

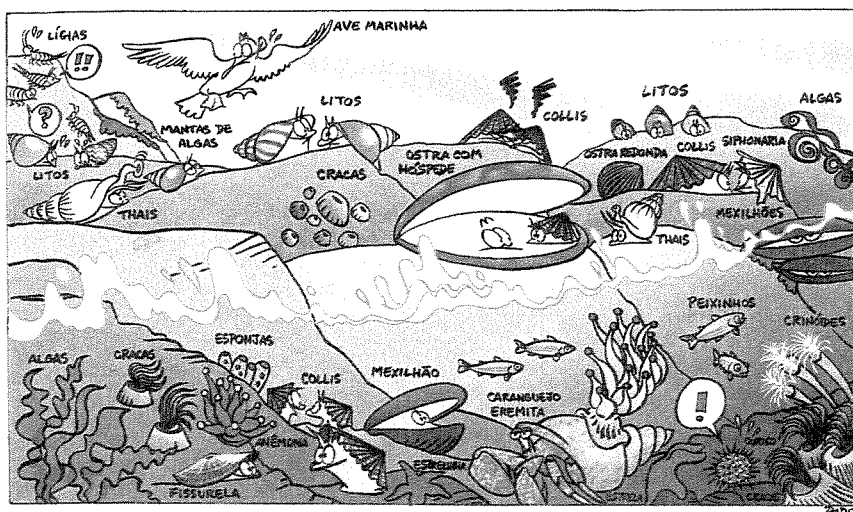
Universidade Estadual de Campinas

Juliana José

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

Estruturação Genética e Morfológica em *Collisella*

subrugosa (Patellogastropoda: Acmaeidae).



Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
título de mestre em Genética e
Biologia Molecular na área de
Genética Animal e Evolução.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a):
Juliana José
Vera Nisaka Solferini
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

JNIDADE RL
Nº CHAMADA 7/Unicamp
5772e
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 54575
PROC 16-117-04
C _____ D x
PREÇO 11,00
DATA 15/04/2004
Nº CPD _____

CM00196674-2

Bib id: 314353

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

J772e

José, Juliana

Estruturação genética e morfológica em *Collisella subrugosa* (Patellogastropoda: Acmaeidae) / Juliana José. --
Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientadora: Vera Nisaka Solferini

Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Molusco. 2. Conchas. 3. Evolução animal. I. Solferini, Vera Nisaka. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 12 de Novembro de 2003

Banca Examinadora

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini
(Orientadora)

Vera Nisaka Solferini

Prof. Dr. Louis Bernard Klazcko

L. B. Klazcko

Prof. Dr. Roland Vencovsky

R. Vencovsky

Profa. Dra. Ana Maria de Azeredo-Espin

Dedico este trabalho a minha mãe
que me ajudou a superar os
obstáculos, físicos e emocionais,
para que eu me tornasse uma
bióloga e seguisse meu caminho
como cientista.

AGRADECIMENTOS



Agradeço...

a minha mãe, Marisa, pelo apoio e toda a disposição que teve em me ajudar a executar este trabalho, por todas as viagens de coleta nas quais me acompanhou, por toda a força e coragem em enfrentar correnteza de rios, ondas, ventos, chuvas, e até mesmo siris atrevidos.

a minha vó Wanda e ao meu vô Carlos Augusto por todo o apoio, pelo interesse por meu trabalho e pela disposição em me acompanhar em uma viagem de coleta.

a Selma, por me manter "em forma".

a Vera, minha orientadora, pelo apoio e atenção, pelos ensinamentos (biológicos ou não), por estar sempre disposta a ler inúmeras vezes meus textos, pela dedicação aos nossos moluscos, pelo empenho em conseguir apoio à nossa pesquisa, e por fazer de seu laboratório um maravilhoso ambiente de trabalho.

ao professor Luiz Duarte, que me ajudou muito a entender o ambiente tão fascinante da zona entremarés e a pensar nas questões ecológicas envolvidas com este trabalho.

a professora Cláudia e ao Tiago (Lalas) que me apresentaram às *Collis* e me ajudaram a ver o quão encantadoras elas são.

aos membros da pré-banca, Prof. Dr. Louis Bernard Klazcko, Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis e Prof. Dr. Alexandre Siqueira Coelho por terem se disponibilizado a ler a tese e pelos valiosos comentários.

a Sônia por ser minha companheira de pesquisa e dividir comigo todos os problemas de nosso trabalho.

a Karla pela ajuda por me ajudar a rodar as vagarosas análises morfométricas.

a todos os amigos que tanto me ajudaram nas coletas enfrentando as adversidades de um costão rochoso: Sônia, Karla, Aluana, Ricardo (Ti), Tiago (Lalas).

a todos do lab (Sônia, Karla, Flávia, Tereza, Teresa, Aluana, Ti, Karina, Evandro, Clau, Suzana, Renato, Gustavo, Flávio) pelo companheirismo, pela ajuda, pelas ricas discussões, e principalmente pela grande amizade. Tudo isso foi muito importante para mim e estou certa que nada disso se perderá.

ii

aos meus queridos amigos: Paulo (Miu), Patrícia, Rodrigo, Cíntia, Renato, Aluana, Márcio, Kubota, Yu, Anders, Naiara, Dodigo, Rafael (Rafis), Sérgio, Mário, Humberto, Horácio, Véio, Gu, Baku e Trigo, incluindo todos do lab, e meus mais novos amigos da bio00, pelo carinho, apoio, ajuda, consolos e por nossos divertidos encontros!

aos amigos "grandões": Miu, Anders, Kubota, Rafis, Sérgio, Horácio, Mário, Clau, pelos ombros e braços amigos que me ajudaram a passar várias vezes pelas terríveis escadarias do IB.

ao Herberth e a todos os demais servidores do Departamento de Genética e Evolução, pelo apoio técnico oferecido durante este trabalho.

a todos vocês, e a todos os demais que, de alguma forma, contribuíram com este trabalho.

Agradeço a Capes pela bolsa de mestrado concedida e a Fapesp pelo projeto de auxílio concedido a essa pesquisa (2001/01994-2).

ÍNDICE

Resumo	x
Abstract	xi
Introdução Geral	1
Capítulo 1 - Large-scale genetic homogeneity vs. local heterozygote deficiency in Brazilian populations of <i>Collisella subrugosa</i> (Patellogastropoda: Acmaeidae).	9
1.1.Introduction	11
1.2.Material and Methods	12
1.2.1.Sampling sites and treatment	12
1.2.2.Isozyme electrophoresis	14
1.2.3.Data Analysis	15
1.3.Results	16
1.3.1.Estimated variability	16
1.3.2.Intra-sample variation and structure	17
1.3.3.Inter-sample variation and structure	18
1.4.Discussion	20
1.4.1. Estimated variability	20
1.4.2. Intra-sample variation and structure	20
1.4.3.Inter-sample variation and structure	22
1.5.Final considerations	23
1.6.Acknowledgements	23
1.7.References	24
Capítulo 2 - Estruturação Genética de Pequena Escala em <i>Collisella subrugosa</i> (Patellogastropoda: Acmaeidae): o Problema da Deficiência de Heterozigotos	29
2.1.Introdução	31
2.2.Objetivo	36
2.3.Material e Métodos	37
2.3.1.Características das praias estudadas	37
2.3.2.Desenho amostral	39
2.3.2.1. De acordo com a variação espacial do ambiente	39
2.3.2.2.De acordo com a variação temporal do ambiente	41
2.3.3.Tratamento dos animais	41
2.3.4. Análise isoenzimática	41
2.3.4.1.Análise dos resultados	42
2.4. Resultados	45
2.4.1.Coletas	45
2.4.2.A eletroforese das isozimas	45
2.4.3.Desequilíbrio de ligação	46
2.4.4.Variabilidade genética	46
2.4.4.1.Nas amostras de pontos	46
2.4.4.2.Nas classes de tamanho	49
2.4.5. A deficiência de heterozigotos	51

2.4.5.1. Nas amostras de pontos	51
2.4.5.2. Nas classes de tamanho	51
2.4.6. Estruturação entre os pontos	60
2.4.6.1. Nos pontos amostrados	60
2.4.6.2. Nas classes de tamanho	61
2.5. Discussão	70
2.5.1. Distribuição da variabilidade genética	70
2.5.2. Estruturação no espaço e no tempo	71
2.5.3. A deficiência de heterozigotos nesse trabalho	76
2.5.4. O problema da deficiência de heterozigotos em moluscos marinhos	79
2.6. Literatura Citada	82
Capítulo 3 – Variação de Tamanho e Forma da Concha de <i>Collisella subrugosa</i> (Patellogastropoda: Acmaeidae) ao longo do espaço do costão rochoso e no tempo	89
3.1. Introdução	91
3.2. Objetivos	93
3.3. Material e Métodos	94
3.3.1. Coletas	94
3.3.2. Obtenção das imagens das conchas	94
3.3.3. Análises	94
3.3.3.1. Marcos anatômicos	94
3.3.3.2. O tamanho das conchas	95
3.3.3.3. A forma das conchas	95
3.4. Resultados	96
3.4.1. Erro estimado	96
3.4.2. O tamanho das conchas	97
3.4.3. A forma das conchas	100
3.4.3.1. Os componentes uniformes	100
3.4.3.2. As deformações principais (Relative Warps)	106
3.5. Discussão	109
3.5.1. O tamanho das conchas	109
3.5.2. A forma das conchas	111
3.5.3. Conclusões	113
3.6. Literatura Citada	114
Considerações Gerais	117
Anexo – Capítulo 1	119
Anexo – Capítulo 2	125

RESUMO

Moluscos que vivem na zona entremarés estão sujeitos a uma grande heterogeneidade ambiental, o que influencia vários aspectos de sua biologia evolutiva. Entre eles, as lapas estão entre os gastrópodes mais abundantes nos costões de todo o planeta, sendo *Collisella subrugosa* a única espécie que ocorre ao longo da costa continental brasileira. Nesta dissertação foram investigados dois aspectos da biologia evolutiva dessa espécie: 1) a variabilidade genética e estruturação em escala macro e microgeográfica e 2) a variação de forma da concha e a influência de fatores ambientais sobre a mesma. Foram realizados dois grupos de coletas. O primeiro, amostrando 14 praias em 2.700 Km do litoral. O segundo, amostrando 2 costões de modo estratificado, com pontos de coleta seguindo distâncias em $\log_2$ em um transecto horizontal. Estas coletas foram repetidas três vezes no tempo. O primeiro e o segundo grupo de coletas foi usado para as análises de marcadores isoenzimáticos e o segundo usado também para a análise de morfometria geométrica. *C. subrugosa* apresentou alta variabilidade genética e baixa estruturação no espaço macrogeográfico. Além disso, todas as amostras macrogeográficas revelaram alta deficiência de heterozigotos para a grande maioria dos locos estudados. A hipótese de grupos de acasalamento foi considerada a mais plausível para explicar a alta deficiência de heterozigotos e a análise das coletas em escala microgeográfica visou testar essa hipótese. Nesta pequena escala foi observada uma grande variação temporal nas frequências alélicas no tempo e uma pequena variação no espaço do costão. Foi observado também que a alta deficiência de heterozigotos some em escala microgeográfica. Com isso, podem estar ocorrendo grupos de acasalamento como hipotetizado, mas que o padrão seria explicado de modo mais simples pelo Efeito Wahlund. Também foram observadas variações de forma e tamanho da concha, maiores no espaço que no tempo. Mas, os padrões não foram congruentes entre as duas praias estudadas o que deve ser resultado das diferentes características ambientais das mesmas. As variações de forma observadas indicam que ventos fortes ou turbulência da água tem grande importância e influência na determinação desta.

ABSTRACT

Intertidal molluscs are submitted to a great environmental heterogeneity what strongly influence their evolutionary biology. The limpets are one of the most common gastropods on rocky shores around the world, and *Collisella subrugosa* is the only species of this group in Brazilian continental shores. In the present manuscript we investigated two aspects of their evolutionary biology: 1) the genetic variability and structure in macro and microgeographic scales and 2) the shell shape and size variations and influence of environment on its shape. The samplings were divided in two groups. For the first, 14 beaches were sampled, in a coast range of 2.700 Km. For the second, 2 shores were sampled in a stratified way, on points along horizontal transects defined by $\log_2$. The last sampling group was repeated in three different seasons. The first and the second sampling groups were used for genetic analysis on isozyme loci and the second one was also used for geometric morphometrics. *C. subrugosa* showed high genetic variability and low structure in large-scale. Also, all of those large-scaled samples showed high levels of heterozygote deficiency for almost all loci. The “breeding groups” hypothesis was considered the most adequate to explain the high heterozygote deficiency and the aim of the microgeographic samples analysis was to test this hypothesis. In fine-scale samples all loci showed great variation in allelic frequencies in time and a little variation on the shore space. It was also observed that the high heterozygote deficiency disappear in fine-scaled samples. Those results suggest that could exist “breeding groups” on shores as hypothesized, but the pattern could be better explained by Wahlund effect. *C. subrugosa* also showed variation in shape and size, higher in space than in time. However, variations were not similar for the two studied shores, what can result of different environmental characteristics. Observed variations in shell shape suggest that strong waves and water turbulence have great influence on it.

INTRODUÇÃO GERAL – *O organismo de estudo e as ferramentas usadas*

Na classificação taxonômica do filo Mollusca, a superfamília Patellogastropoda pertence à subordem Archaeogastropoda (Prosobranchia: Gastropoda). Os patelogastrópodes são moluscos que apresentam uma concha cônica e são popularmente chamados de “lapas”. Apesar desta forma peculiar de concha ter surgido independentemente em algumas poucas espécies de outros grupos de moluscos gastrópodes (Jacobs e Lindberg 1998, Lindberg citado em Denny 2000), nos patelogastrópodes ela caracteriza todo o grupo e, provavelmente, esteve presente já no ancestral (Lindberg 1981, Koufopanou e Reid 1999, Harasewych e McArthur 2000). Espécies de patelogastrópodes ocorrem em todos os mares do planeta e a maioria vive na zona entremarés, na qual ocorrem sempre em abundância. Esses caramujos são herbívoros pastadores e durante seu período de forrageamento, na subida da maré, raspam as microalgas que crescem sobre nas rochas do costão (Branch 1981).

As características físicas do ambiente, mais do que as biológicas, parecem afetar a distribuição dessas lapas no ambiente da zona entremarés (Vermeij 1978, Branch 1981). O tempo de exposição ao sol, temperatura, ventos fortes e turbulência da água são fatores que determinam o padrão de distribuição dos indivíduos nos costões, a distribuição de tamanho dos indivíduos no espaço e também a distribuição de formas da concha nesse espaço (Vermeij 1973, revisão em Branch 1981, Brown e Quinn 1988, Denny e Blanchete 2000).

Em relação ao tamanho dos indivíduos isso ocorre porque indivíduos de diferentes tamanhos apresentam diferentes respostas a essas características ambientais, sendo que os maiores são geralmente mais tolerantes (Branch 1981, Fletcher 1984, Tanaka et al. 2002). Em relação à forma da concha, essa é extremamente plástica nesses gastrópodes e muitos estudos identificaram a relação de cada um dos fatores do ambiente físico com as mudanças na forma dessas conchas cônicas (Davies 1969, Vermeij 1973, Wolcott 1973, Bannister 1975, Branch 1981, Fletcher 1984, Simpson 1985, Brown e Quinn 1988, Denny 2000, Denny e Blanchete 2000).

Espécies da subordem Patellogastropoda apresentam larvas planctônicas, planctotróficas em geral. Suas larvas podem permanecer de dias a um ano no plâncton o que gera um grande potencial de dispersão

através das correntes marinhas (Righi 1966, Branch 1981). Além disso, em algumas espécies da família Acmaeidae foi identificado o potencial de escolha pelas larvas características do substrato no momento de seu recrutamento (Dixon 1981, Kay 2002, Zhoo e Quian 2002).

Os membros da família Acmaeidae são encontrados por todo o mundo com exceção apenas da região Antártica. Essa família é especialmente abundante em espécies na região Austral-asiática e no Pacífico leste (Lindberg 1981). Apesar de existirem mais espécies de Acmaeidae e de patelogastrópodes em geral no pacífico leste, as espécies que ocorrem no atlântico apresentam distribuições mais amplas.

No Brasil, ocorrem quatro espécies de Acmaeidae, todas do gênero *Collisella* sendo que três delas são endêmicas de ilhas e apenas *Collisella subrugosa* (Orbigny 1846) é encontrada na costa. *C. subrugosa* é abundante no mesolitoral médio superior dos costões rochosos brasileiros ocorrendo desde o Ceará até o Rio Grande do Sul incluindo parte do Uruguai (Rios 1994). Por sua grande abundância nos costões rochosos brasileiros a espécie é considerada muito importante na determinação das interações ecológicas desses ambientes e das características da comunidade da zona entremarés (Magalhães e Coutinho 1995, Tanaka et al. 2002).

C. subrugosa, como muitas outras espécies de patelogastrópodes, apresenta um comportamento territorial, chamado de “*homing*”. Esse comportamento se caracteriza por uma fidelidade a um local do costão, muitas vezes marcado com uma “cicatriz” pelo próprio animal, para onde sempre voltam após o forrageamento (Branch 1981, Chelazzi et al. 1998, Minchinton e Ross 1999, Sebastian et al. 2002). Mas, mesmo em espécies onde foi registrado o comportamento de *homming*, a ocorrência desse varia entre populações de uma mesma espécie e até mesmo entre indivíduos de diferentes faixas etárias de uma mesma população (Branch 1981). O surgimento deste comportamento está associado a pressões de competição por espaço, alimento, predação e ao stress de dessecação provocado pelo ambiente físico da entremarés (Branch 1981).

Em *C. subrugosa*, esse comportamento foi registrado em algumas áreas do litoral do estado de São Paulo. Em algumas dessas áreas foi observada também a produção de cicatriz na rocha o que indica alta fidelidade de sítio de descanso (José et al. Em preparação). Essa espécie também apresenta grande

variação de tamanho e forma da concha entre costões rochosos ao longo do litoral e também entre regiões de um mesmo costão (José e Solferini em preparação, Tanaka et al. 2002).

Dentro desse contexto, nos propomos a estudar dois problemas que geram grandes discussões em duas diferentes áreas da biologia evolutiva e que envolvem essa espécie. O primeiro deles é a variabilidade genética existente nas espécies e sua estruturação em escala macro e microgeográfica e dentro deste, o problema da deficiência de heterozigotos comumente observada em invertebrados marinhos. O segundo problema envolve a amplitude da variação morfológica da concha que seria observada em diferentes escalas espaciais, gerada pela influência das características físicas do ambiente do costão rochoso sobre esses animais.

Invertebrados marinhos que apresentam larva planctônica também apresentam, em geral, alta variabilidade genética e baixa estruturação macrogeográfica (Nevo 1978, Solé-Cava e Thorpe 1991). No entanto, alta deficiência de heterozigotos e estruturação microgeográfica têm sido observadas em populações de muitos invertebrados marinhos especialmente moluscos bivalves e em muitos locos isoenzimáticos (ver Zouros e Foltz 1981 e Raymond et al 1997 para revisões do assunto). Esse padrão foi extensamente estudado e discutido em bivalves, mas foi pouca a atenção dada aos gastrópodes principalmente por serem menos estudados. Mesmo com toda a literatura de bivalves destinada à discussão do problema da deficiência de heterozigotos, não foi encontrado nenhum consenso até o momento e ainda são muitas as possíveis causas desse padrão.

Para essas análises genéticas a ferramenta escolhida foi a análise de eletroforese de isoenzimas já que são extensos os dados desses marcadores presentes na literatura e deficiência de heterozigotos têm sido observada nesses locos. A eletroforese de isozimas tem sido utilizada para estimar parâmetros genéticos em nível populacional nestes moluscos e outros grupos de invertebrados (Berger 1983; Janson 1987; Behrens Yamada 1989; Ward 1990; Bunn e Hughes 1997; Todd et al. 1998; Bohonak 1999). Esta técnica tem apresentado bons resultados e é considerada adequada para a investigação dos processos evolutivos que estão agindo nessas populações, uma vez que pode ser usada para estimar a dinâmica de migração dos genes entre as populações (Berger 1983; Burton 1983; revisão em Bohonak 1999).

A grande variabilidade apresentada pelas espécies de moluscos, especialmente gastrópodes, nos locos isoenzimáticos também torna possível o uso desses marcadores para análises intrapopulacionais. Muitos trabalhos com moluscos também têm usado locos isoenzimáticos nas tentativas de detectar sub-estrutura populacional em pequena escala (Borsa et al. 1991, Foltz e Hu 1996, de la Rosa-Velez 1996, Johannesson et al. 1995, Johannesson et al 1997, Tatarenkov e Johannesson 1999).

A variação morfológica da concha cônica desses organismos foi bastante estudada em sua relação com os fatores físicos do ambiente da zona entremarés (Davies 1969, Vermeij 1973, Wolcott 1973, Bannister 1975, Branch 1981, Fletcher 1984, Simpson 1985, Brown e Quinn 1988, Denny 2000, Denny e Blanchete 2000). Entretanto, a amplitude de variação de tamanho e forma entre diferentes escalas espaciais e temporais ainda é desconhecida. A fim de caracterizar a variação de tamanho e forma da concha de *C. subrugosa* em diferentes escalas microgeográficas e temporais a ferramenta escolhida foi a morfometria geométrica.

Durante a década de oitenta, houve grandes mudanças nas análises biométricas e a morfometria geométrica baseada em marcos anatômicos surgiu como uma alternativa à morfometria tradicional (Rholf e Marcus 1993). A vantagem de uma abordagem baseada em marcos anatômicos é que a forma e a geometria se mantêm integradas durante o processo de análise (Bookstein et al. 1985). No entanto alguns grupos de biometristas ficaram distantes dessa nova técnica por dificuldades logísticas. Em especial, o estudo das conchas dos gastrópodes sofre grande dificuldade de se adequar à morfometria baseada em marcos anatômicos pela grande dificuldade na localização destes marcos nas conchas (Stone 1998).

Algumas formas alternativas de determinação dos marcos anatômicos foram propostas para conchas de gastrópodes espiralados ao redor de um eixo central (Stone 1998), mas nenhum trabalho abordou a localização de marcos anatômicos nas conchas cônicas. Entretanto, consideramos válida a análise de morfometria geométrica nesses gastrópodes não espiralados ainda que com marcos de extrema curvatura, se considerarmos questões intraespecíficas que lidem especificamente com a alta variação de forma resultante de plasticidade fenotípica.

LITERATURA CITADA

- Andrade SCS (2000). Variabilidade genética em litorinídeos (Gastropoda: Mollusca) da costa Brasileira. Tese de Mestrado. Campinas, SP, UNICAMP: 113pp.
- Bannister JV (1975). Shell parameters in relation to zonation in mediterranean limpets. Marine Biology 31(1): 63-67.
- Berger EM (1983). Population genetics of marine gastropods and bivalves. The Mollusca, vol. 6, Academic Press Inc.
- Bohonak AJ (1999). Dispersal, gene flow, and population structure. Quarterly Review of Biology 74(1): 21-45.
- Bookstein FL, Chernoff B, Elder RL, Humphries JM, et al. (1995). Morphometrics in evolutionary biology, The Academy of Natural Science Philadelphia.
- Borsa P, Zainuri M and Delay B (1991). Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. Heredity 66: 1-8.
- Branch GM (1981). The biology of limpets: physical factors, energy flow, and ecological interactions. Oceanography and Marine Biology Annual Review 19: 235-380.
- Brown KM and Quinn JF (1988). The effect of wave action on growth in three species of intertidal gastropods. Oecologia 75: 420-425.
- Burton RS (1983). Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. Marine Biology Letters 4(193-206).
- Chelazzi G, Serra G and Bucciarelli G (1997). Zonal recovery after experimental displacement in two sea urchins co-occurring in the Mediterranean. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 212(1): 1-7.
- Davies PS (1969). Physiological ecology of *Patella* .3. Desiccation effects. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 49(2): 291-&.
- de la Rosa-Velez J, Farfan C and Cervantes-Franco MA (2000). Geographic pattern of genetic variation in *Modiolus capax* (Conrad, 1837) from the Gulf of California. Ciencias Marinas 26(4): 585-606.
- Denny MW (2000). Limits to optimization: Fluid dynamics, adhesive strength and the evolution of shape in limpet shells. Journal of Experimental Biology 203(17): 2603-2622.
- Denny MW and Blanchette CA (2000). Hydrodynamics, shell shape, behavior and survivorship in the owl limpet *Lottia gigantea*. Journal of Experimental Biology 203(17): 2623-2639.
- Dixon J (1981). Evidence of gregarious settlement in the larvae of the marine snail *Collisella strigatella* (Carpenter). Veliger 24(2): 181-184.
- Fletcher WJ (1984). Intraspecific variation in the population dynamics and growth of the limpet, *Cellana tramoserica*. Oecologia 63(1): 110-121.
- Foltz DW and Hu YP (1996). Genetics of scnDNA polymorphisms in juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) .2. Heterozygote deficiency and gametic disequilibrium in natural population samples. Molecular Marine Biology and Biotechnology 5(2): 130-137.
- Harasewych MG and McArthur AG (2000). A molecular phylogeny of the Patellogastropoda (Mollusca : Gastropoda). Marine Biology 137(2): 183-194.

- o
- Jacobs DK and Lindberg DR (1998). Oxygen and evolutionary patterns in the sea: onshore/offshore trends and recent recruitment of deep-sea fauna. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 9396-9401.
- Johannesson K, Johannesson B and Lundgren U (1995). Strong natural selection causes microscale allozyme variation in a marine snail. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(7): 2602-2606.
- Johannesson K and Tatarenkov A (1997). Allozyme variation in a snail (*Littorina saxatilis*) - Deconfounding the effects of microhabitat and gene flow. Evolution 51(2): 402-409.
- José J and Solferini VN Large-scale genetic homogeneity and heterozygote deficiency in *Collisella surugosa* (Gastropoda:Acmaeidae). Marine Biology submitted.
- Kay MC (2002). Recruitment in the intertidal limpet *Lottia digitalis* (Patellogastropoda : Lottiidae) may be driven by settlement cues associated with adult habitat. Marine Biology 141(3): 467-477.
- Koufopanou V, Reid DG, Ridgway SA and Thomas RH (1999). A molecular phylogeny of the patellid limpets (Gastropoda : Patellidae) and its implications for the origins of their antitropical distribution. Molecular Phylogenetics and Evolution 11(1): 138-156.
- Lindberg DR (1981). Acmaeidae: Gastropoda, Mollusca. Pacific Grove, CA, USA, The Boxwood Press. 122p.
- Magalhães CA and Coutinho C (1995). Distribution and zonation of three species of predatory gastropods: patterns and adaptation to wave impact on the rocky shore. Publicação Especial do Instituto Oceanográfico, São Paulo 11: 123-131.
- Minchinton TE and Ross PM (1999). Oysters as habitat for limpets in a temperate mangrove forest. Australian Journal of Ecology 24(2): 157-170.
- Nevo E (1978). Genetic-variation in natural-populations - patterns and theory. Theoretical Population Biology 13(1): 121-177.
- Raymond M, Vaanto RL, Thomas F, Rousset F, et al. (1997). Heterozygote deficiency in the mussel *Mytilus edulis* species complex revisited. Marine Ecology-Progress Series 156: 225-237.
- Righi G (1966). On the Brazilian species in the *Acmaea subrugosa* complex (Gastropoda: Prosobranchia: Patellacea). Malacologia 4: 269-295.
- Rios E (1994). Seashells of Brazil. FURG, Rio Grande do Sul, BR.
- Rohlf FJ and Marcus LF (1993). A revolution in morphometrics. Trends in Ecology and Evolution 8: 129-132.
- Sebastian CR, Steffani CN and Branch GM (2002). Homing and movement patterns of a South African limpet *Scutellastra argenvillei* in an area invaded by an alien mussel *Mytilus galloprovincialis*. Marine Ecology-Progress Series 243: 111-122.
- Simpson RD (1985). Relationship between allometric growth, with respect to shell height, and habitats for 2 patellid limpets, *Nacella (Patinigera) macquariensis* Finlay, 1927, and *Cellana tramoserica* (Holten, 1802). Veliger 28(1): 18-27.
- Singh SM and Zouros E (1981). Genetics of growth rate in oysters and its implications for aquaculture. Canadian Journal of Genetics and Cytology 23(1): 119-130.

- Solecava AM and Thorpe JP (1991). High-levels of genetic-variation in natural-populations of marine lower invertebrates. Biological Journal of the Linnean Society 44(1): 65-80.
- Stone JR (1998). Landmark-based thin plate spline relative warp analysis of gastropod shells. Systematic Biology 47: 254-263.
- Tatarenkov A and Johannesson K (1999). Micro and macrogeographic allozyme variation in *Littorina fabalis*; do sheltered and exposed forms hybridize? Biological Journal of the Linnean Society 67(2): 199-212.
- Todd CD, Lambert WJ and Thorpe JP (1998). The genetic structure of intertidal populations of two species of nudibranch molluscs with planktotrophic and pelagic lecithotrophic larval stages: are pelagic larvae "for" dispersal? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 228(1): 1-28.
- Vermeij GJ (1973). Morphological patterns in high intertidal gastropods - adaptive strategies and their limitations. Marine Biology 20(4): 319-346.
- Vermeij GJ (1978). Biogeography and adaptation - patterns of marine life, Harvard University Press. 332p.
- Ward RD (1990). Biochemical genetic variation in the genus *Littorina* (Prosobranchia: Mollusca). Hydrobiologia 193: 53-69.
- Yamada SB (1989). Are direct developers more locally adapted than planktonic developers? Marine Biology 103(3): 403-411.
- Zhao B and Qian PY (2002). Larval settlement and metamorphosis in the slipper limpet *Crepidula onyx* (Sowerby) in response to conspecific cues and the cues from biofilm. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 269(1): 39-51.
- Zouros E and Foltz DW (1984). Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. Malacologia 25(2): 583-591.

CAPÍTULO 1

Large-scale genetic homogeneity vs. local heterozygote deficiency in Brazilian populations of *Collisella subrugosa* (Patellogastropoda: Acmaeidae).



Este capítulo está na forma
do artigo submetido à "Marine Biology"
por Juliana José e Vera Nisaka Solferini.

1.1. INTRODUCTION

Marine invertebrate species, especially those that live in the intertidal zone, are characterized by high genetic variability, compared to freshwater and terrestrial species (Nevo 1978; Berger 1983). This has frequently been related to the extensive spatial and temporal heterogeneity of the intertidal environment (Bryant 1976; Nevo 1978; Hedrick 1986; Solé-Cava and Thorpe 1991). Based on the niche-width hypothesis (Van Valen 1965), population geneticists predict that there should be a positive correlation between genetic diversity and niche breadth. The genetic variability would be required to cope with environmental heterogeneity, in space and time. This pattern has been observed in many species, e.g. some bivalves (Levinton 1973) and gastropods – littorinids (Noy et al. 1987) and patellogastropods (Badino and Sella 1980; but see Lavie et al. 1987 for an inverse relationship).

Besides environmental heterogeneity, gene flow would be the main determinant of the degree of genetic differentiation among populations, on various geographic scales. The rate of gene flow seems to be strongly dependent on the species' type of development and on the length of their larval stage (Palmer and Strathmann 1981; Bherens Yamada 1989; Parsons 1996; Todd et al. 1998; Bohonak 1999; but see discussions in Hedgecock 1986; Palumbi 1995).

For most intertidal species, larval dispersal is the only means of genetic exchange among populations since the adults are often sessile or sedentary. Thus, species with planktonic larval stages should show a lower population structure than those with direct development or complete ovoviviparity (Bherens Yamada 1989; Parsons 1996; Bohonak 1999). Also, species with planktotrophic larvae should have the highest dispersal rates and consequently less structuring (Chambers et al. 1996; Todd et al. 1998). However, the patterns of population microstructure can sometimes be also explained by differences in selective forces (Janson and Ward 1984; Johannesson and Johannesson 1989; Johannesson and Tatarenkov 1997).

The genetic variability and population structure have been estimated for some species of the Patellidae family using isozyme markers (Badino and Sella 1980; Lavie et al. 1987; Byers 1989; Sella et

al. 1993; Cretella et al. 1994; Côrte-Real et al. 1996 a, b; Ridgway et al. 1998; Weber et al. 1998). High values were observed for variability parameters, as expected based on the natural history of these animals (Berger 1983). However, few studies have evaluated the degree of populational genetic substructure, and there has been no work on Acmaeidae species.

Collisella is a genus of Acmaeidae that is abundant in the intertidal zone on rocky shores around the world (Lindberg 1981). There are four species of *Collisella* in Brazil. *C. subrugosa* (Orbigny 1846), the only continental species, is the most widely distributed (from northeastern Brazil to the cost of Uruguay) and the most abundant Brazilian limpet. This species inhabits rocky shores in the midintertidal zone (Rios 1994). These limpets are dioiceus, with external fertilization and planktonic larvae. Since the adults are sedentary, gene flow depends exclusively on larval dispersal, although the extent of this phenomenon is unknown (Righi 1966).

In this study, we describe the genetic variability in *C. subrugosa* and assess the degree of large-scale genetic substructure among rocky shores along the Brazilian coast. We also examine the evidence for a microstructure based on estimations of local heterozygote deficiency.

1.2. MATERIAL AND METHODS

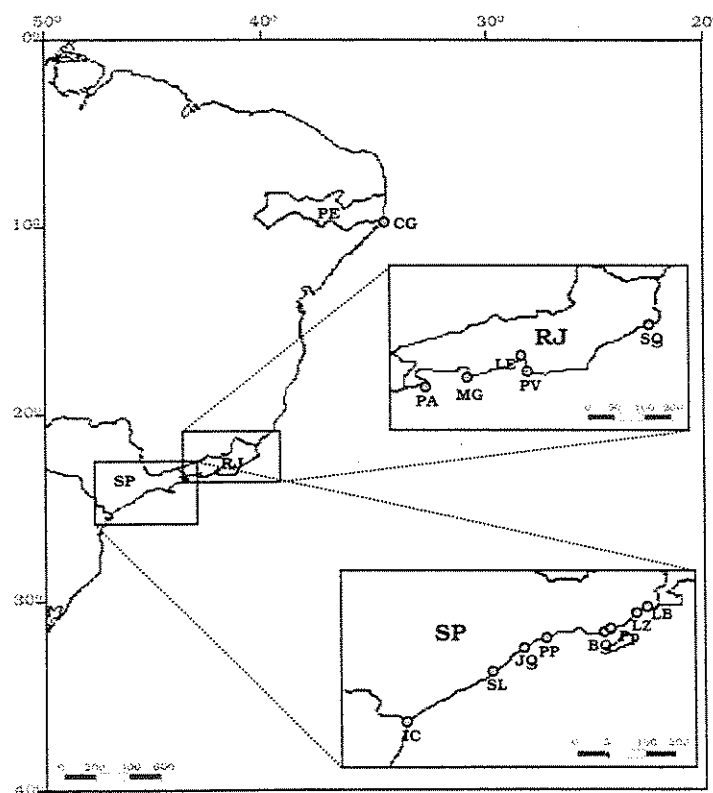
1.2.1. Sampling sites and treatment

Samples of ca. 40 individuals were collected at 14 locations along 2,700 km of the Brazilian coast, from July 1999 to July 2000 (figure 1.1 and table 1.1). The individuals were collected randomly from the rocky shores and were stored in an ultra deep-freeze (at -70°C) until electrophoretic analysis.

Table 1.1: Samples localities and dates. The abbreviation used is indicated after the beach name. Note that São Paulo coast have two beaches with the same name, identified here as P. Preta 1 and P. Preta 2.

Sample	City	Date	N	Distance from IC (Km)
Ilha do Cardoso (IC)	Cananéia (SP)	07/25/00	35	-
São Lourenço (SL)	Bertioga (SP)	07/15/99	76	202,84
Juquehy (JQ)	São Sebastião (SP)	01/28/00	45	238,55
Praia Preta 1 (PP)	São Sebastião (SP)	07/15/99	46	244,19
Barequeçaba (BQ)	São Sebastião (SP)	10/11/99	49	284,47
Praia Preta 2 (Pp)	São Sebastião (SP)	10/11/99	37	290,87
Lázaro (LZ)	Ubatuba (SP)	03/09/00	30	369,67
Praia do Lamberto (LB)	Ubatuba (SP)	04/05/00	25	379,67
Parati (PA)	Parati (RJ)	09/26/99	35	521,52
Mangaratiba (MB)	Mangaratiba (RJ)	08/20/00	40	791,45
Praia Vermelha (PV)	Rio de Janeiro (RJ)	12/08/99	40	884,86
Leme (LE)	Rio de Janeiro (RJ)	07/09/00	50	886,70
Squarema (SQ)	Squarema (RJ)	03/08/00	50	955,50
Praia da Coroa Grande (CG)	São José da Coroa Grande (PE)	01/11/00	38	More than 2.700

Figure 1.1: Sampled sites for *Collisella subrugosa*.



1.2.2. Isozyme electrophoresis

Electrophoresis was carried out on 8,5% starch gels. The soft tissue of each limpet was removed and homogenized in electrode buffer "c" (table 1.2) with 0.05% v/v β -mercaptoethanol. The entire soft body was used because there is no differential expression of isozymes in the head, viscera and foot. Four buffer systems were used (table 1.1) to analyze 17 enzymatic systems (table 1.2). The gels were stained according to Shaw and Prasad (1970), Ward and Warwick (1980) and Corrias et al. (1991).

Table 1.2: Enzymatic systems, their loci and electrophoretic systems resolved in *Collisella subrugosa*.

Enzymes	ECN	Loci	Buffer System
Esterase	3.1.1.1	<u>Est</u>	(d)
Fumarase	4.2.1.2	<u>Fum</u>	(d)
Glutamate oxaloacetic transferase	2.6.1.1	<u>Got-1</u>	(d)
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	<u>Got-2</u>	(d)
		<u>Idh-1</u>	(c)
		<u>Idh-2</u>	(c)
		<u>Idh-3</u>	(c)
Leucine aminopeptidase	3.4.11.1	<u>Lap-1</u>	(b)
		<u>Lap-2</u>	(b)
Malic enzyme	1.1.1.40	<u>Me-1</u>	(a)
		<u>Me-2</u>	(a)
Malate dehydrogenase	1.1.1.37	<u>Mdh-1</u>	(c)
		<u>Mdh-2</u>	(c)
Glucose phosphate isomerase	5.3.1.9	<u>Pgi</u>	(c)
Phosphoglucumutase	2.7.5.1	<u>Pgm-1</u>	(c)
		<u>Pgm-3</u>	(c)
		<u>Pph</u>	(a)
Pyrophosphatase	3.6.1.1	<u>Pph</u>	(a)
Peptidase – leucyl-alanine	3.4.-.-	<u>Pep-la-1</u>	(a)
		<u>Pep-la-2</u>	(a)
Peptidase - leucyl-glycyl-glycine	3.4.-.-	<u>Pep-lgg</u>	(a)
Sorbitol dehydrogenase	1.1.1.14	<u>Sdh</u>	(a)
Triose phosphate isomerase	5.3.1.1	<u>Tpi-2</u>	(d)
		<u>Tpi-2</u>	(d)
Xanthine dehydrogenase	1.2.1.37	<u>Xdh</u>	(d)

(a) Electrode: 0.04 M citric acid and N(3 aminopropyl) morpholine adjusted to pH 6.1. Gel: electrode solution diluted 1:20 (Clayton and Tetriak 1972)

(b) Electrode: 0.3 M boric acid, 60 mM NaOH, pH 8.0. Gel: 10 mM Tris, pH 8.5 (Shaw and Prasad 1970)

(c) Electrode: 0.25 M tris and 0.057 M citric acid, pH 8.0. Gel: electrode solution diluted 1:25 (Ward and Warwick 1980)

(d) Electrode: 10 mM lithium hydroxide, 90 mM boric acid, 3 mM EDTA, pH8.0. Gel: electrode solution diluted 1:10.

1.2.3. Data analysis

The genetic variability in each sample was inferred through: (a) the percentage of polymorphic loci (95% criteria), (b) the mean number of alleles per locus, (c) the mean heterozygosity per locus, observed and expected (gene diversity). Deviations from the expected frequencies in Hardy-Weinberg equilibrium were tested using a Monte Carlo routine (Manly 1997).

The heterogeneity of heterozygote deficiency among samples and among loci was tested as suggested by Gaffney et al. (1990), by applying a Z test described by Sokal and Rohlf (1995) for the correlation coefficients. The estimate of heterozygote deficiency used in this test was the F_{IS} coefficient, because F-statistics can be treated as correlation coefficients (Crow and Kimura 1970).

The relationships among samples were evaluated through: (a) matrices of genetic distances and identities (Nei 1978, unbiased estimate), and (b) populational substructure using Wright's hierarchical F-statistics (Wright 1978) estimated according to Weir and Cockerham (1984). Theta () is considered an unbiased estimate, the most adequate for *C. subrugosa* because it fits the "random populations" model (Black and Krafur 1985). The average was estimated with Jackknife permutations of the loci and the confidence interval (95%) was determined by 5000 bootstrap resamplings. Gene-flow was estimated through N_m (Wright 1969). The correlation between genetic structure (by pairwise) and geographic distance matrices was investigated using a Mantel test (Hutchinson and Templeton 1999).

The length of each shell was measured with a digital caliper (to the nearest 0.1mm) to estimate between size classes. Size distribution fit to the normal distribution in all samples. This meant that the seven size classes, which were significantly different (ANOVA, $p < 0.01$), had the same relative amplitude and variances. Theta () for size classes was estimated for classes obtained by combining all samples and for classes obtained within two samples with a high sample number, São Lorenzo (SL) and Saquarema (SQ).

Linkage disequilibria were evaluated using an exact test (Lehmann et al. 1998). Contingency tables corresponding to associations among loci in each sample were calculated and analyzed using the Markov

chain method, with 100 batches of 1000 iterations per batch and 1000 dememorization steps. The Bonferroni procedure was used to reduce type I errors enhanced by the multiple tests (Rice 1989).

The softwares used in data analysis were: BIOSYS-1 (Swofford and Selander 1981) to estimate genetic variability, Nei's genetic distance and identity and Wright's F-statistics, TFGPA (Miller 1997) to estimate θ , Genetix v. 4.02 (Belkhir et al. 1996-2001) for paired χ^2 and the Mantel test, and GENEPOP (Raymond and Rousset 1995) for linkage disequilibria analysis.

1.3. RESULTS

1.3.1. Estimated variability

The seventeen enzymatic systems, yielded 24 loci (table 1.2). Only one, Mdh-2, was monomorphic in all of the samples. The allele frequencies and sample sizes are shown in table 3. All of the samples had high values of genetic variability in all estimates (table 1.3). The genetic variability was not correlated to sample sizes (Pearson correlation index = 0.188; $p > 0.05$). No linkage disequilibrium was detected (out of 1062 tests).

Table 1.3: Estimates of genetic variability for the 15 samples of *Collisella subrugosa*.

Sample	Mean number of alleles locus ⁻¹ (A)	% of polymorphic loci	Mean heterozygosity		F _{IS}
			Observed (H)	Expected HdyWbg (h)	
IC	3.3	56.5	0.089	0.172	0.48
SL	3.0	54.5	0.067	0.192	0.65
JQ	3.1	75.0	0.096	0.288	0.67
PP	2.7	54.5	0.054	0.190	0.72
BQ	2.2	54.2	0.068	0.121	0.44
Pp	2.8	63.5	0.111	0.255	0.56
LZ	2.8	58.3	0.068	0.162	0.58
LB	2.5	45.8	0.092	0.180	0.49
PA	3.0	68.2	0.104	0.247	0.58
MB	2.3	56.5	0.097	0.147	0.34
PV	2.7	68.2	0.121	0.276	0.56
LE	3.3	60.9	0.088	0.171	0.49
SQ	3.3	52.2	0.071	0.167	0.57
CG	2.5	68.2	0.089	0.214	0.58

1.3.2. Intra-sample variation and structure

All samples showed a significant heterozygote deficiency for most of the loci (table 1.4a). The Pep-la 1 and Pep-lgg loci showed significant departures in all samples, the loci for the enzymes LAP, ME and XDH also showed accentuated departures in most samples. No heterozygote excess was recorded in any sample. Only the sample from Saquarema (SQ) showed homogeneity of heterozygote deficiency among loci (mean $F_{IS} = 0.58$). Seven loci were homogeneous for heterozygote deficiency through all samples (table 1.4a).

