

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

BC/43386

IB/81588

INSTITUTO DE BIOLOGIA

OK

I

Universidade Estadual de Campinas



Sônia Cristina da Silva Andrade

VARIABILIDADE GENÉTICA EM LITORINÍDEOS (GASTROPODA: MOLLUSCA) DA COSTA BRASILEIRA

Form with handwritten text: Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Sônia Cristina da Silva Andrade e aprovada pela Comissão Julgadora. 06/11/2000

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

Orientadora: Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

UNIDADE	I.B/81588	
N.º CHAMADA	7/UNICAMP	
	An24v	
V.	Ex.	
TOMBO BC	43386	
PROC.	392/01	
C	<input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00	
DATA	06/07/01	
N.º CPD		

CM-00153640-9

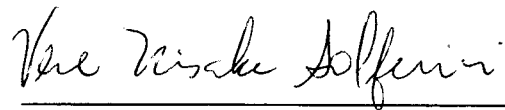
**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

- An24v** **Andrade, Sónia Cristina da Silva**
 Variabilidade genética em litorinídeos (gastropoda: mollusca)
 da costa brasileira/ Sónia Cristina da Silva Andrade. -- Campinas,
 SP:[s.n.], 2000.
 113f: ilus.
- Orientadora: Vera Nisaka Solferini
 Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.
1. Genética de populações. 2. Moluscos. 3. Isoenzimas.
 I. Solferini, Vera Nisaka. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 6 de novembro de 2000

Banca Examinadora

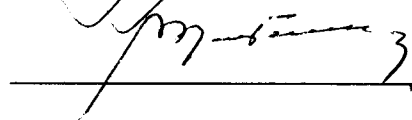
Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini
(Orientadora)



Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin



Prof. Dr. Roland Vencovsky



Prof. Dr. Sérgio Russo Matioli

À minha família

AGRADECIMENTOS

À Vera, minha orientadora, pela amizade, orientação e apoio, todos fundamentais na minha formação; também por criar um ótimo ambiente de trabalho e nos ensinar como trabalhar em grupo.

Aos meus pais, António e Claudine, pelo apoio incondicional e exemplo.

Aos membros da pré - banca, Dr. Roland Vencovsky, Dr. Sérgio Russo Matioli e Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, pela leitura atenta do trabalho e ótimas sugestões.

Às pessoas que iam apenas passear na praia e acabaram coletando caramujinhos:

Hermes, Juliana (Jujuba), Adriano, Veridiana, Bárbara Segal, Tiago, Anders, Naiara, Karla, Ju Felix, Juzinha, André (Aracaju), Manoel, Paula, Cláudia, Profa. Eleonore Setz e Prof. Woodruff Benson.

Sem sua ajuda, com certeza este trabalho não seria o mesmo.

A Hermes, pelos mapas dos capítulos 1 e 2.

Ao André (Aracaju), pelas fotos dos bichos.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida e pelo custeio de algumas viagens e material de laboratório.

À Cláudia Magalhães, por ter me apresentado estes bichinhos e sua história, e pelas sugestões, estímulo e empolgação com o trabalho.

Aos técnicos do laboratório, Herberth Luiz da Silva e Seu Pedro Maria, pelo apoio.

Às secretárias do Depto. de Genética, Ana Rita C. Quintana, Zaira Priess e Patrícia L. Augusto, pelo apoio.

Aos meus amigos e colegas de laboratório,

Veridiana, Juliana, Flávia Fuchs, Ju Felix, Fabiana, Tiburcio, Juzinha, Karla, Aluana, Teresa, Tereza, Flávia, Maria Elena, Bruno e Tiago

sua ajuda (tanto na bancada, quanto nas análises e discussão do trabalho), senso de humor e companheirismo tornaram este trabalho melhor e agradável de ser realizado.

À amiga Angela Midori, pela bem-humorada companhia nos dias de corrida de gel (inclusive nos feriados e finais de semana).

A José Carlos e Lygia, pelo apoio e interesse pelo andamento do trabalho .

A todos os professores dos cursos de Genética e de Ecologia que de alguma maneira contribuíram para minha formação.

Aos amigos e colegas, pelos bons momentos ao longo do mestrado.

Ao meu grande companheiro Hermes, que esteve sempre do meu lado, me dando apoio e força ao longo de todo o trabalho. Seu interesse e entusiasmo pela Biologia têm sido, para mim, um grande estímulo e exemplo.

“Não cessaremos de explorar
e ao fim de nossa exploração
voltaremos ao ponto de partida,
como se não o tivéssemos conhecido.”

- T. S. Elliot

SUMÁRIO

Lista de Figuras	XII
Lista de Tabelas	XII
Resumo	XIII
Abstract	XV
Introdução geral	1
Capítulo 1 - Estudo da variabilidade genética em populações de <i>Nodilittorina lineolata</i> (Prosobranchia: Gastropoda)	7
Introdução	7
Material e Métodos	10
Resultados	16
Discussão	25
Capítulo 2 - Variabilidade e estruturação populacional das espécies do gênero <i>Littoraria</i> (Mollusca: Littorinidae) da costa brasileira	37
Introdução	37
Material e Métodos	41
Resultados	48
Discussão	57
Considerações Gerais	67
Referências Bibliográficas	70
Apêndice 1	77
Apêndice 2	82
Apêndice 3	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto das espécies	6
Figura 1.1. Pontos de coleta de <i>Nodilittorina lineolata</i>	13
Figura 1.2. Dendrograma das amostras de <i>N. lineolata</i>	22
Figura 1.3. Dendrograma das amostras de <i>N. lineolata</i> separadas por ano	23
Figura 1.4. Gráfico da variação da heterozigosidade	25
Figura 2.1. Pontos de coleta de <i>Littoraria flava</i> e <i>L. angulifera</i>	42
Figura 2.2. Dendrograma das amostras de <i>L. flava</i> e <i>L. angulifera</i>	53
Figura 2.3. Gráfico do teste de Mantel de <i>L. angulifera</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Locais e datas de coleta de <i>Nodilittorina lineolata</i>	14
Tabela 1.2. Sistemas enzimáticos e suas características	17
Tabela 1.3. Variabilidade genética de <i>N. lineolata</i>	20
Tabela 1.4. Amostras e locos que apresentaram desvio de Hardy-Weinberg	21
Tabela 1.5. Matriz de distância e identidade genética de <i>N. lineolata</i>	24
Tabela 2.1. Locais de coleta de <i>Littoraria flava</i> e <i>L. angulifera</i>	43
Tabela 2.2. Sistemas enzimáticos e suas características	49
Tabela 2.3. Variabilidade genética de <i>L. flava</i> e <i>L. angulifera</i>	50
Tabela 2.4. Amostras e locos que apresentaram desvio de Hardy-Weinberg	51
Tabela 2.5. Matriz de distância e identidade genética de <i>L. flava</i> e <i>L. angulifera</i>	56
Tabela a.1. Freqüências gênicas de <i>N. lineolata</i>	82
Tabela a.2. Freqüências genotípicas do loco <u>PGM</u> -1 em <i>N. lineolata</i>	87
Tabela a.3. Freqüências gênicas de <i>L. flava</i>	91
Tabela a.4. Freqüências gênicas de <i>L. angulifera</i>	95

RESUMO

Nesse estudo foram analisadas, através de eletroforese de enzimas, populações de três espécies de gastrópodes marinhos da família Littorinidae: *Nodilittorina lineolata*, *Littoraria flava* e *L. angulifera*.

Nodilittorina lineolata pertence a um complexo de sete espécies denominado complexo *ziczac*, originário do mar do Caribe. Aparentemente, apenas esta espécie pode ser encontrada na costa brasileira, ocupando amplas áreas de costão rochoso. As espécies *Littoraria flava* e *L. angulifera* ocupam ambientes diferentes: costões próximos a água doce ou salobra e mangues, respectivamente. As três espécies possuem em comum estágio larval planctotrófico, sendo que *L. angulifera* apresenta ovoviviparidade incompleta; *N. lineolata* e *L. flava* são ovíparas.

O objetivo central deste trabalho foi estimar a variabilidade e estruturação genética populacional das espécies citadas, a fim de verificar se há alguma relação entre estas estimativas, o tipo de desenvolvimento larval e o tipo de ambiente ocupado. Além disso, buscou-se esclarecer se ocorre alguma outra espécie do complexo *ziczac*, nos locais amostrados, além de *N. lineolata*, pois havia controvérsia na literatura quanto ao número de espécies deste grupo na costa brasileira.

Foram realizadas 20 coletas de *Nodilittorina lineolata* em 13 locais. *L. flava* foi coletada em oito localidades e *L. angulifera* em nove.

As três espécies apresentaram alta variabilidade genética. As médias de diversidade gênica e de porcentagem de locos polimórficos para *N. lineolata*, *L. flava* e *L. angulifera* foram, respectivamente: $H_e = 0,155$, $0,172$ e $0,18$ e $P = 45$, $48,9$ e $41,5$. A

alta variabilidade genética pode ser um reflexo da diversidade de habitats que estes moluscos ocupam no costão e no mangue, ou simplesmente resultado do grande tamanho efetivo das populações (estes animais são relativamente abundantes no ambiente natural).

Todas as amostras estudadas apresentaram desvio das proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, sempre no sentido de deficiência de heterozigotos. Os locos que apresentam este desvio variam de amostra para amostra.

As amostras de *N. lineolata* apresentaram baixa estruturação genética ($F_{st}=0,028$), as de *L. flava*, baixa a moderada ($F_{st}=0,054$) e de *L. angulifera*, alta estruturação ($F_{st}=0,185$). A dispersão planctônica e conseqüente fluxo gênico podem explicar a pouca diferenciação interpopulacional observada em *N. lineolata* e *L. flava*. A alta estruturação encontrada nas amostras de *L. angulifera* pode ser atribuída à ovoviviparidade e à descontinuidade do ambiente ocupado, o mangue. No entanto, em *L. angulifera*, assim como nas outras espécies, não foi encontrada correlação entre distância geográfica e diferenciação genética entre as amostras.

ABSTRACT

In this study, populations of three marine gastropod species of the family Littorinidae, *Nodilittorina lineolata*, *Littoraria flava* and *L. angulifera*, were analyzed by enzyme electrophoresis.

Nodilittorina lineolata belongs to a group of seven sibling species called *ziczac* complex, which is native from the West Indies. It seems that only this species can be found along the Brazilian coast, colonizing rocky shores. *Littoraria flava* and *L. angulifera* are found in two different habitats: rocky shores near some fresh water and mangroves, respectively. The three species have long-living pelagic larvae; *N. lineolata* and *L. flava* are oviparous and *L. angulifera* has incomplete ovoviviparity.

The main purpose of this work was to estimate the genetic variability and the population structures of these species, in order to verify the relationships between these estimates, the kind of larval development and the kind of their environment. We also tried to elucidate in the sampled area the possible presence of other species of the *ziczac* complex, besides *N. lineolata*, because there are some controversies in the literature.

Isozymic analyses were carried out with 20 samples of *Nodilittorina lineolata*, collected in 13 localities; *L. flava* was sampled in eight localities and *L. angulifera* in nine.

The three species presented high genetic variability. Mean values of heterozygosity and percentage of polymorphic loci in *N. lineolata*, *L. flava* and *L. angulifera* were, respectively: $H_e = 0,155$, $0,172$ and $0,18$ and $P = 45$, $48,9$ and $41,5$.

This high genetic variability could be consequence of the diverse habitats occupied by these mollusks along the coastal shores and mangroves or, simply be the result of large population effective sizes (these animals are very abundant).

All samples presented significant departures from Hardy-Weinberg expectations, always showing heterozygote deficiencies. The loci that presented these departures varied from sample to sample.

N. lineolata presented low genetic differentiation among samples ($F_{st}=0,028$), *L. flava* low to moderate differentiation ($F_{st}=0,054$) and *L. angulifera*, great genetic differentiation ($F_{st}=0,185$). The planktonic dispersal and consequent gene flow could explain the low differentiation observed in *N. lineolata* and *L. flava*. The great differentiation found among *L. angulifera* samples could be assigned to its ovoviviparity and to the discontinued environment occupied by this mollusk, the mangrove. However, in *L. angulifera*, as well as in the other species, no significant correlation between geographic distance and genetic differentiation was found.

INTRODUÇÃO GERAL

Nas populações naturais, os fatores responsáveis pela distribuição e freqüência dos genótipos são o tamanho das populações, os padrões de acasalamento, o fluxo gênico, as mutações, a seleção natural e suas interações.

Algumas características das espécies podem ser relacionadas com um ou mais destes fatores. Trabalhos comparando padrões de estruturação e de variabilidade genética de espécies diferentes quanto a estas características representam uma oportunidade para a compreensão da ação dos fenômenos evolutivos sobre as populações naturais.

Um exemplo é o estudo do fluxo gênico em invertebrados marinhos com fase larval planctônica. Nestas espécies, espera-se encontrar baixa divergência genética entre populações espacialmente distantes devido ao grande potencial de dispersão (Behrens Yamada 1989; Palumbi 1994; Todd et al. 1998; Bohonak 1999). Alguns autores, entretanto, afirmam que mesmo espécies com longo estágio larval podem encontrar obstáculos durante a migração, diminuindo a troca de genes entre as populações (Burton 1983; Palumbi 1994). Estes obstáculos podem ser correntes marinhas, temperatura, salinidade, predação, escassez de alimento, entre outros. Larvas de algumas espécies de crustáceos marinhos aparentemente podem controlar a direção de sua trajetória ou a sua profundidade na coluna d'água, de modo que não se afastam muito da zona costeira (Palumbi 1994). Além disso, após a liberação dos ovos ou larvas, há uma redução constante na densidade da prole conforme os indivíduos se afastam do local onde estão os parentais.

Várias espécies apresentam padrões de divergência genética concordantes com seu tipo de dispersão: espécies com desenvolvimento direto normalmente apresentam maior estruturação populacional do que aquelas com estágio larval planctônico (Berger 1973; Janson 1987; Behrens Yamada 1989; Todd et al. 1998; Bohonak 1999). Algumas espécies apresentam populações distribuídas ao longo da zona costeira. Nesses casos, estas populações são muito semelhantes devido à migração das larvas entre populações vizinhas, ao passo que espécies com distribuição insular apresentam maior divergência entre as populações em relação às primeiras (Palumbi 1994).

A família Littorinidae (Gastropoda: Mollusca) têm sido bastante estudada neste sentido pois possui espécies filogeneticamente próximas, que ocorrem no mesmo habitat, mas com diferentes capacidades de dispersão (Janson 1987; Behrens Yamada 1989). Sua ampla distribuição, assim como seu importante papel nas comunidades litorâneas, torna esta família especialmente interessante para estudos genéticos e ecológicos.

Os litorínídeos vivem na região entremarés de substratos rochosos e em áreas de mangue, nas superfícies de troncos e folhas, alimentando-se de algas unicelulares, líquens e esporos recém-estabelecidos de macroalgas (Reid 1989). Estes moluscos possuem conchas de 0,5 a 4 cm de comprimento, cônicas, turbinadas ou subglobulosas, com abertura oval ou circular. São dióicos, possuem fertilização interna e o desenvolvimento pode ser planctônico ou não (Rios 1994). Nas espécies planctotróficas a desova é lançada na água e, após a eclosão, as larvas podem ter longa fase pelágica, que dura de poucas semanas a alguns meses. Estima-se que a fase larval em espécies planctotróficas de moluscos tropicais pode durar até 6 meses; já o estágio larval das espécies que habitam ambientes temperados, varia entre 3 e 6

semanas (Scheltema 1971; Scheltema 1978 *apud* Jablonski 1986). Existem, ainda, espécies lecitotróficas que possuem uma fase pelágica curta (de poucos dias) e, neste período, utilizam as reservas nutricionais contidas no ovo. No caso do desenvolvimento não planctônico (ou direto) a desova é bêntica, os ovos são depositados no substrato e os juvenis eclodem já parecidos com os adultos, como é o caso de *Littorina saxatilis*, que apresenta ovoviviparidade completa (Leal 1991; Reid 1996).

A costa brasileira tem cerca de 8000 Km de extensão, que abrange áreas de costão abrigadas ou expostas, praias e manguezais. Apesar da ampla extensão, existem poucas espécies representantes da família Littorinidae na costa do Brasil, sendo documentados dois gêneros: *Nodilittorina* Martens 1897 e *Littoraria* Griffith e Pidgeon 1834 (Rios 1994; Magalhães 1998). Estes dois gêneros são bastante próximos filogeneticamente e provavelmente têm um ancestral comum, não compartilhado com qualquer outro gênero (Reid 1986).

O gênero *Nodilittorina* é o mais rico em número de espécies da família; pode ser encontrado em quase todos os continentes, sendo freqüente nas regiões tropicais e subtropicais (Bandel e Kadolsky 1982; McQuaid 1996). No Brasil pode ser encontrada *Nodilittorina vermeiji* e, para alguns autores (Borkowski e Borkowski 1969; Bandel 1974), três espécies do complexo *ziczac*, agrupadas devido a semelhanças morfológicas.

Nodilittorina vermeiji tem distribuição restrita à ilha de Trindade, ao arquipélago de Fernando de Noronha e ao Atol das Rocas (Leal 1991). As três espécies do complexo *ziczac* são: *N. ziczac* (Gmelin 1791), *N. angustior* (D'Orbigny 1841) e *N. lineolata* D'Orbigny 1840 (Bandel e Kadolsky 1982). Este grupo tem sua origem no Caribe, ocupando a costa das Américas desde a Flórida (EUA) até o Uruguai.

Recentemente, foi apontada apenas a presença de *N. lineolata* (figura 1.a) no litoral do Brasil e do Uruguai, com distribuição restrita a estes países (Bandel e Kadolsky 1982).

Dentro do gênero *Littoraria* são encontradas, no Brasil, as espécies *L. flava* (King e Broderip 1832) e *L. angulifera* Lamarck 1822 (figuras 1.b e 1.c). Este grupo é restrito às áreas tropicais e as espécies que o compõem estão geralmente associadas à vegetação do mangue e costões próximos a ambientes de água doce ou salobra (Reid 1986).

Nodilittorina lineolata, *Littoraria flava* e *L. angulifera* apresentam desenvolvimento larval planctotrófico (Gallagher e Reid 1974; Mileikovsky 1975; Reid 1999). Esta característica é bastante importante quando se pretende estudar a relação entre a dispersão e os padrões espaciais de estruturação genética em populações naturais (Burton 1983; Bohonak 1999).

A eletroforese de isozimas tem sido utilizada para estimar parâmetros genéticos 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 têm se mostrado bastante adequada para a interpretação dos processos evolutivos que estão agindo sobre estes animais, uma vez que pode ser usada para estimar o movimento dos genes entre as populações (Berger 1983; Burton 1983; revisão em Bohonak 1999).

Além disso, a eletroforese de enzimas pode ser empregada como uma metodologia para complementar estudos de morfologia e, conseqüentemente, estudos de sistemática. Dentro da família Littorinidae, este método tem fornecido informações relevantes sobre a diferenciação intra e interespecífica (Ward e Warwick 1980; Berger 1983; Janson 1985a; Ward 1990; Boulding et al. 1993; Zaslavskaya 1995).

No presente trabalho foram estudadas as espécies da família Littorinidae que ocupam a costa brasileira, com exceção de *N. vermeiji*. As coletas foram realizadas ao longo de cerca de 3.700 Km de costa, compreendendo do Estado do Ceará até Santa Catarina. Como a eletroforese de isozimas tem sido utilizada em vários estudos de genética desta família, os resultados obtidos podem ser comparados aos encontrados em outras espécies de litorinídeos.

O trabalho apresentado no primeiro capítulo teve como objetivo caracterizar a variabilidade genética de *N. lineolata*, verificando se há algum padrão de distribuição da variabilidade ao longo do litoral brasileiro que possa ser explicado pelo tipo de desenvolvimento planctônico. Por se tratar de um dos gêneros de gastrópode de supralitoral mais abundantes nos costões rochosos das regiões sudeste e nordeste do Brasil (Matthews 1968; Absalão 1988), pode-se considerá-lo como um modelo para o estudo de outras espécies de invertebrados que ocupam o mesmo tipo de ambiente e que possuem desenvolvimento planctônico. Neste estudo, também foi abordada a questão taxonômica, buscando evidências da existência ou não de mais de uma espécie do complexo *ziczac* nos locais amostrados.

No segundo capítulo são descritos os padrões de variabilidade genética encontrados nas espécies *Littoraria flava* e *L. angulifera*. Estas espécies habitam ambientes distintos, com sobreposição em poucos locais amostrados. Esta diferença de habitat pode refletir em uma diferente estruturação genética das populações para cada espécie, o que foi observado e comparado aos resultados obtidos para *N. lineolata*.

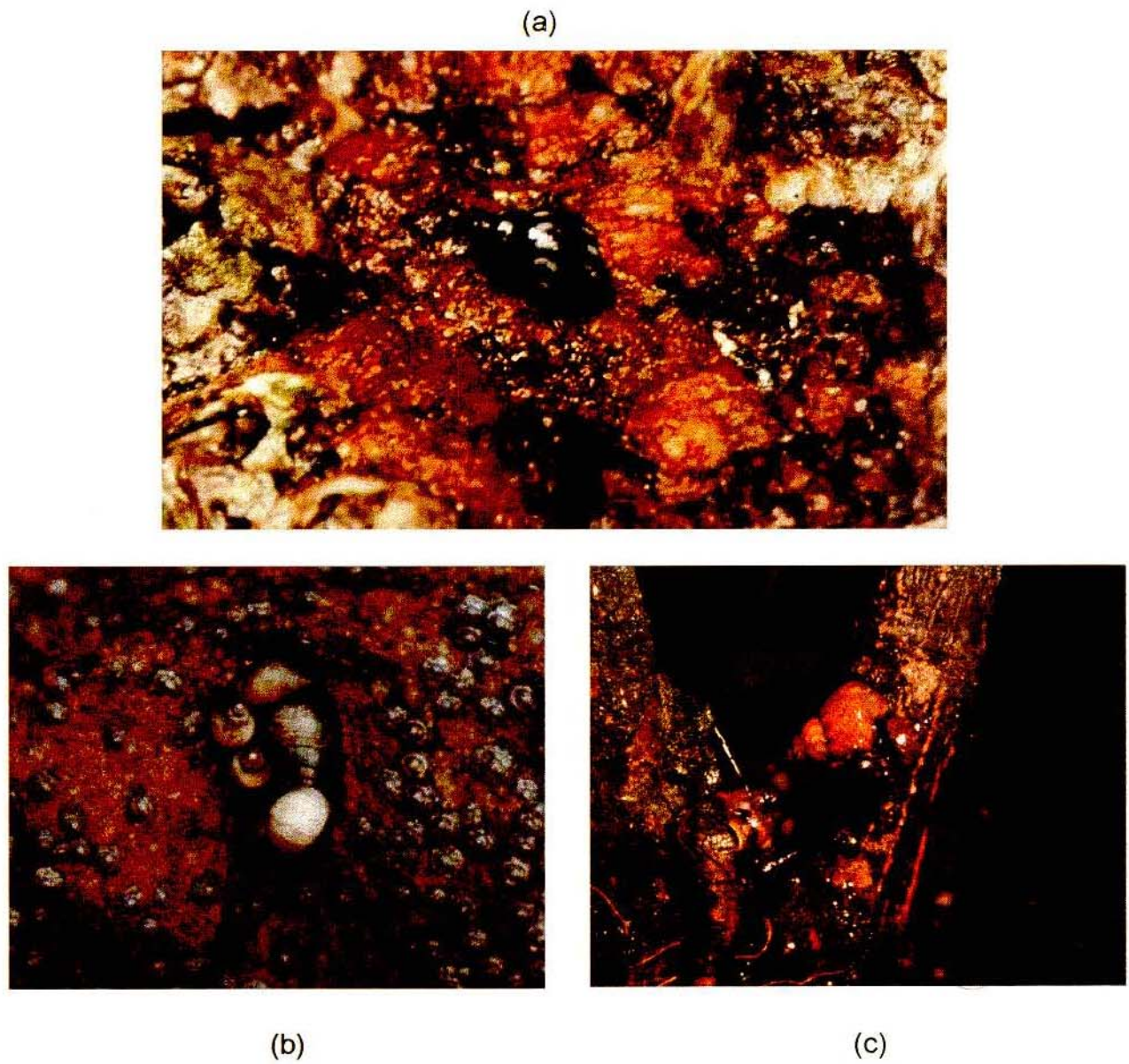


Figura 1. Espécies estudadas neste trabalho: (a) *Nodilittorina lineolata*, (b) *Littoraria flava*, (c) *Littoraria angulifera*.

