UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE- FURG PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA

OCORRÊNCIA DO NEUROPIGMENTO LIPOFUSCINA E ESTRUTURA POPULACIONAL DO CAMARÃO VERMELHO *Pleoticus muelleri* (DECAPODA: SOLENOCERIDAE) NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL

PEDRO FERNANDES SANMARTIN PRATA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Cestari Dumont

RIO GRANDE Janeiro de 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande – FURG, ao Instituto de Oceanografia e a Capes pelo apoio, estrutura e bolsa concedida durante o período de doutorado. Ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, todo o corpo docente, que sempre se mostrou disposto a colaborar para que este estudo pudesse ser realizado.

Agradeço a minha família, principalmente minha mãe Ana Luiza, que sem ela nada disso seria possível.

Meu mais sincero obrigado a meu orientador Luiz Felipe Dumont. Fui o seu primeiro orientando no mestrado e agora finalizando o doutorado. Obrigado por sempre estar disposto a ajudar, ensinar, e claro, chamar a atenção sempre de forma construtiva e às vezes dura (com razão), mas acima de tudo, obrigado pela amizade.

Também agradeço imensamente a Maria Cristina, que desde o começo do doutorado viveu comigo os momentos de decepção e felicidade a cada PCR no laboratório de biologia molecular, além de passar todo seu conhecimento e me ajudar em todas as fases ao longo destes 4 anos e meio. É uma amizade que vou levar para o resto da vida. Diversos professores ajudaram ao longo deste processo: Professora Maíra, que sempre ajudou quando foi preciso, muito obrigado! Professor Juliano, Gonzalo, Duane, Kinas, Pedro de Carli, obrigado pela ajuda!

Amigos do laboratório de Crustáceos Decápodes: Ileana e Lucas (Obrigado pela ajuda, principalmente na estatística), Ana Luzia, Cristopher, Dédi, Marcos, Sarah, Diego (que me ajudou no começo com a lipofuscina) e demais, muito obrigado por tudo! Finalizando, um agradecimento especial ao mentor do nosso laboratório, amigo pessoal de muitos anos, que sempre me ajudou e me incentivou, e que seremos eternamente gratos pelo laboratório ser o que é hoje, obrigado ao Prof. Dr Fernando D'Incao.

ÍNDICE

	RESUMO	1
	ABSTRACT	.4
1	. INTRODUÇÃO	7
	1.1 Características Gerais	7
	1.2 Ocorrência do Neuropigmento lipofuscina	9
	1.3 Identificação de Estoques1	12
	1.4 Hipóteses	17
	1.5 Objetivos1	18
	1.5.1 Objetivo Geral	18
	1.5.2 Objetivos Específicos	18
2.	MATERIAIS E MÉTODOS1	19
	2.1 Ocorrência de Neurolipofuscina	19
	2.1.1. Coletas dos espécimes para determinação da ocorrência de neurolipofuscina	19
	2.1.2. Morfologia do cérebro e a quantificação de neurolipofuscina em <i>P.muelleri</i>	20
	2.1.3. Coleta e análise de imagens	21
	2.1.4. Análise dos dados2	1
	2.2 Identificação de Estoques – Relações Biométricas2	22
	 2.2 Identificação de Estoques – Relações Biométricas	22 2
	2.2 Identificação de Estoques – Relações Biométricas 2 2.2.1. Amostragem Geral e Área de Estudo 2 2.2.2. Processamento das amostras 2	22 2 2

2.3. Identificação de Estoques – Biologia Molecular					
2.3.1. Extração do DNA genômico25					
2.3.2. Amplificação da região controle do DNA mitocondrial26					
2.3.3. Análise Eletroforética do Segmento Amplificado do DNA mitocondrial27					
2.3.4. Purificação e Sequenciamento do Produto de PCR					
2.3.5. Análise dos Dados28					
3. SÍNTESE DOS RESULTADOS					
3.1. Ocorrência de Neurolipofuscina					
3.2. Identificação de Estoques					
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS					
4.1. Ocorrência e Quantificação do Neuropigmento Lipofuscina					
4.2. Identificação de Estoques					
LITERATURA CITADA					
APÊNDICES45					
Apêndice 1					
Apêndice 2					
Apêndice 3					

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1: Occurrence and quantification of the autofluorescent pigment neurolipofuscin in brains of the Red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda: Solenoceridae).

Apêndice 2: Biometric Relationships of the red Shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Decapoda: Solenoceridae) in the South American Coast

Apêndice 3: Population genetic structure of the red shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Decapoda: Solenoceridae) in the South American Coast.

RESUMO

Nos últimos anos, a pesca camaroeira no Brasil vem se tornando uma atividade multiespecífica, direcionando-se também para espécies alternativas, como o camarão vermelho Pleoticus muelleri. Dessa forma, para a elaboração de planos de manejo eficientes, e a fim de evitar a sobreexploração dos estoques de P.muelleri, a determinação precisa da idade e da estrutura populacional é de fundamental importância para que a pesca se mantenha de forma sustentável, e as populações sejam preservadas. O presente estudo teve como objetivos principais: 1) verificar a ocorrência e o acúmulo de neurolipofuscina nos cérebros de *P.muelleri*, e 2) elucidar de que forma os estoques estão distribuídos ao longo da costa Sul Americana, utilizando a biologia molecular e as relações biométricas como ferramentas. Para verificar a ocorrência e como ocorre o acúmulo da neurolipofuscina, no ano de 2012, seis amostras foram coletadas na região de Balneário Camboriú, Santa Catarina, sul do Brasil, em um barco de pesca camaroeiro. Uma análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar a taxa de acúmulo de neurolipofuscina e a média do diâmetro dos grânulos entre três classes de tamanho, baseado no comprimento da carapaça (classe I <15mm; classe II 15-25mm e classe III >25 mm). Verificou-se uma diferença significativa (p<0,05) na taxa de acúmulo, entre 0,11% na classe I e 0,35% na classe III. Além disso, a média no diâmetro dos grânulos apresentou um crescimento linear, apresentando um tamanho médio de 0,67 µm na classe I, 0,73 µm na classe II e 0,83 µm na classe III. Para a identificação de estoques de *P.muelleri*, foram coletados espécimes ao longo de toda a área de distribuição da espécie, entre Rio de Janeiro, Brasil e Sul do Golfo São Jorge, Argentina, tanto para análises de morfometria quanto para análises moleculares. Através de uma análise Permanova, verificou-se uma diferença significativa nas relações biométricas entre as populações e também entre machos e fêmeas. Além disso, a análise de Cluster indicou uma clara separação em dois grupos distintos: Um formado pela população do Rio de Janeiro, e outro formado pelas populações de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Uruguai e pelas populações da costa Argentina. Um padrão latitudinal no número médio de dentes do rostro foi observado, com uma redução conforme o aumento da latitude. Através do sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial, foi avaliada a diversidade genética, a estrutura populacional e a história demográfica dos camarões coletados ao longo da costa Sul-Americana. De forma geral, os resultados evidenciaram o mesmo padrão de estruturação revelado pelas relações biométricas. Altas diversidades haplotípicas (h entre 0,76 e 0,98) foram encontradas em todas as populações, com a menor delas no Rio de Janeiro (h=0,76). Foi encontrado um total de 86 haplótipos. Foi observado um padrão de alta estruturação populacional entre Rio de Janeiro e as populações da costa Argentina (Norte e Sul do Golfo São Jorge e Rawson) e uma estruturação moderada nas populações do Sul do Brasil. Já entre as populações argentinas, uruguaia e do sul do Brasil, foi verificada uma baixa estruturação. A maioria das populações apresentou um padrão unimodal da distribuição mismatch, indicando uma recente expansão demográfica, enquanto o Rio de Janeiro apresentou uma distribuição multimodal, característica de uma população estável. Os maiores tempos de expansão foram encontrados entre os limites de distribuição da espécie, no Rio de Janeiro (100.146 anos), e no Sul do Golfo São Jorge (88.450). O menor tempo foi encontrado no Uruguai (62.865). De maneira geral, as diversidades haplotípicas foram diretamente relacionadas aos tempos de expansão, exceto no Rio de Janeiro, que apresentou o maior tempo de expansão e uma baixa diversidade, possivelmente devido a um efeito gargalo causado por um isolamento em uma área reduzida, sobrepesca ou impactos humanos. Dessa forma, os resultados obtidos, tanto pelas relações biométricas quanto pela biologia molecular, são corroborados pela distância geográfica separando as populações, assim como pela oceanografia costeira. Dessa forma, para um manejo adequado, e visando a manutenção da variabilidade genética do camarão vermelho, sugere-se uma unidade de manejo individual no Rio de Janeiro, e um plano compartilhado entre o sul do Brasil, Uruguai e Argentina.

Palavras-chave: Neurolipofuscina, Idade, Região Controle.

ABSTRACT

In recent years, shrimp fishery in Brazil has become a multispecies activity, also targeting alternative species such as the red shrimp *Pleoticus muelleri*.. Thus, in order to elaborate management plans for these fisheries, and to avoid overexploitation of P. muelleri stocks, a precise determination of age and the population structure throughout its distribution area is of fundamental importance for keeping the fishing in a sustainable way, and the populations be preserved. The main goals of the present study were: 1) verifying the occurrence and accumulation of neurolipofuscin in *P.muelleri* brains, and 2) to elucidate how the stocks of *P.muelleri* are distributed off the South American Coast, using morphometric traits and molecular biology as tools. To verify the occurrence and the neurolipofuscin accumulation, in 2012, six samples were collected in the region of Balneário Camboriú, Southern Brazil, on a shrimp fishing boat. An analysis of variance (ANOVA) was used to compare the accumulation rate of neurolipofuscin and the mean diameter of the granules between three size classes, based on the carapace length (class I <15mm, class II -15-25mm and class III> 25 mm). In order to determine the population structure of *P.muelleri*, were sampled individuals throughout the distribution area of the species, between Rio de Janeiro, Brazil and South of the Gulf of São Jorge, Argentina, for both morphometric and molecular analyzes. Through a Permanova analysis, there was a significant difference in biometric relationships among populations and also between males and females. In addition, the Cluster analysis indicated a clear separation into two distinct groups: one formed by the population of Rio de Janeiro, and the other formed by the populations of Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Uruguay and the populations from the Argentinean coast. A latitudinal pattern in mean number of rostral teeth (RT) was observed, with reductions in mean values as latitudes decreases. Through the sequencing of the mitochondrial DNA control region, the genetic diversity, population structure and demographic history of each population were evaluated. In general, the results showed the same pattern of structuring revealed by the morphometric traits. A total of 86 mtDNA haplotypes were found. Strong population structure was observed, with a high differentiation between Rio de Janeiro and Argentinean populations, and a moderate population structure between Rio de Janeiro and the populations from South Brazil and Uruguay. Among the populations from Argentina, Uruguay and Southern Brazil, a low population structure was observed. High haplotype diversity (h between 0.76 and 0.98) were found in all populations except Rio de Janeiro (h = 0.76). Most populations showed unimodal mismatch distribution, indicating a recent demographic expansion, while Rio de Janeiro presented a multimodal distribution, characteristic of a stable population. Times since possible population expansion were highest in Rio de Janeiro (100,146 ya), while in the Southern region the longest time was observed at South of Gulf of San Jorge (88,450 ya) and shortest at Uruguay (62,865 ya). In a general manner, haplotype diversities were directly related to times since population expansions, with Rio de Janeiro was the exception, displaying long time since expansion but low diversity, possibly due to a bottleneck effect caused by an isolation in a reduced area, overfishing or human impacts. The results obtained, both by biometric relations and by molecular biology, are corroborated by the geographic distance separating populations, as well as coastal oceanography. Thus, for an adequate management, and aiming at maintaining the genetic variability of red shrimp, we suggest an individual management unit in Rio de Janeiro, and a shared plan between southern Brazil, Uruguay and Argentina.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características Gerais

A família Solenoceridae Wood-Mason & Alcock, 1891, é composta por nove gêneros e 86 espécies no mundo, das quais 12 são registradas no Oceano Atlântico Ocidental (De Grave *et al.* 2009; Tavares & Martin, 2010). A maioria das espécies ocorre em águas profundas e cinco gêneros possuem interesse comercial (Tavares & Martin, 2010). Dessa família, em águas costeiras brasileiras, são registradas apenas três espécies (Calazans, 2000). Uma dessas espécies, *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) é conhecida como camarão-santana ou camarão-vermelho no Brasil, e langostino na Argentina.

No Brasil, as principais espécies de camarão exploradas na região sudeste/sul são da família Penaeidea: *Farfantepenaeus paulensis* (Perez-Farfante, 1967) (camarão-rosa), *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (camarão-rosa), *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (camarão-sete-barbas), *Litopenaeus schmitii* (Burkenroad, 1936) (camarão-branco) e *Artemesia longinaris* (Bate, 1888) (camarão-barba-ruça); e da família Solenoceridae: *Pleoticus muelleri* (camarão-santana). Devido ao decréscimo nos desembarques do camarão rosa, diversas espécies, dentre elas o camarão santana, que anteriormente eram consideradas como *bycatch*, progressivamente passaram a ser valorizadas pelas frotas pesqueiras, e assim, uma pescaria que anteriormente era monoespecífica, tornou-se uma atividade multiespecífica (Valentini *et al.* 2012). Na costa Brasileira, a pescaria do camarão vermelho encontra-se mais desenvolvida no Rio Grande do Sul, já que é pescada juntamente com a espécie *Artemesia longinaris*

(camarão barba-ruca), onde as frotas utilizam uma rede fixa, que é adaptada para utilização no oceano (IBAMA, 2011). Já nos demais estados, a pescaria é basicamente de pequena-escala, e é geralmente associada a outras espécies de camarão, como o camarão sete-barbas (Xiphopenaeus kroyeri) (Castilho et al.2012; Pantaleão et al. 2013). Na costa Uruguai, a pesca ocorre também de forma artesanal, e o maior esforco de pesca ocorre na área de Punta del Diablo, onde as capturas entre 2005 e 2006 atingiram a 12 toneladas (Segura et al. 2012). Entretanto, a maior abundância de Pleoticus muelleri é observada em águas argentinas, onde é considerado um dos principais recursos pesqueiros do país. A pesca é caracterizada por grandes flutuações interanuais, uma vez que entre dois anos sucessivos, diferenças de cerca de 40 mil toneladas desembarcadas já foram registradas (Bertuche et al. 2005). Essas flutuações devem-se principalmente a fatores ambientais, que afetam os estágios iniciais do ciclo de vida de P.muelleri, e ao esforço de pesca direcionado no período de recrutamento (CedePesca, 2014). De um modo geral, considera-se que a localização das áreas de desova e das rotas de migração está relacionada com a reprodução da espécie (Fernandez et al. 2012; Roux et al. 2012), entretanto, as ligações entre a dinâmica espacial dos estoques, a alocação do esforço e a oceanografia regional são pouco entendidas (Glembocki et al. 2015). No ano de 2015, foi obtido um novo record no histórico das capturas, mais precisamente na área de Rawson, com um desembarque declarado que superou 38.400 t, valor 16% superior ao desembarque de 2014 na mesma área. Na costa argentina, a maior participação no desembarque total anual de P. muelleri corresponde à área patagônica (72%), e 28% é correspondente de capturas provenientes de jurisdições provinciais de Chubut (26,61%), Santa Cruz (0,82%) e Río negro

(0,61%) (Fischbach & Bertuche, 2016). Os principais mercados importadores do camarão vermelho são Espanha, China, Itália, Japão e Estados Unidos (Minagri, 2015).

O camarão vermelho P. muelleri é endêmico da costa Sul-Americana, com uma distribuição desde o Rio de Janeiro (23°S), Brasil, até Santa Cruz (50°S), Patagônia, Argentina, permanecendo no ambiente marinho durante todo seu ciclo de vida (Boschi, 1997), incluindo o período pós-larval, sem penetrar em águas salobras ou desembocaduras de rios ou lagunas costeiras (Scelzo & Pagani 1988). De acordo com Dall et al (1990), há quatro tipos de ciclo de vida, sendo que a espécie P. muelleri apresenta o ciclo de vida do tipo 3, na qual toda fase adulta se desenvolve em águas distantes da costa, e os estágios larvais de desenvolvem em águas abertas, costeiras e profundas. A distribuição de P. muelleri atinge profundidades de até 30 m, onde está sujeita à dinâmica destes ecossistemas (Lalli & Parsons, 2006). A espécie possui registros em profundidades entre 2 e 600 m (Costa et al. 2003). Na costa brasileira, as maiores abundâncias ocorrem entre as isóbatas de 15 e 45m (Castilho et al.2007; Sancinetti, 2015). Além disso, a espécie ocorre em águas com temperaturas que variam de 9 a 25 °C, e na costa brasileira as maiores abundâncias foram registradas em temperaturas inferiores a 19°C (Castilho et al. 2008; Simões, 2012). Além da temperatura, parâmetros como tipo de sedimento e salinidade são moduladores da distribuição da espécie (Costa et al. 2005; Fernandez et al. 2011).

1.2. Ocorrência do Pigmento Neurolipofuscina

Entre os parâmetros mais importantes para o manejo pesqueiro, a determinação da idade merece uma atenção especial, já que é a base para os modelos que avaliam o estado de exploração do estoque (Muller et al.1997). A determinação precisa da estrutura etária em populações de crustáceos, especialmente os de interesse comercial, como o camarão vermelho *P.muelleri*, é fundamental para uma apropriada avaliação da pescaria e o estado em que esta se encontra (Vila et al.2000, Fonseca & Sheehy, 2007). O método baseado em medidas de frequência de comprimento, embora seja amplamente utilizado no manejo pesqueiro, apresenta uma falha no ponto de vista de determinar com precisão a idade de crustáceos (Hartnoll, 2001). Esta metodologia é considerada ineficiente para crustáceos coletados diretamente do campo, já que o crescimento é dependente de outros fatores, como variação ambiental e denso-dependência (Sheehy, 1992, James et al. 2001). Dessa forma, o método baseado no acúmulo de neurolipofuscina tem uma melhor resolução, em termos de predição de coortes, do que o método baseado em frequências de comprimento (Sheehy, 1992). Isso fica evidenciado quando ocorre uma sobreposição de coortes no método tradicional, ou seja, o indivíduo atinge certo tamanho, atinge seu tamanho máximo $(l\infty)$, e sua idade vai aumentando, o que não é detectado no método tradicional, diferente do método da neurolipofuscina (Sheehy et al. 1994).

A principal dificuldade na determinação da idade em crustáceos é a falta de estruturas de idade tradicionais (otólitos, espinhos,...) e a perda periódica da carapaça pelo processo de ecdise, e dessa forma, a ausência de uma determinação de idade mais precisa se tornou um desafio na modelagem e no manejo das pescarias comerciais. (Puckett, 2008). Até agora, todos os trabalhos de determinação de idade para a espécie

P.muelleri foram baseados na metodologia das frequências de comprimento, como o trabalho de Castilho *et al.* (2012) na região sudeste do Brasil.

Sendo assim, novas metodologias vêm sendo desenvolvidas para determinação da idade com maior precisão em crustáceos. A mais recente delas, foi proposta por Kilada *et al* (2012), e baseia-se na contagem anual de bandas de crescimento depositadas no pedúnculo ocular de camarões e siris, e no trato gástrico de lagostas, e vem sendo testada também em outros grupos de crustáceos. Embora seja uma técnica promissora, esta ainda necessita de estudos mais detalhados que validem de forma definitiva a metodologia, já que, por exemplo, uma de suas restrições está relacionada à influência que o ambiente e a estação do ano têm na formação das bandas que são utilizadas para determinação da idade. Dessa forma, em espécies de ambiente tropical, por exemplo, o crescimento influenciado de acordo com a estação do ano pode afetar a leitura e interpretação das bandas de crescimento e até mesmo resultar em uma bi-periodicidade anual (Ledland *et al.* 2015).