Table 1.4: F_{IS} for each locus in (a) samples and (b) size classes. Gray cells show significant departure from Hardy-Weinberg; Cells in blank correspond to those that could not be estimated and tested by lack of adequate sample size. In (a) “*” indicates loci that presented homogeneity of F_{IS} among samples.

(a)

Locus	IC	SL	JQ	PP	BQ	Pp	LZ	LB	PA	MB	PV	LE	SQ*	CG
Est*	0.79	0.93	0.43	0.58	0.61	0.58	0.88		0.64	0.65	0.31	0.66	0.74	0.64
Fum	-0.03		1.00			0.64	0.69		0.54	1.00	0.53	0.00	1.00	0.45
Got-1	-0.01	0.00	0.00	1.00		1.00								
Got-2*	-0.05	0.21	0.65	1.00	0.63	0.78	0.70	1.00	0.85	0.38	0.50	0.55	-0.04	0.66
Idh-1*		0.92	0.48	0.73	0.66	0.54			1.00		1.00			
Idh-2*	-0.05	0.47	0.70		0.13	0.58	-0.04	-0.02	0.33	0.59	0.00	-0.05	0.66	0.37
Idh-3	-0.02		0.00		-0.14					0.37		0.00	0.00	
Lap-1	0.83	0.78	0.83			0.76	0.69	1.00	0.69	-0.20	1.00	0.68	0.82	0.87
Lap-2	0.70	0.57	0.71	0.81	0.47	0.65	0.59	0.30	0.37	-0.20	0.63	0.48	0.69	0.78
Me-1	0.49	0.65	1.00	0.91	0.65	0.00	0.66	0.66	0.49	0.61	0.54	0.64	0.59	
Me-2*	-0.02	0.66	0.79	1.00	0.49		0.66	1.00		0.79	0.85	0.54	0.00	0.00
Mdh-2	0.00		0.00							-0.02				
Mdh-1								0.50					1.00	
Pph*	0.55	1.00		0.00	0.85		0.50		0.49	-0.04	0.47	0.00	0.00	0.38
Pgi	0.11	0.18	0.56	0.29	-0.06	0.27	-0.04	0.38	0.46	0.39	-0.02	0.14	-0.08	-0.14
Pgm-1	0.60		0.58		0.00		1.00	0.19		0.65	0.39	0.42	0.52	
Pgm-3	0.45	-0.03	0.52	-0.03	0.32	-0.14	0.53	0.43	-0.05	0.22	0.13	-0.08	0.28	0.00
Pep-la-1		1.00	1.00	1.00			0.66	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		
Pep-la-2				0.00		0.00	-0.03	0.00				0.00		1.00
Pep-lgg		0.66	1.00	0.65		1.00			1.00		1.00	1.00		1.00
Sdh	-0.01		0.32	0.00		1.00			0.00	0.00		0.00	0.55	
Tpi-1	1.00	1.00	0.69	1.00				0.61	0.63		1.00	1.00	0.00	0.65
Tpi-2	0.00	0.53	0.48	0.00	1.00	0.35	0.00	0.00	1.00		0.00	0.31	0.59	1.00
Xdh*	0.56	1.00	0.88	0.90	1.00	0.85	0.54	0.62	0.32	1.00	0.31	0.75	0.74	0.80
Mean	0.49	0.66	0.68	0.72	0.45	0.58	0.59	0.50	0.59	0.34	0.58	0.49	0.58	0.59

(b)

Locus	1	2	3	4	5	6	7
Est	0.00	0.71	0.76	0.60	0.49	0.79	
Fum		0.00	0.57	0.83	0.45	1.00	
Got-1			-0.01	1.00			
Got-2	1.00	0.24	0.67	0.57	0.49	0.66	0.00
Idh-1	0.00	0.71	0.91	0.92	0.90		
Idh-2		-0.01	0.47	0.31	0.42	0.13	-0.02
Idh-3			-0.01	-0.04		0.46	0.00
Lap-1		0.82	0.82	0.78	0.65	1.00	
Lap-2		0.48	0.60	0.63	0.59	1.00	0.29
Me-1		0.65	0.69	0.61	0.65	0.80	-0.10
Me-2	0.00	-0.01	0.65	0.73	1.00	0.85	
Mdh-2			-0.01			0.00	
Mdh-1				1.00			
Pph		0.66	0.43	0.49	0.23	0.46	0.00
Pgi	-0.03	0.38	0.17	0.28	0.37	-0.04	1.00
Pgm-1			0.66	0.60	0.60	-0.08	0.64
Pgm-3		-0.06	0.39	0.28	0.12	0.35	-0.03
Pep-la-1			1.00	1.00	0.66	1.00	
Pep-la-2		0.00	0.50	0.00	0.66		
Pep-lgg		0.66	1.00	0.66	1.00	1.00	
Sdh		0.00	0.56	0.67	-0.01		
Tpi-1			0.82	0.75	0.74	0.50	
Tpi-2		0.31	0.47	0.43	0.39	0.00	
Xdh		0.62	0.67	0.82	0.62	0.76	
Mean	0.38	0.52	0.63	0.62	0.56	0.68	0.31

There were considerable departures from Hardy-Weinberg equilibrium in the size classes (79 out of 117 tests), with F_{IS} values of the same magnitude as those obtained within samples (table 1.4b). Although the departures were more frequent in intermediate size classes, this reflected differences in sample size, with lower sample sizes occurring in the extreme classes.

1.3.3. Inter-sample variation and structure

Exclusive rare alleles (frequency lower than 0.1) were detected in some samples (attached). In addition, some rare alleles were not found in heterozygotes, as expected. Many rare alleles were restricted

to a few samples separated by large geographic distances. For example, $T_{pi-1}^{0.75}$ was found in Ilha do Cardoso (IC) and Coroa Grande (CG) which are 2,700 km apart.

The mean value for the samples was 0.03 (SD = 0.0076; CI = 0.023 to 0.052), indicating negligible population substructure and resulting in a Nm of 8.08. There was no correlation between the genetic (theta) and geographic distance matrices, either among all of the samples ($Z = 3295.497$, $p = 0.82$), or within regions (São Paulo: $Z = 78240.91$, $p = 0.32$, Rio de Janeiro: $Z = 132316.95$, $p = 0.09$). Nei's coefficients of genetic identity (Nei 1978) were all very high (table 1.5).

Table 1.5: Matrix of coefficients of genetic identity and distance. Above diagonal: Nei' genetic distance (1978), below diagonal: Nei' genetic identity (1978).

Sample	IC	SL	PP	BQ	Pp	JQ	LB	LZ	PA	MB	PV	LE	SQ	CG
IC	****	.011	.018	.013	.008	.019	.005	.008	.023	.018	.045	.001	.002	.007
SL	.989	****	.027	.010	.012	.011	.012	.018	.009	.024	.060	.010	.006	.009
Pp	.982	.974	****	.028	.034	.033	.028	.016	.031	.025	.019	.019	.020	.037
BQ	.987	.990	.972	****	.008	.025	.018	.010	.019	.023	.061	.009	.010	.022
Pp	.992	.989	.967	.992	****	.029	.012	.012	.027	.023	.063	.007	.06	.018
JQ	.982	.989	.968	.975	.971	****	.013	.038	.015	.024	.067	.023	.017	.015
LB	.995	.988	.972	.983	.988	.987	****	.017	.018	.019	.045	.009	.002	.001
LZ	.992	.982	.984	.990	.988	.963	.983	****	.032	.023	.046	.004	.007	.024
PA	.977	.991	.970	.981	.973	.985	.982	.968	****	.036	.052	.024	.017	.015
MB	.982	.977	.975	.977	.978	.976	.981	.978	.964	****	.057	.020	.018	.032
PV	.956	.942	.981	.941	.939	.935	.956	.955	.950	.945	****	.048	.044	.055
LE	.999	.990	.981	.991	.993	.977	.991	.996	.976	.981	.954	****	.003	.012
SQ	.998	.994	.980	.990	.994	.983	.998	.993	.983	.982	.957	.997	****	.007
CG	.993	.991	.964	.978	.982	.986	.999	.976	.985	.969	.947	.988	.993	****

There was no structure among size classes when all samples were considered together ($\Phi = 0.001$, SD = 0.004, CI = -0.01 to 0.009) or when São Lourenço (SL) ($\Phi = -0.054$, SD = 0.046, CI = -0.119 to -0.017) and Saquarema (SQ) ($\Phi = -0.020$, SD = 0.037, CI = -0.078 to -0.030) were considered alone.

1.4. DISCUSSION

1.4.1. *Estimated variability*

All of the estimated parameters of genetic variability were higher than those reported for most *Patella* species (Wilkins 1977; Sella et al. 1993; Lavie et al. 1987; Côté-Real et al. 1996 a, b; Ridgway et al. 1998), and other prosobranch limpet families (Hamm and Burton 2000). High variability appears to be characteristic of these groups (for exceptions, see Côté-Real and Thorpe 1996b), and could be due to the species' bionomic characteristics, as well as ecological and environmental factors.

The high genetic variability observed could also be ascribed to environmental heterogeneity (Powell 1971; Levinton 1973; Ward and Warwick 1980). The genetic variability would allow adaptation to the considerable environmental variations in the intertidal zone in space and time, on a large (between rocky shores) or small scale (within a rocky shore). In *Patella* populations, high values for genetic variability were related to the species' great niche breadth, i.e. a wide geographic and intra-shore distribution (Bandino and Sella 1980; but see Lavie et al. 1987). *C. subrugosa* could fit this model.

1.4.2. *Intra-sample variation and structure*

Hardy-Weinberg departures occur in many marine invertebrate populations, generally through excess of homozygotes (Nevo 1978, Zouros and Foltz 1984, Mallet et al. 1985, Beaumont 1991, Raymond et al. 1997). Our *C. subrugosa* samples showed heterozygote deficiency and F_{IS} coefficients greater than those observed in other Patellogastropoda populations (Lavie et al. 1987; Sella et al. 1993; Côté-Real et al. 1996 a, b, Ridgway et al. 1998; Weber et al. 1998).

Large departures for so many loci in linkage equilibrium are probably not a consequence of null alleles nor aneuploidy (Gaffney et al. 1990). Heterozygote deficiencies are typically attributed to one of three major processes: inbreeding, natural selection (disruptive or balanced) and the Wahlund effect.

Inbreeding could result in two patterns. Within samples, it would affect all loci equally, regardless of the gene frequencies. Between samples, the inbreeding rates could change according to local

subpopulation size and the number of immigrants. Our data showed heterogeneity for the heterozygote deficiency within most samples but homogeneity at seven loci across all samples. In addition, inbreeding seems implausible in this case because *C. subrugosa*, like other patellogastropods and bivalves, is dioiceus, with external fertilization, and their larvae can disperse over long distances.

Natural selection against heterozygotes or disruptive selection could be involved. Differences in thermal stability have been reported for alleles of Pgi and Pgm loci in the limpets *P. vulgata* and *P. aspera* (Wilkins 1977). Similarly, heavy metals tolerance varies for alleles of the Pgm locus in the shrimp *Palaemon elegans* (Nevo et al. 1981) and the Pgi locus in *Littorina punctata* (Lavie et al. 1987). Among our samples, the heterogeneity of heterozygote deficiencies can exclude natural selection as an important factor. In contrast, the homogeneity of F_{IS} at seven loci indicates that some form of selection may be involved. Even if selection could explain the heterozygote deficiencies for these seven loci, another explanation is still needed for the other 17 loci. Besides, for selection alone maintain the high heterozygote deficiencies observed in so many loci, it would have to be very strong. Estimates of the selection coefficients have shown that fitness differences associated with allozyme loci are several orders of magnitude smaller than those required to explain high deficiencies (Gaffney et al. 1990; Eanes 1999).

High heterozygote deficiencies in mollusks have been also related to the sampling of divergent groups, the Wahlund effect (Berger 1983; Jonson and Black 1984). We have no evidence that *C. subrugosa* has permanent subgroups that diverge from each other and the low genetic structure among samples is evidence against this effect. A high F_{IS} associated with a high rate of gene flow has been also observed in many other intertidal mollusks, thus minimizing the importance of the Wahlund effect in explaining those patterns (Johnson and Black 1984; Zouros and Foltz 1984; Raymond et al. 1997).

For these reasons, we considered an alternative hypothesis derived from the Wahlund effect as more plausible, the breeding groups' hypothesis of Tracey et al. (1975). According to these authors, the heterozygote deficiency of marine invertebrate populations would be a consequence of temporary assemblages of individuals with different genotypes forming "breeding groups" along the rocky shore.

In this hypothesis, the homozygote excess would be related to any structuring process in the intertidal zone. Groups of individuals with different genotypes may recruit in different periods, as a result of possible temporal variation in larval composition, or at different points on the shore, as a result of spatial variation on larval choice of microhabitat, as seen in *Collisella strigatella* (Dixon 1981) and *Haliotis rufes* (Boxshall 2000). This temporary fine-scale structuring could easily explain the high values of heterozygote deficiencies because neither strong selection nor permanent differentiation among subpopulations is required. However, the breeding group hypothesis still invokes some selective forces to create the temporary groups along the shore (Tracey et al. 1975).

Temporal variation in the genotypes of recruits may result in differences in the genetic composition of age classes. Our results indicated no genetic structuring among size classes (used to estimate age) (table 5). Within each class, the heterozygote deficiency was as high as within samples, which suggests that there is insufficient temporal variation among recruits to explain the heterozygote deficiency of our data. Nevertheless, the shell length may not be a good age marker in *C. subrugosa*, and a study of the genetic composition over time would provide better information.

The “breeding group” hypothesis has also been suggested to explain the heterozygote deficiency in other mollusks, including three Brazilian litorinids (Andrade et al. in prep). Fine scale spatial structuring resulting in heterozygote deficiency has been reported in the limpet *Siphonaria sp* (Gastropoda: Pulmonata) (Johnson and Black 1984). Considering this hypothesis, we suggest that the high F_{IS} values seen in *C. subrugosa* may probably be related to some small-scale process, within each rocky shore.

1.4.3. *Inter-sample variation and structure*

The low structuring detected among *C. subrugosa* samples and the many rare alleles restricted to a few distant samples reinforced the inference of intense gene flow among the shores (Slatkin 1985).

Despite the large range sampled, we observed high genetic identity (>0.9) between all *C. subrugosa* samples as expected for conspecific populations (Thorpe 1979). The identity was even higher than that

reported for conspecific populations of other patellogastropods, such as *P. rustica*, *P. piperata*, *P. candei* and *P. granularis* (Côrte-Real et al. 1996 a, b; Ridgway et al. 1998; Weber et al. 1998).

The high genetic identities between all samples (table 5) also suggested a great capacity for larval dispersal. In this case, the small differences observed would not reflect an inability to disperse.

1.5. FINAL CONSIDERATIONS

The extensive genetic variability in *C. subrugosa* agrees with the pattern reported for other intertidal mollusks, amazingly the greatest values observed in patellogastropods so far. Since this is the first study of population genetics for an acmaeid species, and also the first patellogastropod studied in the tropics, the high variability observed could be characteristic either of Acmaidae or of species of tropical environment.

Like other mollusks, *C. subrugosa* showed high genetic homogeneity throughout its range, and this suggested extensive larval dispersal in this species. And, unlike the large-scale where no structure emerges, the small-scale events on rocky shores may be important as structuring phenomena, as indicated by the high F_{IS} and the high heterozygote deficiency observed. It indicates that process not detected in this study may also be involved.

1.6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank SCS Andrade, PR Guimarães Jr. and AG Silva for valuable comments in the manuscript and S Hyslop for reviewing the English version. We are in debt with SCS Andrade, KS Yotoko, MP Quast, TEM Duque-Estrada, FS MacCord, H Montenegro, HF Medeiros and especially with MN Galvão for help in the samplings. Financial support was provided by FAPESP grant (#01/01994-2); J José received a FAPESP fellowship (# 99/07110-7). The experiments comply with the Brazilian current laws.

1.7. REFERENCES

- Badino, G and Sella, G (1980) Phosphoglucose isomerase variability in sympatric populations of mediterranean species of *Patella* (Gastropoda, Prosobranchiata). *Mar Ecol Prog Ser* 2: 315-320.
- Beaumont, AR (1991) Genetic studies of laboratory reared mussels, *Mytilus edulis* - heterozygote deficiencies, heterozygosity and growth. *Biol J Linn Soc* 44: 273-285.
- Behrens Yamada, S (1989) Are direct developers more locally adapted than planktonic developers? *Mar Biol* 10: 403-411.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N and Bonhomme F (1996-2001). GENETIX (version 4.02), logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Berger EM (1983) Population genetics of marine gastropods and bivalves. In: Russel-Hunter WD (ed) *The mollusca*, Vol. 6. Academic Press, New York, pp 563-596.
- Black W and Krafur E (1985) A FORTRAN program for analysis of genotypic frequencies and description of the breeding structure of populations. *Theor Appl Gen* 70: 484-490.
- Bohonak AJ (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *Q Rev Biol* 74: 21-45.
- Boxshall AJ (2000) The importance of flow and settlement cues to larvae of the abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *J Exp Mar Biol Ecol* 254: 143-167.
- Bryant EH (1976) A comment on the role of environmental variation in maintaining polymorphisms in natural populations. *Evolution* 30: 188-190.
- Byers BA (1989) Habitat-choice polymorphism associated with cryptic shell-color polymorphism in the limpet *Lottia digitalis*. *Veliger* 32: 394-402.
- Chambers RJ, McQuaid CD and Kirby R (1996) Determination of genetic diversity of South African intertidal limpets (Gastropoda: Siphonaria) with different reproductive modes using polyacrylamide gel electrophoresis of total cellular proteins. *J Exp Mar Biol Ecol* 201: 1-11.
- Corrias B, Rossi N, Arduina P, Cianchi R and Bullini L (1991) *Orchis longicornu* Poirer in Sardinia: genetic, morfological and chorological data. *Webbia* 45: 75-101.
- CorteReal H, Hawkins SJ and Thorpe JP (1996a) Population differentiation and taxonomic status of the exploited limpet *Patella candei* in the Macaronesian islands (Azores, Madeira, Canaries). *Mar Biol* 125: 141-152.
- CorteReal H, Hawkins SJ and Thorpe JP (1996b) An interpretation of the taxonomic relationship between the limpets *Patella rustica* and *P. piperata*. *J Mar Biol Assoc UK* 76: 717-732.
- Cretella M, Scillitani G, Toscano F, Turella P, Picariello O and Cataudo A (1994) Relationships between *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 and the other Tyrrhenian Species of *Patella* (Gastropoda, Patellidae). *J Mollusc Stud* 60: 9-17.

- Crow J and Kimura M (1970) An introduction to population genetics theory. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota.
- Dixon J (1981) Evidence of gregarious settlement in the larvae of the marine snail *Collisella strigatella* (Carpenter). *Veliger* 24: 181-184.
- Eanes WF (1999) Analysis of selection on enzyme polymorphisms. *Annu Rev Ecol Syst* 30: 301-326.
- Gaffney PM, Scott TM, Koehn RK and Diehl WJ (1990) Interrelationships of heterozygosity, growth-rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* 124: 687-699.
- Hamm DE and Burton RS (2000) Population genetics of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the central California coast. *J Exp Mar Biol Ecol* 254: 235-247.
- Hedgecock D (1986) Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *B Mar Sci* 39: 550-564.
- Hedrick PW (1986) Genetic polymorphism in heterogeneous environments: a decade later. *Annu Rev Ecol Syst* 17: 535-566.
- Hutchinson DW and Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53: 1898-1914.
- Janson K and Ward RD (1984) Microgeographic variation in allozyme and shell characters in *Littorina saxatilis* Olivi (Prosobranchia, Littorinidae). *Biol J Linn Soc* 22: 289-307.
- Johannesson K and Johannesson B (1989) Differences in allele frequencies of aat between high-rocky and mid-rocky shore populations of *Littorina saxatilis* (Olivi) suggest selection in this enzyme locus. *Genet Res* 54: 7-11.
- Johannesson K and Tatarenkov A (1997) Allozyme variation in a snail (*Littorina saxatilis*) - deconfounding the effects of microhabitat and gene flow. *Evolution* 51: 402-409.
- Johnson MS and Black R (1984) The Wahlund effect and the geographical scale of variation in the intertidal limpet *Siphonaria sp.* *Mar Biol* 79: 295-302.
- Lavie B, Noy R and Nevo E (1987) Genetic variability in the marine gastropods *Patella coerulea* and *Patella aspera* - patterns and problems. *Mar Biol* 96: 367-370.
- Lehmann T, Hawley W, Grebert H and Collins F (1998) The effective population size of *Anopheles gambiae* in Kenya: implications for population structure. *Mol Biol Evol* 15: 264-276.
- Levinton J (1973) Genetic-variation in a gradient of environmental variability - marine bivalvia (Mollusca). *Science* 180: 75-76.
- Lindberg DR (1981) Acmaeidae: Gastropoda, Mollusca. The Boxwood Press, Pacific Grove.
- Mallet AL, Zouros E, Gartnerkepckay KE, Freeman KR and Dickie LM (1985) Larval viability and heterozygote deficiency in populations of marine bivalves - evidence from pair matings of mussels. *Mar Biol* 87: 165-172.

- Manly B (1997) Randomization, Bootstrap and Monte Carlo methods in biology. Chapman & Hall, London.
- Miller MP (1997). Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Logan, Utah.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nevo E (1978) Genetic-variation in natural-populations - patterns and theory. *Theor Pop Biol* 13: 121-177.
- Nevo E, Perl T, Beiles A and Wool D (1981) Mercury selection of allozyme genotypes in shrimps. *Experientia* 37: 1152-1154.
- Noy R, Lavie B and Nevo E (1987) The niche-width variation hypothesis revisited - genetic diversity in the marine gastropods *Littorina punctata* (Gmelin) and *Littorina neritoides* (L). *J Exp Mar Biol Ecol* 109: 109-116.
- Palmer AR and Strathmann RR (1981) Scale of dispersal in varying environments and its implications for life histories of marine invertebrates. *Oecologia* 48: 308-318.
- Palumbi SR (1995) Using genetics as an indirect estimator of larval dispersal. In: McEduward L (ed) *Ecology of marine invertebrate larvae*. CRC press, New York, pp 369-388.
- Parsons KE (1996) The genetic effects of larval dispersal depend on spatial scale and habitat characteristics. *Mar Biol* 126: 403-414.
- Powell R (1971) Genetic polymorphisms in varied environments. *Science* 174: 1035-1036.
- Raymond M and Rousset F (1995) Genepop (Version-1.2) - Population-genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86: 248-249.
- Raymond M, Väänto RL, Thomas F, Rousset F, de Meeüs T and Renaud F (1997) Heterozygote deficiency in the mussel *Mytilus edulis* species complex revisited. *Mar Ecol Prog Ser* 156: 225-237.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Ridgway TM, Stewart BA, Branch GM and Hodgson AN (1998) Morphological and genetic differentiation of *Patella ghanularis* (Gastropoda : Patellidae): recognition of two sibling species along the coast of southern Africa. *J Zool* 245: 317-333.
- Righi G (1966) On the brasilian species in the *Acmaea subrugosa* complex (Gastropoda: Prosobranchia: Patellacea). *Malacologia* 4: 269-295.
- Rios E (1994) Seashells of Brazil, FURG, Rio Grande do Sul.
- Sella G, Robotti CA and Biglione V (1993) Genetic divergence among 3 sympatric species of mediterranean *Patella* (Archaeogastropoda). *Mar Biol* 115: 401-405.
- Shaw CR and Prasad R (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. *Biochem Genet* 4: 297-320.

- Slatkin M (1985) Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65.
- Solecava AM and Thorpe JP (1991) High-levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. *Biol J Linn Soc* 44: 65-80.
- Swofford D and Selander R (1981) BIOSYS-1: a FORTRAM program for the comprehensive analysis of eletrophoretic data in population genetics and systematics. *J Hered* 72: 281-283.
- Thorpe JP (1979) Enzyme variation and taxonomy - estimation of sampling errors in measurements of interspecific genetic similarity. *Biol J Linn Soc* 11: 369-386.
- Todd CD, Lambert WJ and Thorpe JP (1998) The genetic structure of intertidal populations of two species of nudibranch molluscs with planktotrophic and pelagic lecithotrophic larval stages: are pelagic larvae "for" dispersal? *J Exp Mar Biol Ecol* 228: 1-28.
- Tracey ML, Bellet NF and Gravem CD (1975) Excess allozyme homozygosity and breeding population structure in mussel *Mytilus californianus*. *Mar Biol* 32: 303-311.
- Van Valen L (1965) Morphological variation and width of ecological niche. *Am Nat* 99: 377-390.
- Ward RD and Warwick T (1980) Genetic differentiation in the molluscan species *Littorina rudis* and *L. arcana* (Prosobranchia: Littorinidae). *Biol J Linn Soc* 14: 417-428.
- Weber LI, Thorpe JP, Santos RS and Hawkins SJ (1998) Identification of stocks of the exploited limpets *Patella aspera* and *P. candei* at Madeira Archipelago by allozyme electrophoresis. *J Shellfish Res* 17: 945-953.
- Weir BS and Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population- structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wilkins NP (1977) Genetic variability in littoral gastropods - phosphoglucose isomerase and phosphoglucomutase in *Patella vulgata* and *Patella aspera*. *Mar Biol* 40: 151-155.
- Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations. Vol 4. Variability within and among Natural Populations.* University of Chicago Press, Chicago.
- Zouros E and Foltz DW (1984) Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. *Malacologia* 25: 583-59.

CAPÍTULO 2

Estruturação Genética de Pequena Escala em *Collisella subrugosa* (Patellogastropoda: Acmaeidae): o Problema da Deficiência de Heterozigotos.



2.1. INTRODUÇÃO

Populações de invertebrados marinhos, principalmente das espécies que habitam o litoral, se destacam por apresentar alta variabilidade genética (Nevo 1978, Berger 1983, Solé-Cava e Thorpe 1991). Em populações naturais, a manutenção da variabilidade genética é normalmente atribuída a um conjunto de mecanismos evolutivos como mutações, fluxo gênico, seleção natural, sendo considerada pequena a perda por deriva genética em consequência dos altos tamanhos efetivos das populações. Para as populações que habitam a zona entremarés, é amplamente difundida a idéia de que pressões seletivas seriam importantes para explicar os padrões microevolutivos observados (Levene 1953, Hedrick et al. 1976, Bryant 1976, Hedrick 1986).

Van Valen (1965) propôs que a diversidade genética apresentada pelas populações deve estar relacionada à extensão do nicho ocupado pela espécie, dependendo de variáveis ambientais e da história natural do grupo. Considerando a amplitude da distribuição geográfica como indicativa da extensão do nicho, Levinton (1973) comparou, através de locos enzimáticos, espécies de bivalves que apresentam diferentes amplitudes de distribuição. Conforme o esperado, as espécies com maior distribuição apresentaram também maior variabilidade genética. Bandino e Sella (1980), estudando três espécies de *Patella* da costa do Mediterrâneo, também encontraram uma relação direta entre as estimativas de variabilidade genética e a amplitude de distribuição dessas espécies. Lavie et al. (1987), entretanto, encontraram uma relação inversa à esperada por Van Valen (1965) ao comparar duas espécies de *Patella* dessa mesma costa, também através de locos enzimáticos. A espécie que apresentou maior variabilidade era considerada a de nicho mais restrito.

A extensão do nicho seria também, de certo modo, dependente da granulação do ambiente em relação aos indivíduos que o habitam. Variações de granulação fina, que apresentam um período menor que o tempo de vida, ou em espaço menor que o espaço explorado por um indivíduo da população (Futuyma 1992), estão representadas pelo ciclo de marés, e pelas variações entre microhabitats no ambiente de um costão. Esse tipo de variação seria capaz de manter a diversidade genética em locos onde ocorresse sobredominância, ou sobredominância marginal (Bryant 1976, Futuyma 1992).

Indícios da ocorrência de sobredominância foram encontrados em algumas espécies de bivalves (Zouros et al. 1983, Zouros e Foltz 1984). Nessas espécies, os indivíduos com genótipos heterozigóticos apresentavam maiores taxas de crescimento e maior eficiência metabólica. Do mesmo modo, os genótipos heterozigóticos para certos locos parecem aumentar a viabilidade pós-recrutamento dos juvenis de *Crassostrea virginica* (Zouros e Foltz 1984, Singh e Green 1984).

Além disso, a heterogeneidade do ambiente também poderia manter a variabilidade mesmo sem a vantagem do heterozigoto (Levene 1953, Bryant 1976, Solé-cava e Thorpe 1991, Prout 1996, Hedrick et al. 1976). Variações de granulação grossa, que apresentam um período maior que o tempo de vida, ou um espaço maior que o espaço explorado por um indivíduo (Futuyma 1992), seriam variações como as diferenças de clima e do tipo de costão entre os locais ao longo do litoral. Essas variações poderiam manter a variabilidade mesmo sem heterose, em casos de polimorfismo de nicho múltiplo (Futuyma 1992).

A existência de diferentes pressões seletivas atuando nas localidades amostradas é, em alguns casos, indicada como causa da estruturação populacional (Wilkins 1977, Beamont 1982, Beamont et al. 1983, Kartavtsev et al. 1983, Janson e Ward 1984, Johannesson et al. 1993). Diferenças entre costões ou entre praias foram observadas na forma de clinas de frequências alélicas relacionadas a gradientes ambientais, como observado em duas alozimas do bivalve *Mytilus edulis* (Koehn et al. 1976). Em outros trabalhos, uma grande diferença é encontrada nas frequências genotípicas correspondendo a ambientes onde há melhor atividade bioquímica de diferentes alelos das alozimas (Wilkins 1977, Nevo et al 1981) ou simplesmente associadas a diferentes microhabitats (Beamont 1982, Beamont et al. 1983, Kartavtsev e Zalavskaya 1983, Janson e Ward 1984, Johannesson e Johannesson 1989, Johannesson et al. 1993, Johannesson et al. 1995, Johannesson e Tatarenkov 1997).

Na heterogeneidade observada em ambientes naturais é difícil distinguir o componente espacial do componente temporal da variação. Em qualquer situação de multihabitats, a variação temporal também se expressa espacialmente, acentuando o efeito da variação espacial (Bryant 1976). Com isso, na tentativa de observar o efeito da variação espacial sobre as frequências genotípicas das populações naturais é importante considerar também o efeito da variação temporal do ambiente (Bryant 1976).

A grande heterogeneidade dos ambientes litorâneos também decorre de acentuadas variações temporais, geralmente sazonais, nesse sistema. Nesse contexto, o ciclo de vida de muitos organismos marinhos apresenta padrões sazonais acentuados em relação ao crescimento, abundância, reprodução e recrutamento (Coma et al. 2000). Essas variações temporais, especialmente na abundância e no recrutamento, podem modificar a estrutura genética das populações dessas espécies ao longo do tempo.

Além de habitarem o ambiente heterogêneo da zona entremarés, esses invertebrados marinhos apresentam outras características bionômicas importantes para compreensão dos mecanismos de manutenção e estruturação da variabilidade genética. Essas espécies possuem grandes tamanhos populacionais em geral, o que, juntamente com a alta variabilidade apresentada, sugere que essas populações também apresentam um alto tamanho efetivo (Berger 1983), considerado a principal causa da manutenção da variabilidade em populações naturais por Ward (1990).

Um outro fator importante, a taxa de fluxo gênico entre as populações, parece depender fortemente do tipo de desenvolvimento e do tempo de duração do estágio larval apresentado pela espécie (Palmer e Strathmann 1981, Burton 1983, Hedgecock 1986, Yamada 1989, Parsons 1996). A dispersão larval é a única via de troca genética entre as populações para a maioria das espécies, já que os adultos são em geral sésseis ou sedentários. Desse modo, é esperado que espécies que possuam estágios larvais planctônicos apresentem baixa estruturação populacional em relação às que possuem desenvolvimento direto e ovoviviparidade completa (Behrens Yamada 1989, Hedgecock 1986, Parsons 1996, Bohonak 1999). Além disso, entre as espécies que apresentam larvas planctônicas, as de larvas planctotróficas (que passam por fase pelágica, permanecendo no plâncton por longo tempo) apresentariam maiores taxas de dispersão e conseqüentemente menor estruturação do que as que possuem larvas lecitotróficas (que permanecem pouco tempo no plâncton), mesmo entre populações geograficamente distantes. Esse padrão foi observado em diferentes espécies de gastrópodes (Ward e Warwick 1980, Burton 1983, Janson 1987, Yamada 1989, Chambers et al. 1996, Parsons 1996, Todd et al. 1998).

A variabilidade genética de patellogastrópodes foi caracterizada para algumas espécies de Patellidae e Acmaeidae através da análise de locos enzimáticos, incluindo espécies das regiões temperada e tropical (Wilkins 1977, Bandino e Sella, 1980, Lavie et al., 1987, Sella *et.al.* 1993, Cretella et al. 1994,

Côrte-Real et al. 1996, Byers 1989, Ridgway et al. 1998, José e Solferini, submetido). Todas as espécies estudadas apresentaram altos valores para as estimativas de variabilidade consideradas (porcentagem de locos polimórficos, número de alelos por loco, diversidade gênica – H_e), como seria esperado pelas características da história de vida desses animais (Berger 1983).

Por apresentarem grandes populações, fertilização externa e estágio larval planctônico seria também esperado que essas espécies apresentassem panmixia e que as frequências genotípicas de suas populações estivessem de acordo com as proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. No entanto, o desvio às proporções esperadas por Hardy-Weinberg tem sido encontrado para muitos locos aloenzimáticos em grande parte dos trabalhos, na forma de altos valores para a deficiência de heterozigotos (Lavie et al. 1987, Sella et al. 1993, Côrte-Real et al. 1996, Ridgway et al. 1998, Andrade et al. 2003, José e Solferini submetido).

O padrão geral de deficiência de heterozigotos em populações de invertebrados marinhos foi primeiramente percebido, e amplamente discutido, em populações de espécies de bivalves (Zouros e Foltz 1984, Singh e Green 1984). Muitos outros trabalhos subsequentes relataram o mesmo padrão para outros taxa, muitos deles moluscos habitantes da zona entremarés que apresentam dispersão larval planctônica (Berger 1983). Além dos patellogastrópodes, os litorínídeos também foram bastante estudados (Lavie e Nevo 1987, Janson 1985, Noy et al. 1987, Ward 1990, McQaid 1996, Tatarenkov e Johannesson 1999, Andrade et al. 2003), assim como as lapas da subordem Pulmonata, *Siphonaria* spp. (Johnson e Black 1982, 1984) e as lapas da família Haliotidae (Ham e Burton 2000), que também apresentaram deficiência de heterozigotos em locos de microsátélites (Huang et al. 2000).

Várias explicações têm sido propostas para explicar esse padrão. A princípio, o excesso de homozigotos poderia ser atribuído à seleção contra o heterozigoto. Wilkins (1977) demonstrou que diferentes alelos de locos de *Pgi* e *Pgm*, de *Patella vulgata* e *P. aspera*, apresentam diferentes graus de tolerância ao aumento da temperatura. Em algumas espécies de bivalves, a deficiência de heterozigotos é maior em indivíduos jovens, chegando a ocorrer heterose nos adultos, refletida em maiores taxas de crescimento e maior eficiência metabólica (Zouros e Foltz 1984, Singh e Green 1984, Gaffney et al. 1990). Esse padrão foi associado a diferentes pressões seletivas atuando antes e depois do recrutamento.

Entretanto, essa relação entre a idade do indivíduo e a sua heterozigosidade não foi observada em outras espécies de bivalves e gastrópodes analisadas (Foltz et al. 1993, Rio-Portilla e Beaumont 2000) e parece não ser um padrão geral.

A estabilidade de diferentes alelos em diferentes condições ambientais foi também encontrada em ambientes poluídos com altas concentrações de metais. Nevo et al. (1981) observou que diferentes concentrações de mercúrio favorecem diferentes genótipos no loco da enzima PGM (fosfoglicomutase) do camarão *Palaemon elegans*, e poderiam resultar no excesso de homozigotos observado. Do mesmo modo, no gastrópode *Littorina punctata*, a presença de cádmio e mercúrio parece reduzir a viabilidade de heterozigotos em um loco da PGI (isomerase da fosfoglicose) (Lavie e Nevo 1987).

A deficiência de heterozigotos observada em espécies de moluscos também foi relacionada à amostragem de grupos divergentes, ao efeito Wahlund, em alguns trabalhos (Berger 1983, Jonson e Black 1982, 1984, Lavie et al. 1987). A amostragem de subpopulações que diferem nas frequências alélicas produziria uma deficiência de heterozigotos na população em geral, proporcional à variância das frequências alélicas entre as subpopulações. No entanto, de acordo com o esperado para esse efeito, os altos índices de deficiência de heterozigotos observados nas populações só poderiam se justificar caso houvesse grandes variâncias nas frequências alélicas entre as subpopulações. No entanto, para os locos enzimáticos estudados na maioria desses moluscos, a variação geográfica em larga-escala das frequências alélicas é muito pequena e limita a importância do efeito Wahlund na explicação do padrão de deficiência de heterozigotos nessas populações (Zouros e Foltz, 1984, Johnson e Black, 1984).

Tracey et al. (1975), a partir de trabalhos com *Mytilus californianus*, apresentaram a hipótese de que a grande deficiência de heterozigotos em invertebrados marinhos pode ser causada pela formação de grupos temporários de indivíduos com diferentes composições genótípicas, formando o que foi chamado de “grupos de acasalamento” ao longo do substrato. Estas diferenças nas frequências alélicas apareceriam entre grupos próximos no costão, resultantes de uma variação temporal na composição e distribuição dos recrutas, por exemplo, ou mesmo da influência da variação espacial, de microhabitats do costão sobre esses grupos. Essa hipótese também sugere a influência da estruturação espacial, assim como no efeito Wahlund, mas a estruturação dos grupos de acasalamento seria percebida apenas em pequena escala e não

dependeria da amostragem. Os grupos de acasalamento fariam com que a população não apresentasse a panmixia pressuposta pelo modelo de Hardy-Weinberg na população de adultos ou mesmo no grupo das larvas no plâncton. A hipótese de "grupos de acasalamento" foi sugerida também para populações *Siphonaria sp* por Johnson e Black (1982, 1984).

A freqüente ocorrência do desvio das proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em invertebrados marinhos ainda não foi completamente esclarecida. Nei (1987) ressalta que o fato deste sistema apresentar padrões que contrariam o esperado em espécies panmíticas é um indício de que o investimento em seu estudo poderá trazer contribuições interessantes para compreender a distribuição e organização dos genótipos em populações naturais.

No capítulo anterior (José e Solferini, submetido), foram estudadas amostras de *C. subrugosa* de 14 praias do nosso litoral, quanto à variabilidade populacional. Os locos isoenzimáticos estudados revelaram desvios às proporções esperadas pela lei de Hardy-Weinberg, sempre no sentido de deficiência de heterozigotos em pelo menos 8 locos, chegando até a 18 locos em algumas amostras. A hipótese mais aceita para explicar esse tipo de padrão, o efeito Wahlund, não foi considerada como plausível nesse trabalho, pois a espécie apresentou baixa estruturação populacional. A hipótese proposta por Tracey et al (1975), foi considerada mais adequada para explicar ao menos parte da grande deficiência de heterozigotos observada nessas amostras.

2.2. OBJETIVOS

Como o padrão de grande deficiência de heterozigotos em *Collisella subrugosa* foi observado em locos isoenzimáticos, a investigação sobre a origem desse padrão foi realizada nesses mesmos locos. Desse modo, investigamos a importância relativa da seleção natural e de processos estocásticos na formação do padrão de deficiência de heterozigotos, avaliamos a variação dos genótipos em locos isoenzimáticos de *C. subrugosa* ocorrendo no espaço microgeográfico do costão, no tempo e ao longo da ontogenia da espécie.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Características das praias estudadas

As coletas foram realizadas em um estuário – o costão direito de Itamambuca (Ubatuba), e em um costão exclusivamente marinho – o costão direito de Barequeçaba (São Sebastião). As duas praias, situadas no litoral norte do estado de São Paulo (figura 2.1), foram escolhidas pela grande abundância e amplitude da distribuição de *C. subrugosa* no costão, e pela acentuada estratificação vertical e horizontal da zona entremarés.

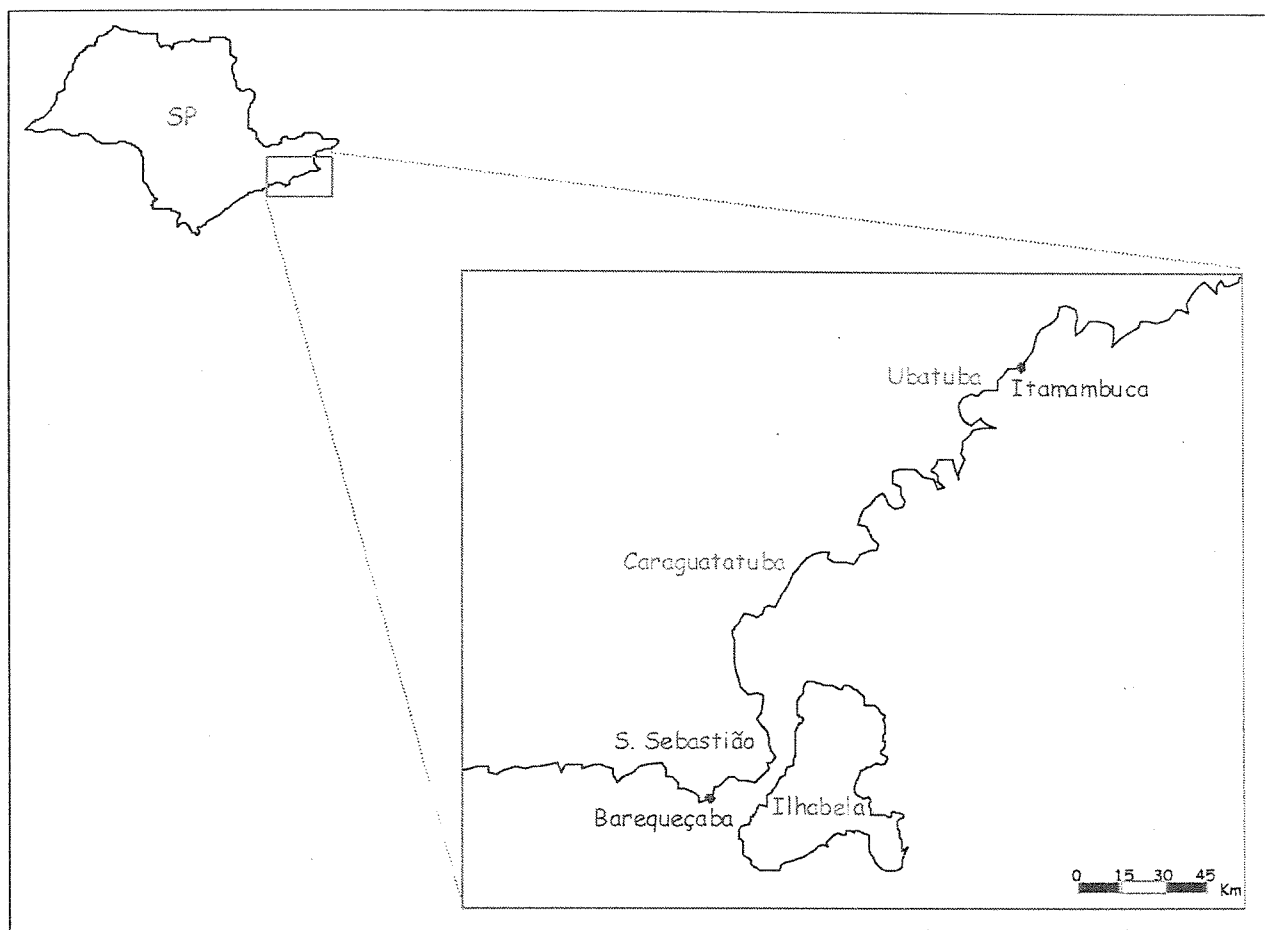


Figura 2.1: Mapa do litoral norte paulista indicando as duas praias estudadas para *C. subrugosa*.

