genética (F_{ST}) entre os pares das regiões estudadas. Nível de significância de $p < 0,05$ (+).

	Rio de Janeiro	Paraná	São Paulo
Rio de Janeiro	0	+	-
Paraná	0,0506	0	+
São Paulo	0,0150	0,0642	0

Na rede de haplótipos (Figura 7), desenhada através do programa Network, o qual utiliza o método estatístico de parcimônia, é observado uma alta frequência relativa (83%) no compartilhamento do haplótipo 1 (h1). A rede evidencia a maior diversificação genética no Paraná, o potencial de dispersão da espécie nesta região e, caracteriza pelo seu formato “estrela” um evento recente de expansão populacional a partir do haplótipo 1. O número relativamente alto de haplótipos do Paraná não compartilhados também denota a estruturação populacional entre as regiões.

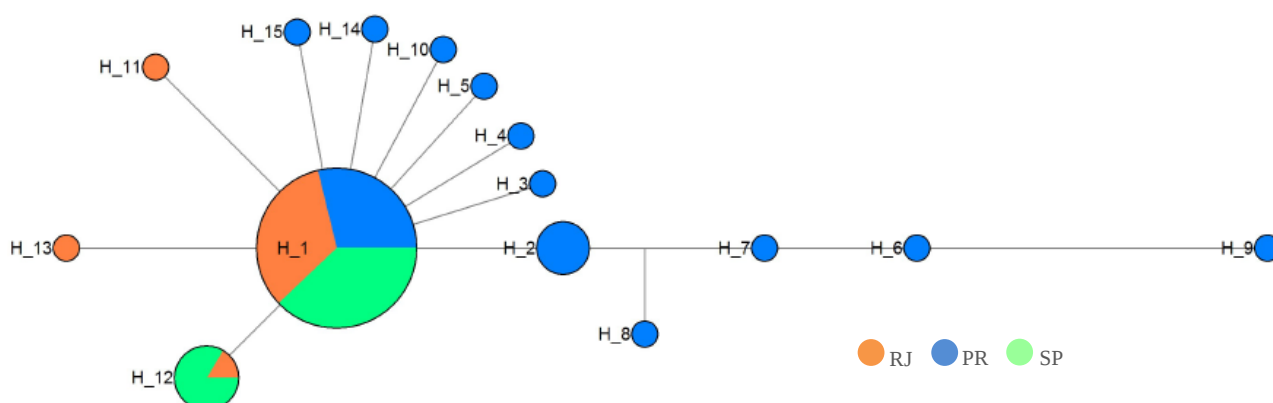


Figura 7. Rede de haplótipos do polvo *Eledone massyae* calculada pelo método Median-Joining.