CAPÍTULO 1

ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *NODILITTORINA LINEOLATA*
(PROSOBRANCHIA: GASTROPODA)

INTRODUÇÃO

A diversidade do meio ambiente é apontada como um dos fatores importantes na manutenção da variabilidade genética em populações naturais. Assim, alguns trabalhos tentam explicar a variabilidade observada como uma adaptação a padrões de variação temporal e espacial do ambiente (Levene 1953; Ayala et al. 1975; Hedrick et al. 1976; Jonhson e Black 1982; Jonhson e Black 1984). No entanto, o efeito da heterogeneidade ambiental sobre a estruturação e variabilidade genética também depende da ação do fluxo gênico.

Invertebrados aquáticos com estágio larval planctônico são um bom modelo para estudar a ação da heterogeneidade do ambiente e do fluxo gênico sobre a variabilidade genética em populações naturais. Nesses organismos considera-se que as taxas de dispersão sejam relativamente altas e, conseqüentemente, espera-se que as populações não sejam estruturadas e apresentem alta variabilidade genética intrapopulacional (Raff 1996). Realmente, em algumas espécies de moluscos e artrópodes com estágio larval planctônico, observou-se baixa estruturação genética (Berger 1973; Ward e Warwick 1980; Janson 1987; Behrens Yamada 1989; Ward 1990; Todd et al. 1998; Bohonak 1999).

No entanto, vários autores contestam a validade desta hipótese, afirmando que há poucas evidências da relação entre dispersão larval e a estruturação genética das

populações (Burton 1983; Hedgecock 1986; McQuaid 1996; Bunn e Hughes 1997). Além disso, não há evidências de que um maior tempo de desenvolvimento planctônico reduza a diferenciação genética entre as populações (Burton 1983; Bohonak 1999).

Para Hedgecock (1986) não há dúvidas de que a dispersão de espécies com larvas planctotróficas é maior do que nas espécies com desenvolvimento não-planctotrófico. No entanto, se há ou não fluxo gênico entre populações de invertebrados com fase larval planctônica depende principalmente do valor adaptativo dos recrutas, o que estaria diretamente relacionado à variabilidade espacial e temporal do ambiente ocupado pela geração anterior. Um juvenil que chegasse a um ambiente sob pressão seletiva diferente em relação ao local onde seus parentais viviam, não conseguiria se estabelecer. Ou seja, o fluxo gênico não tornaria populações distantes homogêneas, a não ser que a pressão seletiva nos locais ocupados pela espécie seja semelhante (Hedgecock 1986).

Para Burton (1983), o fluxo gênico em espécies com desenvolvimento planctônico é superestimado, sendo que vários fatores podem torná-lo restrito: durante a dispersão as larvas podem encontrar obstáculos bióticos e abióticos (como falta de alimento, predação ou correntes marinhas, por exemplo); mesmo quando a dispersão tem sucesso, os recrutas podem falhar ao chegar a um novo local, não chegando a se reproduzir.

Estudos genéticos utilizando isozimas têm sido importantes para inferir os padrões micro e macrogeográfico de diferenciação entre as populações, estimando o movimento dos indivíduos entre as mesmas (Burton 1983; Bohonak 1999).

A família Littorinidae (Mollusca: Gastropoda) tem sido bastante estudada neste sentido pois possui espécies próximas com tipos de desenvolvimento distintos (Janson

1987; Behrens Yamada 1989; Grant e Lang 1991). Esta família pode ser encontrada em todo o mundo, principalmente na região entremarés, em substratos rochosos e em áreas de mangue (Reid 1996). Na costa brasileira ela é representada por poucas espécies, sendo documentada a presença de dois gêneros, *Littoraria* (Griffith e Pidgeon 1834) e *Nodilittorina* Martens 1897 (Rios 1994; Magalhães 1998). Dentro do gênero *Littoraria* são encontradas as espécies *L. flava* (King e Broderip 1832) e *L. angulifera* (Lamarck 1822), as quais habitam, respectivamente, costões próximos a ambientes de água salobra e manguezais.

Para alguns autores (Borkowski e Borkowski 1969; Bandel 1974) estariam presentes na costa brasileira três espécies do gênero *Nodilittorina* pertencentes ao complexo *ziczac*: *N. ziczac* (Gmelin 1791), *N. angustior* (D'Orbigny 1841) e *N. lineolata*, D'Orbigny 1840. No entanto, mais recentemente tem sido apontada apenas a presença da espécie *N. lineolata* no litoral do Brasil e do Uruguai, com distribuição restrita a estes países (Bandel e Kadolsky 1982).

Nodilittorina lineolata possui desenvolvimento planctônico completo (Mileikovskiy 1975). O tempo de duração da fase planctônica não foi determinado para esta espécie; porém, na família Littorinidae, este tempo pode variar de 24 dias (*Nodilittorina hawaiiensis* em condições de laboratório, Reid 1996) a 10 semanas (*L. angulifera*, Gallagher e Reid 1974) em espécies com estágio planctotrófico.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética de *N. lineolata*, verificando se há algum padrão ao longo do litoral brasileiro que possa ser explicado.

Durante este estudo procurou-se esclarecer a questão taxonômica, verificando se ocorre mais de uma espécie do complexo *ziczac*, além de *N. lineolata*, nos locais amostrados.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas e identificação

Nodilittorina lineolata foi coletada de maio de 1996 a fevereiro de 1999 ao longo da costa brasileira em 13 localidades (tabela 1.1). Em alguns locais foram realizadas mais de uma coleta (tabela 1.1), sendo que nenhum método de coleta específico foi usado. As áreas foram escolhidas devido à sua distribuição, formando três grupos distantes entre si, abrangendo cerca de 3700 Km da costa brasileira (figura 1.1), sendo que os pontos mais próximos distam cerca de 1Km (Guaecá e Barequeçaba).

Os moluscos foram coletados nas zonas de supralitoral e médio litoral superior e mantidos vivos até a chegada ao laboratório. Cerca de 15 indivíduos de quatro amostras (Tibau, Guaecá, Preta e Barequeçaba, coletados em 1996) foram anestesiados em solução de cloreto de magnésio 7,5% em água e água do mar 1:1 e depois fixados em álcool etílico 70%. Alguns espécimes foram enviados para a identificação ao Dr. David G. Reid do Museu Britânico de História Natural, taxonomista da família Littorinidae.

Uma parte de cada amostra foi congelada em nitrogênio líquido a fim de manter a atividade enzimática até o momento da eletroforese. Foram coletados de 50 a 100 indivíduos por amostra.

Os espécimes enviados ao Dr. Reid foram depositados no Museu Britânico de História Natural. Quando possível, cerca de 30 indivíduos de cada amostra foram fixados como descrito acima. Parte das amostras será depositada no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas (MZUEC), São Paulo.

Eletroforese

Foram analisados 1109 indivíduos através de eletroforese de isozimas em gel de amido (Sigma 8,5%). Os géis foram preparados no dia anterior ao da corrida e mantidos à temperatura ambiente, cobertos por filme de PVC. As dimensões do gel são: 19 cm de comprimento X 18 cm de largura X 1 cm de espessura.

O corpo mole foi retirado da concha sob estereomicroscópio e macerado em recipientes plásticos contendo tampão de extração (solução de Tris 0,1M, pH ajustado para 8,0 com solução 1N de ácido clorídrico) acrescido de β -mercaptoetanol 0,5% (modificado a partir de Ward e Warwick 1980). O extrato foi absorvido em retângulos de 3 x10 mm de papel Whatman nº 3, os quais foram aplicados nos géis em uma fenda aberta no sentido da largura, a 6 cm do cátodo. Entre cada amostra foi deixado um espaço de 3 mm, permitindo, com clareza, a obtenção de dados para 28 indivíduos a cada corrida. Outros detalhes do procedimento de eletroforese seguiram o descrito por Alfenas et al. (1998).

Três sistemas de tampões foram utilizados:

(I) Eletrodo: ácido bórico 0,3 M, hidróxido de sódio 60 mM, pH 8,0. Gel: tris 10 mM, pH 8,5 (Shaw e Prasad 1970, com modificações). Condição de corrida: 180 V/ 3h 30 min;

(II) Eletrodo: ácido cítrico 0,04 M e N (3 aminopropil) morfolina até alcançar pH 6,1. Gel: solução do eletrodo diluída 1:20 (Clayton e Tetriak 1972). Condição de corrida: 50 mA/ 6hs;

(III) Eletrodo: tris 0,25M e ácido cítrico 0,057M, pH8,0. Gel: solução do eletrodo diluída 1: 25 (Ward e Warwick 1980). Condição de corrida: 50 mA/ 5hs.

Foram testados 30 sistemas enzimáticos: leucina aminopeptidase (LAP), L-leucil-L-glicilglicina peptidase (PLgg), L-leucil-alanina peptidase (PLa), pirofosfatase (PP), manose fosfato isomerase (MPI), desidrogenase do sorbitol (SDH), enzima málica (ME), fosfoglicose isomerase (PGI), fosfoglicomutase (PGM), desidrogenase do malato (MDH), desidrogenase do isocitrato (IDH), adenilato quinase (AK), desidrogenase do lactato (LDH), esterase (EST), hexoquinase (HK), desidrogenase da glicose 6-fosfato (G6PDH), desidrogenase hidroxibutírico (HBDH), desidrogenase do álcool (ADH), desidrogenase do octanol (ODH), oxidase do aldeído (AO), fosfatase ácida (ACPH), fumarase (FUM), aldolase (ALD), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), desidrogenase da xantina (XDH), diaforase (DIA), desidrogenase da glicose 3-fosfato (G3PD), desidrogenase da α -galactose (α GDH) e desidrogenase do ácido 6-fosfogluconico (6PGD). Os protocolos da revelação dos sistemas enzimáticos foram adaptados a partir de Shaw e Prasad (1970) e Alfenas et al. (1991), com pequenas modificações.



Figura 1.1. Locais amostrados para *Nodilittorina lineolata*. As abreviaturas das amostras se encontram na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Locais e datas de coleta de *Nodilittorina lineolata*.

Estado	Abrev. ¹	N ²	Localidade	Data de coleta	lat/long
Ceará	(Fo)	57	Fortaleza	julho/ 1998	3 ^o 43's / 38 ^o 30'l
	(Ti96)	94	Tibau	agosto/ 1996	4 ^o 48's / 37 ^o 15'l
	(Ti97)	69		fevereiro/1997	
Rio Grande do Norte	(Na)	30	Natal	abril/ 1997	5 ^o 48's / 35 ^o 10'l
Pernambuco	(Po)	64	Porto (Barreiro)	janeiro/ 1997	8 ^o 49's / 35 ^o 7'l
	(SJ)	61	S. José da Coroa Grande	janeiro/ 1997	8 ^o 54's / 35 ^o 8'l
Rio de Janeiro	(Pe)	50	Pepino	janeiro/ 1998	22 ^o 56's / 43 ^o 16'l
	(Fr)	67	Frade	agosto/ 1997	23 ^o 00's / 44 ^o 16'l
S. Paulo	(IP)	51	Ilha dos Porcos (Ubatuba)	fevereiro/ 1999	23 ^o 23's / 44 ^o 53'l
	(Pre96)	89	Preta	novembro/ 1996	23 ^o 48's / 45 ^o 23'l
	(Pre97)	53	(S. Sebastião)	junho/ 1997	
	(Pre98)	31		junho/ 1998	
	(Ba96)	78	Barequeçaba	novembro/ 1996	23 ^o 50's / 45 ^o 26'l
	(Ba98)	19	(São Sebastião)	junho/ 1998	
	(Gua96)	52	Guaecá	maio/ 1996	23 ^o 50's / 45 ^o 27'l
	(Gua3/97)	58	(S. Sebastião)	março/ 1997	
	(Gua6/97)	45		junho/ 1997	
	(PG97)	45	Praia Grande	fevereiro/ 1997	23 ^o 52's / 45 ^o 25'l
	(PG98)	36	(S. Sebastião, Ilha Bela)	junho/ 1998	
Sta. Catarina	(Bo)	60	Bombas	outubro/ 1998	27 ^o 8's / 48 ^o 29'l

¹ Abreviatura das localidades. ² Tamanho amostral.

Análises

Utilizando o programa BIOSYS-1 (Swofford e Selander 1981), foram obtidas estimativas de variabilidade genética, tais como: proporção de locos polimórficos (P, critério de 95%), o número médio de alelos por loco (A_p), a diversidade gênica (H_e) e heterozigosidade média observada (H_o) por loco e por amostra.

Desvios das proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg foram obtidos através do programa TFGA (Miller 1997). Para isso foi utilizado um teste

baseado no método de Monte Carlo, adaptado por Guo e Thompson (1992), com 10 séries de 1000 randomizações, totalizando 10000 randomizações.

Foi também calculado o coeficiente F_{st} (Wright 1978) utilizando o parâmetro (θ) de Weir e Cockerham (1984) a fim de estimar como as amostras se encontram estruturadas geneticamente. Este parâmetro foi escolhido pois parece ser o mais adequado para as populações amostradas, que se encaixam dentro do modelo de "random populations" (Weir 1996). Com o programa GDA (Lewis e Zaykin 1999) foi determinado o intervalo de confiança de 95% para o valor do F_{st} total através de "bootstrapping" com 10000 randomizações.

Foram calculadas matrizes de distância e similaridade genética (Nei 1972) e foi construído um dendrograma por UPGMA ("unweighted pairgroup method with arithmetic means"), utilizando o coeficiente de distância genética de Nei (1972). As amostras foram separadas por ano de coleta (1996, 1997, 1998/1999) e feito um dendrograma para cada ano. Estes cálculos foram feitos pelo programa BIOSYS-1 (Swofford e Selander 1981).

Foi realizada uma análise de desequilíbrio de ligação para testar a possibilidade de mais de uma espécie nas amostras estudadas. Os alelos menos frequentes não foram agrupados como um único alelo para evitar perda de informação e possíveis artefatos. O programa GENEPOP (Raymond e Rousset 1995a; Raymond e Rousset 1995b), foi utilizado por fornecer um teste exato para o cálculo de desequilíbrio de ligação (Lehmann et al. 1998). Para testar a significância dos resultados foram calculadas tabelas de contingência que correspondem às associações de locos em cada amostra. As tabelas foram então analisadas empregando o método de cadeia de

Markov, cujos parâmetros usados foram: 100 séries de 1000 iterações com 1000 passos de desmemorização. Para todos os testes foi feita a correção de Bonferroni seqüencial para múltiplos testes (Rice 1989). Esta correção consiste na divisão do nível de significância utilizado (ou seja, $\alpha = 0,05$) pelo número de testes, aumentando o rigor do critério de significância.

RESULTADOS

Identificação das amostras

Todos os espécimes analisados pelo Dr. Reid foram identificados como *Nodilittorina lineolata*. Morfologicamente as amostras não apresentaram indícios de serem constituídas por mais de uma espécie (D. G. Reid, comunicação pessoal). Os caracteres observados não apresentaram descontinuidades, contudo análises mais consistentes da morfometria da concha e da rádula estão sendo realizadas com o intuito de caracterizar morfologicamente as amostras brasileiras de *N. lineolata*.

A ocorrência de apenas uma espécie nas amostras estudadas pode ser confirmada durante as análises genéticas, que serão apresentadas a seguir.

Polimorfismo e variabilidade genética

Dos 30 sistemas enzimáticos testados, foi obtida resolução para 14, totalizando 18 locos (tabela 1.2). Não foi obtida resolução para os seguintes sistemas: esterase (EST), desidrogenase da glicose 6-fosfato (G6PDH), desidrogenase do hidroxidutírico (HBDH), desidrogenase do álcool (ADH), desidrogenase do octanol (ODH), oxidase do

aldeído (AO), fosfatase ácida (ACPH), fumarase (FUM), aldolase (ALD), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), desidrogenase da xantina (XDH), diaforase (DIA), desidrogenase da glicose 3-fosfato (G3PD), desidrogenase da α -galactose (α GDH) e desidrogenase do ácido 6-fosfogluconico (6PGD). Estes sistemas não apresentaram definição para uma leitura confiável ou simplesmente não apareceram. Os protocolos dos sistemas para os quais foi obtida definição estão detalhados no apêndice 1.

Tabela 1.2. Características dos sistemas enzimáticos analisados e respectiva variabilidade.

Sistem enzimático	E.C.	Tampão	Loco	Heterozigosidade ¹
leucina amnopeptidase	3.4.11.1	(I)	<u>LAP</u>	0,530 (0,360)
L -leucil-L-alanina peptidase	3.4.13	(I)	<u>PLa</u>	0,116 (0,039)
L -leucil-L-glicilglicina peptidase	3.4.11	(I)	<u>PLgg</u>	0,222 (0,134)
pirofosfatase	3.6.1.1	(I)	<u>PP</u>	0,163 (0,030)
desidrogenase do lactato	1.1.1.27	(II)	<u>LDH</u>	0,058 (0,033)
fosfomanose isomerase	5.3.1.8	(II)	<u>MPI</u>	0,023 (0,012)
desidrogenase do sorbitol	1.1.1.14	(II)	<u>SDH-1</u>	0,120 (0,078)
			<u>SDH-2</u>	0,280 (0,078)
enzima málica (NADP)	1.1.1.40	(II)	<u>ME</u>	0,015 (0,006)
hexoquinase	2.7.1.1	(III)	<u>HK-1</u>	0,112 (0,092)
			<u>HK-2</u>	0,140 (0,114)
fosfoglicose isomerase	5.3.1.9	(III)	<u>PGI</u>	0,108 (0,108)
fosfoglicomutase	2.7.5.1	(III)	<u>PGM-1</u>	0,553 (0,325)
			<u>PGM-2</u>	0,042 (0,036)
desidrogenase do malato (NAD)	1.1.1.37	(III)	<u>MDH</u>	0,007 (0,007)
desidrogenase do isocitrato	1.1.1.42	(III)	<u>IDH</u>	0,004 (0,003)
adenilato quinase	2.7.4.3	(III)	<u>AK-1</u>	0,056 (0,039)
			<u>AK-2</u>	0,221 (0,154)

¹. Valores obtidos pelo cálculo da média da diversidade gênica das 20 amostras por loco. Entre parênteses estão as médias dos valores de heterozigosidade observados por loco.

Dos 18 locos analisados, apenas os locos MDH e IDH não apresentaram polimorfismo (critério de 95%). Em média, as amostras apresentaram 45% de locos polimórficos. Dos locos estudados, o menos variável foi ME, com três alelos e PGM-1 e

LAP foram os mais variáveis, cada um apresentando 10 alelos (tabela a.1). Na tabela 1.2 é possível visualizar a alta variabilidade destes locos em relação aos demais. A amostra de “Pre96” apresentou o maior valor, com 72,2% de locos polimórficos (tabela 1.3).

Foi observada alta diversidade gênica, as médias de H_e para as populações e para a espécie foram, respectivamente, 0,155 e 0,190. A heterozigosidade média observada ($H_o = 0,089$) apresentou valor relativamente inferior ao esperado (tabela 1.3). Para os locais onde foi obtida mais de uma amostra (Tibau, Guaecá, Barequeçaba e Preta), foi observada variação nos valores de variabilidade encontrados (figura 1.4).

Todas as amostras apresentaram deficiência de heterozigotos para um ou mais locos. Foi encontrada variação quanto aos locos, às classes de genótipos que apresentaram desvio de Hardy-Weinberg e quanto à intensidade deste desvio (ver exemplo do loco PGM-1 na tabela a.2). Na tabela 1.4 estão apresentadas as amostras e os respectivos locos e os níveis de significância dos desvios das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, calculados pelo teste de Monte Carlo (Guo e Thompson 1992). Podemos verificar que as amostras de Ilha dos Porcos (SP) e Fortaleza (CE) são as que apresentam o maior número de locos com desvios das proporções de Hardy-Weinberg.

O loco PGM-1 apresentou deficiência de heterozigotos em 19 das 20 amostras. Com fim ilustrativo, apresentamos uma tabela (tabela a.2) que mostra as freqüências genóticas observadas e esperadas deste loco para as amostras que apresentaram desvio.

Desequilíbrio de ligação

Foram realizados 1055 testes exatos de desequilíbrio de ligação, sendo que destes, 33 foram significativos. Quando aplicada a correção de Bonferroni seqüencial, nenhum destes testes se mostrou significativo.

Estruturação e distância genética

Foi observado para as amostras de *N. lineolata* uma baixa estruturação genética ($F_{st}=0,028$, IC 95%= 0,016-0,043), ou seja, cerca de 97% da variação encontrada é atribuível a variabilidade intrapopulacional.

Os valores de distância genética variaram de 0 (entre Barequeçaba 96 e S. José e entre Barequeçaba 98 e Tibau 96) a 0,132 (entre Guaecá 96 e Tibau 97) com uma média $D=0,023$ (tabela 1.5). A matriz de distância e identidade genética (Nei 1972) está apresentada na forma de dendrograma para visualização da similaridade entre as amostras (figura 1.2).

Nos dendrogramas das figuras 1.2 e 1.3 é possível notar que as amostras de Guaecá 96, Guaecá 6/97 e Tibau 97 se afastam das demais, inclusive das amostras coletadas na mesma localidade em diferentes ocasiões.

Para estas amostras o valor do F_{st} foi de 0,337 (IC 95%= 0,001-0,637), indicando grande estruturação, o que deve ser avaliado com cautela observando o amplo intervalo de confiança obtido.

Tabela 1.3. Variabilidade genética de *N. lineolata*. N = média da amostra por loco. Ap= média do número de alelos por loco. P= porcentagem de locos polimórficos. H_o= heterozigosidade média observada. H_e= diversidade gênica.

Localidade	N	Ap	P	H _o	H _e
Fortaleza	44,1	3,2	55,6	0,081	0,172
Tibau 96	41,3	2,3	22,2	0,052	0,097
Tibau 97	28,1	2,6	50,0	0,093	0,147
Natal	21,2	2,2	44,4	0,092	0,185
S. José	17,4	1,8	33,3	0,061	0,084
Porto	37,0	3,2	44,4	0,128	0,176
Frade	43,9	3,0	50,0	0,089	0,167
Pepino	37,5	3,3	55,6	0,092	0,185
Guaecá 96	12,3	1,4	16,7	0,038	0,055
Guaecá 3/97	30,2	2,7	61,1	0,064	0,164
Guaecá 6/97	15,0	1,7	33,3	0,087	0,118
Preta 96	47,2	3,5	72,2	0,125	0,222
Preta 97	15,7	1,6	11,1	0,030	0,042
Preta 98	21,3	2,9	61,1	0,127	0,238
Barequeçaba 96	31,1	2,2	22,2	0,043	0,085
Barequeçaba 98	14,4	2,2	38,9	0,083	0,131
Praia Grande 97	29,6	3,1	61,1	0,139	0,190
Praia Grande 98	26,6	2,7	50,0	0,097	0,206
Porcos	43,6	3,5	66,7	0,125	0,244
Bombas	43,2	3,3	50,0	0,140	0,195
Média	30,0	2,7	45,0	0,089	0,155
Espécie	600,7	6,2	61,1	0,100	0,190

Tabela 1.4. Amostras e locos que apresentaram desvio das proporções de Hardy-Weinberg (resultados obtidos através do teste de Monte Carlo (Guo e Thompson 1992)).