Em Itamambuca, o costão escolhido fica no estuário do Rio Itamambuca. Na parte em que banha o costão, o rio possui ao redor de 8m de largura e de 40 a 80cm de altura da coluna d'água. A parte do costão mais próxima ao estuário possui um formato arredondado, com algumas pedras redondas isoladas na frente do paredão rochoso (figura 2.2b). Desse modo, esta primeira parte do costão apresenta um

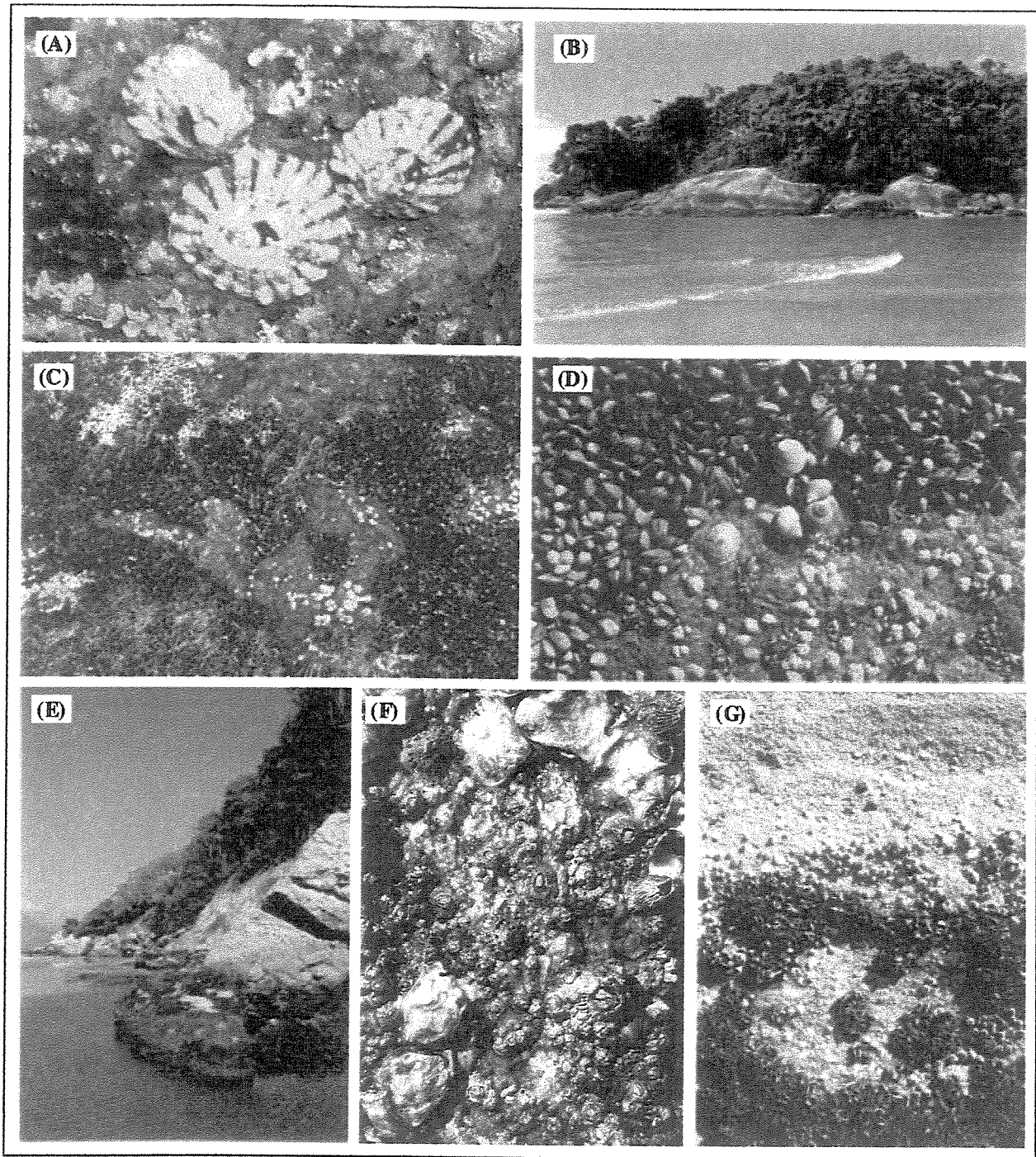


Figura 2.2: Imagens do organismo e das áreas de estudo. (A) Três indivíduos de *Collisella subrugosa* aderidos à rocha. (B) Área estudada no costão estuarino de Itamanbuca, e sua zona entremarés em destaque em (C) e (D). O mediolitoral em destaque em (C) é representativo de grande parte da área estudada em Itamanbuca, a qual apresenta grande abundância de macroalgas. O médiolitoral em destaque (D) representa a pequena área de Itamanbuca que não apresenta macroalgas e onde se localizam o quarto e quinto ponto do transecto estudado nessa praia. (E) Área estudada no costão marinho de Barequeçaba, e sua zona entremarés em destaque em (F) e (G). O médiolitoral em destaque em (F) representa a primeira parte da área estudada em Barequeçaba, a qual não apresenta bancos de mexilhões e onde se localizam os pontos de 1 à 5 do transecto estudado. O médiolitoral em destaque em (G) representa a segunda parte da área estudada em Barequeçaba, que se apresenta extensamente coberta por bancos de mexilhões e onde se localizam os pontos de 6 à 11 do transecto estudado. Notar em (C), (D) e (G) as clareiras entre os bancos de mexilhões onde fica a maior parte dos indivíduos de *C. subrugosa*.

grande número de concavidades e frestas nas pedras e uma grande porção de áreas sombreadas. Nessa primeira parte estão localizados os 4 primeiros pontos de coleta (figura 2.3a).

A segunda parte desse costão, onde foi realizada a coleta dos demais pontos e mais próxima à água salgada, é formada por um grande paredão rochoso, quase sem concavidades e fissuras e com toda a área exposta diretamente ao sol. Nessa segunda parte estão localizados os pontos de coleta de 5 a 8 (figura 2.3a). O mediolitoral apresenta grande abundância de macroalgas e é extensamente coberto por bancos de mexilhões. Nas clareiras entre esses bancos, se localiza a maior parte dos indivíduos de *C. subrugosa* (figura 2.2c), apenas os pontos 4 e 5 do transecto se localizam em uma área sem macroalgas (figura 2.2d). O costão de Itamambuca pode ser caracterizado como batido em relação ao de Barequeçaba.

Em Barequeçaba o costão é formado por um longo paredão rochoso, havendo poucas pedras isoladas na sua frente (figura 2.2e). Apenas os pontos de 1 a 3 e o ponto 6 estão situados em pedras arredondadas à frente do paredão rochoso, nas quais há um maior número de frestas e concavidades. Na primeira parte do transecto, mais próxima à areia e onde ficam os 5 primeiros pontos, a faixa do mediolitoral não apresenta bancos de mexilhões, somente muitas cracas e ostras (figura 2.2f). Os bancos de mexilhões começam a ocorrer a partir do ponto 6 (figura 2.2g). Ao longo de toda a área estudada no costão de Barequeçaba, não foram observadas macroalgas co-ocorrendo com *C. subrugosa*. O costão de Barequeçaba está situado no início do canal de São Sebastião (figura 2.1) e pode ser considerado abrigado.

2.3.2. Desenho amostral

2.3.2.1. De acordo com a variação espacial do ambiente

A variação espacial dentro da zona entremarés pode ocorrer ao longo de dois eixos de distribuição dos animais: (a) um horizontal, no sentido praia-mar, (b) um vertical, de acordo com a altura de posição na pedra. As tentativas de estratificar a coleta no eixo vertical da variação foram mal sucedidas. A espécie estudada apresenta uma distribuição muito restrita nesse eixo, numa faixa de cerca de 30cm, inviabilizando a estratificação da coleta nesse. Assim, somente o eixo horizontal de variação foi estudado.

Como não sabemos qual a escala em que poderíamos encontrar uma estruturação na variabilidade genética, o esquema de amostragem foi montado com distâncias entre as amostras seguindo função logarítmica de base 2, que corresponde à exponencial:

$$D_n = 2^{n-1}$$

onde, D é a distância a ser medida a partir da origem e n o número do ponto de coleta. Nos dois costões, uma distância de 64m foi amostrada, resultando em 7 pontos de coleta segundo o esquema logarítmico de coleta adotado.

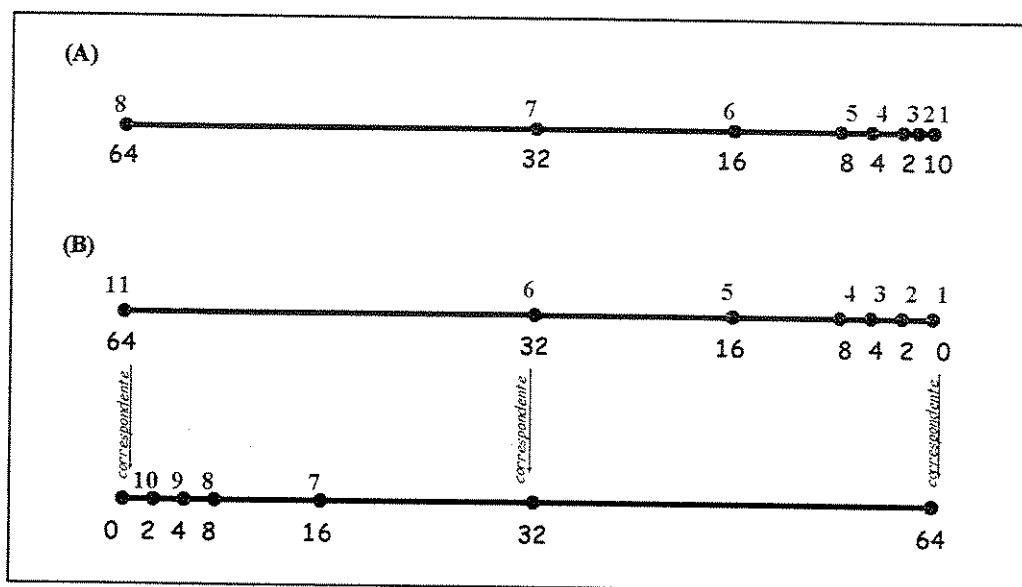


Figura 2.3: Esquema logarítmico de distribuição dos pontos de coleta de *C. subrugosa* nas duas praias estudadas. (A) O transecto com os pontos de coleta em Itamambuca. (B) Os dois transectos com os pontos de coleta em Barequeçaba. Os números em cinza correspondem a distância do ponto inicial de cada transecto em metros. Os números em azul são referentes à numeração adotada para a referência aos pontos ao longo do texto.

Em Itamambuca a coleta foi feita ao longo de um transecto de 64m que começa onde foram encontrados os primeiros indivíduos de *C. subrugosa* na parte do costão mais próxima ao rio (figura 2.3a). Nessa parte incluímos no transecto o ponto 0, que está situado um metro antes do ponto 1, para não perder a grande variação de microhabitats observada entre o ponto 0 (que fica no paredão rochoso) e o ponto 1 (que fica em uma pedra isolada na sua frente).

Em Barequeçaba a coleta foi feita ao longo de dois transectos de 64m sobrepostos, onde o início de um corresponde ao final do outro (figura 2.3b). O primeiro transecto começa na parte do costão mais distante d'água onde foram encontrados os primeiros indivíduos de *C. subrugosa*, e segue em direção à água. O segundo transecto começa no último ponto do primeiro, dentro d'água e segue em direção à areia.

água. O segundo transecto começa no último ponto do primeiro, dentro d'água e segue em direção à areia. Desse modo, os dois transectos possuem três pontos em comum, os dois pontos extremos (0 e 64m) e o ponto intermediário (32m). Esse esquema foi adotado para esse costão por causa da grande variação entre microhabitats observada ao longo dele.

Foram coletados 30 indivíduos por ponto, sempre que possível. A procura pelos indivíduos na pedra foi sempre restrita a uma área de 0.5m^2 ao redor do ponto determinado.

2.3.2.2. De acordo com a variação temporal do ambiente

A análise da variação temporal consiste em 3 repetições das coletas estruturadas no espaço descritas acima ao longo de um ano, com intervalos de 3 meses entre elas. Assim, cada coleta foi feita em uma estação diferente. O intervalo de 3 meses é necessário para o restabelecimento das “subpopulações” locais pelo recrutamento e crescimento dos indivíduos, pois a coleta de 30 indivíduos por ponto praticamente esgota a área.

Essa análise foi apenas exploratória, pois não esperávamos encontrar nenhum padrão de variação temporal nesse curto espaço de tempo. No entanto, essa análise foi muito importante para investigar se há variação ao longo de um ano. Se variações fossem encontradas poderíamos constatar sua ocorrência. Se não fossem encontradas, ainda restaria a possibilidade dela ocorrer e não ter sido detectada nesse ano.

2.3.3. Tratamento dos animais

Todos os indivíduos coletados foram congelados em nitrogênio líquido logo após a coleta e mantidos em biofreezer a -70°C para as análises genéticas. Dos indivíduos usados na análise de isoenzimas, uma pequena parte do tecido do pé foi armazenada para a extração de DNA e futuras análises de locos de microsátélites. Todas as conchas foram mantidas individualizadas para a morfometria.

2.3.4. Análise isoenzimática

Esta análise foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de amido Sigma 8,5%. Uma porção da parte mole dos indivíduos foi macerada em tampão Tris 0.05M pH 8.0 com 0,05% de β -mercaptoetanol. A

eletroforese foi realizada em 3 sistemas tampão gel-eletrodo para a análise de 11 sistemas enzimáticos, totalizando 17 locos (tabela 2.1).

Tabela 2.1: Sistemas enzimáticos analisados, seus respectivos locos e sistemas eletroforéticos.

<i>Enzimas</i>	<i>ECN</i>	<i>Locos</i>	<i>Sistemas</i>
Aminotransferase do aspartato	2.6.1.1	<u>Aat</u> -1	(b)
		<u>Aat</u> -2	(b)
Desidrogenase do isocitrato	1.1.1.42	<u>Idh</u> -1	(a)
		<u>Idh</u> -2	(a)
Aminopeptidase da leucina	3.4.11.1	<u>Lap</u> -1	(b)
		<u>Lap</u> -2	(b)
Enzima Málica	1.1.1.40	<u>Me</u> -1	(b)
		<u>Me</u> -2	(b)
Isomerase da glucose 6-fosfato	5.3.1.9	<u>Pgi</u>	(a)
Fosfoglucomutase	5.4.2.2	<u>Pgm</u> -1	(a)
		<u>Pgm</u> -2	(a)
Pirofosfatase inorgânica	3.6.1.1	<u>Pph</u>	(b)
Desidrogenase do sorbitol	1.1.1.14	<u>Sdh</u>	(b)
Isomerase da triose-fosfato	5.3.1.1	<u>Tpi</u> -2	(c)
		<u>Tpi</u> -2	(c)
Desidrogenase da xantina	1.1.1.204	<u>Xdh</u>	(c)

(a) Eletrodo: Ácido Cítrico 0.04 M e N(3 aminopropyl) morfolina ajustando para pH 6.1. Gel: solução do eletrodo diluída em proporção 1:20 (Clayton and Tetriak 1972)

(b) Eletrodo: Tris 0.25 M e Ácido Cítrico 0.057 M, pH 8.0. Gel: solução do eletrodo diluída em proporção 1:25 (Ward and Warwick 1980)

(c) Eletrodo: Hidróxido de Lítio 10mM, Ácido Bórico 90mM, EDTA 3mM, pH8.0. Gel: solução do eletrodo diluída em proporção 1:10.

Os sistemas de tampões e os protocolos de revelação dos sistemas enzimáticos foram definidos de acordo com Shaw e Prasad 1970, Ward e Warwick 1980, e Soltis et al. 1983, adaptados por Andrade (2000). Os sistemas enzimáticos foram escolhidos de acordo com a resolução, o polimorfismo, e os altos valores de deficiência de heterozigotos apresentados nas análises do capítulo anterior.

2.3.4.1. Análise dos resultados

Primeiramente, considerando todos os pontos amostrados de cada praia como uma única amostra, foi testado o desequilíbrio de ligação entre os locos estudados através de um teste exato (Lehmann *et al.* 1998), analisando as tabelas de contingência de associações entre os locos pela cadeia de Markov, com 100 rodadas de 1000 interações por rodada e 1000 passos de “desmemorização”. Para reduzir o erro do tipo 1 foi usado o procedimento de Bonferroni em todos os testes múltiplos realizados (Rice 1989).

A análise de estruturação genética foi realizada de acordo com duas linhas gerais. A estruturação foi investigada: (a) considerando os pontos amostrados nos costões para cada época de coleta e (b) subdividindo as amostras totais de cada costão, e de cada época de coleta, de acordo com classes de tamanho dos indivíduos.

Estruturação entre os pontos amostrados. Para cada ponto amostrado nas duas praias foram estimadas as heterozigosidades médias. Os desvios às proporções esperadas por Hardy-Weinberg foram testados com o procedimento de “randomização” de Monte Carlo (Manly 1997), na tentativa de reduzir o viés que pode resultar do grande número de alelos raros observados. Foram testadas as correlações de Spearman da distância entre os pontos com as heterozigosidades e estimativas de F_{IS} .

A heterogeneidade das deficiências de heterozigotos entre os locos e entre as amostras foi testada como sugerido por Gaffney et al. (1990), através do teste Z para coeficientes de correlação (Sokal e Rohlf 1995). A estimativa de deficiência de heterozigotos usada para esse teste é o F_{IS} (segundo Weir & Cokerham 1984) já que as estatísticas-F de Wright podem ser usadas como um coeficiente de correlação (Crow and Kimura 1970). Desvios na heterozigosidade multiloco (MLH) foram avaliados através da contagem do número de locos heterozigotos por indivíduo (N_h) relativo ao número total de locos estudados naquele dado indivíduo, testando-se a aderência da distribuição de N_h à distribuição normal, considerada a hipótese nula. O teste de normalidade usado foi o W de Shapiro-Wilk (Sokal e Rohlf 1995).

A estruturação entre as amostras foi quantificada através da estimativa de Weir & Cokerham (1984), considerada como uma estimativa não enviesada do F_{ST} de Wright (1978). Essa estimativa parece mais adequada principalmente por nossas amostras corresponderem ao modelo de “populações aleatórias” (Weir 1996). O (referido como F_{ST} deste ponto em diante) de foi estimado para cada loco, e sua média será estimada com permutações de Jackknife, com intervalo de confiança de 95% determinado por 5000 reamostragens de bootstrap. A estrutura espacial da variação genética será analisada através da comparação uma matriz de F_{ST} a uma matriz de distância geográfica através de um teste de Mantel, como sugerido por Hutchinson e Templeton (1999). A diferenciação das amostras relativa às frequências

alélicas também foi testada através de um teste exato de Fisher (Raymound and Rousset 1995, Sokal e Rholf 1995).

Estruturação nas classes de tamanho. As classes de tamanho foram definidas a partir do comprimento do centróide (medido no trabalho referente ao segundo capítulo desta tese), evitando sobreposição de valores de tamanho e heterogeneidade de variância (testadas com ANOVA). Em todas as seis amostras, os mesmos valores de corte foram usados para delimitar as classes de tamanho. Para investigar uma possível diferença de frequências gênicas e/ou genotípicas entre indivíduos de diferentes tamanhos, todos os pontos amostrados em cada praia foram considerados como uma única amostra para que cada classe de tamanho tenha no mínimo 20 indivíduos. Como a distribuição de tamanhos em cada amostra se aproxima da normal, as classes de tamanho extremas sempre apresentam menos indivíduos.

As diferenças nas frequências gênicas entre as classes foram quantificadas com o χ^2 do mesmo modo descrito para a estruturação entre os pontos amostrados. Os desvios das proporções genotípicas às esperadas por Hardy-Weinberg foram testados com o procedimento de “randomização” de Monte Carlo (Manly 1997). As heterozigosidades e os F_{IS} foram também correlacionados com as classes (após transformação arco-seno dos valores).

O tamanho dos indivíduos também foi correlacionado à heterozigosidade multiloco (MLH). Além disso, foi testada a aderência da distribuição de N_h (Número de locos heterozigotos por indivíduo) à normal para cada classe de tamanho estabelecida.

Programas de análise usados. A análise de desequilíbrio de ligação foi realizada no programa GENEPOP (Raymound e Russet 1995). As estimativas de deficiência de heterozigotos, os testes de Mantel, e as estimativas do F_{ST} foram realizadas no programa GENETIX v. 4.2 (Belkhir 2001). Os testes de randomização foram realizados no programa FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet 2002) e ARLEQUIN (Schneider 2000). O teste exato de Fisher para diferenciação populacional foi realizado no TFGPA (Miller 1997). As correlações e a ANOVA foram realizados no STATISTICA (StatSoft 1996).

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Coletas

Foram realizadas três coletas ao longo do tempo, simultaneamente nas duas praias. O número de indivíduos coletados por ponto em cada praia está na tabela 2.2. Alguns dos pontos extremos dos transectos apresentaram poucos indivíduos em algumas coletas.

Tabela 2.2: Número de indivíduos de *C. subrugosa* coletados em cada um dos pontos das duas praias estudadas em cada uma das três épocas de coleta.

	Pontos	Número de Indivíduos		
		11/2001	02/2002	05/2002
Itamanbuca	01	26	25	24
	02	30	30	28
	03	30	30	35
	04	35	30	25
	05	35	30	25
	06	32	35	33
	07	32	35	31
	08	0	35	31
Barequeçaba	01	35	22	30
	02	0	15	5
	03	35	35	35
	04	35	35	35
	05	35	35	35
	06	35	35	35
	07	35	35	35
	08	35	0	0
	09	35	0	0
	10	35	0	24
	11	35	30	10

2.4.2. A eletroforese das isozimas

Todos os locos estudados se apresentaram polimórficos como esperado. Apenas o Me-2 se apresentou monomórfico em algumas amostras. Ao longo da execução das eletroforeses, apenas a enzima PGM apresentou problemas de resolução na revelação. As frequências alélicas obtidas para cada loco em cada amostra estão apresentadas na tabela em anexo.

2.4.3. Desequilíbrio de ligação

Foram detectados desequilíbrios de ligação entre alguns dos locos analisados nas amostras (9 de 2734 testes). Os desequilíbrios se restringiram às amostras das duas primeiras coletas de Barequeçaba (tabela 2.3), especialmente à primeira, não ocorrendo desequilíbrio nas amostras de Itamambuca. Nenhuma das detectadas entre os locos se manteve ao longo do espaço e/ou tempo de coleta.

Tabela 2.3: Matriz de ligação entre os locos estudados. Acima da diagonal estão discriminadas as ligações detectadas entre locos nos pontos amostrados em Barequeçaba. O primeiro número que aparece nas células representa o número da coleta e o segundo número, entre parênteses, representa o número do ponto amostrado.

	Xdh	Tpi-1	Tpi-2	Pp	Lap-1	Lap-2	Me-1	Me-2	Sdh	Got-1	Got-2	Pgi	Pgm-1	Pgm-2	Idh-1	Idh-2
Xdh	-	1 (10)						2 (11)							2 (4)	
Tpi-1		-						1 (3)							1 (5)	
Tpi-2			-													
Pp				-				2 (2)								
Lap-1					-											
Lap-2						-										
Me-1							-									
Me-2								-	1 (9)					1 (9)		
Sdh									-							
Got-1										-						
Got-2											-				1 (7)	
Pgi												-				
Pgm-1													-			
Pgm-2														-		
Idh-1															-	
Idh-2																-

2.4.4. Variabilidade genética

2.4.4.1. Nas amostras de pontos

No espaço. As heterozigosidades esperadas (H_e – diversidade genética) foram altas nas amostras dos pontos (figura 2.4), com grandes variações ao longo do espaço e do tempo, apresentando, em geral, valores similares aos observados em amostras de diferentes praias (José e Solferini, submetido). A heterozigosidade observada apresentou valores menores que a esperada para os pontos, mas sua variação foi similar à esperada, com pequenas discrepâncias em alguns pontos (figura 2.4a e c).

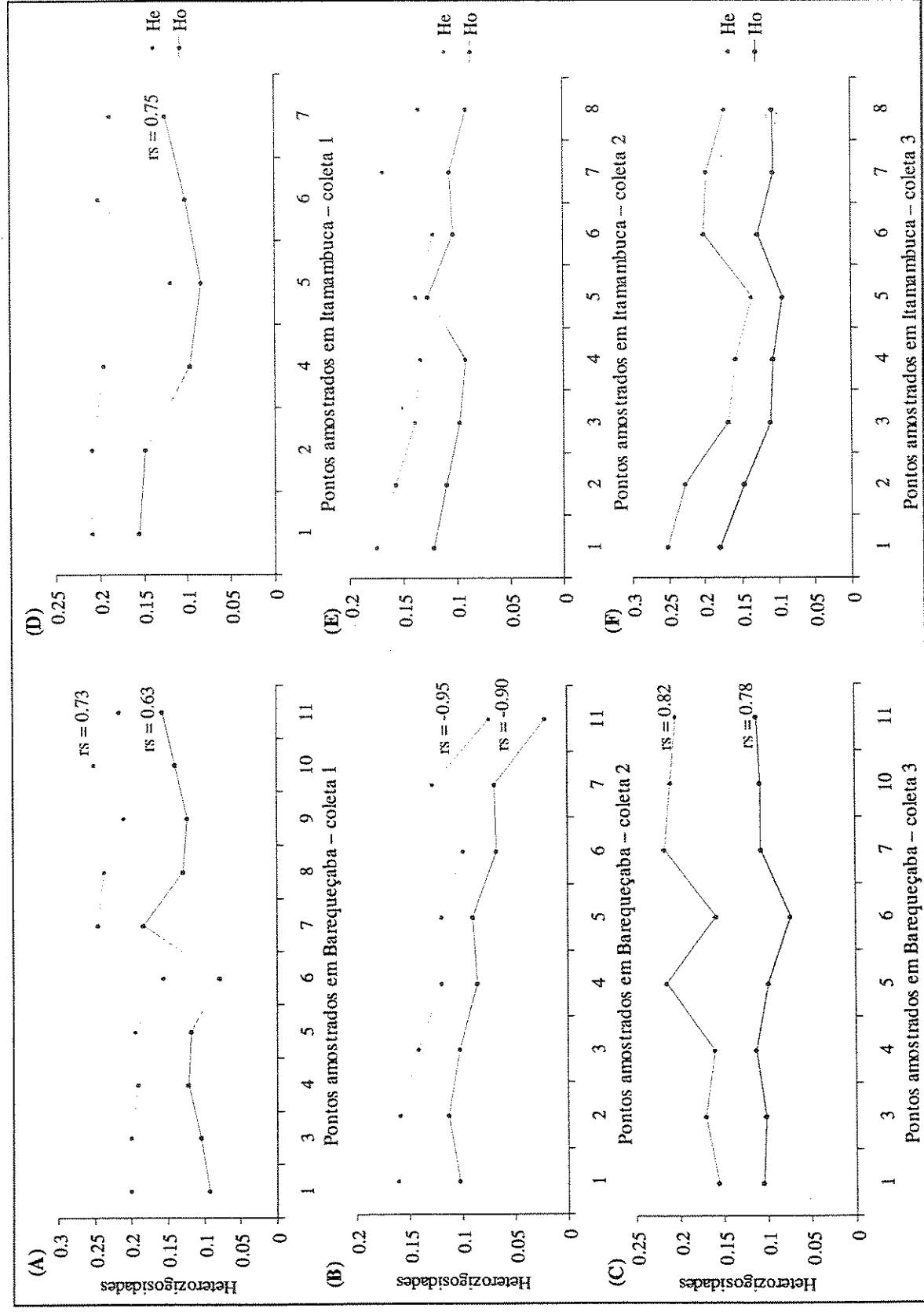


Figura 2.4: Variação dos valores de heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) ao longo do transecto de coleta para as amostras de Barequeçaba (A, B e C) e Itambuca (D, E e F). (A) e (D) correspondem à primeira coleta, (B) e (E) à segunda coleta e (C) e (F) à terceira coleta. Nas coletas onde houve correlação significativa das heterozigosidades com a distância, seu valor está apresentado no gráfico.

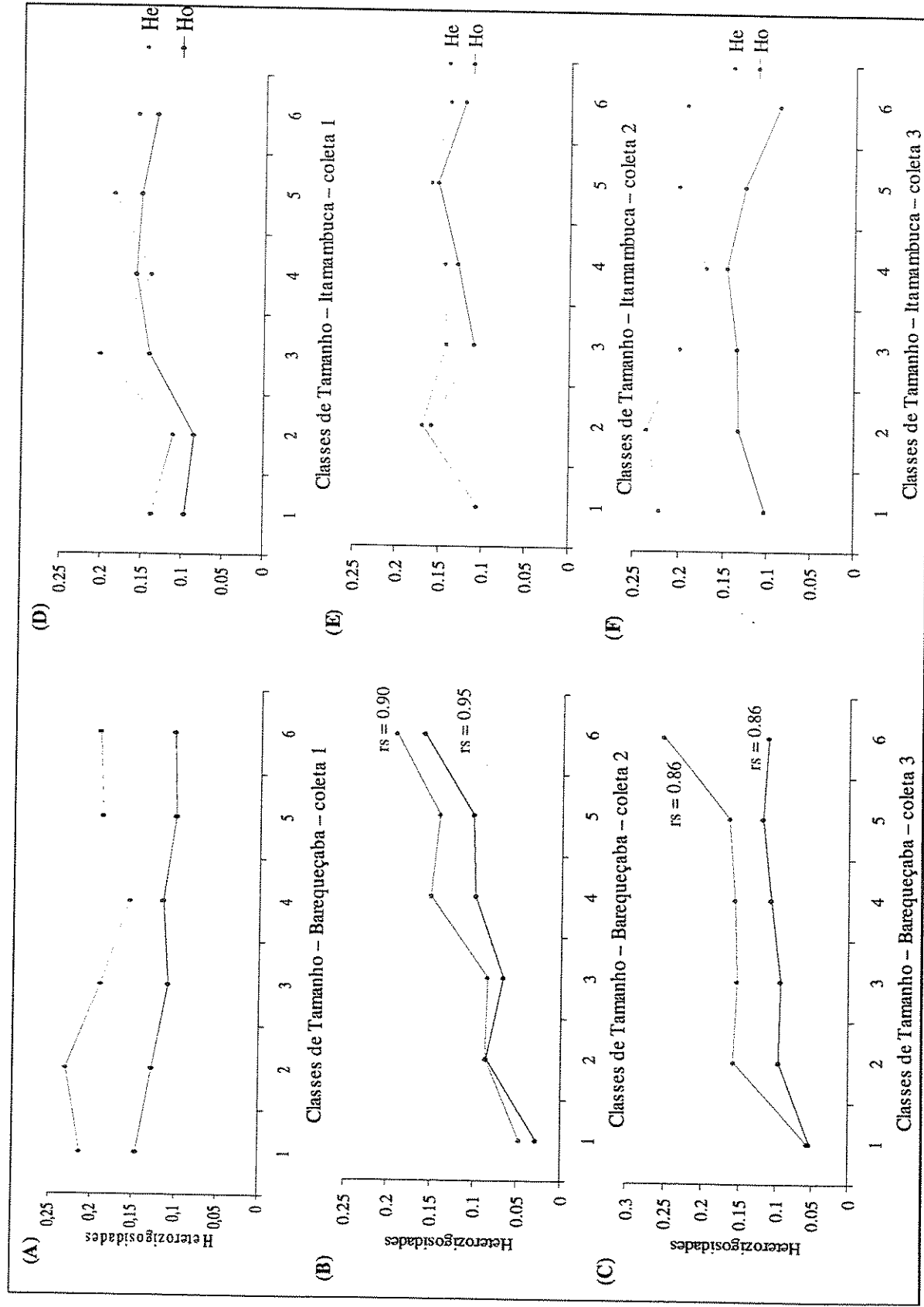


Figura 2.5: Variação dos valores de heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho) ao longo das classes de tamanho estabelecidas para as amostras de Barequeçaba (A, B e C) e Itamambuca (D, E e F). (A) e (D) correspondem à primeira coleta, (B) e (E) à segunda coleta e (C) e (F) à terceira coleta. Nas coletas onde houve correlação significativa das heterozigosidades com a distância, seu valor está apresentado no gráfico.

Em Barequeçaba as heterozigosidades apresentaram uma queda no ponto 6 do transecto, nas três épocas de coleta. Na segunda coleta também foi observada uma queda nos pontos 7 e 11 (figura 2.4b). Os valores de heterozigosidade apresentaram correlação com as distâncias no transecto nas três coletas, sendo que na primeira e na terceira coletas as correlações foram positivas e na segunda coleta a correlação foi negativa.

Em Itamambuca as heterozigosidades apresentaram sempre uma redução na diferença entre H_o e H_e no ponto 5 do transecto (figura 2.4). Nenhuma correlação foi detectada entre as heterozigosidades e a distância das amostras no transecto.

No tempo. A variação das heterozigosidades ao longo dos transectos estudados apresentou grande amplitude entre as coletas analisadas, chegando a ocorrer inversões de tendências, como entre as duas primeiras coletas de Barequeçaba (figura 2.4a e b), mas sem nenhum padrão direcional.

2.4.4.2. Nas classes de tamanho

As heterozigosidades esperadas (H_e - diversidade genética) também foram altas para todas as classes de tamanho (figura 2.5). A diferença entre a heterozigosidade observada e a esperada foi, em geral, menor que a dos pontos, mas variou bastante entre as coletas chegando a ocorrer uma classe com H_o maior que H_e (figura 2.5d).

Em Barequeçaba as heterozigosidades apresentaram uma correlação positiva com as classes de tamanho na segunda e terceira coletas. Em Itamambuca a heterozigosidade observada se correlacionou positivamente com as classes de tamanho na primeira coleta. Nessa coleta houve também uma inversão nas heterozigosidades na quarta classe de tamanho, o valor de H_o superou o de H_e , mas isso não resultou em um excesso de heterozigotos significativo.

Uma importante observação é que o padrão de variação da heterozigosidade ao longo do transecto parece acompanhar a variação de tamanho (figura 3.3 – capítulo 3). O tamanho do centróide médio está correlacionado positivamente com o H_o em todas 6 amostras estudadas e positivamente correlacionado

com o H_e para as duas primeiras coletas de Barequeçaba e para as coletas de Itamambuca (figura 2.6). A terceira coleta de Barequeçaba não apresentou correlação com o H_e .

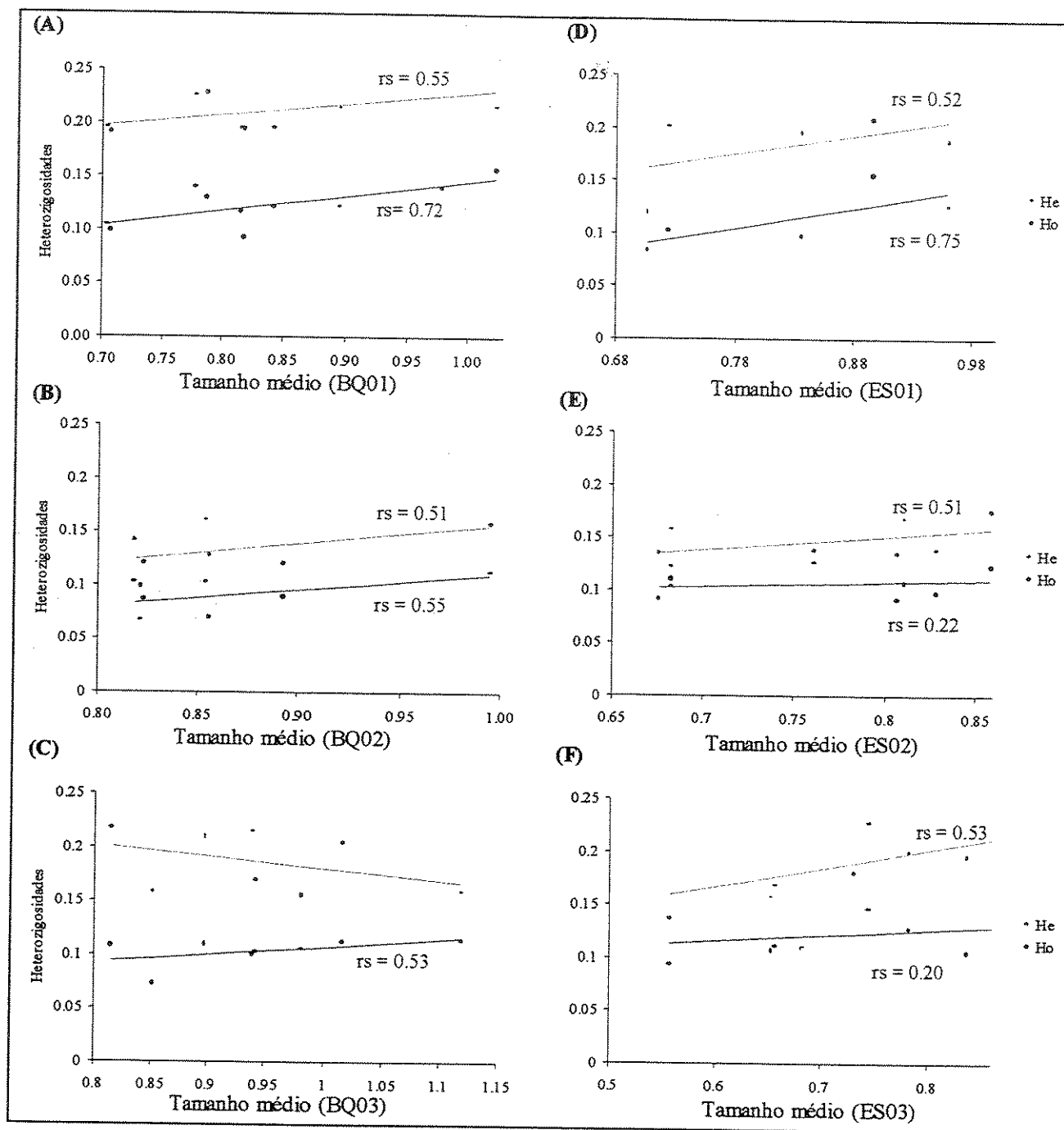


Figura 2.6: Representações gráficas das correlações dos valores de heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) com o tamanho médio da concha observado para cada ponto amostrado nas três coletas de Barequeçaba (A, B e C) e Itamambuca (D, E e F). (A) e (D) correspondem à primeira coleta, (B) e (E) à segunda coleta e (C) e (F) à terceira coleta. Nas coletas onde houve correlação significativa das heterozigosidades com a distância, seu valor está apresentado no gráfico. Nas coletas onde houve correlação significativa das heterozigosidades com a distância, seu valor está apresentado no gráfico.

2.4.5. A deficiência de heterozigotos

2.4.5.1. Nas amostras de pontos

No espaço. Apesar dos valores de F_{IS} obtidos terem sido altos para todos os pontos amostrados, poucos valores foram significativamente diferentes de zero quando testados (tabela 2.4). A primeira coleta de Barequeçaba e a terceira coleta de Itamambuca tiveram um maior número de valores de F_{IS} significativos e altos. No entanto, os valores significativos apareceram em muito menor quantidade do que foi observado juntando-se todos os pontos amostrados em cada coleta (tabela 2.7) e juntando-se todas as coletas de cada ponto (tabela 2.8).

Os valores de F_{IS} foram heterogêneos entre locos para muitos pontos amostrados em Itamambuca e para alguns pontos amostrados em Barequeçaba, nas três coletas. Alguns locos também apresentaram heterogeneidade de F_{IS} entre os pontos. No entanto, apesar da grande heterogeneidade de valores, nenhuma tendência pode ser associada a essas variações.

No tempo. Os poucos locos apresentaram deficiência de heterozigotos nesta escala temporal de amostragem e essas variaram entre os pontos entre as coletas. Nenhuma deficiência se manteve entre duas ou mais coletas. Algumas das heterogeneidades entre os valores de F_{IS} se mantiveram entre as coletas de cada praia (tabela 2.4 e 2.5). No entanto, não houve nenhuma tendência ou padrão na variação dos valores que se repetisse entre as coletas.

1.4.5.2. Nas classes de tamanho

O mesmo padrão observado na análise dos pontos se repetiu na análise das classes de tamanho. Os valores de F_{IS} observados foram altos, mas poucos foram significativamente diferentes de zero. Não houve diferença entre os valores das classes de tamanho. E, novamente, a primeira coleta de Barequeçaba e a terceira coleta de Itamambuca tiveram um maior número de valores de F_{IS} significativos e altos, mas em muito menor quantidade do que o observado ao juntar diferentes amostras (tabelas 2.7 e 2.8).

Tabela 2.4: Valores de F_{IS} obtidos para cada loco nos pontos amostrados em Barequeçaba. Os valores são homogêneos entre os locos de todos os pontos indicados com (*) e homogêneos entre os pontos para os locos indicados com: (¹) para a primeira coleta, (²) para a segunda coleta e (³) para a terceira coleta. As células marcadas (■) indicam desvio significativo às proporções esperadas por Hardy-Weinberg.

Barequegaba																		
coleta 1																		
Pontos	Xdh¹	Tpi-1	Tpi-2¹,³	Pp¹	Lap-1	Lap-2	Me-1	Me-2¹	Sdh	Got-1	Got-2¹,³	Pgi	Pgm-1	Pgm-2³	Idh-1	Idh-2¹,³	Média	
1*	0.018	0.842	0.723	0.477	0.272	0.109	0.424			0.009	0.731	0.108				1.000	0.428	
3*	0.792	0.722	0.065	0.791	0.422	0.241	0.250		0.000	0.000	0.446	0.039			0.000	0.040	0.293	
4*	0.542	0.626	0.000	0.663	0.151	0.456	0.477		0.000	1.000	0.420	0.168	0.077	0.020		0.055	0.333	
5*	0.335	0.661	0.009		0.626	0.249	0.541		0.018		0.013	0.144	0.393	0.600		0.663	0.354	
6*	1.000		1.000		0.335	0.321	0.226	0.077			0.794	0.377				0.059	0.465	
7*	0.521	0.000	0.476		0.532	0.276	0.146			0.000	0.741	0.122	0.250	0.429		0.000	0.291	
8*	0.543	1.000	0.451		0.408	0.460	0.259	0.658	0.000	0.000	0.846	0.326	0.360	0.141	0.000	0.000	0.430	
9*	0.643	1.000	0.633	0.000	0.450	0.254	0.358	0.000	0.352		0.851	0.215	0.352	0.360	0.013	0.043	0.368	
10*	0.786	0.805	0.483	0.282	0.027	0.458	0.639	0.000	0.000	0.483	0.488	0.025	0.176	0.359		0.662	0.378	
11*	0.842	0.640	0.038	0.663	0.317	0.324	0.169		0.018		0.470	0.131	0.324	0.214	0.000	0.025	0.298	
Média	0.602	0.700	0.388	0.479	0.354	0.315	0.349	0.184	0.055	0.415	0.580	0.166	0.276	0.303	0.003	0.255	0.339	
1*	0.661	0.788	1.000	0.022	0.127	0.181	0.211		0.022		0.530	0.019		0.730	0.000	0.008	0.331	
2		0.455		0.000	0.067	0.034	0.080		0.000		0.356	0.032		0.586		0.000	0.161	
3	1.000	0.000	0.015	0.030	0.133	0.030	0.132		0.000			0.473		0.268		0.041	0.193	
4	0.000		0.477	1.000	0.016	0.004	0.145		0.000	0.000	0.009	0.018			0.000	0.009	0.140	
5	1.000	1.000		1.000	0.061	0.182	0.144					0.022			0.000	0.011	0.380	
6*	1.000			0.024	0.057	0.451	0.319		0.024	0.000	0.640	0.027			0.000	0.036	0.258	
7*	1.000	1.000	0.379	0.000	0.149	0.389	0.706		0.007		0.488	0.138	0.037			0.000	0.358	
11						0.500											0.500	
Média	0.777	0.649	0.468	0.297	0.087	0.221	0.248		0.009	0.000	0.405	0.104	0.037	0.528	0.000	0.015	0.256	
coleta 3																		
1*	0.375		0.294	0.000	0.222	0.155	0.075	0.000			0.542	0.487		0.783		0.547	0.290	
3	0.521	0.614	0.000		0.367	0.331	0.318		0.000		0.661	0.048		0.000		0.013	0.287	
4*	0.394		0.330	0.034	0.008	0.063	0.275			0.000	0.844	0.083	0.000			0.017	0.171	
5*	0.631		0.848	0.017	0.037	0.500	0.246		0.485	0.000	0.733	0.018		0.505		0.850	0.406	
6*	0.780			1.000	0.082	0.379	0.236	0.000		1.000	0.791	0.018		0.658		0.018	0.451	
7	0.000			0.000	0.091	0.000	0.429		0.000		0.415	0.000		1.000	0.000		0.194	
10	0.332			0.012	0.003	0.000	0.237		0.000	0.000	0.402	0.000	0.000	0.000		0.034	0.146	
11	0.820				0.059	0.000	0.561		0.000	0.000	0.029	0.029	1.000	0.000		0.029	0.253	
Média	0.503	0.614	0.368	0.210	0.124	0.204	0.306	0.000	0.162	0.250	0.574	0.098	0.500	0.421	0.000	0.246	0.286	

Barequeçaba

Tabela 2.5: Valores de F_{IS} obtidos para cada loco nos pontos amostrados em Itamambuca. Os valores são homogêneos entre os locos de todos os pontos indicados com (*) e homogêneos entre os pontos para os locos indicados com: (¹) para a primeira coleta, (²) para a segunda coleta e (³) para a terceira coleta. As células marcadas (■) indicam desvio significativo às proporções esperadas por Hardy-Weinberg.