Entretanto, uma metodologia de determinação de idade em crustáceos, proposta por Etershalk (1983) e primeiramente testada com o krill antártico *Euphasia superba*, tem provado ser efetiva e eficiente na resolução de grupos etários em crustáceos. Este método baseia-se no acúmulo de um pigmento chamado lipofuscina, no tecido nervoso de crustáceos, ao longo do tempo, fornecendo uma medida de idade fisiológica (Sheehy *et al.* 1998; Bluhm & Brey, 2001; Kodama *et al.* 2006; Sheehy & Prior, 2008). O processo de formação de lipofuscina ocorre continuamente ao longo da vida durante a respiração aeróbica das células (Terman & Brunk, 2004), pois sua formação está relacionada ao estresse oxidativo, resultante do metabolismo celular (Sitte *et al.* 2001). A acumulação do pigmento lipofuscina é idade-dependente (Katz, 2002) e é considerada uma característica marcante no processo natural do envelhecimento, podendo ser entendida como um índice de envelhecimento fisiológico (Porta *et al.* 2002). Os principais componentes de lipofuscina são as proteínas (30-70%) e os lipídios (20-50%); enquanto que em pequenas concentrações encontram-se os carboidratos (4-7%), e metais traços (Al, Cu, Fe e Zn) (Porta *et al.* 2002).

Assim, a quantificação de neurolipofuscina torna-se uma das metodologias mais confiáveis na determinação da estrutura etária de espécies de ciclo de vida curto e de interesse comercial, como *P.muelleri*. Uma das principais razões baseia-se no fato de que a predição das coortes, através deste método, tem uma melhor resolução do que o método baseado nas frequências de comprimento apresentava (Sheehy et al. 1994). A validação do método baseia-se nas distribuições de frequências de concentração do neuropigmento, definindo, assim, as coortes com mais eficiência (Sheehy et al. 1998) De acordo com um estudo feito por Fonseca & Sheehy (2007), com a lagosta Pacifastacus leniusculus a taxa de crescimento declina mais com a idade do que com a taxa de acúmulo de neurolipofuscina (Sheehy, 1992), e assim, a sobreposição de coortes em um determinado tamanho na distribuição das frequências de comprimento não é um problema no método da neurolipofuscina. Em uma espécie de ciclo de vida curto, como P. muelleri, o uso do método das frequências de comprimento pode levar a uma falha na detecção de coortes mais velhas, uma vez que uma grande variedade de tamanhos está associada a determinado grupo etário, podendo gerar uma subestimação das taxas de crescimento e mortalidade, causando uma avaliação errônea do estado do recurso (Campana, 2001).

1.3. Identificação de Estoques

O conceito de estoque biológico como uma unidade populacional básica para espécies comercialmente exploradas é central para o manejo das pescarias. Na maioria dos casos, os limites dos estoques engloba grupo de indivíduos da mesma espécie que possuem características demográficas e genéticas similares, e assim responderão unicamente e independentemente às pescarias (Ovenden *et al.* 2013). De acordo com avaliações feitas a partir da pesca camaroeira, há uma necessidade de se aprimorar o controle da atividade em termos de sustentabilidade comercial dos estoques pesqueiros, e estabelecer períodos de defeso específicos para cada região (D'Incao *et al.* 2002). Isso inclui o reconhecimento desses estoques e da forma como se distribuem ao longo dos campos de pesca, de modo a promover melhor entendimento sobre os impactos da pressão pesqueira sobre sua manutenção regional.

Entre as províncias biogeográficas de Brasil e Argentina, ocorre uma região de transição (23° a 35°S), onde ocorre uma mistura de massas de água, e tanto espécies euritermais quanto eurihalinas são encontradas. Dessa forma, nessa extensão latitudinal, são encontradas espécies que habitam ambas as costas, brasileira e argentina, e uma delas é o camarão vermelho *P.muelleri* (Costa *et al.* 2000; Boschi, 2000). Consequentemente, em decorrência desta amplitude latitudinal, as diferenças nos fatores abióticos, e também os processos oceanográficos, acoplados à dinâmica reprodutiva da espécie, poderão influenciar a estrutura populacional da espécie na costa sul-americana.

No limite norte de distribuição da espécie, na região de Cabo frio, no Rio de Janeiro, a temperatura da água é cerca de 20°C e a salinidade em torno de 37 durante grande parte do ano (Sancinetti, 2011). Nessa região do Brasil, devido á confluência das

correntes do Brasil e das Malvinas, ocorre a formação da Água Central do Atlântico Sul (ACAS), que formará uma área de ressurgência, entre as latitudes 23°S e 29°S (Acha et al. 2004). Esta ressurgência é influenciada por ventos costeiros e por uma quebra na plataforma (aproximadamente 50 km a partir da costa) impulsionada pelo padrão sinuoso e turbulento da corrente do Brasil (Campos et al. 2000). Com isso, ocorre um enriquecimento da zona costeira, com uma água fria e rica em nutrientes (Valentin, 1984), e consequentemente, ocorre um aumento na produtividade primária da região, particularmente em Cabo Frio, Rio de Janeiro (23°S) (De Léo & Pires-Vanin, 2006). Já no limite sul de sua distribuição, na costa argentina, desenvolvem-se sistemas frontais caracterizados por uma produtividade primária e secundária elevada. Nos extremos do Golfo São Jorge, onde a profundidade é menor, a mistura vertical causada por ventos e marés gera frentes de desenvolvimento estacionárias, que permanecem durante a primavera e o outono (Cucchi Colleoni & Carreto, 2003). Entretanto, uma resolução mais detalhada é necessária para investigar o papel das características oceanográficas na dinâmica espacial dos estoques costeiros (Gagliardini et al. 2004). Complementando a área de distribuição de *P.muelleri*, entre os limites norte e sul, temos os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul no Brasil, e também o Uruguai. Nessa região, há a presença de uma massa de água fria denominada Água Costeira (AC). Essa massa de água é influenciada principalmente pelo deságue de água doce do rio da Prata, que se direciona ao norte quando há a ocorrência de ventos nordeste de forma intensa e frequente. Essa massa de água consegue alcançar a costa do estado do Rio Grande do Sul durante todo o ano, principalmente no outono e no inverno (Piolla et al. 2005). Assim, essa massa de água fria pode servir como um vetor de dispersão de larvas e

adultos oriundos da costa Argentina, até o sul do Brasil, como foi demonstrado com a espécie simpátrica *Artemesia longinaris* (Dumont & D'Incao, 2010).

Além dos processos oceanográficos, outro fator importante na estruturação dos estoques é a dinâmica reprodutiva da espécie nos diferentes pontos ao longo de sua ocorrência. Na costa brasileira, o trabalho de Castilho et al. (2012) mostrou que na costa sudeste do Brasil, há uma forte influência da Água central do Atlântico Sul (ACAS), que chega à costa durante os meses de primavera e verão, diminuindo a temperatura (<20°C) e a salinidade (<35) (Castro Filho et al. 1987). De acordo com Vega-Perez (1993), nesse período, aumentam os níveis de clorofila e de fitoplâncton, coincidindo com os períodos de desova e alimentação das larvas. Além disso, Castilho et al. (2007; 2008) encontrou o mesmo investimento reprodutivo nos períodos de primavera-verão para as espécies Artemesia longinaris e Sicyonia dorsalis, demonstrando que a produção primária é de fundamental importância para camarões da superfamília Penaeoidea, baseando-se na teoria macth/mismatch, ou seja, em que o máximo investimento reprodutivo de espécies marinhas planctotróficas coincide com a máxima abundância fitoplantônica sazonal. Já na costa Argentina, de acordo com Boschi (1989), P. muelleri tem dois períodos de desova, sendo o principal deles da primavera até o fim do verão (novembro a marco), e um de menor impacto no inverno (agosto a setembro). Atualmente, sabe-se que no litoral patagônico, a reprodução de P. muelleri ocorre na zona costeira, em profundidades menores que 80, estando concentrada em três setores: sul de Rawson, norte do Golfo São Jorge e sul do Golfo São Jorge, variando em relação a seu início, intensidade e duração (Fernandez & Macchi, 2007; Fernandez et al. 2011), tendo uma influência de frentes oceanográficas costeiras de alta produtividade (Carreto & Cucchi Colleoni 2007).

Tendo em vista os fatores influenciadores da estrutura dos estoques em uma ampla faixa de distribuição, e a fim de se obter um manejo efetivo dos recursos pesqueiros, a identificação da estrutura populacional é de fundamental importância (Grimes *et al.* 1987). Uma das ferramentas utilizadas são as relações biométricas, que podem ser utilizadas para explorar diferenças entre populações geograficamente distintas (Kinsey, 1994), uma vez que caracteres fenotípicos podem tanto ter uma influência ambiental como genética. Estudos anteriores tem mostrado que as variações ambientais levam a diferenças na estrutura de populações, incluindo uma heterogeneidade morfológica entre grupos. (Collins *et al.* 2007; Giri and Loy, 2008; Dumont & D'Incao, 2010; Torres *et al.* 2014).

Além das relações biométricas, metodologias com base na biologia molecular auxiliam na determinação de estoques biológicos (Waples & Gaggioti, 2006). Os estoques são comumente definidos ou identificados em termos genéticos, uma vez que a variação genética garante que uma espécie explorada retenha características adaptativas específicas ou uma variação genotípica suficiente para se adaptar à mudanças ambientais (Kenchington *et al.* 2003). Em águas marinhas abertas, sem aparentes barreiras para migração, espécies com alta capacidade de dispersão e grandes tamanhos populacionais poderiam representar uma grande população geneticamente homogênea, com um alto fluxo gênico (Machado-Schiaffino *et al.* 2011). Contudo, existem exemplos que desafiam esta hipótese, com alguns estudos demonstrando que organismos com alta capacidade de dispersão podem exibir uma estrutura genética populacional determinada pelas condições oceanográficas e história de vida da espécie (Knutsen *et al.* 2003; Machado-Schiaffino *et al.* 2011). Um estudo feito com a espécie simpátrica *Artemesia longinaris* mostrou que esta encontra-se geograficamente estruturada, com um estoque compartilhado entre Argentina, Uruguai e sul do Brasil (RS e SC) (Dumont *et. al.* 2009). Isto nos levou à hipótese de que a espécie *P. muelleri* também poderia apresentar algum grau de estruturação populacional, já que compartilha os mesmos habitats e estão sujeitos às mesmas condições oceanográficas. O único trabalho com a espécie *P.muelleri* utilizando a biologia molecular como ferramenta, teve o objetivo de identificar espécies de crustáceos em alimentos, utilizando sequências parciais das regiões citocromo b e 16s do DNA mitocondrial (Calo-Mata *et al.*2009).

O sequenciamento de determinadas regiões do mtDNA é uma metodologia capaz de identificar diferenças nas bases nucleotídicas entre indivíduos. Além disso, é um método preciso, e sua molécula apresenta uma herança maternal, é haploide e não está sujeita à recombinação, tornando-se uma ferramenta muito útil para estudos de estrutura populacional (Liu & Cordes 2004). Entre os marcadores moleculares mais eficientes do genoma mitocondrial, podemos citar a região controle, que se caracteriza principalmente por ser uma região com uma taxa de evolução rápida (Machado-Schiafinno *et al.* 2009). Os marcadores moleculares tem a capacidade de identificar se determinada pescaria contem amostras oriundas de populações iguais ou diferentes, e também verificar a contribuição relativa de diferentes estoques genéticos para um estoque misto (Gusmão *et al.* 2013).

1.4. Hipóteses

Nesta tese de doutoramento, testaremos as hipóteses de que:

I) As concentrações de neurolipofuscina nos gânglios cerebrais de *P. muelleri* ocorrem em quantidades detectáveis e servem como um potencial marcador de idade para a espécie *P.muelleri;*

II) Existe estruturação morfométrica entre os estoques de *P.muelleri* ao longo de sua área de distribuição;

III) Existe estruturação genética dos estoques de *P.muelleri* ao longo de sua área de distribuição.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivos Gerais

I) Avaliar a ocorrência e o acúmulo do neuropigmento lipofuscina no tecido nervoso do camarão vermelho *Pleoticus muelleri*, a fim de utilizar esta técnica como um marcador de idade eficiente para o manejo deste importante recurso pesqueiro/

II) Elucidar, pela primeira vez, a estrutura populacional do camarão vermelho *P.muelleri* no Atlântico Sul Ocidental, utilizando as relações biométricas e o sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial como ferramentas para avaliar de que forma os estoques estão distribuídos, assim como gerar informações capazes de auxiliar no manejo desta espécie.

1.5.2. Objetivos específicos

I) Descrever histologicamente a ocorrência do neuropigmento lipofuscina no tecido nervoso do camarão vermelho *Pleoticus muelleri*, mais precisamente as estruturas como

o Lobo olfatório, o feixe de axônios e a massa de células (agregado 10), onde se acumula o neuropigmento;

II) Quantificar o acúmulo de neurolipofuscina entre diferentes classes de tamanho (classe I - < 15 mm; classe II – entre 15 e 25 mm; classe III - > 25 mm);

III) Estimar relações biométricas para cada estoque ao longo da área de distribuição da espécie;

IV) Analisar a variabilidade genética baseada na região controle do DNA mitocondrial;

V) Determinar de que forma os estoques estão distribuídos ao longo da costa Sul Americana, ou seja, se os estoques são compartilhados ou isolados geneticamente, e quais os fatores influenciadores neste padrão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Ocorrência de Neurolipofuscina

2.1.1. Coletas dos espécimes para determinação da ocorrência de

neurolipofuscina

Foram analisadas 6 amostras, de diferentes classes de tamanho, baseado no comprimento de carapaça (classe I - < 15 mm; classe II – entre 15 e 25 mm; classe III - > 25 mm) na região de Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil (Fig.1), que é um local tradicional de desembarque de *P.muelleri* no sul do Brasil. Os cérebros foram dissecados e submetidos ao procedimento histológico: 1) Desidratação gradual da amostra (30 minutos em álcool 70%, e 1 hora em álcool 80, 90 e 100%), sendo posteriormente transferida para uma solução etanol/xileno, e xileno, por 30 min. Em

seguida, a amostra foi parafinizada de forma perpendicular, para a observação de neurolipofuscina em microscópio de fluorescência e para a sua determinação histoquímica (Sheehy *et al.*, 1996; Fonseca, 2002).



Figura 1. Local de coleta dos espécimes de *Pleoticus muelleri* para quantificação da neurolipofuscina, em Balneário Camboriu, Santa Catarina, Brasil.

2.1.2. Morfologia do cérebro e a quantificação de neurolipofuscina em P. muelleri

Em cérebros de crustáceos, as estimativas são realizadas em cortes da massa celular "agregado 10" associada ao lóbulo olfatório, que é uma estrutura pareada (Pereira *et al.* 2009). No caso de *P._muelleri*, o agregado 10 localiza-se posteriormente ao lobo olfatório. Para a observação dos grânulos de neurolipofuscina, o cérebro foi emblocado de maneira perpendicular, permitindo o corte transversal do tecido. Os cortes no micrótomo foram realizados com 6µm de espessura. As lâminas foram desparafinizadas com três banhos consecutivos de xilol, por dois minutos, e em seguida montadas com lamímulas, usando-se "Entellan".

2.1.3. Coleta e análise de imagens

Não há necessidade de corantes para a quantificação de lipofuscina, pois ela é autufluorescente. Sob excitação verde (514 nm), lipofuscina emite comprimentos de onda na faixa do amarelo (550 nm) (Terman & Brunk, 1998). Para observação das lâminas, foi utilizado um microscópio Olympus BX50 equipado com fluorescência (BX-FLA). Após a identificação da área de interesse para a quantificação do neuropigmento, foi fotografada uma imagem por cada corte com uma câmera Olimpus DP72 (Fonseca, 2005).

Para a quantificação de lipofuscina, é coletada uma imagem por corte, com 15 a 30 imagens por amostra (Maxwell *et al.*, 2007). A quantidade do pigmento, por imagem, baseia-se no cálculo da razão entre a área ocupada pelos grânulos e área total de células. A média para cada amostra (i.e., todas as imagens de uma amostra) é calculada por uma média aritmética simples.

2.1.4. Análise dos dados

Para o cálculo do volume de neurolipofuscina em cada amostra, foi usada a média geométrica da fração da área ocupada pelos grânulos, em todas as imagens, como medida da concentração de neurolipofuscina em cada indivíduo (Sheehy *et al.* 1998). Esta fração média da área é determinada como uma porcentagem da fração do volume (%NF). Uma análise de Variância (ANOVA) foi usada para comparar o nível de neurolipofuscina, a média do diâmetro dos grânulos e o tamanho médio dos neurônios

entre as diferentes classes de tamanho. Um modelo de regressão linear (y= a+bx) foi ajustado para avaliar a relação entre a quantidade de neurolipofuscina e o comprimento da carapaça e o diâmetro médio dos grânulos. A qualidade do ajuste foi vista através do coeficiente de determinação (r^2) e da aparência visual dos dados plotados.

2.2. Identificação de Estoques - Relações Biométricas

2.2.1 Amostragem Geral e Área de Estudo:

As amostras biológicas de *P. muelleri* foram obtidas ao longo do litoral da costa brasileira (Macaé, RJ; Itajaí, SC e Rio Grande, RS), costa uruguaia (Punta Del Diablo) e costa argentina (Rawson, Chubut; norte e sul do Golfo São Jorge) (Fig. 2), entre 2012 e 2013. Para as análises das relações biométricas, foram utilizados 491 indivíduos, e para a extração de DNA, foram utilizadas entre 20 e 30 amostras de cada local (Tab. I)

Tabela I: Locais de coleta do camarão vermelho *P.muelleri* na costa Sul-Americana; Latitudes; Número de amostras utilizadas para as relações biométricas e Número de amostras utilizadas para extração de DNA e análises moleculares

Localidade	Latitude	N amostral - Morfometria	N amostral - Biologia Molecular
Rio de Janeiro	22° 22' 15"	90	22
Santa Catarina	26° 59' 26"	40	23
Rio Grande do Sul	32° 01' 60"	70	26
Uruguai	34° 04' 58"	110	23
Rawson	43° 48' 08"	46	27
Norte do Golfo São Jorge	45° 16' 07"	50	16
Sul do Golfo São Jorge	47° 00' 04''	85	21
Total	-	491	158



Figura 2. Locais de coleta do camarão vermelho *Pleoticus muelleri*, ao longo da Costa Sul-Americana: Macaé (Rio de Janeiro), Balneário Camboriú (Santa Catarina), Rio Grande (Rio Grande do Sul), Punta del Diablo (Uruguai), Rawson (Chubut), Norte do Golfo São Jorge e Sul do Golfo São Jorge.

2.2.2 Processamento das amostras

Todas as amostras foram mantidas em álcool 90% até o momento das medições e retirada dos tecidos para os procedimentos moleculares. A identificação do sexo foi realizada por meio da observação do primeiro par de pleópodos (macho: presença de pestasma no primeiro par de pleópodos; fêmea: ausência de petasma) (Pérez-Farfante & Kensley, 1997). Para a biometria, foi utilizado um paquímetro digital (precisão de 0,01mm). As principais medidas foram: Comprimento da carapaça (distância da margem pós-orbital até o limite médio-dorsal posterior da carapaça), comprimento total (considerado como a distância da ponta do rostro até o fim do telson) e largura do cefalotórax. Entretanto, foram realizadas outras medidas, como: Comprimento da Carapaça sem o rostro; comprimento do rostro; distância entre o espinho epigástrico e o último dente rostral; distância entre os dois últimos dentes rostrais; distância entre a base do rostro e o penúltimo dente rostral; altura do cefalotórax, comprimento da cauda, do abdômen e do telson e peso, totalizando 17 medidas. Além disso, foram contados o número de dentes rostrais, a fim de utilizar para análises merísticas.