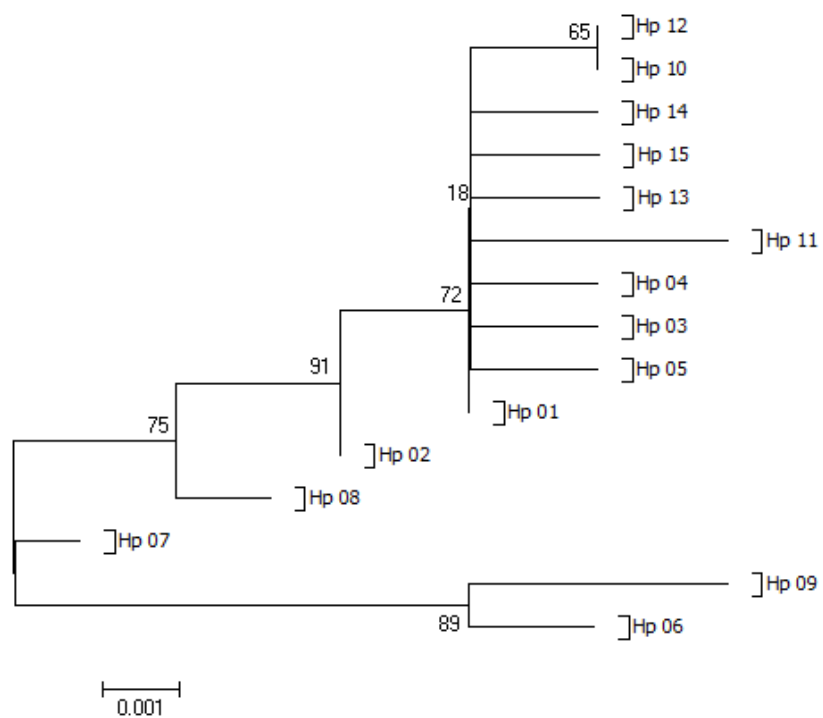


Figura 8. Arvore de haplótipos do polvo *Eledone massyae* construída utilizando o método Neighbor-Joining, com modelo evolutivo e com 1000 réplicas de bootstrap.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, pôde-se observar que o número de indivíduos de *E. massyae* coletados, nas três regiões estudadas, foi praticamente o mesmo, apenas com diferenças entre as profundidades amostradas. No Estado do Paraná, os indivíduos foram capturados em profundidades entre 30 m e 50 m. Em São Paulo, os arrastos foram mais profundos, entre 100 m e 150 m. No Rio de Janeiro as profundidades variaram entre 50 e 80 m. Esses dados apontam uma faixa de ocorrência que pode variar em mais de 100 m dependendo de sua localização e da temperatura da água. Ressalta-se que todas as coletas se concentraram entre os meses de agosto e dezembro, principalmente por conta do período de defeso do camarão², que ocorre no intervalo de 1º de março a 31 de maio, no Sul e Sudeste do Brasil, quando as embarcações que atuam com o arrasto de camarão buscam alternativas, deixando então de obter a espécie alvo do estudo como fauna acompanhante. Outro fator que pode estar associado a esta faixa de ocorrência da espécie na pesca do camarão é o período de desova da espécie, que ocorre em zonas rochosas no talude entre meados de dezembro a março, com provável pico em janeiro e fevereiro. Após esse período, os jovens adotam o ambiente bentônico e se deslocam em direção à plataforma onde ocorre a maturação e o acasalamento (COSTA e HAIMOVICI, 1990; PEREZ, 1990).

Analisando o conjunto total de amostras das três regiões, a diversidade nucleotídica observada foi de $\pi = 0.00105$, enquanto o valor de diversidade haplotípica foi de $H_d = 0.3021$. Estes índices podem ser considerados altos, como visto em Sales et al. (2013), onde espécies como

² O defeso do camarão é regulamentado pela Instrução Normativa IBAMA nº 189, de 23/09/2008. Inicia-se em 1º de março e vai até 31 de maio, período em que é proibida a pesca e a captura desse crustáceo, visando à preservação de suas espécies. Durante estes três meses, fica proibido o exercício da pesca de arrasto com tração motorizada para a captura do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*, *F. brasiliensis* e *F. subtilis*), camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), camarão-branco (*Litopenaeus schmitti*), santana ou vermelho (*Pleoticus muelleri*) e barba-ruça (*Artemesia longinaris*). No defeso, também são proibidos o transporte interestadual, a estocagem, o beneficiamento, a industrialização e a comercialização de qualquer volume de camarão das espécies proibidas, sem a comprovação de origem do produto, conforme formulário de guia de origem que deve ser obtido no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) e que deverá acompanhar o produto desde a origem até o destino final. A proibição nesse período específico é válida na área marinha compreendida entre os paralelos 21º18'04,00"S (divisa dos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro) e 33º40'33,00"S (Foz do Arroio Chuí, estado do Rio Grande do Sul). Desrespeitar o período de defeso é crime ambiental.

Octopus vulgaris e *O. insularis* foram divididos em grupos, de acordo com suas localidades e observou-se o Hd entre 0,27 e 0,47. Neste estudo o maior nível de diversidade foi encontrado no Paraná (Hd = 0,4270 e π = 0,00214) e o menor no Rio de Janeiro (Hd = 0,1720 e π 0,00037).