	Pontos	Xdh ²	Tpi-1	Tpi-2 ^{1,3}	Pp ¹	Lap-1	Lap-2	Me-1	Me-2	Sdh ³	Got-1 ³	Got-2	Pgi	Pgm-1	Pgm-2 ³	Idh-1	Idh-2 ¹	Média
Itamambuca	1*	0.371	0.000	1.000	0.546	0.367	0.358	0.203	0.203	0.043		0.159	0.508	0.033	0.070	0.650	0.331	
	2	0.546	0.600		0.000	0.207	0.414	0.223	0.223			0.288	0.038	0.134	0.451	0.017	0.265	
	4	0.346		0.030		0.200	0.655	0.412		0.000		0.000	0.202		1.000	0.346	0.319	
	5	0.479		0.022	0.000	0.068	0.090	0.198	0.000			0.000	0.332			0.040	0.123	
	6*	0.364		0.784		0.295	0.034	0.095		1.000		0.364	0.641			0.792	0.485	
	7	0.043		0.235		0.274	0.012	0.077		0.018			0.653	0.632		0.068	0.224	
	Média	0.358	0.300	0.414	0.182	0.235	0.261	0.201	0.000	0.265		0.162	0.396	0.266	0.507	0.319	0.276	
	1	0.479	0.442			0.301	0.125	0.258		0.000		0.228	0.058			0.035	0.214	
coleta 2	2			0.047	0.000	0.208	0.184	0.135	0.000		1.000	0.055	0.370			0.010	0.201	
	3	0.022		0.000		0.102	0.009	0.304	0.000			0.011	0.050	0.787		0.045	0.133	
	4	0.000		0.037	0.000	0.077	0.111	0.132			0.000	0.018	0.333	1.000				
	5	0.018		0.000	0.036	0.089	0.011	0.045	0.000			0.031	0.063	0.345		0.000	0.018	0.055
	6	0.659	0.000	0.000	0.230	0.049	0.011	0.086		0.000		0.058	0.031	0.481		0.018	0.135	
	7		0.374	0.360	0.000	0.061	0.243			0.000		0.379	0.084	0.422		0.024	0.195	
	8	0.662	0.011	1.000	0.281	0.140	0.070				0.000	0.367	0.060	0.084		0.011	0.244	
	Média	0.307	0.207	0.206	0.091	0.128	0.096	0.160	0.000	0.000	0.333	0.143	0.131	0.520	0.000	0.023	0.156	
coleta 3	1	0.440		0.651		0.310	0.187	0.125		0.030	0.659	0.034	0.158	0.319	0.416	0.030	0.280	
	2*	0.654		0.027		0.338	0.297	0.055	0.000	0.793		0.482	0.200	0.304	0.424	0.000	0.000	0.275
	3			0.000		0.143	0.321	0.201				0.385	0.045	0.462	0.128	0.000	0.376	0.206
	4			0.000		0.204	0.026	0.141	0.000			0.011	0.382	0.452	0.228	1.000	0.244	
	5					0.146	0.219	0.026		0.000		0.000	0.235	0.047	0.592	0.375	0.182	
	6					0.235	0.186	0.118	0.000	0.008	0.031	0.439	0.286	0.322	0.531	0.251	0.219	
	7*	0.780		0.469	0.664	0.138	0.135	0.341			0.000	0.022	0.190	0.472	0.807	0.019	0.336	
	8*	0.830		0.664	0.013	0.165	0.211	0.070		0.000	0.000	0.006	0.026	0.545	0.231	0.000	0.178	0.210
	Média	0.676		0.302	0.339	0.210	0.198	0.135	0.000	0.166	0.173	0.172	0.190	0.365	0.420	0.000	0.279	0.242

Tabela 2.6: Valores de F_{IS} obtidos para cada loco nas classes de tamanho definidas para a amostra de Barequegaba. Os valores são homogêneos entre os locos de todos os pontos indicados com (*) e homogêneos entre os pontos para os locos indicados com: (¹) para a primeira coleta, (²) para a segunda coleta e (³) para a terceira coleta. As células marcadas (■) indicam desvio significativo às proporções esperadas por Hardy-Weinberg.

	CT	Xdh ³	Tpi-1	Tpi-2 ^{1,2,3}	Pp ^{1,2,3}	Lap-1	Lap-2	Me-1	Me-2	Sdh	Got-1	Got-2 ^{1,2,3}	Pgi	Pgm-1	Pgm-2	Idh-1	Idh-2	Média
Barequegaba coleta 1	1	0.658	1.000	0.000	0.660	0.450	0.477	0.394	0.000	0.647	1.000	0.000	-0.103	-0.048	-0.123	-0.030	-0.015	0.350
	2*	0.787	0.895	0.382	0.795	0.296	0.245	0.427	0.000	0.000	0.489	0.731	0.204	0.240	0.673		0.177	0.460
	3*	0.638	0.849	0.794	0.000	0.513	0.529	0.361	0.000	-0.018	0.493	0.180	0.261	0.424	-0.024		-0.030	0.440
	4		1.000	0.477	0.000	0.295	0.109	0.241	0.000	0.000		0.000	-0.107	0.461	-0.021		-0.011	0.233
	5	0.626	1.000		0.000	0.532	0.218	0.500	0.000	0.000	0.651	0.839	0.000	0.258	0.316			0.492
	6	0.529	0.750			-0.143		0.774			1.000	0.500	-0.091	1.000			-0.032	0.526
Barequegaba coleta 2	1							0.625	0.000	0.000								0.481
	2					-0.053	0.059	-0.023	-0.023	-0.023	0.000	0.000	-0.086				-0.015	
	3	0.662	1.000	-0.008	0.000	-0.034	0.231	0.236		0.000	0.000	-0.044	-0.023				-0.021	0.236
	4*		0.642	0.657	0.657	-0.071	0.183	0.233		-0.004		0.654	0.234	0.000	0.632		-0.011	0.362
	5	1.000	0.465	-0.006	-0.025	0.003	0.080	0.143		-0.007	0.000	0.084	0.084	0.439			-0.021	0.298
	6	0.658	1.000	1.000	0.000	0.054	0.143	0.072		-0.012	-0.037	-0.055	0.000	0.000	-0.047		0.239	
Barequegaba coleta 3	1	-0.043						-0.125	0.000									-0.075
	2	1.000		0.000		-0.040	0.307	0.092			0.659	-0.102	1.000	0.640			0.659	0.434
	3*	0.718		0.788	0.492	0.099	0.206	0.373	0.000	0.000	0.493	0.475	0.046	0.647			0.366	0.402
	4*	0.369	0.000	0.333	-0.020	0.156	0.284	0.196	0.000	0.491	0.000	0.821	0.248	0.583			0.664	0.326
	5	0.541	0.647	-0.071	-0.021	0.288	0.106	0.216				0.648	-0.038	-0.020			0.487	0.305
	6	1.000	1.000	1.000		0.000	-0.154	0.524			0.451	0.000	1.000	0.500			-0.037	0.627
	Média	0.653	0.788	0.411	0.212	0.147	0.202	0.292	0.000	0.077	0.304	0.524	0.066	0.324	0.374	-0.039	0.155	0.340

Tabela 2.7: Valores de F_{IS} obtidos para cada loco nas classes de tamanho definidas para a amostra de Itamambuca. Os valores são homogêneos entre os locos de todos os pontos indicados com (*) e homogêneos entre os pontos para os locos indicados com: ⁽¹⁾ para a primeira coleta, ⁽²⁾ para a segunda coleta e ⁽³⁾ para a terceira coleta. As células marcadas (■) indicam desvio significativo às proporções esperadas por Hardy-Weinberg.

	CT	Xdh ²	Tpi-1 ²	Tpi-2 ^{2,3}	Pp ^{2,3}	Lap-1	Lap-2	Me-1	Me-2	Sdh	Got-1	Got-2	Pgi	Pgm-1	Pgm-2	Idh-1	Idh-2 ³	Média
Itamambuca coleta 1	1	0.661		0.476		0.261	-0.133	0.046		1.000		0.479	0.486				-0.027	0.271
	2	0.652		-0.015		0.111	0.196	0.176				-0.041	0.460				0.660	0.262
	3	0.088		0.642	-0.027	0.060	0.357	-0.118	0.000			0.000	0.529	1.000	0.500		-0.023	0.384
	4	-0.029				0.191	-0.217	-0.111						0.000	0.000		-0.047	-0.057
	5	0.000		-0.023		0.656	0.077	0.407		-0.048			0.333	0.000			-0.114	0.183
	6	0.326		-0.048		0.310	0.298	0.085				0.000	0.313				-0.023	0.198
Itamambuca coleta 2	1				0.000			-0.067		0.000		-0.091	0.625				-0.091	0.094
	2	0.484	-0.020	-0.011	-0.043	-0.006	-0.143	0.197		0.000		-0.011	-0.083	0.262			0.000	0.093
	3*	0.646	0.793	0.663	0.240	0.046	0.137	0.395	-0.008		0.000	0.417	0.083	-0.073			-0.026	0.232
	4*	-0.006	-0.078	0.484	0.664	0.013	0.032	0.015		0.000	0.000	0.021	0.040	0.785			-0.017	0.118
	5	0.000		-0.059	0.000	-0.111	0.080	-0.080		1.000	-0.043	0.000	0.000	0.500			-0.043	0.111
	6			0.000	0.000	0.000	-0.077	-0.116	0.000		0.000	0.000	0.762		-0.072		0.000	0.197
Itamambuca coleta 3	1					-0.100	0.656	0.328			0.000	0.000	0.261	0.000		-0.054	0.179	0.334
	2*	0.571		0.000		0.136	0.367	-0.024		0.664		0.241	0.226	0.409	0.533	-0.008	0.658	0.284
	3*	0.000		-0.028	0.665	0.320	0.321	0.116	0.000	0.392	0.386	-0.008	0.083	0.308	0.536		0.171	0.284
	4	0.650		0.489		0.060	0.171	0.085	0.000	-0.005	-0.006	0.302	0.204	0.457	0.309	0.000	-0.030	0.271
	5*	1.000		-0.023	0.000	0.342	-0.140	0.512	0.000		0.000		0.659	0.636	-0.105		0.781	0.469
	6	0.573		1.000	0.000	0.000	0.223	0.643					0.000	-0.053			0.000	0.359
	Média	0.514	0.690	0.321	0.185	0.141	0.165	0.217	-0.001	0.137	0.272	0.328	0.157	0.342	0.333	-0.025	0.124	0.282

Tabela 2.8: Valores de Fis obtidos para cada loco para as três amostras totais (três eventos de coleta) de Barequeçaba e Itamambuca. As células marcadas (■) indicam desvio significativo às proporções esperadas por Hardy-Weinberg.

Coleta	Barequeçaba			Itamambuca			Média
	1	2	3	1	2	3	
Xdh	0.614	0.829	0.583	0.438	0.410	0.691	0.594
Tpi-1	0.727	0.697	0.651	0.547	0.306		0.586
Tpi-2	0.434	0.449	0.478	0.396	0.228	0.425	0.402
Pp	0.534	0.268	0.207	0.433	0.163	0.397	0.334
Lap-1	0.359	-0.018	0.140	0.237	0.048	0.216	0.164
Lap-2	0.322	0.151	0.219	0.179	0.055	0.221	0.191
Me-1	0.354	0.198	0.260	0.149	0.152	0.095	0.201
Me-2	0.278		-0.002	0.000	-0.005	-0.004	0.053
Sdh	0.134	-0.021	0.326	0.204	-0.007	0.324	0.160
Got-1	0.565	-0.003	0.396		0.498	0.242	0.340
Got-2	0.605	0.474	0.641	0.241	0.159	0.286	0.401
Pgi	0.105	0.088	0.083	0.396	0.055	0.161	0.148
Pgm-1	0.235	-0.037	0.796	0.089	0.395	0.378	0.309
Pgm-2	0.357	0.520	0.567	0.250		0.431	0.425
Idh-1	-0.005	-0.005	0.000		0.000	-0.005	-0.003
Idh-2	0.169	-0.024	0.393	0.297	-0.030	0.247	0.175
Média	0.382	0.268	0.384	0.252	0.165	0.32	0.280

Tabela 2.9: Valores de Fis obtidos para cada loco para os pontos amostrados em Barequeçaba e Itamambuca unindo os três eventos de coleta como uma única. As células marcadas (■) indicam desvio significativo às proporções esperadas por Hardy-Weinberg.

Pontos	Barequeçaba							Itamambuca								Média
	1	2	3	5	6	7	11	1	2	3	4	5	6	7	8	
Xdh	0.532	0.436	0.692	0.379	0.849	0.570	0.839	0.420	0.527	-0.022	0.299	0.315	0.474	0.558	0.784	0.510
Tpi-1	0.793	0.640	0.631	0.822		0.650	0.642	0.372	0.634				0.000	0.374	-0.011	0.504
Tpi-2	0.656	0.360	0.080	0.638	1.000	0.458	-0.025	0.796	-0.023	-0.006	-0.040	-0.014	0.655	0.355	0.796	0.379
Pp	0.495	0.489	0.559	0.228	-0.008	0.493	0.664	0.561	-0.004		0.000	-0.018	0.243	0.495	0.218	0.315
Lap-1	0.353	0.095	0.297	0.131	0.172	0.277	0.244	0.328	0.224	0.126	0.161	0.011	0.176	0.116	0.153	0.191
Lap-2	0.177	0.211	0.279	0.140	0.375	0.305	0.243	0.239	0.312	0.176	0.140	0.004	0.053	0.117	0.136	0.194
Me-1	0.318	0.295	0.238	0.203	0.230	0.462	0.117	0.170	0.146	0.257	0.077	0.048	0.031	0.235	0.070	0.193
Me-2				0.000	-0.013				-0.003	0.000	0.000	-0.004	0.000			-0.003
Sdh	0.316	-0.006	-0.004	-0.014	-0.010	-0.013	-0.012	-0.041	0.798		0.000	0.000	0.388	-0.010	0.000	0.099
Got-1	0.000	0.496	0.000	-0.003	0.665	0.000	0.000	0.665	1.000		0.000		-0.009	0.000	-0.008	0.216
Got-2	0.585	0.531	0.522	0.601	0.734	0.562	0.337	0.134	0.278	0.322	-0.022	-0.021	0.302	0.299	0.264	0.362
Pgi	0.095	0.113	0.108	0.143	0.136	0.017	-0.106	0.142	0.116	-0.055	0.314	0.167	0.328	0.264	-0.044	0.116
Pgm-1	0.393	-0.056				-0.105	0.547	0.153	0.288	0.550	0.560	0.165	0.372	0.480	0.227	0.298
Pgm-2	0.560	-0.017	0.270	0.752	0.660	0.580	0.246	0.216	0.320	0.128	0.395	0.592	0.531	0.307	0.231	0.418
Idh-1	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000		-0.004	0.000		0.000			0.000	0.000
Idh-2	0.655	-0.033	-0.045	0.532	-0.045	-0.004	-0.028	0.273	0.177	0.184	0.558	0.119	0.404	-0.038	0.145	0.190
Média	0.397	0.277	0.327	0.375	0.376	0.368	0.306	0.239	0.302	0.217	0.258	0.167	0.270	0.344	0.231	0.297

Algumas classes de tamanho também apresentaram heterogeneidade de F_{IS} entre locos e alguns dos locos apresentaram heterogeneidade entre as classes, nas duas praias estudadas (tabela 2.6 e 2.7). No entanto, nenhuma relação foi detectada na variação dos valores de F_{IS} dos diferentes locos.

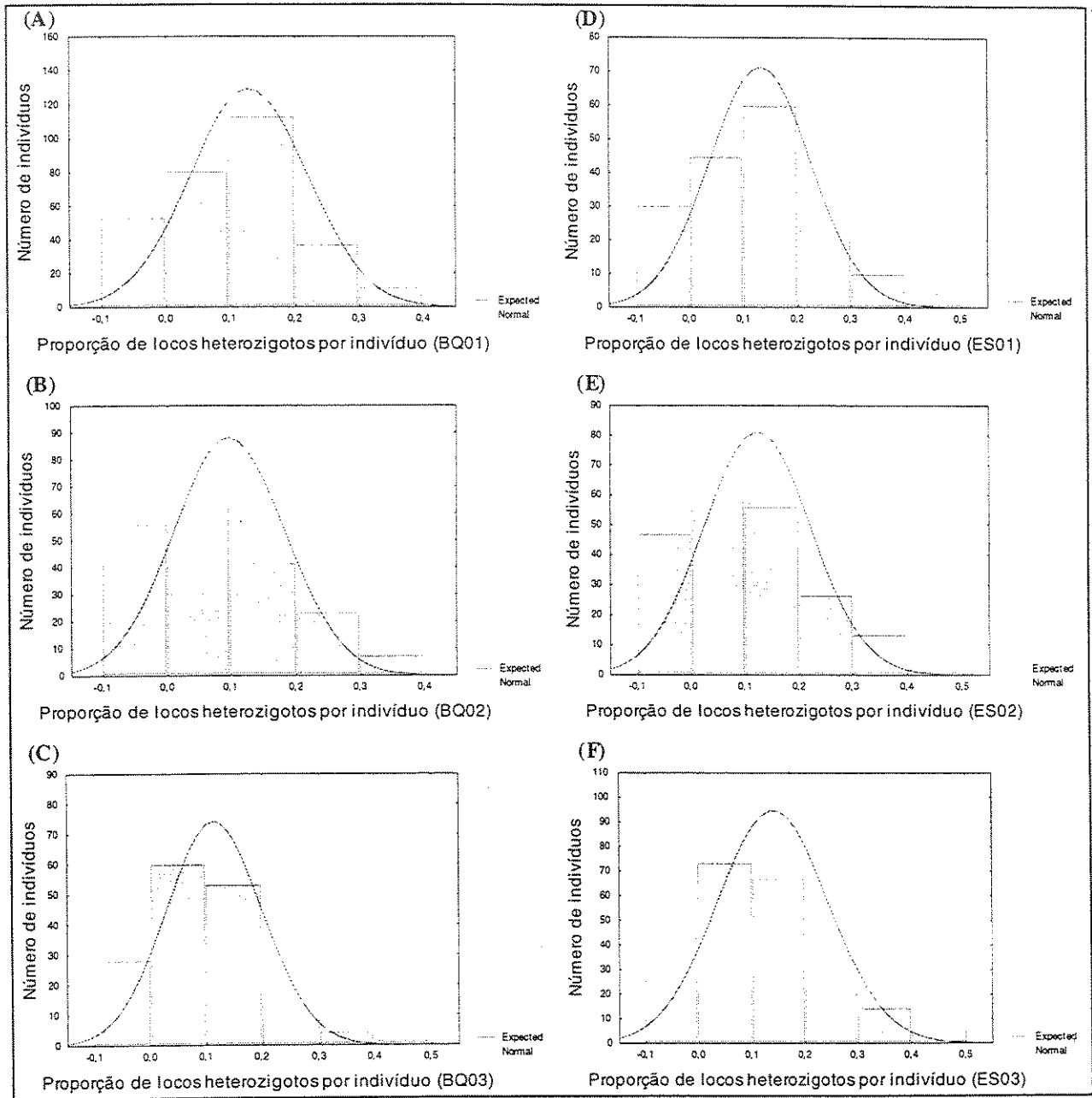


Figura 2.7: Distribuição do número de locos heterozigotos por indivíduo de *C. subrugosa* na amostra total de (A) Barequeçaba – primeira coleta, (B) Barequeçaba – segunda coleta, (C) Barequeçaba – terceira coleta, (D) Itamambuca – primeira coleta, (E) Itamambuca – segunda coleta e (F) Itamambuca – terceira coleta.

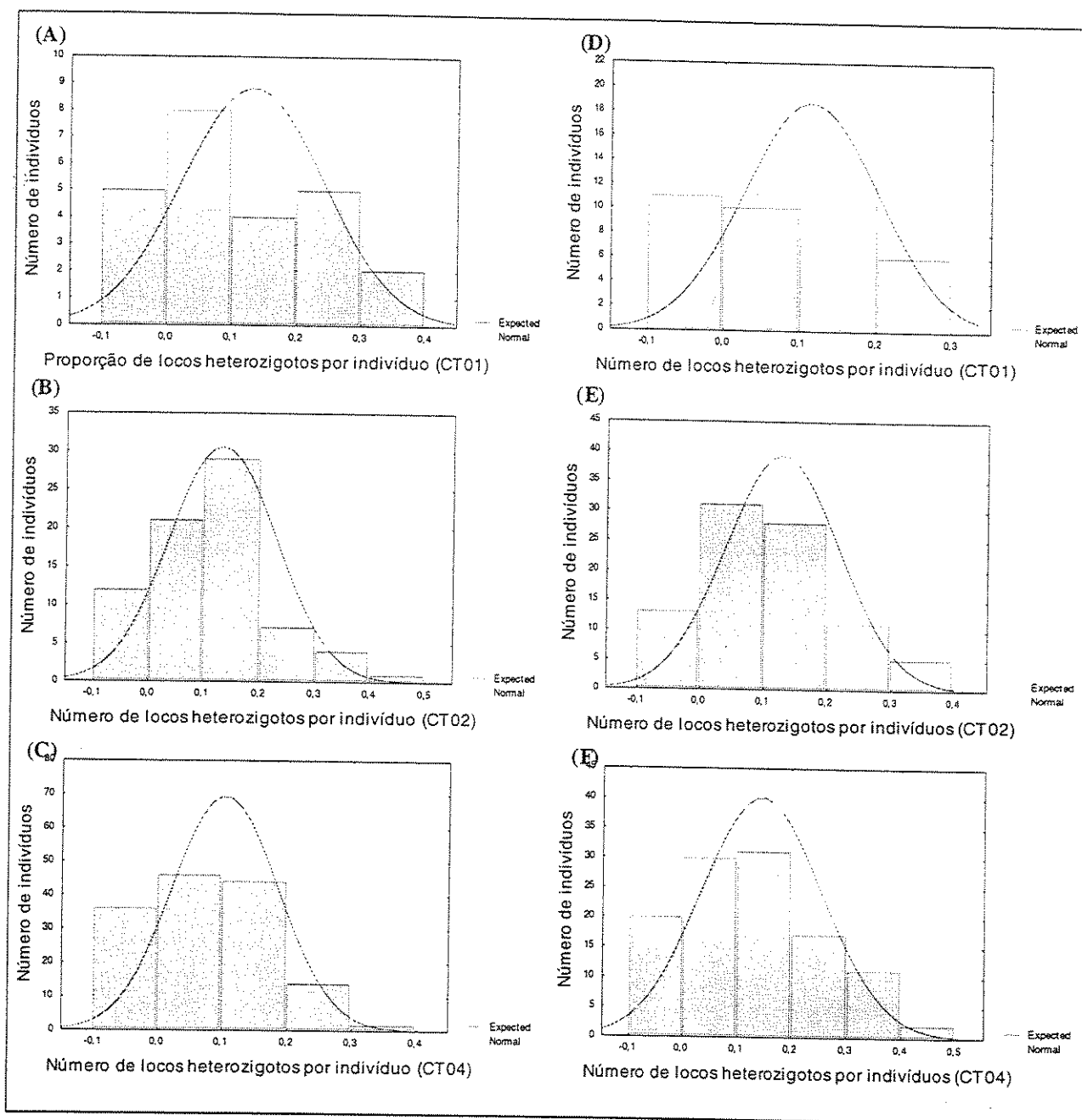


Figura 2.8: Distribuição do número de locos heterozigotos por indivíduo de *C. subrugosa* nas classes de tamanho da amostra total de (A) Barequeçaba – primeira coleta, (B) Barequeçaba – segunda coleta, (C) Barequeçaba – terceira coleta, (D) Itamambuca – primeira coleta, (E) Itamambuca – segunda coleta e (F) Itamambuca – terceira coleta. Apenas as classes com distribuição que desviou da normal estão apresentadas.

Desvios na heterozigosidade multiloco (MLH). O número de locos heterozigotos por indivíduo variou de 0 a 6, e portanto, as proporções de Nh (número de locos heterozigotos pelo total de locos) variaram de 0 a 0.375. A distribuição de Nh desviou significativamente da normal em direção a um menor

número de locos heterozigotos por indivíduo, tanto para os pontos quanto para as classes de tamanho (figura 2.7 e 1.8). Nenhuma amostra de Itamambuca apresentou correlação entre o Nh e o tamanho dos indivíduos (figura 2.9). Apenas amostra da segunda coleta de Barequeçaba apresentou essa correlação, mas, ainda assim, com um coeficiente baixo (r de apenas 0,19 – figura 2.9b). Não foram detectadas correlações entre Nh e o tamanho considerando os indivíduos de cada classe de tamanho separadamente.

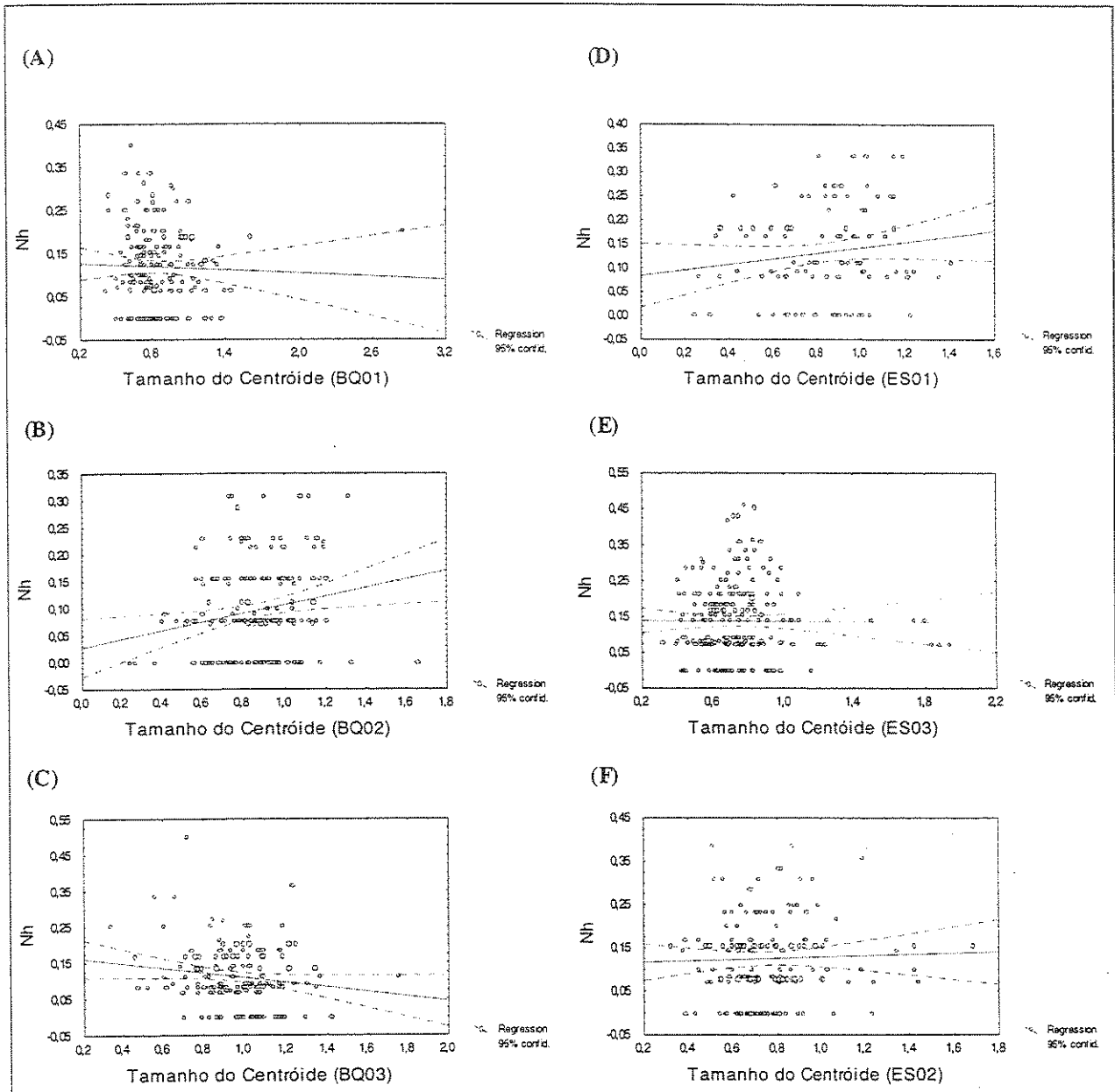


Figura 2.9: Correlação entre o tamanho do centróide e o número de locos heterozigotos por indivíduo (Nh) de *C. subrugosa* na amostra total de (A) Barequeçaba – primeira coleta, (B) Barequeçaba – segunda coleta, (C) Barequeçaba – terceira coleta, (D) Itamambuca – primeira coleta, (E) Itamambuca – segunda coleta e (F) Itamambuca – terceira coleta.

2.4.6. Estruturação entre os pontos

2.4.6.1. Nos pontos amostrados

No espaço. No cálculo par a par do F_{ST} considerando todos os pontos e classes de tamanho das duas praias, alguns valores foram significativos (tabela 2.8). Muitos valores de F_{ST} foram significativamente diferentes de zero apesar de baixos entre pontos da primeira coleta de Barequeçaba. Entre os pontos da segunda coleta de Barequeçaba nenhum F_{ST} foi significativamente diferente de zero e da terceira coleta apenas um valor foi significativo, mas também baixo (tabela 2.8). Entre os pontos das coletas de Itamambuca apenas um valor de F_{ST} foi significativamente diferente de zero, na primeira coleta (tabela 2.8). Em nenhuma das três coletas das duas praias observamos relação entre os valores de F_{ST} e a distância dos pontos no transecto no teste de Mantel.

No tempo. Em Barequeçaba, poucos valores de F_{ST} foram significativamente diferentes de zero entre a primeira e a segunda coleta, mas muitos valores foram significativos e alguns maiores que 0.05 (que podem ser considerados altos) entre a primeira e a terceira coleta. Isso mostra uma maior diferenciação dos pontos em um maior intervalo de tempo (tabela 2.8 e figura 2.10a, b e c). Nessa praia a maior diferenciação ao longo das coletas parece ter sido entre as duas grandes áreas descritas no ítem 2.3.1, antes e depois do ponto 6 do transecto.

O maior número de valores de F_{IS} significativamente diferentes de zero ocorreu entre a segunda e a terceira coletas de Itamambuca, principalmente em relação ao ponto 8 da terceira coleta. Mas, os valores observados em Itamambuca foram, em geral, menores que em Barequeçaba (tabela 2.8 e figura 2.10d). Essa diferenciação temporal entre os pontos parece não seguir nenhum padrão espacial, ou seja, um dado ponto de uma coleta não apresentou menor ou maior estruturação em relação a suas réplicas temporais do que em relação aos outros pontos (figura 2.10).

Comparando Barequeçaba com Itamambuca temos que a primeira e a terceira coletas das duas praias apresentaram maior diferenciação que a segunda. Em especial, a terceira coleta foi a que apresentou

mais valores de F_{ST} significativamente diferentes de zero e também os valores mais altos (figura 2.11a e b). A primeira e terceira coletas das duas praias também apresentaram maior diferenciação (figura 1.11a) do que a primeira com a segunda, e a segunda com a terceira (figura 2.11a, b e c). E essa diferenciação foi novamente maior em relação ao ponto 8 da terceira coleta de Itamambuca.

As amostras totais das três coletas de Barequeçaba e Itamambuca se diferenciaram significativamente nos testes exatos de Fisher. A diferenciação apareceu tanto entre as amostras de uma mesma praia quanto entre as amostras de uma praia comparada com as da outra.

2.6.4.2. Nas classes de tamanho

No cálculo par a par do F_{ST} considerando as classes de tamanho, poucos valores de F_{ST} significativamente diferentes de zero foram detectados entre classes de uma mesma coleta. Apenas dois valores foram significativos entre as classes da primeira coleta apenas 1 da segunda coleta de Barequeçaba (tabela 2.9 e figura 2.12a). Em Itamambuca apenas um valor de F_{ST} significativamente diferente de zero foi encontrado na primeira coleta, um valor especialmente alto, entre as classes 4 e 6.

Entre classes de diferentes coletas, alguns valores foram significativos e muitos maiores que 0,05 (tabela 2.9). Em Barequeçaba, um maior número de valores de F_{ST} significativamente diferentes de zero apareceu entre a segunda coleta e as demais, enquanto entre a primeira e a terceira coletas a diferenciação foi menor (figura 2.12a). A maior parte da diferenciação da segunda coleta em relação às outras foi gerada pela quarta classe de tamanho da mesma. Em Itamambuca, houve um maior número de valores de F_{ST} significativos entre a segunda e a terceira coletas, mas os valores mais altos detectados ficaram entre a primeira e a terceira (figura 2.12b). Esses altos valores foram gerados principalmente pela classe 6 da primeira coleta e pela classe 5 da terceira. A diferenciação temporal entre as classes de tamanho não obedeceu nenhum padrão direcional em relação à ordenação das classes.

Comparando Barequeçaba e Itamambuca para cada coleta, a classe de tamanho 6 da primeira coleta de Itamambuca apresentou valores significativos e altos em relação às cinco primeiras classes da primeira coleta de Barequeçaba (figura 2.13a). Na segunda coleta, apenas a classe 2 de Barequeçaba se

Tabela 2.8: Matriz de F_{ST} entre os pontos de todas as coletas das duas praias estudadas. As células marcadas

		Barequeçaba - coleta 1										Barequeçaba - coleta 2										Barequeçaba - coleta 3									
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	11	1	3	4	5	6	7	10	11					
Barequeçaba coleta 1	1	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.06	0.00	0.00	0.01	0.03	0.00	0.01	0.00	0.03					
	3		0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.00	0.03	0.00	0.01	0.02	0.04	0.00	0.01	0.01	0.02					
	4			0.01	0.01	0.06	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.07	0.02	0.00	0.02	0.03	0.01	0.00	0.00	0.01					
	5				0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.05	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00					
	6					0.02	0.00	0.00	0.03	0.01	0.02	0.00	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.10	0.02	0.01	0.04	0.06	0.01	0.01	0.00	0.04					
	7						0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.07	0.02	0.00	0.04	0.07	0.07	0.05	0.03	0.01	0.00	0.04					
	8							0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.00	0.07	0.00	0.01	0.02	0.03	0.00	0.01	0.01	0.01					
	9									0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.07	0.01	0.01	0.02	0.03	0.00	0.01	0.01	0.00				
	10										0.00	0.01	0.01	0.01	0.03	0.02	0.03	0.02	0.06	0.03	0.00	0.03	0.02	0.00	0.00	0.01	0.01				
	11											0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.00	0.07	0.02	0.00	0.02	0.03	0.00	0.01	0.00	0.01				
	Barequeçaba coleta 2	1												0.02	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.04	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.03	0.00	0.02			
2														0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.08	0.02	0.00	0.04	0.03	0.00	0.03	0.01	0.04				
3															0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.03	0.03	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02				
4																0.01	0.00	0.00	0.06	0.01	0.00	0.02	0.04	0.00	0.02	0.01	0.04				
5																	0.01	0.01	0.00	0.03	0.01	0.05	0.07	0.00	0.03	0.01	0.04				
6																		0.00	0.06	0.01	0.02	0.01	0.03	0.02	0.01	0.01	0.03				
7																			0.04	0.01	0.00	0.02	0.05	0.00	0.00	0.00	0.03				
11																				0.04	0.11	0.06	0.06	0.08	0.00	0.00	0.10				
Barequeçaba coleta 3	1																			0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.03					
	3																				0.01	0.02	0.01	0.02	0.00	0.01					
	4																					0.01	0.00	0.02	0.00	0.01					
	5																						0.01	0.00	0.02	0.00	0.01				
	6																							0.01	0.02	0.00	0.03				
	7																								0.01	0.00	0.00				
	10																									0.00	0.02				
	11																										0.00				
Itamambuca coleta 1	1																														
	2																														
	4																														
	5																														
	6																														
	7																														
	7																														
Itamambuca coleta 2	1																														
	2																														
	3																														
	4																														
	5																														
	6																														
	7																														
	8																														
Itamambuca coleta 3	1																														
	2																														
	3																														
	4																														
	5																														
	6																														
	7																														

(*) correspondem aos valores significativamente diferentes de zero.