Amostra	Loco
Fortaleza	<u>PGM-1</u> ** , <u>PGI</u> * , <u>SDH-1</u> ** e 2** , <u>AK-2</u> ** , <u>PLa</u> * , <u>PLgg</u> * , <u>LAP</u> ** , <u>PP</u> **
Tibau 96	<u>PGM-1</u> ** , <u>MPI</u> * , <u>AK-1</u> * , <u>HK-1</u> * , <u>LAP</u> *
Tibau 97	<u>PGM-1</u> ** , <u>AK-1</u> * e 2* , <u>PLa</u> ** , <u>PLgg</u> * , <u>LAP</u> ** , <u>PP</u> *
Natal	<u>PGM-1</u> ** , <u>PLa</u> ** , <u>PLgg</u> ** , <u>LAP</u> *
S. José	<u>PGM-1</u> ** , <u>LAP</u> *
Porto	<u>PGM-1</u> ** , <u>IDH</u> ** , <u>MPI</u> ** , <u>ME</u> * , <u>LAP</u> ** , <u>PP</u> *
Frade	<u>PGM-1</u> ** , <u>SDH-2</u> * , <u>HK-2</u> * , <u>PLa</u> ** , <u>PLgg</u> ** , <u>LAP</u> * , <u>PP</u> **
Pepino	<u>PGM-1</u> ** , <u>ME</u> * , <u>SDH-1</u> ** e 2** , <u>PLa</u> * , <u>LAP</u> ** , <u>PP</u> **
Guaecá 96	<u>PLa</u> **
Guaecá 3/97	<u>PGM-1</u> ** , <u>LDH</u> ** , <u>SDH-2</u> ** , <u>HK-2</u> * , <u>PLa</u> * , <u>LAP</u> * , <u>PP</u> *
Guaecá 6/97	<u>PGM-1</u> *
Preta 96	<u>PGM-1</u> ** , <u>ME</u> ** , <u>SDH-1</u> ** , <u>AK-2</u> ** , <u>PLa</u> ** , <u>PLgg</u> ** , <u>LAP</u> ** , <u>PP</u> **
Preta 97	<u>PGM-1</u> **
Preta 98	<u>PGM-1</u> ** , <u>SDH-1</u> ** e 2** , <u>HK-1</u> ** , <u>PLa</u> * , <u>LAP</u> ** , <u>PP</u> **
Barequeçaba 96	<u>PGM-1</u> ** , <u>AK-2</u> ** , <u>PLa</u> ** , <u>LAP</u> **
Barequeçaba 98	<u>PGM-1</u> ** , <u>AK-1</u> * , <u>PP</u> *
PraiaGrande 97	<u>PGM-1</u> ** , <u>PLa</u> ** , <u>PP</u> **
PraiaGrande 98	<u>PGM-1</u> ** , <u>SDH-1</u> ** e 2** , <u>PLgg</u> ** , <u>PP</u> **
Porcos	<u>PGM-1</u> ** , <u>MPI</u> ** , <u>SDH-1</u> ** e 2** , <u>AK-1</u> ** , <u>PLa</u> ** , <u>PLgg</u> ** , <u>LAP</u> ** , <u>PP</u> **
Bombas	<u>PGM-1</u> ** e 2** , <u>LDH</u> ** , <u>SDH-2</u> ** , <u>HK-1</u> ** , <u>PP</u> **

* significativo para $p \leq 0,05$; ** significativo para $p \leq 0,01$.

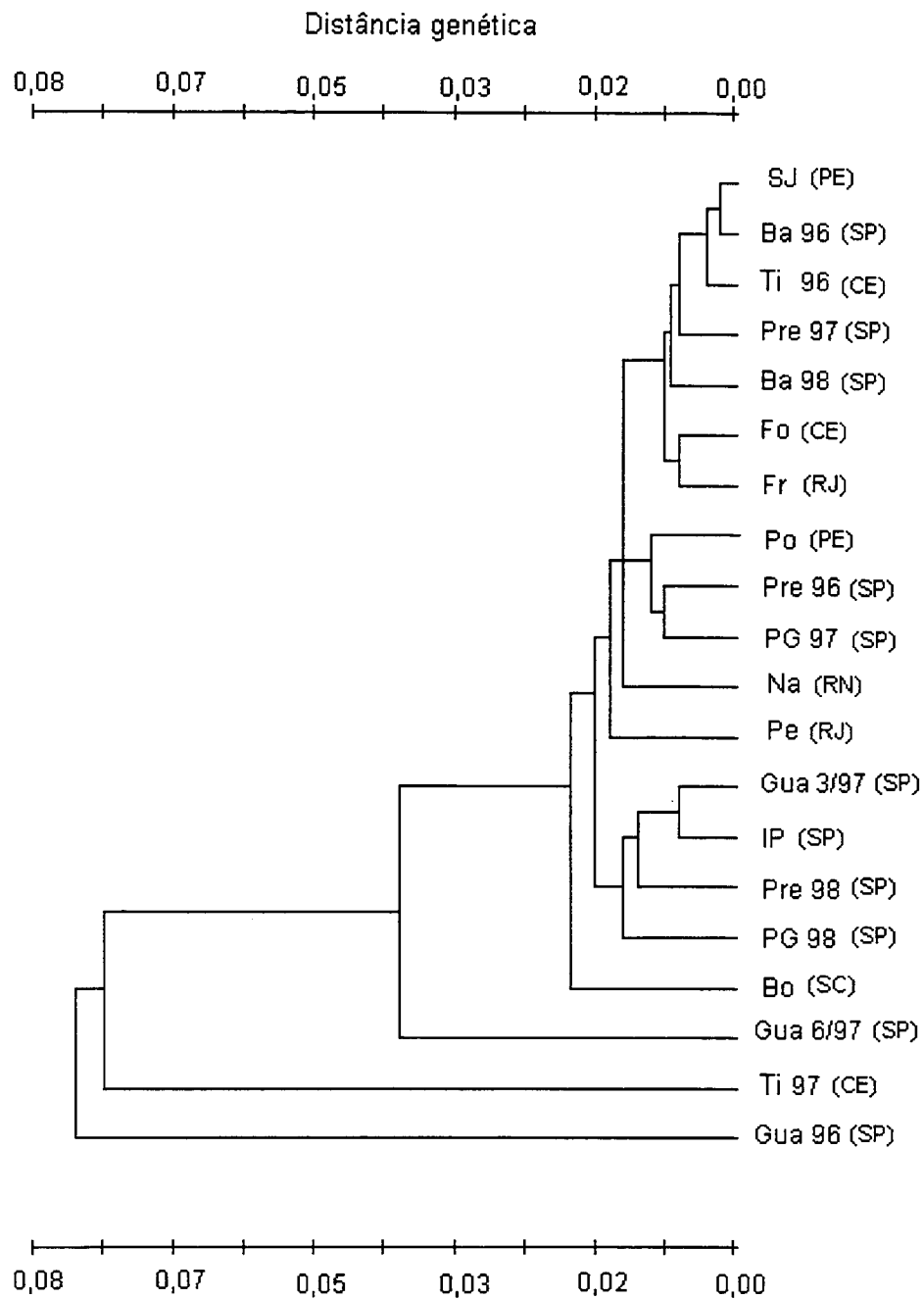


Figura 1.2. Dendrograma das amostras de *N. lineolata* obtido através da análise de UPGMA utilizando o coeficiente de Nei (1972). Correlação cofenética= 0,957. As abreviaturas das amostras se encontram na tabela 1.1.

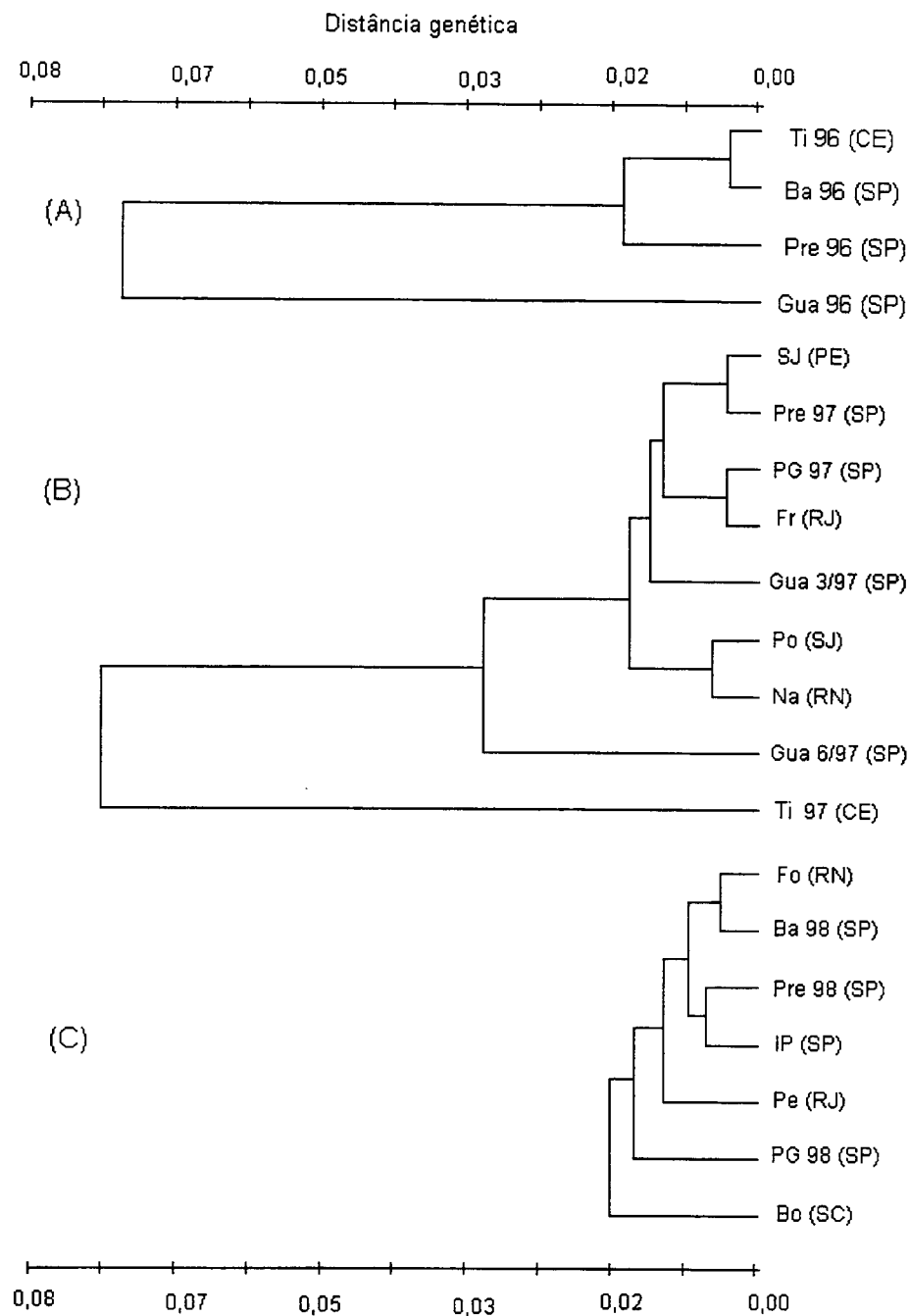


Figura 1.3. Dendrogramas das amostras de *N. lineolata* separadas por ano obtidos através da análise de UPGMA utilizando o coeficiente de Nei (1972). (A) Amostras coletadas no ano de 1996 (correlação cofenética= 1,00). (B) Amostras coletadas no ano de 1997 (correlação cofenética= 0,973). (C) Amostras coletadas nos anos de 1998/1999 (correlação cofenética= 0,691). As abreviaturas das amostras se encontram na tabela 1.1.

Tabela 1.5. Acima e abaixo da diagonal, respectivamente, distância e identidade genética (Nei, 1972) para amostras de *N. lineolata*.

Amostras *	SJ	Po	Ti 96	Ti 97	Na	Fo	Gu 96	Gu 3/97	Gu 6/97	Pr 96	Pr 97	Pr 98	Ba 96	Ba 98	Ba 99	Ba 97	Ba 98	Ba 99	PG 97	PG 98	Fr	IP	Pe	Bo	
	S. José	****	,010	,001	,070	,007	,005	,064	,010	,028	,010	,003	,017	,000	,004	,005	,012	,004	,019	,012	,004	,019	,012	,012	,013
Porto	,990	****	,010	,078	,005	,010	,077	,016	,009	,003	,013	,025	,011	,014	,006	,013	,011	,020	,015	,013	,011	,020	,015	,025	
Grossos 96	,999	,990	****	,069	,007	,003	,068	,008	,032	,009	,004	,011	,002	,000	,006	,009	,003	,014	,008	,006	,009	,003	,014	,010	
Grossos 97	,932	,925	,934	****	,070	,061	,132	,075	,098	,065	,069	,059	,070	,072	,065	,047	,069	,068	,061	,065	,047	,069	,068	,061	,085
Natal	,993	,995	,993	,933	****	,007	,077	,014	,026	,008	,014	,021	,007	,011	,008	,012	,010	,017	,009	,008	,012	,010	,017	,009	,025
Fortaleza	,995	,990	,997	,940	,993	****	,068	,004	,031	,007	,008	,005	,005	,002	,005	,007	,002	,005	,005	,007	,002	,002	,005	,005	,011
Guaecá 96	,938	,925	,935	,877	,926	,935	****	,067	,089	,068	,061	,081	,070	,065	,056	,066	,067	,075	,082	,066	,066	,067	,075	,082	,077
Guaecá 3/97	,990	,984	,992	,928	,986	,996	,935	****	,031	,012	,010	,007	,013	,001	,009	,009	,004	,003	,013	,009	,009	,004	,003	,013	,010
Guaecá 6/97	,972	,991	,968	,907	,975	,969	,915	,970	****	,018	,028	,050	,032	,033	,024	,027	,031	,039	,042	,027	,031	,039	,042	,043	,043
Preta 96	,990	,997	,991	,937	,992	,993	,935	,988	,982	****	,011	,013	,010	,009	,001	,005	,005	,014	,013	,001	,005	,005	,014	,013	,018
Preta 97	,997	,987	,996	,933	,986	,992	,941	,990	,973	,990	****	,018	,006	,003	,007	,011	,007	,023	,022	,007	,011	,007	,023	,022	,015
Preta 98	,983	,976	,990	,943	,979	,995	,923	,993	,952	,987	,982	****	,016	,006	,012	,005	,006	,003	,008	,012	,005	,006	,003	,008	,007
Barequeçaba 96	1,00	,989	,998	,932	,993	,995	,933	,987	,969	,990	,994	,984	****	,005	,005	,014	,005	,018	,009	,005	,014	,005	,018	,009	,015
Barequeçaba 98	,996	,987	1,00	,931	,989	,998	,937	,999	,968	,991	,997	,994	,995	****	,007	,006	,002	,008	,010	,007	,006	,002	,008	,010	,007
P. Grande 97	,995	,994	,994	,937	,992	,995	,946	,991	,976	,999	,993	,988	,995	,993	****	,007	,003	,012	,010	,013	,007	,003	,012	,010	,013
P. Grande 98	,988	,987	,991	,954	,989	,994	,936	,991	,973	,995	,989	,995	,986	,994	,993	****	,006	,009	,013	,011	,006	,006	,009	,013	,011
Frade	,996	,989	,997	,933	,990	,998	,935	,996	,969	,995	,993	,994	,995	,998	,997	,994	****	,008	,005	,008	,994	****	,008	,008	,005
I. dos Porcos	,981	,980	,986	,935	,983	,995	,928	,997	,962	,986	,978	,997	,982	,992	,988	,991	,992	****	,007	,015	,991	,992	****	,007	,015
Pepino	,988	,985	,992	,941	,991	,995	,921	,987	,959	,987	,979	,992	,991	,991	,990	,987	,992	,992	****	,018	,990	,992	****	,018	,018
Bombas	,987	,976	,991	,919	,975	,989	,926	,990	,958	,982	,985	,993	,986	,993	,987	,989	,995	,985	,983	,987	,989	,995	,985	,983	****

* As abreviaturas das amostras estão na tabela 1.1.

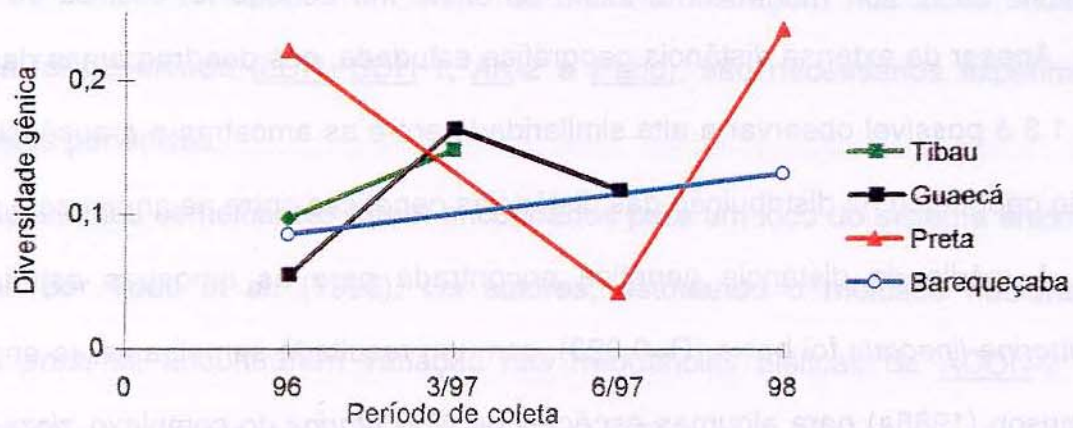


Figura 1.4. Variação dos valores da diversidade gênica encontrada nas amostras de Tibau, Guaecá, Barequeçaba e Preta, coletadas em mais de uma época.

DISCUSSÃO

Estruturação e distância genética

A baixa estruturação genética encontrada ($F_{st}=0,028$) pode ser explicada pelo estágio larval planctotrófico desta espécie. Em invertebrados aquáticos com desenvolvimento planctônico os ovos e as larvas são submetidos à ação das correntes marinhas. Altas taxas de dispersão associadas à menor variabilidade interpopulacional em relação à intrapopulacional são comumente observadas nestes animais (Berger 1973; Behrens Yamada 1989; Ward 1990; Raff, 1996; Todd et al. 1998; Bohonak 1999). Apesar da controvérsia apresentada anteriormente sobre a relação desenvolvimento larval e fluxo gênico, nossos dados parecem corroborar a hipótese de que a baixa variabilidade interpopulacional se deve à homogeneização causada pela migração das larvas planctotróficas. Uma possível evidência do fluxo gênico entre amostras é a

presença de alelos poucos freqüentes (dos locos PGM-1, PGI, AK-2 e LAP, por exemplo) compartilhados em amostras geograficamente distantes (tabela a.1).

Apesar da extensa distância geográfica estudada, nos dendrogramas das figuras 1.2 e 1.3 é possível observar a alta similaridade entre as amostras e a ausência de um padrão geográfico na distribuição das distâncias genéticas entre as amostras.

A média de distância genética encontrada para as amostras estudadas de *Nodilittorina lineolata* foi baixa ($D=0,023$), com um resultado semelhante ao encontrado por Janson (1985a) para algumas espécies de *Nodilittorina* do complexo *ziczac* (média da distância genética intraespecífica = 0,016). Para as amostras de outros litorinídeos foram também encontrados valores semelhantes de distância genética intraespecífica (*Littorina rudis* Ward e Warwick 1980; *L. arcana* Ward e Warwick 1980 e Knight et al. 1987; e *Littorina sitkana* e *L. subrotundata* Boulding et al. 1993), mesmo para as espécies que não possuem estágio larval planctônico (dentre as citadas, *L. subrotundata* e *L. rudis*).

Nos dendrogramas apresentados nas figuras 1.2 e 1.3 pode-se observar que as amostras de Guaecá 96, Guaecá 6/97 e Tibau 97 se afastam das demais, inclusive das amostras coletadas na mesma localidade em diferentes épocas. Isto ocorreu porque as freqüências alélicas (dos locos LDH, SDH-1, AK-2 e PLgg) nessas amostras foram bem diferentes em relação às demais amostras (tabela a.1). Na análise de estruturação genética vemos que, principalmente para SDH-1, PLgg e PP, os valores de θ foram altos (respectivamente, 1,00, 0,59 e 0,46).

As amostras de Guaecá 96, Guaecá 6/97 e Tibau 97 têm poucos indivíduos representantes desses locos, logo não é possível fazer muitas especulações sobre

estes resultados. Para verificar se realmente ocorre variação temporal nas freqüências alélicas ou se isso foi apenas um efeito da baixa amostragem nos locos onde esta mudança foi observada (LDH, SDH-1, AK-2 e PLgg), são necessários experimentos com coletas periódicas.

Resultados semelhantes foram encontrados para um loco do sistema enzimático aconitase por Todd et al. (1998). Os autores, estudando o molusco nudibrânquio *Adalaria proxima*, encontraram variação nas freqüências alélicas da ACON-2 entre amostras de um mesmo local coletadas em anos diferentes, no entanto também não apresentaram nenhuma hipótese para explicar este resultado devido a ausência de evidências empíricas.

Polimorfismo e variabilidade

As amostras de *N. lineolata* mostraram-se bastante polimórficas em geral, sendo que na amostra “Pre96” foi observada a maior porcentagem de locos polimórficos (72,2%). A partir desta primeira coleta em Praia Preta, oito meses depois foram feitas novas coletas no mesmo local (“Pre97”) e o que foi observado para esta amostra foi a menor porcentagem de locos polimórficos obtida para *N. lineolata*, 11,1%. Novamente, um ano após a coleta de “Pre97”, foi feita mais uma coleta, resultando na amostra “Pre98”. Esta apresenta alta porcentagem de locos polimórficos, 61,1%, assim como a primeira amostra “Pre96” (tabela 1.3). Esta oscilação pode ser vista também nas diferentes coletas de Guaecá, Barequeçaba e Tibau. Observando a variabilidade destas amostras (tabela 1.3), nota-se que também há variação nos valores da diversidade gênica de ano para ano e aparentemente não há nenhum padrão em relação a época do ano. Para ilustrar esta variação nas amostras coletadas na mesma localidade mais

de uma vez, foi feito um gráfico da relação da diversidade gênica com a época de coleta (figura 1.4). A relação entre porcentagem de locos polimórficos e a época de coleta não foi mostrada, pois é semelhante à figura 1.4.

Estas oscilações poderiam ser explicadas pelo efeito do recrutamento de genótipos diferentes em épocas diferentes. Um aspecto importante é que a desova de espécies do complexo *ziczac* ocorre ao longo do ano (durante cerca de 8 meses), em resposta ao nível das marés (Borkowski 1971). Ou seja, no costão o recrutamento ocorre com freqüência, e a colonização por recrutas com genótipos diferentes do observado em meses anteriores pode ser comum. Caso existam variações microgeográficas nas freqüências genotípicas, isto também poderia levar a diferenças entre as amostras.

