



**Contribuição da reprodução sexuada e assexuada e conectividade  
entre populações da estrela-do-mar *Coscinasterias tenuispina*  
(Lamarck, 1816) na costa do Estado do Rio de Janeiro.**

Bárbara Feital Fonseca



Dissertação apresentada a Pós-Graduação em Ciências (Zoologia) do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas - Zoologia.

Rio de Janeiro

2015

**Contribuição da reprodução sexuada e assexuada e conectividade  
entre populações da estrela-do-mar *Coscinasterias tenuispina*  
(Lamarck, 1816) na costa do Estado do Rio de Janeiro.**

Bárbara Feital Fonseca

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientador: Dr. Carlos Renato Rezende Ventura

Banca examinadora:

---

Presidente, Prof. Dr. Carlos Renato Rezende Ventura (MN/UFRJ)

---

Prof. Dr. Edson Pereira da Silva (UFF)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christine Ruta (UFRJ-Macaé)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Passeri Lavrado (UFRJ)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Claudia dos Santos Brasil (UFRRJ)

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2015

Esta dissertação foi desenvolvida no  
Laboratório de Equinodermatologia  
do Departamento de Invertebrados  
do Museu Nacional – UFRJ.

Orientador:  
Prof. Dr. Carlos Renato Rezende Ventura

Departamento de Invertebrados  
Museu Nacional – UFRJ

Foto da capa: Espécime de *Coscinasterias tenuispina*.

## Ficha Catalográfica

**FONSECA, Bárbara Feital**

Contribuição da reprodução sexuada e assexuada e conectividade entre as populações da estrela-do-mar *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816) na costa do Estado do Rio de Janeiro. / Bárbara Feital Fonseca. Rio de Janeiro: UFRJ, Museu Nacional, 2015. xv, 64f.:i l.; 29,7cm.

Orientador: Dr. Carlos Renato Rezende Ventura

Dissertação (Mestrado). UFRJ/MN/Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), 2012.

Referências bibliográficas: f.52-64

1. Asteroidea. 2. Genética de Populações. 3. Microssatélites. 4. COI. 5. Clonalidade. 6. Desenvolvimento Embrionário.

I. Ventura, Carlos Renato Rezende. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia). III. Contribuição da reprodução sexuada e assexuada e conectividade entre as populações da estrela-do-mar *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816) na costa do Estado do Rio de Janeiro.

Se amanhã o que eu sonhei não for bem aquilo, eu tiro um arco-íris da cartola. E refaço. Colo. Pinto e bordo. Porque a força de dentro é maior. Maior que todo mal que existe no mundo. Maior que todos os ventos contrários. É maior porque é do bem. E nisso, sim, acredito até o fim.

Caio Fernando Abreu

A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte.

Albert Einstein

## **Agradecimentos**

É impossível desenvolver uma dissertação sem a participação e/ou colaboração de outras pessoas. Foram dois anos gratificantes, de muito aprendizado e desafios em um mundo completamente novo para mim. Muitas pessoas contribuíram de forma essencial para a conclusão desse trabalho e, por isso, faço questão de expressar a elas meu sincero agradecimento.

Aos meus pais e ao meu irmão que sempre foram meus amigos, meus exemplos e meus alicerces. E que nunca interferiram nas minhas escolhas, por mais difíceis que fossem. Obrigada por todo amor, educação, apoio, confiança e valores que deram. Cada passo que eu dou é pensando em, um dia, dar muito orgulho a vocês.

Aos meus familiares que sempre estiveram presentes, torcendo por mim e que sempre me rodearam de muito carinho. Agradecimento especial para tia Narda, a qual apesar da constante correria que a sua profissão de médica exige, sempre foi um anjo para todos nós; minha prima Joca que sempre me ensina muito com sua doçura e amizade; minha cunhada Isabelle, que sempre me apóia e vibra comigo a cada conquista (não poderia desejar melhor pessoa para o meu amado irmão); minha avó Odete por todas as rezas e boas energias transmitidas; minha prima Cynthia, por sempre estar tão perto de mim mesmo morando tão longe (somos a prova que amizade independe de proximidade); minha tia do coração, Ilana, que onde quer que ela esteja eu sei que está me apoiando como sempre fez.

Ao meu grande orientador e amigo Renato Ventura, por toda dedicação e confiança no meu trabalho. Pelos estímulos nos momentos de desânimo, pelas agradáveis coletas (e conversas) e por ter me apresentado o “mosquitinho da ciência”. Pois é, fui picada durante a monografia e como resultado saiu essa dissertação. O maior incentivador e responsável disso tudo.

À toda equipe do laboratório: Mariana, Elínia, Marcela, Vanessa, Alanna, Fernanda, Jéssica, Gilmar e Marcira. Vocês tornam o ambiente de trabalho ainda mais prazeroso. Obrigada pela agradável e divertida companhia. Além de muitas outras coisas, aprendi o que é parceria de verdade e também fiz amigos de verdade. Obrigada por toda ajuda, pelas conversas diárias, desabafos, gargalhadas e tudo mais. Sei que alguns nomes que citei não estão mais no laboratório, mas podem ter certeza que continuam e sempre vão continuar fazendo parte dele. Um agradecimento especial à Mari, minha grande companheira durante os meses trabalhando em

Arraial e a qual me ensinou muito também; e para Elínia que teve muita paciência de me ajudar com a parte da genética entre tantas outras contribuições que fizeram muita diferença.

Ao professor Paulo Paiva e todo o Laboratório de Polychaeta da UFRJ, por todo o suporte com a parte molecular e pela constante ajuda que oferece não só a mim, mas a toda a nossa equipe.

À Universidade de Barcelona, em especial ao Alex e a Rocío, também pela cooperação com a parte molecular. Foi uma troca extremamente positiva para mim.

Ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira por ter me acolhido durante alguns meses e ter possibilitado o sucesso da fertilização *in vitro* depois de muitas tentativas frustrantes. Em especial, queria agradecer à querida Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Souza Martins, por toda a experiência que compartilhou comigo e com a Mari. Por todas as conversas e apoio que nos ofereceu. Esse tempo no IEAPM me presenteou com uma grande amiga.

Queria agradecer aquelas que, muito além de amigas de escola são amigas para vida toda: May, Naty Rente, Isa, Pri, Kaká, Deh, Kikinha e Zelius. Não importa os diferentes caminhos que escolhemos, vocês estão sempre ao meu lado me apoiando, compartilhando os risos e os choros. E tenho certeza que assim sempre será.

Ao Pudim: Aline, Fiat, Gisa, Glica, Natita, Lívia e Patrícia. Vocês foram um verdadeiro presente da Biologia UFRJ. Obrigada por sempre garantirem os momentos mais divertidos! Companheiros de profissão e da vida. Me orgulho muito de cada um de vocês. É nós, Moscada!

Ao meu xodó querido, Stop, por sempre dar um jeitinho de colorir ainda mais a minha vida. Ao Prost, por sempre ser esse grande amigo. Ao Axel, que além de ter tido paciência de estudar comigo (sem a qual eu não teria conseguido passar) ainda foi meu grande companheiro e me ajudou muito ao longo do mestrado todo, uma grande amizade que ganhei!

Ao Gabe, por fazer parte disso tudo em todos os momentos. Por ser, acima de tudo, verdadeiro amigo e companheiro. Por sempre estar ao meu lado me incentivando; e por ter contribuído diretamente para essa dissertação, seja me ajudando com as fórmulas ou ficando comigo até de madrugada no skype me ajudando com a formatação.

À Capes pela bolsa de auxílio à pesquisa.

Aos exemplares de “Coscinas” que sacrifiquei.

À todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão de mais esta etapa de minha vida, um muitíssimo obrigada!

## RESUMO

Contribuição da reprodução sexuada e assexuada e conectividade entre as populações da estrela-do-mar *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816) na costa do Estado do Rio de Janeiro.

Bárbara Feital Fonseca

Orientador: Dr. Carlos Renato Rezende Ventura

Resumo da Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

A estrela-do-mar *Coscinasterias tenuispina* reproduz-se sexuada e assexuadamente por fissão. Essas formas de reprodução acarretam efeitos diretos na constituição genética das populações. Para estimar a contribuição de ambos os modos de reprodução em quatro populações de *C. tenuispina* no litoral do Rio de Janeiro (Praia da Tartaruga, Praia da Ferradura, Prainha e Itaipu) e a conectividade entre elas, foram realizadas análises moleculares da sequência de DNA mitocondrial (COI) e microssatélites. Os resultados mostraram a maior contribuição da reprodução assexuada em todas as populações analisadas, sendo a população de Itaipu a que possui menor diversidade genotípica amostrada (95,9% da população pertencem a um único genótipo multi-locos). Os dados obtidos corroboram evidências biológicas e populacionais, como a alta incidência de fissão, o desequilíbrio da razão sexual, os indícios de redução populacional e o baixo índice gonadal, registrados ao longo de 12 anos, em estudos pretéritos com as mesmas populações. Há alta conectividade entre as subpopulações da Praia da Tartaruga, Praia da Ferradura e Prainha (variação de  $F_{st}$  de 0,0005 a 0,0625). A população de Itaipu mostrou ser a mais estruturada (variação de  $F_{st}$  de 0,2402 a 0,3984), provavelmente, pela maior distância geográfica. A cronologia do desenvolvimento embrionário até o estágio de larva bipinária, até então nunca documentada, foi descrita. O estágio de blástula ocorre após 20 horas da fertilização e de gástrula durante as três horas seguintes (23 horas de vida). *Coscinasterias tenuispina* desenvolve larvas planctotróficas. A larva bipinária é formada no quarto dia após a fertilização e clivagens. A dificuldade de encontrar espécimes maduros e a fragilidade de embriões e larvas criados em laboratório são consideradas indicativos indiretos da menor frequência da reprodução sexuada nestas populações no ambiente natural.

Palavras-chave: Asteroidea, Genética de populações, Microssatélites, COI, Clonalidade, Desenvolvimento embrionário.

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2015

## ABSTRACT

Contribution of sexual and asexual reproduction and connectivity among populations of seastar *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816) on the Rio de Janeiro coast.

Bárbara Feital Fonseca

Orientador: Dr. Carlos Renato Rezende Ventura

Abstract da Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

The seastar *Coscinasterias tenuispina* is able to reproduce both sexual and asexually by fission. These types of reproduction cause direct effects on the genetic constitution of populations. Molecular analyses of mitochondrial DNA sequence (COI) and microsatellites were performed to estimate the contribution of both reproductive modes in four populations of this species along the Rio de Janeiro coast (at Ferradura Beach, at Tartaruga Beach, at Prainha Beach and Itaipu Beach) and to estimate the connectivity among them. The results showed a higher contribution of asexual reproduction in all populations analyzed. The population of Itaipu presented the lowest genetic diversity sampled (95.9% of population have unique multi-loci genotype). The data corroborate to biological evidences of high incidence of fission, sexual disequilibrium, signs of population density reduction and low gonad index, recorded over 12 years by previous studies on the same populations. The subpopulations of Ferradura Beach, Tartaruga Beach and Prainha Beach showed high connectivity. The population of Itaipu is the most structured, probably because of the largest geographical distance apart of other ones. The chronology of early development of *C. tenuispina* is firstly described. Blastula stage is achieved 20 hours after fertilization and gastrula is formed 3 hours later (23 hours of age). *C. tenuispina* develops planktotrophic larva. Bipinnaria is developed after the 4<sup>th</sup> day of age. Difficulties to find mature specimens in the environment and the fragility of embryos and larvae reared in laboratory are considered as indirect cues to the low frequency of sexual reproduction in these populations.

Key-words: Asteroidea, Population Genetics, Microsatellites, COI, Clonality, Embryonic Development

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2015

## SUMÁRIO

Ficha Catalográfica .....	iii
Agradecimentos .....	v
RESUMO .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiv
1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	9
2.1 Objetivo Geral .....	9
2.2 Objetivos Específicos .....	9
3. Material e Métodos .....	10
3.1. Locais e Métodos de Coleta .....	10
3.2. Métodos Moleculares .....	11
3.2.1 Microssatélites .....	13
3.2.2. Análise do gene mitocondrial Citocromo Oxidase .....	20
3.3. Estudo do Desenvolvimento Inicial .....	21
4. Resultados .....	24
4.1. Microssatélites .....	24
4.2. Citocromo Oxidase subunidade I .....	30
4.3. Cronologia do Desenvolvimento de <i>Coscinasterias tenuispina</i> .....	33
5. Discussão .....	37
5.1. Análise Molecular .....	37
Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação .....	37
Variação gênica entre as populações .....	40
Análise da Clonalidade .....	42
5.2. Desenvolvimento Inicial de <i>Coscinasterias tenuispina</i> .....	47
6. Conclusões .....	51
7. Referências Bibliográficas .....	52

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Espécime de *Coscinasterias tenuispina* em ambiente natural. .... 6
- Figura 2** - Localização das áreas amostradas no Estado do Rio de Janeiro entre as coordenadas 22° 45'S - 41° 54'W e 22° 59'S - 43° 04'W. N= Sentido do norte geográfico. Escala = 20 km. 10
- Figura 3** - *Coscinasterias tenuispina*. A- Braço com a gônada feminina (salmão) exposta. B - Braço dissecado mostrando a gônada masculina (amarelada) e cecos pilóricos. .... 21
- Figura 4** - *Coscinasterias tenuispina* – Observação das gônadas em lupa. A- Gônada masculina em processo de liberação dos espermatozoides. B- Gônada feminina liberando ovócitos. .... 22
- Figura 5** - Proporção dos genótipos multi-locos idênticos (MLGs) em cada uma das populações Praia da Ferradura, n = 21; Praia da Tartaruga, n = 22; Prainha, n = 24; Praia de Itaipu, n = 24). Cada MLG em comum nas diferentes populações foi representado pelo mesmo número e pela mesma cor. .... 29
- Figura 6** - Dendrograma obtido pela análise de Máxima Verossimilhança a partir das sequências de COI de cada indivíduo de *C. tenuispina*. Os números nos ramos indicam o valor de *bootstrap*. Grupo externo: *Asterias amurensis*. .... 32
- Figura 7** - *Coscinasterias tenuispina* – Óvulo circundado por camada gelatinosa. Escala = 0,05mm. .... 34
- Figura 8** - *Coscinasterias tenuispina*- A- Embrião com membrana de fertilização indicada pela seta. B- Primeira clivagem do embrião. C- Segunda clivagem do embrião. D- Estágio adiantado de clivagem. E- Estágio final das clivagens. F- Estágio de blástula. G- Início de uma gástrula com o blastóporo, indicado pela seta. H- Final de uma gástrula com o arquêntero alongado, indicado pela seta. I- Início da formação de uma larva bipinária, visão lateral. J- Início da formação de uma larva bipinária com enterocéles direita e esquerda indicadas pelas setas, visão frontal. L- Larva bipinária com trato digestório completo, visão lateral. M- Larva bipinária com trato digestório completo e ânus indicado pela seta, visão frontal. N- Larva bipinária com eixo ântero-posterior mais alongado e com distinção visível entre o estômago (indicado pela seta branca) e o esôfago (indicado pela seta amarela), visão lateral. O- Larva bipinária eixo ântero-posterior mais alongado, visão frontal. Escalas = 0,1mm. .... 35

**Figura 9** - *Coscinasterias tenuispina* – A-Início da formação de uma larva bipinária com células mesenquimais (indicadas pela seta) migrando da ponta do arquêntero em direção a blastocele, visão lateral. B- Início da formação de uma larva bipinária com células mesenquimais (indicadas pela seta) saindo da ponta do arquêntero em direção a blastocele, visão frontal. Escalas = 0,05mm. .... **36**

**Figura 10** - *Coscinasterias tenuispina* - A- Óvulos. B- Transição entre gástrula e larva bipinária com blastóporo (indicado pela seta amarela) e cílios (indicado pela seta branca) evidentes. C- Larva bipinária com trato digestivo completo e boca evidente indicada pela seta, visão frontal. D- Larva bipinária com trato digestivo completo, visão lateral. .... **36**

**Figura 11** - Índice gonadal (IG) máximo de diferentes espécies de asteróides ao longo dos meses. Dados atuais e pretéritos de *C. tenuispina*, de outras espécies do gênero *Coscinasterias*, de espécies que ocorrem na mesma região (*E. (O.) brasilensis*, *Asterina stellifera*) e em ambientes semelhantes (*E. (O.) guyanensis*, em Vitória - E.S.). .... **44**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Lista dos <i>loci</i> caracterizados para a espécie <i>Coscinasterias tenuispina</i> . Estão apresentados os <i>motifs</i> microssatélites e os tamanhos dos alelos em pares de base (pb). Dados retirados de GARCIA-CISNEROS <i>et al.</i> (2013). .....	<b>13</b>
<b>Tabela 2</b> – Frequências alélicas verificadas nos <i>loci</i> polimórficos encontrados em <i>C. tenuispina</i> . .....	<b>24</b>
<b>Tabela 3</b> – Valores de P significativos para desequilíbrio de ligação entre os pares de locos das populações da Praia da Ferradura e Prainha. ....	<b>25</b>
Tabela 4 - Valores de número médio de alelos por loco ( $N_a$ ) e de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) para <i>Coscinasterias tenuispina</i> em cada localidade amostrada. A= População da Ferradura; B= População da Tartaruga; C= População da Prainha e C= População de Itaipu. ....	<b>25</b>
<b>Tabela 5</b> - Estimativas de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (valores de P) para cada população de <i>Coscinasterias tenuispina</i> . S.E. = Erro padrão. $P < 0,05$ significativo. A= População da Ferradura; B= População da Tartaruga; C= População da Prainha e C= População de Itaipu. ....	<b>26</b>
<b>Tabela 6</b> - Estimativa do coeficiente de diferenciação populacional entre pares de populações, $F_{ST}$ , na parte abaixo da diagonal da matriz e da estimativa do fluxo gênico, $N_m$ , na parte superior. A= População da Ferradura; B= População da Tartaruga; C= População da Prainha e D= População de Itaipu.....	<b>26</b>
<b>Tabela 7</b> -Genótipos multi-locos idênticos (MLGs) detectados nas populações amostradas, a partir do tipo de alelos (altura dos picos no eletroferograma) e o número de indivíduos que compartilham cada MLG em cada população. ....	<b>27</b>
<b>Tabela 8</b> -Quantidade de genótipos multi-locos idênticos (MLGs) presente em cada população; Valores de $P_{sex}$ e $P_{crítico}$ . *** = Valor significativo para ( $p < 0,01$ ); n.s. = valor não significativo. <b>28</b>	
<b>Tabela 9</b> - Estimativas da contribuição da reprodução sexuada e assexuada para as quatro populações de <i>C. tenuispina</i> separadamente e considerando todas as populações como uma só. $G_o$ = Índice de diversidade genotípica observada; $G_e$ = Diversidade genotípica esperada; $N_{go}$ = número de genótipos na população; $N$ = tamanho amostral; e $N^*$ = número de indivíduos sexualmente produzidos.....	<b>30</b>
<b>Tabela 10</b> – Valores da estimativa do coeficiente de diferenciação populacional ( $F_{ST}$ ) entre pares de populações, baseados nas sequências resultantes das ampliações do gene COI. *=significativo para $P > 0,05$ . .....	<b>31</b>

