



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
MESTRADO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *Melampus coffeus*
(Linnaeus, 1758) AO LONGO DA COSTA CEARENSE**

CARLOS GLAUBER BATISTA DE MELO

**FORTALEZA-CE
JUNHO, 2012**

CARLOS GLAUBER BATISTA DE MELO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *Melampus coffeus*
(Linnaeus, 1758) AO LONGO DA COSTA CEARENSE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciências Marinhas Tropicais do programa de pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC); área de concentração: utilização e manejo de ecossistemas marinhos e estuarinos.

Orientador: Rodrigo Maggioni, Ph.D

FORTALEZA

2012

RESUMO

Melampus coffeus é um gastropoda pulmonado comumente encontrado em estuários da costa oeste do Atlântico e são importantes recicladores de nutrientes pelo fato de serem macrodetritívoros. Considerando a importância ecológica do *M. coffeus*, seu potencial como bioindicador e sua distribuição em estuários submetidos a diversos níveis de pressão antrópica, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a diversidade genética de suas populações ao longo da costa Cearense usando como ferramenta molecular o gene mitocondrial *COI*. Os espécimes foram coletados em seis estuários da costa Cearense (Rio Ceará, Cocó, Pacoti, Acaraú, Guriú e Barra Grande). No total foram analisadas 138 sequências contendo 426 pb cada. Foram encontrados 81 haplótipos com 73 destes ocorrendo de forma exclusiva, sendo o haplótipo1 o mais abundante ocorrendo 45 vezes e em todos os estuários. A diversidade haplotípica apresentou valor médio de 0,893 e a nucleotídica teve média de 0,00526. As variações entre as sequências ocorreram na sua maioria dentro das populações e os índices de diversidade demonstraram um alto grau de variação intrapopulacional e pouca variação interpopulacional. Observou-se que os estuários apresentaram baixa estruturação gênica com índice de fixação (F_{ST}) de 0,0069 ($P=0,02$). A diferença entre as populações obtida através do número de substituições apresentou valores baixos que variaram entre 0,004 e 0,006, indicando baixo grau de divergência entre os estuários. Os testes de neutralidade apresentaram valores negativos e estatisticamente significativos, indicando que a população passou por uma expansão recente, corroborando com os resultados obtidos com a análise *mismatch distribution* e pela rede de haplótipos. Comparando as sequências Cearenses com outras provenientes da Flórida e Porto Rico constatou-se um alto grau de estruturação gênica com as variações ocorrendo principalmente entre os grupos. Conclui-se que os organismos da costa Cearense apresentaram variabilidade genética alta sem um claro padrão de estruturação e com um possível crescimento populacional recente. As populações Cearenses mostraram um alto grau de diferenciação daquelas descritas para Porto Rico e Flórida, e parecem apresentar, em relação a elas, um processo de estruturação populacional longo e estável no decorrer do tempo.

Palavras-chave: *Melampus coffeus*, variabilidade genética, *COI*, Ceará.

ABSTRACT

Melampus coffeus is a pulmonate gastropod commonly found in estuaries along the west coast of the Atlantic. They are important nutrient recyclers because they are macro-detritivorous organisms. Considering the ecologic importance of *M. coffeus*, its potential as a bioindicator and its distribution in estuaries subjected to various level of anthropogenic pressure, this project aimed at characterizing the genetic diversity of *M. coffeus* populations along the coast of Ceará using the mitochondrial gene COI as a molecular tool. Samples were collected from six estuaries of Ceara's coast (Rivers Ceará, Cocó, Pacoti, Acaraú, Guriú and Barra Grande). During the experiment 138 sequences were analysed, each one containing 426bp. We found 81 haplotypes, 73 of these occurring uniquely Haplotype 1 was the most abundant, occurring 45 times across all the estuaries. The haplotype diversity showed middle value of 0.893 and the nucleotide diversity showed middle of 0.00526. The variations between the sequences occurred mostly within populations and the diversity rates showed a high degree of intra-population variation and little inter-population variation. A low level of genetic structuring was observed among the estuaries, with an overall fixation index (F_{ST}) of 0.0069 ($P=0.02$). The difference between populations, estimated through the number of substitutions, was 0.004 and 0.006, indicating a low degree of divergence between the estuaries. The neutrality tests showed statistically significant negative values, indicating that the population is likely to have suffered a recent expansion. This is in agreement the results obtained from the mismatch distribution analysis and the haplotype network. Comparing populations from Ceará with those from Florida and Puerto Rico it was observed a high degree of genetic structuring with the variations occurring mainly between the groups. In conclusion, *M. coffeus* from Ceara's coast showed high genetic variability with no detectable structuring among estuaries. The local populations seem to have suffered a recent expansion. The populations from Ceará are clearly isolated from those from Puerto Rico and Flórida suggesting a long and stable process of population structuring over time.