A amostra de Ilha dos Porcos também apresentou grande polimorfismo (66,7% dos locos). Nesta localidade, os indivíduos de *Nodilittorina lineolata* foram coletados em uma parede de costão rochoso totalmente exposta ao mar aberto, na face oceânica da ilha. Esta foi a única coleta realizada neste tipo de ambiente; os outros locais amostrados se caracterizam por praias arenosas com costão batido ou abrigado. Aparentemente não foi encontrada nenhuma relação entre áreas abrigadas ou não e porcentagem de polimorfismo ou variabilidade genética, pelo menos em nível macrogeográfico. Também não foram encontradas evidências da existência de gradientes ao longo do litoral brasileiro.

A porcentagem média de locos polimórficos ($P= 45\%$ para as amostras e $61,1\%$ para a espécie, tabela 1.3) foi maior que o observado para espécies da família Littorinidae em geral (média $P= 35\%$, em Ward 1990) e para 3 espécies do complexo *ziczac* estudadas por Janson (1985a) (média $P= 34\%$).

Foi observada também alta diversidade gênica ($H_e = 0,155$, d.p.=0,059), com um resultado semelhante à média encontrada para as outras espécies da família ($H_e=0,15$, d.p.=0,071) segundo Ward (1990). A variabilidade encontrada para *N. lineolata* foi maior em relação ao resultado obtido por Janson (1985a) para espécies do complexo *ziczac* (média $H_e=0,125$).

A quantidade de variabilidade genética e polimorfismo encontrados em algumas espécies ou populações são apontados como reflexo da heterogeneidade ambiental (Levene 1953; Powell 1971; Levinton 1973; Levinton e Suchanek 1978; Ward e Warwick 1980; Janson 1985a; Noy et al. 1987; Solé-Cava e Thorpe 1991; Mitchell-Olds 1992). Populações que vivem em ambientes mais complexos seriam mais polimórficas e apresentariam maior variabilidade em relação a populações que habitam ambientes mais simples.

Na família Littorinidae alguns trabalhos mostram que as espécies que ocupam mais de um nicho ou um nicho amplo têm maior variabilidade e apresentam mais locos polimórficos (Ward e Warwick 1980; Janson 1985a; Noy et al. 1987). No entanto, as revisões de Ward (1990) e McQuaid (1996) mostram que os padrões de variabilidade encontrados podem ser explicados também por outros fatores além da variação espacial, considerando, ainda, que amplitude de nicho é difícil de ser estimada. Além disso, em populações naturais, é difícil separar os componentes espaciais e temporais; quando se estuda vários locais, a variação temporal pode acentuar a variação espacial observada (Bryant 1976).

No costão rochoso existem vários microambientes diferentes, com áreas mais e menos abrigadas, presença ou não de filetes de água doce, pedras mais ou menos batidas pelas ondas, entre outros. *Nodilittorina lineolata* ocupa amplos trechos desse

ambiente, tendo sido encontrada e coletada nas zonas de médio litoral superior e supralitoral, e em superfícies de madeira quando não totalmente imersas (onde foi coletada a amostra de S. José da Coroa Grande). Apesar disso, é difícil assumir, sem experimentos ou comparações com espécie próximas que ocupem o mesmo ambiente, que os altos valores de polimorfismo e variabilidade encontrados sejam decorrentes do amplo ambiente ocupado. Há indícios de que, em geral, o polimorfismo pode estar relacionado com a heterogeneidade ambiental e, nesse caso, a variação enzimática encontrada poderia ser adaptativa; no entanto há poucas evidências empíricas suportando a hipótese de que a heterogeneidade ambiental é o principal fator que mantém a variação genética (Gooch e Schopf 1972; Hedrick et al. 1976; Ward 1990). A variabilidade pode estar sendo mantida por um alto tamanho efetivo nas populações e este pode ser devido ao tamanho do nicho ocupado por *N. lineolata*.

Deficiência de heterozigotos

Devido à existência de estágio larval e por possuírem populações grandes, espera-se que invertebrados marinhos dióicos apresentem panmixia e que suas freqüências genotípicas se encontrem dentro do esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. No entanto, vários trabalhos mostram que nem sempre as freqüências genotípicas de populações naturais de invertebrados marinhos se encontram em equilíbrio, geralmente tendendo para o excesso de homozigotos (Mitton e Koehn 1973; Nevo et al. 1981; Berger 1983; Singh e Green 1984; Zouros e Foltz 1984; Nevo et al. 1984; Janson 1985a; Lavie e Nevo 1987; Noy et al. 1987; Ward 1990; McQuaid 1996).

Alguns trabalhos (Zouros et al. 1983; Zouros e Foltz 1984) mostram que a heterozigosidade estaria relacionada com a taxa de crescimento em bivalves e com a

maior eficiência metabólica de alguns indivíduos, conseqüentemente tamanhos maiores seriam atribuídos a heterose. Além disso, a heteroziguidade para certos locos parece aumentar a viabilidade pós-recrutamento nos juvenis de *Crassostrea virginica* (Zouros e Foltz 1984). A relação entre tamanho e heteroziguidade não foi encontrada quando testada em *Littorina littorea* (Foltz et al. 1993).

O efeito Wahlund também já foi apontado como explicação para a deficiência de heterozigotos em várias espécies de moluscos (Berger 1983; Johnson e Black 1984). Noy et al. (1987) verificaram baixa freqüência de heterozigotos em três populações de *L. punctata* e atribuem este resultado ao efeito Wahlund. Outra hipótese para este caso foi apresentada por Ward (1990): por esta espécie possuir uma distribuição restrita à região estudada, o resultado encontrado seria devido ao seu reduzido tamanho efetivo. Janson (1985a) encontrou deficiência de heterozigotos apenas em populações de *Nodilittorina angustior*, sem indícios deste fenômeno nas outras espécies do complexo *ziczac*. Segundo a autora, a deficiência poderia ser devida à seleção contra o heterozigoto, a alelos nulos ou ao efeito Wahlund.

Um outro exemplo de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg em populações naturais foi encontrado em ambientes poluídos por materiais inorgânicos. Os sistemas enzimáticos PGM em crustáceos e PGI em moluscos (inclusive em espécies do gênero *Littorina*) parecem estar relacionados com a resistência a metais pesados, como mercúrio e cádmio (Nevo et al. 1981; Nevo et al. 1984; Lavie e Nevo 1987). Para o camarão marinho *Palaemon elegans* foi observado que concentrações diferentes de mercúrio favorecem diferentes genótipos: em altas concentrações de mercúrio os indivíduos homozigóticos para um determinado alelo da PGM são favorecidos mas, no ambiente natural onde as concentrações são baixas ou intermediárias, os heterozigotos

possuem maior valor adaptativo (Nevo et al. 1981; Nevo et al. 1984). Na presença de cádmio e mercúrio, os homozigotos para um dos alelos do sistema enzimático PGI de *L. punctata* e os heterozigotos são desfavorecidos em geral; nas mesmas condições, foi observado em *L. neritoides* que apenas o alelo S (slow) da PGI é selecionado contra (Lavie e Nevo 1987). No gastrópode do gênero *Monodonta* os indivíduos homozigotos para um alelo da enzima PGI são os mais resistentes à poluição por mercúrio no meio ambiente (Nevo et al. 1984). Estas enzimas possuiriam, então, um papel importante no valor adaptativo das populações analisadas.

Em *N. lineolata* foi também encontrado desvio das proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, sempre tendendo ao excesso de homozigotos. Foi observada deficiência de heterozigotos para pelo menos um loco em cada amostra analisada. O loco PGM-1 apresentou deficiência em todas as amostras com exceção de Guaecá 96 (tabela 1.4); os locos LAP e PP apresentaram deficiência em 13 amostras. Na tabela a.2, é interessante notar a alta freqüência de homozigotos da PGM-1 (apresentada no início da tabela) em relação à freqüência observada dos heterozigotos para os alelos mais comuns.

A possibilidade de que este resultado seja explicado pela presença de agentes poluentes no mar parece remota pois a deficiência de heterozigotos foi encontrada nos 20 locais amostrados, assim como a hipótese do baixo tamanho efetivo é pouco provável no presente trabalho devido ao grande número de indivíduos encontrados no costão. Uma outra explicação para estes resultados seria a presença de alelos nulos nos locos estudados, já que um indivíduo heterozigoto para um alelo nulo seria interpretado como homozigoto. Embora seja possível que existam alelos nulos nos

genótipos amostrados para um ou outro loco, é pouco provável a sua presença em 17 locos e com a frequência encontrada.

Uma explicação possível para a deficiência de heterozigotos é o efeito Wahlund, que ocorre quando, por exemplo, duas populações diferentes são incluídas em uma única amostra. Esta hipótese pode ser considerada pouco provável devido a similaridade genética observada entre as amostras estudadas.

Tracey et al. (1975), estudando o bivalve *Mytilus californianus*, encontraram resultados semelhantes e têm a seguinte hipótese: no costão podem ser encontrados os chamados “grupos de acasalamento”, ou seja, conjuntos de indivíduos com frequências genótípicas diferentes agrupados no ambiente. Estas diferenças nas frequências alélicas podem ser causadas por uma variação temporal na composição e distribuição dos recrutas resultante, por exemplo, de uma diferenciação genotípica para época reprodutiva. Esta hipótese é especulativa, mas é possível que animais com determinados genótipos reproduzam em épocas diferentes em relação a animais com genótipos diferentes. No presente trabalho é pouco provável que isto tenha ocorrido já que há coletas de várias épocas do ano.

O trabalho de Tracey et al. (1975) não é o único onde pode ser observada diferença na composição dos genótipos causando deficiência de heterozigoto; foram encontrados padrões semelhantes também para *Mytilus edulis* (Levinton e Suchanek 1978) e para o pulmonado *Siphonaria sp* (Johnson e Black 1982, Johnson e Black 1984). A heterogeneidade do costão, com seus microambientes distintos, poderia estar causando a alta variabilidade genética e a deficiência de heterozigotos encontrada.

Extensos trabalhos sobre o efeito da variação do ambiente sobre a composição dos genótipos têm sido realizados com as espécies *Littorina saxatilis* e *Littorina fabalis*

(Johannesson e Johannesson 1989; Johannesson et al. 1993; Johannesson et al. 1995; Johannesson e Tatarenkov 1997; Tatarenkov e Johannesson 1999). Para estas duas espécies foi observado, em distâncias de poucos metros, diferenciação morfológica e genética, sendo que, em algumas populações, os autores observaram a ocorrência de acasalamentos não aleatórios. Deve-se lembrar que estes moluscos são dióicos, têm fertilização interna e que, durante a fase adulta, habitam uma determinada faixa no costão e provavelmente irão se acasalar com os indivíduos vizinhos.

Esta observação caberia também a *Nodilittorina lineolata*, que apesar da grande motilidade na fase larval, passa a vida adulta na zona de supralitoral de costões rochosos (Magalhães 1998). As amostras estudadas seriam formadas por diferentes grupos com diferentes composições genótípicas ao longo do costão, o que seria consequência de seleção ou simplesmente de uma variação aleatória na composição genética durante o recrutamento.

Como visto acima, a deficiência de heterozigotos é bastante comum em moluscos, inclusive em espécies da família Littorinidae. Os resultados apresentados não permitem a inferência do que estaria causando a deficiência de heterozigotos encontrada, já que não foram realizados experimentos com este objetivo. São necessários mais estudos para tentar compreender qual ou quais são os fatores responsáveis, verificando também se há ou não padrões microgeográficos na estruturação das populações naturais. *Nodilittorina lineolata* pode ser um modelo interessante para este estudo, devido aos resultados encontrados para esta espécie e à sua ampla distribuição no ambiente.

O complexo de espécies ziczac na costa brasileira

A análise genética, assim como a morfológica (realizada pelo Dr. D. G. Reid), também não mostrou indícios de mais de uma espécie do gênero *Nodilittorina* nas amostras estudadas. A ausência de locos diagnósticos para algumas espécies próximas na família Littorinidae não é incomum (Ward e Warwick 1980; Mastro et al. 1982; Janson 1985a; Knight e Ward 1986; Knight et al 1987). Logo, o fato de não termos encontrado sinais de locos diagnósticos dentro e entre nossas amostras não significa necessariamente que não exista mais de uma espécie.

Foi encontrada deficiência de heterozigotos em parte dos locos estudados, mas não houve ausência de heterozigotos compostos pelos alelos mais comuns, cujas frequências foram verificadas caso a caso, principalmente no loco PGM-1 (tabela a.2). A ausência de associações de locos em desequilíbrio é um indício de que as populações estudadas são grandes. Este resultado também reforça a hipótese de que apenas uma espécie foi amostrada, pois espécies crípticas sem locos diagnósticos entre elas poderiam ser detectadas por esta análise (desequilíbrio ligação gerado por acasalamento preferencial intraespecífico).

A ocorrência de apenas *N. lineolata* do complexo *ziczac* na costa brasileira está de acordo com a hipótese de Bandel e Kadolsky (1982), mas algumas questões ainda precisam ser respondidas. Para alguns autores esta espécie teria distribuição restrita à costa do Brasil e do Uruguai (Bandel e Kadolsky 1982; Reid, comunicação pessoal), já outros pesquisadores afirmam que *N. lineolata* ocorre desde a costa da Flórida até a costa do Uruguai (Borkowski e Borkowski 1969; Bandel 1974; Janson 1985a). Para responder esta pergunta são necessários estudos para estabelecer a distribuição dessa espécie, se está ou não restrita à parte da costa da América do Sul. A real distribuição

de *Nodilittorina lineolata* e suas relações de parentesco com as outras espécies do complexo *ziczac* são questões em aberto.

CAPÍTULO 2

VARIABILIDADE E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DAS ESPÉCIES DO GÊNERO

LITTORARIA (MOLLUSCA: LITTORINIDAE) DA COSTA BRASILEIRA

INTRODUÇÃO

A família Littorinidae tem sido objeto de estudos genéticos e ecológicos devido à sua importância nas comunidades litorâneas, sua ampla distribuição e às diferenças bionômicas e ecológicas encontradas entre espécies próximas (Reid 1989; McQuaid 1996). Algumas destas características, tais como os diversos tipos de desenvolvimento larval e os diferentes padrões de distribuição das populações, tornam esta família especialmente favorável a estudos evolutivos.

O gênero *Littoraria* (Griffith e Pidgeon 1834) possui características exclusivas. Enquanto a maior parte das espécies da família têm distribuição restrita à zona entremarés dos costões rochosos (com exceção das espécies do gênero *Mainwaringia*), as espécies do gênero *Littoraria* geralmente ocupam regiões de mangue, áreas onde há água salobra e regiões do costão próximas a fontes de água doce (Reid 1986; observações pessoais). Além disso suas conchas são grandes em relação às espécies dos outros gêneros (a concha de um adulto de *L. zebra* pode chegar a medir 4 cm de comprimento), e algumas espécies apresentam rico polimorfismo em sua coloração. Este polimorfismo foi principalmente estudado para as espécies *Littoraria pallescens*, *L. filosa* e *L. intermedia*, sendo atribuído, principalmente, a pressões seletivas dependentes de frequência (Cook 1986; Reid 1987; Cook 1990; Cook 1992; Cook 1995).

O gênero é composto por 36 espécies cuja distribuição é restrita aos trópicos. Destas, apenas cinco estão presentes na costa das Américas (Reid 1999). Na costa brasileira podem ser encontradas as espécies *L. flava* (King e Broderip 1832), pertencente ao subgênero *Littoraria*, e *L. angulifera* (Lamarck 1822), do subgênero *Littorinopsis* Mörch. A primeira pode também ser encontrada no mar das Antilhas, já *L. angulifera* possui uma distribuição mais ampla, documentada nas regiões tropicais banhadas pelo Oceano Atlântico (Reid 1986). As duas espécies podem ser facilmente diferenciadas: a concha de *L. flava* tem um formato arredondado em relação a de *L. angulifera* e de coloração amarelada. *Littoraria angulifera* possui concha cônica e polimórfica quanto ao padrão de pigmentação, assim como outras espécies do subgênero *Littorinopsis* (*Littoraria pallescens*, *L. filosa* e *L. intermedia*).

Alguns trabalhos foram realizados com *L. angulifera* a fim de estabelecer seu padrão de zonação, a dinâmica de populações no ambiente natural, assim como suas características reprodutivas (Bandel 1974; Gallagher e Reid 1974; Gallagher e Reid 1979). Esta espécie pode ser encontrada nos arbustos do mangue (sempre acima da linha da maré) e em ambientes artificiais, como diques ou estacas de madeira (Gallagher e Reid 1974). Bandel (1974) observou que populações de *L. angulifera* não permanecem muito tempo em áreas onde ocorre fluxo constante de água doce (como um rio, por exemplo).

Como outras espécies do subgênero *Littorinopsis*, *L. angulifera* apresenta ovoviviparidade incompleta (Bandel 1974; Gallagher e Reid 1974; Reid 1986). Os ovos, depois de fecundados, permanecem em uma cavidade do manto da fêmea durante cerca de quatro dias, até o momento da eclosão, quando as larvas e alguns ovos

imaturos são liberados na água (Bandel 1974; Gallagher e Reid 1974). O tipo de desenvolvimento larval dessa espécie é planctotrófico e estima-se que sua duração seja de 8 a 10 semanas (Gallagher e Reid 1974; Reid 1986; Reid 1999).

O longo estágio larval e o polimorfismo para a cor de concha motivaram estudos genéticos e morfológicos nesta espécie. Gaines et al. (1974) e Janson (1985b), analisando populações de *L. angulifera* da costa da Flórida, encontraram resultados divergentes em alguns aspectos. Gaines et al. (1974), comparando ilhas compostas por mangue, não encontraram correlação entre a distância genética e a geográfica, mas observaram a existência de um gradiente latitudinal na frequência genotípica de um loco do sistema enzimático esterase. Janson (1985b), analisando populações continentais, obteve alta identidade genética (média $I=0,988$), e não observou nenhum gradiente para as populações estudadas. No entanto, observou que, apesar de não haver diferenciação genética interpopulacional, as populações são morfológicamente distintas quanto a alguns caracteres morfométricos e aos padrões de coloração da concha.

A outra espécie do gênero *Littoraria* presente no litoral brasileiro, *L. flava*, foi menos estudada e pouco se conhece sobre seus padrões de zonação e suas características reprodutivas. No entanto, sabe-se que se trata de uma espécie ovípara, com estágio larval planctotrófico (Gallagher e Reid 1974; Reid 1986; Reid 1999).

Não foi encontrada correlação, dentro deste gênero, entre a amplitude de dispersão e o tipo de desenvolvimento, ovíparo ou ovovivíparo (Reid 1986). Este resultado não é surpreendente já que ambos, nesse caso, envolvem longos períodos larvais. Algumas espécies, como *L. albicans*, são ovíparas e tem estágio larval planctotrófico, e, no entanto, têm distribuição restrita a uma determinada região da

Indonésia. *L. flava* e *L. angulifera* apresentam estágio larval planctotrófico, mas têm distribuições e modos de desenvolvimento distintos, possibilitando um estudo comparativo entre estas duas espécies.

Além disso, este grupo de espécies se mostra interessante para a análise do efeito da heterogeneidade ambiental sobre a variabilidade e o polimorfismo genéticos das populações. Espera-se que espécies que ocupam uma maior diversidade de ambientes, apresentem maior variabilidade (Powell 1971; Levinton 1973; Bryant 1976; Hedrick et al. 1976; Nevo 1978). No entanto, são poucas as evidências empíricas de que a variação ambiental é o principal fator que mantém a variabilidade em populações naturais (Hedrick et al. 1976; Ward 1990). Um exemplo disso é o estudo de Ayala et al. (1975): analisando populações de equinodermos que habitam o fundo do mar, os autores encontraram alta variabilidade e polimorfismo genético. O que poderia estar mantendo esta variabilidade, já que este ambiente é considerado estável? Foi apresentada a hipótese de que ambientes temporalmente estáveis poderiam ter um “acúmulo” de alelos diferentes devido à estrutura espacial dos recursos, os quais podem ser variados e estáveis.

Estudos de genética têm sido realizados usando invertebrados marinhos como modelo para estimar a ação do fluxo gênico na estruturação de suas populações, devido à baixa motilidade durante a fase adulta e ao longo estágio larval apresentado por algumas espécies (Ward e Warwick 1980; Janson 1987; Behrens Yamada 1989; Bunn e Hughes 1997; Todd et al. 1998; Bohonak 1999). Espera-se que populações de animais com estágio larval planctônico possuam maior variabilidade intrapopulacional em relação à interpopulacional, devido à ação homogeneizadora do fluxo gênico (Raff 1996). A família Littorinidae possui espécies próximas com diferentes capacidades de

dispersão, oferecendo a oportunidade de estudos dos fenômenos evolutivos sobre suas populações.

Neste trabalho, nosso objetivo foi caracterizar a variabilidade genética das duas espécies de *Littoraria* presentes na costa brasileira. A espécie *L. angulifera* ocupa ambientes descontínuos em relação à *L. flava* (que habita costões e mangues). Devido à distribuição dos mangues na costa brasileira, espera-se que as populações de *L. angulifera* apresentem maior estruturação apesar do estágio larval planctotrófico.