O valor encontrado de F_{ST} = 0,0784 ($p < 0,000001$) indicou nível de estruturação moderado entre as amostras coletadas no Paraná, em relação às demais regiões. Tais resultados também foram observados anteriormente, em outros trabalhos realizados com a espécie *Octopus vulgaris*, utilizando ferramentas moleculares, onde foram identificadas diferenciações entre populações ao longo do litoral brasileiro (CABRANES et al., 2008; MOREIRA et al., 2011; SALES et al., 2013). Neste sentido, é possível que existam barreiras geográficas marinhas que parecem estar influenciando na diferenciação genética das populações de *E. massyae*, ao menos entre as populações das regiões estudadas, as quais tiveram os valores de F_{ST} calculados.

Uma possível explicação levantada neste estudo, é de que, como visto em Piola et al. (2005), as populações do litoral sul do Brasil ao contrário das que ocorrem no litoral sudeste, podem sofrer influências sazonais da pluma do rio da Prata, principalmente nos meses de inverno. Influências estas relacionadas à alterações físico-químicas da água como temperatura, oxigenação, salinidade, entre outros fatores que poderiam ao longo do tempo gerar processos vicariantes, fragmentando a distribuição da espécie e dificultando o fluxo gênico entre as populações.

A fim de corroborar esta ideia, amostragens em regiões mais ao sul do Paraná como Santa Catarina, Rio Grande do Sul, além do Uruguai e Argentina, complementariam o estudo ampliando a compreensão das distribuições dos haplótipos, suas interações e possíveis causas, possibilitando a verificação da estrutura genética dessas populações ao longo de toda a faixa de distribuição da espécie e das regiões sob influência da pluma do Rio da Prata.

Amostras do litoral do Paraná e Rio de Janeiro apresentaram valores de diferenciação genética menores do que as amostras do Rio de Janeiro em relação a São Paulo. Ou seja, as amostras do Paraná se diferenciam menos com as amostras do Rio de Janeiro, do que com as amostras do

estado vizinho São Paulo. O que pode indicar um fluxo gênico maior entre as regiões do Paraná e Rio de Janeiro do que São Paulo e Rio de Janeiro ou ainda, São Paulo e Paraná. Este mesmo fato também foi observado em outros trabalhos como em Moreira et al. (2011), utilizando marcadores microssatélites, identificados índices menores de diferenciação genética entre amostras de *O. vulgaris* provenientes do litoral sul (Paraná e Santa Catarina) e amostras do Rio de Janeiro do que entre amostras de São Paulo e do Rio de Janeiro. Outro trabalho realizado por Tomás (2002), também com a espécie *O. vulgaris*, reportou diferenças morfométricas entre populações de São Paulo e Rio de Janeiro.

Diante desses dados, outra possível explicação levantada neste trabalho é de que essa menor diferença genética entre os estados do sul do Brasil e do Rio de Janeiro, possa estar associada à ressurgência da Água Central do Atlântico Sul (ACAS) no litoral fluminense, que favorece o fluxo gênico entre estas regiões. Segundo Miranda et al. (2002), as correntes e massas de água oceânicas são variáveis importantes na determinação da distribuição de organismos marinhos. Ainda de acordo com Miranda et al. (2002), a presença de uma espécie (ou um conjunto delas) em determinado ponto do litoral sudeste do Brasil, por exemplo, pode ser devido à penetração de uma massa de água profunda (Corrente das Malvinas) que flui do litoral argentino em direção ao Brasil em uma determinada época do ano, possibilitando o estabelecimento de comunidades de espécies típicas do litoral argentino, no litoral sudeste do Brasil, inclusive com distribuições aparentemente descontínuas (MIRANDA e MARQUES, 2011).

Essa incompreensão sobre barreiras geográficas ainda pode ser creditada à maior complexidade dos ecossistemas marinhos, os quais são caracterizados por vários regimes de correntes, frentes oceânicas, diferenças de temperatura, salinidade, profundidade, gradientes latitudinais, relevo e composição de fundo, além das distintas comunidades que se estabelecem de acordo com as condições abióticas de cada local (ACHA et al., 2004; LUCAS et al., 2005). Desta forma, uma variável ambiental que pode funcionar como barreira geográfica para uma comunidade de uma área (como tipo de substrato e/ou composição de fundo oceânico para bentônicos ou

qualidade da água para pelágicos), pode não ter qualquer influência para outra comunidade que ocupa esta mesma área e que seja influenciada por outras variáveis ambientais (como temperatura e luminosidade da coluna d'água para o fitoplâncton). Assim, fica evidente que as barreiras atuam sobre a biologia dos organismos marinhos e não sobre táxons ou sobre a biota como um todo (MIRANDA e MARQUES, 2011).