Key-words: *Melampus coffeus*, genetic variability, COI, Ceará.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Espécimes de *Melampus coffeus* encontrados nos estuários cearenses. Legenda: A. exemplares de *M. coffeus*; B. indivíduos se alimentando no substrato durante a maré baixa.....12
- Figura 2** – Mapa do Ceará indicando os manguezais onde foram realizadas as coletas. Legenda: 1. Guriú, 2. Acaraú, 3. Ceará, 4. Cocó, 5. Pacoti e 6. Barra Grande.....15
- Figura 3** - Rede de haplótipos dos exemplares de *M. coffeus* analisados no Ceará. Legenda: As cores dos círculos indicam a origem do haplótipo. Amarelo=Acaraú, Preto=Guriú, Azul=Ceará, Vermelho=Cocó, Verde=Pacoti, Marron=Barra Grande. O diâmetro do círculo indica a proporção de ocorrência.....22
- Figura 4** – Distribuição dos haplótipos com frequência maior que um entre os grupos. Legenda: Grupo 1 – 1. Guriú e 2. Acaraú; Grupo 2 – 3. Ceará, 4. Cocó e 5. Pacoti; Grupo 3 – 6. Barra Grande.....23
- Figura 5** - Rede de haplótipos originários da Flórida, Porto Rico e os mais abundantes no Ceará. Legenda: Círculo preto: Ceará; Círculo cinza: Flórida e Porto Rico. O tamanho do círculo indica a frequência de ocorrência.....30
- Gráfico 1** – Distribuição de frequência das diferenças em pares (*mismatch distribution*) das populações Cearenses. Legenda: linha em cinza indica tendência modelo; linha em preto indica tendência obtida pelos valores da análise.....26
- Gráfico 2** – Distribuição de frequência das diferenças em pares (*mismatch distribution*) de todos os estuários. Legenda: linha em cinza indica tendência modelo; linha em preto indica tendência obtida pelos valores da análise.....28
- Gráfico 3** - Distribuição da frequência das diferenças em pares (*mismatch distribution*) das sequências provenientes do Ceará, Flórida e Porto Rico. Legenda: linha em cinza indica tendência modelo; linha em preto indica tendência obtida pelos valores da análise.....29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Índices de diversidade molecular das populações Cearenses. Legenda: N: nº de sequências; h: nº de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; π : diversidade nucleotídica; S: sítios polimórficos; Ts/Tv: Transições/Transversões.....24
- Tabela 2** - Comparação em pares dos valores dos índices de fixação (F_{ST}) das populações cearenses. Os valores em negrito indicam resultado significativo com $p < 0.05$25
- Tabela 3** - Número médio da diferença das sequências comparadas par a par entre as populações do estado do Ceará.....25
- Tabela 4** - Valores obtidos através dos testes de neutralidade seletiva nas amostras examinadas. Legenda: N = tamanho da amostra, P_i = média das diferenças pareadas de nucleotídeos entre sequências.....27
- Tabela 5** - Comparação em pares dos valores dos índices de fixação (F_{ST}) das populações cearenses, da Flórida e Porto Rico. Os valores em negrito indicam resultado significativo com $p < 0,05$28
- Tabela 6** - Número médio da diferença das sequências comparadas par a par entre as populações do estado do Ceará e as da Flórida e Porto Rico.....29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Caracterização dos Manguezais e os impactos sofridos por eles	8
1.2 Uso do DNA mitocondrial em estudos moleculares	10
1.3 A biologia de <i>Melampus coffeus</i>	11
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Área de estudo	16
3.2 Coleta e obtenção do material genético	17
3.3 Análise molecular	19
4 RESULTADOS	22
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização dos manguezais e os impactos sofridos por eles