Juntamente com estas análises, verificou-se se as estimativas de variabilidade e polimorfismo apresentam padrões concordantes com a variedade de nichos ocupados pelas espécies. Também foi constatado se há relação entre o estágio larval planctotrófico e os tipo de desenvolvimento (ovíparo e ovovivíparo) com a estruturação genética das populações.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas

Littoraria flava foi amostrada em oito locais e *L. angulifera*, em nove (tabela e figura 2.1). As coletas foram realizadas ao longo de três anos, entre janeiro de 1997 e janeiro de 2000. Em S. José da Coroa Grande foram realizadas duas coletas para ambas as espécies. Os locais foram escolhidos pela facilidade de coleta e abundância de amostras, já que populações de *L. angulifera* com tamanho amostral significativo

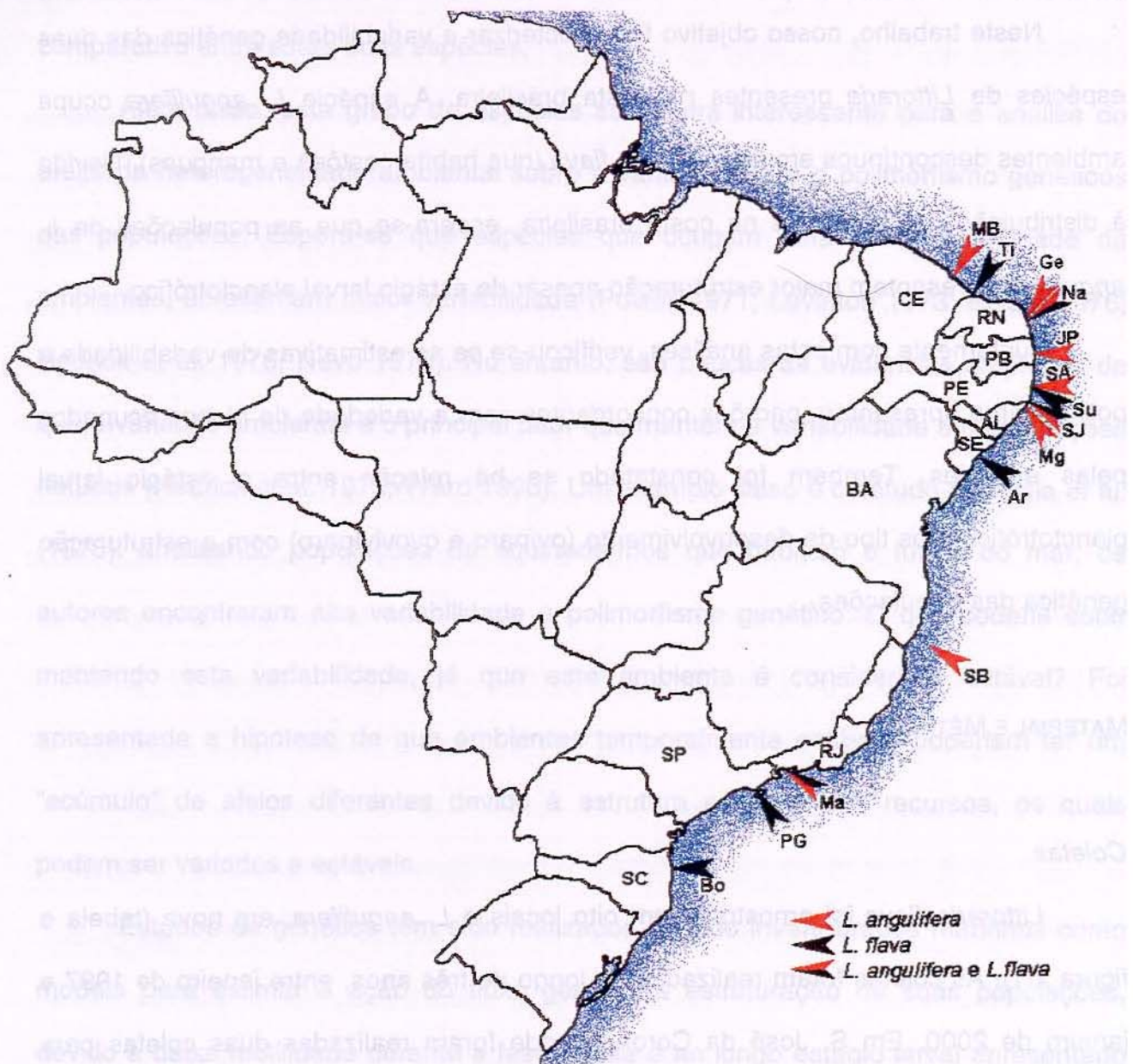


Figura 2.1. Locais amostrados de *Littoraria flava* e *L. angulifera*. As abreviaturas das amostras estão na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Locais de coleta de *Littoraria flava* e *L. angulifera*.

Espécie	Estado	N ²	Abrev. ¹	Localidade	Data de coleta	lat/long
<i>L. flava</i>	Ceará	34	(FITi)	Tibau	julho/ 1999	4 ^o 48's / 37 ^o 15'l
	Rio Grande do Norte	21	(FINa)	Natal	novembro/ 1999	5 ^o 48's / 35 ^o 10'l
	Pernambuco	40	(FISu)	Suape	outubro/1999	8 ^o 28's / 34 ^o 57'l
		17	(FISJ97)	S. José da Coroa Grande	janeiro/ 1997	8 ^o 54's / 35 ^o 8'l
		24	(FISJ00)		janeiro/ 2000	
	Sergipe	35	(FIAr)	Aracaju	julho/ 1997	10 ^o 55's / 37 ^o 2'l
	Rio de Janeiro	48	(FIMa)	Mangaratiba	setembro/1998	22 ^o 56's / 44 ^o 4'l
	S. Paulo	10	(FIPG)	Praia Grande (Ilha Bela)	junho/ 1998	23 ^o 52's / 45 ^o 25'l
Sta. Catarina	10	(FIBo)	Bombas	outubro/1998	27 ^o 8's / 48 ^o 29'l	
<i>L. angulifera</i>		17				
	Ceará		(AnMB)	Morro Branco	setembro/ 1997	4 ^o 9's / 38 ^o 7'l
	Rio Grande do Norte	24	(AnGe)	Genipabu	fevereiro/1998	5 ^o 41's / 35 ^o 12'l
		12	(AnNa)	Natal	novembro/ 1999	5 ^o 48's / 35 ^o 10'l
	Paraíba	33	(AnJP)	João Pessoa (mangue Jacaré)	agosto/ 1997	7 ^o 8's / 34 ^o 57'l
	Pernambuco	13	(AnSA)	Cabo de Sto. Agostinho	maio/ 1997	8 ^o 21's / 34 ^o 57'l
		20	(AnSJ97)	S. José da Coroa Grande	janeiro/ 1997	8 ^o 54's / 35 ^o 8'l
		25	(AnSJ00)		janeiro/ 2000	
	Alagoas	41	(AnMg)	Maragoji	novembro/1999	9 ^o 1's / 35 ^o 13'l
	Bahia	41	(AnSB)	Abrolhos (I. de Sta. Bárbara)	outubro/ 1998	18 ^o 21's / 38 ^o 36'l
Rio de Janeiro	45	(AnMa)	Mangaratiba	setembro/1998	22 ^o 56's / 44 ^o 4'l	

¹ Abreviatura das localidades. ² Tamanho amostral.

são encontradas principalmente em áreas de mangue relativamente conservadas. As únicas coletas dessa espécie realizadas em costão foram em Natal e na Ilha de Santa Bárbara, pertencente ao arquipélago de Abrolhos (Bahia). O costão onde foi coletada a amostra da Ilha de Santa Bárbara é voltado para o continente, em frente ao município de Caravelas (BA), onde há uma vasta região de mangue. Já os espécimes de *L. flava* foram coletados em costões, na zona de supralitoral, geralmente perto de água doce ou de água salobra.

Os indivíduos foram mantidos vivos até a chegada ao laboratório e depois congelados em nitrogênio líquido a fim de manter a atividade enzimática até o momento da eletroforese. Foram coletados de 10 a 50 indivíduos por amostra.

Algumas coletas tiveram o tamanho amostral pequeno devido ao difícil acesso a algumas áreas (por exemplo, regiões do interior do mangue onde foi observada uma maior densidade de *L. angulifera*) e devido à baixa abundância dos caramujos em vários locais.

Eletroforese

Foram analisados 239 indivíduos de *L. flava* e 271 de *L. angulifera*, totalizando 510 indivíduos. Os géis foram preparados no dia anterior ao da corrida e mantidos à temperatura ambiente, cobertos por filme de PVC. As dimensões do gel são: 19 cm de comprimento X 18 cm de largura X 1 cm de espessura.

O corpo foi retirado da concha e macerado inteiro em recipientes plásticos contendo tampão de extração (solução de Tris 0,1M, pH ajustado para 8,0 com solução 1N de ácido clorídrico) acrescido de β -mercaptoetanol 0,5% (modificado a partir de Ward e Warwick 1980). O extrato foi absorvido em retângulos de 3 x10 mm de papel Whatman nº 3, os quais foram aplicados nos géis em uma fenda aberta no sentido da largura, a 6 cm do cátodo. Entre cada amostra foi deixado um espaço de 3 mm, permitindo, com clareza, a obtenção de dados para 28 indivíduos a cada corrida. Outros detalhes do procedimento de eletroforese seguiram o descrito por Alfenas et al. (1998).

Três sistemas de tampões foram utilizados:

(I) Eletrodo: ácido bórico 0,3 M, hidróxido de sódio 60 mM, pH 8,0. Gel: tris 10 mM, pH 8,5 (Shaw e Prasad 1970, com modificações). Condição de corrida: 180 V/ 3h 30 min;

(II) Eletrodo: ácido cítrico 0,04 M e N (3 aminopropil) morfolina até alcançar pH 6,1. Gel: solução do eletrodo diluída 1:20 (Clayton e Tetriak 1972). Condição de corrida: 50 mA/ 6hs;

(III) Eletrodo: tris 0,25M e ácido cítrico 0,057M, pH8,0. Gel: solução do eletrodo diluída 1:25 (Ward e Warwick 1980). Condição de corrida: 50 mA/ 5hs.

Foram testados os seguintes sistemas enzimáticos: leucina aminopeptidase (LAP), L-leucil-L-glicilglicina peptidase (PLgg), L-leucil-alanina peptidase (Pla), pirofosfatase (PP), aspartato aminotransaminase (AAT), manose fosfato isomerase (MPI), desidrogenase do sorbitol (SDH), enzima málica (ME), fosfoglicose isomerase (PGI), fosfoglicomutase (PGM), desidrogenase do malato (MDH), desidrogenase do isocitrato (IDH), adenilato quinase (AK), desidrogenase do lactato (LDH), esterase (EST), desidrogenase do álcool (ADH), desidrogenase do octanol (ODH), hexoquinase (HK) e desidrogenase da glicose 6-fosfato (G6PDH). Os protocolos da revelação dos sistemas enzimáticos foram adaptados a partir de Shaw e Prasad (1970), Soltis e Soltis (1989) e Alfenas et al. (1991), com modificações (protocolos descritos no apêndice 1).

Análises

Para a análise dos resultados foram utilizadas estimativas de variabilidade genética, tais como: proporção de locos polimórficos (P , critério de 95%), o número médio de alelos por loco (A_p) e a diversidade gênica (H_e) e heterozigosidade média observada (H_o) por loco e por amostra. Estas análises foram realizadas com o auxílio do programa BIOSYS-1 (Swofford e Selander 1981).

Desvios das proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados por um teste baseado no método de Monte Carlo, adaptado por Guo e Thompson (1992) (com 10 séries de 1000 randomizações, totalizando 10000 randomizações) através do programa TFPGA (Miller 1997).

Foi também calculado o coeficiente F_{st} (Wright 1978) utilizando o parâmetro (θ) de Weir e Cockerham (1984) a fim de estimar como as amostras se encontram estruturadas geneticamente. Este parâmetro foi escolhido pois parece ser o mais adequado para as populações amostradas, que se encaixam dentro do modelo de "random populations" (Weir 1996). Foi determinado o intervalo de confiança de 95% para o valor do F_{st} total através de "bootstrapping" com 10000 randomizações utilizando o programa GDA (Lewis e Zaykin 1999).

Foram calculados, com as amostras de *Littoraria angulifera* tomadas duas a duas, os valores de estruturação genética (F_{st}) e distância geográfica. Estes dados foram comparados através do teste de Mantel, utilizando o programa TFPGA (Miller 1997), a fim de estimar se há relação entre estas duas medidas na espécie estudada. A distância geográfica entre as coletas S. José 97 e S. José 00 foi considerada 0, embora se saiba que as amostras não foram coletadas exatamente no mesmo local.

Em *L. angulifera* foi observado polimorfismo conspícuo na cor da concha em todas as amostras. Em cada amostra foram observados, pelo menos, dois morfos para cor de concha diferentes. No total, foram encontrados seis morfos bem definidos: marrom escuro, marrom listrado, marrom rajado, marrom listrado com ápice marrom escuro, branco e laranja. Os indivíduos foram agrupados de acordo com a cor da concha e analisados a fim de verificar se há alguma relação entre esta e a variabilidade genética ou estruturação.

Utilizando programa BIOSYS-1 (Swofford e Selander 1981), verificou-se se há um padrão na distribuição das frequências alélicas através das matrizes de distância e similaridade genética (Nei 1972). As espécies *Littoraria angulifera* e *L. flava* foram analisadas em conjunto e foi obtido um dendrograma calculado através de UPGMA (“unweighted pair-group method with arithmetic means”).

Foi realizada uma análise de desequilíbrio de ligação para as duas espécies de *Littoraria*. Para evitar perda de informação e possíveis artefatos, os alelos menos frequentes não foram agrupados. O programa GENEPOP (Raymond e Rousset 1995a; Raymond e Rousset 1995b) fornece um teste exato para o cálculo de desequilíbrio de ligação. Para testar a significância dos resultados foram criadas tabelas de contingência que correspondem às associações de locos em cada amostra. As tabelas são então analisadas empregando o método de cadeia de Markov, cujos parâmetros foram: 100 séries de 1000 iterações com 1000 passos de desmemorização. Para todos os testes foi feita a correção seqüencial de Bonferroni para múltiplos testes (Rice 1989). Esta correção consiste na divisão do nível de significância utilizado (ou seja, $\alpha=0,05$) pelo número de testes, aumentando o rigor do critério de significância.

Em algumas análises *L. flava* e *L. angulifera* foram analisadas em conjunto, por exemplo: nas tabelas de freqüências gênicas (tabelas a.3 e a.4), estão representados os mesmos alelos para duas espécies nos locos compartilhados.

RESULTADOS

Littoraria flava

Foi obtida resolução para 12 sistemas enzimáticos em *L. flava*, totalizando 19 locos (tabela 2.2). Estes sistemas estão listados e seus respectivos protocolos se encontram no apêndice 1. Não foi obtida resolução para seis sistemas testados: L-leucil-alanina peptidase (Pla), esterase (EST), desidrogenase do álcool (ADH), desidrogenase do octanol (ODH), hexoquinase (HK) e desidrogenase da glicose 6-fosfato (G6PDH). O sistema enzimático peptidase L-leucil-L-glicilglicina aparentemente possui três locos, no entanto foi obtida resolução para leitura em apenas um loco.

A média de variabilidade por locos foi alta (média $H=0,160$, ver tabela 2.2), sendo que os locos mais variáveis foram PGI, PGM-1 e 2 e IDH-1. A diversidade gênica das amostras também foi alta (média $H_e = 0,172$), se destacando a amostra coletada em Natal ($H_e = 0,235$).

O número de locos polimórficos foi alto (média de 48,9%), e a amostra de Natal foi a mais polimórfica (68,4%). Com a exceção dos locos MDH-1 e MDH-2, todos os restantes se mostraram polimórficos (critério de 95%). Os locos mais polimórficos foram a PGM-2 e a PGI, com respectivamente 13 e 12 alelos (freqüências gênicas apresentadas na tabela a. 3).

Tabela 2.2. Sistemas enzimáticos analisados para cada espécie e características.

Sistema enzimático	E.C.	Tampão	Loco	Heterozigosidade ¹	
				<i>L. flava</i>	<i>L. angulifera</i>
leucina amnopeptidase	3.4.11.1	(I)	<u>LAP</u> -1	0,026 (0,014)	-
			<u>LAP</u> -2	0,270 (0,109)	0,350 (0,081)
L-leucil-L-glicilglicina peptidase	3.4.11	(I)	<u>PLgg</u>	0,129 (0,042)	0,242 (0)
pirofosfatase	3.6.1.1	(II)	<u>PP</u>	0,039 (0,018)	0,082 (0,018)
Aspartato aminotransaminase	2.6.1.1	(II)	<u>AAT</u> -1	0,030 (0,020)	0,113 (0)
			<u>AAT</u> -2	0,037 (0,027)	0,053 (0,003)
manose fosfato isomerase	5.3.1.8	(II)	<u>MPI</u>	0,039 (0,029)	0,150 (0,087)
desidrogenase do sorbitol	1.1.1.14	(II)	<u>SDH</u> -1	0,095 (0,077)	0,049 (0,019)
			<u>SDH</u> -2	-	0,094 (0,023)
enzima málica (NADP)	1.1.1.40	(II)	<u>ME</u>	0,185 (0,154)	0,267 (0,072)
fosfoglicose isomerase	5.3.1.9	(III)	<u>PGI</u>	0,590 (0,470)	0,646 (0,210)
fosfoglicomutase	2.7.5.1	(III)	<u>PGM</u> -1	0,330 (0,100)	-
			<u>PGM</u> -2	0,258 (0,210)	0,726 (0,414)
			<u>PGM</u> -3	0,301 (0,238)	0,187 (0,120)
desidrogenase do malato (NAD)	1.1.1.37	(III)	<u>MDH</u> -1	0,003 (0,003)	0,008 (0,008)
			<u>MDH</u> -2	0,007 (0,007)	0,008 (0,008)
desidrogenase do isocitrato	1.1.1.42	(III)	<u>IDH</u> -1	0,338 (0,253)	0,011 (0)
			<u>IDH</u> -2	-	0,016 (0,002)
adenilato quinase	2.7.4.3	(III)	<u>AK</u> -1	0,224 (0,217)	0,333 (0,062)
			<u>AK</u> -2	0,021 (0,015)	0,008 (0,008)
			<u>AK</u> -3	0,125 (0,056)	0,078 (0,060)

¹. Valores obtidos pelo cálculo da média da heterozigosidade esperada do total de amostras por loco e por espécie (H). Entre parênteses estão as médias dos valores de heterozigosidade observados por loco. - loco não observado na espécie.

A heterozigosidade observada tem valor inferior à esperada (tabela 2.3) e, através do teste de Monte Carlo (Guo e Thompson 1992), verificou-se que todas as amostras apresentaram desvio das proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg para pelo menos um loco, sempre na direção de deficiência de heterozigoto. O loco PGM-1 apresentou deficiência em sete das nove amostras, e LAP-2, em seis amostras (tabela 2.4).

Tabela 2.3. Variabilidade genética de *L. flava* e *L. angulifera*. N = média da amostra por loco. Ap= média do número de alelos por loco. P= porcentagem de locos polimórficos. H_o = heterozigosidade média observada. H_e = diversidade gênica.

Espécie	Localidade	N	Ap	P	H_o	H_e
<i>L. flava</i>	Tibau	29,9	2,8	36,8	0,090	0,146
	Natal	20,1	3,2	68,4	0,147	0,235
	Suape	37,8	3,8	52,6	0,108	0,176
	S. José 1997	13,2	1,8	42,1	0,082	0,110
	S. José 2000	22,8	2,4	36,8	0,126	0,156
	Aracaju	26,6	2,2	36,8	0,078	0,104
	Mangaratiba	41,8	3,7	52,6	0,089	0,156
	Praia Grande	7,9	1,7	57,9	0,104	0,186
	Bombas	9,8	2,0	52,6	0,153	0,174
média		23,3	2,6	48,9	0,108	0,172
espécie		210,2	6,8	52,6	0,104	0,167
<i>L. angulifera</i>	Morro Branco	14,5	1,7	26,3	0,034	0,110
	Natal	11,2	2,7	68,4	0,122	0,274
	Genipabu	22,4	2,1	36,8	0,068	0,169
	João Pessoa	27,9	2,8	36,8	0,058	0,205
	Sto. Agostinho	10,7	1,8	42,1	0,044	0,191
	S. José 1997	14,9	1,5	26,3	0,017	0,103
	S. José 2000	22,8	2,2	42,1	0,073	0,174
	Maragoji	36,0	2,9	52,6	0,074	0,215
	I. Sta. Bárbara	35,9	3,1	47,4	0,067	0,197
	Mangaratiba	40,4	2,5	26,3	0,072	0,163
	média		23,7	2,4	41,5	0,063
espécie		236,8	5,9	47,4	0,067	0,226

Foi observada baixa a moderada diferenciação genética ($F_{st} = 0,054$, IC 95%= 0,025-0,084), ou seja, cerca de 95% da variação encontrada é atribuível à variabilidade intrapopulacional.

Apenas 2% dos testes de desequilíbrio de ligação foram significativos ao nível de 5% (15 em 653 testes). Quando aplicada a correção seqüencial de Bonferroni nenhum destes testes se mostrou significativo.

A média de distância genética (Nei 1972) entre as amostras foi de 0,022, variando entre 0,007 (entre Suape e Tibau) e 0,068 (Natal e Praia Grande, ver tabela 2.5).

A média de distância genética encontrada entre as espécies *Littoraria angulifera* e *L. flava* foi alta (média $D= 1,86$) (figura 2.2 e tabela 2.5).

Tabela 2.4. Amostras e locos que apresentaram desvio das proporções de Hardy-Weinberg (resultados obtidos através do teste de Monte Carlo (Guo e Thompson 1992)).

Espécie	Localidade	Loco
<i>L. flava</i>	Tibau	<u>PGM-1**</u> , <u>IDH-1**</u> , <u>MPI*</u> , <u>SDH-1*</u> , <u>LAP-2*</u>
	Natal	<u>PGM-1** e 3*</u> , <u>IDH-1*</u> , <u>ME*</u> , <u>SDH-1*</u> , <u>AK-2* e 3**</u> , <u>LAP-1* e 2**</u> , <u>PP**</u> , <u>AAT-2*</u>
	Suape	<u>PGM-1** e 2**</u> , <u>PGI**</u> , <u>IDH-1**</u> , <u>ME*</u> , <u>SDH-1**</u> , <u>AK-1*</u> , <u>LAP-2**</u> , <u>PP*</u>
	S. José 1997	<u>LAP-2**</u>
	S. José 2000	<u>PGM-1*</u> , <u>AK-3*</u> , <u>AAT-1*</u>
	Aracaju	<u>PGM-1* e 2*</u> , <u>PGI</u> , ** <u>AK-3**</u>
	Mangaratiba	<u>PGM-1** e 2**</u> , <u>PGI*</u> , <u>MPI*</u> , <u>ME*</u> , <u>AK-1* e 3*</u> , <u>PEP**</u> , <u>LAP-2**</u>
	Praia Grande	<u>PEP**</u> , <u>LAP-2**</u>
	Bombas	<u>PGM-1*</u>
<i>L. angulifera</i>	Morro Branco	<u>PGM-2**</u> , <u>PGI**</u> , <u>PEP*</u> , <u>AAT-1*</u>
	Natal	<u>PGM-2**</u> , <u>PGI*</u> , <u>ME**</u> , <u>SDH-1* e 2**</u> , <u>AK-1**</u> , <u>PP**</u> , <u>AAT-2*</u>
	Genipabu	<u>PGM-2**</u> , <u>PGI**</u> , <u>ME*</u> , <u>AK-1**</u> , <u>PEP**</u> , <u>LAP-2**</u>
	João Pessoa	<u>PGM-2** e 3**</u> , <u>PGI**</u> , <u>IDH-2*</u> , <u>AK-1**</u> , <u>PEP**</u> , <u>LAP-2**</u>
	Sto. Agostinho	<u>PGI**</u> , <u>ME**</u> , <u>AK-1**</u> , <u>LAP-2**</u> , <u>PP*</u> , <u>AAT-1**</u>
	S. José 1997	<u>PGI*</u> , <u>ME**</u> , <u>AK-1**</u> , <u>PEP**</u> , <u>AAT-1**</u>
	S. José 2000	<u>PGM-2** e 3*</u> , <u>PGI*</u> , <u>ME**</u> , <u>AK-1**</u>
	Maragoji	<u>PGM-2** e 3**</u> , <u>PGI**</u> , <u>IDH-1* e 2*</u> , <u>SDH-1* e 2**</u> , <u>PEP**</u> , <u>LAP-2**</u> , <u>AAT-1** e 2**</u>
	I. Sta. Bárbara	<u>PGM-2** e 3**</u> , <u>PGI**</u> , <u>MPI**</u> , <u>ME**</u> , <u>SDH-2**</u> , <u>PEP**</u> , <u>LAP-2**</u> , <u>PP**</u>
	Mangaratiba	<u>PGM-2**</u> , <u>PGI**</u> , <u>MPI**</u> , <u>SDH-2**</u> , <u>PEP*</u> , <u>LAP-2**</u> , <u>PP*</u>

* significativo para $p \leq 0,05$; ** significativo para $p \leq 0,01$.

Littoraria angulifera

Foi obtida definição para 19 locos nesta espécie. Os sistemas que não apresentaram definição em *L. angulifera* foram os mesmos de *L. flava*. O sistema peptidase L-leucil-L-glicilglicina aparentemente possui três locos também para esta espécie, apresentando resolução para leitura em apenas um loco (o mesmo de *L. flava*).