Estudos dos ciclos de vida das espécies é um aspecto de suma importância para a compreensão da evolução no tempo e espaço, uma vez que abordagens biogeográficas não podem negligenciar a relação entre a biologia dos grupos e suas áreas de endemismo. Dentre os fatores físicos, há uma dificuldade inerente em se compreender a vicariância no ambiente marinho, ou seja, se delimitar a existência de barreiras históricas ou atuais que determinaram a cladogênese dos grupos (MYERS, 1997; HEADS, 2005). A inexistência de estudos em biogeografia para a maioria dos grupos marinhos pode ser creditada ao fato de que a ideia de evolução biológica conjunta à evolução geológica/ambiental não é tão evidente no meio marinho, seja por fatores biológicos ou físicos (MIRANDA e MARQUES, 2011).

Estes dados reforçam as duas ideias levantadas neste trabalho, referentes ao entendimento da estruturação populacional do *E. massyae* na costa sul e sudeste brasileira. Uma vez que, como a espécie não possui fase larval, a dispersão da população é baixa podendo sofrer processos de endemismo por conta da pluma do Rio da Prata nos estados mais ao sul do Brasil, mas que também podem ser carregadas pelas fortes correntes de fundo (Malvinas), ressurgindo na plataforma continental do Rio de Janeiro, sem caracterizar uma migração propositada, mas caracterizando um fluxo gênico.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma vez observado um nível de estruturação moderado entre as amostras coletadas no Paraná, em relação às demais regiões (São Paulo e Rio de Janeiro), torna-se importante considerar a caracterização de populações diferenciadas no litoral brasileiro, para a efetiva elaboração de planos de manejo e conservação específicos para as diferentes regiões.

Entretanto, para que planos de conservação e manejo sejam propostos de maneira assertiva e que de fato alcancem níveis satisfatórios na preservação do *E. massyae*, faz-se necessárias análises que incluam amostras de regiões mais ao sul da costa brasileira, como Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e também de outras regiões onde a espécie ocorre como Uruguai e Argentina. Dessa forma, seria possível entender melhor a dinâmica na dispersão e no fluxo gênico, além de possibilitar a identificação da região basal da espécie. Além disso, estudos mais detalhados sobre a dinâmica das correntes oceanográficas e suas influências sobre a espécie e a região que ela ocorre, também poderiam esclarecer ainda mais a estruturação dessa população.

Por fim, diante de todos os pontos apresentados, entende-se que os resultados obtidos apresentam as primeiras análises genéticas da espécie, revelando dinâmicas populacionais que abrem caminho para o manejo diferenciado entre as populações do *E. massyae* nas regiões estudadas.

7. REFERÊNCIAS

- ACHA, E.M., MIANZAN, H., GUERRERO, R.A., FAVERO, M. E BAVA, J. Marine fronts at the continental shelves of austral South America physical and ecological processes. *Journal of Marine Systems* 44, 83-105, 2004.
- ALLCOCK A. L.; BRIERLEY A. S.; THORPE J. P.; RODHOUSE P. G. Restricted gene flow and evolutionary divergence between geographically separated populations of the Antarctic octopus *Pareledone turqueti*. *Marine Biology*, v.129, p.97-102, 1997.
- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215: 403-410, 1990.
- ALVES-GOMES, J.A.; ORTÍ, G.; HAYGOOD, M.; MEYER, M.; HEILIGENBERG, W. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: A synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology Evolution* 12(2): p. 298-318, 1995.
- ALVES-GOMES, J.A. The phylogenetic position of the South American electric fish genera *Sternopygus* and *Archolaemus* (Ostariophysi; Gymnotiformes) according to 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre. p. 447-460, 1998.
- AMARATUNGA, R. Populations biology. In: BOYLE, P.R. *Cephalopod Life Cycles, Comparative Reviews*. London: Academic Press, p. 239-252, 1987.
- ANDREW, N.L.; PEPPERELL, J.G. The by-catch of shrimp trawl fisheries. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 30: 527-565, 1992.
- ARCHIDIACONO, A.M.; TOMÁS, A.R.G. The Brazilian panorama in the world octopus trade - a study case. *Arq. Ciên. Mar, Fortaleza*, 42(1): 85 – 93, 2009.
- AVISE J. C.; ARNOLD J.; BALL R.M.; BERMINGHAM E.; LAMB T.; NEIGEL J.E.; REEB C. A.; SAUDERS N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review Ecology Systematics*, v.18, p.489-522, 1987.
- AVISE J. C. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 2000.
- BANDELT H-J, FORSTER P, RÖHL A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* 16: 37-48, 1999.