<b>Tabela 11</b> – Parâmetros de estimativa da reprodução sexuada e assexuada publicados para invertebrados marinhos. $G_o$ = diversidade genotípica observada; $G_e$ = diversidade genotípica esperada; $N_{go}$ = número de genótipos multi-locos únicos; $N^*$ = número de indivíduos sexualmente produzidos e $N$ = tamanho amostral. ....	<b>43</b>
<b>Tabela 12</b> – Cronologia do desenvolvimento das espécies <i>C. tenuispina</i> e <i>C. calamaria</i> . ....	<b>48</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

SSR - *Simple Sequence Repeats*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

COI - Subunidade 1 da Citocromo c Oxidase

DNA - Ácido desoxiribunocléico

BA - Bahia

SP - São Paulo

RJ - Rio de Janeiro

RAPD - *Randomly Amplified Polymorphic DNA*

°C - Graus Celcius

μL - Microlitro

mm- Milímetro

rpm - Rotação por minuto

M- Molar

mM - Milimolar

mL - Mililitro

km - Quilômetro

US- Unidade de salinidade

BSA - *Bovine Serum Albumin*

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

dNTP -Desorribonucleotídeo trifosfatado

pb - Pares de base

EHW- Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Ho - Heterozigosidade observada

He - Heterozigosidade esperada

N<sub>a</sub>- Número médio de alelos por loco

MLG- Genótipo multi-locos

P<sub>sex</sub>- probabilidade de encontrar tantos indivíduos com o mesmo genótipo quanto aquele esperado numa população panmítica

P<sub>crítico</sub> - probabilidade total de obter indivíduos com um mesmo genótipo via reprodução sexuada

$G_o$  - Índice de diversidade genotípica observada

$G_e$  - Índice de diversidade genotípica esperada

$N_{go}$  - número de genótipos na população

$N$  - tamanho amostral

$N^*$  - número de indivíduos sexualmente produzidos.

$F_{st}$  - Estimativa de distância genética

$N_m$  - Estimativa de fluxo gênico

IEAPM - Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

S.E - Erro padrão

n.s - Não significativo

EGE — Estrutura Genética Espacial

% - Porcentagem

IG- Índice gonadal

h- Hora

cels - Células

## 1. Introdução

O filo Echinodermata é composto por invertebrados exclusivamente marinhos e, em sua maioria, bentônicos que habitam, predominantemente, o infralitoral. São muito abundantes e morfologicamente diversificados. São características deste filo: a simetria radial pentâmera, o sistema hidrovacular celômico, o tecido conjuntivo mutável e o esqueleto interno composto de ossículos calcários. Há, atualmente, cerca de 7000 espécies distribuídas em cinco classes: Crinoidea, Asteroidea, Ophiuroidea, Echinoidea e Holoturoidea (RUPPERT & BARNES, 1996; SMITH, 1992; BRUSCA & BRUSCA, 2002).

Os equinodermos possuem uma variedade de modos reprodutivos, incluindo mecanismos sexuais e assexuais. Estratégias de reprodução desempenham um fundamental papel evolutivo e têm importantes efeitos ecológicos nos ecossistemas dos invertebrados marinhos (EMSON & WILKIE, 1980).

A reprodução sexuada, na maioria dos equinodermos, envolve a produção de gametas, sua liberação na água do mar e, posteriormente, a fertilização, o desenvolvimento de fases larvais, a metamorfose e o recrutamento. Esse tipo de reprodução é responsável pela maior dispersão geográfica das espécies e pela recombinação genética, que promove a variabilidade. Esta variabilidade pode favorecer a capacidade de exploração espacial e temporal do habitat e facilitar a adaptação em ambientes mais instáveis (HURST & PECK, 1996). A reprodução sexuada é a mais comum entre as espécies do filo (LLODRA, 2002).

Considerando o modo de nutrição, as larvas podem ser classificadas em lecitotróficas, planctotróficas ou planctotróficas facultativas (MCEDWARD & CHIA, 1991; MCEDWARD & JANIES, 1993). Espécies com desenvolvimento lecitotrófico produzem um pequeno número de ovócitos grandes, ricos em vitelo, o qual subsidiará a posterior nutrição das larvas. Estas

possuem curta permanência na coluna d'água. Já as espécies com desenvolvimento planctotrófico produzem um grande número de ovócitos pequenos e com pouco vitelo. Logo, necessitam de fontes nutricionais exógenas obtidas em suspensão na coluna d'água. Assim, possuem maior permanência na coluna d'água e, conseqüentemente, um potencial de dispersão maior (STRATHMANN, 1985; MCEWARD & CHIA, 1991; MCEWARD & JANIES, 1993). Espécies planctotróficas facultativas são aquelas cujas larvas têm a capacidade de ingerir e digerir alimentos em partículas, e se beneficiarem a partir da digestão desse alimento. Porém, não necessitam de alimentação exógena para completar o desenvolvimento até a metamorfose. Os benefícios da alimentação durante o desenvolvimento planctotrófico facultativo incluem o aumento da sobrevivência larval, um longo período de competência metamórfica, o aumento do tamanho das larvas, o aumento do tamanho do juvenil e a capacidade de abreviar o tempo de desenvolvimento desde a fecundação até a metamorfose (ALLEN & PERNET, 2007).

Na reprodução assexuada (ou clonal) não ocorre fecundação, ou seja, há produção de indivíduos geneticamente iguais. Já foram descritas diferentes formas de reprodução assexuada em equinodermos, tanto na fase adulta como na fase larval, como: partenogênese ameiótica, autotomia de larvas e adultos e fissão (JAECKLE, 1994; MLADENOV, 1996). O mecanismo de reprodução assexuada mais comum dentre os equinodermos é a fissão. Nesta, ocorre divisão do corpo em duas partes, cada uma capaz de regenerar um novo indivíduo (CROZIER, 1920; EMSON & WILKIE, 1980; RUBILAR *et al.*, 2005). Neste processo, a dispersão geográfica é limitada, pois não há formação de larvas capazes de dispersarem. Fatores populacionais e ambientais, como disponibilidade de alimento, baixa densidade populacional, altos níveis de predação e variação na temperatura da água do mar podem provocar o aumento da incidência da reprodução assexuada (GEORGIADIS *et al.*, 2006). Como vantagens, a reprodução clonal promove a rápida

amplificação dos genótipos bem adaptados às condições locais e produz indivíduos já adultos, capazes de produzir gametas (MLADENOV & EMSON, 1990; MLADENOV, 1996; DUCATI *et al.*, 2004), permitindo maior sobrevivência dos recrutas (clones) (VENTURA *et al.*, 2004). A fissão ocorre apenas nas espécies das classes Asteroidea, Ophiuroidea e Holothuroidea (MLADENOV, 1996).

A classe Asteroidea, conhecida como estrelas-do-mar, é composta por animais de vida livre. Por serem predadores de topo, em sua maioria, possuem um papel importante na dinâmica das comunidades de invertebrados marinhos e na manutenção do equilíbrio da diversidade dessas comunidades (CLARK & DOWNEY, 1992; HENDLER *et al.*, 1995). Algumas espécies de asteróides são capazes de se reproduzir sexuada e assexuadamente. Apenas poucas espécies de asteróides são capazes de realizar fissão espontânea (EMSON & WILKIE, 1980). Existem em torno de 1600 espécies de estrelas-do-mar pertencentes a cinco ordens (Paxillosida, Platyasterida, Spinulosida, Valvatida e Forcipulatida) e que estão divididas em 30 famílias. Apenas 23 espécies de quatro dessas famílias (Asteriidae, Asterinidae, Echinasteridae e Solasteridae) são fissíparas (CLARK, 1967; CLARK & DOWNEY, 1992). A reprodução sexuada e assexuada têm diferentes consequências para o recrutamento. O potencial de dispersão e sobrevivência varia muito, dependendo do modo de reprodução. O balanço entre a dispersão e a sobrevivência pode moldar as diferenças entre as populações locais no que diz respeito à variabilidade genética e o isolamento geográfico (VENTURA *et al.*, 2004). Essas formas de reprodução acarretam um efeito direto na constituição genética das populações e, portanto, são consideradas muito importantes para o sucesso adaptativo das espécies.

Nas estrelas-do-mar, o ciclo da reprodução sexuada pode ser estimado através do peso relativo das gônadas (índices gonadais) e através de cortes histológicos destas, que aferem os

estágios gametogênicos ao longo do ciclo (GEORGIADIS *et al.*, 2006). Já a reprodução assexuada é aferida pela ocorrência de fissão, estimada pela contagem de indivíduos recentemente fissionados, em regeneração e intactos (ALVES *et al.*, 2002; HARAMOTO *et al.*, 2006). Apesar do índice gonadal fornecer evidências para a ocorrência da reprodução sexuada, ele não fornece provas de recrutamento larval para as populações locais, pois as larvas podem morrer ou se dispersar. Devido à dispersão, até mesmo as populações locais sem reprodução sexuada podem receber recrutamento larval significativo de outras populações. Considerando estes fatos, a abordagem genética oferece informações úteis sobre a contribuição da reprodução assexuada e sexuada para a manutenção das populações (JOHNSON & THRELFALL, 1987). Exemplos dos efeitos contrastantes de diferentes modos de reprodução sobre a composição genética de populações marinhas são fornecidos por vários estudos de anêmonas-do-mar (por exemplo, BLACK & JOHNSON, 1979; SHICK *et al.*, 1979; AYRE, 1983; HOFFMAN, 1986) e corais (por exemplo, STODDART, 1984; HEYWARD & STODDART, 1985; AYRE & RESING, 1986). Estudos de genética de populações fornecem medidas de diversidade genotípica que permitem estimar, em uma população, a quantidade de indivíduos clonais gerados por reprodução assexuada e indivíduos geneticamente diferentes gerados por reprodução sexuada (COFFROTH *et al.*, 1992).

A taxa de evolução é um dado importante na escolha do gene para resolver questões filogenéticas, taxonômicas e de genética de populações. Quando se pretende comparar categorias muito próximas, como por exemplo, indivíduos da mesma espécie, é apropriado o uso de marcadores com taxas de substituições mais altas (SACCONE, 1994).

Os marcadores do tipo microssatélites, também conhecidos como *Simple Sequence Repeats*- SSR, consistem em repetições de um a seis pares de base em sequência e podem ser encontradas em todo o genoma, especialmente em regiões intergênicas (entre genes) e íntrons

(regiões não codificadoras de proteínas) (ELLEGREN, 2004). Tais regiões podem ser amplificadas pela técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction*– PCR) através de iniciadores (*primers*) elaborados especificamente para a sequência flanqueadora de cada marcador (*locus*) obtida através do sequenciamento de fragmentos do genoma estudado. A diferença no tamanho dos produtos de PCR obtidos, ou seja, o polimorfismo observado se deve tanto à inserções quanto deleções as quais alteram o número de repetições do microssatélite, gerando um número potencialmente elevado de alelos. Um *locus* de microssatélite geralmente varia de 5 a 40 repetições (ou *motifs*), mas números maiores podem acontecer (LI *et al.*, 2002; ELLEGREN, 2004; SELKOE & TOONEN, 2006). Os microssatélites têm sido considerados os marcadores ideais para os estudos de genética de populações por apresentarem alto grau de polimorfismo, expressão codominante, presença abundante em todo o genoma e relativa facilidade de execução técnica (LEHMAN *et al.*, 1996).

A subunidade 1 da Citocromo c Oxidase (COI) do DNA mitocondrial é parte de um complexo gênico codificante de proteínas transmembranas, envolvidas no transporte elétrico e catálise da cadeia respiratória de organismos eucariotos. Por sua universalidade e importância evolutiva, este gene vem sendo alvo de estudos populacionais de variabilidade genética. Possui sequências nucleotídicas conservadas interespecificamente e variáveis quando se compara as mesmas espécies, possibilitando o estudo comparativo dessas sequências. Estas regiões também podem ser amplificadas pela técnica de PCR (PALUMBI, 1996).

A ordem Forcipulatida abrange quatro famílias: Asteroiidae, Heliasteridae, Zoroasteridae e Brisingidae. Entre os gêneros pertencentes à família Asteroiidae está o gênero *Coscinasterias* Verrill, 1870. Este é considerado monofilético e é composto por quatro espécies atuais que se reproduzem tanto sexuadamente quanto assexuadamente. A distribuição do gênero é ampla:

*Coscinasterias acutispina* (Stimpson, 1862) e *Coscinasterias muricata* Verrill, 1870 são encontradas nos oceanos Índico e Pacífico; *Coscinasterias calamaria* (Gray, 1840) e *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816) no oceano Atlântico. A dispersão larval é considerada o principal mecanismo biogeográfico que explica a ampla distribuição dessas estrelas-do-mar (WATERS & ROY, 2003). No entanto, alta variação genética tem sido encontrada entre as populações destas espécies (JOHNSON & THRELFALL, 1987; SKÖLD *et al.*, 2003) sugerindo que elas não sejam panmíticas. Espécies fissíparas desse gênero são facilmente identificadas pela presença de braços com comprimentos assimétricos (WALTER & ROY, 2003).

*Coscinasterias tenuispina* (Figura 1) habita substratos rochosos e possui uma ampla distribuição geográfica, porém descontínua, sendo encontrada no Mar Mediterrâneo, Bahamas e na costa sudeste do Brasil, de Salvador (BA) a Santos (SP) (CLARK & DOWNEY, 1992). No entanto, segundo WATERS & ROY, (2003) populações do Brasil, Bahamas e do Mediterrâneo são próximas filogeograficamente, ou seja, exibem um alto grau de conectividade, o que sugere dispersão em longas distâncias. Entretanto, tais resultados foram baseados em poucos espécimes amostrados por localidade e por apenas um marcador molecular (COI).



**Figura 1** - Espécime de *Coscinasterias tenuispina* em ambiente natural.

Por ser uma espécie fissípara, não é raro encontrar indivíduos de *C. tenuispina* com seis a nove braços assimétricos e múltiplos madreporitos, variando de um a cinco (CROZIER, 1915). Esta espécie possui um ciclo gonadal anual, com um período de liberação de gametas mais prolongado (quatro meses) do que outras espécies da região como *Asterina stellifera* e *Astropecten brasiliensis* (VENTURA *et al.*, 1997; ALVES *et al.*, 2001; CARVALHO & VENTURA, 2002).

Populações de *C. tenuispina* no litoral do Rio de Janeiro vêm sendo estudadas pela equipe do Laboratório de Echinodermata do Museu Nacional durante os últimos 12 anos. Foi observada uma grande queda na abundância populacional da espécie (de 86%) quando se comparam dados de estudos realizados entre 1997 e 2000 (ALVES *et al.*, 2001) e estudos atuais entre 2010 e 2012, nas mesmas regiões (FONSECA, 2012). Atualmente, a reprodução sexuada parece contribuir pouco para a manutenção destas populações, pois há uma grande incidência de indivíduos sem gônadas ou com gônadas vazias. Recentemente, foram registrados baixos valores do índice gonadal nas populações de *C. tenuispina*, com pequena variação durante 14 meses (FONSECA, 2012), sendo estes menores que aqueles encontrados em estudos pretéritos (ALVES *et al.*, 2001). Também foi observado um desequilíbrio sexual, com a predominância de machos, em oposição às razões sexuais anteriores (de uma fêmea para um macho) nas populações da Praia da Ferradura (Armação de Búzios, RJ) e Prainha (Arraial do Cabo, RJ) (VENTURA *et al.*, 2004).

Na população de Itaipu, foi verificada uma alta incidência de indivíduos com sinais de fissão recente ou em regeneração e um forte desequilíbrio sexual com predominância de machos (ALVES *et al.*, 2001). Esses autores sugerem que a reprodução assexuada por fissão é dominante e, conseqüentemente, há uma alta concentração de clones na população de Itaipu. Entretanto, a análise genética de multi-locos (com aloenzimas e RAPD) revelou que a incidência de clones

nessa população não é significativamente alta para considerar a fissão como preponderante (PAZOTTO *et al.*, 2010).

Populações de equinodermos nas quais a fissão foi considerada a forma de reprodução predominante já foram descritas (OTTESSEN & LUCAS, 1982; MLADENOV, 1996). A reprodução sexuada nas espécies fissíparas, geralmente, resulta na produção de um pequeno número de larvas, uma vez que a energia alocada é utilizada tanto no desenvolvimento de gametas quanto na regeneração de uma nova parte. As larvas produzidas por essas espécies, provavelmente, têm como principais funções a colonização de novos ambientes, já que os indivíduos fissionados apresentam limitação no potencial de dispersão e a recombinação genética (EMSON & WILKIE, 1980; OTTESEM & LUCAS, 1982).