Em *L. angulifera* observou-se uma média de 41,5% de locos polimórficos (tabela 2.3), sendo que a amostra de Natal (como em *L. flava*) se mostrou a mais polimórfica (68,4% de locos polimórficos) e as amostras de Mangaratiba, Morro Branco e S. José 97, as menos polimórficas (26,3%). O loco PGM-2 foi o mais polimórfico, com 16 alelos (tabela a.4). Os locos MDH-1, MDH-2, IDH-2 e AK-2 não apresentaram polimorfismo (critério de 95%).

Foi observada alta variabilidade também para esta espécie, obtendo-se o mesmo valor da média de heterozigosidade para os locos e as amostras (H e $H_e = 0,180$). Como apresentado na tabela 2.2, PGM-2 e PGI apresentaram a maior variabilidade (respectivamente, $H=0,726$ e $0,646$).

A heterozigosidade observada das amostras apresentou valores relativamente inferiores ao que era esperado (tabela 2.3). As amostras de *L. angulifera* apresentaram desvio das proporções de Hardy-Weinberg (sempre tendendo para deficiência de heterozigotos) para pelo menos quatro locos. Os locos PGM-2 e PGI apresentaram desvio em oito das dez amostras analisadas (tabela 2.4).

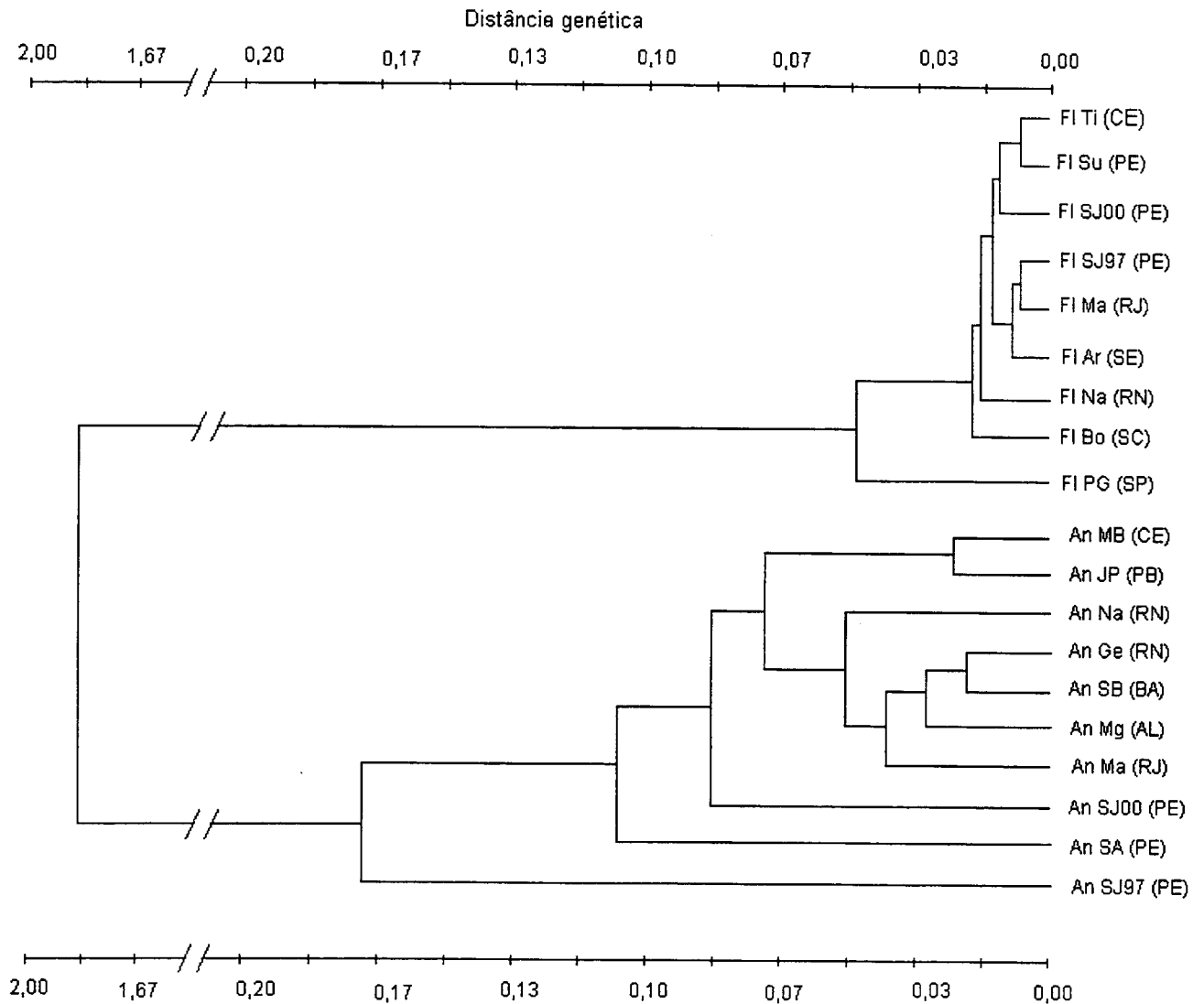


Figura 2.2. Dendrograma obtido através da análise de UPGMA utilizando o coeficiente de Nei (1972). As amostras de *L. flava* estão representadas pelas abreviaturas iniciadas por FI e as amostras de *L. angulifera* são representadas pelas abreviaturas iniciadas por An (correlação cofenética do dendrograma= 0,997).

O valor do coeficiente F_{st} encontrado foi alto ($F_{st} = 0,185$; IC 95% = 0,11-0,27). Foi feito o teste de Mantel para verificar se há alguma relação entre distância geográfica e estruturação das amostras. O valor do parâmetro F_{st} variou de 0,056 (entre Genipabu e Santa Bárbara) a 0,394 (entre Morro Branco e Mangaratiba). Já a distância geográfica entre as amostras variou de 12,8 Km entre S. José e Maragoji e, aproximadamente, 2.717 Km entre Morro Branco e Mangaratiba. As coletas entre S. José 97 e S. José 00 provavelmente ocorreram a poucos metros de distância e é interessante colocar que o valor do F_{st} encontrado entre S. José 97 e S. José 00 foi de 0,209. A correlação entre a distância geográfica e a estruturação genética, obtida pelo teste de Mantel, não foi significativa ($r=0,2324$ $p= 0,24$, figura 2.3).

A análise dos morfos, a princípio, não apresentou nenhum padrão; entre estes ocorreu alta similaridade e o valor do F_{st} foi de 0,026, bastante inferior ao obtido para amostras separadas por local de coleta. Também não foi observado nenhum padrão nas frequências gênicas, nos valores de variabilidade e de polimorfismo genético, como também nenhuma correlação entre variabilidade ou polimorfismo genético e a diversidade de morfos nas amostras.

A princípio, a análise de desequilíbrio mostrou que cerca de 8% dos testes (40 associações em 509) foram significativos. No entanto, quando aplicada a correção de Bonferroni, dos 40 testes, apenas sete permaneceram significativos. As associações de locos em desequilíbrio foram: PLgg e LAP-2 (em Genipabu), AK-1 e PLgg (João Pessoa), PGI e LAP-2 (João Pessoa e Maragoji), AK-1 e AAT-1 (S. José 97), ME e AK-1 (S. José 00), LAP-2 e AAT-2 (Maragoji).

A distância genética média encontrada entre as amostras estudadas foi de 0,103, variando de 0,024 (entre Genipabu e Sta. Bárbara) a 0,244, entre Mangaratiba e S. José 97 (tabela 2.5). No dendrograma apresentado na figura 2.2 observa-se que as amostras coletadas no estado de Pernambuco (principalmente a de S. José 97) estão um pouco separadas das demais.

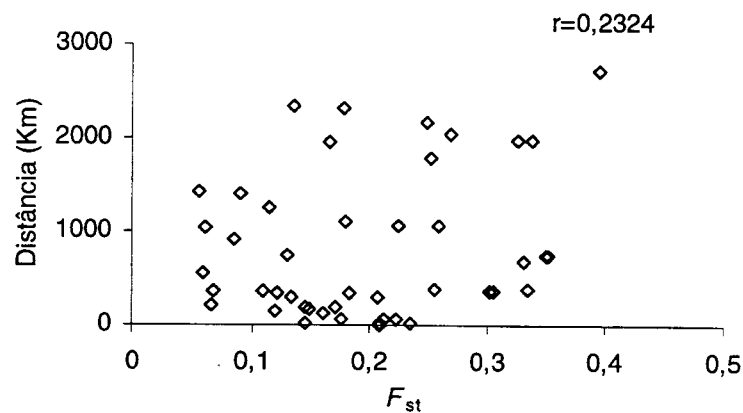


Figura 2.3. Gráfico da relação entre as estimativas de F_{st} encontradas e distância geográfica entre as amostras de *L. angulifera*.

DISCUSSÃO

Estruturação genética e distância interpopulacional

A estruturação genética obtida para as amostras de *Littoraria flava* ($F_{st} = 0,054$) está entre o que seria considerado estruturação baixa ($F_{st} < 0,05$) e moderada ($0,05 < F_{st} < 0,15$) de acordo com Wright (1978). Esta espécie é ovípara, com desenvolvimento planctotrófico, mas pouco se sabe quanto ao tempo em que as larvas permanecem no mar até o recrutamento (Reid 1986). Provavelmente é o suficiente para que ocorra fluxo gênico entre locais relativamente distantes, já que o valor de distância genética (Nei 1972) entre as amostras foi baixo (variou de 0,005, entre FI Ma e FI SJ97, a 0,068, entre FI PG e FI Na). Além da grande similaridade, encontra-se ausência de padrão geográfico na distribuição das amostras, como pode ser observado na figura 2.2. Um indício de que o fluxo gênico pode ser responsável pela homogeneização genética das amostras é a presença dos mesmos alelos raros em amostras geograficamente distantes (tabela a.3)

A distância genética encontrada entre as amostras de *L. angulifera* (média $D=0,103$) foi maior em relação ao observado em *L. flava*, *Nodilittorina lineolata* e aos resultados obtidos por Janson (1985b), que encontrou baixa diferenciação genética entre quatro amostras de *L. angulifera* coletadas na costa da Flórida (média $D= 0,014$).

Esta espécie também apresentou alta estruturação genética ($F_{st}=0,185$), cerca de 19% da variabilidade encontrada está entre as amostras analisadas.

Nestas amostras, o valor da correlação entre distância geográfica e diferenciação genética (F_{st}) obtida pelo teste de Mantel não foi significativo ($r=0,2324$,

$p=0,24$). Hutchinson e Templeton (1999) apresentam, na forma de representações gráficas, quatro possíveis resultados da correlação entre estruturação genética e distância geográfica e suas prováveis interpretações. O gráfico de correlação obtido para *L. angulifera* (figura 2.3), caracterizado por pontos amostrados dispersos de forma aleatória ao longo dos eixos, se encaixa no padrão do caso III apresentado por Hutchinson e Templeton (1999). Neste caso, a estruturação genética parece independente da distância geográfica. Segundo os autores, este padrão é resultante da forte ação de deriva genética, a qual estaria se sobrepondo ao efeito do fluxo gênico.

L. angulifera é ovovivípara e estima-se que as larvas permaneçam no mar de 8 a 10 semanas antes do recrutamento (Gallagher e Reid 1974). Isto seria o suficiente para que ocorresse fluxo gênico entre populações geograficamente distantes. De acordo com estimativas de Scheltema (1971), o máximo de tempo necessário para que larvas atravessem o oceano Atlântico no sentido leste - oeste é 60 dias e, na direção contrária, 96 dias. *Littoraria angulifera* pode ser encontrada nos dois lados do Atlântico e, morfologicamente, as amostras estudadas são similares, um indício de migrações entre os continentes (Reid 1986).

Em nosso estudo, tanto o mecanismo de deriva genética como o de seleção podem estar atuando sobre as populações amostradas, fazendo com que as frequências gênicas mudem em poucos quilômetros de distância ou em meses (no caso de São José da Coroa Grande) e atenuando a ação do fluxo gênico. A diferenciação entre as amostras poderia ser causada por mudanças ambientais devido a fatores abióticos, como por exemplo, diferentes concentrações de salinidade. Neste caso, as larvas que foram geradas em um ambiente, quando se estabelecem em um habitat com salinidade diferente, podem ter baixa sobrevivência e ausência ou baixa

taxa de reprodução. Como os mangues são ambientes descontínuos, as larvas liberadas também podem estar sendo retidas localmente devido à ação de correntes marinhas.

Comparado ao observado para *Nodilittorina lineolata* (capítulo 1, nessa dissertação), *L. flava* e *L. angulifera* apresentam maior estruturação genética. *Littoraria flava* possui as mesmas características de desenvolvimento de *N. lineolata*, mas apresenta uma distribuição menos contínua no costão. Isso ocorre talvez porque *L. flava* está freqüentemente associada à presença de água doce ou salobra. Já *L. angulifera* apresenta ovoviviparidade incompleta e ocupa ambientes mais descontínuos. Além disso, as populações naturais de *L. flava* e *L. angulifera* são nitidamente menores que as populações encontradas de *Nodilittorina*. O tamanho populacional, o tipo de ambiente ocupado e sua distribuição podem ser a explicação para as diferenças de estruturação encontrada para as três espécies.

Distância genética interespecífica

O loco MDH-1 foi diagnóstico entre as duas espécies. Os locos PGM-1 e LAP-1 só foram observados em *L. flava* e os locos IDH-2 e SDH-2 foram encontrados apenas em *L. angulifera*. Nos locos restantes as espécies compartilham alelos.

A distância genética entre *Littoraria angulifera* e *L. flava* foi alta (média $D=1,86$). *Littoraria angulifera* e *L. flava* pertencem aos subgêneros *Littorinopsis* e *Littoraria*, respectivamente, os quais são relativamente distantes dentro do gênero *Littoraria* (Reid 1986). Zaslavskaya (1995) encontrou, entre *Littorina kasatka* e *L. subrotundata*, *L. sp.* e *L. sitkana*, resultados semelhantes ao observado neste trabalho (os valores de

distância genética variaram de 1,123 a 2,087 entre *L. kasatka* e as outras espécies). Também, neste caso, a primeira espécie pertence a um subgênero diferente das outras espécies.

Thorpe (1982), ao fazer uma revisão das análises de sistemática de vertebrados (com exceção de aves) e invertebrados, encontrou padrões consistentes nas estimativas de distância e identidade genética de populações coespecíficas, de espécies pertencentes ao mesmo gênero e entre gêneros dentro dos diferentes grupos estudados. Em nosso trabalho foi obtida a média de 0,22 de identidade genética entre *L. flava* e *L. angulifera*. Johnson e Black (1998) encontraram, para as espécies *Littoraria sulculosa* e *L. cingulata* (que também pertencem a diferentes subgêneros), uma média identidade genética de 0,028. Estes valores são inferiores à média do critério de identidade genética entre espécies cogenéricas proposto por Thorpe (1982), de 0,54.

Quando comparado nosso resultado com a identidade genética obtida entre *L. angulifera* e *Nodilittorina angustior* ($I=0,178$), calculada por Janson (1985b), foi encontrado um valor bem próximo ao observado para as duas espécies do gênero *Littoraria*. As espécies estudadas no presente trabalho pertencem a diferentes subgêneros com características bem distintas, tais como os caracteres reprodutivos, por exemplo. Os dados da análise genética parecem evidenciar que estas espécies são muito divergentes, talvez mais divergentes do que o esperado para espécies cogenéricas. Todavia, este tipo de resultado pode ser comum na família Littorinidae para espécies de diferentes subgêneros, uma vez que Zaslavskaya (1995) e Johnson e Black (1998) encontraram padrão semelhante.

Polimorfismo e variabilidade genética

L. flava e *L. angulifera* apresentaram alta porcentagem de locos polimórficos (48,9% e 41,5%, respectivamente). Da mesma forma que *N. lineolata*, estas espécies apresentam mais polimorfismo que outras espécies pertencentes à família Littorinidae (média $P=35\%$, Ward 1990).

Verificou-se que as duas espécies estudadas também apresentaram maior variabilidade genética (média $H_e= 0,172$ para *L. flava* e média $H_e= 0,18$ para *L. angulifera*) em relação às outras espécies da família (média $H_e = 0,15$, Ward 1990). A variabilidade observada nos locos PGI para ambas e PGM-2 para *L. angulifera* foi muito alta (tabela 2.2). Quando as medianas da heterozigosidade foram calculadas para cada espécie, os resultados foram 0,125 (*L. flava*) e 0,094 (*L. angulifera*). A diferença encontrada entre médias e medianas na estimativa de variabilidade deve-se principalmente ao efeito dos locos citados sobre as médias.

Nossos resultados foram semelhantes aos obtidos por Janson (1985b). As amostras analisadas de *Littoraria angulifera* da Flórida possuem 41,7% de locos polimórficos e alta variabilidade ($H_e = 0,23$). Não observamos nenhum tipo de gradiente como o encontrado por Gaines et al. (1974), logo a variação das freqüências genótípicas ao longo da latitude pode ser característica do loco estudado ou de algum outro loco ligado àquele fisicamente. Quando Janson (1985b) analisou populações também coletadas na costa da Flórida, não encontrou nada parecido para o loco da esterase. Para análises futuras dessa espécie pode ser interessante estudar minuciosamente este sistema enzimático.

As amostras coletadas em Natal ("FI Na" e "An Na") foram as mais polimórficas e as que apresentaram maior diversidade gênica para ambas espécies, apesar do número relativamente baixo de indivíduos analisados por locos (tabela 2.3). Nessa coleta, *L. angulifera* e *L. flava* foram encontradas ocupando o mesmo ambiente (o costão), lado a lado.

A ação do ambiente sobre a variabilidade e polimorfismo genético é bastante questionada (Powell 1971; Levinton 1973; Levinton e Suchanek 1978; Ward e Warwick 1980; Janson 1985a; Noy et al. 1987; Ward 1990; Solé-Cava e Thorpe 1991; Mitchell-Olds 1992; McQuaid 1996). Em populações naturais, é difícil isolar o efeito da heterogeneidade ambiental do efeito do tamanho efetivo e da ação do fluxo gênico. Além disso, a variação temporal pode estar acentuando a variação espacial observada (Bryant 1976). Dentro da família Littorinidae alguns trabalhos sugerem que as espécies que ocupam mais de um nicho ou têm nicho amplo têm maior variabilidade e apresentam mais locos polimórficos (Ward e Warwick 1980; Janson 1985a; Noy et al. 1987). No entanto, estes trabalhos apresentam poucas evidências empíricas e os padrões de variabilidade encontrados para essas espécies podem ser explicados pela variação espacial ou pelo alto tamanho efetivo das populações (Ward 1990; McQuaid 1996).

Segundo Reid (1986), *Littoraria flava* pode ser encontrada nos ambientes de costão e de mangue. No entanto, em nossas coletas, só encontramos esta espécie em costão; nenhum espécime de *L. flava* foi observado nos mangues onde as coletas de *L. angulifera* foram feitas. Assim, pode-se pressupor que entre elas, *L. angulifera* aparentemente ocupa um nicho mais amplo na costa brasileira. Além do mais, a distribuição desta espécie em nível macrogeográfico é maior, sendo encontrada

também no continente africano (Reid 1986). As duas espécies, no entanto, não apresentam diferenças significativas quanto a variabilidade genética.

Deficiência de heterozigotos e desequilíbrio de ligação

Apesar dos grandes tamanhos populacionais e do estágio larval planctônico, nem sempre as frequências genóticas de invertebrados marinhos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, geralmente tendendo para o excesso de homozigotos (Mitton e Koehn 1973; Nevo et al. 1981; Berger 1983; Singh e Green 1984; Zouros e Foltz 1984; Nevo et al. 1984; Janson 1985a; Lavie e Nevo 1987; Noy et al. 1987; Ward 1990; McQuaid 1996; capítulo 1 desta dissertação).

O desvio das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg em populações naturais foi encontrado em ambientes poluídos e atribuído ao efeito da seleção natural. A frequência de determinados alelos de locos dos sistemas PGM e PGI em moluscos (inclusive em espécies do gênero *Littorina*) parecem estar relacionados com a resistência a metais pesados, como mercúrio e cádmio (Nevo et al. 1981; Nevo et al. 1984; Lavie e Nevo 1987). Além disso, poluentes causam “stress” ambiental e podem levar a aneuploidia em bivalves (Dixon 1982 *apud* Gaffney 1990). A perda de um cromossomo ou de parte dele pode ser a causadora da deficiência de heterozigotos observada em amostras da espécie *Mytilus edulis*.

Outros fatores foram apontados como responsáveis pelo desvio das proporções esperadas por Hardy-Weinberg: seleção natural não relacionada a poluentes (Zouros e Foltz 1984; Janson 1985a; Gaffney et al. 1990, entre outros); efeito Wahlund (Berger 1983; Johnson e Black 1984; Janson 1985a; Noy et al. 1987; Gaffney et al. 1990, entre outros); alelos nulos (Janson 1985a; Gaffney et al. 1990), entre outros.

Todas as amostras estudadas de *L. flava* e *L. angulifera* apresentaram desvios das proporções de Hardy-Weinberg sempre no sentido de deficiência de heterozigotos. Pelo menos um loco em cada amostra de *L. flava* e quatro locos em cada amostra de *L. angulifera* apresentaram desvio (tabela 2.4).

Os locos do sistema enzimático PGM foram os que apresentaram a maior frequência de deficiência de heterozigotos, tanto nas espécies do gênero *Littoraria* quando em *Nodilittorina lineolata* (capítulo 1). Apesar da coincidência, a hipótese de seleção devida à ação de metais pesados é pouco provável, já que a deficiência foi observada em todas as amostras. Não se pode excluir, no entanto, que outros fatores seletivos possam estar atuando nestas isozimas.

Alelos nulos provavelmente não são os responsáveis pelo resultados observados, já que a maior parte dos locos precisaria apresentá-los e seria necessária uma forte seleção favorecendo os heterozigotos nulos a fim de manter a alta frequência desses alelos (Gaffney et al. 1990). Como há muitos locos com deficiência de heterozigotos, hipóteses como a aneuploidia também podem ser descartadas, pelo menos como a única causa dos desvios observados, pois os indivíduos teriam baixo valor adaptativo.

O efeito Wahlund é usado como explicação para a deficiência de heterozigotos quando as frequências gênicas diferem entre populações (Zouros e Foltz 1984; Gaffney et al. 1990), o que não ocorre para *L. flava*. *L. angulifera* apresenta estruturação genética; neste caso poderia haver uma contribuição do efeito Wahlund, causado pela mistura de larvas provenientes de lugares diferentes.

Tracey et al. (1975), em um estudo com bivalves, apresentaram a hipótese de que a deficiência de heterozigotos em invertebrados marinhos pode ser causada pela

formação de grupos de indivíduos com diferentes composições genotípicas (denominados “grupos de acasalamento”) ao longo do substrato, às vezes, a poucos metros de distância. Estas diferenças nas freqüências alélicas podem ser causadas por uma variação temporal na composição e distribuição dos recrutas, por exemplo. A formação destes grupos pode ser explicada de dois modos: por seleção natural ou simplesmente pela ação da deriva genética sobre a composição genética das larvas durante o recrutamento.

Outros trabalhos com moluscos (Levinton e Suchanek 1978; Johnson e Black 1982; Johnson e Black 1984; Gaffney et al. 1990), encontraram resultados semelhantes e apresentam esta hipótese para explicar a deficiência de heterozigotos encontrada. No entanto, Gaffney et al. (1990) acreditam que somente a deriva genética não seria suficiente para gerar os “grupos de acasalamento”. Os autores crêem que a deficiência de heterozigotos encontrada nas espécies de invertebrados com estágio larval planctônico deve ser conseqüência de vários fatores atuando em conjunto (os citados acima, seleção, alelos nulos, entre outros), e não de apenas um destes fatores.