O manguezal é um ecossistema costeiro, de transição entre os ambientes terrestre e marinho, caracterizado por uma vegetação lenhosa típica associada a outros componentes da flora e fauna, adaptados às condições físico-químicas limitantes de salinidade, substrato inconsolidado, ambiente pouco oxigenado e com freqüente submersão pelas marés (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

O ecossistema manguezal desempenha diversas funções naturais de grande importância ecológica e econômica, dentre as quais se destaca a sustentação da cadeia trófica costeira, por ser fonte de detritos orgânicos para águas costeiras adjacentes e o fato de servirem como área de refúgio, alimentação e reprodução para muitas espécies animais, incluindo as de valor econômico (LACERDA, 1984; LUGO & SNEDAKER, 1974; NAGELKERKEN *et al*, 2002; VANNUCCI, 2001). Os manguezais atuam como barreira contra a ação das ondas, marés e ventos, protegendo as zonas costeiras contra erosão (LACERDA, 1984; LUGO & SNEDAKER, 1974; SCHAEFFER-NOVELLI, 2001). Também imobilizam substâncias poluentes, funcionando como um filtro biológico em que bactérias aeróbias e anaeróbias trabalham a matéria orgânica e a lama promovendo a fixação e a inertização de partículas contaminantes, como os metais pesados (LACERDA, 1984; LUGO & SNEDAKER, 1974; VANNUCCI, 2001).

Apesar de comprovada importância dos manguezais, a intensa utilização dos recursos naturais vem ameaçando a existência desse ecossistema, principalmente porque muitas dessas regiões litorâneas se tornaram grandes centros populacionais e econômicos (SCHAEFFER-NOVELLI *et al*, 2000). Os principais agentes causadores de impactos nos manguezais incluem o barramento de rios, os extrativismos animal e vegetal, agropecuária, incluindo a aquicultura, produção de sal e a urbanização, que resultam em pressões sobre o balanço de sedimento e água, o fluxo de nutrientes e poluentes nos estuários (ELLISON & FARNSWORTH, 1996; 2001; FONDO & MARTENS, 1998; VARJABEDIAN, 1995).

Ao longo da costa Cearense existem 22 rios que desembocam no mar formando zonas estuarinas com presença da vegetação de mangue, onde diversos fatores agem causando impactos sobre seu equilíbrio (SEMACE, 2006). Abaixo estão descritos os agentes impactantes que atuam nos manguezais aqui analisados.

No Estuário do Rio Acaraú a extração de madeira para construção de casas e a instalação de fazendas para o cultivo de camarão vem despertando preocupação por conta da degradação e descaracterização do manguezal (MAIA, 2010).

No Estuário do Rio Ceará, em 1999, foi criada a APA desse estuário com uma área de 2744,89 ha, nela está inserida uma área de manguezal com aproximadamente 500 ha, localizada na divisa entre os municípios de Fortaleza e Caucaia, sendo esta uma unidade de conservação de uso sustentável. Os principais problemas existentes na APA são decorrentes da ação antrópica, ocasionadas pela ocupação irregular das margens do rio com barracas para vendas de bebidas e alimentos, estaleiros e construções diversas, além do desmatamento, das queimadas e da pesca predatória (SEMACE, 2012a).

O Estuário do Rio Cocó pode ser caracterizado como um ambiente fortemente impactado pelas atividades humanas ao longo da bacia de drenagem, que ocorre principalmente pela emissão de esgoto doméstico sem tratamento adequado (MOLISANI, 2005). Além das ações humanas, os fatores ambientais como o avanço das dunas em direção ao leito do rio, o assoreamento do manguezal e a formação de bancos de areia na sua foz comprometem a estabilidade nesse ambiente (VIANA, 1996).

O Rio Pacoti possui 150 km de extensão com a vegetação de mangue distribuída por 15 Km a partir de sua foz, apresentando uma área estuarina com cerca de 160 ha. Em 2000 foi criada a Área de Proteção Ambiental do Rio Pacoti, com 2915 ha, abrangendo os municípios de Fortaleza, Eusébio e Aquiraz (GORAYEB *et al*, 2005; SEMACE, 2012b). Os principais problemas existentes na APA do Rio Pacoti são decorrentes da ação antrópica, ocasionados pela especulação imobiliária, com a construção de casas de veraneio, condomínios fechados e empreendimentos hoteleiros, emissão de resíduos sólidos nas margens

do manancial, ocupação por residências na área de preservação permanente do rio e tráfego de veículos sobre as dunas (SEMACE, 2012).