A contribuição da reprodução clonal na dinâmica populacional pode, muitas vezes, se igualar ou exceder a da reprodução sexuada (DORKEN & ECKERT, 2001). A permanência destas condições por um longo período pode ocasionar baixa variabilidade genética e diminuição na capacidade de dispersão geográfica da espécie na região dificultando a colonização de novos habitats distantes do original. Isto pode acarretar uma redução populacional da espécie, já que as populações serão constituídas por poucos genótipos diferentes, os quais podem ter baixa resistência a mudanças ambientais (POTTS, 1983). Uma preocupação com relação à preservação de espécies é a sua diversidade genética, uma vez que populações com baixa diversidade são menos resistentes a distúrbios naturais e antropogênicos e mais susceptíveis às extinções locais. Por possuir distribuição geográfica descontínua, é relevante avaliar a magnitude dos eventos reprodutivos (sexuados e assexuados) que regem a manutenção populacional e a dispersão desta espécie.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a estratégia da espécie *Coscinasterias tenuispina* em relação aos modos de reprodução e seu potencial de dispersão natural e estimar a diversidade genética e conectividade entre populações de quatro localidades da costa do Estado do Rio de Janeiro.

### 2.2 Objetivos Específicos

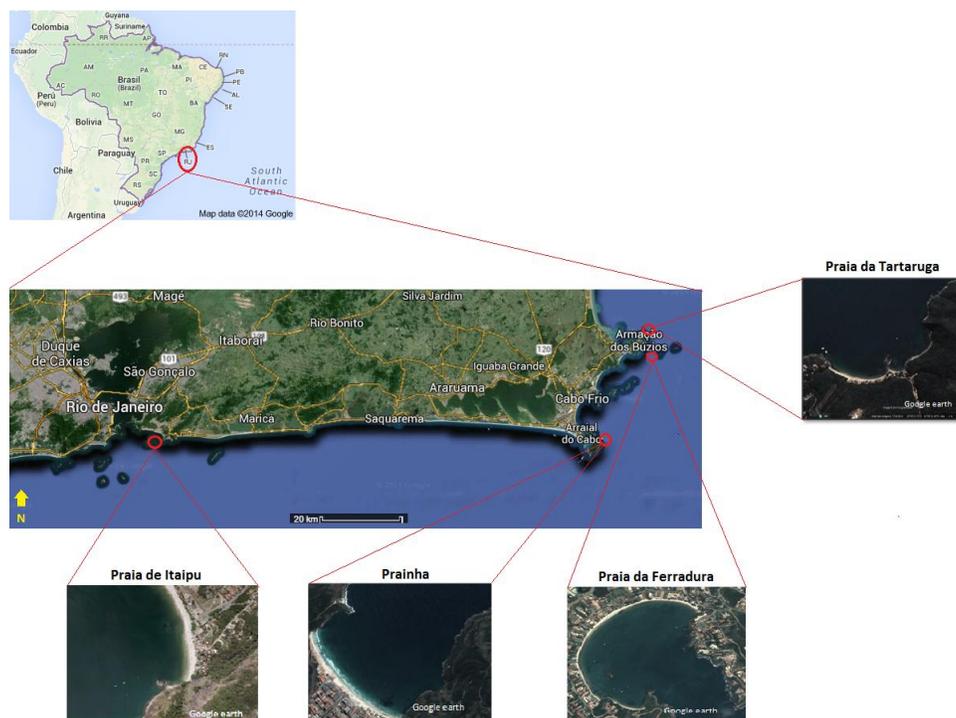
- Estimar a frequência de clones e a diversidade genética em populações de quatro localidades da costa do Estado do Rio de Janeiro;
- Avaliar a conectividade entre estas populações de *Coscinasterias tenuispina*;
- Descrever o desenvolvimento embrionário e larval de *Coscinasterias tenuispina*, em laboratório;

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Locais e Métodos de Coleta

As coletas de indivíduos da espécie *Coscinasterias tenuispina* foram realizadas, através de mergulho livre, entre setembro de 2010 e setembro de 2014, em quatro localidades do litoral do Estado do Rio de Janeiro (Figura 2):

- Arraial do Cabo – Prainha ( $22^{\circ} 58' S$  e  $43^{\circ} 01' W$ ).
- Armação de Búzios – Praia da Ferradura ( $22^{\circ} 46' S$  e  $42^{\circ} 53' W$ ).
- Armação de Búzios – Praia da Tartaruga ( $22^{\circ} 45' S$  e  $41^{\circ} 54' W$ ).
- Niterói – Praia de Itaipu ( $22^{\circ} 59' S$  e  $43^{\circ} 04' W$ ).



**Figura 2** - Localização das áreas amostradas no Estado do Rio de Janeiro entre as coordenadas  $22^{\circ} 45' S - 41^{\circ} 54' W$  e  $22^{\circ} 59' S - 43^{\circ} 04' W$ . N= Sentido do norte geográfico. Escala = 20 km.

A escolha destas localidades de coleta deveu-se à facilidade de obtenção dos espécimes, assim como a existência de dados referentes à biologia reprodutiva desta espécie nesses locais. A Praia de Ferradura e Praia da Tartaruga são bem próximas geograficamente, cerca de 15 km ao longo da costa. As praias de Ferradura e Prainha distam entre si, aproximadamente, 32 km. Já a Praia da Ferradura está distante de Itaipu por cerca de 130 km e Itaipu distante da Prainha por cerca de 111 km.

### **3.2. Métodos Moleculares**

Para o estudo da frequência de clones e conectividade nas populações, os pés ambulacrais dos espécimes coletados foram preservados em etanol a 99% em *ependorfs* individuais e armazenados em freezer a -20°C para posterior extração do DNA a partir de pequenas adaptações do protocolo do kit de extração DNAeasy (Qiagen) (ZIGLER & LESSIOS, 2003), que constituiu em:

- Secar o tecido em papel toalha com auxílio de uma pinça (a cada amostra a pinça foi lavada em NaOH e depois em água destilada a fim de evitar contaminação);
- Colocar o tecido em *ependorfs* com 300 µL de lise celular;
- Deixar 15 minutos em banho-maria seco a 65°C;
- Adicionar 3 µL de proteinase;
- Deixar em banho-maria a 55°C por 60 minutos;
- Adicionar 100 µL da solução para precipitar proteína e misturar no vórtex por 20 segundos;
- Deixar durante 5 minutos no gelo e depois centrifugar a 14000 rpm por 6 minutos. Repetir mais uma vez esse procedimento;

- Retirar cuidadosamente o sobrenadante com uma pipeta e adicioná-lo em novos *ependorfs* com 300  $\mu$ L de isopropanol 100%. Everter 50 vezes;
- Centrifugar por 5 minutos;
- Descartar o sobrenadante e deixar o precipitado secando por 5 minutos, com a abertura dos *ependorfs* voltada para baixo em um papel absorvente. Adicionar 300  $\mu$ L de etanol 70%. Everter 25 vezes e centrifugar, durante um minuto, na velocidade de 14000 rpm. Repetir mais uma vez esses procedimentos;
- Adicionar 50  $\mu$ L de solução hidratante de DNA e agitar no vórtex por 5 segundos;
- Por fim, deixar 1 hora (ou *over night*) no banho-maria a 65°C.

Dos métodos atuais para medir a diversidade de sequências do DNA, os mais utilizados são baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI *et al.*, 1985), que permite a amplificação de partes específicas do DNA a partir de pequenas amostras que podem ser amplificadas milhões de vezes. Para tal, regiões conservadas específicas são identificadas de cada um dos lados do segmento alvo da amplificação, flanqueado pelas regiões conservadas, e, a partir delas, os iniciadores são desenvolvidos (FRANKHAM *et al.*, 2008). As análises moleculares foram efetuadas através da análise de sequência de DNA mitocondrial (citocromo oxidase subunidade I-COI) e microssatélites, por meio da PCR. Em cada amplificação, foi utilizado um controle negativo sem DNA (branco), permitindo discriminar eventuais contaminações. A confirmação do sucesso de amplificação foi efetuada por corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% com GelRed.

### 3.2.1 Microssatélites

A identificação genética individual através da utilização de microssatélites baseia-se no pressuposto de que, recorrendo a *loci* altamente polimórficos, se poderá traçar um perfil genético multi-locos único para cada indivíduo. Deste modo, foram amplificados doze *loci* de microssatélites (Tabela 1) obtidos através de uma cooperação com a Universidade de Barcelona. Estes foram desenvolvidos de acordo com o método de GARCIA-CISNEROS *et al.* (2013). Para todos os locos, a reação de amplificação foi feita em um volume final de 15 µL utilizando-se, 4 µL de cada *primer*; 3 µL de 5X *Green Buffer*; 1,5 µL de BSA (*Bovine Serum Albumin*); 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub>; 1,5 µL de dNTP (2 mM); 0,2 µL de Taq DNA polimerase (1U) e 1 µL de DNA. As condições de amplificação consistiram de cinco passos: (1) desnaturação inicial da fita dupla a 95°C por 5 minutos; (2) desnaturação a 95°C por 30 segundos; (3) hibridação dos iniciadores a 49°C por 30 segundos; (4) extensão a 72°C por 40 segundos e (5) extensão final a 72°C por 10 minutos.

**Tabela 1-** Lista dos *loci* caracterizados para a espécie *Coscinasterias tenuispina*. Estão apresentados os *motifs* microssatélites e os tamanhos dos alelos em pares de base (pb). Dados retirados de GARCIA-CISNEROS *et al.*(2013).

<i>Loci</i>	<i>Motif</i>	Tamanho (pb)
m.ten19	(GATT)*8	133–150
m.ten14	(TAA)*7	137–138
m.ten40	(AG)*11	151–154
m.ten6	(TAA)*7	160–163
m.ten1	(ATT)*12	171–174
m.ten32	(TAGA)*8	245–249
m.ten27	(AT)*9	293–295
m.ten25	(GTA)*10	295–298
m.ten31	(TGTT)*9	298–302
m.ten13	(ATAC)*12	360–364
m.ten24	(GT)*11	365–367
m.ten30	(AGTC)*17	397–409

Os produtos das amplificações foram encaminhados para sequenciamento pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul). Para a determinação dos genótipos, os 91 eletroferogramas resultantes (provenientes de 21 indivíduos da Praia da Ferradura, 22 da Praia da Tartaruga, 24 da Prainha e 24 de Itaipu) foram analisados no programa PEAK SCANNER v1.0 (Applied Biosystems).

Após a identificação dos alelos, os dados foram analisados de modo a detectar possíveis erros. Em estudos de genética populacional, os erros de genotipagem afetam as estimativas das frequências alélicas e a discriminação dos diferentes genótipos, podendo levar a inferências errôneas da estruturação populacional. Assim, o primeiro passo foi testar, pelo programa MICRO-CHECKER v.2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004), a presença de alelos nulos, de bandas “falsas” (*stutter*) e de picos +A, que ocorrem durante o processo de PCR e que podem afetar a leitura dos microssatélites. Os alelos nulos são alelos não amplificados que, quando em heterozigose, resultam num aparente homozigoto. Para os microssatélites, os alelos nulos podem aparecer quando ocorrem mutações nas regiões flanqueadoras, impedindo um ou os dois *primers* de se ligarem. A presença de alelos nulos em marcadores microssatélites é frequente, especialmente em grandes populações naturais (LI *et al.*, 2002; KARLSSON & MORK, 2005). O seu aparecimento produz um erro importante nas proporções genotípicas, de modo que se observa um claro desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg devido a um excesso de homozigotos. As bandas *stutter* são produzidas por deslizamentos da DNA polimerase durante a reação de PCR, de modo que se originam fragmentos que são uma ou várias repetições mais curtas ou mais longas que o verdadeiro alelo. Após migração, estas bandas apresentam-se como uma cadeia de picos seguidos, sobressaindo um que será o verdadeiro alelo. Por fim, os picos +A são criados pela DNA polimerase ao adicionar um nucleotídeo, geralmente adenina, à extremidade 3' do fragmento amplificado (MATSUMOTO *et al.*, 2004).

Os níveis de diversidade genética foram estimados através de uma estatística descritiva que determinou o número de locos polimórficos (mais de um alelo detectado), as frequências alélicas, assim como a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e a esperada ( $H_e$ ), utilizando o programa GENEPOP v4.2 (RAYMOND & ROUSSET, 1995). O mesmo programa foi utilizado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio de ligação. A heterozigosidade observada é uma medida da variabilidade genética das populações e reflete a quantidade de indivíduos heterozigotos para um determinado loco. A heterozigosidade esperada reflete a quantidade teórica de indivíduos heterozigotos, que é esperada de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A hipótese nula parte da premissa de que os alelos ou genótipos são retirados de todas as populações de forma idêntica, ou seja, que estes estão distribuídos entre todas as populações na mesma proporção. O princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg estipula que após uma geração (cruzamento), as frequências genótípicas para um locos com dois alelos **A** e **a**, devem seguir a seguinte fórmula:

$$(p+q)^2 = p^2+2pq+q^2$$

Onde  $p^2$  é a frequência esperada do genótipo **AA**;  $2pq$  é a frequência esperada do genótipo **Aa**; e  $q^2$  é a frequência esperada do genótipo **aa**.

Para testar a ocorrência de desequilíbrio de ligação, foram feitas tabelas de contingência para cada par de locos em todas as populações. Neste caso, a hipótese nula é que os alelos de um loco são independentes dos alelos de outros locos.

Estimativas de distância genética ( $F_{ST}$ ) (WEIR & COCKERHAM, 1984; feito par a par com 1000 permutações) e fluxo gênico ( $N_m$ ) foram realizadas utilizando o programa GENETIX

v.4.05 (BELKHIR *et al.*, 2004).  $F_{ST}$  é definido como a correlação entre gametas retirados ao acaso da mesma subpopulação em relação ao total (WRIGHT, 1951, 1965), é um indicador informativo de diferenciação genética que examina a divergência genética total entre as subpopulações. Também pode ser definido como a variância estandardizada das frequências gênicas ou coeficiente efetivo de hibridação (WEIR & COCKERHAM, 1984). O  $F_{ST}$  compara a heterozigosidade média (supondo o EHW) entre os níveis menos inclusivos [subpopulações ( $H_S$ )] com os mais inclusivos [população total ( $H_T$ )]:  $F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$ ; e seus valores variam de 0 (toda a diversidade gênica é compartilhada igualmente e não há diferenças genéticas entre as populações) a 1 (quando há diferenças extremas na diversidade gênica entre as populações). Dessa forma, a partir do  $F_{ST}$  é possível detectar desvios da situação de panmixia, ou seja, existência de estruturação populacional (HOLSINGER & WEIR, 2009). Já a estimativa de  $N_m$  é inversamente proporcional ao valor de  $F_{ST}$ , uma vez que o fluxo gênico torna as frequências alélicas entre as populações mais homogêneas, diminuindo a diferenciação genética entre elas.

A estimativa de clones foi realizada pelo programa MLGsim v.1.0 (STENBERG *et al.*, 2003). A princípio, foram considerados como clones dois ou mais indivíduos que compartilharam a mesma combinação de genótipos para todos os locos analisados (MLG). Porém, indivíduos com o mesmo genótipo multi-locos também podem ser originados por eventos de reprodução sexuada. Assim, para corrigir esse efeito, o mesmo programa foi utilizado para calcular a probabilidade de encontrar tantos indivíduos com o mesmo genótipo quanto aquele esperado numa população panmítica ( $P_{sex}$ ) através das frequências dos alelos de cada população amostrada. Também foi calculada a significância desses valores de  $P_{sex}$ . Foram realizadas 1.000.000 de simulações considerando o valor de alfa de 0,01. Ao final, foi gerada a probabilidade total de obter indivíduos com um mesmo genótipo via reprodução sexuada ( $P_{crítico}$ ).

Um valor de  $P_{sex}$  menor do que o valor de  $P_{crítico}$  significa que o genótipo multi-locos observado mais de uma vez é, provavelmente, resultado da reprodução clonal. Já um valor de  $P_{sex}$  maior do que o valor de  $P_{crítico}$  indica geração de indivíduos com o mesmo genótipo devido a cruzamentos aleatórios (via reprodução sexuada).

Para comparar a contribuição da reprodução assexuada e sexuada dentro das populações, foram utilizados outros três parâmetros:

1. Índice de diversidade genotípica observada ( $G_0$ ), segundo STODDART & TAYLOR (1988):

Diversidade genotípica é um parâmetro informativo da estrutura genética dentro das populações. É definido pela fórmula:

$$G_0 = 1 / \sum_i^k p_i^2$$

Onde  $p_i$  é a frequência relativa do genótipo  $i$  na população e  $k$  é o número total dos diferentes genótipos na população. Assim, quando houver apenas um genótipo representando a população, o valor de  $G_0$  será 1 e quando os genótipos estiverem distribuídos uniformemente na população,  $G_0$  terá valor máximo de  $k$ .

Este índice pode ser usado para refletir a integração da diversidade de cada *loci* em genótipos multi-locos. Desta forma, a comparação da diversidade genética de uma população (variável dependente) prevista a partir das frequências dos genes (variáveis independentes) pode ser utilizada para testar o quão próximo o seu modo de reprodução está da panmixia. Em espécies que empregam ambos os modos de reprodução (sexuada e assexuada), esta comparação pode ser utilizada para estimar a proporção relativa da contribuição clonal dentro de uma

população ou para comparar esta contribuição entre populações (STODDART, 1983a; HOFFMANN, 1986, 1987).

A relação entre a diversidade genotípica observada e a aquela esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $G_e$ ) é expressa pela proporção  $G_o/G_e$ . Devido à improbabilidade de um genótipo ocorrer mais vezes em uma população panmítica que se reproduz sexuadamente (COFFROTH & LASKER, 1998; CHEN *et al.*, 2002),  $G_e$  foi expressa pelo tamanho amostral. Uma população dominada por poucos genótipos terá uma baixa relação  $G_o/G_e$  (indicando a ocorrência de reprodução clonal), enquanto que em populações com muitos genótipos e poucos clones  $G_o/G_e$  irá se aproximar de 1 (AYRE *et al.*, 1997a; ZILBERBERG *et al.*, 2006).