A hipótese dos “grupos de acasalamento” poderia explicar os padrões encontrados em *L. flava* e *L. angulifera*: uma forte evidência é o número de locos que apresentaram deficiência, não se restringindo aos mesmos nas diferentes amostras, com algumas exceções. Todavia, os fatores responsáveis pela formação destes grupos nestas espécies ainda são desconhecidos.

L. angulifera, em relação à *L. flava* e *N. lineolata*, apresentou, proporcionalmente, um maior número de locos com desvios e desequilíbrio de ligação. Apesar das poucas associações em desequilíbrio encontradas, provavelmente é um indício de que algum fenômeno biológico está atuando para mantê-las. A repetição de

uma das associações entre os locos (PGI e LAP-2, nas amostras de João Pessoa e Maragoji) reforça o significado biológico destes resultados. O desequilíbrio de ligação encontrado deve ser melhor estudado, mas pode estar sendo causado pelo mesmo fenômeno responsável pela deficiência de heterozigotos (a formação de conjuntos de indivíduos com diferentes freqüências genotípicas).

Este trabalho, desde o início, teve um caráter exploratório, cujo objetivo foi descrever os padrões de variabilidade genética destes litorinídeos ao longo da costa brasileira. Dos resultados encontrados, percebe-se que há necessidade de mais experimentos para que se possa compreender os padrões observados. Como *Nodilittorina lineolata*, as espécies *Littoraria flava* e *L. angulifera*, se mostraram modelos instigantes no estudo dos fatores que determinam a distribuição da variabilidade genética nas populações naturais.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

- Em média, as amostras das três espécies de litorínídeos estudadas possuem alta variabilidade genética e mais de 40% de locos polimórficos. Estes resultados podem ser conseqüência do grande tamanho efetivo de suas populações, de sua ampla distribuição e, ainda, da heterogeneidade do ambiente ocupado por elas.

- Foi observada variação nas freqüências gênicas entre amostras coletadas em um mesmo local, em épocas diferentes, nas três espécies: em *N. lineolata*, nas amostras de Tibau, Praia Preta, Barequeçaba e Guaecá; e em *Littoraria flava* e *L. angulifera*, nas duas coletas realizadas em S. José da Coroa Grande. Isto pode ser resultado da variação temporal, mas também pode refletir variações espaciais, uma vez que as coletas não foram feitas no mesmo ponto, ou ainda ser conseqüência da ação conjunta destes efeitos. Uma possível explicação para a variação encontrada é o recrutamento de juvenis com diferentes genótipos ao longo do ano.

- As espécies apresentaram diferentes graus de estruturação genética, sendo que o menor foi observado em *N. lineolata* e, o maior, em *L. angulifera*. As estruturas populacionais destas espécies podem estar relacionadas com a continuidade dos ambientes ocupados. Além disso, existe o tamanho efetivo das populações estudadas, que pode variar de espécie para espécie. *Littoraria flava* e *N. lineolata* são ovíparas e *L. angulifera* tem ovoviviparidade incompleta, o que também pode explicar a maior estruturação genética encontrada nesta última espécie.

- Apesar da grande extensão geográfica amostrada, não foi observado qualquer padrão na distribuição dos genótipos das espécies estudadas ao longo da costa brasileira.

- Em uma revisão sobre dispersão e especiação em animais marinhos, Palumbi (1994) coloca a migração entre populações vizinhas como responsável pela homogeneização genética em populações costeiras. No entanto, em *L. angulifera*, não foi verificada correlação entre distância geográfica e divergência genética, o que sugere que algum fenômeno (deriva genética ou seleção natural) deve estar se contrapondo à ação do fluxo gênico entre as populações amostradas.

- Foi encontrado desvio das proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas amostras nas três espécies de litorinídeos. Deficiência de heterozigotos em populações naturais de moluscos é bastante comum, principalmente em bivalves. No entanto, as hipóteses mais comumente empregadas na explicação deste fenômeno em estudos com invertebrados marinhos não parecem adequadas para explicar a alta frequência de deficiência de heterozigotos observada no presente trabalho. Portanto, é possível que estes desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg se devam a um mesmo fator (ou fatores) que está atuando sobre as populações da costa brasileira. São necessários estudos e experimentos mais detalhados a fim de verificar o que poderia estar determinando esta situação. Estes experimentos seriam compostos por desenhos amostrais direcionados ao estudo da distribuição dos genótipos em diferentes ambientes do costão e a comparação das frequências gênicas dos recrutas

com os adultos. Também é interessante averiguar se outras espécies de gastrópodes marinhos, que ocupam os mesmos ambientes e têm o mesmo tipo de desenvolvimento, apresentam este padrão.

- Durante a análise de desequilíbrio de ligação em *Nodilittorina lineolata* não foram encontradas associações de locos em desequilíbrio. A análise genética está de acordo com a hipótese de Bandel e Kadolsky (1982) e com a identificação do Dr. D. G. Reid, pois não foram observados indícios da presença de mais de uma espécie do complexo *ziczac*, além de *N. lineolata*, nos pontos amostrados.

- De maneira geral, os parâmetros de variabilidade encontrados para as três espécies foram semelhantes. Estes dados indicam que, apesar das diferenças ecológicas reconhecidas entre estas espécies, as forças evolutivas estariam atuando de forma semelhante na manutenção e organização da distribuição da diversidade genética das mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Absalão, R.S.. 1988. Associação de moluscos de um costão rochoso intertidal em Ponta de Itaipu, Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Biologia, **48**: 51-58.
- Alfnas, A.C.. Eletroforese de Isozimas e Proteínas Afins. Editora Universidade Federal de Viçosa, 574pp.
- Ayala, F.J.; Valentine, J.W.; Hedgecock, D. e Barr, L.G.. 1975. Deep-sea asteroids: high genetic variability in a stable environment. Evolution, **29**: 203-212.
- Bandel, K..1974. Studies on Littorinidae from the Atlantic. The Veliger, **17**(2): 92-114.
- Bandel, K. e Kadolsky, D.. 1982. Western Atlantic species of *Nodilittorina* (Gastropoda: Prosobranchia): comparative morphology and its functional, ecological, phylogenetic and taxonomic implications. The Veliger, **25**: 1-42.
- Behrens Yamada, S.. 1989. Are direct developers more locally adapted than planktonic developers? Marine Biology, **103**: 403-411.
- Berger, E.M.. 1973. Gene-enzyme variation in three sympatric species of *Littorina*. Biological Bulletin, **145**: 83-90.
- Berger, E.M.. 1983. The Mollusca, Vol. 6 Ecology. Chap. 13 Population genetics of marine gastropods and bivalves. págs. 563-596. Academic Press.
- Bohonak, A.J.. 1999. Dispersal, gene flow, and population structure. The Quarterly Review of Biology, **74**: 21-45.
- Borkowski, T.V.. 1971. Reproduction and reproductive periodicities of South Floridian Littorinidae. Bulletin of Marine Science, **21**: 826-840.
- Borkowski, T.V..1975. Variability among Caribbean Littorinidae. The Veliger, **17**: 369-377.
- Borkowski, T.V. e Borkowski, M.R.. 1969. The *Littorina ziczac* species complex. The Veliger, **11**: 408-415.
- Boulding, E.G.; Buckland-Nicks, J. e Van Alstyne, K.L.. 1993. Morphological and allozyme variation in *Littorina sitkana* and related *Littorina* species from the Northeastern Pacific. The Veliger, **36**:43-68.
- Bryant, E.H.. 1976. A comment on the role of environmental variation in maintaining polymorphisms in natural populations. Evolution, **30**: 188-190
- Bunn, S.E. e Hughes, J.M.. 1997. Dispersal and recruitment in streams: evidence from genetic studies. Journal North American of the Benthological Society, **16**: 338-346.
- Burton R.S.. 1983. Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. Marine Biology Letters, **4**: 193-206.

- Clayton, J. e Tetriak, D.. 1972. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. Journal of Fisheries Research Board of Canada, 29: 1169-1172.
- Cook, L.M.. 1986. Site selection in a polymorphic mangrove snail. Biological Journal of the Linnean Society, 29: 101-103.
- Cook, L.M.. 1990. Systematic effects on morph frequency in the polymorphic mangrove snail *Littoraria pallescens*. Heredity, 65: 423-427.
- Cook, L.M.. 1992. The neutral assumption and maintenance of colour morph frequency in mangrove snails. Heredity, 69: 184-189.
- Cook, L.M. e Bridle, J.. 1995. Colour polymorphism in the mangrove snail *Littoraria intermedia* in Sinai. Malacologia, 36: 91-95.
- Dixon, D.R.. 1982. Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis*) originating from a polluted dock . Marine Biology Letters, 3: 155-161.
- Foltz, D.W.; Shumway, S.E. e Crisp, D.. 1990. Genetic structure and heterozygosity-related fitness effects in the marine snail *Littorina littorea*. American Malacological Bulletin, 10: 55-60.
- Gaffney, P.M.; Scott, T.M.; Koehn, R.K. e Diehl, W.J.. 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiency in the coot clam, *Mulinia lateralis*. Genetics, 124: 687-699.
- Gaines, M.S.; Caldwell, J. e Vivas, A.M.. 1974. Genetic variation in the mangrove periwinkle *Littorina angulifera*. Marine Biology, 27: 327-332.
- Gallagher, S.B. e Reid, G.K.. 1974. Reproductive behavior and early development in *Littorina scabra angulifera* and *Littorina irrorata* (Gastropoda: Prosobranchia) in the Tampa Bay region of Florida. Malacological Review, 7: 105-125.
- Gallagher, S.B. e Reid, G.K.. 1979. Population dynamics and zonation in the periwinkle snail, *Littorina angulifera*, of the Tampa Bay, Florida, region. The Nautilus, 94: 162-178.
- Gooch, J.L. e Schopf, T.J.M.. 1972. Genetic variability in the deep sea: relation to environmental variability. Evolution, 26: 545-552.
- Grant, W.S. e Lang, M.. 1991. Mode of larval development and genetic population structure in *Nodilittorina africana knysnaensis* (Prosobranchia: Littorinidae). Marine Biology, 109: 479-483.
- Guo, S.W. e Thompson, E.A.. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics, 48: 361-372.
- Hartl, D.L. e Clark, A.G.. 1997. Principles of Population Genetics. 3rd ed.. Sinauer Associates. 542pp.

- Hedgecock, D. 1986. Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? Bulletin of Marine Science, 39: 550-564.
- Hedrick, P. H.; Ginevan, M.E. e Ewing, E.P.. 1976. Genetic polymorphism in heterogeneous environments. Annual Review of Ecology and Systematics, 7: 1-32.
- Hutchinson, D.W. e Templeton, A.R.. 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.
- Jablonski, D.. 1986. Larval ecology and macroevolution in marine invertebrates. Bulletin of Marine Science, 39: 565-587.
- Janson, K.. 1985a. Genetic variation in three species of caribbean periwinkles, *Littorina angustior*, *L. lineolata* and *L. ziczac* (Gastropoda: Prosobranchia). Bulletin of Marine Science, 37: 871-879.
- Janson, K.. 1985b. Genetic and morphologic variation within and between populations of *Littorina angulifera* from Florida. Ophelia, 24: 125-134.
- Janson, K.. 1987. Allozyme and shell variation in two marine snails (*Littorina*, Prosobranchia) with different dispersal abilities. Biological Journal of Linnean Society, 30: 245-256.
- Johannesson, K. e Johannesson, B.. 1989. Differences in allele frequencies of AAT between high- and mid-rocky shore populations of *Littorina saxatilis* (Olivi) suggest selection in this enzyme locus. Genetical Research, 54:7-11.
- Johannesson, K.; Johannesson, B. e Rolán-Alvarez, E.. 1993. Morphological differentiation and genetic cohesiveness over a micro-environmental gradient in the marine snail *Littorina saxatilis*. Evolution, 47: 1770-1787.
- Johannesson, K.; Johannesson, B. e Lundgren, U.. 1995. Strong natural selection causes micro-scale allozyme variation in a marine snail. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 92: 2602-2606.
- Johannesson, K. e Tatarenkov, A.. 1997. Allozyme variation in a snail (*Littorina saxatilis*)-deconfounding the effects of microhabitat and gene flow. Evolution, 51: 402-409.
- Johnson, M.S. e Black, R.. 1982. Chaotic genetic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria* sp.. Marine Biology, 70: 157-164.
- Johnson, M.S. e Black, R.. 1984. The Wahlund effect and the geographical scale of variation in the intertidal limpet *Siphonaria* sp.. Marine Biology, 79: 295-302.
- Johnson, M.S. e Black, R.. 1998. Effects of isolation by distance and geographical discontinuity on genetic subdivision of *Littoraria cingulata*. Marine Biology, 132: 295-303.

- Knight, A.J. e Ward, R.D.. 1986. Purine nucleoside phosphorylase polymorphism in the genus *Littorina* (Prosobranchia: Mollusca). Biochemical Genetics, 24: 405-413.
- Knight, A.J.; Hughes, R.N. e Ward, R.D.. 1987. A striking example of the founder effect in the mollusc *Littorina saxatilis*. Biological Journal of the Linnean Society, 32: 417-426.
- Lavie, B. e Nevo, E.. 1987. Differential fitness of allelic isozymes in the marine gastropods *Littorina punctata* and *L. neritoides*, exposed to the environmental stress of the combined effects of cadmium and mercury pollution. Environmental Management, 11: 345-349.
- Leal, J.H.. 1991. Marine prosobranchs gastropods from oceanic islands off Brazil. Species Composition and biogeography. Universal Books Service/ Dr. W. Backhuys. 418 pp.
- Lehmann, T.; Hawley, W.A.; Grebert, H. e Collins, F.H.. 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. The American Naturalist, 87: 331-333
- Levinton, J.. 1973. Genetic variation in a gradient of environmental variability: marine bivalvia (Mollusca) Science, 180: 75-76.
- Levinton, J.S. e Suchanek, T.H.. 1978. Geographic variation, niche breadth and genetic differentiation at different geographic scales in the mussels *Mytilus californianus* and *M. edulis*. Marine Biology, 49: 363-375.
- Lewis, P. O., and Zaykin, D. 1999. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d12). Free program.
- Magalhães, C.A.. 1998. Density and shell-size variation of *Nodilittorina lineolata* (Orbigny, 1840) in the intertidal region in southeastern Brazil. Hydrobiologia, 378: 143-148.
- Mastro, E.; Chow, V. e Hedgecock, D.. 1982. *Littorina scutulata* and *Littorina plena*; sibling species status of two prosobranch gastropod species confirmed by electrophoresis. Veliger, 24: 239-246.
- Matthews, H.R.. 1968. Notas sobre a família Littorinidae no nordeste brasileiro (Molusca: Gastropoda). Arquivo Estadual de Biologia Marinha da Universidade Federal do Ceará, 8: 183-186.
- McQuaid, C.D.. 1996. Biology of the gastropod family Littorinidae. I. Evolutionary aspects. Oceanography and Marine Biology: an Annual Review, 34: 233-262.
- Mileikovsky, S.A.. 1975. Types of larval development in Littorinidae (Gastropoda: Prosobranchia) of the world ocean, and ecological patterns of their distribution. Marine Biology, 30: 129-135.

- Miller, M.P.. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.
- Mitchell-Olds, T.. 1992. Does environmental variation maintain genetic variation? A question of scale. Trends en Ecology and Evolution, 7: 397-398.
- Mitton, J.B. e Koehn, R.K.. 1973. Population genetics of marine pelecypods. III. epistasis between functionally related isoenzymes of *Mytilus edulis*. Genetics, 73: 487-496.
- Nei, M.. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist, 106: 283-293.
- Nevo, E.. 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. Theoretical Population Biology, 13: 127-177.
- Nevo, E., Perl, T., Beiles, A. e Wool, D.. 1981. Mercury selection of allozyme genotypes in shrimps. Experientia, 37: 1152-1154.
- Nevo, E., Ben-Shlomo e Lavie, B.. 1984. Mercury selection of allozymes in marine organisms: prediction and verification in nature. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 81: 1258-1259.
- Noy, R., Lavie, B. e Nevo, E..1987. The niche-width variation hypothesis revisited: genetic diversity in the marine gastropods *Littorina punctata* (Gmelin) and *L. neritoides* (L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 109: 109-135.
- Palumbi, S.R.. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. Annual Review of Ecology and Systematics, 25: 547-572.
- Powell, J.R.. 1971. Genetic polymorphisms in varied environments. Science, 174: 1035-1036.
- Raff, R.A.. 1996. The Shape of Life. Genes, Development and the Evolution of Animal Form. The University of Chicago Press.
- Raymond M. e Rousset F.. 1995a. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity, 86:248-249.
- Raymond M. e Rousset F.. 1995b. An exact test for population differentiation. Evolution, 49: 1280-1283.
- Reid, D.G.. 1986. The Littorinid Molluscs of Mangrove Forests in the Indo-Pacific Region. The Genus *Littoraria*. British Museum (Natural History). 228 pp..
- Reid, D.G.. 1987. Natural selection for apostasy and crypsis acting on the shell colour polymorphism of a mangrove snail, *Littoraria filosa* (Sowerby) (Gastropoda: Littorinidae). Biological Journal of the Linnean Society, 30: 1-24.
- Reid, D.G..1989. The comparative morphology, phylogeny and evolution of the gastropod family Littorinidae. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B324: 1-110.
- Reid, D.G..1996. Systematics and Evolution of *Littorina*. Ray Society, London. 456 pp.

- Reid, D.G.. 1999. The genus *Littoraria* Griffith & Pidgeon, 1834 (Gastropoda: Littorinidae) in tropical eastern Pacific. The Veliger, 42: 21-53.
- Rice, W.R.. 1989. Analyzing tables of statistical tests. Evolution, 43: 223-225.
- Rios, E.C.. 1994. Seashells of Brazil. FURG, Rio Grande do Sul, Brasil. 492 pp.
- Scheltema, R.S.. 1971. Larval dispersal as a means of genetic exchange between geographically separated populations of shallow-water benthic marine gastropods. Biological Bulletin, 140: 284-322.
- Scheltema, R.S.. 1978. On the relationship between dispersal of pelagic veliger and the evolution of marine prosobranch gastropods. Págs. 303-322 in B. Battaglia and J. A. Beardmore, eds. Marine Organisms: Genetics, Ecology And Evolution. Plenum, New York.
- Shaw, C.R. e Prasad, R.. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. Biochemical Genetics, 4: 297-320.
- Singh, S.M. e Green, R.H.. 1984. Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. Malacologia, 25: 569-581.
- Solé-Cava e Thorpe, J.P.. 1991. High levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. Biological Journal of the Linnean Society, 44: 65-80.
- Soltis, D.E. e Soltis, P.S.. 1989. Advances in Plant Sciences Series, Vol. 4: Isozymes in Plant Biology. Ed. T.R.Dudley. Dioscorides Press.
- Swofford, D. L. e Selander, R.B.. 1981. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. Journal of Heredity, 72: 281-283.
- Tatarenkov, A. e Johannesson, K.. 1999. Micro- and macrogeographic allozyme variation in *Littorina fabalis*; do sheltered and exposed forms hybridize? Biological Journal of the Linnean Society, 67: 199-212.
- Thorpe, J.P.. 1982. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, 13: 139-168.
- Todd, C.D.; Lambert, W.J. e Thorpe, J.P.. 1998. The genetic structure of intertidal populations of two species of nudibranch molluscs with planktotrophic and pelagic lecithotrophic stages: are pelagic larvae "for" dispersal? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 228: 1-28.
- Tracey, M.L.; Bellet, N.F. e Gravem, C.D.. 1975. Excess allozyme homozygosity and breeding population structure in the mussel *Mytilus californianus*. Marine Biology, 32: 303-311.
- Ward, R.D.. 1990. Biochemical genetic variation in the genus *Littorina* (Prosobranchia: Mollusca). Hydrobiologia, 193: 53-69.

- Ward, R.D. e Warwick, T.. 1980. Genetic differentiation in the molluscan species *Littorina rudis* and *L. arcana* (Prosobranchia: Littorinidae). Biological Journal of the Linnean Society, 14: 417-428.
- Weir, B.S.. 1996. Genetic Data Analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4. Variability within and among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Zaslavskaya, N.I.. 1995. Allozyme comparison of four littorinid species morphologically similar to *Littorina sitkana*. Hydrobiologia, 309: 123-128.
- Zouros, E. e Foltz, D.W.. 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. Malacologia, 25(2): 583-591.

APÊNDICE 1

Protocolos dos sistemas enzimáticos modificados para *N. lineolata*. As abreviaturas das enzimas e suas respectivas identificações estão na tabela 1.2.*

LAP (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

tampão: tris maleato 0,2M pH 6,0 - 25ml

l-leucina β -naftilamida HCL - 35mg

n-dimetil formamida - 900 μ l

Fast-garnet GBC - 30mg

PEP leu -ala (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

tampão: tris HCL 0,1M pH8,0 - 30ml

leu-ala - 30mg

MnCl₂ - 6mg

veneno de cobra (*Crothalus atrox*) - 8mg

peroxidase - 8mg

dianisidina - 8mg

PEP leu-gly-gli (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

tampão: DH pH 8,4- 30ml

leu-gly-gli - 30mg

MnCl₂ - 6mg

veneno de cobra (*Crothalus atrox*) - 8mg

peroxidase - 8mg

dianisidina - 16mg

PP (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

solução 1: tampão tris HCL 0,1M pH 8,0 - 25ml

pirofosfato de sódio - 112mg

MgCl₂ - 0,5ml

Incubar o gel nesta solução durante 1h, retirar e colocar a solução 2:

solução 2: H₂O - 25ml

molibdato de amônia - 625 mg

ácido ascórbico - 1,25 g

LDH (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

tampão: DH pH 8,4 - 30ml
NaD lactato - 15ml (ajustar para pH 8,2)
NAD - 0,5ml
MTT - 0,5ml
NBT - 0,5ml
PMS - 0,6ml

MPI (modificada a partir de Alfenas et al. 1991)

tampão: tris HCL 0,2M pH 8,0 - 30ml
manose 6-fosfato - 6 mg
NADP - 0,3ml
MgCl₂ - 0,3ml
MTT - 0,3ml
fosfoglicose isomerase - 40U (1U= 2μl)
glicose 6-fosfato desidrogenase - 10U (1U= 5μl)
PMS - 0,3ml

SDH (modificada a partir de Alfenas et al. 1991)

tampão: tris HCL 0,05M pH8,0 - 30ml
sorbitol - 275mg (ajustar para pH 8,0)
NAD - 0,5ml
MTT - 0,3ml
NBT - 0,3ml
PMS - 0,5ml

ME (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

tampão: DH pH 8,4- 30ml
substrato MDH - 10ml
NADP - 0,6ml
MgCl₂ - 0,3ml
NBT - 0,3ml
PMS - 0,6ml

HK (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

tampão: DH pH 8,4 - 30ml
glicose - 60mg

ATP - 25mg
NADP - 0,6ml
MgCl₂ - 0,3ml
MTT - 0,2ml
NBT - 0,15ml
glicose 6-fosfato desidrogenase - 40U (1U= 5μl)
PMS - 0,3ml

PGI (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

tampão: DH pH 8,4 - 30ml
frutose 6-fosfato - 5mg
NADP - 0,3ml
MgCl₂ - 0,3ml
MTT - 0,1ml
glicose 6-fosfato desidrogenase - 9U (1U= 5μl)
PMS - 0,3ml

PGM (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

tampão: tris HCL 0,05M pH8,0 - 30ml
glicose 1-fosfato - 60mg
NADP - 0,3ml
MgCl₂ - 0,6ml
MTT - 0,3ml
glicose 6-fosfato desidrogenase - 30U (1U= 5μl)
PMS - 0,3ml

MDH (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

tampão: DH pH 8,4 - 30ml
substrato MDH - 5ml
NAD - 0,3ml
MTT - 0,4ml
PMS - 0,5ml

AK (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

tampão: tris HCl 0,1M pH8,0 - 30ml
glicose - 30mg
ADP - 6mg

NADP - 0,3ml
MgCl₂ - 0,3ml
MTT - 0,25ml
hexoquinase - 20U (18U= 1mg)
glicose 6-fosfato desidrogenase - 15U (1U= 5μl)
PMS - 0,3ml

IDH (modificada a partir de Alfenas et al. 1991)

tampão: DH pH 8,4 - 30ml
ácido isocítrico - 70mg
MgCl₂ - 0,3ml
NADP - 0,6ml
MTT - 0,3ml
PMS - 0,6ml

Protocolos dos sistemas enzimáticos modificados para *Littoraria flava* e *L. angulifera* (os sistemas cujo protocolo é o mesmo de *N. lineolata* não foram repetidos). As abreviaturas das enzimas e suas respectivas identificações estão na tabela 2.2.