2.2.3 Análise dos dados:

As relações biométricas foram estimadas usando os dados transformados (log), através de uma regressão linear simples, considerando o comprimento da carapaça (CC) como a variável dependente. A equação da regressão linear é dada por CT=a+bCC, onde CT é o comprimento total, a é o intercepto, b é a curva e CC o comprimento da carapaça. As diferenças entre as curvas foram testadas par a par, baseando-se nos intervalos de confiança, de tal forma que a ausência de sobreposição dos intervalos significa que as retas são estatisticamente diferentes. Uma análise de variância permutacional de duas vias (PERMANOVA) testou a hipótese nula de não haver diferença nas relações biométricas entre os locais (sete níveis), entre os sexos (dois níveis) e sua interação. (Nível de significância definido como p=0,05 e valores de p foram obtidos utilizando 999 permutações dos resíduos através de um modelo reduzido), utilizando o software Primer (Clarke & Gorley, 2006). Uma matriz de dissimilaridade Euclidiana foi construída a partir das relações biométricas, e uma análise de Cluster foi feita a partir dessa matriz, a fim de se visualizar os padrões de distribuição espacial das relações biométricas de cada população. Uma análise de variância não-paramétrica de Kruskall Wallis (p<0,05) foi feita para verificar se haviam diferenças significativas no número médio de dentes do rostro, por localidade, uma vez que os dados não apresentaram normalidade e também para comparar o tamanho médio do comprimento da carapaça (CC) entre as localidades, e entre machos e fêmeas, utilizando o software R.

2.3. Biologia Molecular

2.3.1. Extração de DNA genômico:

A metodologia utilizada para extração de DNA foi a de fenol/clorofórmio segundo Sambrook, Fristch e Maniatis (1989), com algumas modificações. Foi retirada uma amostra de tecido muscular do pereiópodo, colocado num cadinho, adicionado nitrogênio líquido, e macerado; Após ser macerado, o tecido foi colocado em um microtubo de 2ml, onde foram adicionados 500 µl de tampão PS (mexido levemente) e 6 µl de proteinase k (20mg/ml); Foi deixado no banhomaria a 50°C +- uma hora (após 30 min do tempo inicial, foi adicionado mais 6 μ l de proteinase k; Foi adicionado 250 µl de fenol e 250 µl de clorofórmio; Após, foram levemente agitados (em torno de 90 vezes, ida e volta); As amostras foram colocadas na centrífuga a 13.000 rpm durante 10 minutos; O sobrenadante foi retirado e colocado em microtubos onde foram adicionados 250 µl de fenol e 250 ul de clorofórmio, sendo levemente agitados (em torno de 90 vezes, ida e volta); as amostras foram colocadas na centrífuga a 13.000 rpm durante 10 minutos; após este tempo, o sobrenadante foi retirado e colocado em outro microtubo, e adicionado o mesmo volume de clorofórmio (mexido levemente); as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 min; o sobrenadante foi retirado e adicionado Nacl (5M) na proporção: 20 µl de Nacl para cada 480 µl de amostra e o dobro do volume total de etanol 100%; Foi levemente mexido (observa-se a precipitação do DNA); As amostras foram deixadas no freezer *overnight*; No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 minutos, sendo a seguir descartado o sobrenadante; Foi adicionado às amostras 700 µl de etanol 70% e centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 min, sendo a seguir descartado o sobrenadante; Foi adicionado 700 µl de etanol 70% e centrifugadas a 13.000 rpm, por 5 min.

2.3.2. Amplificação da região controle do genoma mtDNA

Para amplificação da região controle do camarão *P.muelleri*, foram desenhados *primers* (iniciadores) específicos. Os *primers* (F: 5' GCTGCTGGCACAAATTTTAGC 3'e R: 5' CCTTTTTCAGGCACTTCATT 3') foram desenvolvidos em genes conservados (12S e Ile^{tRNA}) que flanqueiam a região controle das seguintes espécies da família Peneidae: *Farfantepenaeus californiensis, Marsupenaeus japonicus, Penaeus monodon, Litopenaues stilyrostris, Litopenaeus vanammei,* através de um alinhamento consenso. Estes *primers* amplificaram um fragmento de aproximadamente 1210 pares de bases.

Para amplificação da região controle, através de uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram utilizados:

0,2 μm de cada primer; Taq DNA polimerase (2,5U por reação); dNTP (0,3 mM); MgCl₂ (2mM); Solução tampão (10%); DNA (4μl/6ng); e água ultrapura para completar o volume de 25 μl. As condições da reação de PCR foram: 10 ciclos iniciais de 1' a 94° C, 10'' a 94°, 45'' a 55°C e 1'15'' a 68°C, seguidos de 25 ciclos de 10'' a 94°C, 45'' a 55°C, 1'15'' a 68°C e 5' 68°C.

2.3.3. Análise Eletroforética do Segmento Amplificado do mtDNA

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese para confirmação da eficiência da amplificação. Um marcador de peso molecular (1kb ou 100 pb ladder) foi utilizado para comparação dos fragmentos amplificados, e o resultado visualizado utilizando-se Gel Red aplicado diretamente às amostras (Fig. 3).



Figura 3. Perfil eletroforético de bandas de mtDNA (Região D-loop) em gel de agarose 1% para teste de *primers* no camarão *P.muelleri*. Á esquerda, marcador de peso molecular de 100 pb. Nos poços 1, 2 e 3 exemplares do Rio de Janeiro.

2.3.4. Purificação e Sequenciamento do Produto de PCR

O material amplificado foi purificado através da precipitação com PEG 8000 (Polietileno Glicol PM 8000) e ressuspenso em tampão TE pH 7. Os produtos purificados foram então sequenciados utilizando os serviços da empresa Macrogen (Coreia do Sul - <u>http://dna.macrogen.com/eng/</u>).

2.3.5. Análise dos dados

A edição das sequências foi realizada no programa BIOEDIT versão 7.0.9 (Hall, 1999). As sequências foram previamente alinhadas com parâmetros definidos no programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994).

Foram realizadas as seguintes análises: O número de haplótipos foi calculado no programa DnaSP 4.10.9 (Rozas & Rozas, 1999). Os sítios polimórficos (s), diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π), os testes de neutralidade Tajima's D (Tajima, 1989) e Fu's FS (Fu, 1997) e a estrutura genética entre as 7 localidades foram estimadas usando o software Arlequin 3.1 (Excofier *et al.* 2005). A estruturação entre as localidades foi inferida através dos índices de Fst par a par, calculados através do modelo Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), determinado através do software jModel test 2.1.10 (Darriba *et al.* 2012), com nível de significância baseado em 1023 permutações (Excoffier *et al.* 1992). Uma rede haplotípica foi gerada através do software PopART (Bandelt *et al.* 1999).

A história demográfica de *P.muelleri* foi inferida através do método da distribuição mismatch. Os valores de Fu's FS e Tajima's D foram obtidos para avaliarmos se as variações na região controle da espécie *P.muelleri* diferiram significativamente do esperado, sob condições de neutralidade. A significância dos testes de neutralidade foi determinada, baseado em 1000 permutações.

3. SÍNTESE DOS RESULTADOS

Os resultados detalhados encontram-se nos artigos anexados (apêndices). A seguir, os resultados são apresentados de forma sucinta.

3.1. Ocorrência e Quantificação do Neuropigmento Lipofuscina

Pela primeira vez, foram detectados grânulos do pigmento neurolipofuscina na espécie *P.muelleri*. A descrição histológica da região de acúmulo do neuropigmento mostrou que esta se encontra posteriormente ao lobo olfatório, com conexão através de um feixe de axônios facilmente identificado. Os grânulos apresentaram uma forma arredondada, com dimensões variáveis, e diâmetro inferior a 1µm, estando distribuídos de forma uniforme no citoplasma.

Além disso, de acordo com diferentes classes de tamanho, com base no comprimento da carapaça, a média no diâmetro dos grânulos apresentou um crescimento linear, apresentando um tamanho médio de 0,67 μ m na classe I (CC<15mm), 0,73 μ m na classe II (CC -15-25 mm) e 0,83 μ m na classe III (CC>25mm). Uma Análise de Variância (Anova) também verificou uma diferença significativa na taxa de acúmulo do pigmento entre as três classes de tamanho (p<0,05; R²=0,84). A média geral de acúmulo ficou em torno de 0,26 (±0.07), e variou de 0,11% na classe de tamanho I (CC< 15mm) a 0,35% na classe de tamanho III (CC>25mm). Dessa forma, ficou evidenciado que o método de acúmulo de neurolipofuscina apresenta um potencial para determinar a estrutura etária de forma eficiente na espécie, o que é de grande importância para o manejo deste recurso pesqueiro.

3.2. Identificação de Estoques

Para a avaliação da estrutura populacional da espécie, foram utilizadas duas ferramentas: as relações biométricas e a biologia molecular, baseada na região controle do DNA mitocondrial.

Através das relações biométricas, verificou-se, através de uma análise Permutacional de Variância (Permanova), que há diferenças significativas (p<0,05) nas relações biométricas entre as sete populações analisadas, entre machos e fêmeas e também na interação localidade x sexo. Além disso, o dendrograma, resultante de uma análise de cluster, evidenciou a existência de dois grupos distintos: o primeiro formado pela população do Rio de Janeiro; o segundo formado pelas populações de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Uruguai e as populações argentinas (Golfo São Jorge – norte e sul e Rawson).

Em relação à variação do comprimento da carapaça, uma análise de Kruskal-Wallis mostrou que há diferenças significativas entre as populações, de modo que há um decréscimo na média com a diminuição da latitude. As populações da costa Argentina apresentaram valores entre 32,5 a 54,3 mm de CC. Já a população do Uruguai teve uma média de 28,2 mm, seguido pela população do Rio Grande do Sul, com 26,4 mm e Santa Catarina com 20,4 mm. Já a população do Rio de Janeiro não seguiu o padrão, e apresentou uma média de 26 mm.

Já a análise merística, baseado na contagem de dentes do rostro, evidenciou uma variação entre 7 e 9 dentes entre as populações, e uma análise de Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas entre as populações (p<0,05). Foi encontrado um

padrão latitudinal evidente, com uma diminuição na média de número de dentes com o aumento da latitude, onde provavelmente há uma influência do ambiente.

As análises, utilizando o DNA mitocondrial como ferramenta apresentaram resultados mais detalhados de como os estoques de *P.muelleri* estão distribuídos na costa Sul-America.

Foi amplificada uma região de 760 pares de bases, sendo 610 pertencentes a região controle. Este fragmento apresentou uma alta diversidade e variabilidade, apresentando 86 haplótipos. A maior diversidade haplotípica foi encontrada em Santa Catarina (h=0,98) e a menor no Rio de Janeiro (h=0,76).

Os resultados de distância genética, baseado nos índices de Fst, indicaram uma alta estruturação genética entre os limites de distribuição da espécie, entre Rio de Janeiro e Sul do Golfo São Jorge (Fst=0,19), Norte do Golfo São Jorge (Fst=0,11) e Rawson (Fst=0,11). Já entre Rio de Janeiro e as populações de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Uruguai, foi verificada uma estruturação moderada, com valores de Fst entre 0,05 e 0,09. Já entre as populações Argentinas, em que foram encontrados valores de Fst negativos entre -0,08 e -0,03, pode-se dizer que geneticamente fazem parte de um mesmo grupo. Sendo assim, o dendrograma, baseado nos índices de Fst indicaram a existência de dois grupos: Um estoque isolado, formado pela populações do Rio de Janeiro, e outro estoque compartilhado entre o sul do Brasil (Rio Grande do Sul e Santa Catarina); a costa Uruguaia (Punta del Diablo) e a costa Argentina (Norte e Sul do Golfo São Jorge e Rawson).

Em relação à expansão demográfica, observou-se, através da análise de distribuição mismatch (padrão unimodal) e dos testes de neutralidade de Tajima's D e

Fus'Fs (valores negativos), que todas as populações, exceto o Rio de Janeiro, estão em expansão. Entretanto, a população do Rio de Janeiro apresentou um padrão multimodal na distribuição mismatch, com valores de Tajima's D e Fus'Fs positivos, indicando que a população está em equilíbrio demográfico.

O maior tempo de expansão foi na população do Rio de Janeiro (100.146 anos atrás), e Sul do Golfo São Jorge (88.450 anos atrás), enquanto que entre os limites de distribuição da espécie, o maior tempo de expansão foi no norte do Golfo São Jorge e o menor no Uruguai (62.865 anos atrás). De maneira geral, as diversidades haplotípicas foram diretamente relacionadas aos tempos de expansão, com exceção da população do Rio de Janeiro, que teve o maior tempo de expansão e a menor diversidade.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1. Ocorrência e Quantificação do Neuropigmento Lipofuscina

- O estudo de ocorrência e quantificação do neuropigmento lipofuscina no tecido nervoso do camarão vermelho *Pleoticus muelleri* evidenciou o potencial uso da técnica para a espécie, e assim, determinar a estrutura etária com uma maior precisão e confiabilidade;
- O futuro uso desta metodologia trará vantagens em relação ao método tradicional, já que esta tem a capacidade de detectar grupos etários mais avançados, ou seja, se o indivíduo atinge seu tamanho máximo, a partir deste ponto o método tradicional não identifica idades mais avançadas;
- O presente estudo mostrou que a morfologia do tecido nervoso de *Pleoticus muelleri* é semelhante a outros crustáceos da ordem Decapoda, com a massa de células, onde são contabilizados os grânulos de lipofuscina, localizada posteriormente e dorsalmente ao lobo olfatório, conectando-se através de um feixe de axônios.
- Apesar do baixo número amostral, a taxa de acúmulo do pigmento foi significativamente diferente entre diferentes classes de tamanho, onde foi observado um acúmulo linear com o comprimento da carapaça. Não foi observada uma diferença significativa no d iâmetro dos grânulos de neurolipofuscina, entre as diferentes classes de tamanho.
- Este estudo provém o precursor necessário para futuros trabalhos de determinação de idade com a espécie *P.muelleri*, demonstrando conclusivamente a ocorrência do pigmento lipofuscina no tecido nervoso da espécie em quantidades suficientes.

4.2. Identificação de Estoques

- A identificação de estoques de *Pleoticus muelleri* ao longo da costa Sul-Americana sugere que ocorra uma estruturação populacional significativa, onde as populações que se encontram no sul do Brasil, Uruguai e Argentina apresentam maiores similaridades, e a população do Rio de Janeiro como um único estoque, fato evidenciado tanto em termos genéticos quanto morfométricos.
- Diferenças genéticas e ambientais podem causar uma diversidade no desenvolvimento ontogenético, resultando em uma diferença morfométrica. Além disso, até mesmo populações que estão sujeitas a pequenas diferenças de influência ambiental podem apresentar alteração na morfometria, como resultado de processos evolucionários. Dessa

forma, o uso de ferramentas moleculares é necessário, uma vez que diferenças de características fenotípicas não expressam se a causa é genotípica ou por simples mudanças ambientais. Por essa razão, quando marcadores moleculares e dados morfométricos são usados em conjunto nas mesmas populações, informações mais conclusivas podem ser geradas a respeito da estrutura populacional.

- O padrão obtido através das relações biométricas tem como principais fatores moduladores as característica ambientais, como a diferença na média da temperatura da água entre os limites da distribuição da espécie e também os processos oceanográficos presentes na região. A Ressurgência de Cabo Frio (limite norte de distribuição) isola a população do Rio de Janeiro, devido à penetração da Água Central do Atlântico Sul (ACAS), que é uma massa de água fria, rica em nutrientes, que atua tanto como uma barreira fisiológica quanto física entre as populações de *P.muelleri*. Já a retração ou expansão sazonal da Água Costeira (AC), é uma massa de água formada pelo deságue do Rio da Prata e da Lagoa dos Patos, que atinge a costa do Rio Grande do Sul durante todo o ano, sendo mais evidenciada durante os meses de outono e inverno, e que serve como um vetor de transporte de indivíduos da Argentina até a costa sul do Brasil, gerando um intercâmbio entre as populações do sul do Brasil, Uruguai e Argentina. Isso nos permite inferir tratar-se de um estoque único. Além disso, a Água Costeira tem influência no isolamento da população do Rio de Janeiro, já que mesmo sob condições favoráveis de vento e chuva, esta não atinge esta região.
- Dessa forma, a veracidade do padrão genético corrobora as diferenças morfométricas entre as populações, tornando confiável a elaboração de planos de manejo para estas pescarias, de forma a tratar o Rio de Janeiro como um único estoque, e um estoque compartilhado entre Brasil, Uruguai e Argentina.

 As diversidades haplotípicas foram diretamente proporcionais aos tempos de expansão, com altas diversidades observadas nas populações do sul do Brasil e da Argentina. A única exceção foi em relação à população do Rio de Janeiro, que pela distribuição mismatch parce estar estável e apresentou uma baixa diversidade, o que não se relaciona com o seu tempo de expansão, que foi o mais alto. Uma das explicações para esta baixa diversidade pode estar relacionada a um evento de gargalo, ou até mesmo uma sobrepesca sobre esta população, que está restrita a uma área reduzida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA EM, HW MIANZAN, RM GUERRERO, M FAVERO, J BAVA. 2004. Marine fronts at the continental shelves of austral South American physical and ecological processes. *Journal of Marise Systems*, 44: 83-105.

BANDELT N, P FORSTER, A ROHL. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48

BERTUCHE D, J DE LA GARZA, M FERNÁNDEZ, P MORIONDO, R PIÑERO & A ROUX. 2005. Estudio de las potenciales afectaciones de las distintas actividades económico-productivas realizadas en la zona costera patagónica, en especial en el Golfo San Jorge, sobre las especies bentónicas, en relación a la evolución de aquellas definidas como indicadoras. Consultora Serman & Asociados S.A., Informe Proyecto Langostino. INIDEP, 162 pp

BLUHM BA & T BREY.2001. Age determination in the Antarctic shrimp *Notocrangon antarcticus* (Crustacea: Decapoda), using the autofluorescent pigment lipofuscin. *Marine Biology*, 138: 247-257.

BOSCHI EE. 1989. Biologia pesquera Del lagostino Del patagonico de Argentina (*Pleoticus muelleri*). *Contribución Instituto Nacional y Desarrollo Pesquero*, 646: 5-71

BOSCHI EE. 1997. Las pesquerías de crustáceos decápodos en El litoral de La República Argentina. *Investigaciones Marinas*, 25: 19-40.

CALAZANS D. 2000. Taxonomy of solenocerid larvae and distribution of larval phases of *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Decapoda: Solenoceridae) on the southern Brazilian coast. In: J.C. Von Vaupel Klein & F.R. Schram (eds.). The biodiversity crisis and Crustaceans Issues, 12: 565-575.

CALO-MATA P, A PASCOAL, I FERNANDEZ, K BOHME, JM GALLARDO, J BARROS-VELASQUEZ. 2009. Evaluation of a novel 16SrRNA/tRNAval mitochondrial marker for the identification and phylogenetic analysis of shrimp species belonging to the Superfamily Penaeoidea. *Analytical Biochemistry*, 391 (2): 127-134.

CAMPANA SE. 2001. Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. *Journal of Fish Biology*, 59: 197–242.

CAMPOS EJD, D VELHOTE & ICA SILVEIRA. 2000. Shelf break upwelling driven by Brazil Current cyclonic meanders. *Geophysics Research Letter*, 27: 751-754.