## 2. Contribuição mínima da reprodução sexuada, segundo UTHICKE *et al.* (1998):

É expressa pela fórmula:

$$\frac{N_{go}}{N}$$

Onde  $N_{go}$  corresponde ao número de genótipos na população e  $N$  corresponde ao tamanho amostral.  $N_{go}/N$  terá seu valor mínimo igual a 0 quando apenas um genótipo for registrado na população e terá seu valor máximo igual a 1 quando todos os genótipos forem diferentes.  $N_{go}/N$  é o estimador mais simples de entrada sexual, mas é provável que seja subestimado porque ignora a produção repetida do mesmo genótipo através da reprodução sexuada. O inverso dessa relação, ou seja,  $N/N_{go}$  gera o número médio de indivíduos por genótipo, ou seja, a quantidade média de clones na população (MCFADDEN, 1997).

3. Contribuição máxima da reprodução sexuada, segundo JONHSON & THREFALL (1987):

É calculada pela fórmula:

$$N^*/N$$

$N^*$  corresponde ao número máximo de indivíduos na população assumido como sendo o produto da reprodução sexuada e  $N$  corresponde ao tamanho amostral. Desta forma, esse parâmetro fornece uma estimativa corrigida da entrada da reprodução sexuada. O valor de  $N^*$  é obtido pela fórmula:

$$N^* = \sum [p_{95} (N-1)]$$

$P_{95}$  equivale ao valor do limite superior a 95% do intervalo de confiança da probabilidade de cada genótipo ter sido gerado por reprodução sexuada. Este valor foi multiplicado número total de indivíduos ( $N$ ) menos 1 (o primeiro indivíduo com o genótipo). Este intervalo de confiança foi gerado aplicando a fórmula de Hald.

Quando, em uma população, a contribuição da reprodução clonal for maior que a da reprodução sexuada, o valor de  $N^*/N$  será mais próximo de 0. Já, quando a contribuição da reprodução sexuada for maior, este valor será mais próximo de 1.

### 3.2.2. Análise do gene mitocondrial Citocromo Oxidase

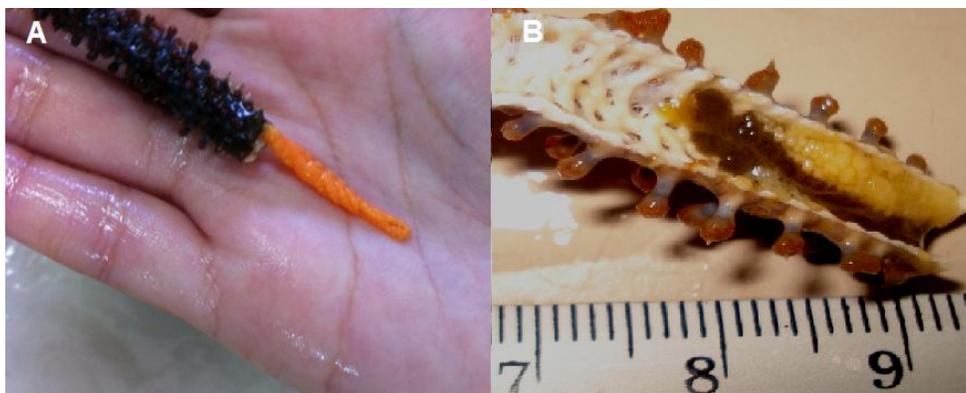
Para amplificação do gene COI mitocondrial, foram utilizados os iniciadores universais F210-CO1 (5' GGTAATGCCAATTATGATTGG 3') e COA (5' AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC 3') (PALUMBI *et al.*, 1991), com base nas condições descritas por WATERS & ROY (2003). Todas as reações de amplificação foram feitas em um volume final de 25  $\mu$ L utilizando-se 1  $\mu$ L de cada *primer* (1,6  $\mu$ M); 5  $\mu$ L de 5X *Green Buffer*; 1,5  $\mu$ L de BSA; 2,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>; 2,4  $\mu$ L de dNTP (2 mM); 0,21  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (1U) e 1  $\mu$ L de DNA. As condições de amplificação consistiram em cinco passos: (1) desnaturação inicial da fita dupla a 94°C por 5 minutos; (2) desnaturação a 94°C por 60 segundos; (3) hibridação dos iniciadores a 48°C por 30 segundos; (4) extensão a 72°C por 30 segundos e (5) extensão final a 72°C por 10 minutos. O sequenciamento dos produtos das amplificações foi realizado no laboratório de Biodiversidade Molecular do Departamento de Genética da UFRJ e Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul). As 65 sequências resultantes (provenientes de 17 indivíduos da Praia da Ferradura, 13 da Praia da Tartaruga, 19 da Prainha e 16 de Itaipu), foram editadas através do programa SEQUENCHER (Gene Codes Corporation) e alinhadas pelo programa MEGA6 (TAMURA *et al.*, 2011) através do algoritmo de ClustalW (CHENNA *et al.*, 2003). Após o alinhamento automático, este foi otimizado manualmente. O mesmo programa foi utilizado para a determinação dos agrupamentos baseados nas similaridades entre as sequências dos indivíduos. As análises foram obtidas pelo método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo GTR, obtido pelo programa jModalTest (POSADA, 2008). Para a determinação dos limites de confiança nas ramificações, os dados foram submetidos ao teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) para 1.000 replicações e os valores são apresentados em porcentagem próximos ao ramos. Estimativas de distância genética ( $F_{ST}$ ) foram realizadas utilizando o

programa ARLEQUIN v3.5.1.2 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). O programa NETWORK v4.6 (BANDELT *et al.*, 1999) foi utilizado para gerar uma rede de haplótipos, no entanto, isto não foi possível pela insuficiência de haplótipos encontrados.

### 3.3. Estudo do Desenvolvimento Inicial

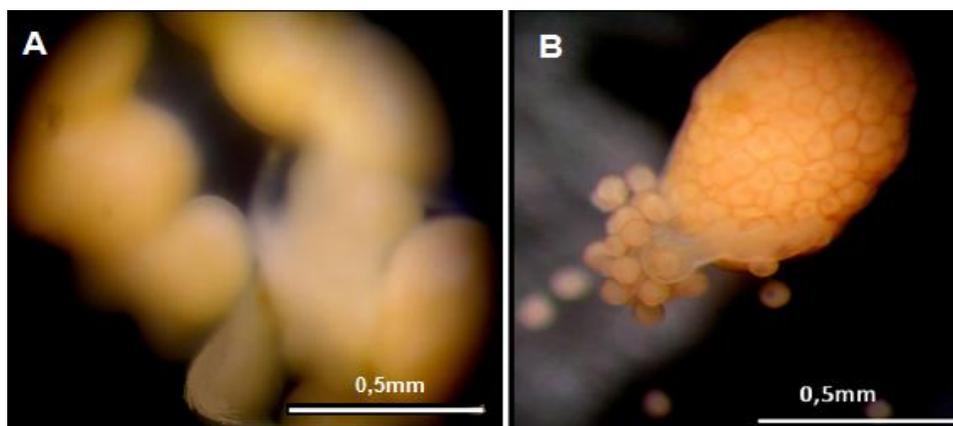
Após muitas tentativas sem sucesso e com o intuito de otimizá-las, os experimentos de fertilização *in vitro* foram realizados no Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), em Arraial do Cabo. A proximidade dos pontos de coleta possibilitou a realização das tentativas de fertilização *in vitro* no mesmo dia em que os espécimes foram amostrados. O IEAPM disponibilizou autoclaves para a esterilização de todo o material utilizado e facilitou a obtenção de água do mar da Ilha de Cabo Frio, que é de extrema qualidade.

Para o estudo do desenvolvimento embrionário, os espécimes foram dissecados, em laboratório, e separados por sexo, visualmente aferidos pela coloração das gônadas (Figura 3). As gônadas masculinas possuem coloração esbranquiçada ou amarelada enquanto que as femininas apresentam coloração salmão.



**Figura 3** - *Coscinasterias tenuispina*. A- Braço com a gônada feminina (salmão) exposta. B - Braço dissecado mostrando a gônada masculina (amarelada) e cecos pilóricos.

Inicialmente, as gônadas retiradas foram imersas, separadamente, em solução contendo 4 mL de água do mar e 2 mL de 1-metiladenina a  $10^{-5}$ M, segundo KANATANI (1969). Após algumas tentativas sem sucesso, adotou-se a estratégia de imergir as gônadas em soluções contendo apenas 20 mL de água do mar filtrada em filtro Millipore de 0,45  $\mu$ L. Após a liberação, a mobilidade dos espermatozoides foi observada através de exame microscópico para que fosse usado no processo de fertilização (Figura 4). Assim, soluções de óvulos (4 mL) e espermatozoides ativos (200  $\mu$ L) foram misturadas em um recipiente com 500 mL de água do mar filtrada em 0,45  $\mu$ L e mantidos em temperatura ambiente. Essa diferença na quantidade de gametas masculinos e femininos teve o objetivo de evitar a polispermia e permitir a fertilização da maioria dos ovócitos.



**Figura 4** - *Coccinasterias tenuispina* – Observação das gônadas em lupa. A- Gônada masculina em processo de liberação dos espermatozoides. B- Gônada feminina liberando ovócitos.

A partir da união dos gametas, amostras dessa solução foram observadas em um microscópio óptico em intervalos de 10 minutos, para verificar o sucesso da fertilização. Após a decantação dos ovos no recipiente e uma vez comprovado o sucesso da fertilização pela presença da membrana de fertilização, a água foi trocada para retirar o excesso de espermatozoides. Os

embriões e larvas foram observados em microscópio óptico para registro fotográfico das clivagens e metamorfoses. Os mesmos foram fixados em solução de glutaldeído 2,5% para posterior análise em microscópio eletrônico de varredura do Departamento de Invertebrados/MN/UFRJ. Através das fotografias obtidas, foram medidos os diâmetros dos ovócitos e comprimento das larvas utilizando o *software* ImageJ (E.U. National Institute of Health).

Durante a fase embrionária, a água foi trocada a cada dia. Para isso, a água foi filtrada em uma malha de 50 µm com o auxílio de uma mangueira. Os embriões retidos na malha foram, então, transferidos para uma nova água do mar filtrada. O mesmo procedimento foi feito com as larvas, porém de dois em dois dias. Após a troca de água, as larvas foram alimentadas com 400 µL de microalga da espécie *Dunaliella tertiolecta* em concentração de, aproximadamente,  $3,2 \times 10^4$  células/mL. Em uma dieta com apenas um tipo de microalga ou associada à outra espécie, *Dunaliella tertiolecta* é um bom alimento durante todo o desenvolvimento larval de equinodermos até a sua metamorfose (STRATHMANN, 1987).

Durante as tentativas de fertilização, foram testadas diferentes temperaturas (20°C, 24°C e 27°C) e salinidades (27 US, 30 US, 33 US e 35 US). Apenas os resultados na temperatura ambiente de 24°C e salinidade 35 US foram apresentados, pois foram as condições nas quais o sucesso da fertilização foi obtido.

## 4. Resultados

### 4.1. Microssatélites

Um total de 91 espécimes (21 indivíduos da população de Ferradura, 22 da população da Tartaruga e 24 espécimes das populações da Prainha e 24 de Itaipú) foi utilizado para as análises. Dezenove alelos foram encontrados para o conjunto dos marcadores analisados. Dos 12 locos amplificados, seis revelaram-se monomórficos (*m.ten14*, *m.ten30*, *m.ten13*, *m.ten19*, *m.ten24* e *m.ten27*). Já os locos *m.ten1*, *m.ten6*, *m.ten31*, *m.ten32*, *m.ten25* e *m.ten40* apresentaram polimorfismo.

A partir das frequências genotípicas, foram calculadas as frequências dos alelos em cada um dos locos polimórficos (Tabela 2).

**Tabela 2** – Frequências alélicas verificadas nos *loci* polimórficos encontrados em *C. tenuispina*.

<i>Loci</i>	Alelos	Frequências
<b>m.ten1</b>	177	0,316
	171	0,356
	168	0,339
<b>m.ten6</b>	163	0,947
	166	0,07
<b>m.ten31</b>	298	0,495
	302	0,505
<b>m.ten32</b>	245	0,947
	249	0,053
<b>m.ten25</b>	295	0,5
	298	0,5
<b>m.ten40</b>	152	0,369
	160	0,631

Não foram encontradas evidências de alelos nulos ou de erros de nomeação gerados por *stuttering*.

Os pares de locos **m.ten1-m.ten6**, **m.ten1-m.ten32** e **m.ten6-m.ten32** apresentaram desequilíbrio de ligação nas populações da Praia da Ferradura e Prainha (Tabela 3).

**Tabela 3** – Valores de P significativos para desequilíbrio de ligação entre os pares de locos das populações da Praia da Ferradura e Prainha.

Pares de locos	Valores de P	
	Ferradura	Prainha
<b>m.ten1-m.ten6</b>	0,04588	0,000
<b>m.ten1-m.ten32</b>	0,04907	0,000
<b>m.ten6-m.ten32</b>	0,04876	0,000

Houve excesso de heterozigotos em todas as populações (Tabela 4), após a comparação das heterozigosidades médias observadas e esperadas. Testes para desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) demonstraram que todos os locos polimórficos analisados apresentaram-se fora de equilíbrio nas diferentes populações amostradas (exceto locos *m.ten6* e *m.ten3* na população da Prainha) (Tabela 5).

**Tabela 4** - Valores de número médio de alelos por loco ( $N_a$ ) e de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) para *Coscinasterias tenuispina* em cada localidade amostrada. A= População da Ferradura; B= População da Tartaruga; C= População da Prainha e C= População de Itaipu.

Populações	$N_a$	$H_e$	$H_o$
<b>A</b>	1,58	0,18	0,34
<b>B</b>	1,33	0,17	0,32
<b>C</b>	1,58	0,23	0,36
<b>D</b>	1,67	0,08	0,16

**Tabela 5** - Estimativas de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (valores de P) para cada população de *Coscinasterias tenuispina*. S.E. = Erro padrão.  $P < 0,05$  significativo. A= População da Ferradura; B= População da Tartaruga; C= População da Prainha e C= População de Itaipu.

Locos	A		B		C		D	
	P	S.E.	P	S.E.	P	S.E.	P	S.E.
m.ten1	0	0	0,0002	0,0001	0	0	-	-
m.ten6	-	-	-	-	0,5505	0,0014	-	-
m.ten31	0	0	0	0	0	0	0	0
m.ten32	-	-	-	-	0,552	0,0014	-	-
m.ten25	0	0	0	0	0	0	0	0
m.ten40	0	0	0	0	0	0	-	-

Os valores de distância genética ( $F_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $N_m$ ), apresentados na Tabela 6, variaram de 0,0005 (população da Praia da Ferradura X Praia da Tartaruga) a 0,398 (população da Praia de Itaipu X Tartaruga) e 0,38 (população da Praia de Itaipu X Tartaruga) a 453,23 (população da Praia da Ferradura X Tartaruga), respectivamente. Segundo WRIGHT (1978), os valores de  $F_{ST}$  na faixa de 0 a 0,05 indicam fraca diferenciação genética; valores entre 0,05 e 0,15 indicam moderada diferenciação genética entre as populações, valores entre 0,15 e 0,25 indicam alta diferenciação genética entre as populações e para valores acima de 0,25 a diferenciação genética é considerada muito alta.

**Tabela 6** - Estimativa do coeficiente de diferenciação populacional entre pares de populações,  $F_{ST}$ , na parte abaixo da diagonal da matriz e da estimativa do fluxo gênico,  $N_m$ , na parte superior. A= População da Ferradura; B= População da Tartaruga; C= População da Prainha e D= População de Itaipu.

Populações	A	B	C	D
A	-	453,23	5,34	0,41
B	0,00055	-	3,75	0,38
C	0,04476	0,06252	-	0,79
D	0,37728	0,39845	0,24021	-

Dos 91 genótipos multi-locos distintos esperados (correspondente ao tamanho amostral), apenas seis foram encontrados (Tabela 7). Para cada um desses genótipos, em cada uma das populações, a probabilidade de terem sido originados por reprodução assexuada ( $P_{sex} < P_{crítico}$ ) foi estatisticamente alta. Somente dois indivíduos (da população da Praia da Tartaruga) compartilhando o mesmo MLG apresentaram baixa probabilidade de terem sido gerados por reprodução assexuada ( $P_{sex} > P_{crítico}$ ). Estes genótipos idênticos podem ter sido formados ao acaso em dois eventos distintos de reprodução sexuada, portanto neste caso, não seriam clones (Tabela 8).