		Itamambuca - Coleta 1							Itamambuca - Coleta 2								Itamambuca - Coleta 3							
		1	2	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	
Barequeçaba coleta 1	1	0.01	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.04	
	3	0.03	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01	0.03	
	4	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.02	0.02	0.00	0.01	0.02	
	5	0.00	0.00	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	
	6	0.02	0.03	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.02	0.01	0.02	0.04	
	7	0.03	0.02	0.02	0.03	0.00	0.01	0.02	0.01	0.04	0.01	0.01	0.03	0.01	0.03	0.01	0.01	0.03	0.03	0.06	0.02	0.01	0.05	
	8	0.02	0.01	0.00	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00	0.00	0.02	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	0.03	
	9	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00	0.02	0.02	0.00	0.00	0.02	
	10	0.02	0.01	0.00	0.03	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.00	0.03	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	
	11	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00	
	Barequeçaba coleta 2	1	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.03	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02
2		0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.03	0.02	0.00	0.01	0.04	
3		0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.03	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	
4		0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.00	0.02	0.00	0.01	0.02	0.04	
5		0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.03	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.04	
6		0.01	0.03	0.00	0.00	0.01	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.00	0.03	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	
7		0.03	0.01	0.00	0.00	0.02	0.02	0.00	0.01	0.00	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.03	
11		0.07	0.02	0.04	0.03	0.10	0.07	0.02	0.10	0.06	0.07	0.03	0.04	0.04	0.02	0.02	0.08	0.04	0.00	0.04	0.05	0.06	0.06	
Barequeçaba coleta 3	1	0.03	0.04	0.00	0.02	0.00	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01	0.03	
	3	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.03	0.03	0.04	0.00	0.01	0.03	0.00	0.01	0.00	0.00	
	4	0.02	0.04	0.01	0.02	0.00	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.02	0.01	0.04	0.01	0.03	0.04	0.02	0.02	0.01	0.02	
	5	0.01	0.03	0.00	0.03	0.01	0.03	0.02	0.03	0.02	0.04	0.04	0.05	0.02	0.00	0.03	0.00	0.04	0.05	0.02	0.02	0.02	0.03	
	6	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	
	7	0.02	0.00	0.03	0.01	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	
	10	0.00	0.01	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.02	0.01	0.03	0.01	0.03	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	
	11	0.00	0.01	0.00	0.04	0.01	0.01	0.02	0.00	0.02	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	
Itamambuca coleta 1	1		0.02	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01	0.00	0.00	0.03	
	2			0.01	0.03	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	
	4				0.00	0.01	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	
	5					0.01	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	
	6						0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.02	0.01	0.00	0.00	0.02	
	7							0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01	
	8																							
Itamambuca coleta 2	1								0.01	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.03	
	2									0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01	0.01	
	3										0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	
	4											0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	
	5												0.01	0.01	0.02	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.03	
	6													0.00	0.01	0.03	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	
	7														0.00	0.03	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.03	0.06	
	8															0.03	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.03	
Itamambuca coleta 3	1																0.00	0.00	0.01	0.03	0.00	0.00	0.01	
	2																	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	
	3																		0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	
	4																			0.00	0.00	0.00	0.02	
	5																				0.00	0.01	0.01	
	6																					0.00	0.00	
	7																						0.02	

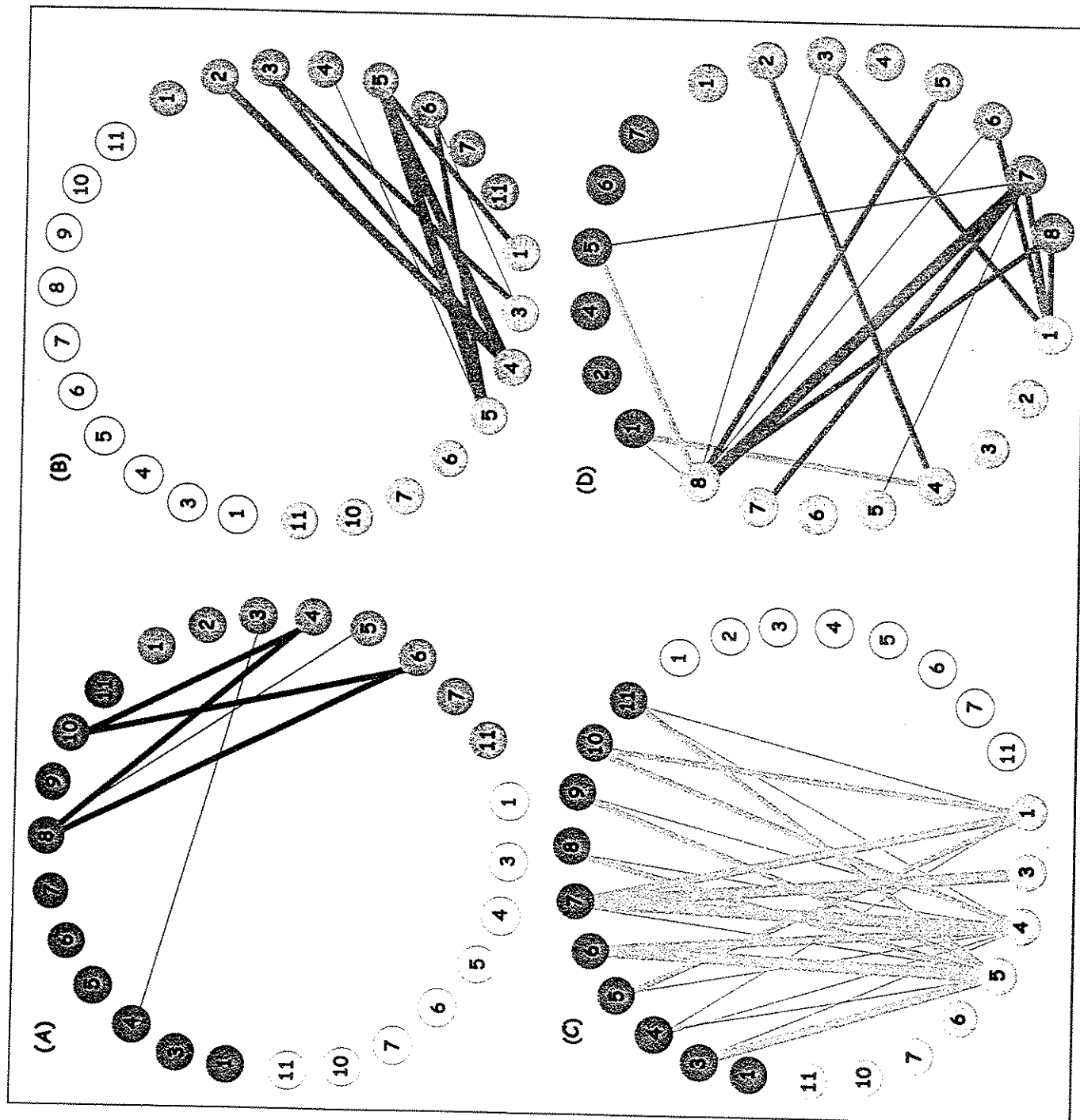


Figura 2.10. F_{ST} par a par entre os pontos amostrados nas três coletas de (A, B e C) Barequeçaba e (D) Itamambuca. Os pontos em círculos rosa (■) correspondem à primeira coleta, em azul (■) correspondem à segunda coleta e em verde (■) correspondem à terceira coleta. As linhas representam o F_{ST} pareado, significativamente diferente de zero (ver matriz da tabela 2.6), entre os pontos correspondentes. As espessuras da linha indicam o valor do F_{ST} , de modo que:

— 0.02
 — 0.03
 — 0.04 – 0.05
 — 0.06 – 0.07

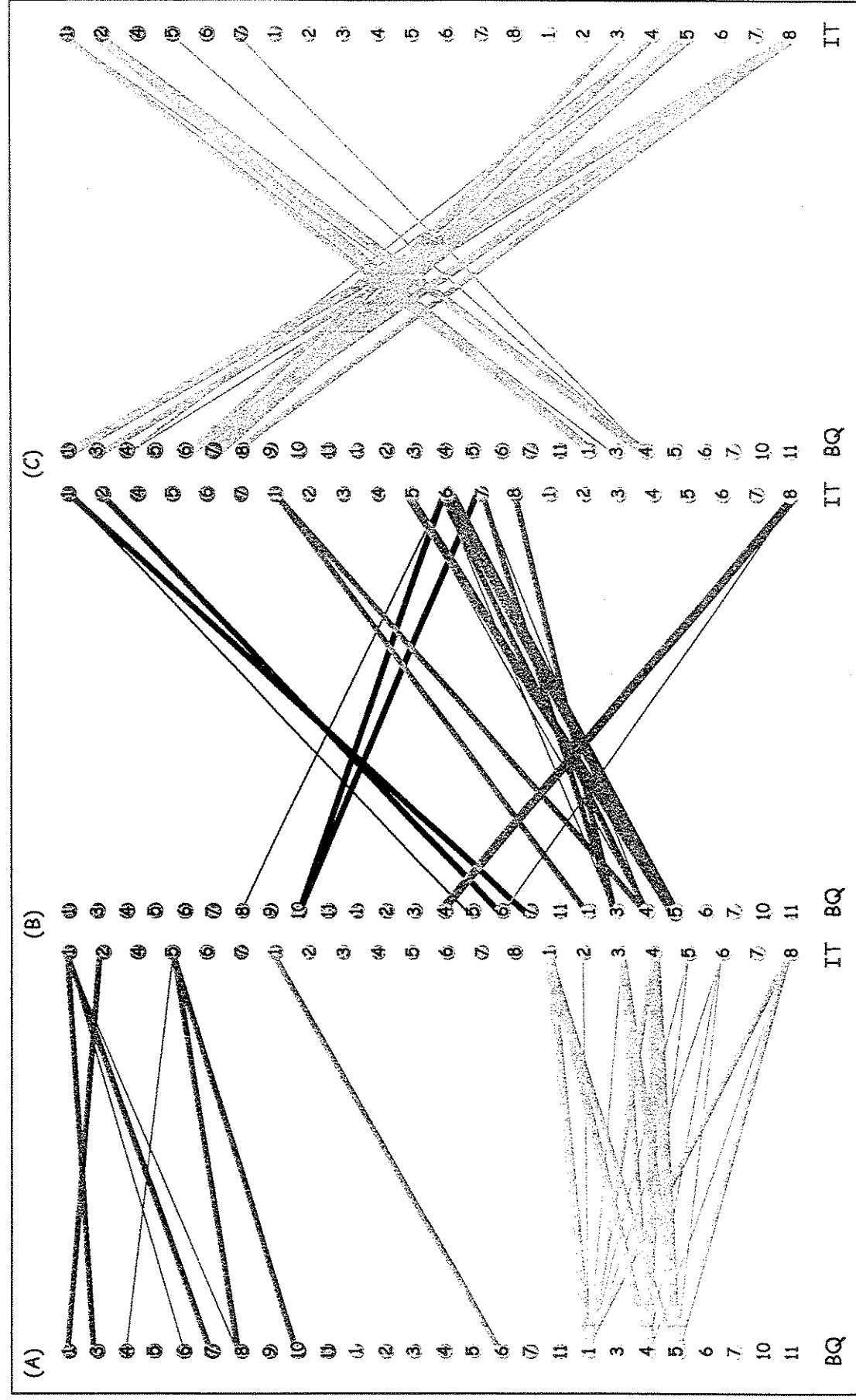
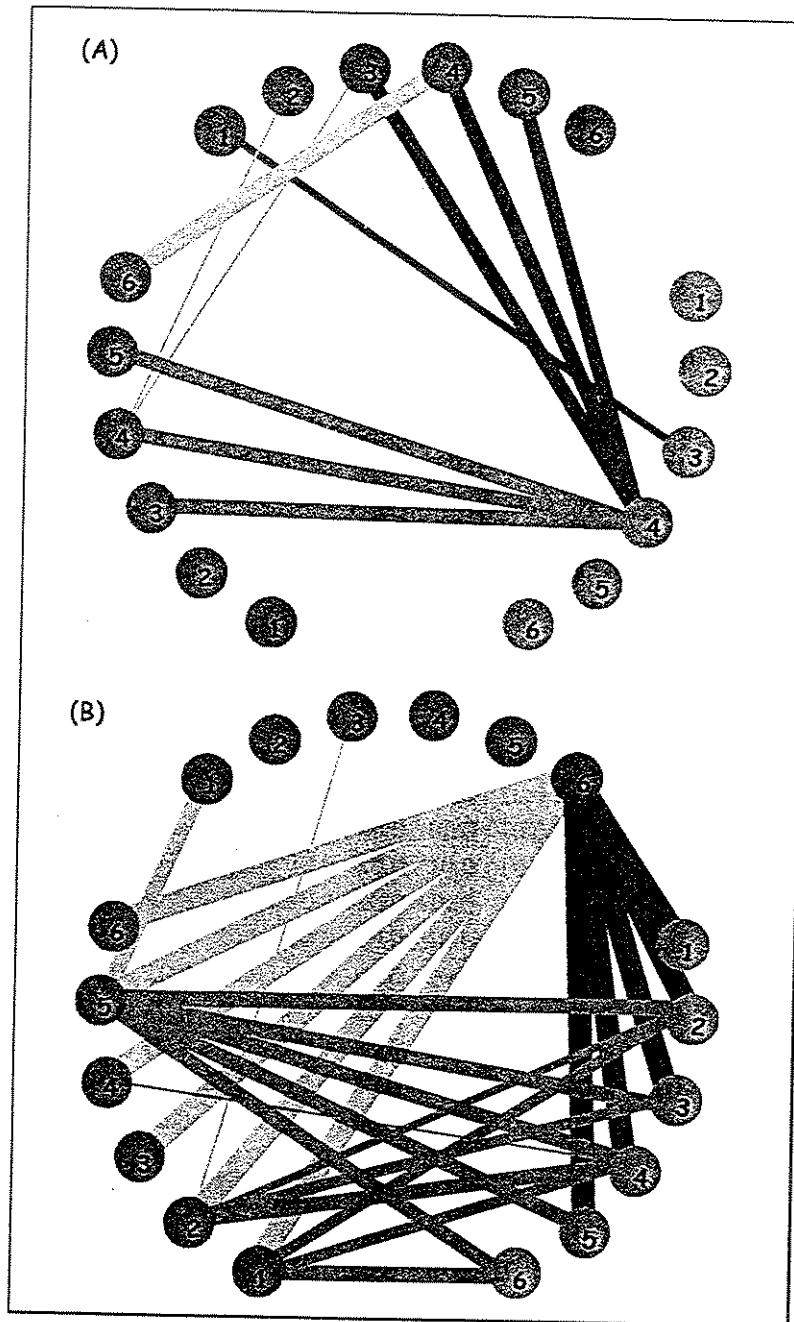


Figura 2.11. F_{ST} par a par entre os pontos amostrados em Barequeçaba e Itamambuca, nas três coletas. Em (A) estão os valores de F_{ST} entre os pontos da mesma época de coleta, em (B) entre os pontos de coletas consecutivas e em (C) entre a primeira e terceira coleta. Os pontos em círculo rosa (■) correspondem à primeira coleta, em azul (■) correspondem à segunda coleta e em verde (■) correspondem à terceira coleta. As linhas representam o F_{ST} significativamente diferente de zero (ver matriz da tabela 2.6), entre o par de pontos correspondente, e a espessura da linha indicam o valor do F_{ST} , como indicado na figura 2.10.

praias estudadas. As células marcadas (*) correspondem aos valores significativamente diferentes de zero.

		Itamambuca - coleta 1						Itamambuca - coleta 2						Itamambuca - coleta 3					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Barequeçaba coleta 1	1	0.02	0.03	0.00	0.02	0.03	0.17	0.02	0.01	0.00	0.00	0.02	0.01	0.03	0.02	0.01	0.00	0.04	0.02
	2	0.02	0.05	0.02	0.01	0.02	0.14	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.03	0.00	0.00	0.05	0.01
	3	0.01	0.05	0.02	0.01	0.02	0.13	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01	0.00	0.05	0.02
	4	0.01	0.06	0.00	0.01	0.01	0.22	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.01	0.05	0.00	0.01	0.08	0.05
	5	0.00	0.04	0.02	0.00	0.00	0.18	0.01	0.03	0.01	0.01	0.02	0.00	0.02	0.01	0.01	0.00	0.04	0.01
	6	0.01	0.05	0.01	0.01	0.03	0.12	0.04	0.04	0.06	0.07	0.04	0.04	0.05	0.05	0.01	0.01	0.03	0.04
Barequeçaba coleta 2	1	0.03	0.03	0.14	0.04	0.05	0.02	0.02	0.08	0.05	0.07	0.10	0.18	0.01	0.03	0.07	0.07	0.00	0.01
	2	0.00	0.00	0.01	0.03	0.01	0.05	0.02	0.04	0.02	0.00	0.01	0.02	0.02	0.04	0.02	0.01	0.09	0.03
	3	0.00	0.01	0.03	0.03	0.03	0.40	0.00	0.02	0.00	0.00	0.02	0.01	0.02	0.03	0.01	0.00	0.09	0.03
	4	0.04	0.02	0.03	0.01	0.02	0.26	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.06	0.09	0.03	0.06	0.13	0.12
	5	0.03	0.03	0.14	0.03	0.02	0.04	0.00	0.04	0.03	0.05	0.08	0.12	0.05	0.01	0.04	0.05	0.02	0.01
	6	0.02	0.05	0.02	0.04	0.01	0.17	0.00	0.01	0.00	0.00	0.02	0.02	0.04	0.01	0.03	0.02	0.03	0.02
Barequeçaba coleta 3	1	0.01	0.01	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01	0.03	0.01	0.00	0.02	0.00	0.01	0.02	0.05	0.03
	2	0.02	0.11	0.03	0.03	0.04	0.14	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.04	0.04	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04
	3	0.02	0.02	0.03	0.02	0.00	0.27	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.05	0.02	0.02	0.00	0.04	0.01
	4	0.02	0.02	0.04	0.01	0.01	0.27	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02	0.01	0.06	0.02
	5	0.02	0.01	0.04	0.01	0.01	0.28	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.03	0.02	0.02	0.01	0.05	0.02
	6	0.02	0.10	0.01	0.02	0.02	0.03	0.05	0.06	0.11	0.09	0.02	0.00	0.00	0.03	0.02	0.00	0.04	0.03
Itamambuca coleta 1	1		0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.04	0.01	0.03	0.02	0.06	0.02
	2			0.15	0.03	0.04	0.01	0.01	0.05	0.03	0.05	0.09	0.13	0.06	0.04	0.06	0.07	0.00	0.00
	3				0.00	0.03	0.04	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.01	0.02	0.01	0.02	0.00	0.04
	4					0.02	0.21	0.06	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.02	0.01	0.04	0.05
	5						0.21	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	0.01	0.03	0.01	0.02	0.04	0.02
	6							0.33	0.18	0.28	0.29	0.19	0.06	0.25	0.16	0.13	0.13	0.16	0.27
Itamambuca coleta 2	1								0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00	0.04	0.01	0.00	0.08	0.06
	2									0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.03	0.00	0.01	0.07	0.05
	3										0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.00	0.01	0.08	0.03
	4											0.01	0.02	0.00	0.05	0.00	0.02	0.10	0.04
	5												0.04	0.00	0.02	0.02	0.01	0.06	0.02
	6													0.05	0.05	0.01	0.00	0.08	0.05
Itamambuca coleta 3	1														0.05	0.00	0.05	0.07	0.05
	2															0.03	0.00	0.01	0.02
	3																0.00	0.05	0.03
	4																	0.02	0.01
	5																		0.02



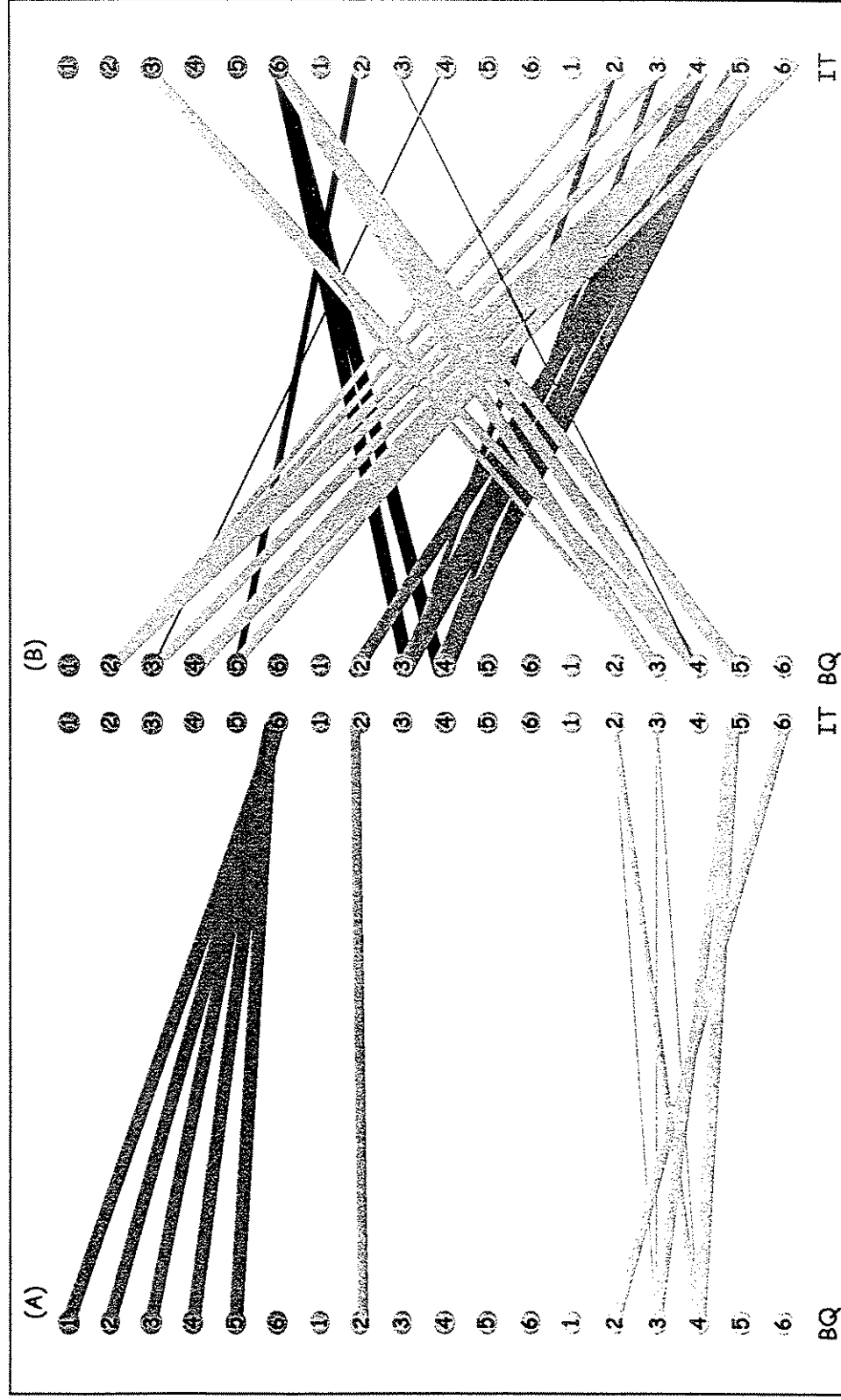


Figura 2.13. F_{ST} par a par entre as classes de tamanho estabelecidas para as amostras de Barequegaba e Itambuca, nas três coletas. Em (A) estão os valores de F_{ST} entre os pontos da mesma época de coleta, em (B) entre os pontos de diferentes épocas de coleta. Os pontos em círculos rosa (■) correspondem à primeira coleta, em azul (■) correspondem à segunda coleta e em verde (■) correspondem à terceira coleta. As linhas representam o F_{ST} significativamente diferente de zero (ver matriz da tabela 2.7), entre o par de pontos correspondente, e a espessura da linha indicam o valor do F_{ST} como indicado na figura 2.12.

2.5. DISCUSSÃO

2.5.1. Distribuição da Variabilidade Genética

As correlações entre as heterozigosidades com a distância dos pontos no transecto (figura 2.4) e com as classes de tamanho em algumas amostras (figura 2.5) parecem ser, na verdade, correlações secundárias. Nesse caso, a correlação primária é, provavelmente, com o tamanho médio dos indivíduos de cada amostra (figura 2.6) já que essa apresentou maior coeficiente e menores resíduos. Desse modo, a correlação de H_o e H_e com a distância entre os pontos na segunda coleta de Barequeçaba, seria produto da co-ocorrência de: i) um gradiente de tamanho dos indivíduos de *Collisella subrugosa* ao longo do costão, e ii) uma correlação das heterozigosidades com o tamanho dos indivíduos que compunham cada amostra. O mesmo se aplicaria às correlações das heterozigosidades com as classes de tamanho.

Uma hipótese que poderia explicar a correlação das heterozigosidades com o tamanho médio dos indivíduos seria a de heterose. Muitos trabalhos relataram heterose em moluscos marinhos, especialmente em bivalves do gênero *Mytilus* (Koehn et al. 1973, Zouros et al. 1980, Koehn e Gaffney 1984, Singh e Green 1984, Zouros e Foltz 1987, Gaffney et al. 1990, Naciri-Grawen et al. 2000, Myrand et al. 2002). Em gastrópodes há um relato de heterose no neogastrópode *Stramonita haemastoma* (Garton 1984). No entanto, nas amostras de *C. subrugosa* não foi detectada correlação entre o N_h e o tamanho, a não ser na segunda coleta de Barequeçaba, o que será discutido no item 2.5.3.. Desse modo, não há nenhuma evidência de que possa estar havendo algum grau de heterose relacionada às isozimas estudadas.

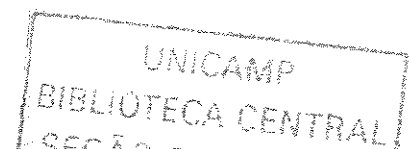
A correlação das heterozigosidades com o tamanho médio dos indivíduos pode estar ocorrendo como resultado de um processo de acúmulo de gerações associado à variação temporal das frequências gênicas (ver item 2.5.2.). Se cada evento de recrutamento envolver uma amostra aleatória de larvas, não representativa de toda a variabilidade genética do pool gênico das larvas no plâncton, quanto mais gerações acumuladas em um grupo de indivíduos maior seria a variabilidade desse grupo. Nesse caso, temos que pressupor: i) que o tamanho dos indivíduos de um mesmo costão tenha relação com sua idade, ii) que quanto maiores os indivíduos de um grupo, mais gerações estariam acumuladas no mesmo, e iii) que o número de indivíduos recrutando a cada intervalo de tempo é muito pequeno. Em relação ao

primeiro pressuposto é possível que exista uma pequena variância associada à relação entre tamanho e idade. Entretanto, o uso do tamanho do centróide como medida de tamanho deve minimizar essa variância já que toda a concha é considerada e não apenas uma única medida dessa, como o comprimento. Em relação ao segundo pressuposto, é realmente plausível inferir que quanto maiores os indivíduos, maior a variância associada a idade desses indivíduos. Em relação ao terceiro pressuposto, é plausível pensar que o número de indivíduos que encontram condições de recrutamento (principalmente espaço livre) no costão é muito pequeno em relação à população de larvas no plâncton. Desse modo, as poucas larvas que recrutam em cada intervalo de tempo não devem ser representativas do pool gênico local. Vale ressaltar que o “intervalo de tempo” de recrutamento não é definido, sendo considerado apenas um corte temporal no recrutamento contínuo da espécie. Nesse caso, o “intervalo de tempo” está sendo considerado como o menor intervalo necessário para o recrutamento de mais de um indivíduo apenas para ilustrar a hipótese. Esse intervalo poderá ser definido *a posteriori* a partir da construção de um modelo matemático dessa hipótese.

Um outro ponto importante no que se refere à distribuição da variabilidade genética no espaço microgeográfico do costão é que, se a quantidade de variabilidade depende do tamanho dos indivíduos amostrados, a distribuição dessa variabilidade no espaço dependerá da distribuição espacial de tamanhos dos indivíduos (o que será descrito no capítulo 3). Especialmente em Barequeçaba, encontramos um importante fator de estruturação de tamanhos ao longo do transecto horizontal do costão, que é a presença de ostras, usadas como substrato pelos indivíduos menores de *C. subrugosa* (José et al. em preparação).

2.5.2. Estruturação no espaço e no tempo

A variação temporal parece maior do que a espacial para o período de tempo amostrado já que os níveis de estruturação foram maiores entre pontos de diferentes coletas do que entre os de uma mesma coleta, e a estruturação detectada entre coletas das duas praias foi menor do que entre coletas da mesma praia (tabelas 2.8 e 2.9). A pequena estruturação espacial detectada pode ser consequência direta da variação temporal nas frequências gênicas, pois nem todos os pontos amostrados devem receber novos



recrutas em todos os intervalos de tempo de recrutamento. Bryant (1976) já havia alertado que em qualquer situação de multihabitats, a variação temporal também se expressaria espacialmente, acentuando o efeito da variação espacial. Além disso, não foi detectado padrão espacial na variação dos valores de F_{ST} entre os pontos das diferentes coletas, o que sugere que o recrutamento não deve ocorrer com preferência de sítio ou de microhabitat no costão.

Em Itamambuca a magnitude dos valores de F_{ST} entre pontos de diferentes coletas foi, em geral, menor que de Barequeçaba (tabela 2.8 e figura 2.11). Entretanto, ao contrário de Barequeçaba, os maiores valores de F_{ST} em Itamambuca estão entre os pontos da segunda e terceira coletas, o que pode ter sido resultado da ausência do ponto 8 em sua primeira coleta, pois este ponto gerou grande parte dos valores de F_{ST} significativamente diferentes de zero nas outras duas coletas (figura 2.11).

Na análise das classes de tamanho a magnitude dos valores de F_{ST} também foi maior entre as classes de diferentes coletas do que entre aquelas de uma mesma coleta. Os altos valores de F_{ST} (maiores que 0.1) encontrados entre as classes de tamanho de diferentes coletas podem ser resultado do agrupamento de indivíduos de diferentes pontos em cada uma delas, com um efeito amplificado pela variação temporal detectada entre os pontos.

Esse padrão de diferenciação entre as classes de tamanho reflete mais uma vez a variação temporal nas frequências gênicas e sugere que o tempo de desenvolvimento de um recruta até adulto deve ser menor do que três meses, o intervalo de tempo entre as coletas. Isso porque, se o tempo de desenvolvimento fosse igual ou maior que três meses, esperaríamos que a diferenciação entre as classes de tamanho de uma coleta fosse semelhante à diferenciação entre as coletas. O pressuposto dessa hipótese é de que os processos que geram essa diferenciação o fazem de modo gradual ao longo das gerações ou coortes.

Um outro importante fato foi o de que o grau de estruturação detectado entre os pontos das diferentes coletas não foi correspondido pelas classes de tamanho nas duas praias estudadas. Enquanto em Barequeçaba a estruturação entre os pontos foi muito alta e a entre as classes de tamanho um pouco

menor, em Itamambuca observou-se o padrão inverso. Essa diferença pode resultar de diferenças entre as praias, mas não pode ser explicado com os dados obtidos.

Uma variação temporal nas frequências gênicas também foi observada em algumas espécies de bivalves como *Mytilus edulis* (Gardner e Palmer 1998), *Mytilus galloprovincialis* (Krava et al. 2000) e *Ruditapes decussatus* (Borsa et al. 1991). Essa variação temporal nas frequências gênicas poderia resultar de processos seletivos direcionais ou até mesmo cíclicos, ou apenas de um acúmulo de erros de amostragem entre as gerações de recrutas. Entre os processos seletivos que poderiam estar envolvidos com essa estruturação no tempo estão: i) a seleção de gametas ou fecundação preferencial, ii) a seleção de microhabitat pelas larvas e iii) a seleção de indivíduos jovens ou adultos através das interações bióticas ou físicas no ambiente da zona entremarés.

A seleção de gametas ou fertilização preferencial é um fenômeno amplamente estudado em espécies de ouriço-do-mar (Palumbi 1994), mas pouco investigado em moluscos. Longwell e Stiles (1973) observaram fertilização preferencial na ostra *Crassostrea virginica* tendendo ao cruzamento heterogamético, o que não poderia gerar deficiência de heterozigotos, e sim, o contrário.

A seleção de microhabitat no momento do recrutamento resultaria também em estruturação no espaço e em algum tipo de padrão espacial na estruturação temporal entre os pontos e, por isso, é uma hipótese comumente usada em trabalhos que detectaram estruturação no espaço microgeográfico. Em *Mytilus edulis* muitos trabalhos apresentaram evidências de seleção natural associada a gradientes de salinidade sobre um loco da enzima LAP (Milkman e Beaty 1970, Koehn et al. 1976, Singh e Green 1984, Raymond et al. 1997, Gardner e Palmer 1998). Esses trabalhos apontam para a existência de um ciclo anual de seleção ao longo do gradiente de salinidade. Outros trabalhos, também com bivalves, atribuem à seleção de microhabitat a diferenciação observada nas frequências gênicas e genotípicas (Zouros e Foltz 1984, Beaumont et al. 1983, Borsa et al. 1991, Foltz e Hu 1996, de la Rosa-Velez et al. 2000).

Em alguns gastrópodes também foi relatada a diferenciação nas frequências genotípicas entre diferentes ambientes em pequena escala espacial (Kartavtsev et al. 2000). Grande parte dos trabalhos que investigaram variações gênicas e genotípicas de micro-escala em gastrópodes está centrada na família

Littorinidae. Johannesson et al. (1995) apresentaram forte evidência de seleção natural com um alto coeficiente de seleção para o loco da enzima AAT em *Littorina saxatilis* resultando em estruturação microgeográfica. Johannesson e Tatarenkov (1997) tentaram separar os efeitos de microhabitat na diferenciação daqueles macrogeográficos associados ao fluxo gênico nessa mesma espécie, e à variação habitat-específica foi a dominante. Posteriormente, Tatarenkov e Johannesson (1998) identificaram uma maior taxa de crescimento dos caramujos em ambientes expostos, e também, pequenas diferenças nas taxas de crescimento para alelos da Pgi e Pgm-2. Em 1999, Tatarenkov e Johannesson (1999) observaram variações muito altas nas frequências genotípicas de um loco da enzima ARK entre diferentes microhabitats (exposto e abrigado) reforçando a idéia de que a seleção natural está determinando a variação nas frequências alélicas e genotípicas nesse loco.

Entretanto, Johson e Black (1998), também isolando os efeitos de microhabitat dos macrogeográficos na diferenciação das frequências alélicas de locos isoenzimáticos em populações de um outro littorínídeo *Bembicium viltatum*, tiveram evidências de que a diferenciação gerada pela estruturação macrogeográfica seria o maior determinante da divergência nas frequências alélicas das alozimas estudadas, em detrimento da seleção localizada em microhabitats.

A seleção dos jovens e/ou adultos pode estar também relacionada aos padrões de diferenciação observados no loco da enzima LAP em *Mytilus edulis* (Singh e Green 1984, Gardner e Palmer 1998) e foi considerada como um importante fator na variação temporal das frequências alélicas e genotípicas de alguns locos analisados para *Mytilus galloprovincialis* (Krava et al. 2000).

Novamente, devemos considerar que dificilmente um fator físico ou biológico geraria variação temporal nas frequências alélicas por seleção, sem uma variação espacial associada, já que esses fatores são tão variáveis no espaço da zona entremarés quanto são no tempo. No presente estudo, a estruturação espacial detectada foi muito pequena. E o mais importante é que tanto a variação espacial quanto a temporal não se acentuaram em nenhum loco específico, sugerindo que não há nenhuma pressão seletiva importante como explicação do padrão observado.

Consideramos que uma hipótese mais plausível para explicar a variação temporal envolve eventos estocásticos gerando “erros de amostragem” entre as gerações de recrutas. Uma variação temporal nas frequências gênicas poderia resultar de duas fontes de “erro”: i) nem todos os adultos se reproduzem ao mesmo tempo, e, haverá um viés nas frequências gênicas das larvas a cada geração se o número de adultos reprodutivos a cada tempo for menor que o necessário para que não haja desvios ao acaso nas frequências gênicas; ii) nem todas as larvas recrutam a cada intervalo de tempo, e assim, haverá de novo um viés nas frequências gênicas se o número de larvas recrutando a cada tempo for menor que o necessário para que não haja desvios ao acaso nessas frequências da amostra de larvas. A partir dessas fontes de “erro” o processo que levaria à deficiência de heterozigotos seria o acúmulo de gerações nas subpopulações locais, do mesmo modo hipotetizado para a variabilidade genética (ítem 2.5.1).

Das duas fontes de “erro” descritas para amostragem das frequências alélicas entre as gerações, a segunda parece ser a mais plausível. A variação no número de adultos que se reproduzem em cada intervalo de tempo deve ocorrer, mas adultos de diferentes costões ao longo de todo o litoral devem contribuir para o pool gênico das larvas (como descrito no trabalho do capítulo 1), reduzindo a chance de ocorrerem “erros de amostragem”. Do mesmo modo, as larvas podem permanecer muito tempo no plâncton. Até mesmo larvas de eventos reprodutivos mais recentes podem acabar recrutando antes de larvas formadas em eventos reprodutivos mais antigos minimizando a primeira fonte de erro descrita acima.

A hipótese apresentada pressupõe que o recrutamento de larvas não seria um evento sincronizado e discreto no tempo. Gaffney et al. (1990) discutiram que essa assincronia deveria gerar três padrões: i) diferenciação nas frequências gênicas entre as classes de tamanho, ii) as classes de tamanho intermediárias devem apresentar os maiores F_{IS} , pois devem compreender mais coortes e iii) seria esperado que classes adjacentes fossem mais similares que as não adjacentes, considerando que o tamanho reflete a coorte de origem. Embora os autores não tenham colocado claramente, esses seriam pré-requisitos caso a variação nas frequências alélicas entre as gerações ou coortes fossem direcionais, resultantes de uma força seletiva. Considerando variações aleatórias nas frequências alélicas por “erros de amostragem”, entre as gerações

ou coortes, não poderíamos esperar nem diferenciação entre todas as classes de tamanho, nem que classes adjacentes fossem mais similares que as não adjacentes, apenas que a classe de tamanho que acumulasse um maior número de coortes tivesse o maior F_{IS} .

Nas amostras de *C. subrugosa* analisadas neste trabalho, nenhuma das classes de tamanho tiveram valores de F_{IS} significativamente maiores que as outras, principalmente porque poucos valores de F_{IS} foram, de fato, significativamente diferentes de zero. No entanto, em nosso trabalho anterior com uma amostragem macrogeográfica (capítulo 1 - José e Solferini submetido) as classes de tamanho 3 e 4 (intermediárias) foram as que apresentaram maiores deficiências de heterozigotos, conforme o esperado.

2.5.3. A deficiência de heterozigotos nesse trabalho

A grande redução na magnitude da deficiência de heterozigotos observada quando a testamos para cada ponto amostrado em relação a quando juntamos os pontos mostra que mesmo a pequena diferenciação observada no espaço é suficiente para gerar a grande deficiência observada em macro-escala, como em nosso trabalho anterior (capítulo 1 - José e Solferini submetido). Essa redução na deficiência de heterozigotos seria, então, um efeito da variação espacial resultante de: i) uma variação temporal, ii) um recrutamento não sincronizado e iii) um recrutamento não homogêneo no espaço do costão. Na análise das classes de tamanho, a deficiência de heterozigotos também foi menor que a observada com a junção de pontos, já que os indivíduos que compunham as classes também vieram de uma coleta em micro-escala, mais detalhada.

A redução na deficiência de heterozigotos também está de acordo com a idéia de que a seleção natural, balanceada no espaço ou de microhabitat, não é um importante fator na formação de um padrão de deficiência de heterozigotos. Muitos trabalhos atribuem a deficiência de heterozigotos observada à variação microgeográfica ou temporal gerada por seleção natural (Singh e Green 1984, Raymond et al. 1997, Gardner e Palmer 1998, Kartavtsev et al. 2000, Johannesson et al. 1995, Tatarenkov e Johannesson 1998, Tatarenkov e Johannesson 1999). No entanto, esse é um fenômeno restrito a alguns locais. Também, se a seleção fosse realmente importante, na análise de amostras em escala microgeográfica esta deveria

gerar tanta deficiência de heterozigotos quanto nas amostras em escala macrogeográfica, ao contrário do que foi observado em *Collisella subrugosa*.

A homogeneidade dos valores de F_{IS} entre os pontos seria esperada em micro-escala se nenhuma força estivesse agindo sobre a distribuição das frequências genotípicas, já que todos os indivíduos de um costão deveriam compor uma única população com uma única dinâmica genética. A heterogeneidade nos valores de F_{IS} detectada foi mais freqüente entre os pontos de Itamambuca do que entre os pontos de Barequeçaba o que seria evidência da ação de seleção nas amostras de Itamambuca. Entretanto, novamente não foi observada tendência ou mesmo um padrão na variação dos valores de F_{IS} entre os pontos.

A homogeneidade de valores de F_{IS} entre os locos isoenzimáticos também seria esperada na ausência de forças microevolutivas e também em processos de endogamia. A heterogeneidade desses valores poderia ser associada à seleção natural, mas também poderia ocorrer quando apenas eventos estocásticos estivessem associados à segregação independente estivessem determinando a distribuição das frequências genotípicas em cada loco. Embora alguns locos tenham apresentado heterogeneidade de F_{IS} entre os pontos, nenhum padrão foi observado na variação destes. O fato de que e nenhum dos locos tenha sido responsável por aumentos nos valores de F_{ST} observados entre os pontos também corrobora a idéia de que não é a seleção natural que está determinando esses padrões.

Nos resultados obtidos nesse trabalho, os testes de heterogeneidade entre as classes de tamanho não forneceram nenhuma informação adicional. Isso porque a heterogeneidade entre as classes de tamanho e entre os locos das classes podem ter resultado da união de indivíduos vindos de diferentes pontos em cada uma delas.

O número relativo de locos heterozigotos (N_h) abaixo do esperado para as amostras de pontos e classes de tamanho concorda com os altos valores de F_{IS} observados nessas amostras. A correlação do N_h com o tamanho dos indivíduos na segunda coleta de Barequeçaba foi baixa ($r = 0.19$) indicando que outros fatores estão influenciando a distribuição de N_h . No entanto, se o tamanho dos indivíduos estiver

relacionado de alguma maneira ao Nh, a magnitude das deficiências de heterozigotos observadas poderiam depender do tamanho dos indivíduos presentes na amostra estudada.

A correlação entre o número de locos heterozigotos com o tamanho dos indivíduos foi detectada para alguns bivalves, especialmente do gênero *Mytilus* (Zouros et al. 1980, Singh e Green 1984, Gardner e Palmer 1998), mas também em *Mulinia lateralis* (Gaffney et al 1990) e *Ostrea edulis* (Naciri-Grawen et al. 2000). Em alguns bivalves, os indivíduos menores tendem a apresentar maiores deficiências de heterozigotos, o que foi muitas vezes atribuído à maior taxa de crescimento e viabilidade dos heterozigotos (Koehn et al. 1973, Ayala 1973, Tracey et al. 1975, Singh e Zouros 1978, Zouros et al. 1980, Koenh e Gaffney 1984, Zouros e Foltz 1987, Myrand et al. 2002).

Essa relação da deficiência de heterozigotos e do número de locos heterozigotos com o tamanho e dos indivíduos foi melhor estudada nos bivalves do gênero *Mytilus*. Nessas espécies, foi detectada grande variação nas frequências genótípicas da enzima LAP relacionadas a gradientes de salinidade (Koenh et al. 1980, Raymond et al. 1997). Posteriormente a deficiência de heterozigotos encontrada nesse loco foi relacionada principalmente às menores classes de tamanho chegando a ocorrer excesso de heterozigotos nos adultos (Hiblish et al. 1982, Gardner e Kathiravetpillai 1997, Gardner e Palmer 1998). Estudos na ostra *Crassostrea virginica* também apresentaram forte correlação entre o tamanho (considerado como o peso) e a deficiência de heterozigotos, na qual os juvenis apresentavam as maiores deficiências e os adultos, as maiores (Singh e Zouros 1981, Singh e Green 1984).

Em *Macoma balthica*, indivíduos de genótipos heterozigóticos para algumas enzimas estudadas apresentaram maiores taxas de crescimento do que os homozigotos (Green 1973). O desequilíbrio da heterozigosidade multiloco, relacionando a heterozigosidade à taxa de crescimento também foi relatado para o gastrópode predador *Thais (Stramonita) haemastoma* (Garton 1984). Esse padrão, associado ao de maior deficiência de heterozigotos nos juvenis resultou em uma série de hipóteses de seleção balanceada e inversão de valor adaptativo ao longo da ontogenia (Haley e Newkirk 1977, Singh e Green 1984, Gardner e Palmer 1998). A partir dessas evidências foi sugerido que os indivíduos de genótipos heterozigóticos teriam uma maior taxa de crescimento. Nas larvas isso seria selecionado negativamente, pois, crescendo

mais, seus requerimentos nutricionais iriam aumentar (e são limitados no plâncton), mas nos adultos seria selecionado positivamente que atingiriam a maturidade sexual mais cedo (Singh e Green 1984).

A relação da heterozigosidade com o tamanho pode ser uma das causas da deficiência de heterozigotos e parece ser importante na explicação dessas deficiências em alguns locos aloenzimáticos de muitas espécies de bivalves (Gaffney et al. 1990). No caso de *Collisella subrugosa*, tanto a heterozigosidade esperada quanto a observada estão correlacionadas ao tamanho indicando que este está determinando a variabilidade (número de alelos presentes e suas frequências relativas) e não simplesmente o número de heterozigotos em si.

De acordo com os dados obtidos nas coletas em escala microgeográfica de *C. subrugosa* tanto a hipótese de efeito Wahlund quanto a hipótese de grupos de acasalamento podem explicar os padrões observados. Essas amostras não apresentaram evidências da atuação seleção natural, apresentaram variação temporal e evidências de que a estruturação espacial, apesar de pequena, pode gerar deficiência de heterozigotos por um efeito Wahlund espacial. Esse padrão também estaria de acordo com a idéia de formação de grupos de acasalamento variáveis no tempo.

2.5.4. O problema da deficiência de heterozigotos em moluscos marinhos

Dentre os grupos de invertebrados marinhos mais estudados do ponto de vista da genética de populações, o filo Mollusca compreende os grupos nos quais o padrão de deficiência de heterozigotos foi mais freqüentemente relatado e também, nos quais gerou maiores discussões teóricas (Zouros et al. 1980, Singh e Green 1984, Zouros e Foltz 1984, Gaffney et al. 1990, Raymond et al. 1997). Parte disso decorre do fato de que em muitos invertebrados marinhos que apresentaram deficiências de heterozigotos, essa provavelmente decorreria de endogamia, quando monóicos, ou apresentarem populações altamente estruturadas. Mesmo entre os moluscos, alguns grupos apresentam hermafroditismo e não são considerados nas revisões desse tema.

Entre os trabalhos que se propõe a discutir o problema da deficiência de heterozigotos em moluscos, muitos se apóiam nas evidências de seleção natural apresentadas pelos trabalhos dos bivalves

mitilídeos (Hiblish et al. 1982, Beaumont 1982, Beaumont et al. 1983, Singh e Green 1984, Raymond et al. 1997, Gardner e Palmer 1998). Entretanto, apesar das fortes evidências de seleção encontradas, a seleção natural como processo gerador das deficiências de heterozigotos iria requer altos coeficientes seletivos (Gaffney et al. 1990) e deveria ocorrer em muitos locos ao mesmo tempo. Apesar de um alto coeficiente seletivo ter sido associado à isozima AAT em *Littorina saxatilis* (Johannesson et al. 1995), esse foi o único trabalho a estimar um coeficiente tão alto. E, também, em todos os casos estudados a seleção foi detectada em locos específicos. A existência de altas forças seletivas em muitos locos em equilíbrio de ligação seria muito difícil de ocorrer, principalmente em enzimas do metabolismo primário. Desse modo, a seleção natural pode ser uma boa explicação apenas para aquelas espécies que apresentaram deficiências em apenas alguns locos.

Considerando os trabalhos de espécies que apresentaram deficiência para muitos locos, a grande maioria atribuiu essas deficiências ao efeito Wahlund mesmo desconsiderando trabalhos com o gênero *Mytilus*, nos quais hipóteses considerando o efeito Wahlund são muito comuns por causa das zonas híbridas que ocorrem em seu complexo de espécies (Raymond et al. 1997). Uma forte crítica ao efeito Wahlund foi feita por Gaffney et al. (1990) argumentando que a magnitude das deficiências observadas em espécies de bivalves e gastrópodes iria requerer variâncias extremamente grandes nas frequências alélicas. No entanto, o presente trabalho sugere que mesmo com pequenas variações nas frequências alélicas, um efeito Wahlund pode ter grande importância no surgimento do padrão de deficiência de heterozigotos.

De fato, se considerarmos um caso de apenas duas populações se diferenciando para um loco com dois alelos como Gaffney et al. (1990), as diferenças nas frequências desses alelos deveriam ser muito grandes para gerar alta deficiência de heterozigotos. No entanto, ao transpormos esse efeito Wahlund para uma variação temporal na população de recrutas temos que considerar infinitas subpopulações com diferenças aleatórias nas frequências de muitos alelos em muitos locos sendo acumuladas no grupo de indivíduos de um costão. Neste cenário não seria improvável a ocorrência de grandes variações nas frequências alélicas de alguns desses alelos nos grupos de recrutas de cada pequeno intervalo de tempo de

recrutamento, gerada pelos “erros de amostragem” propostos no ítem 2.5.2.. Ainda assim, alguns trabalhos têm revelado grandes variações temporais nas frequências alélicas sem evidência de seleção nos locos estudados.