CARRETO JI, MO CARIGNAN, NG MONTOYA, DA CUCCHI COLLEONI. 2007. Ecología del fitoplancton en los sistemas frontales del mar argentino. In: Carreto, J.I., Bremec, C. (Eds.), El Mar Argentino y sus recursos Pesqueros: El ambiente Marino. INIDEP, Mar del Plata. 169 pp.

CASTILHO AL, MA GAVIO, RC COSTA, EE BOSCHI, RT BAUER & A FRANSOZO. 2007. Latitudinal Variatin in Population Structure and reproductive pattern of the endemic South American shrimp *Artemesia longinaris* (Decapoda: Penaeoidea). *Journal of Crustacean Biology*, 27: 548-552.

CASTILHO AL, RC COSTA, A FRANSOZO, MLN FRANSOZO. 2008. Reproduction and recruitment of the South American red shrimp, *Pleoticus muelleri* (Crustacea: Solenoceridae), from southeastern coast of Brazil. *Marine Biology Research*, (4): 361-378.

CASTILHO, A, MR PIE, A FRANSOZO, A, AP PINHEIRO & RC COSTA. 2008. The relationship between environmental variation and species abundance in shrimp community (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea) in south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association*, 88(1): 119-123.

CASTILHO AL, MR WOLF, MS SIMÕES, GL BOCHINI, V FRANSOZO, RC COSTA. 2012. Growth and reproductive dynamics of the South American red shrimp, *Pleoticus muelleri* (Crustacea: Solenoceridae), from the southeastern coast of Brazil. *Journal of Marine Systems*, 105: 135-144.

CASTRO-FILHO BM, LB MIRANDA & SY MIYAO. 1987. Condições hidrográficas na plataforma continental ao largo de Ubatuba: Variações sazonais e em média escala. *Boletim do Instituto de Oceanografia*, 35(2): 135-151.

CLARKE KR, RN GORLEY. 2006. Primer v6: user manual/tutorial. PRIMER-E, Plymouth

COSTA RC, A FRANSOZO, FL MANTELATTO & RH CASTRO. 2000. Occurrence of shrimp species (Crustacea: Decapoda: Natantia: Penaeidea and Caridea), in Ubatuba Bay Ubatuba, SP, Brazil. *Proceeding of the Biological Society of Washington*, 113: 776-781.

COSTA RC, A FRANSOZO, GAS MELO & FAM FREIRE. 2003. Chave ilustrada para identificação dos camarões Dendrobranchiata do litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, 3(1): 1-12.

COSTA RC, A FRANSOZO, AL CASTILHO & FAM FREIRE. 2005. Annual, seasonal and spacial variation of abundance of the shrimp *Artemesia longinaris* (Decapoda: Penaeoidea) in south-eastern Brazil. Journal of the Marine *Biological Association of the United Kingdom*, 85(1): 107-112.

COLLINS PA, V WILLINER, F GIRI.2007. Littoral communities: macrocrustaceans. In: Iriondo, M.H., Paggi, J.C., Parma, M.J. (Eds.), The Middle Parana River, Limnology of a Subtropical Wetland. *Springer-Verlag*, 277–302

DALL W, BJ HILL, PC ROTHLISBERG & DJ STAPLES. 1990. The Biology of the Penaeidae. *Advances in Marine Biology*, 489 pp.

DARRIBA D, GL TABOADA, R DOALLO, D POSADA. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computings. *Nature Methods*, 9: 772.

DE GRAVE S, ND PENTCHEFF, ST AHYONG, TY CHAN, KA CRANDALL, PC DWORSCHAK, DL FELDER, RM FELDMANN, CHJM FRANSEN, LYD GOULDING, R LEMAITRE, MEY LOW, JW MARTIN, CE SCHWEITZER, SH TAN, D TSHUDY & RE WETZER. 2009. A Classification of Living and Fossil Genera of Decapod Crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology Supplement*, 21: 1-109.

DE LEO FC & MAS PIRES-VANIN. 2006. Benthic megafauna communities under the influence of the South Atlantic Central Water intrusion onto the Brazilian SE shelf: a comparison between an upwelling and a non-upwelling ecosystem. *Journal of Marine Systems*, 60: 268-284.

D'INCAO F, H VALENTINI & LR RODRIGUES. 2002. Avaliação da pesca de camarões nas regiões sudeste e sul do Brasil. *Atlântica*, 24: 103–116.

DUMONT LFC & F D'INCAO. 2010. Biometric Relationships of the Argentinean prawn Artemesia longinaris (Decapoda: Penaeidae) in the south-western Atlantic. Journal of the Marine Biological Association, 1385-1393

ETTERSHANK G. 1983. Age structure and cyclical annual size change in the Antarctic krill, *Euphausia superba. Polar Biology*, 2: 189-193.

EXCOFIIER L, PE SMOUSE, JM QUATRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes appilication to human mithocondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

EXCOFIIER I, G LAVAL, S SCHNEIDER, 2005. Arlequin ver.3.5: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bionformatics*, 47-50.

FERNANDEZ M & G MACCHI. 2007. Dinamica del processo reproductivo del langostino del litoral patagônico. Resultados de la Campaña de Investigación OB-06/06 (Noviembre de 2006). *Informe Técnico INIDEP*, 11p.

FERNÁNDEZ M, D HERNÁNDEZ & A ROUX. 2011. Analysis of the Relationship between relative abundance of mature, impregnated females of *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Crustacea: Decapoda) and environmental variables through statistical models. *Latin American Journal of Aquatic Reserch*, 39 (1): 1-15

FERNÁNDEZ M, MI IORIO, D HERNÁNDEZ, G MACCHI. 2012. Studies on the reproductivedynamics of *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Crustacea, Decapoda, Solenoceridae) of Patagonia, Argentina. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40: 858–871.

FISCHBACH C & J BERTUCHE. 2016. La pesquería del langostino en 2015. Actividad de la flota tangonera en jurisdicción nacional. (Actas CFP 22,23 y 29/15) Información reportada. *Inf. Tec. 019 INIDEP*, 13pp

FONSECA DB, AR OLIVEIRA & F. D'INCAO. 2004. Brain structure and in situ neurolipofuscin in the Blue Crab Callinectes sapidus (Decapoda, Portunidae). Resumos do 3rd Brazilian Crustacean Congress & The Crustacean Society Meeting, p. 207.

FONSECA DB, CK PARISE, R. BARUTOT & F. D'INCAO. 2005. Occurrence of lipofuscina ge pigment in *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Varunidae). *Nauplius*, 13 (2): 175-181.

FONSECA DB & MRJ Sheehy. 2007. Does size matter? A cautionary experiment on overoptimism in length-based bioresource assessment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64: 996-1008.

FU YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitching and background selection. *Genectics*, 147: 915-925.

GAGLIARDINI DA, RO AMOROSO, PO ARCIPRETE, P YORIO, JM ORENSANZ. 2004. Detection of small-scale coastal oceanographic processes through Landsat-TM/ETM + images: implications for the study of biological processes along Patagonian coasts of Argentina. *International Journal of Biodiversity, Oceanology and Conservation*, 68: 194-200.

GIRI F, A LOY. 2008. Size and shape variation of two freshwater crabs in Argentinean Patagonia: the influence of sexual dimorphism, habitat, and species interactions. *Journal of Crustacean Biology*, 28: 37–45

GLEMBOCKI N, GN WILLIAMS, ME GONGORA, MA GAGLIARDINI, ME ORENSANZ.2015. Synoptic Oceanography of San Jorge Gulf (Argentina): A template for Patagonian Red Shrimp (*Pleoticus muelleri*) spatial dynamics. *Journal of Sea Research*, 95: 22-35

GUSMÃO J, RM PIERGIORGE, C TAVARES. 2013. The contribution of genetics in the study of the seabod shrimp populations from the Brazilian coast. *Boletim do Instituto de Pesca*, 39(3): 323-338.

HARTNOLL RG. 2001. Growth in Crustacea - twenty years on. *Hydrobiologia*, 449: 111–122.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2011. Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável de Camarões marinhos do Brasil. Dias-Neto, J. (Org.). Brasília, DF. IBAMA, 242p.

JAMES PJ, JT LENNARD, J, MP PAEWAI. 2001. Effect of stocking density and shelter on growth and mortality of early juvenile *Jasus edwardsii* held in captivity. *Marine Freshwater Research*, 52: 1413-1417.

KATZ, ML & WG ROBISON. 2002. What is lipofuscin? Defining characteristics and differentiation from other autofluorescent lysosomal storage bodies. *Archives of Gerontoloy and Geriatrics*, 34: 169-184.

KILADA R, B SAINTE-MARIE, R ROCHETTE, N DAVIS, C VANIER, S CAMPANA. 2012. Direct determination of age in shrimps, crabs and lobsters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 69: 1728-1733.

KODAMA K, H SHIRAISHI, M MORITA, T HORIGUCHI. 2006. Verification of lipofuscin-based crustacean ageing: seasonality of lipofuscin accumulation in the stomatopod *Oratosquilla oratoria* in relation to water temperature. *Marine Biology*, 150: 131-140

LEDLAND JC, DJ BUCHER, J COUGHRAN. 2015. Age determination of a subtropical freshwater crayfish (Redclaw, *Cherax quadricarinatus*) using ossicular growth marks. *PlosOne*, 1-11.

LIU ZF & JF CORDES 2004. DNA marker technologies and their applications in Aquaculture Genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.

MACHADO-SCHIAFINNO G, D CAMPO & E GARCÍA-VAZQUEZ. 2009. Strong genetic differentiation of the Austral hake (Merluccius australis) accros the specis range. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 53: 351-356.

MACHADO-SCHIAFFINO G, F JUANES & E GARCÍA-VAZQUEZ.2011. Identifying unique populations in long-dispersal marine species: gulfs as priority conservation areas. *Biology Conservation*, 144 (1): 330-339.

MAXWELL KE, TR MATTHEWS, MRJ SHEEHY, RD BERTELSEN & CD DERBY. 2007. Neurolipofuscin ps a measure of age in *Panulirus argus*, the Caribbean spiny lobster, in Florida. *Biololgy Bulletin*, 213: 55-66.

MULLER RG, JH HUNT, TR MATTHEWS, WC SHARP.1997. Evaluation of effort reduction in Florida Keys spiny lobster, *Panulirus argus*, fishery using an age-structured population analysis. *Marine Freshwater Research*, 48: 1045-1058.

PANTALEÃO JAF. 2013. Comparação da estrutura da assembleia de camarões marinhos (Penaeoidea e Caridea) em duas localidades do sudeste brasileiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, UNESP, campus de Botucatu, 87pp.

PEREZ-FARFANTE I & B KENSLEY. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 175: 1-233.

PIOLA AR, RP MATANO, ED PALMA, OO MOLLER, EJD CAMPOS. 2005. The influence of the Plata River discharge on the western South Atlantic shelf Geophysics. *Research Letter*, 32: 1-4

PORTA EA. 2002. Pigments in aging: an overview. Ann. NY Acad. Sci. 959: 57-65.

PUCKETT BJ, DH SECOR, SH JU. 2008. Validation and Application of Lipofuscin-Based age determination for Chesapeak Bay Blue Crabs *Callinectes sapidus*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 137: 1637-1649

SANCINETTI GS. 2011. Distribuição espaço-temoral e estrutura populacional do camarão *Artemesia longinaris Bate, 1888* (Crsutacea: Decapoda: Penaeidae) no Litoral de Macaé, RJ. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, Brazil.

SANCINETTI GS. 2015. Biologia do camarão *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea) em seu limite norte de distribuição no Atlântico Sul, numa região sobre efeito da ressurgência oceânica. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 109p.

SEGURA A.M & EA DELGADO 2012. Size at sexual maturity and growth of the red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda: Penaeoidea) captured artisanally in the Atlantic coast of Uruguay. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 7(3):125-134.

SHEEHY MRJ. 1992. Lipofuscin age-pigmnt accumulation in the brains of ageing field- and laboratory-reared crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 161: 79–89.

SHEEHY MRJ, JG GREENWOOD, DR FIELDER. 1994. More accurate chronological age determination of crustaceans from field situations using the physiological age marker, lipofuscin. *Marine Biology*, 121: 237-245.

SHEEHY MRJ, N CAPUTI, C CHUBB, M BELCHIER. 1998. Use of lipofuscin for resolving cohorts of western rock lobster (*Panulirus cygnus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55: 925-936.

SHEEHY MRJ & EA PRIOR. 2008. Progression an old question for stock assessment of the edible crab *Cancer pagurus*. *Marine Ecology Progress Series*, 353: 191-202.

SIMÕES SM. 2012. Estrutura da comunidade e biologia reprodutiva de camarões marinhos (Penaeidea e Caridea), no Complexo Baía-Estuário de Santos e São

Vicente/SP, Brasil. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 149p.

SITTE NK, T MERKER & T VON ZGLINICKI. 2001. Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts in vitro: an indicator of oxidative stress. *Experimental. Gerontology*. 36: 475-486.

TAJIMA F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphisms. *Genectics*, 123: 585-595

TAMURA K, M NEI. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology Evolution*, 10: 510-526

TAVARES, C & JW MARTIN. 2010. Suborder Dendrobranchiata Bate, 1881. *Crustacea*, 9a(63): 99-164.

TERMAN A & UT BRUNK. 2004. Aging as a catabolic malfunction. *International Journal of Biochemestry and Cell Biology*, 36: 2365–2375.

THOMPSON JD, DG HIGGINS, TJ GIBSON. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weightining position- specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.

TORRES MV, F GIRI, PA COLLINS. 2014. Geometric morphometric analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Decapoda: Palaemonidae) at a microgeographical scale in a floodplain system. *Ecology Research*, 29: 959-968.

VILA Y, A MEDINA, C MEGINA, F RAMOS, I SOBRINO. 2000. Quantification of the age-pigment lipofuscin in brains of known-age, pond-reared prawns *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Zoology*, 286: 120-130.

WAPLES RS, O GAGGIOTTI. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, 15: 1419-1439.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Este apêndice refere-se ao artigo intititulado: Occurrence and quantification of the autofluorescent pigment neurolipofuscin in brains of the red shrimp Pleoticus muelleri (Decapoda: Solenoceridae). O artigo foi aceito no periódico Pan-American Journal of Aquatic Sciences

Occurrence and quantification of the autofluorescent pigment neurolipofuscin in the brains of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Decapoda: Solenoceridae)

running headline: Neurolipofuscin in brains of red shrimp

Pedro F.S. Prata¹; Diego M.Pires²; Duane B.Fonseca³; Luiz Felipe C. Dumont¹

¹Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Universidade Federal de Rio Grande (FURG) (<u>prata_sanmartin@hotmail.com</u>, <u>felipecdumont@gmail.com</u>)

²Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) (<u>martins_sg@yahoo.com.br</u>)

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG) (dbf1@mac.com)

*Corresponding author: prata_sanmartin@hotmail.com

Pan-American Journal of Aquatic Sciences submitted manuscript PJ-16060

Abstract. Due to the lack of structures that allow direct age determination in crustaceans, length-based methods are widely used to estimate age. However, such methods assume that there is a direct correlation between size and age, which is often not true. The amount of neurolipofuscin pigment in crustaceans' brains is related to physiological age and may represent

an alternative age marker. The goal of this study was to verify the accumulation of neurolipofuscin in the nervous tissues of *Pleoticus muelleri* and to evaluate its potential use as an age marker. Six specimens were collected in the State of Santa Catarina, Southern Brazil. In the laboratory, the brains were dissected and prepared for observation under a microscope with epifluorescence. Samples of different size classes were analyzed. No significant difference was observed in the granule diameter of neurolipofuscin among the class sizes (p>0.05; $R^2 = 0.07$). However, a significant difference was observed in concentrations of neurolipofuscin according to size (p < 0.05; $R^2 = 0.84$), in such a way that the largest group accumulated a higher concentration of the pigment. Thus, based on the results obtained in the present study, we can conclude that neurolipofuscin is a potential index of age in *P. muelleri*.

Keywords: Crustacea, age marker, lipofuscin granules

Resumo. Ocorrência e Quantificação do Pigmento Auto fluorescente Neurolipofuscina em Cérebros do Camarão Vermelho Pleoticus muelleri (Decapoda: Solenoceridae). Devido à falta de estruturas que permitam a determinação direta da idade em crustáceos, métodos baseados em comprimento são amplamente utilizados. Entretanto, tais métodos assumem que há uma relação direta entre tamanho e idade, o que nem sempre é verdadeiro. A quantidade do pigmento neurolipofuscina, nos cérebros de crustáceos, está relacionada com a idade fisiológica, representando um marcador alternativo da idade. O objetivo deste estudo foi verificar o acúmulo de neurolipofuscina no tecido nervoso de Pleoticus muelleri, e avaliar o seu uso potencial como marcador de idade. Seis indivíduos foram coletados no estado de Santa Catarina, sul do Brasil. No laboratório, os cérebros foram dissecados, e preparados para observação sob microscopia de epifluorescência. Amostras de diferentes classes de tamanho foram analisadas. Não foi observada uma diferença significativa no diâmetro dos grânulos de neurolipofuscina entre as classes de tamanho (p>0.05; $R^2 = 0.08$). Entretanto, uma diferença significativa foi observada nas concentrações de neurolipofuscina de acordo com os tamanhos (p <0.05; $R^2 = 0.84$), de tal forma que a maior classe de tamanho acumulou a maior concentração do neuropigmento. Assim, baseado nos resultados obtidos no presente estudo, nós concluímos que a neurolipofuscina é um potencial marcador de idade para a espécie Pleoticus muelleri.

Palavras-chave: Crustáceo, marcador de idade, grânulos de lipofuscina

INTRODUCTION

The red shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Decapoda: Solenoceridae) is endemic to the South American coast, appearing from Rio de Janeiro (20° S), Brazil, to Santa Cruz (50° S), Patagonia, Argentina. In Argentina, the red shrimp fishery concentrates its operations in the Patagonia region, and occupies an important place in the fishing sector of the country (Boschi 1997). Along the Brazilian coast, recently, the demand for red shrimp has increased (D'Incao *et al.* 2002; Castilho *et al.* 2008), due to a considerable decline in the stocks of more traditional and profitable marine shrimps, such as the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreile 1817) and *F. paulensis* (Perez Farfante 1967). The marked fluctuations in landings of red shrimp raise several questions about its population ecology. Among the most important population parameters, age determination deserves attention, since it provides the background for the models that assess the exploitation state of a certain stock (Muller *et al.* 1997). The precise determination of the age structure in crustacean populations, especially those of commercial importance, such as red shrimp, is essential for an appropriate stock assessment (Vila *et al.* 2000, Fonseca & Sheehy 2007).

Crustaceans present unique challenges for age determination, due to their lack of aging structures (otoliths, scales and fin spines) caused by the periodic loss of their hard parts during molting (Hartnoll 2001, Smith & Addison 2003). All the age approximations of *P.muelleri* are based on modal analysis of size-frequency histograms (Castilho *et al.* 2012). Size, however, is generally considered to be a poor method for aging crustaceans living in the field, since growth is dependent on environmental and density-dependent factors besides age (Sheehy 1992, James *et al.* 2001).

Thus, to solve this problem, alternative methods of determining age for crustaceans have been tested. Recently, a new method was developed by Kilada *et al.* (2012) to directly determine the age of individual crustaceans. This technique relies entirely on counting annual growth bands deposited on the eyestalks of shrimps and crabs and the gastric mill of lobsters, and it has recently been tested in other groups of crustaceans. Although it is a promising technique, it still needs more studies to validate the method, since one of the restrictions of the method is that the growth of bands has an influence from the environment and the season. Thus, the seasonally driven growth variations in subtropical taxa, for example, can be relatively less

marked, resulting in reduced readability (Fowler 1990) or bi-annual periodicity (Ledland *et al.* 2015).