- BARBOSA, S.S. Morfologia do sistema reprodutor e maturação sexual de machos de *Eledone massyae* Voss, 1964 (Cephalopoda: Octopodidae) do Estado do Rio de Janeiro. 2004. 53p. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- BECHENBACH, A.T.; THOMAS, W.K.; SOHARABI, H. Intraspecific sequenci variation and mitochondrial genome of raibow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genome*. 33:13-15, 1990.
- BEHEREGARAY, L.B.; SUNNUCKS, P.; BRISCOE, D.A. A rapid fish radiation associated with the last sealevel changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 269, 65–73, 2003.
- BERMINGHAM E.; MARTIN A. P. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, v.7, p.499-517, 1998.
- BRIERLEY A. S.; THORPE J. P. Biochemical Genetic Evidence Supporting the Taxonomic Separation of *Loligo gahi* from the genus *Loligo*. *Antarctic Science*, v. 6, p. 143-14, 1994.
- BOYLE, P.R. The UFAW handbook on the care and management of Cephalopods in the laboratory. Aberdeen: Universities Federation for Animal Welfare, 1991.
- BROWN, B.L.; CHAPMAN, R.W. Gene flow and mitochondrial DNA variation in the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Evolution*. 45:1147-1161, 1991.
- CABRANES, C.; FERNANDEZ-RUEDA, P.; MARTÍNEZ J.L. Genetic structure of *Octopus vulgaris* around the Iberian Peninsula and Canary Islands as indicated by microsatellite DNA variation. *ICES Journal of Marine Science*, v. 65, p. 12-16, 2008.
- CADDY, J.F. The cephalopods: factors relevant to their population dynamics and to the assessment and management of stocks. *FAO Fish.Tec.Pap.* 231: 452 p., 1983.
- CARVALHO, E.S. Estrutura da população e reprodução do polvo *Eledone massyae* Voss, 1964 (Mollusca, Cephalopoda, Octopodidae) na pesca do Estado de São Paulo, Brasil. Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento. São Paulo, 2007.
- CAVERIVIERE, A.; DOMAIN, F.; DIALLO, A. Observations on the influence of temperature on the length of embryonic development in *Octopus vulgaris* (Senegal). *Aquatic Living Research*, v.12, p. 151-154, 1999.
- COSTA, P.A.S.; HAIMOVICI, M. A pesca de polvos e lulas no litoral do Rio de Janeiro. *Ciência e Cultura*, v.42, n.12, p.1124-1130, 1990.