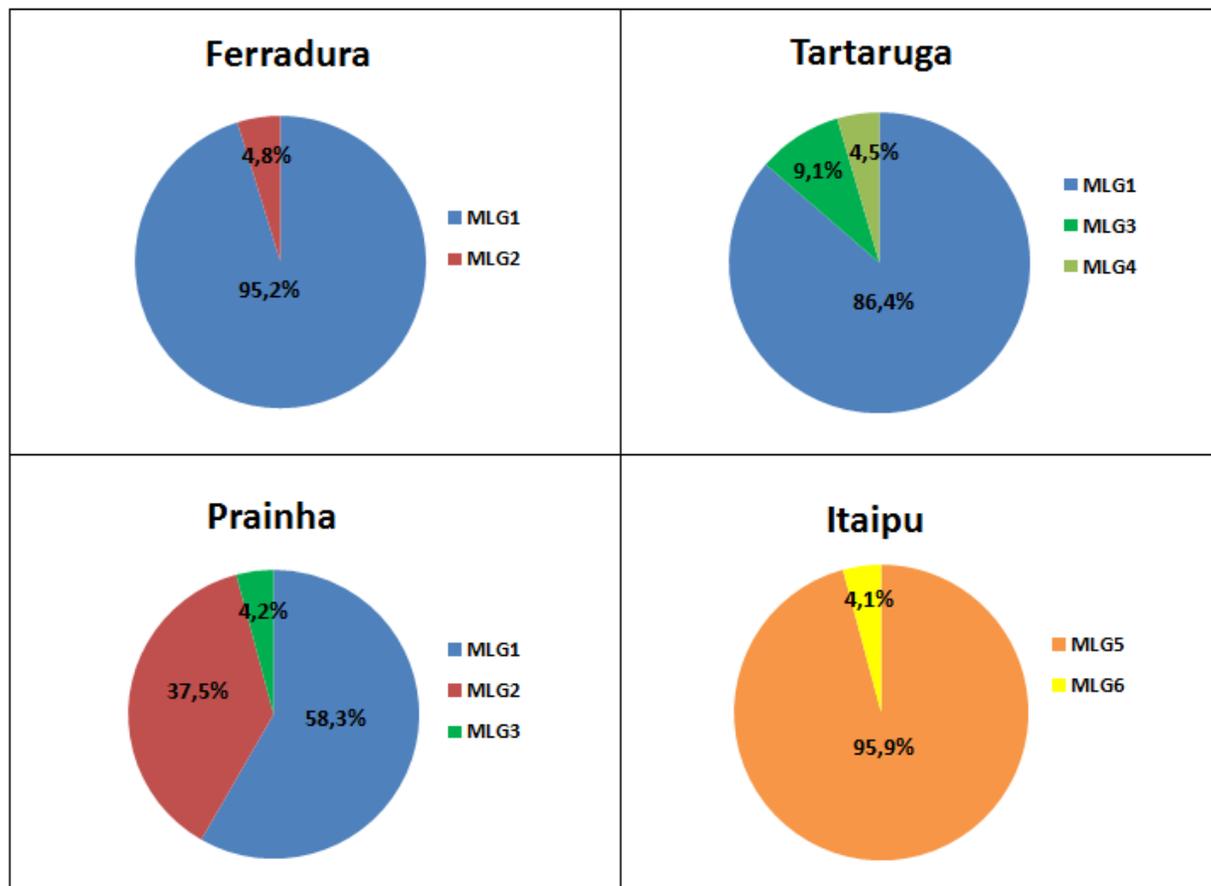
**Tabela 7** -Genótipos multi-locos idênticos (MLGs) detectados nas populações amostradas, a partir do tipo de alelos (altura dos picos no eletroferograma) e o número de indivíduos que compartilham cada MLG em cada população.

MLG						População			
m.ten1	m.ten6	m.ten31	m.ten32	m.ten25	m.ten40	Ferradura	Tartaruga	Prainha	Itaipu
168/186	163/163	298/302	245/245	295/298	152/160		2	1	
168/177	163/163	298/302	245/245	295/298	152/160	20	19	14	
168/177	163/163	298/302	245/245	295/298	152/160		1		
171/171	163/163	298/302	245/245	295/298	152/160				23
171/171	163/163	302/302	245/245	295/298	152/168				1
171/171	163/166	298/302	245/249	295/298	152/160	1		9	

**Tabela 8** -Quantidade de genótipos multi-locos idênticos (MLGs) presente em cada população; Valores de  $P_{sex}$  e  $P_{crítico}$ . \*\*\* = Valor significativo para ( $p < 0,01$ ); n.s. = valor não significativo.

População/MLG	N	$P_{sex}$	$P_{crítico}$
<b>Ferradura</b>			$9,35 \times 10^{-3}$
MLG1	20	0***	
MLG2	1	-	
<b>Tartaruga</b>			$9,55 \times 10^{-3}$
MLG1	2	0,19 (n.s.)	
MLG2	19	0***	
MLG3	1	-	
<b>Prainha</b>			$8,25 \times 10^{-3}$
MLG1	1	-	
MLG2	14	0***	
MLG3	9	0***	
<b>Itaipu</b>			$9,8 \times 10^{-3}$
MLG1	23	$2,49 \times 10^{-13}***$	
MLG2	1	-	

As populações da Praia da Tartaruga e da Prainha apresentaram maior quantidade de MLGs, entretanto, a maior parte dos espécimes nestas populações (86,4% e 58,5%, respectivamente) compartilha o mesmo genótipo. Este também é comum à população da Praia da Ferradura. A população da Praia de Itaipu é a única que não possui genótipos em comum com as demais populações. Nesta população, foram encontrados dois genótipos, sendo um deles representado apenas por um indivíduo (4,1%) (Figura 5).



**Figura 5** - Proporção dos genótipos multi-locos idênticos (MLGs) em cada uma das populações Praia da Ferradura, n = 21; Praia da Tartaruga, n = 22; Prainha, n = 24; Praia de Itaipu, n = 24). Cada MLG em comum nas diferentes populações foi representado pelo mesmo número e pela mesma cor.

Os demais parâmetros utilizados para estimar a contribuição de reprodução sexuada e assexuada podem ser visualizados na Tabela 9. As populações da Prainha e da Praia da Tartaruga foram as que apresentaram os maiores valores destes parâmetros, enquanto que as estimativas para a população de Itaipu foram as mais baixas. A proporção entre a diversidade genotípica observada e esperada ( $G_o/G_e$ ) variou de 0,03 (na população de Itaipu) a 0,09 (na população da Prainha). A contribuição mínima da reprodução sexuada ( $N_{go}/N$ ) variou de 0,08 (na população de Itaipu) a 0,14 (na população da Praia da Tartaruga). Já a contribuição máxima da reprodução

sexuada ( $N^*/N$ ) variou de 0,12 (na população de Itaipu) a 0,31 (na população da Praia da Tartaruga). Sendo assim, os parâmetros indicaram níveis mais elevados de recrutamento assexuado para todas as populações amostradas.

**Tabela 9** - Estimativas da contribuição da reprodução sexuada e assexuada para as quatro populações de *C. tenuispina* separadamente e considerando todas as populações como uma só.  $G_o$  = Índice de diversidade genotípica observada;  $G_e$  = Diversidade genotípica esperada;  $N_{go}$  = número de genótipos na população;  $N$  = tamanho amostral; e  $N^*$  = número de indivíduos sexualmente produzidos.

População	$G_o$	$G_o / G_e$	$N_{go} / N$	$N^*$	$N^* / N$
Ferradura	1,09	0,05	0,09	2.8	0.13
Tartaruga	1,32	0,06	0,14	6.93	0.31
Prainha	2,07	0,09	0,12	2.81	0.12
Itaipu	1,09	0,04	0,08	2.81	0.12
Todas	2,4	0,03	0,06	11.7	0.13

#### 4.2. Citocromo Oxidase subunidade I

As 65 sequências analisadas resultaram em fragmentos de 684 pb do gene COI. A análise filogeográfica de máxima verossimilhança gerada a partir do deste gene mitocondrial (Figura 6), revelou dois grupos distintos: um deles maior, formado pelas populações da Praia da Ferradura, Prainha e Praia da Tartaruga; e o outro grupo composto pelos espécimes da população de Itaipu.

Os valores de distância genética ( $F_{ST}$ ) apresentados na Tabela 10, variaram de -0,02192 (população da Praia da Ferradura X Praia da Tartaruga) a 1 (população da Praia de Itaipu X Tartaruga). Em análises de  $F_{ST}$ , valores negativos indicam que há mais variação intrapopulacional do que interpopulacional nessas localidades. Assim, os valores negativos

devem ser interpretados como zero, ou seja, ausência de diferenciação entre as populações (SOTKA *et al.*,2005; ROESTI *et al.*,2012).

**Tabela 10** – Valores da estimativa do coeficiente de diferenciação populacional ( $F_{ST}$ ) entre pares de populações, baseados nas sequências resultantes das amplificações do gene COI.

\*=significativo para  $P > 0,05$ .

	<b>Ferradura</b>	<b>Tartaruga</b>	<b>Prainha</b>	<b>Itaipu</b>
<b>Ferradura</b>	-			
<b>Tartaruga</b>	-0,02192	-		
<b>Prainha</b>	0,19881	0,27389	-	
<b>Itaipu</b>	0,93938*	1*	0,73727*	-



**Figura 6** - Dendrograma obtido pela análise de Máxima Verossimilhança a partir das sequências de COI de cada indivíduo de *C. tenuispina*. Os números nos ramos indicam o valor de *bootstrap*. Grupo externo: *Asterias amurensis*.

### 4.3. Cronologia do Desenvolvimento de *Coscinasterias tenuispina*

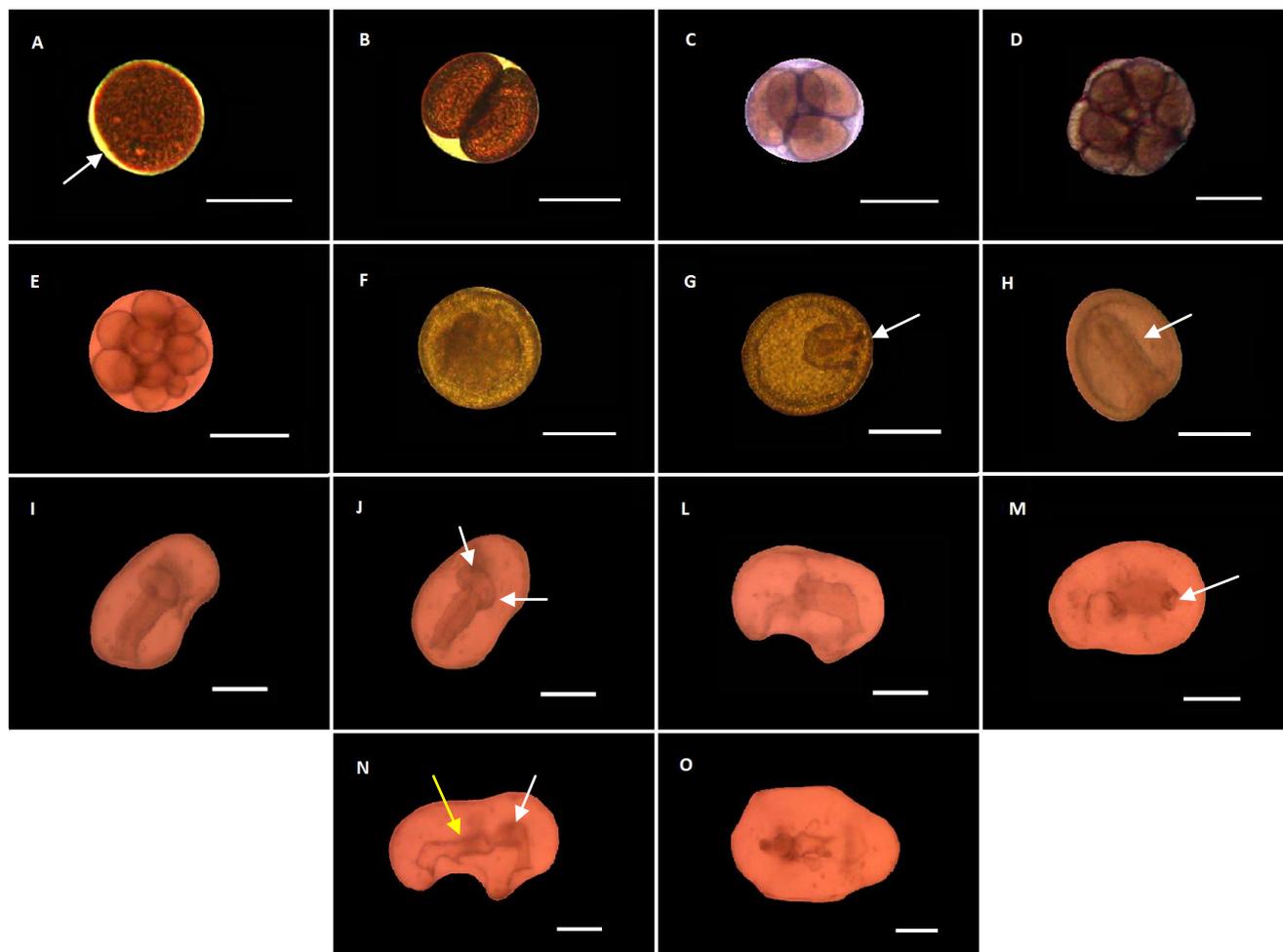
Foram feitas 25 coletas para realização da fertilização *in vitro*, totalizando 253 espécimes coletados (média de 10 indivíduos por coleta), onde mais da metade (61,7%) não possuíam gônadas. Nem sempre foi possível encontrar machos e fêmeas férteis em uma mesma coleta. Houve uma grande dificuldade no sucesso da fertilização *in vitro* dessa espécie. Foram realizadas 27 tentativas, das quais uma chegou ao estágio de clivagem, duas chegaram ao estágio de gástrula e apenas duas tentativas alcançaram o estágio larval de bipinária.

Os óvulos de *Coscinasterias tenuispina* variam de 0,13 a 0,17mm de diâmetro (Figura 7) e são arredondados, de coloração marrom escura e circundados por uma camada gelatinosa. Geralmente, em outras espécies, esta camada é constituída por um complexo de polissacarídeos glico-proteicos (HOSHI *et al*, 2012). A partir de observações microscópicas regulares, após 40 minutos da tentativa de fertilização *in vitro*, foi visualizada a membrana de fertilização em torno dos ovos (Figura 8 A). O processo de divisão celular teve início duas horas após a inseminação de óvulos e espermatozóides, quando o zigoto se dividiu em duas células (primeira clivagem) (Figura 8 B). A segunda clivagem (quatro células) (Figura 8 C) foi observada três horas depois e, após quatro horas, embriões multicelulares foram encontrados (Figura 8 D). A clivagem de *C. tenuispina* é radial e holoblástica. O estágio final das clivagens foi visualizado após 17 horas da fertilização (Figura 8 E). O desenvolvimento de blástula avançada foi registrado 20 horas depois (Figura 8 F). Em 23 horas, originaram gástrulas arredondadas (Figura 8 G), levemente ovaladas, de cor marrom escura e com um poro invaginado em um dos pólos (blastóporo). As gástrulas (com 0,16-0,18mm de comprimento) apresentaram movimentos giratórios em torno do próprio eixo e/ou movimentos circulares curtos. No 2º dia de desenvolvimento, os poros das gástrulas

estão mais invaginados com o crescimento do arquêntero, na blastocele (Figura 8 H). No 3° dia, os embriões sofrem um estiramento longitudinal do corpo. Há o início da formação de uma larva bipinária (com 0,23-0,25mm de comprimento), cujo formato aparenta um feijão (Figura 8 I e J; Figura 9 A, B; Figura 10 B). Nesta fase, células mesenquimais começam a se expandir do arquêntero migrando em direção à blastocele (Figura 9 A e B). A enterocele direita e esquerda forma bolsas na extremidade do arquêntero (Figura 8 J). A natação por cílios é bem evidente. Estes estão distribuídos por toda a superfície do corpo, proporcionando movimento ao redor do eixo ântero-posterior (Figura 10 B). No 4° dia, a larva (com 0,26-0,27mm de comprimento) apresenta o trato digestório completo e é capaz de se alimentar de microalgas (Figura 8 L e M). A região posterior se dobra e, a partir desse momento, o blastóporo pode ser considerado o ânus larval. No 5° dia, segue o alongamento do eixo longitudinal do corpo larval. O eixo ântero-posterior da larva (com 0,3-0,37mm do comprimento) se encontra mais alongado (Figura 8 N e O; Figura 10 C e D). As regiões do intestino se diferenciam com a expansão do estômago e ocorre a separação do estômago e do esôfago por um esfíncter cardíaco (BYRNE & BARKER, 1991) (Figura 8 N). As larvas permaneceram neste estágio por mais duas semanas e pereceram. Como este processo de desenvolvimento não seguiu adiante, não foi possível a caracterização dos estágios larvais mais avançados, como a larva braquiolária.



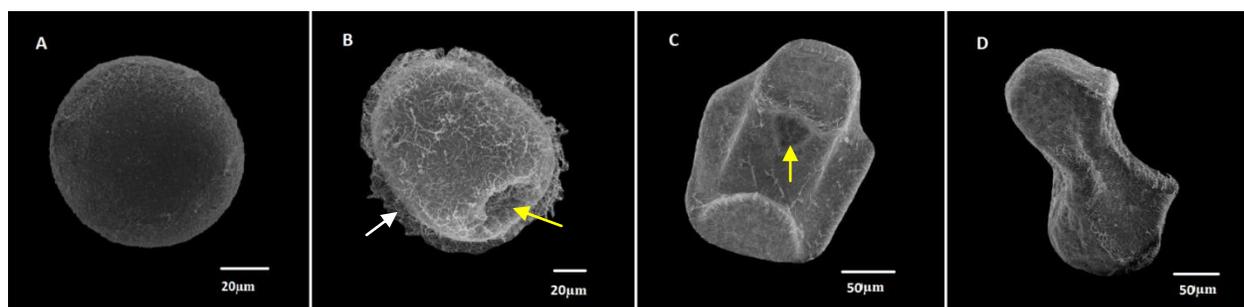
**Figura7** - *Coscinasterias tenuispina* – Óvulo circundado por camada gelatinosa. Escala = 0,05mm.



**Figura 8** - *Coscinasterias tenuispina*- A- Embrião com membrana de fertilização indicada pela seta. B- Primeira clivagem do embrião. C- Segunda clivagem do embrião. D- Estágio adiantado de clivagem. E- Estágio final das clivagens. F- Estágio de blástula. G- Início de uma gástrula com o blastóporo, indicado pela seta. H- Final de uma gástrula com o arquêntero alongado, indicado pela seta. I- Início da formação de uma larva bipinária, visão lateral. J- Início da formação de uma larva bipinária com enteroceles direita e esquerda indicadas pelas setas, visão frontal. L- Larva bipinária com trato digestório completo, visão lateral. M- Larva bipinária com trato digestório completo e ânus indicado pela seta, visão frontal. N- Larva bipinária com eixo ântero-posterior mais alongado e com distinção visível entre o estômago (indicado pela seta branca) e o esôfago (indicado pela seta amarela), visão lateral. O- Larva bipinária eixo ântero-posterior mais alongado, visão frontal. Escalas = 0,1mm.