However, another method of age determination in crustaceans introduced by Etterhank (1983), and first tested with the antarctic krill *Euphasia superba* (Dana 1852), has proven to be effective in solving age groups in crustaceans. This method relies on accumulation over time of neurolipofuscin pigments in the brain or eyestalk neural tissue, which provides a measure of physiological age (Sheehy *et al.* 1998, Bluhm & Brey 2001, Kodama *et al.* 2006, Sheehy & Prior 2008). Lipofuscin occurs as fluorescent granular pigments in postmitotic tissue (neural tissue). It is a product of free radical-mediated lipid peroxidation and the accumulation of nondegradable oxidized macromolecules in lysosomes (Brunk & Terman 2002, Chowdhury *et al.* 2004). Morphological lipofuscin occurs in all cell masses of the brain and eyestalks of decapod crustaceans (Sheehy *et al.* 1996), being particularly conspicuous in the *globulli* cell masses associated with the olfactory lobe. The amount of pigment increases with age and senescence, often showing a positive relationship with chronological age (Brunk & Terman 2002, Chowdhury *et al.* 2004).

Hence, neurolipofuscin quantifiation may represent an important alternative in determining the age structure of short-lived species of commercial interest. The reason is based on the prediction that the cohorts for this method have a better resolution than the lengthfrequency method (Sheehy et al. 1994). According to Fonseca & Sheehy (2007), in the species Pacifastacus leniusculus (Dana 1852) (lobster), the growth rate declines more with age than neurolipofuscin accumulation rate (Sheehy 1992), and, consequently, the overlap of cohorts at asymptotic length in the length-frequency distribution is not a problem in the neurolipofuscin method. Another advantage of the method is that the age-specific variation in neurolipofuscin concentration is less variable than size-at-age (Belchier et al. 1998, Sheehy & Bannister 2002), generating normal components with lower standard deviations and thus higher separation indices (Sheehy et al. 1994). Thus, since P. muelleri is a short-lived species, one that has a longevity of approximately 2.5 years (Castilho et al. 2012), the use of the length-frequency method may lead to a failure in detecting older cohorts, since a vast variety of sizes is associated to a determined age group. It may also create mortality and a growth underestimation rate, resulting in an erroneous assessmentand leading to the overexploitation of the resource (Campana 2001).

So, the global importance of shrimp fisheries, and the successful application of the neurolipofuscin technique for studies of population age structure in other crustaceans, especially in short-lived species, prompted us to provide the first evidence of the age pigment lipofuscin accumulation in the nervous tissues of *P. muelleri*, and the content variation of the pigment according to different class sizes, showing the potential of image analysis of morphological neurolipofuscin as a quantification procedure for determining the age of this important commercial species.

MATERIAL AND METHODS

Sampling and Sample Preparation

A total of six red shrimp specimens were sampled in the spring of 2012. Each individual was measured (Cephalotorax length, CL - mm), and the neurolipofuscin content was verified and quantified in six samples from three different size classes, based on the CL (class I – 10 to 15mm; class II – 15-25mm and class III - >25mm). The samples were collected in shallow coastal waters (7-20 m) off the Balneário Camboriú coast, Santa Catarina, Southern Brazil (Fig. 1).

The brains were carefully dissected, in order to preserve the area of interest, and thus, all nerves originating from the brain were removed, except for the circunesophageal commissure, to facilitate handling and orientation in paraffin wax, which was made perpendicularly. The brains were dehydrated in increasing ethanol concentrations (30 min in 70% ethanol, and one hour each in 80%, 90% and 100% ethanol) and then transferred to a half ethanol, half xylene bath, and to a xylene bath for 30 min, and embedded in paraffin wax on a vertical plane, with the supra-esophageal ganglion facing the cutting edge of the wax block. Serial sections (6μ m) of the brains were dewaxed through three xylene changes (2 minutes in each). During sectioning, only the sections containing the olfactory lobe (OL), neurite tracts (NT) and the olfactory lobe cell mass (OLCM) – the region which was standardized as the location for neurolipofuscin quantification - were used.



Figure 1. Map of the region of Camboriú Beach, State of Santa Catarina, South Brazil.

Fluorescence Microscopy and Neurolipofuscin Quantification

For determination of relative lipofuscin content in brains, images of the 10 to 15 centralmost sections of the OLCM per animal were captured and digitized, and the unstained sections were observed at 40X and 100 X objectives, using an Olympus BX-50 microscope with epifluorescence attachment (BX-FLA), set either at green (514 nm) or at blue (450 nm) excitation filters. Brightness, contrast and sharpness of the images were adjusted so that the neurolipofuscin granules were most obvious and distinct. All fluorescing points that were clearly not lipofuscin granules (according to size and shape) were deselected on the image (Sheehy 1989, Sheehy *et al.* 1996). Pixels representing holes and other areas without tissue were excluded. After discrimination of the grey-scale levels, edited images of the lipofuscin granules were quantified, using the software Gimp 2.8. For the volume calculation of neurolipofuscin in each sample, a geometric average of the area fraction of neurolipofuscin was used in all images as a measure of the neurolipofuscin concentration in the individual (Sheehy *et al.* 1998). This average area fraction is reported as a percent volume fraction (%NF). An analysis of variance (ANOVA) was used to compare the content of neurolipofuscin, the mean granule diameter and the mean axon size among different size classes. A linear regression model (y= ax+b) was fitted to the relationships between lipofuscin content and cephalotorax length and mean granule diameter. The quality of the fit was assessed by the coefficient of determination, r^2 , and the visual appearance of the plotted data.

RESULTS

The Cluster 10 (OLCM) is well developed and is located posteriorly, and slightly dorsal, to the OL, composed of small *globulli* cells, which have a large nucleous filling most of the cell body. The neurite tract connection is easily identified. The OLCM contains a series of small neurons, which, in cross sections, show a semi-spherical shape, with a neurites tract which penetrates into the OL. Each lobe has a large cell mass (OLCM) associated with it called cluster 10, which is connected to the OL by neurite tracts (Fig. 2). Morphological neurolipofuscin was found in all samples, in considerable amounts, appearing as somewhat round granules of variable dimensions (normally with a diameter less than 1 µm, uniformly distributed in the peripheal citoplasm (Fig. 3). The granules mean diameter increased according to the class size (Table I). These granules contain a variable amount of membrane residue embedded in a more homogeneous material. The analysis of variance (ANOVA) showed a significant difference between the accumulation rates between the class sizes (p<0.05; $R^2=0.84$) (Fig.4). Mean neurolipofuscin area fraction was 0.26 (\pm 0.07), and ranged from 0.1 to 0.35% (Table II). In spite of analyzing only two samples per class size, a significant increase in neurolipofuscin concentration was observed as the individuals got larger. In the first size class, which included individuals with a size smaller than 15 mm CL, an average of 0.11% (± 0.04) neurolipofuscin accumulation was found, increasing to 0.18% (±0.06) in individuals of a class size between 15-25 mm, and increased to 0.35% (\pm 0.07) for the largest animals (>25mm).

Table I. Variation in the mean granule diameter of *Pleoticus muelleri* according to class size. Standard

 Deviation (SD) and confidence intervals of means (CI 95%).

Size (CL - mm)	Mean granule diameter	SD	95% IC	
10-15mm	0.67	0.17	0.55	0.76
15-25mm	0.73	0.21	0.60	0.81
>25mm	0.83	0.26	0.77	0.89

Table II. Variation in the mean neurolipofuscin area fraction (%) of *Pleoticus muelleri* brains by classe

 size. Standard Deviation (SD) and confidence intervals of means (CI 95%)

	Mean			
Size (CL - mm)	neurolipofuscin area	SD	95% IC	
	fraction (%)			
10-15mm	0.11	0.021	0.015	0.18
15-25mm	0.18	0.025	0.022	0.21
>25mm	0.35	0.034	0.033	0.39



Figure 2. Autofluorescent histological section (6µm-thick) of a region of the brain showing the olfactory lobe (OL), the axon tracts (AT) and the cell mass cluster 10, which contains *globulli* cells in which neurolipofuscin granules were found.



Figure 3. Autofluorescent histological section (6µm-thick) of the OLCM. Several neurolipofuscin granules are indicated (by arrows). Scale bar: 10µm

The diameter of lipofuscin granules showed no significant differences between different class sizes (p>0.05, R^2 =0.08) (Fig.5), with a mean diameter of 0.76µm (± 0:22), a minimum of 0.21 and a maximum size of 1.68. The intensity of the fluorescence of the neurolipofuscin granules allowed for good discrimination from the background of the cells (Fig. 3). The mean axon size was 4.85 (±1.21), ranging from 2.09 and 6.97, and showed no apparent pattern.



Figure 4. Linear regression between the neurolipofuscin concentration and cephalotorax length for *P*. *muelleri*, with the following parameters: R squared (R^2), equation (y=ax+b) and p value.



Figure 5. Linear regression between the mean diameter of the lipofuscin granules (μ m) and cephalotorx length for *P.muelleri*, with the following parameters: R squared (R²), equation (y=ax+b) and p value.

DISCUSSION

Our results report the first occurrence of morphological lipofuscin in *Pleoticus muelleri*. The position and morphology of the OLCM observed in *P. muelleri* brains were similar to those described for other Penaeid species, such as *Penaeus monodom* (Sheehy *et al.* 1995), *Marsupenaeus japonicus* (Vila *et al.* 2000), *Parapenaeus longirostris* (Medina *et al.* 2000) and *Farfantepenaeus paulensis* (Peixoto *et al.* 2002).

Regarding size, the mean granule diameter of lipofuscin in *P.muelleri* did not show significant differences among the class sizes. This pattern is similar to those found in other short-lived shrimps, such as *F. paulensis* (Peixoto *et al.* 2002) and *M. japonicus* (Vila 2000, Vila Gordillo 2005). On the contrary, long-life span species, such as the deep shrimp *Aristaemorpha foliacea* (Mezzasalma *et al.* 2008) and the lobsters *Homarus americanus* (Wahle

et al. 1996) and *Homarus gammarus* (Sheehy *et al.* 1996), have shown significant increases in granule size according to class size. Thus, it is likely that those individuals with very long life spans will develop lipofuscin granules for a longer period of time and could result in larger granule sizes.

The unstained OLCM sections showed fluorescent granules that increased their concentration according to the class size. In the present study, there was a linear increase in the neurolipofuscin content according to the increase of class size, varying from 0.1% to 0.35%. Peixoto et al. (2002), with the shrimp Farfantepenaeus paulensis, a coastal species that has similar growth parameters, showed a higher accumulation rate of neurolipofuscin, ranging from 0.24% to 0.68%. However, this study used reared specimens under controlled conditions, which may explain this difference in the neurolipofuscin accumulation pattern between the two species. Previous investigations comparing the growth performance of shrimps, between wild and reared conditions, suggest that the shrimps under controlled conditions and unlimited food supply have shown a significant increase in growth rate. The age determination of the spiny lobster Panulirus argus using the neurolipofuscin method (Matthews et al. 2009), using specimens reared, showed that the combination of unlimited amounts of food that is higher in energy, with minimal energy expenditures, determined a 31% greater growth rate in the laboratory than in the wild during the first year (Sharp et al. 2000), leading to an erroneous interpretation of the population structure. In addition, laboratory animals, with larger cephalotoax lengths as a result of a higher energy supply, determine unrealistically large Von's Bertallanfy k coefficients and asymptotic lengths smaller than those observed in nature (Maxwell et al. 2007).

If we compare the lipofuscin accumulation level with other shrimp species from high latitude environments, we see a change in this pattern. The study done by Bluhm & Brey (2001), with the Antarctic shrimp *Notocrangon antarcticus*, in the Wedell Sea, where the temperature is below 0°C, the species has a $L_{\infty}=25$ mm cephalotoax length, and their longevity can reach 10 years for females and the the accumulation levels of neurolipofuscin ranged from <0.001 and 0.22%, which is lower compared to those obtained for *P.muelleri* (0.1% to 0.35%). This can be explained by 1) the food availability, which is lower is this area, compared to continental-shelf areas of lower latitudes (Arntz & Gorny 1991); consequently, the energetic intake affects the metabolism and the lipofuscin formation process and 2) temperature, since the combination of low temperatures and slow metabolism leads to a slow growth, slow accumulation rate and high longevity of polar species. (Chapelle & Peck 1995). Thus, formation

and accumulation of lipofuscin may be affected by spatial and temporal environmental variability (Sheehy *et al.* 1996).

Recently, a new method of aging was proposed by Kilada *et al.* (2012), based on the counting of growth bands observed in the endocuticle layer in thin longitudinal sections of the meso-cardiac ossicles of the gastric mills in the two squat lobster species and in the eyestalks of nylon shrimp. This method has been used in other crustaceans, such as freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus*) (Ledland *et al.* 2015), crabs (*Portunus pelagicus*) (Kilada & Ibrahim 2016) and lobsters (*Homarus americanus*) (Leland *et al.* 2015). Although it is a promising methodology in determining the age structure of crustaceans, we must consider that it still needs studies to definitively validate this method, especially due to the mixing of bands in tropical and high latitude environments, where seasons are not well marked (Leland *et al.* 2015).

Thus, the ubiquitous cellular deposition of neurolipofuscin represents an attractive and valuable aging technique with potentially widespread use (Sheehy 1990, Belchier *et al.* 1998). Lipofuscin is a degenerative auto-fluorescent pigment, broadly diffused in the animal kingdom, and its accumulation shows a positive correlation with advancing age and maximum life spans (Brunk & Terman 2002). Furthermore, this is a method that seems to show good resolution for short-lived life cycles of species, such as *P. muelleri*, since the length-frequency distribution method is very limited for age determination, resulting in nondistinguishable cohorts. This study confirms the occurrence of morphological lipofuscin in the red shrimp *P. muelleri* for the first time, and the results of the present study suggest that the quantification of neurolipofuscin is possible, and that its use can be a helpful tool for age determination of this species.

REFERENCES

- Arntz, W. E. & Gorny, M. 1991. Shrimp (Decapoda, Natantia) occurrence and distribution in the eastern Weddell Sea, Antarctica. Polar Biology, 11: 169-177.
- Belchier, M., Edsman, L., Sheehy, M. R. J., Shelton, P. M. J. 1998. Estimating age and growth in long-lived temperate freshwater crayfish using lipofuscin. Freshwater Biology, 39: 439-446.
- Bluhm, B. A. & Brey, T. 2001. Age determination in the Antarctic shrimp *Notocrangon antarcticus* (Crustacea: Decapoda), using the autofluorescent pigment lipofuscin. Marine Biology, 138: 247-257.

- Boschi, E. E. 1997. Las pesquerías de crustáceos decápodos en el litoral de la República Argentina. **Investigaciones Marinas**, 25: 19-40.
- Brunk, U. T. & Terman, A. 2002. Lipofuscin: Mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. Free Radical Biology & Medicine, 33: 611-619.
- Campana, S. E. 2001. Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. Journal of Fish Biology, 59:197-242.
- Castilho, A. L., Da Costa, R. C., Fransozo, A., Fransozo, M. L. N. 2008. Reproduction and recruitment of the South American red shrimp, *Pleoticus muelleri* (Crustacea: Solenoceridae), from southeastern coast of Brazil. Marine Biology Research, 4: 361-368.
- Castilho, A. L., Wolf, M. R., Simões, M. S., Bochini, G. L., Fransozo, V., Da Costa, R. C. 2012. Growth and reproductive dynamics of the South American red shrimp, *Pleoticus muelleri* (Crustacea: Solenoceridae), from the southeastern coast of Brazil. Journal of Marine Systems, 105: 135-144
- Chapelle, G. & Peck, L. S. 1995. The influence of acclimation and substratum on the metabolism of the Antarctic amphipods *Waldechia obesa* (Chevreux 1905) and *Bovallia* gigantean (Pfeffer 1888). Polar Biology, 15: 225-232.
- Chowdhury, P. K., Halder, M., Kraus, G. A., Desai, M. J., Armstrong, D. W., Casey, T. A., Rasmussen, M. A., Petrich, J. W. 2004. Generation of fluorescent adducts of malondialdehyde and amino acids: toward an understanding of lipofuscin. Photochemestry and Photobiology, 79: 21-25.
- D'Incao, F., Valentini, H., Rodrigues, L. R. 2002. Avaliação da pesca de camarões nas regiões sudeste e sul do Brasil. **Atlântica**, 24: 103-116.
- Ettershank, G. 1983. Age structure and cyclical annual size change in the Antarctic krill, *Euphausia superba*. **Polar Biology**, 2:189-193.
- Fonseca, D. B. & Sheehy, M. R. J. 2007. Does size matter? A cautionary experiment on overoptimism in length-based bioresource assessment. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 64: 996-1008.
- Fowler, A. J. 1990. Validation of annual growth increments in the otoliths of a small, tropical coral reef fish. **Marine Ecology Progress Series**, 64:25-38.
- Hartnoll, R. G. 2001. Growth in Crustacea twenty years on. Hydrobiologia, 449: 111-122.
- James, P. J., Lennard, J. T., Paewai, M. P. 2001. Effect of stocking density and shelter on growth and mortality of early juvenile *Jasus edwardsii* held in captivity. Marine Freshwater Research, 52: 1413-1417.

- Kilada, R., Sainte-Marie, B., Rochette, R., Davis, N., Vanier, C., Campana, S. 2012. Direct determination of age in shrimps, crabs and lobsters. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 69: 1728-1733.
- Kilada, R., Ibrahim, N. K. 2016. Preliminary investigation of direct age determination using band counts in the gastric mill of the blue swimmer crab (*Portunus pelagicus* Linnaeus, 1758) in two salt-water lakes in the eastern Mediterranean. Journal of Crustacean Biology, 2: 119-128.
- Kodama, K., Shiraishi, H., Morita, M., Horiguchi, T. 2006. Verification of lipofuscin-based crustacean ageing: seasonality of lipofuscin accumulation in the stomatopod *Oratosquilla oratoria* in relation to water temperature. **Marine Biology**, 150: 131-140.
- Ledland, J. C., Bucher, D. J., Coughran, J. 2015. Age determination of a subtropical freshwater crayfish (Redclaw, *Cherax quadricarinatus*) using ossicular growth marks. **PlosOne**, 1-11.
- Matthews, T. R., Maxwell, K. E., Bertelsen, R. D., Derby, C. D. 2009. Use of neurolipofuscin to determine age structure and growth rates of Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* in Florida, United States. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 43: 125-137.
- Maxwell, K. E., Matthews, T. R., Sheehy, M. R., Bertelsen, R. D., Derby, C. D. 2007. Neurolipofuscin is a measure of age in *Panulirus argus*, the Caribbean spiny lobster, in Florida. The Biological Bulletin, 213: 55-66.
- Medina, A., Vila, Y., Megina, C., Sobrino, I., Ramos, F. 2000. A histological study of agepigment, lipofuscin, in Dendobrachiate shrimp brains. Journal of Crustacean Biology, 20: 423-430.
- Mezzasalma, V., Zagra, M., Di Estafano, L., Rangonese, S., Bianchini, M. L 2008. Evidence of lipofuscin accumulation in the deep-water red shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827). Mediterranean Marine Science, 9: 21-33.
- Muller, R. G., Hunt, J. H., Matthews, T. R., Sharp, W. C. 1997. Evaluation of effort reduction in Florida Keys spiny lobster, *Panulirus argus*, fishery using an age-structured population analysis. Marine Freshwater Research, 48: 1045-1058.
- Peixoto, S., Aguado, N., D'Incao, F., Wasielesky, W., Cousin, J. C. 2002. Preliminary Identification and Quantification of the Age-Pigment lipofuscin in the brain of *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda). Brazilian Journal of Biology, 64: 871-876.
- Sharp, W. C., Lellis, W. A., Butler, M. J., Herrnkind, W. F., Hunt, J. H., Pardee, W. M., Matthews, T. R. 2000. The use of coded microwire tags in mark-recapture studies of

juvenile Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*. Journal of Crustacean Biology, 20: 510-521.