- DAVIES, R.W.D.; CRIPPS, S.J.; NICKSON, A.; PORTER, G. Defining and estimating global marine fisheries bycatch. *Marine Policy*, Cardiff, 33(4): 661-672, 2009.
- DE GROOT, S.J. Edible species. In: Ruiter, A (ed) *Fish and Fishery Products: Composition, Nutritive Properties and Stability*. IK: CAB International, 1995.
- DE LUCA, D.; CATANESE, G.; PROCACCINI, G.; FIORITO, G. An integration of historical records and genetic data to the assessment of global distribution and population structure in *Octopus vulgaris*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2014.
- DIAS NETO, J.; DORNELLES, L.D.C. Diagnostico da pesca marítima do Brasil. Coleção Meio Ambiente. Serie Estudos Pesca (Brasil). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renovaveis, Brasilia-DF. 163 p.. no. 20, 1996.
- DIEGUES, A. C.S. Pescadores, camponeses e trabalhadores do mar. São Paulo, Ed. Ática, 1983.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, v.131, p.479-491, 1992.
- EXCOFFIER, L.; H.E. L. LISCHER. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v.10, p.564-567, 2010.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. GLOBEFISH Highlights. FIPM/FAO 2015. ed.1, p.62. 2015.
- _____. Review of the state of world marine fishery resources. Fisheries and Aquaculture Resources Use and Conservation Division. Roma, 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/015/i2389e/i2389e.pdf>>. Acessado em: set.14.
- _____. Species Distribution Map. Roma, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/figis/geoserver/factsheets/species.html>. Acessado em: fev. 2016
- FERRIS, S. D.; BERG W. J. The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and management. In: *Population Genetics and Fisheries Management*. University of Washington Press, Seattle, WA, pp. 277-301, 1987.
- FERRIS, S.D.; SAGE, S.D.; HUANG, C.M.; NIELSEN, J.T.; RITTE, U; WILSON, A.C. Flow of mitochondrial DNA across species boundary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 80:2290-2294, 1983.
- FOLMER, O. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*, v.3, p.294-299, 1994.

- GASALLA, M.A.; MARQUES, C.A. Contribuição ao estudo do ciclo reprodutivo da lula *Loligo plei* (Cephalopoda: Loliginidae) no Sudeste do Brasil. Anais da XII Semana Nacional de Oceanografia, Itajaí. p. 673-675, 2000.
- GRAVES, J.E. Molecular insights into the population structure of cosmopolitan marine fishes. *Journal of Heredity*, 89, 427–437, 1998.
- HAIG, S.M. Molecular contribution conservation. *Ecology*, 79:413-425, 1998.
- HALL, M.A.; ALVERSON, D.L.; METUZALS, K.I. By-catch: problems and solutions. *Marine Pollution Bulletin*, Oxford, 41: 204-219, 2000.
- HANLON, R.T.; MESSENGER, J.B. *Cephalopodes Behaviour*. Greta britan, Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- HAIMOVICI, M.; ANDRIGUETTO, J. M. Cefalópodes Costeiros Capturados na Pesca de Arrasto do Litoral Sul do Brasil. *Arquivo Biológico Tecnológico*, v.23, n.3, p.473-495, 1986.
- HEADS, M. Towards a panbiogeography of the seas. *Biological Journal of the Linnean Society* 84, 675-723, 2005.
- IGARASHI, M.A. Situação atual e o potencial para o desenvolvimento do cultivo de polvo no Brasil. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.*, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 417-427, out./dez. 2010.
- KEARSE M, MOIR R, WILSON A, STONES-HAVAS S, CHEUNG M, STURROCK S, BUXTON S, COOPER A, MARKOWITZ S, DURAN C. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649, 2012.
- KELLEHER K. Discards in the World's Marine Fisheries An Update. *FAO Fish. Tech. Paper* 470. FAO, Rome. 131 pp., 2005.
- KNOELLER, J.M.; TOMÁS, A.R.G.; CALTABELLOTTA, F.P; VASKE JUNIOR, T. Morfometria e pigmentação dos bicos do polvo *Eledone massyae* (cephalopoda: octopodidae). *Revista Ceciliana* Dez 6(2): 21-23, 2014.
- KUUSIPALO, L. Genetic differentiation of endemic nile perch *Lates niloticus* (Centropomidae, Pisces) populations in Lake Tanganika suggested by RAPD markers. *Hydrobiologia*. 407: 141-148. 1999.
- LI, M; WEI, F; GOOSSENSE, B; FRENG, Z; TAMATE, H.B.; BRUFORD, M.W.; FUNK, S.M. Mitochondrial phylogeography and subspecific variation in the red panda (*Ailurus fulgens*): Implication for conservation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36:78-89, 2005.