**Figura 9** - *Coscinasterias tenuispina* – A-Início da formação de uma larva bipinária com células mesenquimais (indicadas pela seta) migrando da ponta do arquêntero em direção a blastocele, visão lateral. B- Início da formação de uma larva bipinária com células mesenquimais (indicadas pela seta) saindo da ponta do arquêntero em direção a blastocele, visão frontal. Escalas = 0,05mm.



**Figura 10** - *Coscinasterias tenuispina* - A- Óvulos. B- Transição entre gástrula e larva bipinária com blastóporo (indicado pela seta amarela) e cílios (indicado pela seta branca) evidentes. C- Larva bipinária com trato digestivo completo e boca evidente indicada pela seta, visão frontal. D- Larva bipinária com trato digestivo completo, visão lateral.

## 5. Discussão

### 5.1. Análise Molecular

#### Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação

De acordo com o teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genóticas de uma população podem ser inferidas a partir de suas frequências gênicas. Esse princípio assume como premissas a existência de panmixia (todos os cruzamentos são realizados ao acaso), ausência de seleção natural, deriva genética, migração e mutação atuando na população (FUTUYMA, 2002). Quando os valores observados das frequências genóticas são muito próximos dos esperados pelo teorema de Hardy-Weinberg em uma população, diz-se que esta está em equilíbrio. Por outro lado, quando as diferenças entre os valores esperados e observados são significativas, diz-se que esta população está fora do equilíbrio. No segundo caso, uma ou mais premissas desse teorema não está sendo respeitada.

Neste trabalho, desvios significativos do teorema de Hardy-Weinberg, causados pelo excesso de heterozigotos, foram encontrados em todas as populações. O excesso de heterozigosidade observado em *C. tenuispina* pode ser explicado pela reprodução clonal e/ou pela seleção natural (BLANQUER & URIZ, 2010). Segundo AVISE (1994), excessos de heterozigotos podem ser produzidos pela reprodução clonal diferenciada. Sob a predominância da reprodução assexuada na população, grande parte da prole não é gerada por cruzamentos aleatórios entre dois indivíduos parentais e, portanto, a taxa de recombinação entre genótipos é pequena. Desta forma, o que ocorre é o aumento na frequência e a permanência dos genótipos já existentes nesta população. Em segundo lugar, o tamanho efetivo da população, ou seja, o número de indivíduos igualmente capazes de contribuir geneticamente para a próxima geração

(Avisé, 2009), não corresponde ao total de espécimes presentes na mesma. Isso acontece porque um grande número de indivíduos compartilham os mesmos genótipos, tornando menor a quantidade de espécimes geneticamente diferentes que contribuem para a formação de uma nova geração (AYRE & DUFTY, 1994). Ambos os fatores (a ausência de cruzamentos aleatórios e a redução do tamanho populacional) podem ser responsáveis por desvios nas proporções genotípicas esperadas pelo princípio de Hardy-Weinberg (AYRE, 1984; AYRE & DUFTY, 1994).

Outros trabalhos com invertebrados marinhos também reportam o excesso de heterozigotos e relatam maior predominância da reprodução clonal como, por exemplo, os desvios encontrados em populações da anêmona-do-mar *Anthothoe albocincta* (BILLINGHAM & AYRE, 1997) e em populações do coral *Pocillopora damicornis* (STODDART, 1984). Este padrão também foi detectado em populações de equinodermos como as das espécies de holotúria *Sticophus chloronotus* e *Holothuria atra* (UTHCKE *et al.*, 1998, 2001). Estes trabalhos sugerem que os excessos de heterozigotos foram originados pela reprodução clonal, onde a fissão promove um forte impacto na estruturação genética das populações dessas espécies.

Em relação à hipótese da seleção natural favorecer os heterozigotos, já foi proposto que os genótipos heterozigotos podem oferecer vantagens em regiões com condições ambientais variáveis, sendo mais aptos a suportar mudanças ambientais mais intensas em comparação aos genótipos homozigotos (SCHICK *et al.*, 1979). As populações de *Coscinasterias tenuispina* aqui estudadas são encontradas em substratos rochosos e em áreas rasas. Áreas mais rasas, devido à alteração das marés, sofrem maior variação de fatores abióticos, tais como temperatura e o tempo de exposição ao sol, principalmente nos períodos diurnos de maré baixa (ALVES *et al.*, 2001). Tais condições variáveis podem ser fatores de estresse, favorecendo a sobrevivência diferencial dos heterozigotos (caso estes sejam mais tolerantes a tais circunstâncias). Entretanto, esses

mecanismos que determinam sobrevivência diferencial são pouco conhecidos e, portanto, essa proposta torna-se pouco confiável. Outros estudos prevêm maior ocorrência de reprodução assexuada em ambientes estáveis, uma vez que alguns clones assexuados altamente adaptados são considerados como tendo uma vantagem reprodutiva sobre os indivíduos que se reproduzem sexualmente, em tais circunstâncias (WILLIAMS, 1975; OLIVER, 1984).

Como última alternativa, esses desvios a favor dos heterozigotos podem ser explicados por erros de genotipagem. Estes afetam as estimativas das frequências alélicas e a discriminação dos diferentes genótipos, ocasionando inferências errôneas da estruturação populacional (LI *et al.*, 2002; KARLSSON & MORK, 2005). Entretanto, não foram encontradas evidências de alelos nulos ou de erros de nomeação gerados por *stuttering*. Além do mais, os erros de interpretação geralmente levam a uma deficiência de heterozigotos, uma vez que estes são mais facilmente interpretados como homozigotos do que o contrário (RAYMOND *et al.*, 1997). Assim, é muito pouco provável que erros na genotipagem tenham provocado esse padrão encontrado.

Desequilíbrio de ligação é comumente associado à proximidade entre em locos gênicos analisados, à deriva genética, à seleção natural e ao endocruzamento (BURNETT *et al.*, 1995). Entretanto, muitos casos de desequilíbrio são encontrados em populações cuja a reprodução assexuada é predominante (STODDART, 1984; ZILBERBERG *et al.*, 2006).

Em suma, a explicação mais provável para a tendência ao excesso de heterozigotos e o desequilíbrio de ligação é a reprodução clonal. Há, portanto, evidências de que a reprodução assexuada tem um papel relevante em todas as populações estudadas.

## Varição gênica entre as populações

A estrutura genética populacional pode ser definida como o padrão de distribuição não aleatória de alelos em uma dada escala espacial, resultante da dispersão limitada dos indivíduos, da seleção natural, da deriva gênica e da história da população. Um conceito importante relacionado à dispersão é o isolamento por distância. Este prevê o padrão esperado de estrutura genética espacial (EGE) no âmbito da dispersão restrita e deriva genética local (VEKEMANS & HARDY, 2004). A taxa de fluxo de genes influencia o papel da adaptação local e a EGE da população no processo evolutivo (FENSTER *et al.*, 2003). Sob esse aspecto, é previsto que a clonalidade exerça muita influência nos padrões de EGE. Esta ocorre pelo padrão esperado de distribuição agregada de réplicas de um mesmo genótipo e pela maior capacidade de dispersão dos clones quando estão em grande densidade, pois o crescimento clonal é também um componente de dispersão espacial. O potencial da influência da clonalidade na EGE dependerá do tipo e da taxa de crescimento clonal e o tempo de vida dos genetos (MARBÀ & DUARTE, 1998). No caso de *C. tenuispina*, há poucas chances de maior dispersão espacial dos clones (rametos) quando comparada à dispersão por larvas produzidas por reprodução sexuada (genetos).

O  $F_{ST}$  é o parâmetro de interesse na análise da diferenciação genética das subpopulações e além de ser uma estatística descritiva, está diretamente relacionado à variância da frequência alélica entre as populações e inversamente relacionado com o grau de semelhança entre os indivíduos dentro das populações. Este parâmetro mede o grau de diferenciação genética entre populações devido às diferenças de frequências alélicas entre elas, permitindo inferir sobre a existência de estruturação na população (WRIGHT, 1951; NAGYLAKI, 1997; HOLSINGER & WEIR,

2009). Não foram encontrados níveis significativos de diferenciação ( $F_{ST} < 0,05$ ) pela comparação par a par entre a maioria das populações de *C. tenuispina* estudadas. Em espécies com desenvolvimento planctotrófico (como *C. tenuispina*, com alto potencial de dispersão) e/ou que ocupam habitats livres de barreiras geográficas, espera-se que ocorra pouca divergência genética entre grupos (subpopulações), ou seja, baixos níveis de estruturação populacional (HOLLBORN *et al.*, 1994, MLADENOV *et al.*, 1997; GRAVES, 1998).

Apenas na população de Itaipu, geograficamente mais distante, houve alta diferenciação em relação às demais populações ( $F_{ST} > 0,15$ ). Estes dados foram corroborados pela análise filogeográfica, a partir do gene mitocondrial COI, a qual evidenciou a separação da população de Itaipu, embora com suporte relativamente baixo (*bootstrap* = 0,61). Os valores de  $F_{ST}$  para o gene COI também demonstram este isolamento da população de Itaipu em relação às outras. O conceito de "isolamento por distância", definido por WRIGHT (1943), estabelece que as diferenças genéticas entre as populações se acumulam quando a dispersão é restrita geograficamente.

O fluxo gênico é um fator relevante, pois define os limites geográficos de uma população (SLATKIN, 1995). À medida que ocorre troca de migrantes entre subpopulações ao longo das gerações, aumentam as semelhanças entre as frequências genotípicas destas. Considera-se, assim, que as chances de acasalamento entre os indivíduos de todas as subpopulações são as mesmas e, portanto, as frequências genotípicas observadas se aproximam daquelas esperadas, de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg. Segundo WRIGHT (1978), os valores de  $N_m$  acima de 1 indicam que o fluxo gênico é um fator atuante contra a diferenciação genética entre as populações. O presente estudo demonstrou que três das quatro populações de *C. tenuispina* amostradas na costa do Estado do Rio de Janeiro não se apresentam estruturadas. A única

população que apresenta diferenciação em relação às demais é aquela de Itaipu ( $N_m < 1$ ). Portanto, a dispersão tem sido suficiente para garantir o fluxo gênico entre as subpopulações de Armação de Búzios e Arraial do Cabo, ao contrário do que ocorre para a população de Niterói.

### **Análise da Clonalidade**

Em populações naturais de espécies que são capazes de se reproduzir tanto na forma sexuada quanto na forma assexuada, a análise da diversidade genotípica propicia uma investigação retrospectiva do sucesso relativo de cada modo de reprodução no recrutamento intrapopulacional e entre as populações. Espera-se que quanto maior for a contribuição da clonalidade, menor será o número de genótipos distintos identificados e, conseqüentemente, maior será a quantidade de indivíduos compartilhando o mesmo genótipo. De modo contrário, quanto mais predominante for a reprodução sexuada, maior será a quantidade de genótipos distintos esperados (HUNTER, 1993).

As estimativas da contribuição da reprodução sexuada e assexuada ( $G_o/G_e$ ,  $N_{go}/N$  e  $N^*/N$ ) obtidas para *Coscinasterias tenuispina* revelaram baixos valores para todas as populações, indicando, mais uma vez, que a influência da reprodução sexuada na manutenção dessas populações é muito baixa. Estes valores são ainda mais baixos que os encontrados para populações de invertebrados marinhos, nas quais a principal fonte de recrutas é a reprodução assexuada (BILLIGHAM & AYRE, 1997; CHEN *et al.*, 2002, COFFROTH & LASKER, 1998, BURNETT *et al.*, 1995, AYRE & WILLS, 1998, ZILBERBERG *et al.*, 2006; UTHICKE *et al.*, 1998; PAZOTTO, 2007) (Tabela 11).

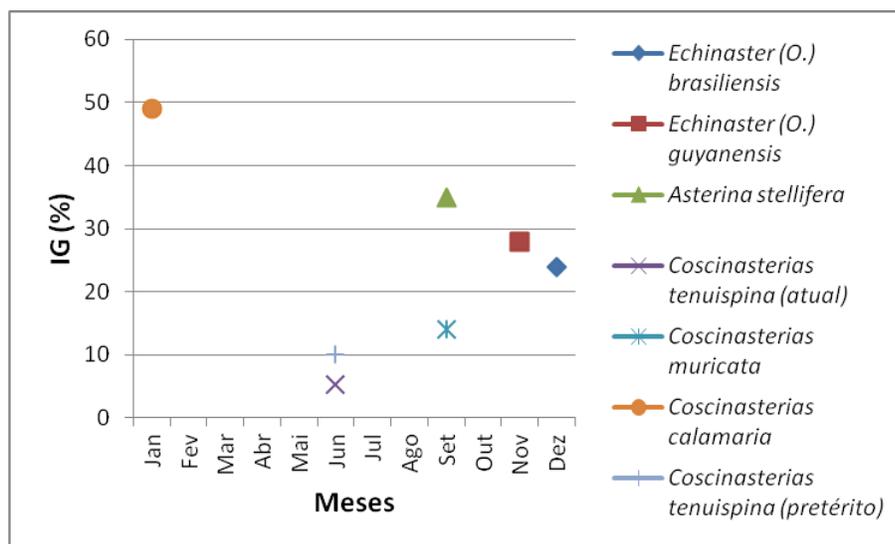
**Tabela 11** – Parâmetros de estimativa da reprodução sexuada e assexuada publicados para invertebrados marinhos.  $G_o$  = diversidade genotípica observada;  $G_e$  = diversidade genotípica esperada;  $N_{go}$  = número de genótipos multi-locos únicos;  $N^*$  = número de indivíduos sexualmente produzidos e  $N$ = tamanho amostral.

Espécie	Classificação	$G_o/G_e$	$N_{go}/N$	$N^*/N$	Referência
<i>Anthothoe albocinta</i>	Anêmona-do-mar	0,14 a 0,49	0,08 a 0,6	-	BILLIGHAM & AYRE, 1997
<i>Junceella fragilis</i>	Coral	0,6	0,07	-	CHEN <i>et al.</i> , 2002
<i>Plexaura kuna</i>	Coral	0,03 a 0,19	0,07 a 0,4	-	COFFROTH & LASKER, 1998
<i>Pavona cactus</i>	Coral	0,27 a 0,73	0,67 a 0,87	-	BURNETT <i>et al.</i> , 1995
<i>Zoanthus coppingeri</i>	Zoantídeo	0,02 a 0,9	0,03 a 0,94	-	AYRE & WILLS, 1998
<i>Chondrilla</i> sp.	Esponja	0,24 a 0,54	-	0,27 a 0,52	ZILBERBERG <i>et al.</i> , 2006
<i>Holothuria atra</i>	Holotúria	0,14 a 0,33	0,11 a 0,36	0,38 a 0,87	UTHICKE <i>et al.</i> , 1998
<i>Coscinasterias calamaria</i>	Estrela-do-mar	0,12 a 0,21	0,04 a 0,44	0,07 a 0,47	JOHNSON & THRELFALL, 1987
<i>Coscinasterias tenuispina</i>	Estrela-do-mar	0,52 a 0,98	0,71 a 0,98	0,98 a 1,0	PAZOTTO, 2007
<i>Coscinasterias tenuispina</i>	Estrela-do-mar	0,04 a 0,09	0,08 a 0,14	0,12 a 0,31	Atual estudo

A população de *C. tenuispina* de Itaipu foi aquela que apresentou menor diversidade genotípica. Peculiaridades desta população já foram encontradas anteriormente. ALVES *et al.*, (2001) reportaram que nenhuma fêmea foi coletada durante 12 meses de estudo. Também não foram encontrados indivíduos menores que 5 mm de raio (distância entre o disco central e a ponta do maior braço). A maioria dos indivíduos desta população (60% e 90%) apresentou braços em regeneração ou recém-fissionados e o processo de fissão foi observado durante todo o ano. Esses dados corroboram a hipótese de grande incidência da reprodução por fissiparidade nessa população e a ausência (ou baixa frequência) de recrutamento via reprodução sexuada.

VENTURA *et al.*, 2004 relataram alta incidência de fissão para indivíduos das populações de Itaipu, Prainha e Ferradura. A pequena contribuição da reprodução sexuada também foi

registrada posteriormente por FONSECA (2012), que relatou grande incidência de indivíduos sem gônadas ou em estágio gametogênico inativo (gônadas vazias). Foram registrados baixos valores do índice gonadal (IG) e uma pequena variação (de 0% a 5,24%) durante 14 meses de estudo. O IG de *C. tenuispina* é bem baixo comparado àquelas espécies de asteróides das mesmas regiões e, portanto, sujeitas às mesmas condições ambientais, como *Echinaster (Othilia) brasiliensis* e *Asterina stellifera*. O IG é baixo também em relação às outras espécies do mesmo gênero como *C. calamaria* e *C. muricata*. Além disto, os valores do IG são menores que aqueles registrados em estudos pretéritos nas mesmas populações (ALVES *et al*, 2001; FONSECA, 2012) (Figura 11). É provável que o esforço reprodutivo (ou seja, a produção de gametas, representado pelo IG) esteja decrescendo ao longo destes anos.



**Figura 11** - Índice gonadal (IG) máximo de diferentes espécies de asteróides ao longo dos meses. Dados atuais e pretéritos de *C. tenuispina*, de outras espécies do gênero *Coscinasterias*, de espécies que ocorrem na mesma região (*E. (O.) brasiliensis*, *Asterina stellifera*) e em ambientes semelhantes (*E. (O.) guyanensis*, em Vitória - E.S.).