O município de Icapuí tem a pesca como a principal atividade econômica, onde está incluso o Estuário de Barra Grande. Com o aumento da urbanização e o estabelecimento da carcinicultura, houve uma perda de 12% da área original dos manguezais (MONTEIRO *et al*, 2004).

O processo de gestão ou manejo ecológico nas áreas de manguezais exige não somente considerações socioeconômicas, como também conhecimentos sobre seus sistemas biológicos e os processos físicos. Daí, a necessidade de se conhecer organismos vivos que nos permitam avaliar ou prever, somente com sua presença ou ausência e respostas ecológicas às condições presentes no habitat, que determinadas perturbações oceanográficas, climáticas, biológicas ou de influência antrópica estão atuando no ambiente (SOTO & LEIGHTON, 1999).

1.2 Uso do DNA mitocondrial em estudos moleculares

Com o advento de avançados métodos moleculares, os dados genéticos atualmente desempenham um papel importante na condução do manejo, conservação e avaliação de organismos marinhos (AVISE, 1994). Dentro desses métodos estão as ferramentas que usam DNA mitocondrial, onde seu frequente uso resultou no aumento de estudos nas áreas de filogenia molecular, genética de populações e aspectos de conservação da qual a detecção de polimorfismo em nível molecular de populações naturais é necessária, e tem mostrado ser eficiente e um excelente ponto de partida nos estudos moleculares (AVISE, 2004; MAO *et al*, 2011). O DNA mitocondrial exibe algumas particularidades em sua estrutura, que permitem o acúmulo rápido de mutações pontuais favorecendo a identificação de variações entre indivíduos (BROWN, 1983).

Entre os marcadores moleculares usados, o gene da subunidade I da Citocromo c Oxidase (*COI*) destaca-se por possuir inúmeras vantagens como a possibilidade de utilização de um *primer* universal para a maioria dos animais e por apresentar maiores taxas mutacionais e sinal filogenético que auxiliam na discriminação de grupos muito próximos (HEBERT *et al*, 2003).

Como prova da eficiência do gene *COI* em estudos moleculares, várias pesquisas vem sendo realizadas com o intuito de caracterizar o padrão filogeográfico, a estrutura e a variabilidade genética de populações de invertebrados, incluindo os moluscos, usando como ferramenta esse gene isolado ou em associação com outros genes (e.g. CHO *et al*, 2007; GHARBI *et al*, 2010; KATSARES *et al*, 2008; MAO *et al*, 2011; YUAN *et al*, 2009).

Pesquisas no campo genético também vêm sendo desenvolvidas para o melhor conhecimento dos Pulmonata. Prasankok & Panha (2011) em sua pesquisa teve como objetivo detectar o grau de estruturação gênica do gastropoda pulmonado terrestre *Cryptozon asiamensis*. Vários ensaios acerca da filogenia molecular dos pulmonados também já foram realizados (e.g. DAYRAT *et al*, 2011; KETMAIER *et al*, 2006; MOUSSALLI *et al*, 2009; RUNDELL *et al*, 2004).

1.3 A biologia de *Melampus coffeus*

De acordo com Martins (1996), no trabalho mais recente realizado sobre a taxonomia do grupo, a espécie *Melampus coffeus* apresenta a seguinte classificação sistemática:

Filo Mollusca

Classe Gastropoda Curvier, 1787

Subclasse Pulmonata Curvier, 1817

Ordem Archaeopulmonata Morton, 1955

Família Ellobiidae H & A. Adams, 1855

Subfamília Melampinae Pfeiffer, 1853

Gênero *Melampus* Montfort, 1810

Espécie *Melampus coffeus* (Linnaeus, 1758)

A ecologia e fisiologia da Família Ellobiidae têm despertado grande interesse, uma vez que esse grupo representa a transição dos moluscos do ambiente marinho para o terrestre, sendo provavelmente o grupo vivo mais primitivo dos Pulmonata e, desta forma, o seu estudo é fundamental para compreensão da evolução dos Gastropoda (MORTON, 1955).