- LÜ, Z.; LI, Q.; LI, H.; WU, C.W. Deep Phylogeographic Break Among *Octopus variabilis* populations in China: Evidence from Mitochondrial and nuclear DNA analyses. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 51, p. 224-231, 2013.
- LUCAS, A.J., GUERRERO, R.A., MIANZAN, H.W., ACHA, E.M. E LASTA, C.A. Coastal oceanographic regimes of the northern Argentine continental shelf (34-43 S). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 65, 405-420, 2005.
- MALTAGLIATI, F.; BELCARI, P.; CASU, D.; CASU, M.; SARTOR, P.; VARGIU, G.; CASTELLI, A. Allozyme genetic variability and gene flow in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda, Octopodidae) from the Mediterranean Sea. *Bulletin of Marine Science*, v. 71, n.1, p. 473-486, 2002.
- MIRANDA, L. B. de; CASTRO, B. M.de; KJERFVE, B. Princípios de oceanografia física de estuários. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.
- MIRANDA, T.P; MARQUES, A.C. Abordagens atuais em biogeografia marinha. *Revista da Biologia* (2011). Vol. Esp.Biogeografia:41-48, 2011.
- MOREIRA, A.A.; TOMÁS, A.R.G.; HILSDORF, A.W.S. Evidence for genetic differentiation of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) fishery populations from the southern coast of Brazil as revealed by microsatellites. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.407, n.1, p.34-40, 2011.
- MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W.M. Evolution of animals mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann Rev Eol Syst.* 18:269-292, 1987.
- MYERS, A.A. Biogeographic barriers and the development of marine biodiversity. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 44, 241-248, 1997.
- ONG, T.L.; STABILE, J; WIRGIN, I; WALDMAN, J.R. Genetic divergence between *Cipenser oxyrinchus* and *A. o. desotoi* as assessed by mitochondrial sequencing analysis. *Copeia*. 464-469, 1996.
- ORTÍ, G.; PETRY, P.; PORTO, J.I.R.; JÉGO, M.; MEYER, A. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *J Mol Evol.*, v.42, p.169-182, 1996.
- PATERNELLO T.; MARCATO S.; ZANE L.; VAROTTO V.; BARGELLONI L. Phylogeography of the *Chionodraco* genus (Perciformes, Channichthyidae) in the Southern Ocean. *Molecular Phylogenetics Evolution*, v.28, p.420-429, 2003.
- PERDICES A.; CUNHA C.; COELHO M. M. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequence. *Molecular Phylogenetics Evolution*, n.31, p.192-203, 2004.

- PEREZ J.A.A. Distribuição, Reprodução e Alimentação de *Eledone massyae* e *Eledone gaucha* (Cephalopoda: Octopodidae), no Sul do Brasil. 1990. 145p. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade do Rio Grande. Rio Grande-RS, 1990.
- PEREZ, J.A.A., HAIMOVICI, M.; COUSIN, J.C.B. Sperm storage mechanisms and fertilization in females of two south american Eledonids (Cephalopoda: Octopoda). *Malacologia*, v.32, n.1, p.147-154, 1990.
- PEREZ, J.A.A.; HAIMOVICI, M. Sexual maturation and reproductive cycle of *Eledone massyae*, Voss, 1964 (Cephalopoda:Octopodidae) in southern Brazil. *Bulletin of Marine Science*, v.49, n.1-2, p.270-279, 1991.
- PEREZ, J.A.A., HAIMOVICI, M.; SANTOS, R.A. Observations on the reproductive biology of the octopod *Eledone gaucha* Haimovici, 1988, in southern Brazil. *American Malacological Bulletin*, v.14, n.1, p.81-84, 1997.
- PESTANO, J; BROWN, R.P. Geographical structuring of mtDNA in *Chalcides sexlineatus* within the island of Gran Canaria. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 266, 815–823, 1999.
- PIOLA, A.R.; MATANO, R.P.; PALMA, E.; MOLLER', J.R.; OO, E.; CAMPOS, E.J.D. The influence of the Plata river discharge on the western South Atlantic Shelf. *Geoph. Res. Letters*. 32: 1-4, 2005.
- ROGERS, A.R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569, 1992.
- ROPER, C.F.E.; SWEENEY, M.J.; NAUEN, C.E. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. *FAO Fisheries Synopsis*, 125(3):277pp, 1984.
- SAILA, S. B. Importance and Assessment of Discards in Commercial Fisheries. Mit 11 tables, 62 pp. Rome: October 1983.
- SAITOH, K; MIYA, M; INOUE, J.G.; ISHIGURO, N.B.; NISHIDA, M. Mitochondial genomes of ostariophysan fishes: Perspectives on phylogeny and biogeography. *J Mol Evol*. 56:464-472, 2003.
- SALES, J.B.L.; REGO, P.S.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, A.A.; HAIMOVICI, M.; TOMÁS, A.R.G.; BATISTA, B.B.; MARINHO, R.A.; MARKAIDA, U.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Phylogeographical Features of *Octopus vulgaris* and *Octopus insularis* in the Southeastern Atlantic Based on the Analysis of Mitochondrial Markers. *Journal of Shellfish Research*, v.32, n.2, p. 325-339, 2013.