Hare et al. 1996 sugerem que a grande heterogeneidade das frequências gênicas entre amostras detectadas por esses marcadores abre um leque de oportunidades para considerações sobre Efeito Wahlund e, desse modo, a importância desse efeito ainda deveria ser determinada. Borsa et al. (1991) observaram grande variação temporal nas frequências genotípicas que resultou em deficiência de heterozigotos que aparece em amostras que englobam um maior número de coortes, se referindo a esse padrão como resultado de um efeito Wahlund no tempo. A partir da idéia de efeito Wahlund, Tracey et al. (1975) imaginaram um cenário no qual uma micro-estrutura espacial, variável no tempo, geraria deficiências de heterozigotos por um efeito Wahlund. Esses autores discutiram que a existência de grandes populações panmíticas nesses invertebrados marinhos que apresentam larvas planctônicas seria realmente difícil, pois: 1) a probabilidade de união dos gametas diminui com a diluição na água e, portanto, a maior parte das fecundações ocorreria entre indivíduos mais próximos; e 2) O tempo disponível para a liberação de gametas diminui com de acordo com a altura no costão, com o tempo em que os indivíduos ficam submersos. Além destes fatores, a partir dos resultados do presente trabalho poderíamos sugerir que os possíveis “erros de amostragem” discutidos no ítem 2.5.2. também contribuiriam para deixarmos de considerar as populações de invertebrados marinhos como panmíticas.

Como consequência dos fatores indicados, Tracey et al. (1975) sugeriram que a estrutura populacional desses organismos seria a de grupos de pequenas populações reprodutivas, os grupos de acasalamento. Esses autores propuseram que a deficiência de heterozigotos em invertebrados marinhos pode resultar da subdivisão aleatória e temporária de uma população em pequenos grupos reprodutivos, panmíticos. Diferenças nas frequências alélicas entre esses grupos reprodutivos resultariam simplesmente de um erro de amostragem, levando ao efeito Wahlund quando a progênie é tomada.

Um efeito Wahlund poderia ser gerado também pela subdivisão temporal de uma população em grupos que se reproduzem em diferentes tempos, se esses grupos diferirem em suas frequências alélicas

(Zouros e Foltz 1984b). Hiblish e Zimmrman (1988) demonstraram diferenças no tempo de reprodução de genótipos de um loco da LAP em uma população de *Mytilus edulis*. No entanto, isso parece ocorrer apenas sobre condições restritas e não deve representar um fator importante na explicação do padrão geral de deficiência de heterozigotos.

Em *Collisella subrugosa* encontram-se evidências de que a deficiência de heterozigotos observada em escala macrogeográfica pode ser gerada por processos temporais que estariam determinando a estrutura microgeográfica. De fato, deve-se considerar os processos de fertilização não aleatória e dependente da altura dos indivíduos no costão colocados por Tracey et al. (1975) como fatores importantes para explicar o padrão de deficiência de heterozigotos, mas, também, considerar os “erros de amostragem” discutidos no item 2.5.2.. Esses três processos, em conjunto, poderiam gerar a variação temporal e a conseqüente variação espacial nas frequências gênicas. O acúmulo dessa variação entre gerações nos indivíduos que habitam um costão poderia resultar nas deficiências de heterozigotos quando analisados em uma escala mais ampla, macrogeográfica.

Os três processos considerados acima devem ocorrer em populações da maioria dos invertebrados marinhos que apresentam larvas planctônicas (e cuja fecundação é externa). Desse modo, podemos prever que outros trabalhos em escala micro-geográfica com esses invertebrados que apresentaram deficiência de heterozigotos em escala macrogeográfica apresentariam ao menos três padrões: i) variação temporal nas frequências gênicas, ii) variação espacial nas frequências gênicas, que não se mantém ao longo do tempo, iii) redução da deficiência de heterozigotos na amostragem microgeográfica.

1.6. LITERATURA CITADA

- Andrade SCS (2000). Variabilidade genética em litorinídeos (Gastropoda: Mollusca) da costa brasileira. Tese de Mestrado. Campinas, SP, UNICAMP: 113pp.
- Andrade SCS, Medeiros HF and Solferini VN. Homogeneity of Hardy-Weinberg deviations in Brazilian littorinids: evidence from selection? **submitted**.
- Andrade SCS, Solferini VN and Magalhães CA (2003). Patterns of genetic variability in Brazilian littorinids (Mollusca): A macrogeographic approach. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research **41**: 249-245.

- Ayala FJ (1973). Role of natural selection in maintaining genetic polymorphisms. Genetics 74(JUN): S13-S13.
- Badino G and Sella G (1980). Phosphoglucose isomerase variability in sympatric populations of mediterranean species of *Patella* (Gastropoda, Prosobranchiata). Marine Ecology-Progress Series 2(4): 315-320.
- Beaumont AR (1991). Genetic studies of laboratory reared mussels, *Mytilus edulis* - heterozygote deficiencies, heterozygosity and growth. Biological Journal of the Linnean Society 44(3): 273-285.
- Beaumont AR, Beveridge CM and Budd MD (1983). Selection and heterozygosity within single families of the mussel *Mytilus edulis* (L). Marine Biology Letters 4(3): 151-161.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, et al. (1996-2001). GENETIX (version 4.02), logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Berger EM (1983). Population genetics of marine gastropods and bivalves. The Mollusca, vol. 6, Academic Press Inc.
- Bohonak AJ (1999). Dispersal, gene flow, and population structure. Quarterly Review of Biology 74(1): 21-45.
- Borsa P, Zainuri M and Delay B (1991). Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. Heredity 66: 1-8.
- Branch GM (1981). The biology of limpets: physical factors, energy flow, and ecological interactions. Oceanography and Marine Biology Annual Review 19: 235-380.
- Bryant EH (1976). A comment on the role of environmental variation in maintaining polymorphisms in natural populations. Evolution 30: 188-190.
- Burton RS (1983). Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. Marine Biology Letters 4(193-206).
- Byers BA (1989). Habitat choice polymorphism associated with cryptic shell color polymorphism in the limpet *Lottia digitalis*. Veliger 32(4): 394-402.
- Chambers RJ, McQuaid CD and Kirby R (1996). Determination of genetic diversity of South African intertidal limpets (Gastropoda: Siphonaria) with different reproductive modes using polyacrylamide gel electrophoresis of total cellular proteins. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 201(1-2): 1-11.
- Coma R, Ribes M, Gili JM and Zabala M (2000). Seasonality in coastal benthic ecosystems. Trends in Ecology & Evolution 15(11): 448-453.
- CorteReal H, Hawkins SJ and Thorpe JP (1996). An interpretation of the taxonomic relationship between the limpets *Patella rustica* and *P. piperata*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 76(3): 717-732.
- Cretella M, Scillitani G, Toscano F, Turella P, et al. (1994). Relationships between *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 and the other Tyrrhenian species of *Patella* (Gastropoda, Patellidae). Journal of Molluscan Studies 60: 9-17.
- Crow J and Kimura M (1970). An introduction to population genetics theory. Minneapolis, Minnesota, Burgess Publishing Company. 591 ppp.
- de la Rosa-Velez J, Farfan C and Cervantes-Franco MA (2000). Geographic pattern of genetic variation in *Modiolus capax* (Conrad, 1837) from the Gulf of California. Ciencias Marinas 26(4): 585-606.

- Deng HW and Fu YX (1998). Conditions for positive and negative correlations between fitness and heterozygosity in equilibrium populations. Genetics **148**(3): 1333-1340.
- Foltz DW and Hu YP (1996). Genetics of scnDNA polymorphisms in juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) .2. Heterozygote deficiency and gametic disequilibrium in natural population samples. Molecular Marine Biology and Biotechnology **5**(2): 130-137.
- Foltz DW, Shumway SE and Crisp D (1993). Genetic structure and heterozygosity-related fitness effects in the marine snail *Littorina littorea*. American Malacological Bulletin **10**(1): 55-60.
- Futuyma DJ (1992). Biologia evolutiva, Sociedade Brasileira de Genética/ CNPq
- Gaffney PM, Scott TM, Koehn RK and Diehl WJ (1990). Interrelationships of heterozygosity, growth-rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. Genetics **124**(3): 687-699.
- Gardner JPA and Kathiravetpillai G (1997). Biochemical genetic variation at a leucine aminopeptidase (LAP) locus in blue (*Mytilus galloprovincialis*) and greenshell (*Perna canaliculus*) mussel populations along a salinity gradient. Marine Biology **128**: 619-625.
- Gardner JPA and Palmer NL (1998). Size-dependent, spatial and temporal genetic variation at a leucine aminopeptidase (LAP) locus among blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) populations along a salinity gradient. Marine Biology **132**(2): 275-281.
- Garton DW (1984). Relationship between multiple locus heterozygosity and physiological energetics of growth in the estuarine gastropod *Thais haemastoma*. Physiological Zoology **57**(5): 530-543.
- Goudet J (1995). FSTAT(version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. The Journal of Heredity **86**: 485-486.
- Green RH (1973). Growth and mortality in an arctic intertidal population of *Macoma balthica* (Pelecypoda, Tellinidae). Journal of the Fisheries Research Board of Canada **30**(9): 1345-1348.
- Haley LE and Newkirk GF (1977). Selecting oysters for faster growth. Proceedings of the Eighth Annual Meeting, World Mariculture Society: 555-565.
- Hamm DE and Burton RS (2000). Population genetics of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the central California coast. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **254**(2): 235-247.
- Hansson B and Westenberg L (2002). On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. Molecular Ecology **11**: 2467-2474.
- Hare MP, Karl SA and Avise JC (1996). Anonymous nuclear DNA markers in the American oyster and their implications for the heterozygote deficiency phenomenon in marine bivalves. Molecular Biology and Evolution **13**(2): 334-345.
- Hedgcock D (1986). Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? Bulletin of Marine Science **39**(2): 550-564.
- Hedrick PW (1986). Genetic polymorphism in heterogeneous environments - a decade later. Annual Review of Ecology and Systematics **17**: 535-566.
- Hedrick PW, Ginevan ME and Ewing EP (1976). Genetic polymorphism in heterogeneous environments. Annual Review of Ecology and Systematics **7**: 1-32.

- Hilbish TJ, Deaton LE and Koehn RK (1982). Effect of an allozyme polymorphism on regulation of cell volume. Nature **298**: 688-689.
- Hutchinson DW and Templeton AR (1999). Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. Evolution **53**: 1898-1914.
- Janson K (1985). Genetic variation in three species of caribbean periwinkles, *Littorina angustior*, *Littorina lineolata*, and *Littorina ziczac* (Gastropoda, Prosobranchia). Bulletin of Marine Science **37**(3): 871-879.
- Janson K (1987). Allozyme and shell variation in two marine snails (Littorina, Prosobranchia) with different dispersal abilities. Biological Journal of the Linnean Society **30**(3): 245-256.
- Janson K and Ward RD (1984). Microgeographic variation in allozyme and shell characters in *Littorina saxatilis* Olivi (Prosobranchia, Littorinidae). Biological Journal of the Linnean Society **22**(4): 289-307.
- Johannesson K and Johannesson B (1989). Differences in allele frequencies of Aat between high-rocky and mid-rocky shore populations of *Littorina saxatilis* (Olivi) suggest selection in this enzyme locus. Genetical Research **54**(1): 7-11.
- Johannesson K, Johannesson B and Lundgren U (1995). Strong natural selection causes microscale allozyme variation in a marine snail. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(7): 2602-2606.
- Johannesson K, Johannesson B and Rolan Alvarez E (1993). Morphological differentiation and genetic cohesiveness over a microenvironmental gradient in the marine snail *Littorina saxatilis*. Evolution **47**(6): 1770-1787.
- Johannesson K and Tatarenkov A (1997). Allozyme variation in a snail (*Littorina saxatilis*) - Deconfounding the effects of microhabitat and gene flow. Evolution **51**(2): 402-409.
- Johnson MS and Black R (1982). Chaotic genetic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria* sp. Marine Biology **70**(2): 157-164.
- Johnson MS and Black R (1984). The Wahlund effect and the geographical scale of variation in the intertidal limpet *Siphonaria* sp. Marine Biology **79**(3): 295-302.
- Johnson MS and Black R (1998). Effects of isolation by distance and geographical discontinuity on genetic subdivision of *Littoraria cingulata*. Marine Biology **132**(2): 295-303.
- Kartavtsev YF, Rybnikova IG, Sitnikov AV, Amachava EY, et al. (2000). Genetic and morphological variability of a gastropod mollusk *Nucella heyseana* (Mollusca, Gastropoda) in the environmental optimum and pessimum. Russian Journal of Genetics **36**(10): 1123-1129.
- Kartavtsev YP and Zaslavskaya NI (1983). Allozyme polymorphism in a population of the common mussel *Mytilus edulis* L (Mytilidae) from the sea of Japan. Marine Biology Letters **4**(3): 163-172.
- Koehn RK and Gaffney PM (1984). Genetic heterozygosity and growth-rate in *Mytilus edulis*. Marine Biology **82**(1): 1-7.
- Koehn RK, Milkman R and Mitton JB (1976). Population genetics of marine pelecypods .4. Selection, migration and genetic differentiation in blue mussel *Mytilus edulis*. Evolution **30**(1): 2-32.
- Koehn RK, Turano FJ and Mitton JB (1973). Population genetics of marine pelecypods II. Genetic differences in microhabitats of *Modiolus demissus*. Evolution **27**(100-105).

- Kravva N, Staikou A and Triantaphyllidis C (2000). Genetic composition and temporal genetic variation in *Mytilus galloprovincialis* populations of the Thermaikos gulf (Northern Aegean Sea). Biologia 55(3): 289-297.
- Lavie B, Noy R and Nevo E (1987). Genetic variability in the marine gastropods *Patella coerulea* and *Patella aspera* - Patterns and problems. Marine Biology 96(3): 367-370.
- Lehmann T, Hawley W, Grebert H and Collins F (1998). The effective population size of *Anopheles gambiae* in Kenya: implications for population structure. Molecular Biology and Evolution 15: 264-276.
- Levene H (1953). Genetic equilibrium when more than one ecological niche is available. American Naturalist 87(836): 331-333.
- Levinton J (1973). Genetic variation in a gradient of environmental variability - Marine bivalvia (Mollusca). Science 180(4081): 75-76.
- Lindberg DR (1981). Acmaeidae: Gastropoda, Mollusca. Pacific Grove, CA, USA, The Boxwood Press. 122p.
- Longwell AC and Stiles SS (1973). Gamete cross incompatibilities and inbreeding in the comertial American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. Cytologia 38: 521-533.
- Manly B (1997). Randomization, Bootstrap and Monte Carlo methods in biology. London, UK, Chapman & Hall. 399p.
- McQuaid CD (1996). Biology of the gastropod family Littorinidae .1. Evolutionary aspects. Oceanography and Marine Biology, Vol 34. London, U C L Press Ltd. 34: 233-262.
- Milkman R and Beaty LD (1970). Large-scale electrophoretic studies of allelic variation in *Mytilus edulis*. Biological Bulletin 139(2): 430-436.
- Miller MP (1997). Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Logan, Utah, USA, Computer software distributed by author.
- Myrand B, Tremblay R and Sevgny JM (2002). Selection against blue mussel (*Mytilus edulis* L.) homozygotes under various stressful conditions. Journal of Heredity 93(4): 238-248.
- Naciri-Graven Y, Launey S, Lebayon N, Gerard A, et al. (2000). Influence of parentage upon growth in *Ostrea edulis*: evidence for inbreeding depression. Genetical Research 76(2): 159-168.
- Nei M (1987). Molecular evolutionary genetics. New York, Columbia University press
- Nevo E (1978). Genetic variation in natural populations - Patterns and theory. Theoretical Population Biology 13(1): 121-177.
- Nevo E, Perl T, Beiles A and Wool D (1981). Mercury selection of allozyme genotypes in shrimps. Experientia 37(11): 1152-1154.
- Noy R, Lavie B and Nevo E (1987). The niche-width variation hypothesis revisited - genetic diversity in the marine gastropods *Littorina punctata* (Gmelin) and *Littorina neritoides* (L). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 109(2): 109-116.
- Palumbi SR (1984). Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. Annual Review of Ecology and Systematics 25: 547-572.
- Parsons KE (1996). The genetic effects of larval dispersal depend on spatial scale and habitat characteristics. Marine Biology 126(3): 403-414.

- Prout T and Savolainen O (1996). Genotype-by-environment interaction is not sufficient to maintain variation: Levene and the leafhopper. American Naturalist 148(5): 930-936.
- Raymond M and Rousset F (1995). Genepop (Version-1.2) - Population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86(3): 248-249.
- Raymond M, Vaanto RL, Thomas F, Rousset F, et al. (1997). Heterozygote deficiency in the mussel *Mytilus edulis* species complex revisited. Marine Ecology-Progress Series 156: 225-237.
- Rice WR (1989). Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43(1): 223-225.
- Ridgway TM, Stewart BA, Branch GM and Hodgson AN (1998). Morphological and genetic differentiation of *Patella gannularis* (Gastropoda : Patellidae): recognition of two sibling species along the coast of southern Africa. Journal of Zoology 245: 317-333.
- Rio-Portilla MAD and Beaumont AR (2000). Larval growth, juvenile size and heterozygosity in laboratory reared mussels, *Mytilus edulis*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 254: 1-17.
- Schneider S, Roessli D and Loutent E (2000). A software for population genetics data analysis. Switzerland, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Sella G, Robotti CA and Biglione V (1993). Genetic divergence among three sympatric species of Mediterranean *Patella* (Archaeogastropoda). Marine Biology 115(3): 401-405.
- Shaw CR and Prasad R (1970). Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. Biochemical Genetics 4(2): 297-343.
- Singh SM and Green RH (1984). Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. Malacologia 25: 569-581.
- Singh SM and Zouros E (1981). Genetics of growth rate in oysters and its implications for aquaculture. Canadian Journal of Genetics and Cytology 23: 119-130.
- Sokal RR and Rohlf JF (1995). Biometrics: the principles and practice of statistics in biological research, W H Freeman & Co
- Solecava AM and Thorpe JP (1991). High levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. Biological Journal of the Linnean Society 44(1): 65-80.
- Soltis DE, Haufler CH, Darrow DC and Gastony GJ (1983). Starch gel electrophoresis of ferns - a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. American Fern Journal 73(1): 9-27.
- StatSoft INC (1996). Statistica, for Windows. Tulsa, OK, USA.
- Tatarenkov A and Johannesson K (1999). Micro and macrogeographic allozyme variation in *Littorina fabalis*; do sheltered and exposed forms hybridize? Biological Journal of the Linnean Society 67(2): 199-212.
- Todd CD, Lambert WJ and Thorpe JP (1998). The genetic structure of intertidal populations of two species of nudibranch molluscs with planktotrophic and pelagic lecithotrophic larval stages: are pelagic larvae "for" dispersal? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 228(1): 1-28.
- Tracey ML, Bellet NF and Gravem CD (1975). Excess allozyme homozygosity and breeding population structure in the mussel *Mytilus californianus*. Marine Biology 32: 303-311.
- Van Valen L (1965). Morphological variation and width of ecological niche. American Naturalist 99: 377-390.

- Ward RD (1990). Biochemical genetic variation in the genus *Littorina* (Prosobranchia: Mollusca). Hydrobiologia **193**: 53-69.
- Ward RD and Warwick T (1980). Genetic differentiation in the molluscan species *Littorina rudis* and *Littorina arcana* (Prosobranchia: Littorinidae). Biological Journal of the Linnean Society **14**(3-4): 417-428.
- Weir BS and Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution **38**(6): 1358-1370.
- Wilkins NP (1977). Genetic variability in littoral gastropods - Phosphoglucose isomerase and phosphoglucomutase in *Patella vulgata* and *Patella aspera*. Marine Biology **40**(2): 151-155.
- Yamada SB (1989). Are direct developers more locally adapted than planktonic developers? Marine Biology **103**(3): 403-411.
- Zouros E and Foltz DW (1984). Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. Malacologia **25**(2): 583-591.
- Zouros E and Foltz DW (1987). The use of allelic isozyme variation for the study of heterosis. Isozymes: Current Topics in Biology and Medical Research **25**(583-591).
- Zouros E, Singh SM, Foltz DW and Mallet AL (1983). Post settlement viability in the American oyster (*Crassostrea virginica*) - an overdominant phenotype. Genetical Research **41**(3): 259-270.
- Zouros E, Singh SM and Miles HE (1980). Growth rate in oysters: an overdominant phenotype and its possible explanations. Evolution **34**(856-867).

CAPÍTULO 3

**Variação de Tamanho e Forma da Concha de *Collisella subrugosa*
(Patellogastropoda: Acmaeidae) ao longo do espaço do costão rochoso
e no tempo.**



3.1. INTRODUÇÃO

A forma cônica das conchas dos Patellogastropoda parece ter surgido com a perda do crescimento em espiral característico dos gastrópodes. Essa transformação da forma básica teria resultado em maior abertura da concha, e conseqüentemente maior área de contato com a rocha, em relação ao tamanho do indivíduo. Considera-se que conchas cônicas surgiram de modo independente ao menos duas vezes entre os patelogastrópodes (Lindberg, citado em Deny 2000), e formas similares surgiram em outras linhagens de moluscos da zona entremarés. Dada essa convergência, considera-se plausível pressupor que a forma “tipo lapa” é adaptativa nesse habitat (Denny 2000).

Essa forma cônica também possui grandes variações sobre sua estrutura básica, que são comumente associadas a determinadas características do ambiente (Vermeij 1978, Branch 1981). O padrão mais testado e discutido é a relação entre o tamanho e forma dos indivíduos com os níveis de dessecação provocados pelo ambiente. Na zona entremarés, as lapas estão sujeitas a períodos variáveis de exposição ao ar de acordo com sua posição na zonação. Na área do supralitoral, onde a exposição pode ser muito mais rigorosa, ocorrem indivíduos maiores que seriam mais tolerantes à dessecação, de acordo com a relação entre a área e o volume do animal (Branch 1981). Essa relação foi verificada em algumas espécies de patelogastrópodes, e até entre os indivíduos de uma mesma população formando gradientes em que o tamanho aumenta em direção ao supralitoral (Branch 1981, Fletcher, 1984).

Em áreas onde o stress de dessecação é maior também são encontrados os indivíduos com conchas mais altas (Branch 1981). Na tentativa de explicar esse padrão, Orton (1932) sugeriu que em ambientes secos os indivíduos deveriam se aderir fortemente ao substrato para evitar o contato com o ar, e com isso o manto seria sempre contraído dentro da base e suas glândulas depositariam a nova concha em uma área menor, resultado em cones mais fechados e altos. Davies (1969) relacionou a forma mais alta e mais fechada a menores taxas de dessecação. A área de perda d'água, a base da concha, seria menor em relação ao volume em uma concha mais alta. Essa associação entre a forma e a taxa de dessecação foi relatada em muitos outros trabalhos, em comparações intra e interespecíficas (Moore 1934, Voss 1959, Ebling et al. 1962, Balaparameswara Rao e Ganapati 1971, Vermeij 1973, Wolcott 1973, Branch 1975a,b, Bannister

1975). No entanto, Branch (1975a) sugeriu que o aumento na altura da concha em direção ao supralitoral não seria tão comum entre espécies.

A morfologia da concha também poderia estar associada ao stress térmico dos indivíduos durante os períodos de exposição ao sol. A radiação absorvida dependeria da área de superfície exposta, de sua orientação ao sol e das propriedades de troca de calor da superfície (Vermeij 1973, Johnson 1975). Assim, conchas mais altas e mais fechadas teriam menor área de ganho de calor em relação à área de perda (Branch 1981). A troca de calor entre o animal e a rocha através do pé também é considerada importante e, como as lapas normalmente apresentam temperatura maior que a de seu substrato (Wolcott 1973), quanto maior a área do pé em contato com a rocha, maior seria a perda de calor (Branch 1981).

Em ambientes que apresentam ventos fortes ou grande turbulência da água, a área da musculatura do pé do animal em contato com a rocha também pode ser importante para a adesão ao substrato (Branch e Marsh 1978). Miller (1974) concluiu que a forma ótima do pé para a adesão teria a proporção do comprimento para a largura igual a 1:3, indicando que as lapas se encaixam nessa proporção. Nesse trabalho, o autor também registrou que em áreas onde há maior força dos ventos, os indivíduos de *Collisella pelta* apresentavam o pé com as maiores áreas. Branch e Marsh (1978) demonstraram que quanto maior a área de superfície do pé, maior a força de adesão apresentada pelas lapas.

Ventos fortes e alta turbulência da água podem desalojar as lapas, deixando o animal vulnerável à predação pelo longo período que levaria para se reposicionar. A tensão provocada por esses fatores apresenta dois componentes: “arrasto”, que seria a força cujo vetor seria paralelo à base da lapa, agindo de modo a empurrar o animal sobre a superfície, e “levantamento”, que seria a força de vetor perpendicular à base da concha, puxando o animal para cima. Denny (2000) propôs que a identificação desses dois componentes da tensão é importante para explicar os padrões de forma, que variam de acordo com a força predominante no ambiente.

A força de “arrasto” seria maior causando maior impacto quando a razão entre a altura e o raio da concha é alta e também quando a razão entre a largura pelo comprimento é baixa (Branch 1981). Em ambientes onde a força de “arrasto” teria grande intensidade, as conchas seriam mais achatadas (baixas e abertas) que regiões mais calmas (Cook 1979). Essa força também causaria maior tensão quanto maior o

indivíduo (Cook 1979, Branch e Marsh 1978). A força de “levantamento” seria maior causando maior impacto quando a razão entre a altura e o raio da concha é baixa (Denny 2000). Assim formas mais resistentes à tensão provocada pelo “levantamento” seriam os cones mais altos (Simpson 1985). Entretanto, o impacto dessas duas forças sobre as lapas depende da capacidade de adesão ao substrato, da tenacidade dos indivíduos (Denny e Blanchette 2000).

Ao comparar padrões de forma entre grupos, a alometria no crescimento que é característica de cada grupo também deve ser analisada. A comparação de valores relativos de medidas da concha entre grupos com diferentes constantes alométricas, teria diferentes respostas dependendo do tamanho dos indivíduos comparados (Simpson 1985). Grandes variações são encontradas nos padrões de alometria para diferentes caracteres da concha de diferentes espécies de lapas (Vermeij 1978, Simpson 1985, Tokeshi et al. 2000) e de diferentes subpopulações de espécies de *Nacella*, *Cellana*, *Patella* e *Collisella* (Vermeij 1978, Simpson 1985, José e Solferini, em preparação).

Em um trabalho anterior, estudamos as relações de forma e alometria das conchas de indivíduos de *Collisella subrugosa* de 14 diferentes praias do litoral brasileiro. Foi observada uma grande variação tanto entre os grupos de diferentes praias como entre indivíduos de um mesmo costão. A forma das conchas dos indivíduos de um mesmo costão apresentou sub-agrupamentos nas análises, sem o registro de formas intermediárias, principalmente na praia de Barequeçaba (São Sebastião – SP). Esses os sub-grupos de formas poderiam resultar da estruturação desses indivíduos no costão, com a associação das formas a diferentes microhabitats.

2.2. OBJETIVOS

Investigar a distribuição de tamanho e forma da concha de *C. subrugosa* ao longo do espaço microgeográfico do costão e sua possível variação no tempo, associadas a características físicas do ambiente.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Coletas

As análises desenvolvidas nesse capítulo foram realizadas com as conchas dos mesmos indivíduos analisados no capítulo 1. Desse modo, as características das praias estudadas e desenho aplicado nas coletas estão descritos nos itens 2.3.1 e 2.3.2.

3.3.2. Obtenção das imagens das conchas

Todas as conchas dos indivíduos de *C. subrugosa* coletados foram digitalizadas em duas posições, uma dorsal e outra ventral (figura 3.1). As digitalizações foram realizadas com uma câmera “Pixera Profissional” de 1.2 megapixels. As análises morfométricas foram realizadas a partir dessas imagens.

3.3.3. Análises

3.3.3.1. Marcos anatômicos

Foram determinados cinco marcos anatômicos na vista dorsal, que correspondem aos extremos de comprimento e largura e ao ápice da concha, e três na vista lateral, os extremos de comprimento e o ápice da concha (figura 1) conforme sugerido por Righi (1966) e Simison e Lindberg (1999). Desses marcos, apenas o ápice da concha não é de extremo de curvatura e pode ser considerado homólogo entre os indivíduos analisados (Lindberg 1979).

A escolha de marcos anatômicos homólogos em conchas de gastrópodes é, geralmente, subjetiva e arbitrária (Johson et al. 1991), já que as conchas têm uma estrutura básica muito simples e todas as variações dessa estrutura em relação a projeções e fissuras são extremamente susceptíveis às variações ambientais. Isto não foi considerado um problema nesse estudo já que nosso objetivo se limita à descrição das mudanças de tamanho e forma ao longo do espaço do costão rochoso. Foram feitas duas repetições das marcações de pontos em todas as conchas da primeira amostra de Barequeçaba para estimarmos a confiabilidade e o erro associado às marcações.

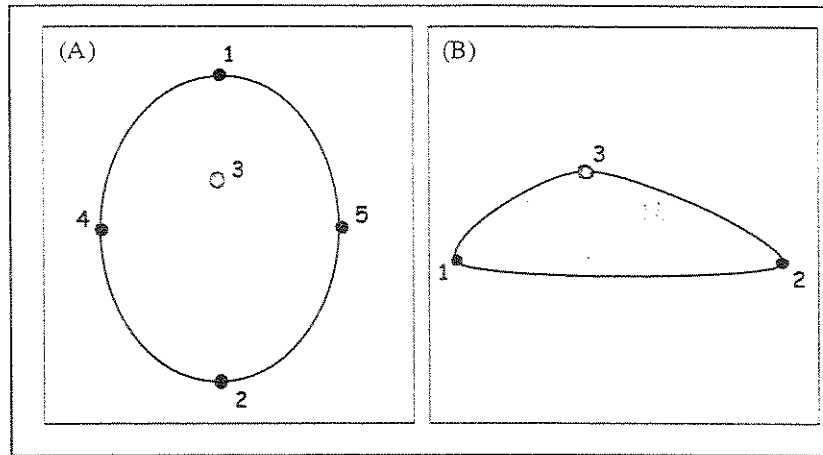


Figura 3.1: Marcos anatômicos definidos na concha de *C. subrugosa*. (A) vista dorsal com os 4 marcos anatômicos de extremos de curvatura, 1 e 2 correspondendo aos extremos de comprimento e 4 e 5 aos extremos de largura e o marco 3 correspondente ao ápice da concha (B) vista lateral com os dois marcos de extremos de curvatura 1 e 2 correspondentes ao comprimento e o marco 3 correspondente ao ápice da concha.

3.3.1.2. O tamanho das conchas

A medida de tamanho usada foi o comprimento do centróide, considerada a única variável de tamanho que não se correlaciona com a forma (Bookstein 1991). A variação do tamanho dos indivíduos entre os pontos dos transectos e entre os diferentes eventos de coleta de cada ponto foi testada usando uma análise de variância (ANOVA) associada às comparações, *a posteriori*, de Tukey (Sokal e Rohlf 1995). A relação entre o tamanho das conchas e a distância entre os pontos foi avaliada através de um teste de Mantel, comparando-se uma matriz de distância geográfica e uma matriz de distância de Mahalanobis baseada nos comprimentos dos centróides das conchas para cada ponto (Sokal e Rohlf 1995).

3.3.1.3. A forma das conchas

Análise da Forma Geométrica. Os marcos anatômicos foram superpostos ortogonalmente pelo método dos quadrados mínimos. Os componentes uniformes foram obtidos como proposto por Bookstein (1996) para as duas vistas da concha, dorsal e lateral. As imagens dos indivíduos foram superpostas ortogonalmente pelos quadrados mínimos em relação à configuração de referência. As deformações principais através de uma análise de deformações (Monteiro e Reis 1999) somente para a vista dorsal da

concha, já que a lateral possui apenas três marcos. O parâmetro que pondera as variações em diferentes escalas (alfa) foi definido como zero dando iguais pesos às variações dos marcos em todas as escalas e como 1 dando maior peso às variações em grande escala.

Os valores das deformações principais foram comparados entre os pontos de cada coleta e entre as coletas de cada ponto através de uma análise de variância (ANOVA) associada às comparações *a posteriori* de Tukey (Sokal e Rohlf 1995). A relação dos componentes uniformes e das deformações principais com a distância entre os pontos foi avaliada através de um teste de Mantel, comparando-se uma matriz de distância geográfica e uma matriz de distância de Mahalanobis baseada nesses respectivos valores da variação de forma para cada ponto (Sokal e Rohlf 1995).

Variação da Forma com o Tamanho. Para observar a mudança na forma da concha com o tamanho do indivíduo, uma matriz forma (deformações parciais) foi comparada com uma matriz de tamanho (tamanho do centróide da configuração média) através de uma regressão multivariada (Monteiro e Reis 1999).

Programas de análise usados. As análises geométricas e multivariadas foram realizadas nos programas da série TPS (Rohlf 2001), os testes de Mantel e as análises de variância foram realizadas no programa STATISTICA (StatSoft, Inc 1996).

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Erro estimado

Nenhum dos pontos da primeira amostra de Barequeçaba apresentaram diferenças significativas nos valores de tamanho do centróide, componentes uniformes e deformações principais entre as três repetições das marcações de pontos. O erro associado a marcação dos pontos foi da ordem de 10^{-5} .

3.4.2. O tamanho das conchas

Distribuição dos tamanhos. A primeira coleta de Barequeçaba apresentou uma distribuição de tamanhos da concha que desviou da distribuição normal no sentido de indivíduos menores que a média (figura 3.3a), mas nas duas coletas seguintes a distribuição de tamanhos aderiu à normal, aumentando o tamanho médio dos indivíduos entre as coletas (figura 3.3 a, b, c). Em Itamambuca foi observado o inverso, a distribuição dos tamanhos da concha aderiu à normal na primeira coleta e, nas coletas seguintes, desviou com mais indivíduos de tamanho cada vez menor (figura 3.3 d, e, f).

No espaço. Ao longo do transecto as amostras apresentaram grandes variações no tamanho da concha com diferenças significativas entre alguns grupos de pontos amostrados (figura 3.2 e 3.3). Nenhuma das amostras apresentou correlação entre a distância geográfica e a de Mahalanobis. Apesar disso, nas duas praias observou-se uma tendência de segregação dos tamanhos entre o início e o final dos transectos. As amostras de Barequeçaba apresentaram indivíduos menores no início do transecto, mais próximo à praia, e as amostras de Itamambuca apresentaram indivíduos maiores no início do transecto, próximo ao rio (figura 3.2 e 3.3).

No tempo. Todos os pontos amostrados apresentaram variação temporal no tamanho das conchas dos indivíduos. As três repetições temporais de cada ponto diferiram significativamente para todos eles. Entretanto, a variação temporal detectada não apresentou nenhum padrão espacial entre os pontos das diferentes coletas (figura 3.2 e 3.3).

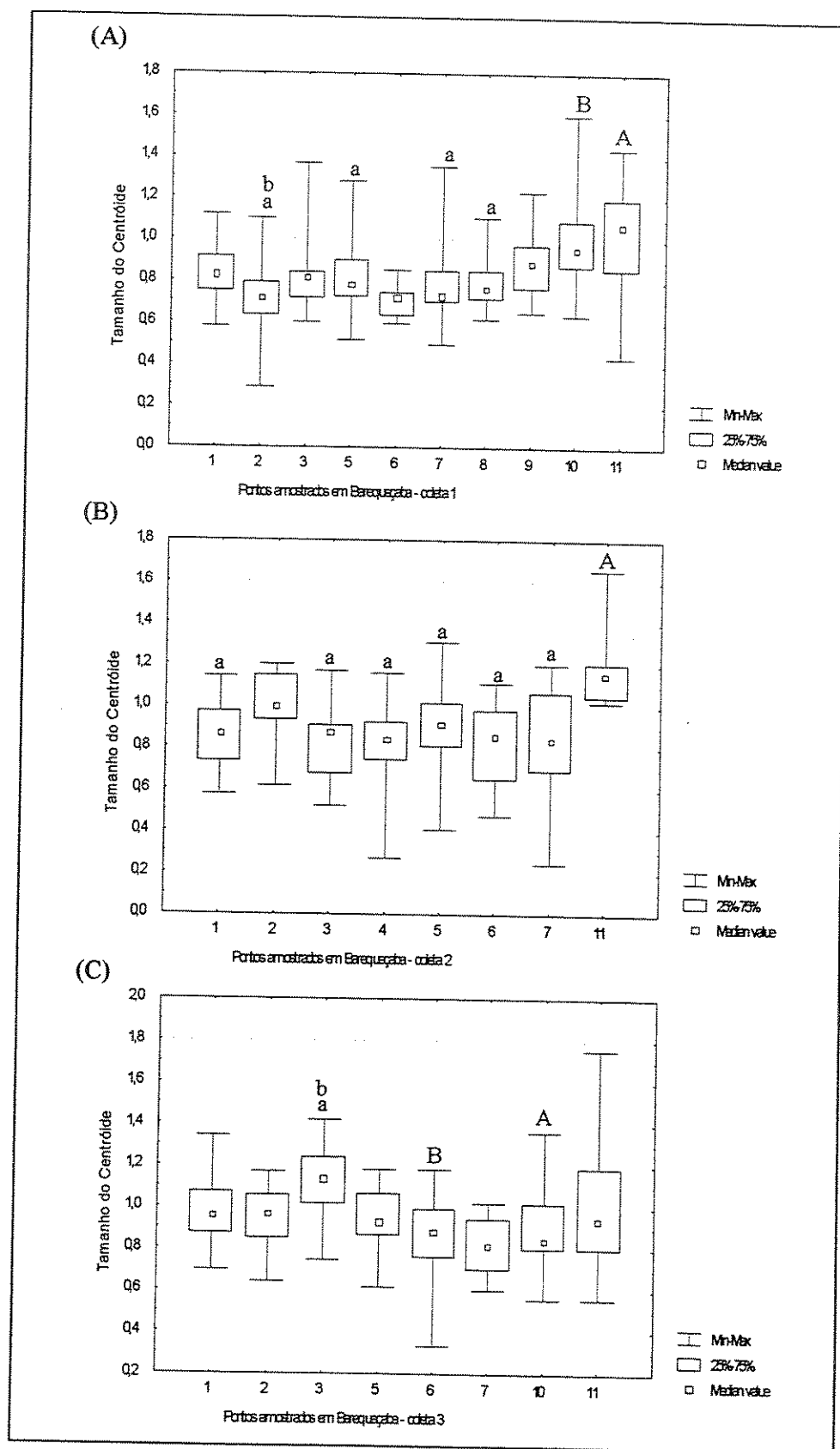


Figura 3.2. Distribuição do tamanho do centróide ao longo do transecto de coleta da praia de Barequeçaba, representada na forma de box-plots. (A) Distribuição obtida na primeira coleta, (B) na segunda coleta e (C) na terceira coleta.

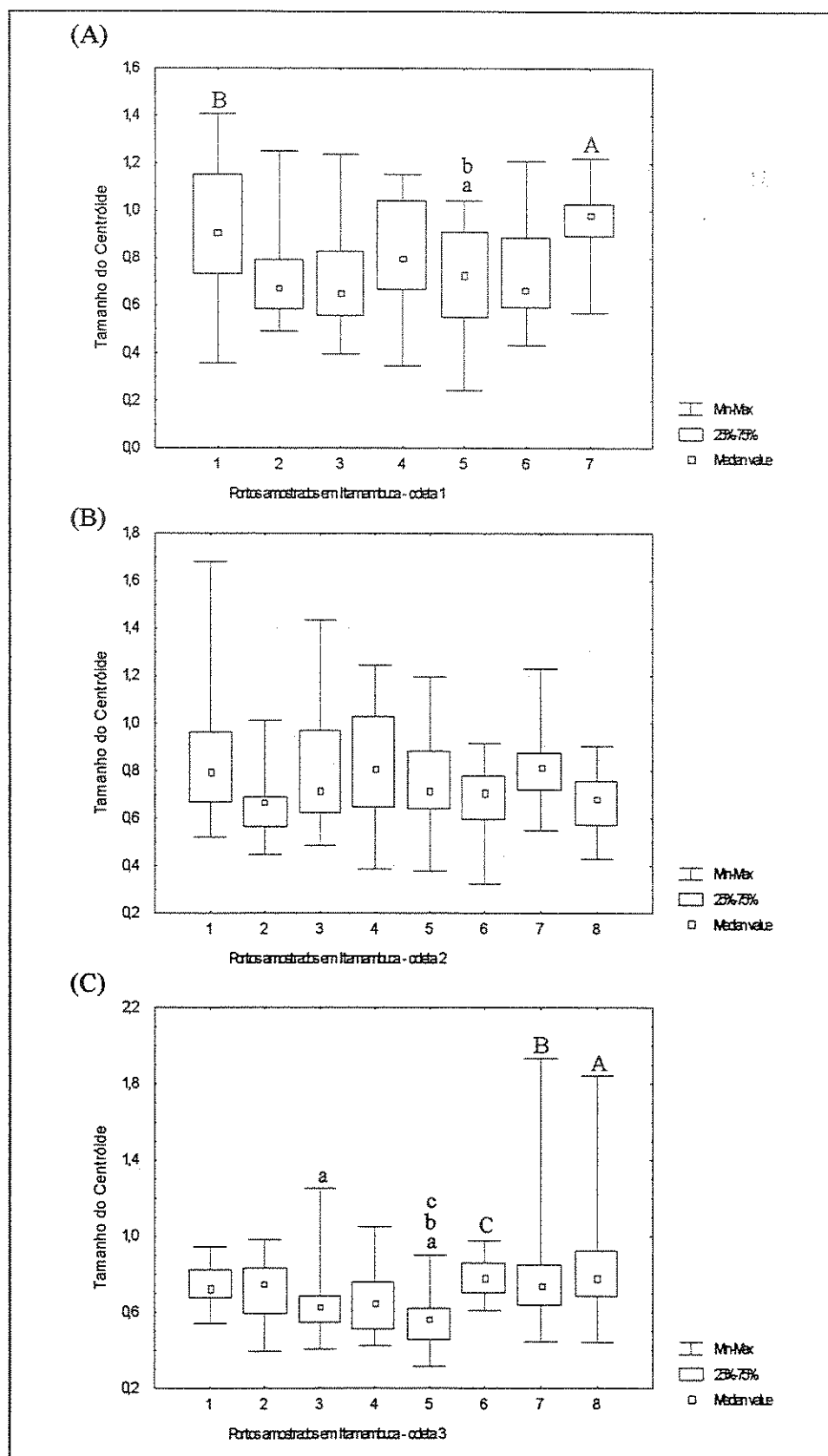


Figura 3.3. Distribuição do tamanho do centróide ao longo do transecto de coleta da praia de Itamambuca, representada na forma de box-plots. (A) Distribuição obtida na primeira coleta, (B) na segunda coleta e (C) na terceira coleta.