A predominância da reprodução assexuada nas mesmas populações de *C. tenuispina* não foi detectada em estudo pretérito. PAZOTTO (2007) utilizou a técnica de eletroforese de aloenzimas (nas populações da Praia da Ferradura, Prainha e Itaipu) e RAPD (apenas na população de Itaipu) para estimar a contribuição dos modos de reprodução. A autora concluiu que tais populações mantinham-se, principalmente, por reprodução sexuada, apesar das evidências de alta incidência de fissão.

Duas hipóteses podem ser levantadas, considerando tais diferenças: (1) as populações de *C. tenuispina* do litoral do Estado do Rio de Janeiro sofreram alterações em sua estrutura genética consequentes da mudança na estratégia reprodutiva predominante ao longo desses anos; e (2) as diferentes técnicas utilizadas nos dois estudos conduziram a resultados opostos.

As aloenzimas foram os primeiros marcadores moleculares utilizados para estudos de genética de populações. Esta técnica se baseia nas diferentes taxas de migração de proteínas em uma cuba de eletroforese em gel de agarose, onde é aplicada uma carga elétrica (AVISE, 1994; SCHLÖTTERER, 2004). Mais populares entre as décadas de 1960 e 1980, os estudos com aloenzimas contribuíram para o entendimento das variações genéticas intrapopulacionais e entre populações. Atualmente, sequências de DNA são mais utilizadas como marcadores moleculares para estudos populacionais (SCHLÖTTERER, 2004). Menos de 10% do DNA dos eucariotos correspondem a genes estruturais que produzem proteínas. Assim, a técnica com aloenzimas detecta menos variação genômica quando comparada às sequências de DNA, além de não ser capaz de detectar alterações silenciosas no DNA, como também as variações nos íntrons (NEVO, 1978; SCHLÖTTERER, 2004).

Já a técnica de RAPD consiste na amplificação de segmentos aleatórios de DNA genômico em PCR, utilizando iniciadores (*primers*) de sequências curtas e aleatórias, compostas por 10

nucleotídeos, geralmente (WILLIAMS *et al.*, 1990; AVISE, 1994). Nesta técnica utiliza-se apenas um tipo de *primer* em cada reação, sendo este frequentemente formado por diferentes combinações das quatro bases nitrogenadas, com um conteúdo de G+C entre 50 e 70% (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2001). O polimorfismo detectado por estes marcadores tem natureza binária, ou seja, um determinado fragmento ou banda está presente ou ausente após amplificação e eletroforese em gel de agarose. Bandas de tamanhos diferentes são consideradas locos diferentes. Marcadores RAPD, diferente das aloenzimas, são dominantes, ou seja, indivíduos homozigotos dominantes para um determinado loco e indivíduos heterozigotos não podem ser diferenciados a partir do perfil de amplificação, uma vez que ambos serão representados pela presença de uma banda no gel (WILLIAMS *et al.*, 1990). Outra limitação é a dificuldade em reproduzir os resultados, mesmo quando se utiliza o mesmo protocolo (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2001).

Desta forma, os microsatélites estão substituindo outros marcadores como as aloenzimas, RFLPs e RAPDs em estudos populacionais devido à sua clara variabilidade e especificidade (GOLDSTEIN & POLOCK, 1997; MADESIS *et al.*, 2013).

Em relação às populações de *C. tenuispina*, as técnicas utilizadas anteriormente por PAZOTTO (2007), se caracterizam pela menor capacidade de registrar variações genéticas entre os indivíduos quando comparadas aos marcadores moleculares aqui utilizados. Mesmo assim, tais variações foram detectadas. Desta forma, descarta-se a hipótese 2, a qual supõe que diferentes marcadores produziram resultados opostos. Em resumo, é possível concluir que estas populações de *C. tenuispina* são mantidas, principalmente, por reprodução clonal no atual momento, ou seja, sofreram mudanças em sua diversidade genética durante este intervalo de tempo.

Os fatores que regulam a fissão ainda não estão bem elucidados. O ciclo reprodutivo dos asteróides é controlado pela interação de fatores endógenos e uma variedade de fatores exógenos,

como fotoperíodo, ciclo lunar, salinidade, temperatura da água e disponibilidade de alimento (PEARSE & WALKER, 1986; BOULAND & JANGOUX, 1988). Apesar de não saber os fatores que provocaram essa mudança, recomenda-se que esta investigação seja realizada em trabalhos futuros.

A conservação da diversidade genética é essencial, pois sua perda reduz a habilidade de uma população se adaptar às mudanças ambientais via seleção natural e, conseqüentemente, aumenta a probabilidade de extinção (FRANKHAM *et al.*, 2008). Sendo assim, é importante compreender os fatores que contribuem para esta predominância da reprodução assexuada como também, manter o monitoramento destas populações de *C. tenuispina* da costa do Rio de Janeiro.

## **5.2. Desenvolvimento Inicial de *Coscinasterias tenuispina***

Como já citado anteriormente, as larvas de equinodermos são classificadas de acordo com seu modo nutricional em lecitotróficas, planctotróficas ou planctotróficas facultativas (MCEWARD & CHIA, 1991; MCEWARD & JANIES, 1993). As larvas de *C. tenuispina* são planctotróficas o que, conseqüentemente, aumenta seu potencial de dispersão. Segundo SKÖLD *et al.* (2003), a diferenciação genética entre as populações de espécies com larvas planctotróficas é geralmente baixa, uma vez que há possibilidade de fluxo gênico entre as subpopulações, mesmo a grandes distâncias. Por permanecerem mais tempo na coluna d'água devido à necessidade de alimentação exógena, as larvas de *C. tenuispina* conseguem se dispersar em longas distâncias, o que explica sua ampla distribuição geográfica e alto grau de conectividade entre as populações do Brasil, Bahamas e do Mediterrâneo (WATERS & ROY, 2003).

A maioria das espécies de estrelas-do-mar desenvolve dois estágios larvais em sequência: bipinária e braquiolária (MCEWARD & JANIES, 1997). O estágio de bipinária é caracterizado pelo arranjo bilateral das bandas ciliares de alimentação e natação (pré e pós-oral), que são suportadas pelos lóbulos (MACBRIDE, 1914; KUME & DAN, 1996). O estágio de braquiolária é caracterizado por estruturas especializadas de fixação no lóbulo pré-oral: os braços braquiolares e o disco de fixação. Tais estruturas fornecem mais adesão ao substrato para a metamorfose.

O desenvolvimento embrionário e a morfologia da larva de *C. tenuispina* são bem similares aos da espécie *Coscinasterias calamaria* descrito por BARKER (1978). A similaridade entre a cronologia do desenvolvimento de *C. tenuispina* e de *C. calamaria* em todos os estágios embrionários (Tabela 12), permite afirmar que o estágio de braquiolária seria alcançado em torno do 18º dia de vida, caso as larvas tivessem resistido.

**Tabela 12** – Cronologia do desenvolvimento das espécies *C. tenuispina* e *C. calamaria*.

<b>Estágio de desenvolvimento</b>	<b>Tempo</b>	
	<i>C. tenuispina</i>	<i>C. calamaria</i>
Primeira clivagem	2h	1-2h
Segunda clivagem	3h	3h
Final das clivagens	4h	5-6h
Blástula	17h	16-18h
Gástrula inicial	23h	20-22h
Gástrula avançada	2º dia	46h
Bipinária	4º dia	4º dia
Braquiolária	-	18º dia

Há uma variedade de motivos para a mortalidade de larvas de invertebrados marinhos em laboratório. Um fator importante no cultivo de larvas é a influência da quantidade de alimento na sobrevivência e crescimento. OLSON & OLSON (1989) sugeriram que as larvas de equinodermos são especialmente tolerantes a baixas concentrações de alimento. ECKERT (1995) demonstrou

que a concentração de 5 cels/ $\mu$ l de *Dunaliella tertiolecta* é suficiente para cultivar larvas de outros grupos de equinodermos, como por exemplo de *Encope michelini* (bolacha-do-praia). Desta forma, é provável que a mortalidade das larvas de *C. tenuispina* não tenha ocorrido devido à insuficiência de alimento. Uma dieta mista (baseada em *Dunaliella tertiolecta* e outra espécie de microalga) poderia ser testada como alternativa para aumentar a sobrevivência dos cultivos em laboratório (STRATHMANN, 1987).

É importante enfatizar a dificuldade encontrada para o sucesso na fertilização *in vitro* de *C. tenuispina*. O desenvolvimento embrionário e larval já foi descrito para muitas espécies de um mesmo gênero de asteróides como, por exemplo: *Astropecten* (NEWTH, 1925; KOMATSU, 1975a; KOMATSU & NOJIMA, 1985; OGURO *et al.*, 1976); *Asterias* (MORTENSEN, 1913; GONDOLF, 2000; PAIK *et al.*, 2005); *Luidia* (MORTENSEN, 1913, 1938; WILSON, 1978; KOMATSU *et al.*, 1982, 1991, 1994, 2000), *Echinaster* (NACHTSHEIM, 1914; ATWOOD, 1973; SIDALL, 1979; NOBRE & CAMPOS-CREASY, 2000; MAGESKY, 2008), entre outros. No entanto, para o gênero *Coscinasterias*, a única descrição publicada até o momento é a de BARKER (1978) para *Coscinasterias calamaria*, o que pode ser um indicativo da fragilidade no desenvolvimento inicial das espécies deste gênero em laboratório. Neste estudo, todos os cuidados relativos à boa qualidade da água e manutenção dos embriões e larvas (COHEN & STRATHMANN, 1996; RAWLINGS, 1996; PECHENIK, 1999) foram realizados.

É provável que as espécies do gênero *Coscinasterias* tenham algum fator biológico característico que dificulte a sua fertilização *in vitro* ou mesmo *in situ*. Há anos a equipe do Laboratório de Echinodermata do Museu Nacional/UFRJ tem investido em tentativas para alcançar o desenvolvimento de *C. tenuispina*, porém, somente no atual trabalho isto foi possível. O baixo índice gonadal e o desequilíbrio sexual registrados para essa espécie nas populações da

costa do Rio de Janeiro (ALVES *et al.*, 2001; FONSECA, 2012) são indícios desses fatores biológicos que podem comprometer a reprodução sexuada.

## 6. Conclusões

- ✦ Atualmente, as populações da espécie *C. tenuispina* analisadas na costa do Estado do Rio de Janeiro encontram-se em desequilíbrio de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg.
- ✦ Estas populações são mantidas principalmente por reprodução assexuada, de acordo com evidências biológicas acumuladas ao longo de estudos pretéritos.
- ✦ Foram evidenciadas duas populações de *C. tenuispina*. As subpopulações da Praia da Tartaruga, Praia da Ferradura e Prainha apresentam um elevado fluxo gênico entre elas, enquanto que a população da Praia de Itaipu encontra-se isolada das demais.
- ✦ A população de *C. tenuispina* de Itaipu possui menor diversidade genotípica.
- ✦ A espécie *C. tenuispina* possui desenvolvimento planctotrófico.

## 7. Referências Bibliográficas

- ALLEN, J. D., PERNET, B. 2007. Intermediate modes of larval development: bridging the gap between planktotrophy and lecithotrophy. *Evolution & Development*, 9:643-553.
- ALVES, D. W. T., PEREIRA A. D., VENTURA, C. R. R. 2001. Sexual and asexual reproduction of *Coscinasterias tenuispina* from Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Biology*, 140: 95-101.
- ATWOOD, D. G. 1973. Larval development in the asteroid *Echinaster echinophorus*. *Biological Bulletin*, 144:1-11.
- AVISE, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York, 511p.
- AYRE, D. J., DAVIS, A. R., BILLINGHAM, M., LLORENS, T., STYAN, C. 1997a. Genetic evidence for contrasting patterns of dispersal in solitary and colonial ascidians. *Marine Biology*, 130:51-61.
- AYRE, D. J., DUFTY, S. 1994. Evidence for restricted gene flow in the viviparous coral *Seriatopora hystrix* on Australia's Great Barrier Reef. *Evolution*, 54:1590-1605.
- AYRE, D. J., WILLS, B. L. 1988. Population structure in the coral *Pavona cactus*: clonal genotypes show little phenotypic plasticity. *Marine Biology*, 99: 495-505.
- AYRE, D. J., RESING, J. M. 1986. Sexual and asexual production of planulae in reef corals. *Marine Biology*, 90:187-190.
- AYRE, D. J. 1984. The effects of sexual and asexual reproduction on geographic variation in the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Oecologia*, 62:222-229.
- AYRE, D. J. 1983. The effects of asexual reproduction and intergenotypic aggression on the genotypic structure of populations of the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Oecologia*, 57: 158-165.
- BANDELT, H. J., FORSTER, P., RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology Evolution*, 16:37-48.

- BARKER, M. F. 1978. Structure of the organs of attachment of brachiolaria larvae of *Stichaster australis* (Verrill) and *Coscinasterias calamaria* (Gray). (Echinodermata: Asteroidea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 33:1–36.
- BELKHIR, K., BORSA, P., CHIKHI, L., RAUFASTE, N., BONHOMME, F. 2004. Genetix 4.04, logiciel sous Windows<sup>TM</sup> pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 500, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- BILLINGHAM, M. R., AYRE, D. J. 1997. Asexual reproduction and genetic determination of colour patterns within populations of the subtidal sea anemone *Anthothoe albocincta*. *Marine Ecology Progress Series*, 156:121-130.
- BLACK, R., JOHNSON, M. S. 1979. Asexual viviparity and population of *Actinia tenebrosa*. *Marine Biology*, 53:27-31.
- BLANQUER, A., URIZ, M. J. 2010. Population genetics at three spatial scales of a rare sponge living in fragmented habitats. *BMC Evolutionary Biology*, 10:13.
- BOULAND, C., JANGOUX, M. 1988. Investigation of the gonadal cycle of the asteroid *Asterias rubens* under static condition. pp. 169–175. In: P. D. R. D. Burke, P. V. Mladenov, P. Lanbert, R. L. Parsley (eds.) *Echinoderm Biology*, Proceedings of the Sixth International Echinoderm Conference, A. A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.
- BRUSCA, R. C., BRUSCA G. J. 2002. *Invertebrates*. 2<sup>a</sup> Edição. Sinauer Associates, Massachusetts. 336p.
- BYRNE, M., BARKER, M. F. 1991. Embryogenesis and larval development of the asteroid *Patiriella regularis* viewed by light and electron microscopy. *Biological Bulletin*, 180:332–345.
- BURNETT, W. J., BENZIE, J. A. H., BEARDMORE, J. A., RYLAND, J. S. 1995. Patterns of genetic subdivision in populations of a clonal cnidarian, *Zoanthus coppingeri*, from the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, 122:665–673.
- CARVALHO, A. L. P. S., VENTURA, C. R. R. 2002. The reproductive cycle of *Asterina stellifera* (Mobius) (Echinodermata: Asteroidea) in the Cabo Frio region, southeastern Brazil. *Marine Biology*, 141: 947–954.

- CHEN, C. A., WEI, N. W., DAI, C. 2002. Genotyping the clonal population structure of a gorgonian coral, *Juncella fragilis* (Anthozoa: Octocorallia: Ellisellidae) from Lanyu, Taiwan, using simple sequence repeats in ribosomal intergenic space. *Zoological Studies*, 41:295-302.
- CHENNA, R., SUGAWARA, H., KOIKE, T., LOPEZ, R., GIBSON, T. J., HIGGINS, D. G., THOMPSON, J. D. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*. 31:3497-500.
- CLARK, A. M., DOWNEY, M. E. 1992. *Starfishes of the Atlantic*. Chapman & Hall, London, 794pp.
- CLARK, A. M. 1967. Variable symmetry in fissiparous Asterozoa. *Symposium of the Zoological Society of London*, 20: 143-157.
- COHEN, C. S., STRATHMANN, R. R. 1996. Embryos at the edge of tolerance: effects of environment and structure of egg masses on supply of oxygen to embryos. *Biological Bulletin*, 190:8-15.
- COFFROTH, M. A., LASKER, H. R. 1998. Population structure of a clonal gorgonian coral: the interplay between clonal reproduction and disturbance. *Evolution*, 52: 379-393.
- COFFROTH, M. A., LASKER, H. R., DAMOND, M. E., BRUENN, J. A, BERMINGHAM, E. 1992. DNA fingerprints of a gorgonian coral: a method for detecting clonal structure in a vegetative species. *Marine Biology*, 114:317-325.
- CROZIER, W. J. 1920. Notes on some problems of adaptation. 2. On the temporal relations of asexual propagation and gametic reproduction in *Coscinasterias tenuispina*: with a note on direction of progression and on the significance of the madrepoes. *Biological Bulletin*, 34: 116-129.
- CROZIER, W. J. 1915. On the number of rays in *Asterias tenuispina* Lamk. at Bermuda. *American Naturalist*, 49:28-36.
- DORKEN, M. E., ECKERT, C. G. 2001. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology*, 89: 339-350.

- DUCATI, C. C., CARNEVALI, M. D. C., BARKER, M. F. 2004. Regenerative potential and fissiparity in the starfish *Coscinasterias muricata*. pp. 113-118. In: Echinoderms: München (Heinzeller T & Nebelsick JH (eds), Taylor & Francis Group, London.
- ECKERT, G. L. 1995. A novel larval feeding strategy of the tropical sand dollar, *Encope michelini* (Agassiz): adaptation to food limitation and an evolutionary link between planktotrophy and lecithotrophy. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 187, 103–128.
- ELLEGREN, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435-445.
- EMSON, R. H., WILKIE, I. C. 1980. Fission and autotomy in echinoderms. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 18:155-250.
- EXCOFFIER, L., LISCHER, H., E. 2010. Arlequin Suite Ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetic analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- FENSTER, C. B., VEKEMANS, X., HARDY, O. J. 2003. Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). *Evolution*, 57: 995–1007.
- FONSECA, B. F. 2012. Relação entre a regeneração corporal, gametogênese e desenvolvimento embrionário da estrela-do-mar *Coscinasterias tenuispina*. 36p. Monografia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- FRANKHAN, R., BALLOU, J. D., BRISCOE, D. A. 2008. *Fundamentos de Genética de Conservação*. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética. 280p.
- FUTUYMA, D. J. 2002. *Biologia Evolutiva*. 2ª Edição. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo, 631p.
- GARCIA-CISNEROS, A., VALERO-JIMENEZ, C., PALACIN, C., PEREZ-PORTELA, R. 2013. Characterization of thirty two microsatellite loci for three Atlanto-Mediterranean echinoderm species. *Conservation Genetics Resources*, 5:749-753.