- Sheehy, M. R. J. 1989. Crustacean brain lipofuscin: an examination of the morphological pigment in the fresh-water crayfish *Cherax cuspidatus* (Parastacidae). Journal of Crustacean Biology, 9: 387-391
- Sheehy, M. R. J. 1990. Potential of morphological lipofuscin age-pigment as an index of crustacean age. **Marine Biology**, 107: 439-442.
- Sheehy, M. R. J. 1992. Lipofuscin age-pigment accumulation in the brains of ageing field- and laboratory-reared crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 161: 79-89.
- Sheehy, M. R. J., Greenwood, J. G., Fielder, D. R. 1994. More accurate chronological age determination of crustaceans from field situations using the physiological age marker, lipofuscin. Marine Biology, 121: 237-245.
- Sheehy, M. R. J., Caputi, N., Chubb, C., Belchier, M. 1998. Use of lipofuscin for resolving cohorts of western rock lobster (*Panulirus cygnus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 55: 925-936.
- Sheehy, M. R. J., Shelton, P. M. J., Wickins, J. F., Belchier, M., Gaten, E. 1996. Aging the European lobster *Homarus gammarus* by the lipofuscin in its eyestalk ganglia. Marine Ecology Progress Series, 143:99–111.
- Sheehy, M. R. J. & Prior, E. A. 2008. Progression an old question for stock assessment of the edible crab *Cancer pagurus*. Marine Ecology Progress Series, 353: 191-202.
- Sheehy, M. R. J. & Bannister, R. C. A. 2002. Year-class detection reveals climatic modulation of settlement strength in the European lobster, *Homarus gammarus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 59: 1132-1143.
- Sheehy, M. R. J., Cameron, G., Marsden, G., Mcgrath, J. 1995. Age structure of female giant tiger prawns *Penaeus monodon* as indicated by neuronal lipofuscin concentration. Marine Ecology Progress Series, 117: 59-63.
- Smith, M. T. & Addison, J. T. 2003. Methods for stock assessment of crustacean fisheries. Fisheries Research, 65: 231-256.
- Vila Gordillo, Y. 2005. Estudio cuantitativo de lipofuscina mediante microscopía de fluorescencia en cerebros de crustáceos peneidos: aplicación a la determinación de la edad en animales salvajes (*Parapenaeus longirostris* Lucas, 1846 y *Aristeus antennatus* Risso, 1816) y cultivados (*Marsupenaeus japonicus* Bate, 1888). PhD thesis, Instituto Español de Oceanografía, Cadiz, España.

- Vila, Y., Medina, A., Megina, C., Ramos, F., Sobrino, I. 2000. Quantification of the agepigment lipofuscin in brains of known-age, pond-reared prawns *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). Journal of Experimental Zoology, 286: 120-130.
- Wahle, R. A., Tully, O., O'Donovan, V. 1996. Lipofuscin as an indicator of age in crustaceans: analysis of the pigment in the American lobster *Homarus americanus*. Marine Ecology Progress Series, 138: 117-123.

APÊNDICE 2

Este apêndice refere-se ao apêndice intitulado "Biometric Relationships of the red Shrimp Pleoticus muelleri (Bate, 1888) (Decapoda: Solenoceridae) in the South American Coast". O artigo foi submetido no periódico Aquatic Biology.

Biometric Relationships of the red Shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Decapoda: Solenoceridae) in the South American Coast:

Prata, P.F.S¹; Ortega, I¹; De Carli, P²; Dumont, L.F.C¹

1 – Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Instituto de Oceanografia (IO) – Campus Carreiros, Rio Grande, Brasil.

2 – Universidad Nacional de la Patagonia Austral (UNPA) – Unidad Académica Rio
Gallegos, Departamento de Ciencias Exactas y Naturales, Campus Universitario, Río
Gallegos, Santa Cruz, Argentina.

Abstract

In the present study, biometric relationships of size were estimated for the red shrimp Pleoticus muelleri, a very important commercial species in the South American Coast. Morphometric and meristic traits were used to elucidate population structure of this species along its all distribution area, from Rio de Janeiro (Brazil) to Patagonian coast (Argentina). The morphological relationships were estimated by a simple linear regression. Three morphometric traits were chosen, using 474 specimens from seven sites, and the pattern of morphological variation among sites was assessed using a multivariate approach. The permutational analysis of variance (Permanova) revealed significant differences (p<0.05) in the morphometric relationships between locations, between males and females, and also in the interaction between location and sex. Additionally, the cluster analysis showed a group formed by the Argentinean populations, Uruguay, Rio Grande do Sul and Santa Catarina and Argentina, and the population from Rio de Janeiro, isolated. In fact, the exact causes affecting the morphometric traits are not definitive and easy to determine, since a combination of factors (environmental and genetic) can influence on the phenotype. In the present study, the difference in the mean water temperature between the distribution limits of the species, and also the coastal oceanographic systems, isolating the population of Rio de Janeiro, with the resurgence of Cabo Frio, and the Coastal Water (CW) connecting the southern populations through larval and shrimp migrations, generated a two separated stocks, which requires an international effort to manage this important and valuable fishing resource.

Key words: shrimp, morphometrics, population structure

Introduction

Pleoticus muelleri is endemic to the South American Coast, with distribution restricted to the Southwestern Atlantic, from Rio de Janeiro (23S°) to Santa Cruz (50°), Patagonia, Argentina. (Boschi, 1997). The majority of this region is considered a transitional area, due to the convergence between the tropical waters of Brazilian Current and cold nutrient-rich sub-Antarctic waters of Malvinas Current (Pezzi et al. 2009) creating an important transitional biogeographic area. The coastal branches of these currents are diluted by the large freshwater discharges of La Plata River and Patos Lagoon estuary and display seasonal expansions and retractions (Piolla et al. 2005).

The life cycle of *P. muelleri* is entirely developed in these coastal marine waters, with migrations between shallow and deep waters, where they recruit and reproduce, respectively. *Pleoticus muelleri* presents highest densities in the Patagonian coast, in areas with temperatures varying between 6 °C and 20°C and salinity between 31.5 and 33.5 (Boschi, 1986). This important fishery resource displays marked interannual fluctuations in abundance, mainly related to environmental factors, especially temperature and salinity. Therefore, the sudden shifts in environmental parameters, the short life cycle and the huge larval mortality, turn the prediction of shrimp densities in the fishing grounds very tricky (De la Garza, 2009).

In the Brazilian coast, the interest for this species *P. muelleri*, increased during the early 2000's due to a considerable decline in the landings of traditionally exploited species such as the pink shrimps *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreile, 1817) and *F. paulensis* (Perez Farfante, 1967), the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1967) and *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). The red shrimp fishery is more developed in the state of Rio Grande do Sul, since its fished along with the species *Artemesia longinaris*, where the fishing fleet uses a fixed net that can be used in the ocean (IBAMA, 2011). In the other states, It is basically a small-scale fishery, and is generally associated with other species, such as the seabob shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) (Castilho et al.2012; Pantaleão et al. 2013). In the Uruguayan coast, fishing also occurs artisanally, and the largest fishing effort occurs in the Punta del Diablo area, where the catches between 2005 and 2006 reached 12 tonnes (Segura et al., 2012). However, in the Argentinean coast, the landings are much more considerable. In 2015, a new record in catch history was obtained, more precisely in the Rawson area, with a declared landing that exceeded 38,400 t, 16% higher than the landing in 2014 in the same area. The largest share of the total annual landing of *P.muelleri* corresponds to the Patagonian area (72%), and 28% correspond to catches from provinces of Chubut (26.61%), Santa Cruz (0.82 %) And Black River (0.61%) (Fischbach & Bertuche, 2016).

The concept of biological stock as a basic stock for commercially exploited species is central to fishery management. In most cases, the stock limits encompass a group of individuals of the same species that have similar demographic and genetic characteristics, and thus respond solely and independently to fisheries (Ovenden et al., 2013). Previous studies have shown that environmental variation leads to differences in population structure, including morphological heterogeneity among groups (Collins et al.2007; Giri and Loy, 2008; Dumont & D'Incao, 2010; Torres et al. 2014). The current area of occurrence of a species depends on what ecological or geographical barriers the individuals encountered during their dispersal. This phenomenon is quite difficult to estimate, since species are formed at different times, and barriers are not necessarily

constant but can appear and disappear over time (Sobel et al. 2009). Therefore, morphometric variation among stocks can provide a basis for stock structure, and might be more applicable for studying a short-term, environmentally induced variation (Begg et al. 1999). From the conservation point of view, the underestimation of stock identification in the fisheries management, considering the exploited resource as only one stock, can lead to a loss of subpopulations, and consequently a loss of intraspecific biodiversity (Viñas et al. 2011).

The morphometric traits has been widely used to elucidate population structure of shrimps belonging to the Superfamily Penaeoidea, such as previuos investigations for *Parapenaeus longirostris* (Abelló 2002); *Xiphopenaeus kroyeri* (Castro et al 2005); *Farfantepenaeus brasiliensis* and *Farfantepenaeus paulensis* (Freitas et al. 2011). Morphometric investigations of *P. muelleri* are restricted to Argentinean coast (Ruiz & Mendia , 2008) and provide limited information supporting the hypothesis of shared stock along the Argentinean coast. The sympatric species *Artemesia longinaris*, showed a marked phenotypic structuring throughout its distribution area. Morphometric relationships indicated the presence of a southern morphotype distributed from Argentina to South Brazil, while the individuals from the northern population of Rio de Janeiro presented a particular biometric trait. Additionally, the mean size at sexual maturity (CL50_%) increases with the latitude, from Ubatuba and Caraguatatuba (23°26' and 23°36') (São Paulo, Brazil) to the Patagonian area (43°30'), Argentina (Castilho et al. 2012; Fernandez, 2012).

So, the aim of this study is to provide, for the first time, informations about the population structuring of the red shrimp *P.muelleri* along its entire distribution area, using morphometric relationships as a tool for detecting possible shared stocks .

2. Material and Methods

2.1 Sampling and Laboratory Procedures

A total 490 samples were obtained from 7 locations along the South Western Atlantic coast, from Rio de Janeiro (21°37'), Brazil, to Rawson (43°30'), Argentina, either by collaboration with other researchers or directly from the fishermen, covering the entire distribution range of the species.

In Brazil, the sampling sites were: Macaé (21°37'); Itajaí (26 °54') and Rio Grande (32 °00'); In Uruguay, Punta del Diablo (34 °04') and in Argentina: Rawson (43° 48' 08") and South and North of the Gulf San Jorge Golf (45° 16' 07" and 47° 00' 04" respectively). (Fig 1).The samples were kept in 90 % alcohol and taken to the laboratory.


Fig 1. Sampling sites of the red shrimp *Pleoticus muelleri* in the South American Coast. Macaé (Rio de Janeiro), Balneário Camboriú (Santa Catarina),Rio Grande (Rio Grande do Sul), Punta del Diablo (Uruguay), Rawson (Chubut), North of the San Jorge Gulf and South of the San Jorge Gulf.

All shrimps specimens collected were identified following Perez Farfante (1997). The shrimps were sexed by the identification of the petasma in males and the thelicum in females. The carapace length (CL, mm) was measured as the distance from the post-orbital margin to the mid-dorsal posterior edge of the carapace. Total length (TL, mm) was considered as the distance from the tip of the rostrum to the end of the telson. The number of rostral teeth (RT) was also counted and used as a meristic trait to identify

possible population structure. Carapace length without rostrum; rostrum length; Distance between the epigastric spine and the last rostral teeth; Distance between the last two rostrals tooth; Distance between the base of the rostrum and the penultimate rostral teeth; Cephalothorax height, tail, abdomen and telson lenght and weight, totaling 13 measurements.

2.2 Morphometrics

Linear Correlations were done to determine which variables would be used in the present study. Length-length relationships were estimated by using the log transformed data through a simple linear regression, considering CL as a dependent variable. The equation of linear regression is given by TL=a+bCL, where TL is total length, *a* is the intercept with dependent variable axis, *b* is the slope and CL is the carapace length. Since linear regression may be influenced by different adjustment qualities, a correction procedure was applied by using coefficients of correlation values. Differences in slopes were pairwise tested based on confidence intervals, in such a way that non-overlapping intervals were considered as statiscally different. A two-factor Permutational analysis of variance (Permanova) tested the null hypothesis of non -difference in biometric relationships (Carapace leght, Total length and cephalotorax width) among sites (fixed, 7 levels), sex (fixed, 2 levels) and their interaction. (Significance was set to p=0.05 and p-values were obtatined using 999 permutations of residuals under a reduced model), using the software PRIMER v6 package (Clarke & Gorley, 2006). An Euclidian

dissimilarity matrix was constructed from the biometric relationships, and Cluster (UPGMA) analysis was conducted on the dissimilarity matrix in order to visualize the patterns in the spatial distribution of the biometric relationships. To verify if there were significant differences on the mean number of rostral teeth, by location, a non-paramtetric Kruskal-Wallis variance analysis (p<0.05) was performed. The average value of the carapace length (CL) was compared across the seven populations, and between females and males, using a Kruskal-Wallis test (Siegel & Castelan, 1988), with the software R.

Table 1. Linear regression summary obtained for different genders and sites, containing estimates of intercept ($a\pm$ confidence interval (CI) at 95%, slope ($b\pm$ CI at 95%), adjusted coefficient of correlation (r^2), number of individuals used (N) and regression p values (p).

Location	Sex	a±CI(95%)	b±IC(95%)	Adjusted r ²	Ν	р
Rio de Janeiro	Females	-0,518	0.545 ± 0.054	0.86	65	< 0.0001
	Males	0,687	0.399 ± 0.089	0.81	25	< 0.0001
Santa Catarina	Females	-0,832	0.604 ± 0.061	0.95	22	< 0.0001
	Males	-0,189	0.517 ± 0.076	0.91	18	< 0.0001
Rio Grande do Sul	Females	-0,535	0.555 ± 0.133	0.82	58	< 0.000
	Males	0,222	0.449 ± 0.166	0.71	12	0.0003
Uruguay	Females	-0,642	0.546 ± 0.063	0.78	84	ns
	Males	-1,114	0.585 ± 0.123	0.8	25	< 0.0001
Rawson	Females	2,276	0.333 ± 0.156	0.51	18	0,0006
	Males	2,982	0.264 ± 0.173	0.23	28	0.0051
Gulf SanJorge - North	Females	3,21	0.272 ± 0.100	0.36	50	< 0.0001
	Males					
Gulf SanJorge - South	Females	-3,225	0.259 ± 0.110	0.32	45	< 0.0001
	Males	4,113	0.154 ± 0.102	0.17	40	0.0044

RESULTS

A total of 490 individuals was used in regression analysis (Tab.1), being 342 females and 148 males. Slopes estimated for Argentinean populations (males and females) were consistently lower than the overall pattern observed for the other populations. In the populations from Brazil and Uruguay, the TL slopes varied between 0.39 and 0.60, while, -in the populations from Argentina, the TL slopes varied between 0.15 and 0.33.

The PERMANOVA analysis (Tab. 2) showed that there were significant differences (p<0.05) in the morphometric relationships between locations, between males and females, and also in the interaction between location and sex.

Table 2. Results of the Permanova analysis, comparing the biometric relationships of *P._muelleri* by location, sex and the interaction(location x sex) from seven sampling points off the South American Coast

Source	df	SS	MS	PseudoF	P(perm)	
Location	6	24486	4081	163.1	0.001	
Sex	1	1535.8	1535.8	61.3	0.001	
Location x Sex	5	43.2	86.8	3.4	0.005	

The dendogram, resulted from cluster analysis, revealed two groups of populations. The larger group, including four populations, is divided in two units: one formed by populations from southern Brazil and Uruguay, and the other one formed by Rio de Janeiro, which is the northern limit of the species. The other group includes populations from Argentina (fig.2).



Fig 2. Cluster grouping for populations of *Pleoticus muelleri* from seven locations in the South American Coast.RJ (Rio de Janeiro); SC (Santa Catarina); RS (Rio Grande do Sul); UR (Uruguay); RAW (Rawson); NG (North of the San Jorge Gulf) and AS (South of the San Jorge Gulf).

The Kruskal-wallis test showed a significant difference in the mean carapace length among populations and between males and females (Tab.3). The mean CL values found in the populations from Argentina ranged from 32.5 to 54.3 mm. In Rawson, the mean CL value was 41.88 mm (\pm 3.04), in the São Jorge Gulf 40 mm (\pm 2.2) and in São Matias Golf 49.4 mm (\pm 5.6). The mean values of CL decreases, with the increasing

latitude, except the South of the San Jorge Gulf, in such a way that the population from Uruguay (34° 04') presented a mean CL value of 28.2 mm (\pm 2.3), Rio Grande do Sul (32° 00') with 26.4 mm (\pm 3.1) and Santa Catarina (26° 54') 20.4 mm (\pm 1.8). The population from Rio de Janeiro (21° 37') showed a mean value of 26.0 mm (\pm 2.6), not following the pattern observed. In all populations, the mean CL of females were significant higher than males (P<0.05).

The analysis of number of rostral teeth (RT) indicated significant differences between groups located at extremes of the distribution area. There was a general range between 7 and 9 teeth, and there were significant differences in the number of rostral teeth by location (p < 0.05). (Fig. 3 and Tab.3).

Table 3. Kruskal-wallis test results, comparing the mean carapace lenght by population, by sex and the mean rostral teeth of seven populations of the shrimp *Pleoticus muelleri*. (chi-squares, df- degree of difference and p value)

Source	chi-squared	df	р
CL x population	473.8	386	0.001
CL x sex	433.2	3	0.004
Rostral teeth x population	17.5	386	0.0005



Fig 3. Mean number of rostral teeth of the seven populations of *P.muelleri* sampled in the South American Coast. RJ (Rio de Janeiro); SC (Santa Catarina); RS (Rio Grande do Sul); UR (Uruguay); RAW (Rawson); NG (North of the San Jorge Gulf) and AS (South of the San Jorge Gulf).

DISCUSSION

That's the first study about the population structure of *P.muelleri*, using the biometric relationships as a tool, and comprising all it's distributional range. The only studies using morphometric traits for the species were related to reproduction patterns and growth analysis, like the work done by Ruiz & Mendia (2008) in Argentina, and by Castilho (2012) in the Southeast Brazil.

Our results showed that there are significant differences among the sampled populations, taking into account three parameters: biometric relationships; mean carapace length, and the mean number of rostral teeth. One of the factors that can explain these differences is the environmental influence. In the northern limit of the species distribution, in Macaé (RJ), the mean water temperature is around 20°C during most of the year (Sancinetti, 2011). However, in the Argentinean coast, the temperature varies seasonally between 6 and 17°C (Acha et al 2003).

In the present study, all populations showed that mean values of females carapace lenght were significantly higher than males (P< 0.05), which was expected. According to Boschi (1989), sex-related differences in body length are a general rule among Penaeoid shrimps. Yamada et al. (2007) suggested that this sexual dimorphism is probably a result of the exponential increase in female fecundity with body size, i.e. the large body size of females may be an adaptation to increase egg production.