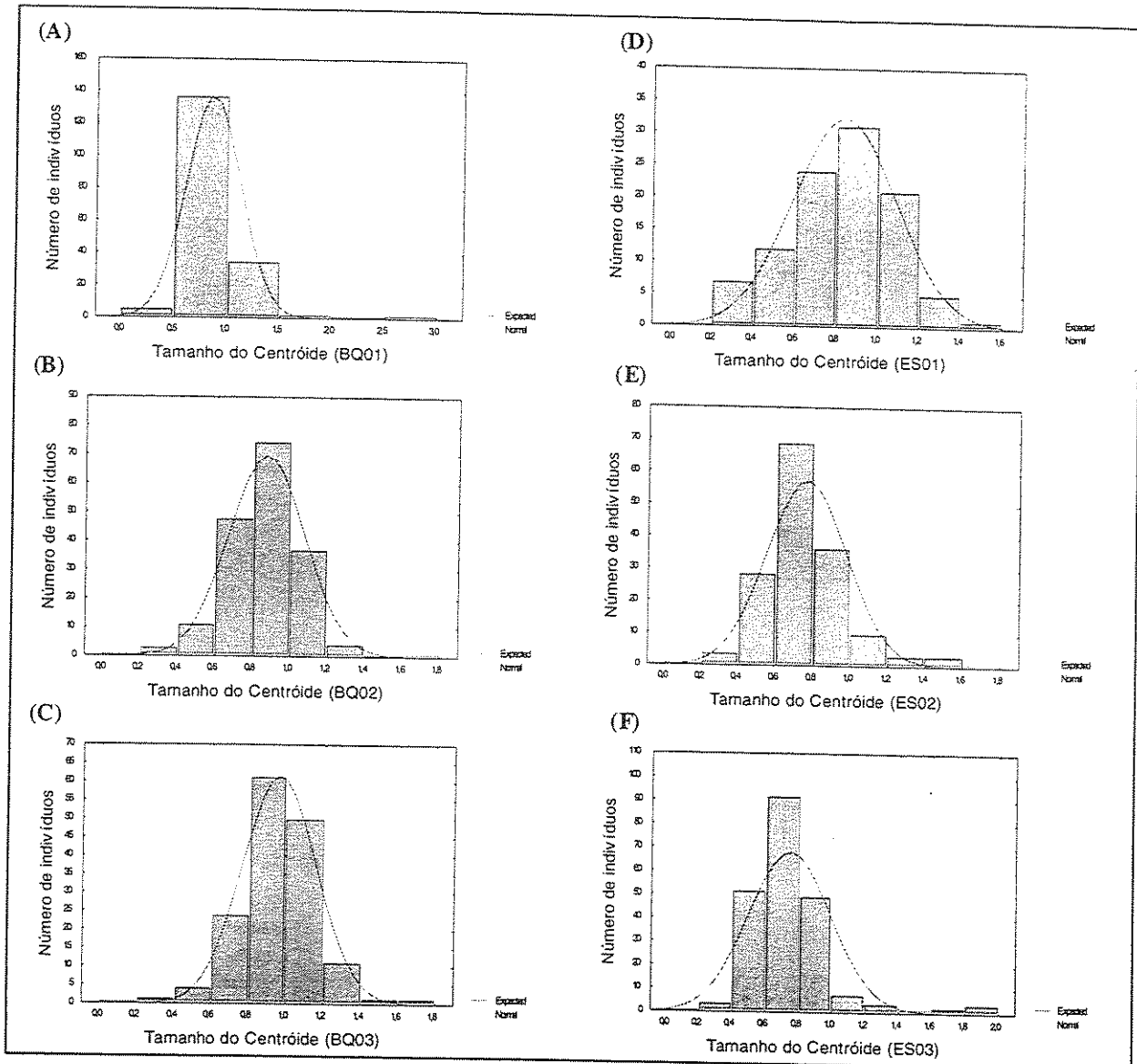


Figura 3.4. Distribuição dos tamanhos do centróide das conchas de *C. subrugosa* nas amostra totais de (A) Barequeçaba – primeira coleta, (B) Barequeçaba – segunda coleta, (C) Barequeçaba – terceira coleta, (D) Itamambuca – primeira coleta, (E) Itamambuca – segunda coleta e (F) Itamambuca – terceira coleta.

3.4.3. A forma das conchas

3.4.3.1. Os componentes uniformes

Relação com os marcos anatômicos. Na vista dorsal (figura 3.1) o primeiro componente uniforme expressou a variação no eixo do comprimento da concha, e a posição do ápice nesse eixo. O segundo componente uniforme expressou a variação no eixo da largura.

Na vista lateral da concha (figura 3.1), o primeiro componente uniforme expressou a variação no eixo do comprimento, o que envolve a posição do ápice, e o segundo componente uniforme expressou a variação no eixo da altura da concha.

No espaço. Na vista dorsal da concha, todos os pontos das três coletas de Barequeçaba apresentaram valores significativamente diferentes para os dois componentes uniformes (figuras 3.5 e 3.6). Os valores do primeiro componente uniforme não apresentaram correlação com a distância entre os pontos (Mantel, $Z = 245$, $p > 0.05$). No primeiro componente uniforme, o ponto 5 do transecto apresentou os maiores valores, e o ponto 6 os menores em todas as amostras de Barequeçaba. No segundo componente uniforme, detectamos um gradiente na variação espacial dos valores, que aumentam em direção ao final do transecto, ao mar (Mantel, $Z = 874$, $p < 0.05$).

Em Itamambuca, apenas alguns pontos se diferenciaram significativamente e apenas no segundo componente uniforme. Em nenhuma das coletas foi detectada correlação entre os valores de componentes uniformes e a distância entre os pontos.

Na vista lateral da concha, apenas alguns pontos as das duas praias (figura 3.7 e 3.8) se diferenciam no segundo componente uniforme. Na segunda coleta de ambas as praias não houve a diferenciação entre pontos.

No tempo. Para a vista dorsal da concha, todos os pontos amostrados em Barequeçaba apresentaram valores significativamente diferentes entre as três coletas. Em Itamambuca nenhum dos pontos apresentou variação entre as coletas. Para a vista lateral da concha não foi detectada variação temporal nos dois componentes uniformes em nenhuma das duas praias.

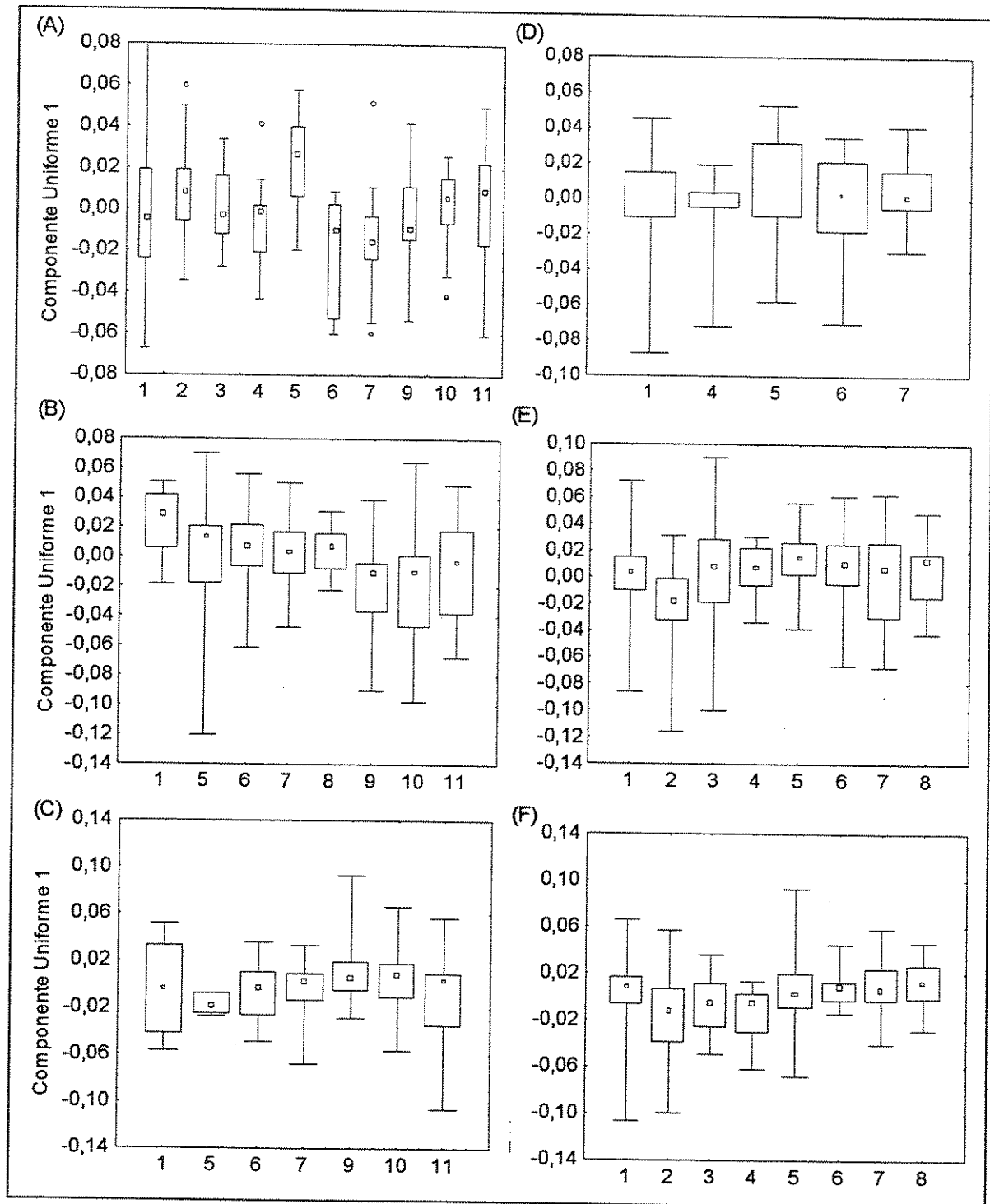


Figura 3.5. Box-plots das distribuições de valores do componente uniforme 1 na análise da vista dorsal da concha de *C. subrugosa* para os pontos amostrados nas duas praias estudadas. (A) Barequeçaba – primeira coleta, (B) Barequeçaba – segunda coleta, (C) Barequeçaba – terceira coleta, (D) Itamambuca – primeira coleta, (E) Itamambuca – segunda coleta e (F) Itamambuca – terceira coleta.

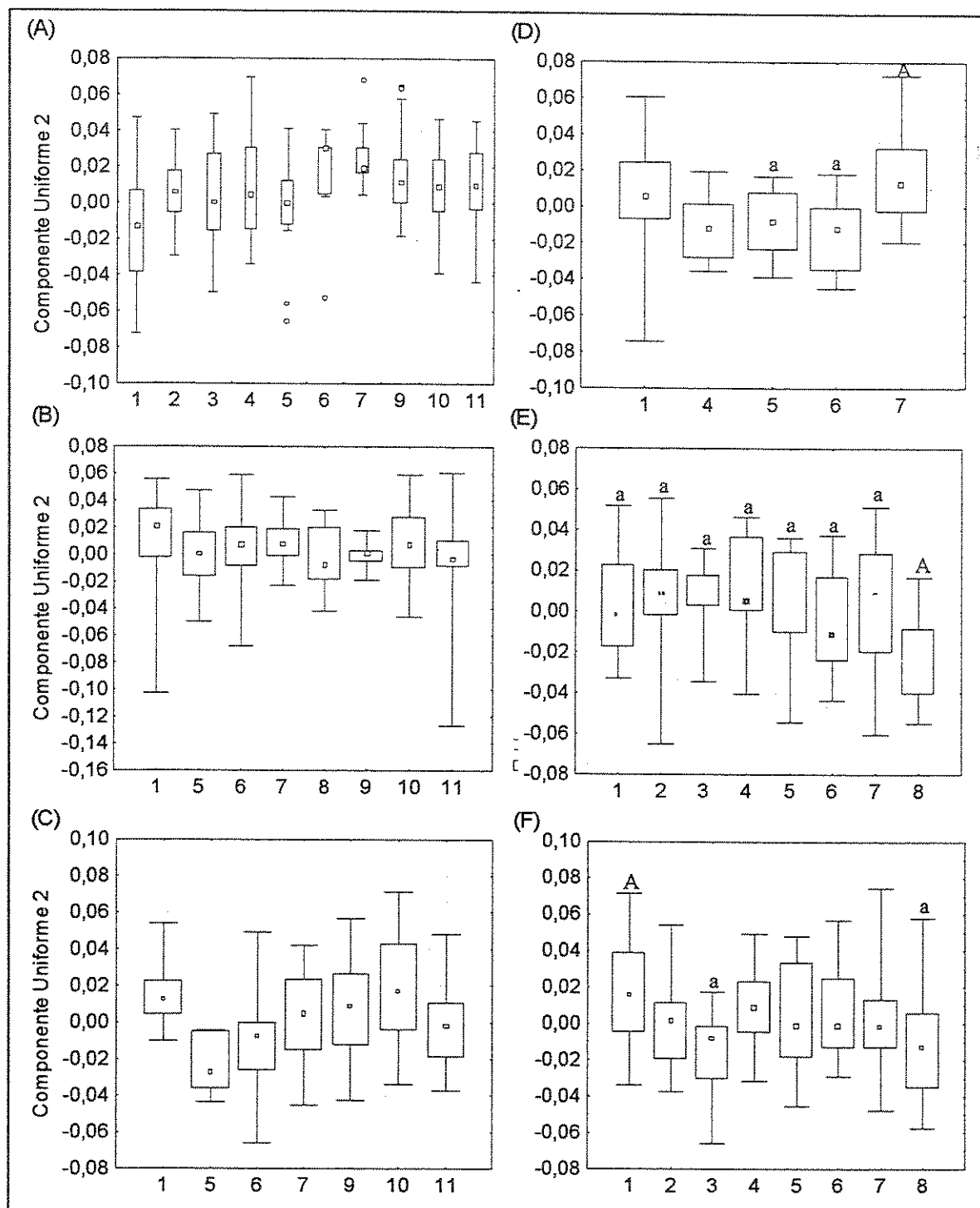


Figura 3.6. Box-plots das distribuições de valores do componente uniforme 2 na análise da vista dorsal da concha de *C. subrugosa* para os pontos amostrados nas duas praias estudadas. (A) Barequeçaba – primeira coleta, (B) Barequeçaba – segunda coleta, (C) Barequeçaba – terceira coleta, (D) Itamambuca – primeira coleta, (E) Itamambuca – segunda coleta e (F) Itamambuca – terceira coleta.

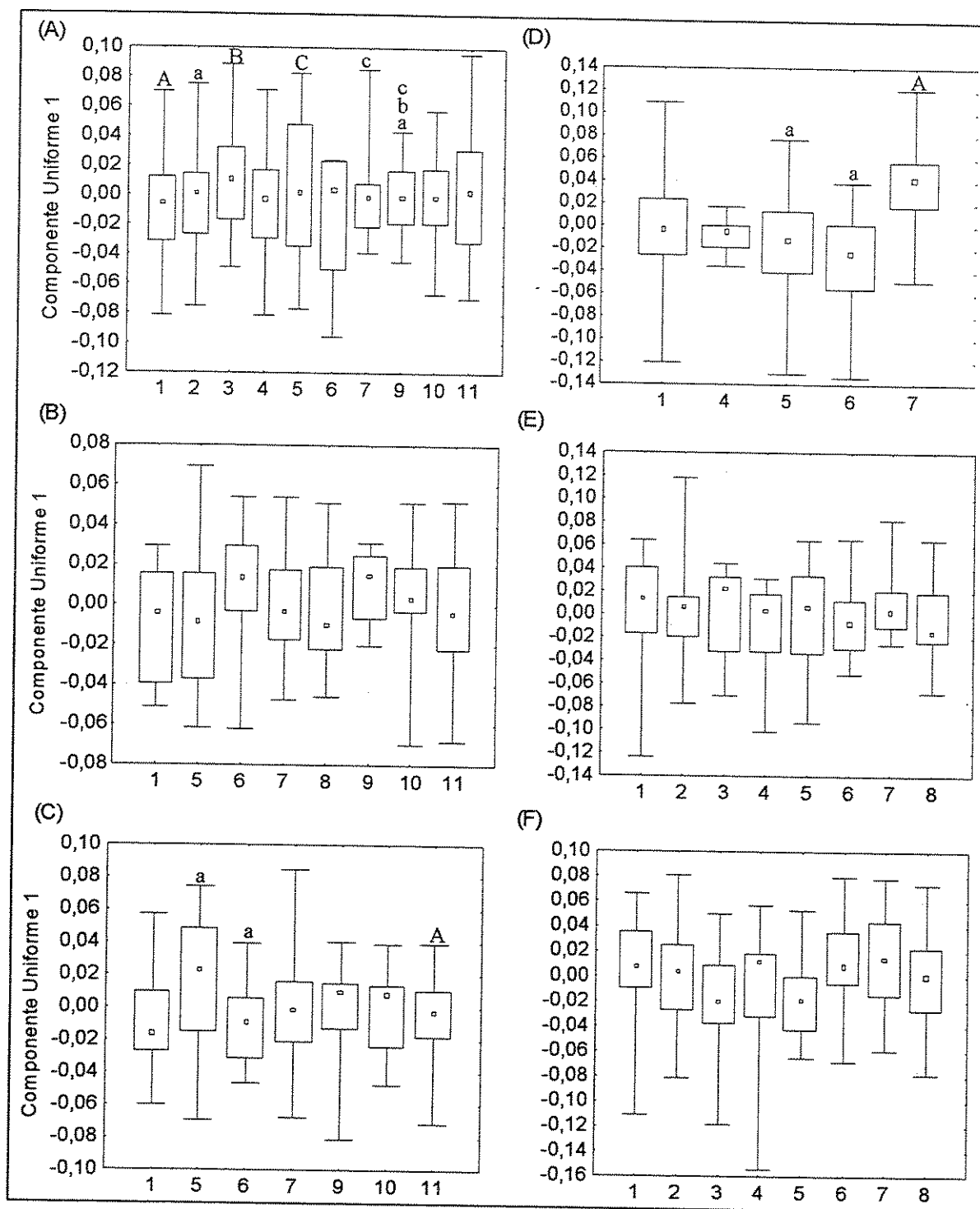


Figura 3.7. Box-plots das distribuições de valores do componente uniforme 1 na análise da vista lateral da concha de *C. subrugosa* para os pontos amostrados nas duas praias estudadas. (A) Barequeçaba – primeira coleta, (B) Barequeçaba – segunda coleta, (C) Barequeçaba – terceira coleta, (D) Itamambuca – primeira coleta, (E) Itamambuca – segunda coleta e (F) Itamambuca – terceira coleta.

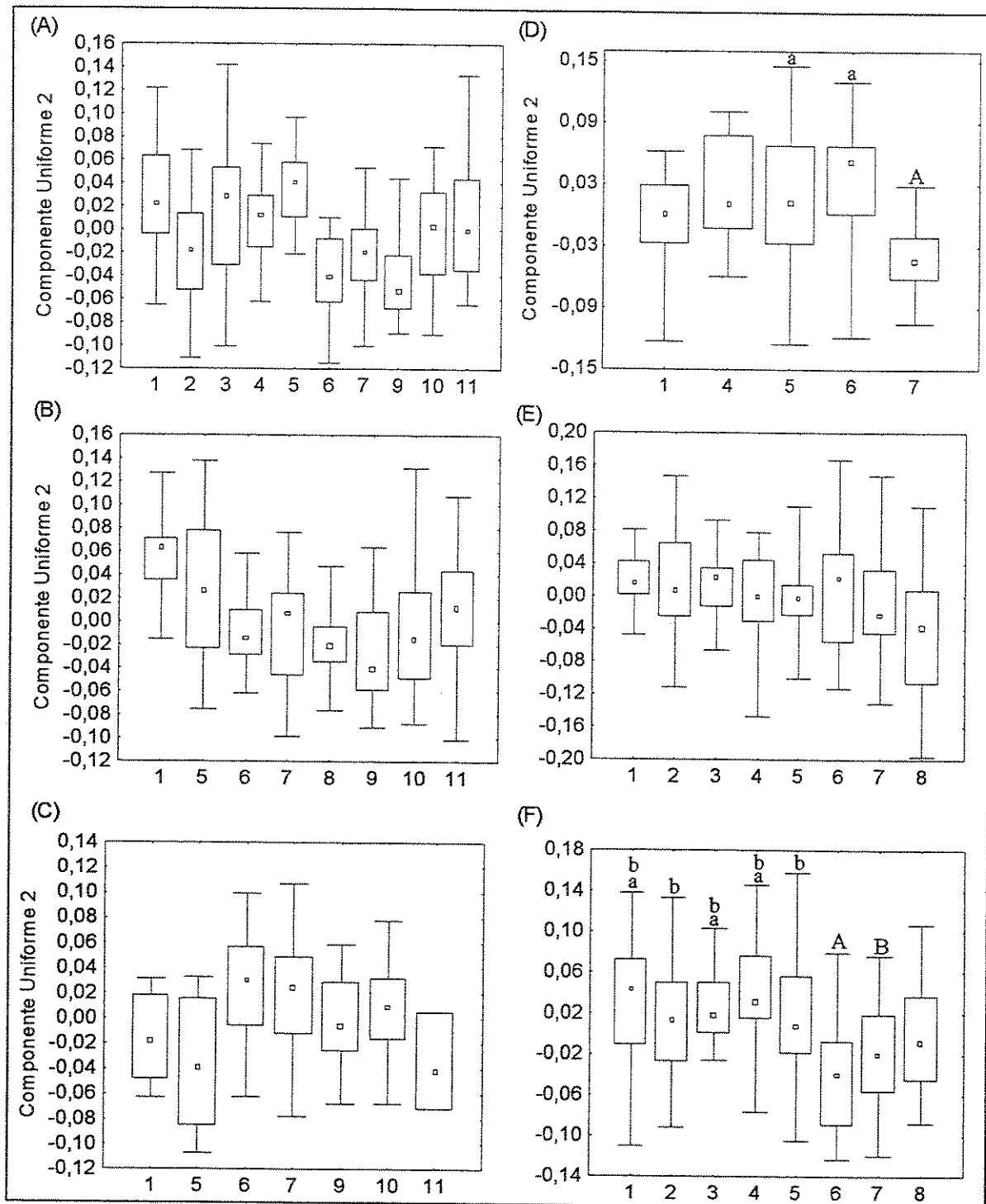


Figura 3.8. Box-plots das distribuições de valores do componente uniforme 2 na análise da vista lateral da concha de *C. subrugosa* para os pontos amostrados nas duas praias estudadas. (A) Barequeçaba – primeira coleta, (B) Barequeçaba – segunda coleta, (C) Barequeçaba – terceira coleta, (D) Itamambuca – primeira coleta, (E) Itamambuca – segunda coleta e (F) Itamambuca – terceira coleta.

3.4.3.2. As deformações principais (Relative Warps)

Apenas as duas primeiras deformações principais apresentaram significância nas análises espaciais e temporais e, portanto, apenas elas serão apresentadas e discutidas neste trabalho.

Relação com os marcos anatômicos. A primeira deformação principal expressou a posição dos marcos da largura da concha ao longo do seu eixo central. A segunda, expressou a largura da concha acrescida de uma pequena variação na posição vertical do ápice (figura 3.9).

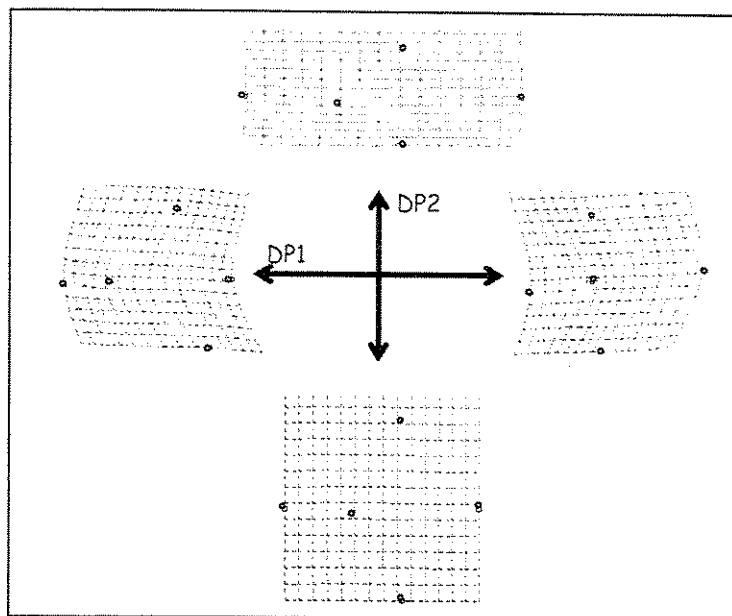


Figura 3.9. Variação da forma da vista dorsal concha ao longo dos dois primeiros eixos de deformações principais (DP).

No espaço. Em Barequeçaba, todos os pontos do transecto apresentaram valores significativamente diferentes para as duas deformações principais nas três coletas (figuras 3.9 e 3.10). Em Itamambuca, alguns pontos se diferenciaram significativamente apenas na deformação principal 1 nas duas primeiras coletas, e nas duas deformações principais na terceira coleta.

Em relação às comparações pareadas significativas, na primeira coleta de Itamambuca apenas os pontos 5 e 6 se diferenciaram do ponto 7; na segunda coleta, o ponto 3 se diferenciou do ponto 6 e os

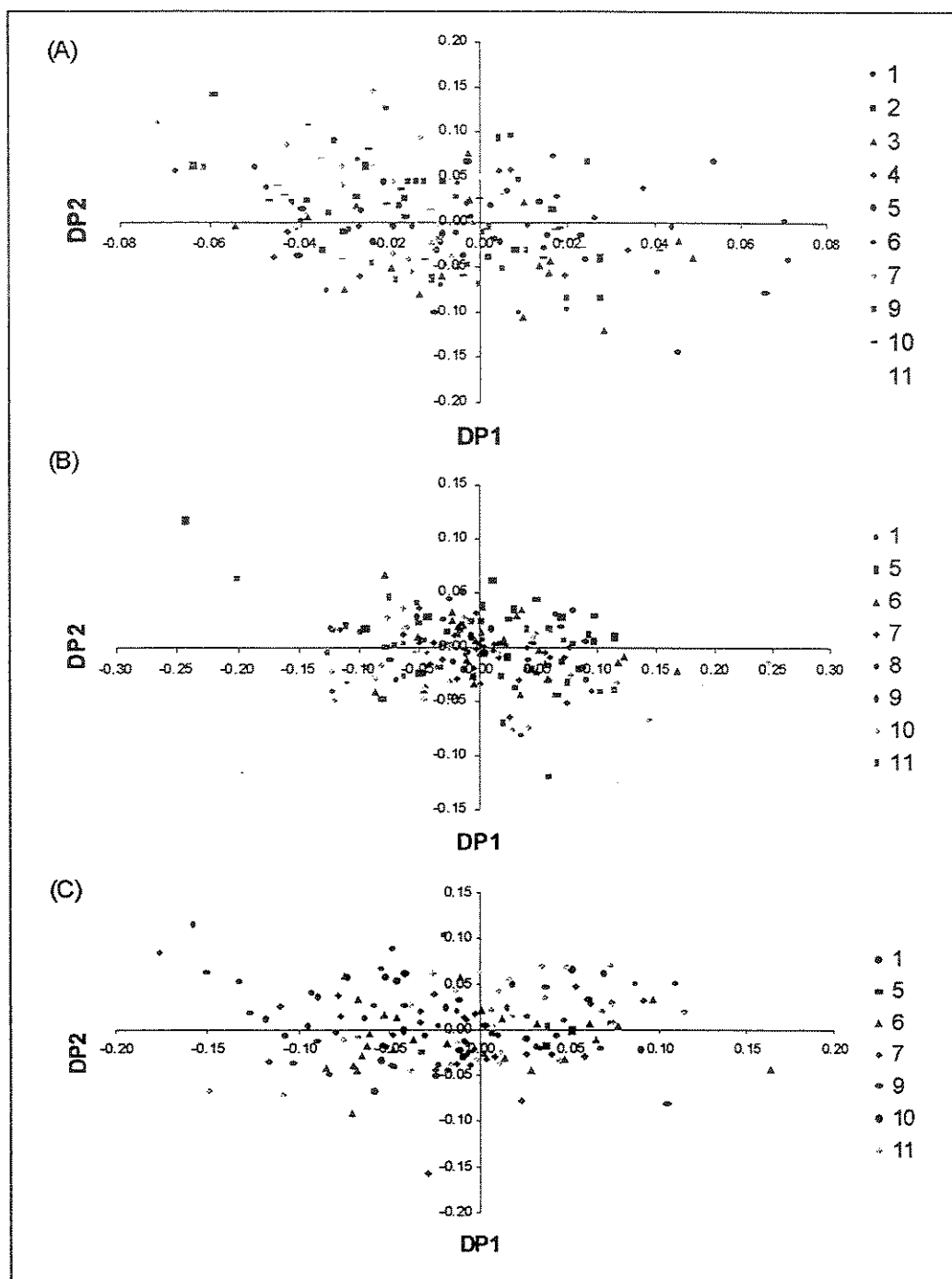


Figura 3.10. Relação observada entre os pontos amostrados em Barequeçaba para os valores de deformações principais (DP) 1 e 2. (A) primeira coleta, (B) segunda coleta e (C) terceira coleta. Apenas os pontos que apresentaram valores significativamente diferentes uns dos outros estão nos gráficos.

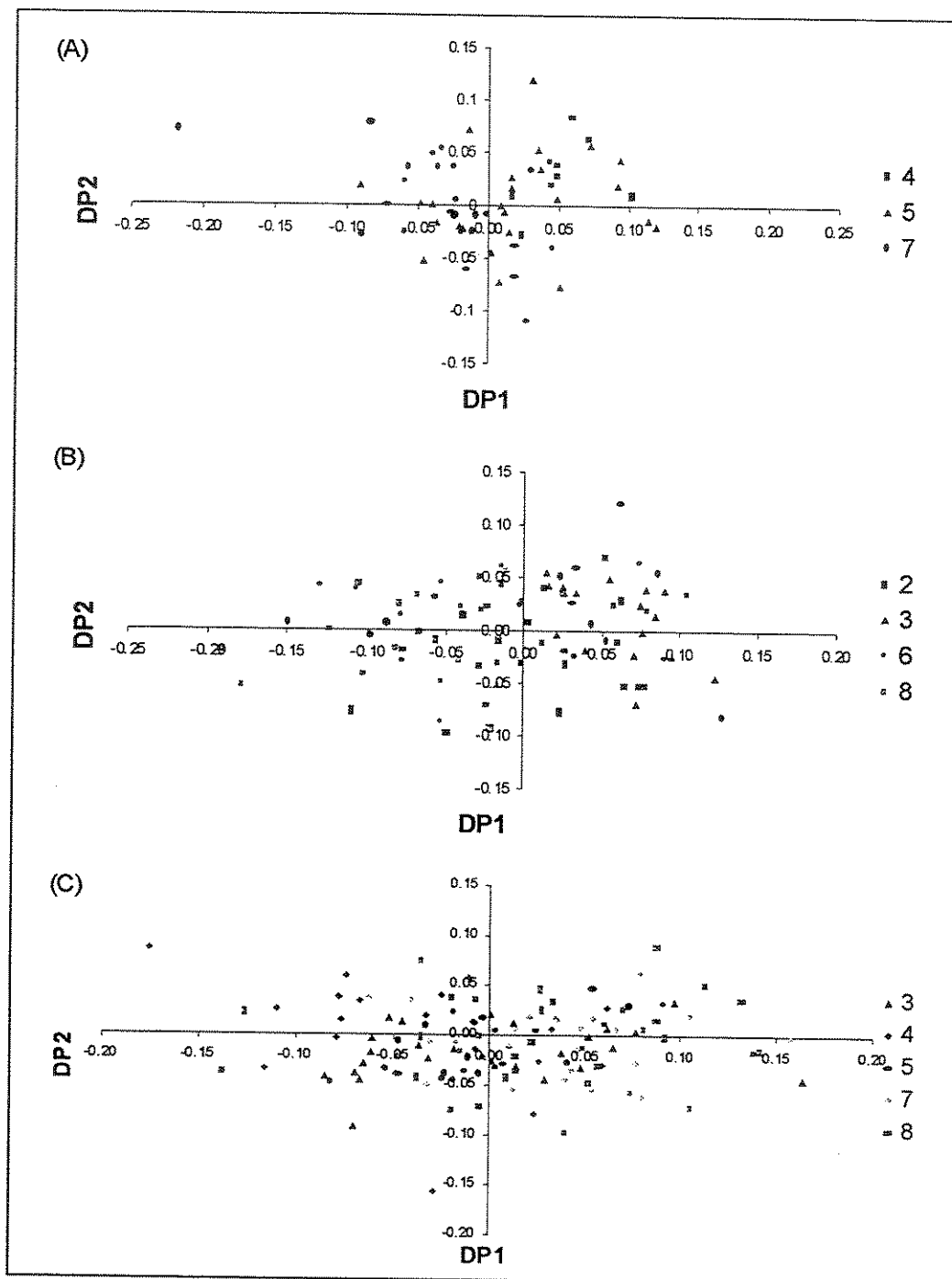


Figura 3.11. Relação observada entre os pontos amostrados em Itamambuca para os valores de deformações principais 1 e 2. (A) primeira coleta, (B) segunda coleta e (C) terceira coleta. Apenas os pontos que apresentaram valores significativamente diferentes uns dos outros estão nos gráficos.

pontos 2 e 3 do ponto 8; e na terceira coleta, os pontos 7 e 8 se diferenciaram do 1 e do 4 na primeira deformação principal, e o ponto 1 se diferenciou dos pontos 3 e 5 na segunda deformação principal. Os valores das deformações principais não apresentaram correlação com a distância entre os pontos para nenhuma das três amostras das duas praias através do teste de Mantel.

No tempo. Em Barequeçaba, todos os pontos apresentaram valores significativamente diferentes entre as coletas. Em Itamambuca, nenhum dos pontos amostrados apresentou diferença significativa entre coletas para as duas deformações, apesar das pequenas variações observadas.

3.5. DISCUSSÃO

3.5.1. O tamanho das conchas

Jaskow (1990) observando os indivíduos de duas praias de Ubatuba (SP), sugeriu que o pico de recrutamento de *Collisella subrugosa* seria no mês de agosto. Entretanto, Tanaka et al. (2002) estudaram outras três praias deste mesmo município e sugeririam que o pico de recrutamento seria no mês de novembro. Nas amostras do presente trabalho, o aumento no tamanho médio dos indivíduos em Barequeçaba (figura 3.4) pode ser consequência da amostragem de novembro estar próxima do pico de recrutamento sugerido por Jaskow (1990), em agosto. Assim, esse aumento no tamanho médio em Barequeçaba sugeriria que muito poucos indivíduos teriam recrutado entre as coletas. No entanto, o tamanho médio dos indivíduos diminuiu ao longo do verão em Itamambuca como foi observado por Tanaka et al. (2002). Esses autores também observaram que o pico de recrutamento no verão ocorria principalmente nas regiões inferiores da entremarés. Em Barequeçaba, essa região apresenta uma grande densidade de uma outra lapa, *Siphonaria hispida*, que poderia estar afetando a disponibilidade de espaço para recrutamento de *C. subrugosa* nessa região.

Em Barequeçaba a presença de indivíduos menores que a média nos primeiros pontos pode ser consequência da presença da ostra *Crassostrea risophorea* nessa área mais próxima à praia. Nessa praia, os indivíduos menores de *C. subrugosa* usam as ostras como sítio para “homming” o que seria uma

resposta de escape do stress de dessecação e desse modo, onde as conchas de ostras estão presentes, há mais indivíduos menores que a média do que seria esperado ao acaso (José et al., em prep).

Em Itamambuca, a presença de indivíduos maiores na área mais próxima ao rio pode estar relacionada a tolerância à baixa salinidade ou a uma menor taxa de recrutamento de *C. subrugosa*, já que a densidade de indivíduos dessa espécie é realmente menor nessa área do estuário. Indivíduos maiores são considerados mais eficientes em ambientes com alimento e espaço limitado (Boaventura et al. 2003). No entanto, a competição intraespecífica parece importante neste estuário, que possui grande abundância de algas e grandes áreas de rocha nua.

O padrão de variação no tamanho da concha não é congruente entre as duas praias e pode indicar uma diferença na distribuição dos indivíduos de diferentes idades resultante de diferenças entre os dois costões (estuário/mar e batido/abrigado) e de uma variação temporal nessa distribuição. Tanaka et al. (2002) encontraram variações na distribuição vertical de tamanhos de *C. subrugosa* ao longo do tempo e também entre praias.

A formação de gradientes de tamanho em Barequeçaba é comum em patelogastrópodes e poderia estar relacionada à competição inter e intraespecífica (entre as classes etárias) por alimento e espaço (Branch 1983, Marshall e Keough 1994, Boaventura et al. 2003). No entanto, se essas interações fossem importantes na estruturação de tamanhos ao longo do costão esperaríamos observar esses gradientes em todas as coletas.

A variação temporal no tamanho das conchas em cada ponto de coleta sugere, mais uma vez, que houve recrutamento ao longo das coletas. A ausência de um padrão na variação temporal de tamanho nos pontos sugere que o recrutamento não ocorre em todos os pontos em todos os intervalos de tempo. Essa é uma idéia plausível já que o recrutamento depende de condições do microhabitat como espaço disponível livre de competidores e predadores (Lohse 1993, Morgan 1995).

3.5.2. A forma das conchas

Para os marcos anatômicos usados em *C. subrugosa*, as variações uniformes são tão ou até mais importantes do que as variações nas deformações principais. Isso porque na vista lateral, a presença de apenas três marcos faz com que apenas as variações uniformes possam ser estudadas e na vista dorsal, variações simples no comprimento e na largura da concha são muito informativas na relação da forma dessas conchas cônicas com a variação ambiental (Branch 1981, Denny 2000, Tanaka et al. 2002).

A variação detectada na forma da concha é maior no espaço que no tempo, ou seja, apesar de existir variação temporal, a variação na forma entre os microhabitats de um mesmo costão é mais ampla. Além disso, comparando os dados do presente trabalho com o trabalho anterior em macro-escala (José e Solferini, em preparação), pode-se dizer que a variação de grande escala, entre costões, é ainda mais ampla que a de pequena escala, dentro de um mesmo costão. Essa relação seria esperada considerando que a amplitude da variação ambiental aumenta de acordo com a escala de amostragem.

Em Barequeçaba há diferenciação de forma da concha entre pontos (para os dois componentes uniformes e para as duas deformações principais) ao longo do transecto. O gradiente observado no segundo componente uniforme indica uma variação gradual na largura das conchas, que aumenta em direção ao mar na primeira coleta e diminui na mesma direção na segunda (figura 3.6). A maior largura da concha poderia estar relacionada à força de arrasto gerada pela turbulência da água ou por ventos fortes (Magalhães e Coutinho 1995, Chapman 1997, Denny 2000, Tanaka et al. 2002), e ao stress térmico (Vermeij 1973, Johson 1975, Branch 1981). No entanto, este costão é abrigado e a turbulência da água não seria um fator tão importante neste, quanto os ventos fortes e/ou o stress térmico.

A diferenciação de forma entre os pontos de Itamambuca foi bem menor que a observada em Barequeçaba. A diferenciação entre os pontos amostrados em Itamambuca foi similar para os valores do segundo componente uniforme e da segunda deformação principal, o que era esperado já que a variação de forma obtida nessas duas variáveis foi muito semelhante. Desse modo, na segunda coleta de Itamambuca a mudança no padrão de diferenciação entre os pontos pode ter sido consequência, principalmente, da variação na posição vertical do ápice. Essa variação, que poderia estar relacionada à turbulência da água

(Denny 2000, Denny e Blanchette 2000), foi muito pequena e não apresentou um padrão na variação temporal, o que reduz sua importância.

Também em Itamambuca, além da pequena variação espacial, não houve variação temporal de forma tanto nos componentes uniformes quanto nas deformações principais. Isso contrasta com o fato de que um estuário é normalmente considerado um ambiente mais heterogêneo que um costão exclusivamente marinho. Esses resultados sugerem que os fatores ambientais importantes para a determinação da forma da concha de *C. subrugosa* são em geral, constantes ao longo do tempo e espaço do estuário.

A turbulência da água é um fator que realmente parece variar pouco ao longo do estuário e do tempo, pois a correnteza do rio promoveria a mesma força de “arrasto” e “levantamento” em todos os pontos por ele banhado. Essa idéia está de acordo com a diferenciação do ponto 8 observada, apresentando valores significativamente menores no segundo componente uniforme, na segunda coleta já que esse ponto está localizado completamente fora da região do estuário.

A variação de valores dos dois componentes uniformes tanto da vista dorsal, quando da vista lateral das conchas de Barequeçaba entre as coletas mostra uma grande variação na forma da concha em intervalos de tempo de apenas três meses. Como não houve nenhum padrão na variação temporal (dos componentes uniformes e das deformações principais) pode-se inferir que há mais de um fator ambiental variável no tempo determinando essa variação de formas.

As variações na largura e no comprimento da concha podem estar relacionadas à turbulência da água, a ventos fortes criando forças de “arrasto” e também ao stress térmico. Indivíduos com maior área da base da concha seriam mais resistentes à força de arrasto (Cook 1979, Simpson 1985, Denny 2000, Denny e Blanchette 2000) e indivíduos com menor área da base seriam menos sensíveis ao stress térmico por apresentar menor área de contato com o substrato (Wolcott 1973, Johson 1975, Branch 1981).

As variações da posição do ápice podem também estar relacionadas à força de “arrasto”, quanto mais central o ápice, maior a resistência ao arrasto (Denny 2000). De fato, nos dois eixos de deformação principal estudados, a posição do ápice varia junto com a largura da concha. No primeiro eixo, os maiores

valores correspondem a conchas mais largas na posição central, e também a ápices mais próximos ao centro da concha (figura 3.9). No segundo eixo, os menores valores correspondem a conchas mais largas e com um menor deslocamento vertical do ápice. Isto pode ser uma evidência de que é a força de arrasto, resultante provavelmente de ventos fortes, que está influenciando a forma das conchas em Barequeçaba.

As variações na altura podem estar relacionadas à dessecação (Orton, 1932, Davies 1969, Moore 1934, Voss 1959, Ebling et al. 1962, Balaparaeswara Rao e Ganapati 1971, Wolcott 1973, Branch 1975a e b, Bannister 1975) ou à força de levantamento resultante da turbulência da água (Denny e Blanchette 2000). Tanaka et al. (2002) sugeriram que a altura da concha de *C. subrugosa* seria mais influenciada pelo grau de exposição ao vento do que pela dessecação em si. Entretanto, a turbulência da água não pode ser desprezada como um importante fator na variação da altura das conchas dessa lapa pois em uma análise em escala macro-geográfica, os indivíduos de *C. subrugosa* apresentaram maiores alturas relativas em praias mais expostas (José e Solferini, em prep).

Os resultados corroboram a idéia de que a força de “arrasto” (pela turbulência da água ou pela força dos ventos) possui grande influência na determinação da forma da concha de *C. subrugosa*. Em Barequeçaba observamos grandes variações na segunda deformação principal que reflete variações na largura e área do pé dos indivíduos, o que provavelmente resulta da ação de ventos fortes. Em Itamambuca observamos homogeneidade na forma da concha ao longo da área de estuário, que provavelmente decorre da ação da turbulência da água. No entanto, o stress dessecação parece ser também um fator importante, na distribuição de tamanhos dos indivíduos ao longo do costão, ao menos em Barequeçaba onde o stress por dessecação deve ser muito maior que em Itamambuca.

3.6. Conclusões

Houve variação espacial e temporal e forma da concha de *C. subrugosa* nas praias estudadas nesse intervalo de tempo. Entretanto, nenhum padrão espacial de tamanho e/ou forma se manteve ao longo do tempo. As duas praias estudadas diferiram bastante, tanto na distribuição de tamanhos quanto de forma, o que deve ser resultado das diferentes características ambientais dessas duas praias.

A variação de tamanho e forma foi maior no espaço que no tempo e menor que o observado em macro-escala no trabalho anterior. Houve recrutamento ao longo do período de coletas com diferente intensidade entre as praias, o que dificultou a definição de um pico.

Em relação ao tamanho da concha, não foi possível identificar uma única característica ambiental que fosse a mais importante na determinação dessa variação. De acordo com a segregação de tamanhos entre as duas grandes áreas do costão observada em Barequeçaba e sua relação com a presença de *Crassostrea risophorea*, podemos imaginar que dessecação é um importante fator na determinação da distribuição de tamanhos e até mesmo de classes etárias no espaço.

Em relação à forma, as variações observadas indicam que a força de arrasto tem grande importância e influência na determinação dessas. Ventos fortes estariam determinando a largura da concha e a posição do ápice no costão de Barequeçaba, e a turbulência da água a altura da concha e também a posição do ápice no estuário de Itamambuca.