- SANETRA, M; CROZIER, R.H. Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomyrmecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Mol Ecol.* 12: 2281-2295, 2003.
- SANGER, F., NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.
- SANJUAN, A.; PÉRES-LOSADA, M.; GUERRA, A. Genetic differentiation in three *Sepia* species (Mollusca: Cephalopoda) from Galician waters (north-west Iberian Peninsula). *Marine Biology*, v.126, p.253-259, 1997.
- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and geography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South american rivers. *Mol Ecol.* 10: 407-417, 2001.
- SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science.* 236:787-792., 1987.
- SLATKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium population. *Evolution.* 47: 264-279, 1993.
- SMITH, P.J.; JAMIESON, A.; BIRLEY, A.J. Eletrophoretic studies and stock concept in marine teleosts. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 47: 231-328, 1990.
- STEPIEN, C.A.; FABER, J.E. Population genetic structure, Philogeography and spawning philopatry in walleye (*Stizostedion vitreum*) from mitochondrial DNA control region sequences. *Mol Ecol.* 7: 1757-1769, 1998.
- STRUGNELL J.; NISHIGUCHI M. K. Phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) inferred from three mitochondrial and six nuclear loci: a comparison of alignment, implied alignment and analysis methods. *Journal of Molluscan Studies*, v.73, n.4, p.399-410, 2007.
- SZYMURA, J.M.; SPOLSKY, C.; UZZELL, T. Concordant change in mitochondrial and nuclear gene in a hybridzone between two frog species (genus *Bombina*). *Experientia.* 41:1469-1470, 1986.
- TAMURA K.; STECHER G.; PETERSON D.; FILIPSKI A.; KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v.30, p.2725-2729, 2013.
- THACKER, C.E. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidae). *Mol Phylogenet Evol.* 26: 354-368, 2003.

- TOLEDO-FILHO S.; ALMEIDA-TOLEDO L. F.; FORESTI F.; GALHARDO E.; DONOLA E. Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. São Paulo: editora USP, v. 39, 1992.
- TOMÁS, A.R.G.; CARNEIRO, M.H. e GASALLA, M.A. A pesca do polvo (*Octopus vulgaris*) pela frota industrial de camarão-rosa desembarcada em Santos, SP. In. Resumos da 3a Reunião Especial da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), Brasil, 1 – 4 maio, 1996: 165-166, 1996.
- TOMÁS, A.R.G. Dinâmica populacional e avaliação de estoques do polvo comum *Octopus cf. vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca, Cephalopoda, Octopodidae) no sudeste e sul do Brasil. 2002. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2002. p.482, 2002.
- VASKE JR.T., COSTA, F. A. P. Lulas e Polvos da Costa Brasileira. Coleção Habitat, vol 5. Fortaleza, UFC/Labomar/NAVE. 181 p. 2011.
- VOSS, G. L. The biogeography of the deep-sea Octopoda. *Malacologia*, 29: 295–307, 1988.
- WARD, R.D; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding Australia’s fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 20, 2005.
- WRIGHT S. The genetical structure of populations. *Annals of eugenics* 15: 323-354, 1949.
- WRIGHT S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*: 395-420, 1965.
- WRIGHT S. Variability Within and Among Natural Populations. *Evolution and the Genetics of Populations*. University of Chicago Press, Chicago, IL. 1978.