Additionally to the biometric relationships and carapace length, the meristic counts of number of rostral teeth (RT) showed a certain level of population structure for *P.muelleri* in the South American Coast, decreasing according to the latitude, except the South of the San Jorge Gulf. The comparison tests showed a significant difference in mean number of RT between the populations inhabiting the distribution extremes (Rio de Janeiro e Gulf San Jorge), and the same pattern was found by Dumont et al (2010) with the sympatric species *A.longinaris*, with the mean number decreasing with the increasing latitude. Historically, the rostral dentition was considered a good character for identification of shrimps (De Grave, 1999), and it has been used to help in determining the population structure of other shrimp species, like *A.longinaris* (Dumont, 2010); *Palaemonetes carteri* and *P. ivonicus* (Garcia Dávila, 2005) and *P. varians* (De Grave, 1999).

The biometric relationships also revealed, through a cluster analysis, the existence of two separated groups. The first one composed by the population from Rio

de Janeiro, isolated, and the second one composed by the populations from Argentina (Rawson and Gulf San Jorge- north and south), Uruguay and Brazil (Santa Catarina and Rio Grande do Sul. The coastal oceanography is one of the main factors that can influence this pattern, allowing the interchange among populations, or causing population isolation. In the northern extreme of the species distribution, in Rio de Janeiro, there is the influence of the South Atlantic Central Water (SACW), giving rise to the Cabo Frio upwelling (Silveira et al. 2000; Acha et al. 2004). This upwelling is enhanced by coastal winds and by the break in the continental shelf (Campos et al. 2000). This pattern results in a strong water mass that carries cold and nitrate-rich SACW waters to the coast (Acha et al. 2004), enhancing the water nutrient concentrations (Valentin, 1984). This water mass can cause different results about the abundance of the red shrimp *Pleoticus muelleri*, and can possibly act as a physical and physiological barrier between populations of other shrimp species and other groups.

On the other hand, the fact that the populations from Argentina, Uruguay and southern Brazil compose a single stock, can also be explained by the coastal oceanography. In fact, the coastal water (CW), which is a cold water mass, and quite variable in terms of salinity and temperature, and its influenced by the La Plata river freshwater outflow, act as dispersion vector of larvae and adults among Argentina, Uruguay and Southern Brazil, having latitudinal displacements regulated by rainfall and wind stress along the coast (Piola et al. 2005). But the fact that the population of Rio de Janeiro is separated, can be explained by the fact that the CW, even with the maximum expansion, can't reach this region (Piola et al. 2005). In the Argentinean coast, Boschi (1989) defended the idea of having a single stock. However, biological, ecological and fishing evidence (Iorio et al 2000; Fernandez et al, 2005; Fernandez & Macchi, 2007)

showed the existence of three subunits, from an ecological point of view: the northern Gulf San Jorge (45°S), southern the Gulf San Jorge and Rawson (43°S). According to Fernandez (2001), this can be explained by a spatio-temporal separation of the reproductive pattern of the species in the Patagonian coast, associated with the latitudinal temperature gradient and the processes associated with this factor. The species has a spawning period in the southern São Jorge Gulf, between December and April, in the northern São Jorge Golf between October and March, and in Rawson, between October and December (De Carli, 2012).

Thus, our results showed a clear pattern of morphometric structure of the *P.muelleri* stocks along its distribution area. However, molecular studies are necessary to have the understanding to what extent this structure is influenced by the environment and by the genotype, since *P.muelleri* has a high capacity of larval dispersal, and we do not know the degree of gene flow among the populations. This tool, along with the sequencing of the control region of the mithocondrial Dna, will provide subsidies for management plans and consequently the preservation of this important fishery resource in the South American Coast.

REFERENCES:

Abelló P, A Abella, A Adamidou, S Jukic-Peladic, P Maiorano & MT Spedicato. 2002. Geographical patterns in abundance and population structure of Nephrops norvegicus and Parapenaeus longirostris (Crustacea: Decapoda) along the European Mediterranean coasts. Scientia Marina, 66: 125-141 Acha EM, HW Mianzan, O Iribame, DA Gagliardini, C Lasta, P Daleo. 2003. The role of Rio de la Plata bottom salinity front in accumulating debris. Marie Pollution Bulletin. 46: 197-202.

Acha EM, HW Mianzan, RM Guerrero, M Favero, J Bava. 2004. Marine fronts at the continental shelves of austral South American physical and ecological processes. Journal of Marine Systems, 44: 83–105.

Begg, GA, JA Hare & DD Sheehan. 1999. The role of life history parameters as indicators of stock structure. Fisheries Research, 43: 141-463.

Boschi EE. 1986. La pesqueria del langostino del litoral patagonico. Redes, 20: 8 pages.

Boschi EE. 1989. Biologia pesquera Del lagostino Del patagonico de Argentina (*Pleoticus muelleri*). Contribución Instituto Nacional y Desarrollo Pesquero, 646: 5-71

Boschi, EE. 1997. Las pesquerías de crustáceos decápodos en El litoral de la República Argentina. Investigaciones Marinas, 25: 19-40.

Campos EJD, D Velhote & ICA Silveira. 2000. Shelf break upwelling driven by Brazil Current cyclonic meanders. Geophysic Research Letter, 27: 751-754.

Castilho AL, MA Gavio, RC COSTA, EE BOSCHI, RT BAUER & A FRANSOZO. 2007. Latitudinal Variatin in Population Structure and reproductive pattern of the endemic South American shrimp *Artemesia longinaris* (Decapoda: Penaeoidea). Journal of Crustacean Biology, 27: 548-552.

Castilho AL, MR Wolf, MS Simões, GL Bochini, V Fransozo, RC Costa. 2012. Growth and reproductive dynamics of the South American red shrimp, *Pleoticus muelleri* (Crustacea: Solenoceridae), from the southeastern coast of Brazil. Journal of Marine Systems, 105: 135-144.

Castro RH, RC Costa, A Fransozo, FLM Mantelatto. 2005 Population structure of the seabob shrimp Xiphopenaeus kroyeri (Heller, 1862) (Crustacea : Penaeoidea) in the littoral of São Paulo, Brazil. Ecology, 69(1): 105-112.

Clarke KR, RN Gorley. 2006. Primer v6: user manual/tutorial. PRIMER-E, Plymouth

Collins PA, V Williner, F Giri.2007. Littoral communities: macrocrustaceans. In: Iriondo, M.H., Paggi, J.C., Parma, M.J. (Eds.), The Middle Parana River, Limnology of a Subtropical Wetland. Springer-Verlag, Berlin, pp. 277-302

De Carli, P. 2012. Pesquería del langostino (*Pleoticus muelleri Bate, 1888*) em Patagonia Argentina: Estructura Genetica Poblacional Y Manejo Sustentable. Punta Arenas. Tesis presentada a la facultad de ciências para la obtención del grado de Magister en Ciencias. Punta Arenas, Chile. 105 pp.

De grave, S. 1999. Rostral variation in *Palemon concinnus* Dana, 1852 (Decapoda, Palaemonidae). Crustaceana, 72(7):701-704.

De la Garza, J & C Fischbach. 2009. Obtención de índices de mortalidad y tasas de explotación Del langostino (*Pleoticus muelleri*) em lãs temporadas de pesca 1992-2008 a partir de dados de producción y desembarque. Informe de Investigación, INIDEP, N°63: 18pp.

Dumont LFC & F D'Incao. 2010. Biometric Relationships of the Argentinean prawn *Artemesia longinaris* (Decapoda: Penaeidae) in the south-western Atlantic. Journal of the Marine Biological Association, 1385-1393

Fernandez M, J Machhi & J De la Garza. 2001. Estimacion de fecundidade potencial y fecundidade relativa del langostino *Pleoticus muelleri* del Golfo San Jorge. Período analizado: Deciembre de 2000 a março de 2001. Informe Técnico INIDEP, 67:1-21 pp.

Fernandez M. 2005. Localización de las concentraciones reproductivas del langostino em El litoral patagônico. Periodo analizado: Diciembre de 2000 a enero de 2005. Informe Técnico Interno INIDEP. 77: 1-13.

Fernandez M & Macchi G. 2007. Dinamica del processo reproductivo del langostino del litoral patagônico. Resultados de la Campaña de Investigación OB-06/06 (Noviembre de 2006). Informe Técnico INIDEP, 11p.

Fernández M, MI Iorio, D Hernández, G Macchi. 2012. Studies on the reproductivedynamics of Pleoticus muelleri(Bate, 1888) (Crustacea, Decapoda, Solenoceridae) of Patagonia, Argentina. Latin American Journal of Aquatic Research, 40: 858–871

Fischbach C, & J. Bertuche. 2016. La pesquería del langostino en 2015. Actividad de la flota tangonera en jurisdicción nacional. (Actas CFP 22,23 y 29/15) Información reportada. Inf. Tec. 019 INIDEP, 13pp.

Freitas F, HA Fracasso, J Branco, ML Christoffersen. 2011 Ten-Year variations in population structure of pink-shrimp in a southwesternatlantic bay affected by highway construction. Brazilian Journal of Oceanography, 59 (4): 377-390.

Giri F, A Loy. 2008. Size and shape variation of two freshwater crabs in Argentinean Patagonia: the influence of sexual dimorphism, habitat, and species interactions. Journal of Crustacean Biology, 28: 37-45

Ibama, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2011. Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável de Camarões marinhos do Brasil. Dias-Neto, J. (Org.). Brasília, DF. IBAMA, 242p.

Iorio M, GJ Macchi & D Hernandez 2000. Estimacion de la talla de primera madurez y fecundidade del langostino patagônico. Caracterización del desarrollo ovárico y es estadío de impregnación. Informe Técnico INIDEP N61/00 15pp.

Pantaleão JAF. 2013. Comparação da estrutura da assembleia de camarões marinhos (Penaeoidea e Caridea) em duas localidades do sudeste brasileiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, UNESP, campus de Botucatu, 87pp.

Pezzi LP, RB Souza, OC Acevedo, I Wainer, MM Mata, CAE Garcia, R Camargo. Multiyear measurements of the oceanic and atmospheric boundary layers at the Brazil-Malvinas confluence region. Journal of Geophysics Research. v. 114. 2009.

Piola AR, OO Moller Jr. & ED Palma..2004 El impacto del Plata sobre el oceano Atlántico. Ciencia Hoy, 14: 20-37.

Piola AR, Matano RP, Palma ED, Moller OO, Campoes EJD. 2005. The influence of the Plata River discharge on the western South Atlantic shelf .Geophysics Research. Letter, 32: 1-4

Sancinetti GS. 2011. Distribuição espaço-temoral e estrutura populacional do camarão *Artemesia longinaris Bate, 1888* (Crsutacea: Decapoda: Penaeidae) no Litoral de Macaé, RJ. Master Thesis, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, Brazil

Segura AM & EA Delgado 2012. Size at sexual maturity and growth of the red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda: Penaeoidea) captured artisanally in the Atlantic coast of Uruguay. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 7(3):125-134.

Silveira, ICA, ACK. Schmidt, EJD Campos, SS Godoi & Y Ikeda. 2000. A Corrente do Brasil ao largo da costa leste brasileira. Bull. Inst. Paul. Oceanogr, 48(2): 171-183.

Sobel JM, GF Chen, LR Watt, DW Schemske.2009. The Biology of Especiation. Evolution, 295-315.

Torres MV, F Giri, PA Collins. 2014. Geometric morphometric analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Decapoda: Palaemonidae) at a microgeographical scale in a floodplain system. Ecology Research. 29: 959-968.

Valentin, JL. 1984. Analyses des parameters hydrobiologiques dans la remontée de Cabo Frio (Brasil). Marine Biology, 82: 259-276.

Viñas JÁ, R Garodoa, F Cebrián, C Pla, U Vahdet, & RM Araguas. 2011. Facts and uncertanties about the population genectic structure of Atlantic bluefin (*Thunnus Thynnus*) in the Mediterranean. Implications for fishery management. Rev.Fish.Biol. Fisheries. 21: 527-541

Yamada, R, K Kodama, T Yamakawa, T Horiguchi, I Aoki. 2007. Growth and reproductive biology of the small penaeid shrimp Trachysalambria curvirostris in Tokyo Bay. Marine Biology, 151: 961-971.

APÊNDICE 3

Este apêndice refere-se ao artigo intitulado *"Population Genectic Structure of the red shrimp Pleoticus muelleri off the South American Coast"* e está em fase de preparação

Population Genectic Structure of the red shrimp *Pleoticus muelleri* off the South American Coast

Prata, P.F.S; Cortinhas, M.C¹; Figueiredo¹, A.L; Proieti¹, M;; Dumont, L.F.C¹

¹Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Universidade Federal de Rio Grande (FURG) (<u>prata_sanmartin@hotmail.com</u>, <u>felipecdumont@gmail.com</u>)

Abstract

The high demand for the red shrimp (*Pleoticus muelleri*) has increased due to a considerable decline in the stocks of more traditional and profitable marine shrimps, and created the need to determine for the first time the stock structure of the species. *P.muelleri* is an endemic penaeid prawn, distributed from Rio de Janeiro (23S°) to Argentina (50°S). To better understand the red shrimp populations in the South American coast, we evaluated the genetic diversity, structure and demography of seven populations, covering all the distribution area of the species, using the mithocondrial DNA (D-loop) as a marker. High haplotypes diversities (h ranging from 0.76 to 0.98) were found in all populations, except Rio de Janeiro (0.76). A total of 86 mtDNA haplotypes were found. High population structure was observed, with high differentiation between Rio de Janeiro and Argentinean populations, and moderate differentiation between Rio de Janeiro and the Southern Brazil and Uruguay populations. Among Southern Brazil, Uruguay and Argentina, low/moderate structure was detected. Most populations showed unimodal mismatch distributions, indicating recent demographic expansion, while Rio de Janeiro presented a multimodal

distribution, characteristic of a stable population. Times since possible population expansion were highest in Rio de Janeiro (100,146 ya) and South of the Gulf San Jorge (88, 450 ya). So, the results obtained are in accordance to the geographic distances that separates the populations, as well the oceanographic dynamics, which presents seasonal expansion and retractions, and are responsible for the connection between southern populations; and upwelling events in the northern limit of the species distribution, which prevent a dispersion and gene flow with the southern populations. To an adequate management plan and to maintain the genetic variability of the *P.muelleri* in the Southwestern Atlantic, we propose two distinct management stocks for this species: one formed only by the Rio de Janeiro and the other one composed by southern populations from Brazil, Uruguay and Argentina.

Introduction

Pleoticus muelleri (Bate, 1888), popularly known as the South American shrimp, is a Penaeid, belonging to the Solenoceridae family. The species is endemic to the South American Coast, with distribution restricted to the Western Atlantic, from Rio de Janeiro (23S°) to Santa Cruz (50°S), Patagonia, Argentina. (Boschi, 1997), where it inhabits shallow coastal waters, in depths up to 30 m, where it is subjected to a highly dynamic environment typical of these ecosystems (Lalli & Parsons 2006).

In the Brazilian coast, recently, the demand for the red shrimp has increased (D'Incao, 2002; Castilho et al 2008), due to a considerable decline in the stocks of more

traditional and profitable marine shrimps, such as the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreile, 1817) and *F.paulensis* (Perez Farfante, 1967). In Argentina, the red shrimp fishery concentrates its operations in the Patagonian region, and occupies an important place in the fishing sector of the country (Boschi,1997). The high commercial value of this crustacean has become one of the main fishery export products of Argentina. (DEP-SPya, 2011).

Pleoticus muelleri presents a wide distribution range, inhabiting areas where there is a considerable difference in relation to environmental factors and oceanographic processes. The northern boundary of its distribution, in Rio de Janeiro, Brazil, the water temperature is about 20°C and the salinity is high (>37), being influenced by upwelling events, driven by the winds and coastal topography (Sancinetti, 2011; Acha et al, 2004). However, in Argentina, the temperature varies seasonally, from 6 to 17°C, and the salinity is around 30. (Acha et al 2003). Besides, much of this extent (23 a 35S) is considered a transitional area, due to mixing of currents, leading to the formation of water masses with tropical and sub-Antarctic features (Boschi, 2000).

Due to this variable pattern of features off the South American Coast, phenotypic variations, especially morphometric ones, among *P.muelleri* populations, have been noted. The mean size at sexual maturity (CL50_%) for example increase with the latitude, from Ubatuba and Caraguatatuba (São Paulo, Brazil) to the Patagonian area, Argentina (Castilho, 2012; Fernandez, 2012). Besides, a study done by Dumont et al. (2010) with the sympatric species *Artemesia longinaris*, using the control region as a marker, showed that this species was genetically structured along the South-Western Atlantic.

A better understanding of population strucuture is important to the effective fisheries management and conservation of genetic resources in exploited marine organisms (Rolda'n et al. 2000). One of the main goals of genectics has been the delimitation of different genetic stocks (Carvalho & Hauser, 1994). Molecular markers allow managers to identify whether fishery samples come from the same or different populations and verify the relative contribution of different genetic stocks to a mixed fishery stock (Kapuscinski & Miller, 2007). The mithocondrial control region is a hypervariable marker, capable of distinguishing different populations (Vaseeharan et al. 2013). Besides, this marker has been greatly used due to the large number of copies per cell (i.e.easy isolation), high mutation rates, generally maternal inheritance, and almost inexistent recombination (Freeland, 2005).

The present work has the main goal of elucidating the population structure of the *P.muelleri* in the Southwestern Atlantic Ocean, by using mtDNA control region sequencing, in order to provide for the first time information on stocks identification, as well as to provide knowledge that can help to manage this importante fishery resource.

2. Material and Methods

2.1 Sampling

Tissue samples (N=158) were obtained by observers during fisheries operations off the South American Coast, from seven locations (Table 1 and Fig. 1).



Figure 1. *Pleoticus muelleri* sampling locations along the South American Coast: RJ (Rio de Janeiro); SC (Santa Catarina); RS (Rio Grande do Sul); UR (Uruguay); RAW (Rawson); NG (North of the San Jorge Gulf) and AS (South of the San Jorge Gulf).

The specimens were identified based on Perez Farfante (1997), and the muscle tissues were preserved in 100% ethanol.

2.2. DNA extraction

Muscle samples from pereiopods and abdomen were removed, fixed in 100% ethanol and stored at 4°C for DNA extraction. DNA was extracted from 50 mg tissue, using the phenol/chloroform method (Sambrook et al, 1989), with some modifications (Da Silva Cortinhas et al. 2010). Purity, concentration and yield of genomic DNA samples were estimated with NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies) with the purpose of evaluating parameters such as quality and quantity.

2.2 Primers Design

For amplification of the control region of *P.muelleri*, were designed specific primers for the species. Primers were designed in conserved genes, flanking the control region of shrimps from the superfamily Penaied and the Solenoceridae family, and were based on a consensus alignment with the following species: *Farfantepenaeus californiensis, Marsupenaeus japonica, Penaeus monodon, Litopenaues stilyrostris, Litopenaues vanammei* and *Pleoticus robustus*. The forward primer was rooted in the end of the 12S gene (position 690) and the reverse primer in the isoleucine transfer RNA (tRNA^{ile}) (position 1900), yielding a 1290 bp fragment.

2.3 D-loop amplification and data analysis

The mtDNA control region was amplified, by the polymerase chain reaction (PCR) using the pair of primers specific for the species: FOR 690 (5'- GCT GCT GGC ACA AAT TTT AGC - 3') and REV 1900 (5' - CCT TTT TCA GGC ACT TCA TT - 3'); ~ and 10% buffer, in a total volume of 25 μ l. The PCR 10ng DNA; 2,5 U Taq Dna polymerase; 1.5 mM Dntp; 2.0 mM Mgcl2 reaction was performed using the following thermal Cycle: 10 cycles of initial denaturing for 1 min at 94C, 10 sec.