3.7. LITERATURA CITADA

- Bannister JV (1975). Shell parameters in relation to zonation in mediterranean limpets. Marine Biology 31(1): 63-67.
- Boaventura D, Da Fonseca LC and Hawkins SJ (2003). Size matters: competition within populations of the limpet *Patella depressa*. Journal of Animal Ecology 72(3): 435-446.
- Bookstein FL (1991). Morphometric tools for landmark data. Geometry and biology. New York, USA, Cambridge University Press.
- Bookstein FL (1996). Standard formula for the uniform shape component in landmark data. Advances in Morphometrics. L. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. Naylor and D. E. Slice. New York, Plenum Publishing Corp.: 153-168.
- Branch GM (1975). Ecology of *Patella* species from Cape Peninsula, South-Africa .4. Desiccation. Marine Biology 32(2): 179-188.
- Branch GM (1975). Intraspecific competition in *Patella cochlear* Born. Journal of Animal Ecology 44(1): 263-&.
- Branch GM (1981). The biology of limpets: physical factors, energy flow, and ecological interactions. Oceanography and Marine Biology Annual Review 19: 235-380.
- Branch GM and Marsh AC (1978). Tenacity and shell shape in 6 *Patella* species - Adaptive features. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 34(2): 111-130.

- Chapman MG (1997). Relationships between shell shape, water reserves, survivorship and growth of highshore littorinids under experimental conditions in New South Wales, Australia. Journal of Molluscan Studies **63**: 511-529.
- Cook SB (1979). Shell shape in a pulmonate limpet. American Zoologist **19**(3): 1007-1007.
- Davies PS (1969). Physiological ecology of *Patella* .3. Desiccation effects. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **49**(2): 291-&.
- Denny MW (2000). Limits to optimization: Fluid dynamics, adhesive strength and the evolution of shape in limpet shells. Journal of Experimental Biology **203**(17): 2603-2622.
- Denny MW and Blanchette CA (2000). Hydrodynamics, shell shape, behavior and survivorship in the owl limpet *Lottia gigantea*. Journal of Experimental Biology **203**(17): 2623-2639.
- Ebling FJ, Sloane JF, Kitching JA and Davies HM (1962). The ecology of Lough Ine .12. The distribution and characteristics of *Patella* species. Journal of Animal Ecology **31**(3): 457-&.
- Fletcher WJ (1984). Intraspecific variation in the population dynamics and growth of the limpet *Cellana tramoserica*. Oecologia **63**(1): 110-121.
- Jaskow A (1990). Aspectos do comportamento de *Acmaea subrugosa* (Gastropoda: Prosobranchia) na praia do segredo, São Sebastião (SP-Brasil). Tese de Mestrado. São Paulo, Brasil, Universidade de São Paulo.
- Johnson SE (1975). In: Perspectives of biophysical ecology. D. M. Gates and R. B. Schmerl. Berlin, Springer Verlag: 559-587.
- Lindberg DR (1981). Acmaeidae: Gastropoda, Mollusca. Pacific Grove, CA, USA, The Boxwood Press. 122p.
- Lohse DP (1993). The effects of substratum type on the population dynamics of three common intertidal animals. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **173**: 133-154.
- Magalhães CA and Coutinho C (1995). Distribution and zonation of three species of predatory gastropods: patterns and adaptation to wave impact on the rocky shore. Publicação Especial do Instituto Oceanográfico, São Paulo **11**: 123-131.
- Marshall PA and Keough MJ (1994). Asymmetry in intraespecific competition in the limpet *Cellana tramoserica* (Sowerby). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **177**: 121-138.
- Miller SL (1974). Adaptive design of locomotion and foot form in prosobranch gastropods. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **14**: 99-156.
- Monteiro LR and Reis SF (1999). Princípios de morfometria geométrica. Ribeirão Preto, SP, Holos Editora, 198p.
- Moore HB (1934). The relation of shell growth to environmental in *Patella vulgata*. Proceedings Malacological Society London **21**: 217-222.
- Morgan SG (1995). Life and death in the plankton: larval mortality and adaptation. Ecology of marine invertebrate larvae. L. McEdward. New York, CRC press
- Orton JH (1932). Studies on the relation between organism and environment. Proceedings of Liverpool Biological Society **46**: 1-16.
- Rao MB and Ganapati PN (1971). Ecological studies on a tropical limpet, *Cellana radiata* - structural variations in shell in relation to distribution. Marine Biology **10**(3): 236-&.

- Righi G (1966). On the Brazilian species in the *Acmaea subrugosa* complex (Gastropoda: Prosobranchia: Patellacea). Malacologia 4: 269-295.
- Rohlf FJ (2001). TPS. Stony Brook, SUNY, Department of Ecology and Evolution.
- Simison WB and Lindberg DR (1999). Morphological and molecular resolution of a putative cryptic species complex: A case study of *Notoacmea fascicularis* (Menke, 1851) (Gastropoda : Patellogastropoda). Journal of Molluscan Studies 65: 99-109.
- Simpson RD (1985). Relationship between allometric growth, with respect to shell height, and habitats for two patellid limpets, *Nacella (Patinigera) macquariensis* Finlay, 1927, and *Cellana tramoserica* (Holten, 1802). Veliger 28(1): 18-27.
- Sokal RR and Rohlf JF (1995). Biometrics: the principles and practice of statistics in biological research, W H Freeman & Co
- StatSoft INC (1996). Statistica, for Windows. Tulsa, OK, USA.
- Tanaka MO, Duque-Estrada TEM and Magalhaes CA (2002). Dynamics of the acmaeid limpet *Collisella subrugosa* and vertical distribution of size and abundance along a wave exposure gradient. Journal of Molluscan Studies 68: 55-64
- Tokeshi M, Ota N and Kawai T (2000). A comparative study of morphometry in shell-bearing molluscs. Journal of Zoology 251: 31-38.
- Vermeij GJ (1973). Morphological patterns in high-Intertidal gastropods - adaptive strategies and their limitations. Marine Biology 20(4): 319-346.
- Vermeij GJ (1978). Biogeography and adaptation - patterns of marine life, Harvard University Press. 332p.
- Wolcott TG (1973). Physiological ecology and intertidal zonation in limpets (*Acmaea*) - critical look at limiting factors. Biological Bulletin 145(2): 389-422.

CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foram investigados aspectos da variação genética e morfológica de *Collisella subrugosa*. A variação genética foi estudada em diferentes escalas espaciais e no tempo, e a variação morfológica foi estudada dentro do ambiente dos costões rochosos e também no tempo complementando a descrição da variação entre costões de um trabalho anterior.

C. subrugosa apresentou alta variabilidade genética nos locos isoenzimáticos estudados, ainda maior que a apresentada por espécies do mesmo grupo. Em escala microgeográfica, essa variabilidade está correlacionada ao tamanho médio dos indivíduos, o que pode resultar de um processo de acúmulo de gerações.

A variabilidade genética de *C. subrugosa* também se apresentou pouco estruturada no espaço, tanto macro quanto microgeográfico. Entretanto, uma maior estruturação apareceu no tempo. Essa variação temporal das frequências gênicas poderia resultar de desvios ao acaso nas frequências gênicas do pequeno grupo de larvas que recruta ao longo de um costão.

Altos desvios às proporções esperadas por Hardy-Weinberg foram detectados em escala macrogeográfica nos locos isoenzimáticos estudados, sempre no sentido da deficiência de heterozigotos. Entretanto esses desvios foram menos frequentes nas amostras de escala microgeográfica estudadas. Essa redução na deficiência de heterozigotos está de acordo com a hipótese de “grupos de acasalamento” mas pode ser explicada também pelo efeito Wahlund.

A variação de forma da concha parece ser menor em escala microgeográfica que a observada em escala macrogeográfica em um trabalho anterior, mas parece ser maior no espaço que no tempo. As variações tamanho e forma não apresentaram padrão espacial e/ou temporal. De acordo com as variações observadas, pode-se inferir que o tamanho da concha é influenciado pelas taxas de dessecação no local e a forma da concha é influenciada por ventos fortes e/ou a turbulência da água.

Table: Allele frequency and sample size (N) for each loci. Samples are identified as in table 1.1. Alleles that appear only in one sample are in boldface.

Locus	Relative Mobility	Samples														LE	SQ	CG
		IC	SL	JQ	PP	BQ	Pp	LZ	LB	PA	MB	PV	LE	SQ	CG			
Est																		
(N)		31	32	25	31	22	20	32	13	40	15	10	29	31	9			
1	0,88	-	-	-	-	-	0,050	-	-	-	0,100	-	-	-	-			
2	0,94	0,016	0,203	0,020	0,161	0,182	0,225	0,031	-	0,287	-	0,100	0,017	0,016	0,167			
3	0	0,919	0,734	0,840	0,710	0,795	0,450	0,859	1,000	0,600	0,900	0,750	0,948	0,871	0,833			
4	1,03	0,065	0,063	0,140	0,129	0,023	0,225	0,063	-	0,100	-	0,150	0,034	0,032	-			
5	1,08	-	-	-	-	-	0,050	0,047	-	0,013	-	-	-	0,048	-			
6	1,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,032	-			
Fum																		
(N)		10	7	5	-	6	10	5	-	9	26	5	14	10	10			
1	0,69	0,050	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,100	-	-	-			
2	0,86	-	-	-	-	-	0,150	0,300	-	-	0,077	0,300	-	0,100	0,250			
3	0	0,900	1,000	0,800	-	1,000	0,850	0,600	-	0,667	0,923	0,300	0,964	0,800	0,650			
4	1,15	0,050	-	0,200	-	-	-	0,100	-	0,333	-	0,300	0,036	0,100	0,100			
Got-1																		
(N)		36	30	25	23	33	30	32	24	27	30	16	39	32	20			
1	0,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
2	0,88	-	-	-	0,043	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
3	0	0,972	0,983	0,980	0,913	1,000	0,967	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			
4	1,33	0,028	0,017	0,020	-	-	0,033	-	-	-	-	-	-	-	-			
5	1,60	-	-	-	0,043	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Got-2																		
(N)		36	41	30	39	33	30	32	24	40	30	16	39	32	20			
1	0,76	0,014	0,037	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
2	0,92	0,014	0,024	-	-	0,030	-	-	-	-	-	-	0,026	0,047	0,050			
3	0	0,917	0,902	0,900	0,897	0,818	0,833	0,828	0,958	0,913	0,917	0,938	0,910	0,938	0,925			
4	1,09	0,014	-	0,033	0,051	0,030	0,017	0,016	-	0,025	0,017	0,031	-	-	-			
5	1,17	0,042	0,037	0,067	0,026	0,045	0,133	0,109	0,042	0,063	0,017	0,031	0,013	-	0,025			
6	1,20	-	-	-	-	0,076	-	0,047	-	-	0,050	-	0,051	0,016	-			
7	1,40	-	-	-	-	-	0,017	-	-	-	-	-	-	-	-			
Idh-1																		
(N)		-	44	18	33	20	25	12	13	20	-	31	-	-	20			
1	0,3	-	0,057	-	-	-	-	-	-	0,100	-	-	-	-	-			
2	0,6	-	-	-	0,030	0,040	0,040	-	-	-	-	-	-	-	-			
3	0,8	-	0,068	0,056	0,091	0,040	0,040	-	-	-	-	-	-	-	-			
4	0	-	0,852	0,889	0,879	0,860	0,860	1,000	1,000	0,600	-	0,968	-	-	1,000			
5	1,25	-	0,023	-	-	0,060	0,060	-	-	0,200	-	-	-	-	-			
6	1,4	-	-	0,056	-	-	-	-	-	0,100	-	0,032	-	-	-			

Table: continued

Locus	R. M.	Samples											LE	SQ	CG	
		IC	SL	JQ	PP	BQ	Pp	LZ	LB	PA	MB	PV				
Ldh-2																
(N)		36	54	30	39	40	25	32	24	29	30	31	39	32	20	
1	0,25	0,014	-	0,033	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,025
2	0,56	0,014	0,019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,026	0,016	-	0,025
3	0,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,017	-	-	-	-	-
4	0,78	-	-	-	-	-	-	-	0,021	-	0,050	-	-	-	-	-
5	0	0,917	0,907	0,883	1,000	0,925	0,900	0,938	0,938	0,948	0,917	0,984	0,90	0,953	-	0,875
6	1,20	-	0,046	0,017	-	0,038	0,080	0,021	0,021	0,017	-	-	0,013	-	-	0,00
7	1,50	0,042	0,019	0,033	-	0,038	0,020	0,021	0,021	0,017	0,017	-	0,026	-	-	0,025
8	1,80	0,014	-	0,033	-	-	-	-	-	0,017	-	0,016	0,026	-	-	-
9	2,20	-	0,009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ldh-3																
(N)		32	-	5	-	9	-	20	11	-	30	-	35	32	-	-
1	0	0,969	-	0,900	-	0,833	-	1,000	1,000	-	0,917	-	0,986	0,984	-	-
2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,014	-	-	-
3	8	0,031	-	0,100	-	0,167	-	-	-	-	0,067	-	-	0,016	-	-
4	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,017	-	-	-	-	-
Lap-1																
(N)		30	6	8	-	4	10	25	11	9	4	5	19	22	10	
1	0,45	-	0,083	-	-	-	-	-	-	0,056	-	-	-	-	-	10
2	0,65	0,017	-	0,063	-	-	-	-	-	0,056	-	-	0,053	-	-	-
3	0,75	0,033	-	-	-	-	0,050	0,080	0,091	-	0,250	-	-	0,023	-	-
4	0,85	0,133	-	0,063	-	-	0,300	0,100	-	0,056	-	-	0,053	0,068	0,150	-
5	0,95	-	0,250	-	-	-	0,150	0,120	-	0,389	-	0,200	-	0,068	0,250	-
6	0	0,617	0,500	0,500	-	1,000	0,300	0,580	0,909	0,444	0,750	0,600	0,711	0,705	0,400	-
7	1,05	0,033	-	0,250	-	-	-	0,040	-	-	-	0,200	-	0,045	-	-
8	1,10	0,067	-	0,125	-	-	-	-	-	-	-	-	0,158	-	-	-
9	1,20	0,100	0,167	-	-	-	0,200	0,080	-	-	-	-	0,026	0,01	0,200	-
Lap-2																
(N)		30	36	27	18	15	17	25	12	27	4	37	18	21	22	
1	0,75	-	0,042	-	-	-	-	0,040	-	-	-	-	-	-	-	22
2	0,85	-	-	0,037	-	-	0,147	-	-	0,111	-	0,054	-	-	-	0,045
3	0,91	0,100	0,014	0,148	0,139	0,067	0,029	0,080	-	0,037	-	0,081	0,139	-	-	0,05
4	0	0,667	0,736	0,426	0,639	0,867	0,324	0,640	0,625	0,574	0,250	0,473	0,667	0,738	0,773	-
5	1,06	0,033	-	0,037	-	-	-	-	0,125	-	-	-	-	-	-	-
6	1,17	0,067	0,056	0,019	0,056	-	0,118	-	0,125	0,111	-	0,068	0,167	0,048	0,068	-
7	1,25	0,050	-	-	-	-	-	0,120	0,125	-	-	0,027	-	0,095	-	-
8	1,36	0,67	0,111	0,204	0,083	0,067	0,206	0,80	-	0,074	0,750	0,162	0,028	0,048	0,045	-
9	1,44	0,017	0,028	0,13	0,083	-	0,147	0,040	-	0,056	-	0,135	-	0,048	0,023	-
10	1,60	-	0,014	-	-	-	0,029	-	-	0,037	-	-	-	0,024	-	-

Samples

Locus	R. M.	IC	SL	JQ	PP	BQ	Pp	LZ	LB	PA	MB	PV	LE 2	SQ	CG
Me-1															
(N)		30	16	14	17	14	3	25	22	15	29	21	35	29	4
1	0,5	-	-	0,071	0,059	-	-	-	-	0,033	-	-	-	-	-
2	0,83	-	-	-	0,118	-	-	-	0,045	0,167	0,017	-	0,014	-	-
3	0,93	0,033	-	-	0,059	-	-	-	0,045	-	-	0,024	-	0,052	-
4	0	0,933	0,656	0,500	0,618	0,893	0,833	0,940	0,682	0,567	0,741	0,643	0,829	0,759	1,000
5	1,05	-	0,063	-	-	-	-	-	0,045	-	0,034	-	0,029	0,052	-
6	1,12	0,033	0,219	0,357	0,088	0,107	0,167	-	0,136	0,133	0,138	0,286	0,057	0,034	-
7	1,22	-	0,063	-	0,059	-	-	0,020	0,045	0,10	0,068	0,048	0,043	0,069	-
8	1,30	-	-	0,071	-	-	-	0,040	-	-	-	-	0,029	0,034	-
Me-2															
(N)		31	31	35	31	27	12	27	18	20	30	27	28	32	6
1	0,87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,018	-	-
2	0,96	0,016	0,032	0,043	0,065	0,037	-	-	0,056	-	0,083	0,093	0,054	-	0,083
3	0	0,952	0,952	0,929	0,871	0,926	1,000	0,944	0,889	1,000	0,917	0,870	0,875	0,984	0,917
4	1,06	0,016	0,016	0,029	0,65	0,037	-	0,056	0,056	-	-	0,037	0,054	0,016	-
Mdh-1															
(N)		36	-	10	-	9	-	20	11	-	30	-	39	32	-
1	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,031	-
2	0	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	0,909	-	1,000	-	1,000	0,969	-
3	1,60	-	-	-	-	-	-	-	0,045	-	-	-	-	-	-
4	2,40	-	-	-	-	-	-	-	0,045	-	-	-	-	-	-
Mdh-2															
(N)		36	47	30	39	40	30	32	24	40	30	16	9	32	20
1	0,87	0,014	-	0,017	-	-	-	-	-	-	0,033	-	-	-	-
2	0	0,986	1,000	0,983	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,967	1,000	1,000	1,000	1,000
Pgi															
(N)		36	46	30	38	39	25	32	24	30	23	26	39	32	5
1	0,16	-	-	-	-	-	-	0,031	-	-	-	-	-	-	-
2	0,20	0,028	0,022	-	0,053	0,026	-	0,016	-	0,067	0,022	-	0,13	0,016	-
3	0,40	0,042	0,022	0,050	0,039	0,051	0,120	0,016	0,042	-	0,065	-	0,103	0,063	-
4	0,70	0,028	-	0,083	0,066	0,013	0,060	-	-	0,067	0,022	-	0,013	-	0,200
5	0	0,847	0,902	0,783	0,816	0,897	0,780	0,922	0,813	0,867	0,848	0,938	0,833	0,875	0,800
6	1,18	0,028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1,25	0,028	0,054	-	0,013	-	0,040	-	0,104	-	0,043	0,031	0,038	0,031	-
8	1,50	-	-	0,017	0,013	0,013	-	0,016	0,042	-	-	0,031	-	0,016	-
9	1,70	-	-	0,067	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table: continued

Locus	R. M.	IC	SL	JQ	PP	BQ	Pp	Samples							CG
								LZ	LB	PA	MB	PV	LE 2	SQ	
Pgm-1															
(N)		24	-	6	-	5	-	20	9	-	12	5	34	32	-
1	0,18	-	-	-	-	-	-	-	0,056	-	-	-	-	0,016	-
2	0,60	0,042	-	0,250	-	-	-	-	0,111	-	-	-	0,029	0,016	-
3	0,72	-	-	-	-	0,100	-	0,050	0,167	-	-	0,200	0,074	0,047	-
4	0,90	0,042	-	0,250	-	-	-	-	-	-	0,125	0,600	0,044	0,047	-
5	0	0,750	-	0,417	-	0,900	-	0,950	0,667	-	0,875	-	0,765	0,859	-
6	1,20	0,167	-	0,083	-	-	-	-	-	-	-	0,200	0,088	0,016	-
Pgm-3															
(N)		29	19	6	11	14	5	20	16	25	22	20	32	31	5
1	0,74	-	0,026	-	0,045	0,036	-	-	0,063	-	-	-	-	-	-
2	0,85	-	0,026	-	-	-	0,00	0,075	-	0,040	0,045	0,025	0,016	0,032	-
3	0,92	0,052	0,026	0,167	-	0,036	-	0,050	0,188	0,020	0,68	0,025	0,78	0,048	0,100
4	0,97	0,017	-	0,333	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,016	-
5	0	0,828	0,921	0,500	0,909	0,893	0,800	0,825	0,656	0,900	0,841	0,800	0,891	0,855	0,900
6	1,03	0,052	-	-	-	0,036	-	0,050	0,031	-	0,045	-	0,016	0,08	-
7	1,15	0,052	-	-	0,045	-	-	-	0,063	0,040	-	0,150	-	-	-
Pep-la 1															
(N)		36	36	25	26	39	21	27	24	39	30	11	39	32	15
1	0,80	-	0,028	0,040	-	-	-	0,037	0,042	-	0,033	0,091	-	-	-
2	0,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,026	-	-
3	0	1,000	0,972	0,920	0,962	1,000	1,000	0,944	0,958	0,974	0,967	0,909	0,974	1,000	1,000
4	1,09	-	-	-	-	-	-	-	-	0,026	-	-	-	-	-
5	1,20	-	-	0,040	0,038	-	-	0,019	-	-	-	-	-	-	-
Pep-6la-2															
(N)		36	36	20	24	34	19	27	24	38	25	11	39	32	15
1	0,80	-	-	-	-	-	0,026	0,019	-	-	-	-	-	-	-
2	0,90	-	-	-	-	-	-	-	0,021	-	-	-	-	-	-
3	0	1,000	1,000	1,000	0,979	1,000	0,974	0,944	0,979	1,000	1,000	1,000	0,987	1,000	1,000
4	1,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1,15	-	-	-	0,021	-	-	0,037	-	-	-	-	0,013	-	-
Pep-1gg															
(N)		25	51	40	41	29	25	27	24	40	11	37	39	18	20
1	0,94	-	0,010	0,025	0,037	-	0,040	-	-	0,050	-	-	0,026	-	0,050
2	0	1,000	0,971	0,975	0,927	1,000	0,880	1,000	1,000	0,925	1,000	0,973	0,949	1,000	0,950
3	1,06	-	0,020	-	0,037	-	0,080	-	-	0,025	-	0,027	0,026	-	-

Table: continued

Locus	R. M.	Samples													
		IC	SL	JQ	PP	BQ	Pp	LZ	LB	PA	MB	PV	LE 2	SQ	CG
Pph															
(N)		36	36	30	23	23	20	25	11	32	30	16	39	32	20
1	0,75	0,014	-	-	-	-	-	0,020	-	0,016	0,050	0,063	-	-	-
2	0,86	0,069	-	-	-	0,087	-	0,020	-	0,031	-	0,063	0,013	0,016	0,075
3	0,93	0,014	0,028	-	0,022	0,065	-	-	-	0,016	-	-	-	-	-
4	0	0,903	0,972	1,000	0,978	0,848	1,000	0,960	1,000	0,938	0,950	0,875	0,987	0,984	0,935
Sdh															
(N)		36	14	15	11	14	5	21	11	26	30	-	39	32	-
1	0,56	-	-	0,033	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0,70	-	-	0,333	-	-	-	-	-	-	0,017	-	-	0,063	-
3	0,80	0,028	-	0,033	-	-	0,200	-	-	0,019	-	-	-	0,016	-
4	0,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,013	-	-
5	0	0,972	1,000	0,900	0,955	1,000	0,800	1,000	1,000	0,981	0,983	-	0,987	0,891	-
6	1,14	-	-	-	0,045	-	-	-	-	-	-	-	-	0,031	-
Tpi-1															
(N)		9	15	15	18	17	19	15	11	17	-	5	13	12	10
1	0,75	0,111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,100
2	0,85	-	-	0,033	-	-	-	-	0,182	0,029	-	-	0,154	0,042	0,050
3	0	0,889	0,933	0,733	0,833	1,000	1,000	1,000	0,727	0,824	-	0,600	0,846	0,958	0,850
4	1,18	-	0,067	0,233	0,167	-	-	-	0,091	0,147	-	0,400	-	-	-
Tpi-2															
(N)		36	17	19	14	21	17	25	16	18	30	5	39	32	10
1	0,82	-	0,088	0,053	-	-	-	-	-	-	-	-	0,013	0,094	0,100
2	0,90	-	-	0,053	-	-	-	0,020	0,031	-	-	-	0,013	0,016	-
3	0,97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,038	-	-
4	0	0,986	0,706	0,895	0,964	0,952	0,853	0,980	0,969	0,944	1,000	0,900	0,923	0,875	0,900
5	1,06	-	0,059	-	-	0,048	0,059	-	-	0,056	-	-	-	-	-
6	1,15	0,014	0,88	-	0,036	-	0,088	-	-	-	-	0,100	0,013	0,016	-
7	1,30	-	0,059	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xdh															
(N)		36	24	23	21	18	26	25	20	23	30	12	38	32	20
1	0,75	0,014	-	-	0,71	-	-	-	0,050	0,022	-	0,042	0,013	0,031	0,050
2	0,85	0,139	-	0,043	-	0,056	0,038	0,060	0,050	0,065	0,033	0,042	0,066	0,047	0,125
3	0	0,819	0,875	0,804	0,714	0,944	0,865	0,860	0,775	0,783	0,967	0,875	0,829	0,875	0,700
4	1,06	0,028	-	-	0,048	-	0,038	0,040	-	0,022	-	-	0,079	0,031	-
5	1,15	-	0,125	0,109	0,167	-	0,038	0,020	0,125	0,109	-	0,042	0,013	0,016	0,125
6	1,22	-	-	0,043	-	-	0,019	0,020	-	-	-	-	-	-	-

continuação da tabela 1.

Coleta 1																
Barequeçaba											Itamambuca					
	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	4	5	6	7
Lap-2																
(n)	30	30	30	30	26	21	26	37	21	27	27	31	21	32	22	29
1	0.000	0.000	0.000	0.017	0.038	0.000	0.000	0.014	0.048	0.037	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.833	0.883	0.700	0.800	0.731	0.857	0.750	0.716	0.738	0.704	0.722	0.806	0.864	0.891	0.727	0.759
3	0.083	0.050	0.150	0.083	0.058	0.095	0.096	0.054	0.167	0.093	0.130	0.161	0.045	0.094	0.182	0.103
4	0.067	0.033	0.083	0.067	0.135	0.024	0.096	0.108	0.024	0.111	0.093	0.032	0.091	0.016	0.091	0.103
5	0.017	0.033	0.033	0.017	0.038	0.024	0.058	0.095	0.024	0.037	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.034
6	0.000	0.000	0.033	0.017	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Me-1																
(n)	20	26	26	30	27	32	27	40	21	21	23	27	11	32	22	13
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.075	0.063	0.000	0.017	0.000	0.023	0.037	0.025	0.024	0.000	0.043	0.019	0.000	0.063	0.000	0.038
3	0.750	0.813	0.731	0.683	0.870	0.818	0.722	0.800	0.667	0.786	0.587	0.704	0.727	0.750	0.705	0.692
4	0.100	0.125	0.154	0.117	0.056	0.136	0.185	0.113	0.143	0.143	0.239	0.130	0.136	0.078	0.068	0.000
5	0.025	0.000	0.115	0.150	0.074	0.023	0.000	0.038	0.167	0.048	0.109	0.148	0.136	0.078	0.227	0.115
6	0.050	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.056	0.025	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.031	0.000	0.154
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Me-2																
(n)	0	0	26	20	18	22	27	40	20	21	23	18	11	15	0	0
1			0.000	0.000	0.125	0.000	0.000	0.013	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033		
2			1.000	1.000	0.875	1.000	0.944	0.988	0.975	1.000	1.000	1.000	1.000	0.967		
3			0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
Sdh																
(n)	20	30	30	30	10	17	27	20	28	29	37	31	18	32	22	29
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.029	0.025	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.023	0.017	0.033	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.034	0.054	0.000	0.028	0.000	0.045	0.034
3	1.000	0.977	0.983	0.967	1.000	1.000	0.971	0.875	0.982	0.966	0.946	1.000	0.972	1.000	0.955	0.966
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Got-1																
(n)	30	30	30	20	20	22	27	30	28	29	37	31	28	32	22	29
1	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.074	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.967	0.983	0.967	1.000	1.000	0.958	0.926	1.000	0.929	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
4	0.017	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.054	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

continuação da tabela 1.

Coleta 1																
Barequeçaba											Itamambuca					
	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	4	5	6	7
Got-2																
(n)	30	30	30	20	28	22	27	40	28	29	37	31	18	32	22	29
1	0.000	0.000	0.017	0.025	0.000	0.000	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000
2	0.033	0.017	0.017	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.023	0.037	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	0.867	0.867	0.800	0.950	0.911	0.909	0.870	0.913	0.929	0.897	0.878	0.903	0.972	0.984	0.886	1.000
5	0.083	0.117	0.150	0.025	0.018	0.068	0.093	0.050	0.018	0.034	0.014	0.081	0.000	0.016	0.068	0.000
6	0.017	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.018	0.069	0.081	0.016	0.000	0.000	0.045	0.000
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Pgi																
(n)	30	30	30	30	28	22	27	40	28	29	37	31	28	32	22	29
1	0.017	0.000	0.033	0.000	0.018	0.045	0.000	0.000	0.018	0.017	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.017
2	0.033	0.033	0.000	0.033	0.000	0.023	0.037	0.038	0.036	0.052	0.027	0.016	0.000	0.016	0.000	0.017
3	0.050	0.017	0.017	0.033	0.036	0.068	0.111	0.050	0.000	0.069	0.041	0.032	0.028	0.016	0.091	0.034
4	0.050	0.000	0.000	0.033	0.000	0.045	0.000	0.025	0.000	0.000	0.054	0.016	0.111	0.063	0.000	0.034
5	0.767	0.917	0.917	0.750	0.911	0.795	0.815	0.863	0.839	0.793	0.851	0.919	0.806	0.875	0.864	0.897
6	0.033	0.017	0.000	0.117	0.036	0.023	0.019	0.000	0.071	0.052	0.027	0.000	0.028	0.000	0.045	0.000
7	0.033	0.000	0.033	0.017	0.000	0.000	0.000	0.025	0.036	0.017	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000
8	0.017	0.017	0.000	0.017	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Pgm-1																
(n)	0	0	26	30	0	17	17	20	28	29	26	13	0	0	0	16
1			0.019	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				0.000
2			0.000	0.000		0.000	0.000	0.025	0.018	0.000	0.019	0.000				0.000
3			0.058	0.067		0.143	0.059	0.050	0.054	0.000	0.096	0.038				0.094
4			0.000	0.033		0.071	0.000	0.025	0.000	0.017	0.019	0.000				0.000
5			0.865	0.733		0.643	0.853	0.725	0.804	0.862	0.712	0.769				0.813
6			0.000	0.000		0.000	0.059	0.000	0.018	0.052	0.038	0.077				0.000
7			0.019	0.167		0.143	0.029	0.150	0.107	0.069	0.077	0.077				0.094
8			0.038	0.000		0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.038	0.038				0.000
Pgm-2																
(n)	0	0	26	30	0	7	17	20	15	16	31	14	17	0	0	0
1			0.000	0.000		0.214	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000			
2			0.000	0.050		0.000	0.000	0.000	0.000	0.125	0.048	0.071	0.000			
3			0.000	0.050		0.143	0.059	0.075	0.067	0.000	0.081	0.071	0.000			
4			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
5			0.962	0.867		0.500	0.853	0.875	0.833	0.719	0.758	0.786	0.857			
6			0.000	0.000		0.071	0.000	0.000	0.000	0.031	0.032	0.036	0.000			
7			0.038	0.017		0.071	0.059	0.050	0.033	0.063	0.081	0.036	0.143			
8			0.000	0.017		0.000	0.029	0.000	0.033	0.063	0.000	0.000	0.000			

Tabela 2: Frequências alélicas em todos os locos das amostras dos pontos da segunda coleta nas duas praias estudadas.

Coleta 2																
Barequeçaba									Itamambuca							
	1	2	3	4	5	6	7	11	1	2	3	4	5	6	7	8
Xdh																
(n)	21	25	27	29	24	26	28	25	23	26	24	25	30	30	30	24
1	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.024	0.000	0.000	0.017	0.042	0.000	0.000	0.000	0.022	0.038	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.021
3	0.929	1.000	0.857	0.983	0.958	0.962	0.955	0.959	0.913	0.846	0.958	0.967	0.967	0.950	1.000	0.938
4	0.000	0.000	0.143	0.000	0.000	0.038	0.045	0.041	0.065	0.115	0.042	0.033	0.000	0.050	0.000	0.042
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Tpi-1																
(n)	23	20	21	8	20	16	18	9	23	21	12	17	12	28	30	24
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.022	0.100	0.045	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000	0.154	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.021
3	0.891	0.800	0.955	1.000	0.900	1.000	0.875	1.000	0.846	1.000	1.000	1.000	1.000	0.972	0.917	0.958
4	0.087	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.125	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.050	0.021
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Tpi-2																
(n)	32	27	28	29	24	30	37	13	23	26	24	25	30	30	30	24
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.027	0.000	0.000	0.058	0.021	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000
3	0.969	1.000	0.944	0.931	1.000	1.000	0.932	1.000	1.000	0.923	0.979	0.933	0.983	0.983	0.917	0.958
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.031	0.000	0.000	0.069	0.000	0.000	0.041	0.000	0.000	0.019	0.000	0.067	0.000	0.017	0.083	0.042
6	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Pph																
(n)	32	17	18	29	24	30	22	20	23	26	24	25	30	30	30	28
1	0.016	0.000	0.056	0.000	0.000	0.017	0.023	0.000	0.000	0.019	0.000	0.033	0.050	0.033	0.017	0.083
2	0.031	0.029	0.000	0.034	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
3	0.953	0.971	0.944	0.966	0.958	0.950	0.977	1.000	1.000	0.981	1.000	0.967	0.950	0.933	0.983	0.875
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.042
Lap-1																
(n)	32	27	28	29	14	29	32	13	20	25	24	25	30	30	30	24
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.100	0.033	0.021	0.000	0.017	0.017	0.000	0.000
3	0.000	0.000	0.000	0.017	0.036	0.000	0.047	0.000	0.150	0.033	0.021	0.000	0.017	0.017	0.033	0.021
4	0.125	0.088	0.139	0.138	0.214	0.069	0.109	0.000	0.100	0.067	0.083	0.100	0.167	0.150	0.200	0.146
5	0.875	0.912	0.861	0.845	0.750	0.931	0.813	1.000	0.650	0.867	0.875	0.900	0.800	0.817	0.767	0.833
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Coleta 2																
Barequeçaba									Itamambuca							
	1	2	3	4	5	6	7	11	1	2	3	4	5	6	7	8
Got-2																
(n)	32	17	18	29	24	30	37	13	23	26	24	15	30	30	30	24
1	0.000	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000
3	0.000	0.029	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.019	0.000	0.000	0.017	0.000	0.017	0.042
4	0.891	0.853	1.000	0.966	1.000	0.900	0.946	1.000	0.913	0.904	0.958	0.933	0.933	0.917	0.817	0.896
5	0.109	0.088	0.000	0.000	0.000	0.100	0.041	0.000	0.022	0.019	0.000	0.033	0.033	0.067	0.133	0.063
6	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.058	0.021	0.033	0.017	0.017	0.017	0.000
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Pgi																
(n)	32	27	18	29	24	30	37	13	23	26	24	25	30	30	30	24
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.017	0.000
2	0.031	0.029	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.033	0.000	0.000	0.021
3	0.016	0.029	0.000	0.034	0.021	0.017	0.041	0.000	0.043	0.058	0.021	0.133	0.033	0.017	0.067	0.063
4	0.047	0.029	0.083	0.000	0.000	0.017	0.054	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.033	0.000	0.017	0.000
5	0.844	0.912	0.889	0.966	0.938	0.933	0.865	1.000	0.891	0.904	0.896	0.833	0.883	0.933	0.883	0.896
6	0.047	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.014	0.000	0.043	0.038	0.000	0.033	0.000	0.000	0.017	0.000
7	0.016	0.000	0.000	0.000	0.021	0.017	0.000	0.000	0.022	0.000	0.021	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000
8	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.021
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Pgm-1																
(n)	0	14	12	12	10	0	15	13	0	0	17	16	13	18	30	24
1		0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2		0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3		0.000	0.000													

continuação da tabela 2.

Coleta 2																
Barequeçaba									Itamambuca							
	1	2	3	4	5	6	7	11	1	2	3	4	5	6	7	8
Idh-1																
(n)	20	27	18	29	24	18	24	13	20	25	24	25	30	30	30	24
1	0.975	1.000	1.000	0.983	0.964	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.983	1.000	1.000	1.000
2	0.025	0.000	0.000	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000
Idh-2																
(n)	32	27	28	29	24	30	37	13	23	26	24	15	30	30	30	24
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.019	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.017	0.021
4	0.969	0.971	0.917	0.966	0.958	0.950	0.986	1.000	0.913	0.962	0.917	1.000	0.950	0.967	0.950	0.958
5	0.000	0.000	0.000	0.017	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6	0.000	0.000	0.028	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	0.016	0.029	0.056	0.017	0.000	0.050	0.000	0.000	0.022	0.019	0.042	0.000	0.017	0.033	0.033	0.000
8	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000

Tabela 3: Frequências alélicas em todos os locos das amostras dos pontos da terceira coleta nas duas praias estudadas.

Coleta 3																
Barequeçaba									Itamambuca							
	1	3	4	5	6	7	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8
Xdh																
(n)	31	20	31	31	29	22	30	20	18	20	18	0	24	28	20	20
1	0.000	0.125	0.016	0.000	0.034	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.100	0.150
2	0.048	0.050	0.081	0.113	0.069	0.000	0.067	0.250	0.125	0.100	0.000		0.000	0.000	0.050	0.100
3	0.919	0.825	0.855	0.855	0.828	0.929	0.833	0.650	0.750	0.850	1.000		1.000	1.000	0.750	0.650
4	0.032	0.000	0.048	0.032	0.069	0.071	0.083	0.100	0.125	0.050	0.000		0.000	0.000	0.100	0.100
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
Tpi-1																
(n)	9	19	14	15	0	0	19	13	0	0	0	10	10	10	16	18
1	0.000	0.000	0.000	0.000			0.000	0.000				0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.083	0.000	0.000			0.000	0.000				0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	1.000	0.750	1.000	1.000			1.000	1.000				1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
4	0.000	0.167	0.000	0.000			0.000	0.000				0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000	0.000	0.000	0.000			0.000	0.000				0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Tpi-2																
(n)	19	22	31	31	20	21	14	10	26	20	21	20	20	25	41	41
1	0.111	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.016	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012
3	0.722	0.958	0.839	0.887	1.000	1.000	1.000	1.000	0.906	0.950	0.976	0.975	1.000	1.000	0.902	0.963
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.167	0.042	0.113	0.081	0.000	0.000	0.000	0.000	0.094	0.050	0.024	0.025	0.000	0.000	0.061	0.024
6	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.037	0.000
Pph																
(n)	31	20	31	31	29	17	10	10	24	29	32	23	26	33	41	41
1	0.016	0.000	0.048	0.032	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.024
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.984	1.000	0.952	0.968	0.966	0.929	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.963	0.976
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000
Lap-1																
(n)	31	20	31	25	29	17	20	10	22	29	30	28	20	32	38	38
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023	0.017	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.050	0.000	0.000	0.017	0.000	0.050	0.000	0.045	0.052	0.017	0.028	0.025	0.000	0.013	0.026
3	0.048	0.050	0.016	0.000	0.017	0.000	0.050	0.000	0.091	0.034	0.050	0.083	0.025	0.063	0.053	0.026
4	0.097	0.025	0.016	0.067	0.069	0.143	0.025	0.100	0.114	0.103	0.117	0.194	0.075	0.125	0.039	0.066
5	0.839	0.875	0.968	0.933	0.879	0.857	0.857	0.900	0.727	0.793	0.800	0.694	0.875	0.813	0.868	0.882
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	0.016	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000

continuação da tabela 3.

Coleta 3																
Barequeçaba									Itamambuca							
	1	3	4	5	6	7	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8
Got-2																
(n)	31	20	31	31	29	7	0	10	16	19	32	23	26	33	41	41
1	0.016	0.025	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.012
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000
3	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.000	0.031	0.026	0.000	0.000	0.000	0.030	0.000	0.000
4	0.887	0.925	0.887	0.871	0.914	0.714	0.900	0.900	0.906	0.895	0.859	0.957	0.981	0.818	0.951	0.976
5	0.081	0.000	0.113	0.065	0.069	0.000	0.500	0.050	0.031	0.053	0.109	0.022	0.019	0.106	0.024	0.012
6	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.214	0.500	0.050	0.031	0.026	0.031	0.022	0.000	0.030	0.012	0.000
7	0.000	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Pgi																
(n)	31	20	31	31	29	17	24	20	24	29	32	23	26	33	41	41
1	0.000	0.000	0.000	0.016	0.017	0.000	0.017	0.000	0.000	0.017	0.000	0.022	0.000	0.000	0.024	0.000
2	0.032	0.025	0.016	0.032	0.000	0.071	0.052	0.050	0.000	0.017	0.016	0.065	0.000	0.030	0.037	0.000
3	0.032	0.050	0.097	0.032	0.017	0.000	0.069	0.050	0.021	0.034	0.031	0.000	0.058	0.015	0.024	0.037
4	0.000	0.025	0.048	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000	0.104	0.034	0.016	0.065	0.038	0.030	0.037	0.000
5	0.935	0.900	0.823	0.839	0.948	0.929	0.793	0.900	0.771	0.862	0.906	0.761	0.865	0.864	0.817	0.963
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.052	0.000	0.042	0.000	0.016	0.043	0.019	0.045	0.024	0.000
7	0.000	0.000	0.016	0.032	0.017	0.000	0.017	0.000	0.063	0.017	0.016	0.022	0.019	0.015	0.037	0.000
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000
Pgm-1																
(n)	19	12	14	0	0	10	10	20	24	29	32	23	26	28	23	30
1	0.000	0.000	0.000			0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000			0.000	0.000	0.000	0.021	0.017	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.000	0.000	0.000			0.000	0.000	0.100	0.146	0.052	0.109	0.065	0.019	0.071	0.043	0.067
4	0.000	0.000	0.000			0.000	0.000	0.000	0.021	0.034	0.016	0.000	0.000	0.000	0.022	0.017
5	1.000	1.000	0.964			1.000	1.000	0.800	0.604	0.776	0.766	0.826	0.923	0.821	0.870	0.883
6	0.000	0.000	0.000			0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.016	0.043	0.000	0.000	0.022	0.000
7	0.000	0.000	0.036			0.000	0.000	0.100	0.104	0.034	0.016	0.065	0.058	0.107	0.043	0.033
8	0.000	0.000	0.000			0.000	0.000	0.000	0.083	0.069	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Pgm-2																
(n)	21	22	14	16	14	24	10	10	24	29	32	23	26	28	23	30
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.022	0.000	0.071	0.000	0.033
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.104	0.069	0.016	0.000	0.000	0.018	0.087	0.050
3	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000	0.050	0.050	0.083	0.086	0.063	0.043	0.058	0.071	0.087	0.067
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.022	0.000
5	0.881	0.958	0.964	0.781	0.893	0.750	0.950	0.950	0.750	0.759	0.844	0.848	0.788	0.786	0.739	0.833
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.052	0.031	0.000	0.058	0.000	0.000	0.000
7	0.119	0.000	0.000	0.156	0.071	0.250	0.000	0.000	0.063	0.034	0.031	0.065	0.000	0.036	0.065	0.017
8	0.000	0.042	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.077	0.018	0.000	0.000

continuação da tabela 3.

Coleta 3																
Barequeçaba									Itamambuca							
	1	3	4	5	6	7	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8
Idh-1																
(n)	12	15	15	0	24	17	10	10	18	20	21	23	26	28	23	20
1	1.000	1.000	1.000		1.000	0.929	1.000	1.000	1.000	0.950	0.976	1.000	1.000	1.000	1.000	0.975
2	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.000	0.000	0.000		0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025
4	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Idh-2																
(n)	31	20	31	31	29	27	20	20	24	29	32	23	26	33	41	41
1	0.000	0.000	0.016	0.000	0.017	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.012	0.012
2	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000
3	0.048	0.000	0.016	0.032	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.030	0.000	0.024
4	0.887	0.950	0.952	0.887	0.948	1.000	0.967	0.900	0.938	0.983	0.922	0.957	0.904	0.894	0.951	0.890
5	0.000	0.000	0.000	0.048	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.031	0.043	0.019	0.000	0.000	0.000
6	0.000	0.000	0.000	0.032	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.030	0.012	0.024
7	0.016	0.025	0.016	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.042	0.017	0.047	0.000	0.038	0.015	0.012	0.037
8	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.012