- GEORGIADIS, E. T., TAMARA, A., HOLDWAY, D. A. 2006. The reproductive cycle of the asteroid *Coscinasterias muricata* in Port Phillip Bay, Victoria, Australia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 332:188-197.
- GOLDSTEIN, D. B., POLLOCK, D. D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, 88:335–342.
- GONDOLF, A. L. 2000. Light and scanning electron microscopic observations on the developmental biology of the common starfish *Asterias rubens* Linné (Echinodermata: Asteroidea). *Ophelia*, 52:153-170.
- GRAVES, J. E. 1998. Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. *Journal of Heredity*, 89: 427437.
- HARAMOTO, H., KOMATSU, M., YAMAZAKI, Y. 2006. Populations genetic structure of the fissiparous seastar *Coscinasterias acutispina* in the Sea of Japan. *Marine Biology*, 148:813-820.
- HENDLER, G., MILLER, J. E., PAWSON, D. L., KIER, P. M. 1995. *Sea stars, sea urchins and allies: echinoderms of Florida and the Caribbean*. Washington: Smithsonian Institution Press. 391p.
- HEYWARD, A. J., STODDART, J. A. 1985. Genetic structure of two species of *Montipora* on a patch reef: conflicting results from electrophoresis and histocompatibility. *Marine Biology*, 85:117-121.
- HOFFMANN, R. J. 1987. Short-term stability of genetic structure in populations of the sea anemone *Metridium senile*. *Marine Biology*, 93: 499-507.
- HOFFMANN, R. J. 1986. Variation in contribution of asexual reproduction to the genetic structure of populations of the sea anemone *Metridium senile*. *Evolution*, 40:357-365.
- HOLLBORN, K., JOHNSON, M. S., BLACK, R. 1994. Population genetics of the corallivorous gastropod *Drupella cornus* at Ningalo Reef, western Australia. *Coral Reefs*, 13:33–39.
- HOLSINGER, K. E., WEIR, B. S. 2009 Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting *F<sub>ST</sub>*. *Nature Reviews Genetics*, 10:639-650.

- HOSHI, M., MORIYAMA, H., MATSUMOTO, M. 2012. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425:595–598.
- HUNTER, C. L. 1993. Genotypic variation and clonal structure in corals populations with different disturbance histories. *Evolution*, 47:1213-1228.
- HURST, L. D., PECK, J. R. 1996. Recent advances in understanding of the evolution and maintenance of sex. *Tree*, 11:46-52.
- JAECKLE, W. B. 1994. Multiple modes of asexual reproduction by tropical and subtropical sea star larvae: an unusual adaptation for genet dispersal and survival. *Biological Bulletin*, 186:62-71.
- JOHNSON, M. S., THREFFALL, T. J. 1987. Fissiparity and population genetics of *Coscinasterias calamaria*. *Marine Biology*, 93:517-525.
- KANATANI, H. 1969. Induction of spawning and oocyte maturation by L-methyladenine in starfishes. *Experimental Cell Research*, 57: 333-337.
- KARLSSON, S., MORK, J. 2005. Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium, and temporal instability in allele frequencies at microsatellite loci in a local population of Atlantic cod. *Journal of Marine Science*, 62:1588–1596.
- KOMATSU, M., SEWELL, M., CARSON, S. F., CHIA, F. 2000. Larval Development and Metamorphosis of the Sea *Luidia foliolata* (Echinodermata:Asteroidea). *Species Diversity*, 5:155-162.
- KOMATSU, M., KAWAI, M., NOJIMA, S., OGURO, C. 1994. Development of the sea-star, *Luidia maculata* Muller & Troschel, Pp. 327-333. in: *Echinoderms through Time* (B. David, A Guille, J. P. Féral and M. Roux, eds.). Balkema, Rotterdam, the Netherlands.
- KOMATSU, M., OGURO, C., LAWRENCE, J. M. 1991. A comparison of development in three species of the genus, *Luidia*, (Echinodermata: Asteroidea) from Florida. Pp 489-498. In *Biology of Echinodermata* (T. Yanagisawa, I. Yasumasu, C. Oguro, N. Suzuki and T. Motokawa, eds.). Balkema, Rotterdam, the Netherlands.
- KOMATSU, M., S. NOJIMA. 1985. Development of the seastar, *Astropecten gisselbrechti* Doderlein. *Pacific Science*, 39: 274-282.

- KOMATSU, M. 1982. Development of the sea-star *Ctenopleura fisheri*. *Marine Biology*, 66:199-205.
- KOMATSU, M. 1975a. On the development of the sea-star, *Astropecten latespinosus* Meissner. *Biological Bulletin*, 148:49-59.
- KUME, M., DAN, K. 1957. *Invertebrate Embryology U.S. Department of Commerce*, National Technical Information Service, Washington, 605 pp.
- LEHMAN, T., HAWLEY, W. A., KAMAU, L., FONTENILLE, D., SIMARD, F., COLLINS, F. H. 1996. Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: Comparison of microsatellite and allozyme loci. *Journal of Heredity*, 77:192-200.
- LI, Y. C., KOROL, A. B., FAHIMA, T., BEILES, A., NEVO, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453–2465.
- LLODRA, E. R. 2002. Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology*, 87-170.
- MACBRIDE, E. W. 1914. *Textbook of Embryology*, Vol. 1, Invertebrata. MacMillan and Co, London.
- MADESIS, P., GANOPOULUS, I., TSAFTARIS, A. 2013. Microsatellites: Evolution and Contribution, Microsatellites. Springer, pp.1-13.
- MAGESKY, A. S. 2007. *Echinaster (Othilia) guyanensis* Clark, 1987 (Echinodermata: Asteroidea: Echinasteridae: Ciclo reprodutivo, desenvolvimento inicial e variabilidade morfológica na Baía de Vitória, Espírito Santo. Tese de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 142p.
- MARBA, N., DUARTE, C. M. 1998. Rhizome elongation and seagrass clonal growth. *Marine Ecology Progress Series*, 174: 269–280.
- MATIOLI, S. R., PASSOS-BUENO, M. R. 2001. *Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos*. MATIOLI, Sergio Russo (Ed.). Biologia Molecular e evolução, Ribeirão Preto.
- MATSUMOTO, T., YUKAWA, W., NOZARI, Y., NAKASHIGE, R., SHINYA, M., MAKINO, S., YAGURA, M., IKUTA, T., IMANISHI, T., INOKO, H., TAMIYA, G., GOJOBORI, T.

2004. Novel algorithm for automated genotyping of microsatellites. *Nucleic Acids Research* 32:6069-6077.
- MCEDWARD, L. R., JANIES, D. A. 1997. Relationships among development, ecology, and morphology in the evolution of Echinoderm larvae and life cycles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 60, 381-400.
- MCEDWARD, L. R., JANIES, D. A. 1993. Life Cycle Evolution in Asteroids: What is a Larva? *The Biological Bulletin*, 184: 255-268.
- MCEDWARD, L. R., CHIA, F. S. 1991. Size and energy content of eggs from echinoderms with pelagic lecithotrophic development. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 147: 95-102.
- MCFADDEN, C. S. 1997. Contributions of sexual and asexual reproduction to population structure in the clonal soft coral, *Alcyonium rudyi*. *Evolution*, 51: 112-126.
- MLADENOV, P. V., ALLIBONE, R. M., WALLIS, G. P. 1997. Genetic differentiation in the New Zealand sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata). *New Zealand Journal of Marine & Freshwater Research*, 31:261–26.
- MLADENOV, P. V. 1996. Environmental factors influencing asexual reproductive processes in echinoderms. *Oceanologica Acta*, 19: 227-235.
- MLADENOV, P. V., EMSON, R. H. 1990. Genetic structure of populations of two closely related brittle stars with contrasting sexual and asexual life histories, with observations on the genetic structure of a second asexual species. *Marine Biology*, 104: 256-274.
- MORTENSEN, T. 1938. Contributions to the study of the development and larval forms of echinoderms IV. Kongelige Danske Vidensk-absernes Selskabs Skrifter, Naturvidenskabelig og Matematisk Aftleling, Series, 7:1-45.
- MORTENSEN, T. 1913. On the development of some British echinoderms. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 10:1–18.
- NACHTSHEIM, H. 1914. Über die Entwicklung von *Echinaster sepositus* (Gray). *Zoologischer Anzeiger*, p. 44
- NAGYLAKI, T. 1997. The diffusion model for migration and selection in a plant population. *Journal of Mathematical Biology*, 35: 409–431.

- NEWTH, H. G. 1925. The early development of *Astropecten irregularis*, with remarks on duplicity in echinoderm larvae. *Quart. J. Micr. Sci.* 69:5 19-554.
- NEVO, E. 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theoretical Population Biology*, 13:121-177.
- NOBRE, C. C., CAMPOS-CREASEY, L. S. 2000. Efeito da salinidade no desenvolvimento larval de *Echinaster echinophorus* (Lamarck 1816) (Echinodermata: Asteroidea). *Notas Técnicas do Facimar*, 4: 61-68.
- OGURO, C., KOMATSU, M., KANO, Y. T. 1976. Development and metamorphosis of the sea-star *Astropecten scoparius*. *Biological Bulletin*, 151: 560-573.
- OLIVER, J. S. 1984. Selection for asexual reproduction in an Antarctic polychaete worm. *Marine ecology Progress Series*, 19:33-38.
- OLSON, R. R., OLSON, M. H. 1989. Food limitation of planktotrophic marine invertebrate larvae: does it control recruitment success? *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 20: 225-247
- OTTESSEN, P. O., LUCAS, J. S. 1982. Divide or Broadcast: Interrelation of sexual and asexual reproduction in a population of the fissiparous hermaphroditic sea star *Nepanthia belcheri* (Asteroidea: Asterinidae). *Marine Biology*, 69:223-233.
- PAIK, S. G., PARK, H. S., YI, S. K., YUN, S. G. 2005. Developmental duration and morphology of the sea star *Asterias amurensis*, in Tongyeong, Korea. *Ocean Science Journal*, 40: 65-70.
- PALUMBI, S. R. 1996. What can molecular genetics contribute to marine biogeography? An urchin's tale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 203:75-92.
- PALUMBI, S. R., MARTIN, A. P., ROMANO, S., MCMILLAN, W. O., STICE, L., GRABOWSKI, G. 1991. The simple fool's guide to PCR, Version 2.0. Published and distributed by the authors, Honolulu.
- PAZOTTO, C. E. M., VENTURA, C. R. R., SILVA, E. P. 2010. Genetic contribution of sexual and asexual reproduction to the recruitment of a sexually unbalanced population of *Coscinasterias tenuispina* (Echinodermata: Asteroidea) in Rio de Janeiro, Brazil. pp. 473-478. In: L. G. Harris, S. A. Böttger, C. W. Walker, M. P. Lesser (eds.) *Echinoderms:*

*Durham*, Proceedings of the 12th International Echinoderm Conference, Durham, New Hampshire, U.S.A.

- PAZOTTO, C. E. M. 2007. Estimativa genética da contribuição da reprodução sexuada e assexuada em populações de *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Asteroidea) na costa do Rio de Janeiro. 107p. Dissertação. Museu Nacional-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- PEARSE, J. S., WALKER, C. W. 1986. Photoperiodic regulation of gametogenesis in a North Atlantic sea star *Asterias vulgaris*. *Invertebrate Reproduction & development*, 9:71-77.
- PECHENIK, J. A. 1999. On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Marine Ecology Progress Series*, 177:269–297.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7):1253-1256.
- POTTS, D. C. 1983. Evolutionary disequilibrium among Indo-Pacific corals. *Bulletin of Marine Science*, 33:619-632.
- RAWLINGS, T. A. 1996. Shelds against ultraviolet radiation: an additional protective role for the egg capsules of benthic marine gastropods. *Marine Ecology Progress Series*, 136:81-95.
- RAYMOND, M., ROUSSET, F. 1995. GENEPOP 4.2: Population genetics software for exact test and ecumenicism. *The Journal of Heredity*, 86:248–249.
- RAYMOND, M., VAANTO, R. L., THOMAS, F., ROUSSET, F., MEEUS, T., RENAUD, F. 1997. Heterozygote deficiency in the mussel *Mytilus edulis* species complex revisited. *Marine Ecology Progress Series*, 156:225-237.
- ROSETI, M., SALZBURGER, W., BERNER, D. 2012. Uninformative polymorphisms bias genome scans for signatures of selection. *BMC Evolutionary Biology*, 12:94
- RUBILAR, T., WARD, C. T. P., VIVAR, M. E. D. 2005. Sexual and asexual reproduction of *Allostichaster capensis* (Echinodermata: Asteroidea) in Golfo Nuevo. *Marine Biology*, 146:1083–1090.
- RUPPERT, E. E., BARNES, R. D. 1996. *Zoologia de Invertebrados*. 6ª edição. Roca LTDA, São Paulo, 1029p.

- SACCONI, C. 1994. The evolution of mitochondrial DNA. *Current Opinion in Genetic and Development*, 4:875-881.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350-1354.
- SCHLÖTTERER, C. 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5: 63–69.
- SELKOE, K. A., TOONEN, R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615–629.
- SHICK, J. M., HOFFMAN, R. J., LAMB, A. N. 1979. Asexual reproduction, population structure and genotype-environment interactions in sea-anemona. *American Zoologist*, 19:699-713.
- SIDALL, S. E. 1979. Development of ossicles in juveniles of sea star *Echinaster sentus*. *Bulletin of Marine Science*, 29 (2): 278-282.
- SKÖLD, M., WING, S. R., MLADENOV, P. V. 2003. Genetic subdivision of a sea star with high dispersal capability in relation to physical barriers in a fjordic seascape. *Marine Ecology Progress Series*, 250:163–174.
- SLATKIN, M., 1995 A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457–462.
- SMITH, B. A. 1992. Echinoderm phylogeny: Morphology and molecules approach accord. *Trends in Ecology and Evolution*, 7:224-229.
- SOTKA, E. E., HEMPELMANN, J. A., BIERMANN, C. H. 2005. Genetic Evidence of Postglacial Population Expansion in Puget Sound Rockfish (*Sebastes emphaeus*). *Marine Biotechnology*, 7:223–230.
- STENBERG, P., M. LUNDMARK, A. SAURA. 2003. MLGsim: a program for detecting clones using a simulation approach. *Mol Ecol Notes* “In press”.
- STODDART, J. A., TAYLOR, J. F. 1988. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics*, 118: 705-711.

- STODDART, J. A. 1984. Genetic structure within populations of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 81:19-30.
- STODDART, J. A. 1983a. Asexual production of planulae in the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 76: 279-284.
- STRATHMANN, M. F. 1987. Reproduction and development of marine invertebrates of the northern Pacific coast. Data and methods for the study of eggs, embryos, and larvae. Univ. Wash.
- STRATHMANN, R. R. 1985. Feeding and nonfeeding larval development and life-history evolution in marine invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16:339-36.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER G., NEI, M., KUMAR, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28:2731–2739.
- UTHICKE, S., CONNAND, C., BENZIE, J. H. A. 2001. Population genetics of the fissiparous holothurians *Stichopus chloronotus*, and *Holothuria atra* (Aspidochirotida): a comparison between the Torres Strait and la reunion. *Marine Biology*, 139:257-265.
- UTHICKE, S., BENZIE, J. H. A., BALLMENT, E. 1998. Genetic structure of fissiparous populations of *Holothuria atra* on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, 132:141-151.
- VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P. M., SHIPLEY, P. F. 2004. MICRO-CHECKER: For identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4:535–538.
- VENTURA, C. R. R., ALVES, S. L. S., MAURÍCIO C. E. P., SILVA, E. P. 2004. Reproduction and population genetics of *Coscinasterias tenuispina* (Asteroidea: Asteriidae) on the Brazilian coast. pp. 73-77. In: Heinzeller & Nebelsick (eds) *Echinoderms: Munchen*. Taylor & Francis Group, London.
- VENTURA, C. R. R., FALCÃO, A. P. C., SANTOS, J. S., FIORI, C. S. 1997. Reproductive cycle and feeding periodicity in the starfish *Astropecten brasiliensis* in the Cabo Frio upwelling ecosystem (Brazil). *Invertebrate Reproduction & development*, 31: 135-141.

- VEKEMANS, X., HARDY, O. 2004. New insights from fine-scale structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* 12: 921–935.
- WATERS, J. M., ROY, M. S. 2003. Global phylogeography of the fissiparous sea-star genus *Coscinasterias*. *Marine Biology*, 142:185-191.
- WEIR, B., COCKERHAM, C., 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358–1370.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531–6535.
- WILLIAMS, G. C. 1975. Sex and evolution. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- WILSON, D. P. 1978. Some observations of bipinnariae and juveniles of the starfish genus *Luidia*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 58: 467-478.
- WRIGHT, S. 1978. *Evolution and genetics of populations*. Chicago: University of Chicago Press. 511p.
- WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19:395-420.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*, 15:223-354.
- ZIGLER, K. S., LESSIOS, H. A. 2003. Evolution of bindin in the pantropical sea urchin *Tripneustes*: comparisons to bindin of other genera. *Molecular Biology and Evolution*, 20: 220–231.
- ZILBERBERG, C., SOLÉ-CAVA, A. M, KLAUTAU, M. 2006. The extent of asexual reproduction in sponges of the genus *Chondrilla* (Demospongiae: Chondrosida) from the Caribbean and the Brazilian coasts. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 336: 221-220.