The amplification products were submitted to electrophoresis on 1% agarose gels submerged in 1x TAE buffer, and pre-stained with ethidium bromide (0.05%) (Sambrook et al. 1989) and visualized under U.V light. A molecular size marker (1kb) was used to estimate fragment lengths. The PCR products were purified using the precipitation with PEG 800 (Polyethilene Glycol PM 800) and resuspended in TE buffer (ph 7). The purified products were sequenced at Macrogen (http://dna.macrogen.com/eng/).

Sequences were aligned using CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) and manually edited in BIOEDIT 7.2.5. (Hall, 1999). A Median Joining haplotype network was generated through PopART (Bandel et al. 1999). Polymorphic sites (s), Haplotype diversity (h), nucleotide diversity (π), Tajima's D (Tajima, 1989) and Fu's FS (Fu, 1997) neutrality test and genetic structure of the seven locations were estimated using ARLEQUIN 3.5 (Excofier et al. 2005). Structure between sites was inferred through pairwise Fst values calculated with the Tamura-Nei model of nucleotide substitution (Tamura and Nei, 1993) as determined through jModel test 2.1.10 (Darriba et al. 2012), with significance tested based on 1023 permutations (Excoffier et al. 1992).

The demographic history of *P.muelleri* was inferred by using mismatch distributions method. The Raggedness index (Harpending, 1994) was calculated in ARLEQUIN 3.5, and the sum of squares deviations (SSD) between the observed and expected mismatch was used to validate the estimated stepwise expansion model (Schneider and Excoffier, 1999). SSD significance (P values) was obtained by a parametric bootstrap approach, which is the probability of observing a less good fit between the model and the observed random distribution. In this test, if 95% or more of the simulated mismatch distribution show a better fit than the observed one, the expansion model is rejected. This test was also used to estimate the mutation parameters before $(\Theta_0 = 2N_0 u)$ and after $(\Theta_1 = 2N_1 u)$ expansion, and the mode of mismatch distribution (π). The time since possible population expansion (t) was calculated through the equation $\pi=2ut$ (Rogers and Harpending, 1992), with u being the mutation rate of the sequence, calculated by $u=2\mu k$, where μ is the mutation rate per nucleotide and k is the number of nucleotides. A mutation rate of 1.8% per nucletotide an per million years (Myr) was used, following McMIllen-Jackson & Bert (2004). To calculate the number of generations since expansion, we used the P.muelleri generation time of approximately two and a half years (Castilho et al. 2012).

3. Results

3.1 Control region: diversity and genetic structure

A total of 760 bp were sequenced for the 158 individuals, comprising the initial 150 bp of the 12S gene, followed by 610 bp of D-loop region. The fragment showed

high diversity, with 86 distinct haplotypes, defined by 696 monomorphic and 62 polymorphic sites. Among polymorphic sites, 24 were parsimoniously informative and 38 autapomorphic. Overall, base composition was 12% Cytosine, 8% Guanine, 38% Thymine and 42% Adenine, common for this mtDNA region. Highest haplotype diversity was found in Santa Catarina (h= 0.98), while lowest was observed in Rio de Janeiro (h=0.76). Genetic diversity indexes – number of haplotypes, haplotype diversity and nucleotide diversity can be found in Table 2.

The haplotype network clearly separated the individuals from Rio de Janeiro of the other populations, with 11 (1-11) exclusive haplotypes. In the rest of the distribution area, two haplotypes were shared between all populations (haplotype 18 and 22). Santa Catarina, Rio Grande do Sul shared haplotype 15; Rio Grande do Sul and Uruguay shared haplotype 35; Rio Grande do Sul and North of the Gulf San Jorge shared the haplotype 38; Rio Grande do Sul, Uruguay and South of the Gulf San Jorge shared the haplotype 40 and Uruguay and North of the Gulf San Jorge shared the haplotype 40 and Uruguay and North of the Gulf San Jorge shared the haplotype 50 and 52.

Fst results (Table 1.) showed high genetic structure between the distribution limits of the species, between Rio de Janeiro and Argentinean populations: South Golf San Jorge (Fst=0.19; p=0.03); North Golf San Jorge (Fst=0.11; p=0.001) and Rawson (Fst=0.11; (Fst=0.19; p=0.03); North Golf San Jorge (Fst=0.11; p=0.001) and Rawson (Fst=0.11; p=0.005). Among the southern populations, differentiation was less pronounced, with Santa Catarina presenting moderate Fst values of 0.07 (p=0.01) and 0.07 (p=0.27) in relation to Rio Grande do Sul and Uruguay, respectively. Lower Fst values were observed among the Argentinean populations, being negative, and varying between -0.008 to -0.03. The haplotype network (Fig 2) confirmed a separation of populations in two distinct groups: Rio de Janeiro as a single stock and a shared stock between south Brazil, Uruguay and Argentina.

Mismacth analysis showed unimodal distributions for almost all populations, supporting a recent demographic expansion model. Rio de Janeiro was the exception, exhibiting a multimodal mismatch distribution indicating demographic equilibrium (stability over time). These results were corroborated by Tajima's D and Fu's FS neutrality tests (Fig.4). While both indexes were positive for the Rio de Janeiro population (D=1.04 and Fs=4.08), they were negative for the remaining populations (D=-0.06 to -1.51 and Fs= -9.89 to -22.93), which showed a higher number of haplotypes and underwent recent population expansion (Fig.3).

The P_{SSD} values and the raggedness test did not reject the encountered distributions; their values and parameters can be found in table 3 and distribution models in Fig.4. Estimated expansions times clearly showed that Rio de Janeiro underwent this process a longer time ago (100,146 ya), followed by the South of Gulf San Jorge (88,450). Between the extreme limits, Rawson and Uruguay presented most recent expansion (respectively 63,600 ya and 62,900 ya) (Table 3).



Figure 2. Median joining haplotype network of populations based on mtDNA haplotypes. Each dash on lines between haplotypes represents one putative mutational step. The featured segment represent the 11 exclusive haplotypes from the population of Rio de Janeiro.

Table 1. Population pairwise Fst values for control region. Significant values are indicated by asterisks

 (P<0.05).</td>

		Santa	Rio Grande do			North Golf San	South Golf San
Fst	Rio de Janeiro	Catarina	Sul	Uruguay	Rawson	Jorge	Jorge
Rio de Janeiro							
Santa Catarina	0.05*						
Rio Grande do Sul	0.09*	0.07*					
Uruguay	0.09*	0.07*	0.006				
Rawson	0.11*	0.007	0.002	0.02			
North Golf San Jorge	0.11*	0.016	0.003	0.01	-0,03		
South Golf San Jorge	0.19*	0.03*	0.00034	0.005	-0,008	-0,004	

Table 2. Mithocondrial DNA control region diversity of *P.muelleri* from seven areas sampled along the Southwestern Atlantic coast. N=number of samples; H=number of haplotypes; h= haplotype diversity; π = nucletotidic diversity

Location	Н	h	π
Rio de Janeiro	11	0.76±0.09	0.004±0.002
Santa Catarina	18	0.98±0.01	0.004 ± 0.002
Rio Grande do Sul	15	0.95±0.02	0.005 ± 0.002
Uruguay	14	0.94±0.03	0.004 ± 0.002
Rawson	10	0.94 ± 0.02	0.004 ± 0.002
North Golf San Jorge	8	0.93±0.04	0.004 ± 0.002
South Golf San Jorge	10	0.95±0.03	0.005 ± 0.003
T-4-1	96		
1 otai	80		







Figure 3. Pairwise mismatch distributions, simulated model of sudden expansion and results of Tajima's D and Fu's Fs tests with associated probability for each population.

Table 3. Sudden expansion model parameters and goodness-of-fit tests of populations based on mtDNA data, with respective significances. Parameters: number of polymorphic sites (S); population size before expansion (Θ 0); population size after expansion (Θ 1); expansion parameter (π); Goodness-of-fit: sum of square deviations (SSD); raggedness index; corresponding p values

Populations	RJ	SC	RS	UR	RAW	NG	AS
Parameters							
S	7	16	26	16	16	9	20
θ0	0.003	0.000	0.04	0.01	0.001	0.003	0.003
θ1	3.48	99.999.000	99.999.000	99.999.000	99.999.000	99.999.000	99.999.000
π	5.48	3.79	4.21	3.44	3.48	4.45	4.84
t	100.146	69.261	76.937	62.865	63.596	81.323	8845
Goodness-of-fit							
SSD	0.047	0.006	0.001	0.001	0.007	0.01	0.02
р	0.00	0.15	0.11	0.95	0.50	0.55	0.20
Raggedness	0.13	0.03	0.01	0.02	0.03	0.03	0.04
р	0.15	0.35	0.75	0.85	0.60	0.85	0.25

4. Discussion

This is the first study about the population structure of the *P.muelleri*, covering its all distribution area, and using the control region of the mtDNA as a marker. The 760 pb segment used in this study provided important information on the diversity, structure and demographic history of *P.muelleri* populations along the South American Coast.

The generally high haplotype diversity found in the populations confirmed the haplotype network, indicating a general high diversity and recent expanding populations. The exception was the population from Rio de Janeiro, which showed low haplotypic diversity, suggesting a stability or recent bottleneck. The results indicated a high differentiation between the population from Rio de Janeiro and the populations from southern Brazil, Uruguay and Argentina. This pattern was found off the South American coast for other shrimps, like *Artemesia longinaris* (Dumont et al. 2010) and fishes, like *Mugil liza* (Mai et al. 2014).

The seven populations used in the present study clearly belong to two separated groups: (Rio de Janeiro, being isolated, and the other one composed by southern Brazil, Uruguay and Argentina). The low/moderate structure observed among the populations from the south limit of distribution could be explained by continued dispersal and gene flow, influenced by the oceanographic system and the reproductive strategy. *P.muelleri* is a high fecundity prawn, living exclusively in the marine environment throughout its life cycle, with individuals usually migrating from inshore to offshore areas during their ontogeny (Boschi, 1989). Moreover, shrimp migration is not restricted to the inshore-offshore axis, as individuals are able to use marine currents throughout their life cycle. According to Boschi (1989), the larvae of *P.muelleri* on the Argentine coast, are able to travel for distances between 120 and 300 nautical miles (about 220 and 550 km, respectively), transported by the coastal currents. Additionaly to the reproductive strategy, the coastal circulation in Southwestern Atlantic supports the stock mixing among Argentina, Uruguay and Southern Brazil.

The main water mass present in near shore zones is the coastal water (CW) (Piola et al. 2005), which is influenced by the freshwater discharge from the La Plata river and the Patos Lagoon estuary. This water mass flows northwards, reaching the state of Santa Catarina, but under specific conditions can reach the state of São Paulo (Piola et al. 2004). Thus, CW acts as dispersion vector of larvae and adults among Argentina, Uruguay and Southern Brazil, having latitudinal displacements regulated by rainfall and wind stress along the coast (Piola et al. 2005).

The fact of the population from the northern limit of distribution be isolated, showing higher and significant genetic distance from the southern stock, can also be explained by the oceanographic system. Once the Coastal Water does not reach the state of Rio de Janeiro (Piola et al 2004), prevents the gene flow between the two stocks. Additionaly to this, another oceanographic system acting in the Southwestern Atlantic is the seasonal presence of the South Atlantic Central Water (SACW), giving rise to the Cabo Frio upwelling, which extends from 23S to 29°S (Silveira et al. 2000; Acha et al. 2004), and creating a conspicuous biogeographic barrier in the southwestern Atlantic (Santos et al. 2006). This water mass carries a cold and nitrate rich water to the coast (Acha et al. 2004), altering the physical conditions and enhancing the water nutrients concentrations (Valentin, 1984). The isolation of the Rio de Janeiro stock turns it more susceptible to overfishing, since the lower diversity associated with higher temperature, which changes only when there is the intrusion of the SACW, maybe mean a reduction of the population fitness (Beisl et al. 2001).

Demographic analyses indicated that most of the populations presented unimodal mismatch distributions, while Rio de Janeiro presented a multimodal pattern and the longest time since expansion. Uruguay and Rawson had the shortest times since expansion (respectively 62,865 and 63,596). This indicates a recent expansion of the species during the Pleistocen, which was characterized for environmental changes, causing expansions and retractions of the species all around the world, affecting directly their distribution and demography (Hewitt, 1996). Regarding to the population from Rio de Janeiro, the mismatch analysis indicates a lower stability of this population, maybe because there is a retention of the genetic signature for a long time, despite of the events of expansion or reduction of the population over time (Lavery et al. 2004). In general, haplotype diversities of the analyzed populations were directly proportional to expansion times, with highest diversities observed in Santa Catarina and Argentina (Table 2). Besides the stability of the population from Rio de Janeiro, it was observed a low genetic diversity (h=0.76) compared to the other populations, which is not in accordance with its long time since expansion (t=100.146 ya). One likely explanation for this low diversity is the occurrence of a recent bottleneck event. The region of Macaé is characterized for the oil exploration, which expands the onshore operational bases, inducing to a socioeconomic growth to adjacent coastal regions (Molisani et al. 2015). Thus, the pollution and release of metals can affect the water quality, ans consequently the marine organisms (Pinheiro et al. 2008).

Thus, the mitochondrial DNA reinforces the isolation of the northern population, and the similarity among the populations from Southern Brazil, Uruguay and Argentina, also cause by the environment influence and the migration. Its tricky to determine the exact causes of the morphometric differences among different stocks, since the phenotype can possibly be expressed by a combination of genotype and environment (Waldmann, 1999).

Therefore, management strategies should be done to preserve the genetic characteristics of these two stocks, in order to preserve this important fishery. We suggest additional studies using microsatellites as molecular markers, since they have even higher resolution than the control region.

References

Acha EM, HW Mianzan, O Iribame, DA Gagliardini, C Lasta, P Daleo. 2003. The role of Rio de la Plata bottom salinity front in accumulating debris. Marie Pollution Bulletin, 46: 197-202.

Acha EM, HW Mianzan, RM Guerrero, M Favero, J Bava. 2004. Marine fronts at the continental shelves of austral South American physical and ecological processes. Journal of Marine Systems, 44: 83–105.

Bandelt N, P Forster, A Rohl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology Evolution, 16: 37-48

Beisl, CH, FP Miranda & CL Silva Junior. 2001. Combined use of Radarsat-1 and AVHRR data for the identification of mesoscale oceanic features in the Campos Basin, Brazil. *Anais da Sociedade Brasileira de Sensoriamento Remoto*, 739-745.

Boschi EE. 1989. Biologia pesquera Del lagostino Del patagonico de Argentina (*Pleoticus muelleri*). Contribución Instituto Nacional y Desarrollo Pesquero, 646: 5-71

Boschi, EE. 1997. Las pesquerías de crustáceos decápodos en el litoral de la República Argentina. Investigaciones Marinas, 25: 19-40.

Boschi EE. 2000. Species of decapods crustaceans and their distribution in the American zoogeographic provinces. Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero, 13: 1-64.

Castilho A, MR Pie, A Fransozo, A, AP Pinheiro & RC Costa. 2008. The relationship between environmental variation and species abundance in shrimp community (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea) in south-eastern Brazil. Journal of the Marine Biological Association, 88(1): 119-123.

Castilho AL, MR Wolf, MS Simões, GL Bochini, V Fransozo, RC Da Costa. 2012. Growth and reproductive dynamics of the South American red shrimp, *Pleoticus muelleri* (Crustacea: Solenoceridae), from the southeastern coast of Brazil. Journal of Marine Systems, 105: 135-144

Darriba D, GL Taboada, R Doallo, D Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computings. Nat. Methods, 9: 772.

D'Incao F, H Valentini & LR Rodrigues. 2002. Avaliação da pesca de camarões nas regiões sudeste e sul do Brasil. Atlântica, 24: 103-116.

Dumont LFC & F D'Incao. 2010. Biometric Relationships of the Argentinean prawn *Artemesia longinaris* (Decapoda: Penaeidae) in the south-western Atlantic. Journal of the Marine Biological Association, 1385-1393.

Excofiier L, PE Smouse, JM Quatro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes appilication to human mithocondrial DNA restriction data. Genetics, 131: 479-491.

Excofiier I, G Laval, S Schneider, 2005. Arlequin ver.3.5: an integrated software package for population genetics data analysis. Evolution Bionformatics Online, 47-50.

Fernández M, MI Iorio, D Hernández, G Macchi. 2012. Studies on the reproductivedynamics of *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Crustacea, Decapoda, Solenoceridae) of Patagonia, Argentina. Latin American Journal of Aquatic Research, 40: 858-871

Freeland J. 2005 (ed) Molecular ecology. West Sussex, Jonh Wiley & Sons, 388p.

Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitching and background selection. Genectics, 147: 915-925.

Hall TA. 1999. Bioedit. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95-98. Hewitt GM. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. Biological Journal of the Linnean Society, 58: 247–276.

Harpending HC. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Human Biology, 66: 591-600.

Lavery S, TY Chan, YK Tam, & KH Chu. 2004. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp *Penaeus s. l.* derived from mitochondrial DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution, 31: 39-49.

Mai ACG, CI Mino, LFF Marins, C Monteiro-Neto, L Miranda, PR Schwingel, VM Lemos, Gonzales-Castro, M Castello, JP Vieira. 2014. Microsatellite variation and genetic structuring in *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) populations from Brazil and Argentina. Estuarie Coastal Shelf Science, 149, 80-86.

McMillen-Jackson AL & TM Bert. 2004. Genetic Diversity in the mtDNA control region and population structure in the Pink Shrimp Farfantepenaeus duorarum. Journal of Crustacean Biology. 24(1): 101-109.

Molisani MM, FR Noronha Jr, MS Schultz, CR Rezende, MG Almeida, CS Silveira. 2015. Mismacth between sediment metal distribution and Pollution Source Gradient: A case study of a Small size Drainage Basin (Southeastern Brazil).

Parsons TR & Lalli CM. 2006. Biological Oceanography: An introduction. Pergamon Press. University of British Columbia. 301 Pages

Piola AR, OO Moller Jr. & ED Palma..2004 El impacto del Plata sobre el oceano Atlántico. Ciencia Hoy 14, 20–37.

Piola AR, Matano RP, Palma ED, Moller OO, Campoes EJD. 2005. The influence of the Plata River discharge on the western South Atlantic shelf. Geophysics Reserch. Letter, 32: 1-4

Pinheiro MRC. 2008. Avaliação de usos preponderantes e qualidade da a´gua como subsı´dios para os instrumentos de gestão dos recursos hídricos, aplicada à bacia hidrográfica do rio Macaé .Dissertation, Centro Federal de Educação Tecnológica de Campos.

Rogers AR, H Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular Biology Evolution, 9: 552-569.

Sancinetti GS. 2011. Distribuição espaço-temoral e estrutura populacional do camarão *Artemesia longinaris Bate, 1888* (Crsutacea: Decapoda: Penaeidae) no Litoral de Macaé, RJ. Master Thesis, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, Brazil

Santos S, T Hrbek, IP Farias, H Schneider, I Sampaio. 2006. Population genetic structuring of the king weakfish Macrodon ancylodon (Scianidae) in Atlantic Coastal Waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. Molecular Ecology, 15: 4361-4373.

Silveira, ICA, ACK. Schmidt, EJD Campos, SS Godoi & Y Ikeda. 2000. A Corrente do Brasil ao largo da costa leste brasileira. Bull. Inst. Paul. Oceanogr. 48(2): 171-183.

Scheneider, S, I Excoffier. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. Genectics, 152: 1079-1089.

Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphisms. Genectics. 123: 585-595

Thompson JD, DG Higgins, TJ Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weightining position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680.
Valentin, JL. 1984. Analyses des parameters hydrobiologiques dans la remontée de Cabo Frio (Brasil). Marine Biology, 82: 259-276.

Waldman JR. 1999. The importance of comparative studies in stock analysis. Fisheries Research. 43: 237-246.