AAT (modificada a partir de Soltis e Soltis 1989)

tampão: C-NaH₂PO₄ 0,2M pH4,3 - 4ml
D- Na₂HPO₄ 0,2M pH9,2 - 21ml
misturar quantidades indicadas dos tampões C e D.
BSA - 30mg
PVP - 125mg
ácido L-aspártico - 113mg
ácido α-cetoglutárico - 18mg
piridoxal 5-fosfato - 2mg
Fast-blue BB - 60mg

PGI (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

tampão: DH pH 8,4 - 30ml
frutose 6-fosfato - 5mg
NADP - 0,3ml
MgCl₂ - 0,3ml
MTT - 0,1ml
glicose 6-fosfato desidrogenase - 8U (1U= 5μl)

PMS - 0,3ml

AK (modificada a partir de Shaw e Prasad 1970)

tampão: tris HCl 0,1M pH8,0 - 30ml

glicose - 25mg

ADP - 6mg

NADP - 0,3ml

MgCl₂ - 0,3ml

MTT - 0,2ml

hexoquinase - 20U (18U= 1mg)

glicose 6-fosfato desidrogenase - 10U (1U= 5μl)

PMS - 0,3ml

* As concentrações das soluções utilizadas foram:

MgCl₂ - 100mg/ ml

NAD - 25mg/ ml

NADP - 10mg/ ml

MTT - 10mg/ ml

NBT - 20mg/ ml

PMS - 1mg/ ml

Tabela a.1. Continuação.

Amostra / Loco	SJ	Po	Ti96	Ti97	Na	Fo	Gu 96	Gu 3/97	Gu 6/97	Pre 96	Pre 97	Pre 98	Ba 96	Ba 98	PG 97	PG 98	Fr	IP	Pe	Bo	
MIDH																					
N	38	64	77	51	30	57	31	52	26	82	30	31	75	19	42	35	56	51	48	59	
13				,010				,019					,013								
22																					
100	1,00	,992	1,00	,980	1,00	1,00	1,00	,981	1,00	1,00	1,00	1,00	,987	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	,008	
143		,008		,010																,992	
IDH																					
N	48	57	92	49	30	56	18	57	33	63	32	30	65	17	45	35	66	51	47	58	
10														,011							
20		,009																			
54																					
100	1,00	,974	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	,989	1,00	1,00	1,00	1,00	,009	
112		,018																		,991	
MPI																					
N	26	47	30	40	30	55	42	33	32	63	39	23	47	19	15	33	67	51	50	60	
71	,019																				
74																					
85		,064	,033																	,008	
91										,022								,020			
100	,981	,936	,967	1,00	,967	,973	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	,978	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	,992	
109					,017	,009												,971			
113					,017	,018												,010			
ME																					
N	9	47	56	34	28	51	19	29	20	66	8	30	30	19	43	21	49	51	48	52	
91		,021											,026							,029	
100	1,00	,979	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	,939	1,00	1,00	1,00	,974	1,00	1,00	1,00	1,00	,979	,971	
112										,061									,021		
LDH																					
N	8	18	34	7	24	31	4	26	0	29	8	17	14	13	31	22	29	42	21	31	
85								,077		,052		,059			,097	,023	,034	,048		,081	
93	,063				,021																
100	,938	1,00	1,00	,857	,979	1,00	1,00	,923		,931	1,00	,941	1,00	1,00	,903	,977	,948	,952	1,00	,903	
114				,143						,017							,017			,016	

Tabela a.1. Continuação.

Amostra / Loco	SJ	Po	Ti96	Ti97	Na	Fo	Gu 96	Gu 3/97	Gu 6/97	Pre 96	Pre 97	Pre 98	Ba 96	Ba 98	Ba 99	Ba 98	Ba 99	Ba 98	Ba 99	PG 97	PG 98	Fr	IP	Pe	Bo	
SDH-1																										
N	0	6	9	2	4	37	0	12	0	12	0	14	0	6	11	11	11	18	37	34	22					
83	-	-	-	-	,125	,054	-	,167	-	,071	-	,071	-	-	,091											
91	-	-	-	-	,875	,878	-	,833	-	,786	-	,786	-	1,00	,909	,727	,972	,838	,853	,015						
100	-	1,00	1,00	1,00	,068	,068	-	,042	-	,143	-	,143	-	-	,091	,182	,028	,135	,132							
111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SDH-2																										
N	0	5	8	1	6	32	0	14	0	4	0	16	0	5	12	9	9	18	29	21	17					
39	-	-	,125	-	,031	,031	-	,071	-	,188	-	,188	-	,200	,111	,111	,111	,086	,119	,235						
53	-	-	,083	-	,063	,063	-	,125	-	,094	-	,094	-	-	,111	,111	,056	,034	,071	,029						
76	-	-	,141	-	,141	,141	-	,357	-	,156	-	,156	-	,100	,042	,139	,139	,362	,095	,088						
100	-	1,00	,875	1,00	,917	,766	-	,571	-	,563	-	,563	-	,700	,958	,778	,806	,517	,714	,647						
AK-1																										
N	29	57	65	40	28	54	17	45	32	79	14	23	54	17	33	36	63	47	45	56						
79	-	-	-	-	,036	,019	-	,013	-	,013	-	,013	-	,029	,008	,053	,011	,021	,011	,009						
88	,009	,008	,025	,025	,019	,029	,029	,013	,013	,013	,013	,013	,013	,029	,014	,016	,016	,011	,011	,011						
93	,008	,046	,975	,975	,964	,935	,971	,981	1,00	,957	1,00	,957	1,00	,941	1,00	,958	,960	,915	,944	,991						
100	1,00	,982	,946	,975	,964	,935	,971	,981	1,00	,957	1,00	,957	1,00	,941	1,00	,958	,960	,915	,944	,991						
108	,009	,046	,046	,046	,028	,028	,028	,006	,006	,043	,043	,043	,043	,029	,014	,014	,016	,033	,033	,033						
118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
AK-2																										
N	14	39	16	26	7	32	8	30	3	42	0	18	17	12	22	24	27	40	40	28						
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
75	,026	,846	,969	,904	1,00	,891	,875	,950	,667	,810	-	,861	,882	,917	,864	,854	,889	,762	,875	,786						
100	,929	,846	,969	,904	1,00	,891	,875	,950	,667	,810	-	,861	,882	,917	,864	,854	,889	,762	,875	,786						
125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
136	,051	,031	,038	,038	,031	,031	,125	,017	,333	,036	-	,028	,118	,114	,021	,021	,074	,087	,075	,071						
150	,071	,077	,019	,038	,016	,016	,125	,017	,333	,036	-	,028	,118	,114	,021	,021	,074	,087	,075	,071						
186	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
215	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						

Tabela a.1. Continuação.

Amostra / Loco	SJ	Po	Ti96	Ti97	Na	Fo	Gu 96	Gu 3/97	Gu 6/97	Pre 96	Pre 97	Pre 98	Ba 96	Ba 98	Ba 98	PG 97	PG 98	Fr	IP	Pe	Bo	
LAP																						
N	12	42	27	24	17	44	4	24	9	33	10	23	25	10	10	32	27	28	49	38	43	
71		,012	,037	,021						,045		,022		,050		,031		,143	,020	,026		
78		,024	,093			,102		,042	,111	,015		,043	,040			,031	,037	,089	,071	,092	,058	
84	,083	,048	,093	,042	,294	,068		,042		,106		,022	,040	,100		,047	,056	,054	,071	,079	,070	
89	,042	,071	,093	,042	,294	,068		,042		,106		,022	,040	,100		,047	,056	,054	,071	,079	,047	
94		,071	,056	,229		,023				,061		,043	,080			,063			,020	,158		
100	,667	,571	,630	,625	,471	,557	1,00	,750	,889	,636	,950	,522	,560	,750	,609	,722	,589	,480	,224	,224	,651	
106	,167	,095	,056	,021	,235	,045		,042		,061		,065	,220	,050	,109	,093	,054	,102	,132	,132	,012	
114		,071	,037	,063		,080		,063		,061		,087		,050	,109	,074	,071	,102	,102	,132	,128	
122	,042	,036				,125		,063		,015	,050	,196	,040			,019			,133	,066	,035	
128												,020								,013		
PP																						
N	7	24	23	20	26	42	0	14	4	40	5	20	14	18	18	30	25	32	38	38	36	
78					,019																	
87				,025														,031		,013	,014	
93					,019	,024		,071		,050		,050				,033	,040	,031	,092	,079		
100	1,00	,958	1,00	,875	,942	,893		,857	1,00	,837	1,00	,850	1,00	,944	,767	,800	,906	,776	,855	,855	,931	
108		,042		,100	,019	,071		,071		,087		,100		,056	,083	,160	,031	,031	,079	,053	,042	
116						,012				,013					,067				,053		,014	
125										,013					,050							

Tabela a.2. Continuação.

Amostras	Preta 97		Preta 98		Barequeçaba 96		Barequeçaba 98		PGrande 97		PGrande 98		Frade		I. Porcos		Pepino		Bombas		
	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	
classes genotípicas 58-58	-	0,06	-	0,02	-	0,01	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49
67-67	-	-	1	0,05	-	-	-	-	-	0,01	-	0,09	-	-	-	0,06	-	-	-	0,01	0,32
76-76	-	0,20	1	0,18	2	0,24	1	0,41	-	0,12	7	1,79	4	1,01	4	0,96	6	0,68	2	0,32	0,49
89-89	-	10,78	12	7,63	28	25,41	11	6,24	22	17,24	15	10,49	31	25,89	19	13,96	26	20,13	36	31,59	0,49
100-100	14	0,31	5	1,60	-	0,24	2	0,27	5	1,27	2	0,22	2	0,46	4	0,96	4	0,80	1	0,13	0,49
107-107	3	0,02	1	0,02	-	0,01	-	0,08	1	0,04	-	-	-	0,05	2	0,16	-	0,01	1	0,13	0,49
116-116	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-	0,07	-	-	-	0,08	-	0,11	-	0,06	-	0,01	0,49
127-127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49
138-138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49
58-76	-	-	-	-	-	-	1	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49
58-89	-	-	-	-	-	-	-	0,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49
58-100	-	-	-	-	-	-	-	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49
58-107	-	-	-	-	-	-	-	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49
58-116	-	-	-	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49
58-127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49
67-76	-	0,06	-	0,11	-	0,02	-	-	-	0,02	-	0,12	-	0,03	-	0,04	-	0,04	-	-	0,49
67-89	2	0,31	-	0,18	-	0,16	-	-	-	0,06	-	0,48	1	0,13	1	0,15	-	0,25	-	-	0,49
67-100	1	2,02	2	1,05	2	1,54	-	-	1	0,65	1	1,13	-	0,66	-	0,55	2	1,30	2	0,32	0,49
67-107	-	0,37	-	0,49	-	0,16	-	-	-	0,18	1	0,18	-	0,09	-	0,15	-	0,27	-	-	0,49
67-116	-	0,12	-	0,07	-	0,05	-	-	-	0,04	-	0,03	-	0,03	-	0,06	-	0,04	-	-	0,49
67-127	-	-	-	0,07	-	0,02	-	-	-	0,05	-	0,03	-	0,04	-	0,05	-	0,08	-	-	0,49
67-138	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	0,02	-	0,03	-	0,01	-	0,05	-	0,08	-	-	0,49
76-89	-	0,10	-	0,26	1	0,08	-	-	-	0,12	-	0,96	1	0,40	-	0,59	-	0,25	1	0,88	0,49
76-100	-	0,67	1	1,58	-	0,77	-	-	1	1,30	4	2,27	1	1,99	3	2,19	2	1,30	7	8,27	0,49
76-107	-	0,12	-	0,74	-	0,08	-	-	1	0,36	-	0,36	-	0,28	-	0,59	-	0,27	2	0,58	0,49
76-116	1	0,04	-	0,11	-	0,02	-	-	-	0,07	-	0,06	-	0,10	1	0,25	-	0,04	1	0,20	0,49
76-127	-	-	-	0,11	-	0,01	-	-	-	0,10	-	0,06	1	0,13	-	0,21	-	0,08	-	-	0,49
76-138	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	0,06	-	0,03	-	0,21	-	0,08	-	-	0,49

Tabela a.2. Continuação.

Amostras	Preta 97		Preta 98		Barequeçaba 96		Barequeçaba 98		PGrande 97		PGrande 98		Frade		I. Porcos		Pepino		Bombas	
	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es	Ob	Es
89 - 100	3	3,37	1	2,63	1	5,39	-	3,57	4	3,25	1	9,08	4	10,62	4	7,66	-	7,79	4	6,77
89 - 107	-	0,61	2	1,23	-	0,56	1	0,81	1	0,90	-	1,43	1	1,48	-	2,06	-	1,61	-	0,48
89 - 116	-	0,20	-	0,18	-	0,16	2	0,49	-	0,18	1	0,24	1	0,54	-	0,88	-	0,25	-	0,16
89 - 127	-	0,10	-	0,18	1	0,08	-	0,16	-	0,24	-	0,24	-	0,67	1	0,74	-	0,50	-	0,08
89 - 138	1	3,55	-	0,15	-	0,08	1	0,45	2	3,11	2	1,71	-	0,13	-	1,48	-	0,13	-	-
89 - 166	-	0,05	1	0,95	1	0,95	1	0,85	2	0,65	2	0,85	-	0,05	-	0,85	-	0,05	-	-
100 - 107	-	4,04	1	7,37	6	5,39	-	2,97	1	9,76	1	3,40	6	7,30	4	7,66	3	8,44	1	4,51
100 - 116	1	1,35	-	1,05	1	1,54	-	1,78	1	1,95	-	0,57	2	2,66	1	3,28	2	1,30	1	1,50
100 - 127	1	3,05	1	1,05	-	0,77	-	0,60	2	2,60	1	0,57	4	3,32	2	2,74	2	2,60	-	0,75
100 - 138	1	0,81	-	0,37	1	0,77	-	0,14	-	0,15	-	0,15	-	0,66	-	0,15	-	0,32	-	-
100 - 166	-	0,05	1	0,11	1	0,05	1	0,05	-	0,05	-	0,15	2	0,05	-	0,05	-	0,05	-	-
107 - 116	-	0,25	-	0,49	1	0,16	-	0,41	-	0,54	-	0,09	-	0,37	-	0,88	-	0,27	-	0,11
107 - 127	-	0,05	1	0,49	-	0,08	-	0,14	2	0,72	-	0,09	-	0,46	2	0,74	2	0,54	1	0,05
107 - 138	-	0,05	-	0,05	-	0,08	-	0,14	-	0,05	-	0,09	-	0,09	-	0,09	-	0,09	-	-
107 - 166	-	0,05	-	0,05	-	0,08	-	0,14	-	0,05	-	0,09	-	0,09	-	0,09	-	0,09	-	-
116 - 127	-	0,05	-	0,07	-	0,02	1	0,08	-	0,15	-	0,02	-	0,17	-	0,32	-	0,08	-	0,02
116 - 138	-	0,05	-	0,05	-	0,02	-	0,02	-	0,05	-	0,02	1	0,03	-	0,03	-	0,03	-	-
116 - 166	-	0,05	-	0,05	-	0,02	-	0,02	-	0,05	-	0,02	-	0,04	-	0,04	-	0,04	-	-
127 - 138	-	0,05	-	0,05	-	0,01	-	0,01	-	0,05	-	0,02	-	0,04	-	0,04	-	0,04	-	-

* As frequências destacadas em vermelho são aquelas cujo afastamento do esperado parece ser mais evidente (não foi realizado nenhum teste estatístico para cada genótipo isolado). Notar alta frequência observada dos genótipos homozigotos em todas as amostras apresentadas.

- classe genotípica não observada em nenhum indivíduo da amostra.

Tabela a.3. Continuação.

Amostra / Loco	Tibau	Natal	Suape	S. José 97	S. José 00	Aracaju	Mangara tiba	P.Grande	Bombas
AK-1									
N	34	19	35	16	23	22	37	9	10
65			,029	,031		,023		,111	,050
71									,050
75							,027		
81		,079	,029				,108	,222	,250
90	,015		,014	,063					
100	,985	,921	,914	,906	1,00	,909	,851	,667	,650
108						,068			
115							,014		
125			,014						
AK-2									
N	34	19	39	17	24	25	41	7	10
91		,026							
100	1,00	,947	1,00	1,00	,958	1,00	1,00	1,00	1,00
104		,026							
113					,042				
AK-3									
N	32	17	34	14	23	15	46	8	9
87						,100			
90		,029					,054	,063	
95	,016						,011		
100	,969	,853	,941	1,00	,957	,833	,913	,938	1,00
103		,059			,043				
109	,016	,059	,015			,067	,022		
118			,044						
PEP									
N	34	21	40	17	24	1	41	9	10
86			,013						
95			,025					,222	,150
100	1,00	1,00	,962	1,00	1,00	1,00	,927	,333	,850
108							,073	,444	
LAP-1									
N	22	18	40	11	20	1	35	1	10
97		,056							
100	1,00	,944	,988	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	,950
107			,013						,050
LAP-2									
N	21	21	39	16	21	35	44	10	10
87				,063			,034		
92	,024		,013				,023	,400	
95		,095	,013		,095		,057		,050
100	,905	,786	,846	,844	,762	,986	,852	,600	,950
103		,071							
106	,048	,048	,077	,063	,119		,034		
112	,024		,051		,024	,014			
124				,031					
PP									
N	34	21	36	16	24	34	46	9	10
77		,024					,011		
93		,024	,014				,011		
100	1,00	,881	,958	1,00	1,00	1,00	,978	1,00	1,00
107			,028						
117		,071							

Tabela a.3. Continuação.

Amostra / Loco	Tibau	Natal	Suape	S.José 97	S.José 00	Aracaju	Manga ratiba	P.Grande	Bombas
GOT-1									
N	15	21	29	10	21	35	40	10	9
38						,029			
50		,024					,013		
57		,024							
100	1,00	,952	1,00	1,00	,952	,971	,988	1,00	1,00
133					,048				
GOT-2									
N	23	21	40	10	24	35	45	10	10
68			,013						
73							,011		
82	,022								
100	,978	,952	,975	1,00	1,00	,986	,989	,950	1,00
112		,048							
120						,014			
129								,050	
140			,013						

Tabela a.4. Frequências gênicas das amostras de *Littoraria angulifera*. Os alelos estão representados pela mobilidade relativa. *N*-tamanho da amostra. *Abreviaturas especificadas na tabela 2.1.

Amostra* / Loco	An MB	AN Na	An Ge	An JP	An SA	An SJ97	An SJ00	AN Mg	AN SB	AN Ma
PGM-2										
alelos										
<i>N</i>	12	12	13	23	2	1	24	41	22	28
66				,022						
83			,077	,043			,063	,037		
88	,042			,043				,024	,045	,018
93		,042	,115	,022				,037	,023	,018
96		,083	,154	,087		1,00	,146	,012	,114	,125
100				,043					,091	
103	,125	,167		,065	,250			,085	,023	,036
106	,042		,077	,152			,042	,037	,341	,250
108	,333	,333	,077	,065			,208	,159		
110							,188	,024		
112		,208						,122		
113	,125	,125	,269	,196	,750		,021	,085	,159	,393
116			,231	,065			,125	,085	,182	,161
120							,104	,098	,023	
123	,208			,174			,104	,159		
128	,125	,042		,022				,037		
PGM-3										
<i>N</i>	15	12	18	26	5	1	25	41	26	28
93			,028			1,00	,140		,038	,018
96	,067	,042	,028	,135			,020	,073	,058	,018
100	,033							,012		,018
102							,060			
104	,900	,917	,944	,827	1,00		,780	,902	,731	,946
109		,042		,038					,173	
112								,012		
PGI										
<i>N</i>	15	11	23	30	10	14	13	37	35	39
63									,043	
83									,043	
100							,077			,013
114				,017	,050	,071			,057	,192
119	,200	,045		,217	,250	,750	,038	,027		
123		,455	,696	,150				,284	,400	,423
126	,400	,318	,152	,400	,500	,107	,654	,216	,243	,154
132	,400	,182	,087	,217	,200	,071	,231	,311	,157	,218
140			,065					,162	,029	
158									,029	
MDH-1										
<i>N</i>	11	12	24	27	8	3	25	41	33	42
33		,042								
152	1,00	,958	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
MDH-2										
<i>N</i>	17	12	24	33	11	12	25	41	41	42
53	1,00	1,00	,958	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
105			,042							

Tabela a.4. Continuação.

Amostra* / Loco	An MB	AN Na	An Ge	An JP	An SA	An SJ97	An SJ00	AN Mg	AN SB	AN Ma
IDH-1										
N	16	12	24	28	10	18	24	17	39	43
52	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	,941	1,00	1,00
80								,059		
IDH-2										
N	15	11	24	29	10	16	23	29	40	43
67				,034						
81								,034		
100	1,00	1,00	1,00	,966	1,00	1,00	1,00	,966	1,00	1,00
MPI										
N	17	12	24	31	13	18	25	41	41	40
68			,021							
79	,971	,875	,958	,984	,962	,972	,920	,988	,915	,375
86							,060		,073	,125
92	,029		,021	,016					,012	,025
96							,020			
100		,125						,012		,475
103					,038	,028				
ME										
N	6	9	24	20	13	15	23	40	38	45
58									,013	
77		,111			,077	,200	,565		,053	
83	1,00	,722	,875	,850	,692	,800	,413	,962	,868	,989
90				,025						
100		,111	,042						,026	
108			,083	,125	,077		,022		,039	,011
113		,056						,025		
120					,154					
152								,013		
SDH-1										
N	17	12	24	32	13	20	23	33	40	45
47		,042								
61		,042								
75	,029									
100	,971	,917	1,00	,984	1,00	1,00	1,00	,879	1,00	,989
123								,121		
125										,011
137				,016						
SDH-2										
N	14	10	22	27	11	12	17	23	39	43
86		,150							,051	,047
100	1,00	,650	,977	,981	1,00	1,00	1,00	,957	,923	,953
109		,200						,043	,026	
119			,023	,019						
AK-1										
N	16	12	18	23	12	20	23	38	41	41
43		,167			,042	,075				
56		,167		,261	,292	,675	,565			
65	1,00	,667	,667	,609	,542	,250	,413	,961	,988	,976
71										,012
75			,333	,087	,125					,012
81									,012	
90							,022	,039		
100				,043						