Melampus coffeus (Linnaeus, 1758) é um gastrópode pulmonado da família Ellobiidae comum em manguezais e marismas do oceano Atlântico, distribuindo-se da Flórida ao Uruguai (RIOS, 1994). Esses caramujos respiram o ar atmosférico através do teto da cavidade do manto vascularizada, que funciona como um pulmão (RUSSEL-HUNTER *et al*, 1972). A concha tem formato cônico-oval com comprimento de 23 mm, sua coloração varia de cinza a marrom escuro e preto, podendo apresentar até quatro faixas brancas na volta corporal e linhas de crescimento axiais claras. Os tentáculos são longos com olhos basais (Figura 1A) (MARTINS, 1996).

M. coffeus vive sobre o substrato e nas árvores de mangue, onde realiza um processo de migração vertical diária, uma vez que os indivíduos adultos necessitam subir nos troncos para não se afogarem com a subida da maré depois de terem se alimentado no substrato durante a maré baixa (Figura 1B) (MAIA & TANAKA, 2007; PROFITT & DEVLIN, 2005). Esses organismos se alimentam de detritos vegetais, preferencialmente de folhas de mangue, o que os tornam importantes componentes da cadeia alimentar desse ecossistema (PROFITT & DEVLIN, 2005; PROFFITT *et al*, 1993; RAULERSON, 2004). Em muitas regiões é considerado o principal macrodetritívoro existente, sendo responsável pela degradação da maior parte da matéria orgânica vegetal que posteriormente será exportada para os ecossistemas adjacentes (MCKEE & FAULKNER, 2000; MOOK, 1986; RAULERSON, 2004).

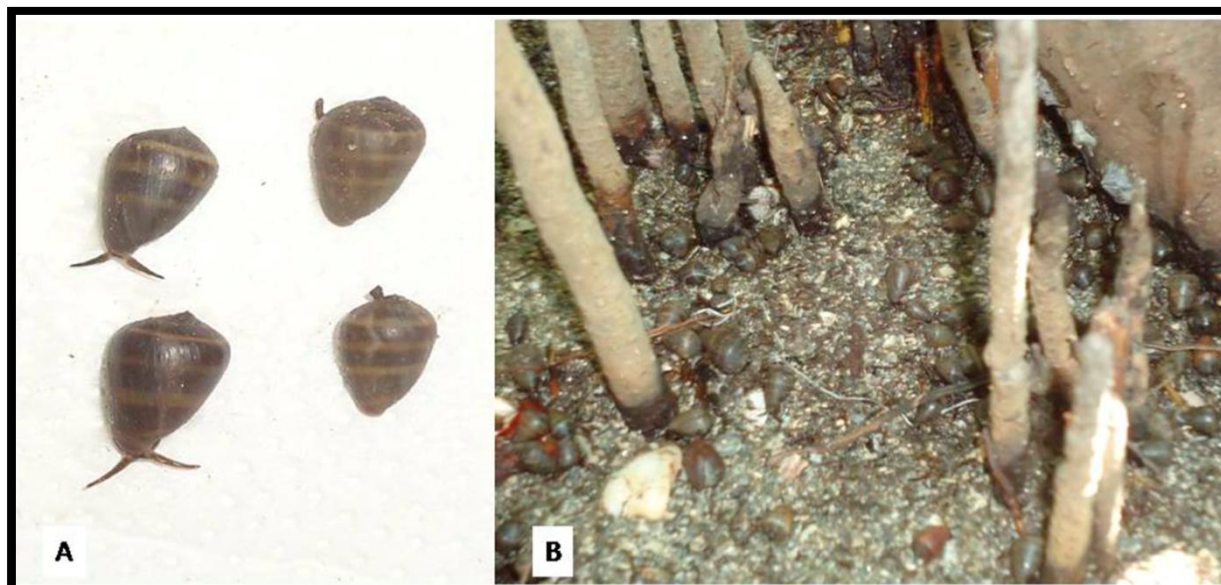


Figura 1 – Espécimes de *Melampus coffeus* encontrados nos estuários cearenses. Legenda: A. exemplares de *M. coffeus*; B. indivíduos se alimentando no substrato durante a maré baixa.

Maia (2010) sugere que o *M. coffeus* pode ser usado para avaliar o estado de degradação dos manguezais, principalmente com relação ao grau de desmatamento já que sua existência estaria condicionada à presença dessas árvores, tanto para refúgio contra afogamento como recurso alimentar, através da produção de serrapilheira, funcionando como um bioindicador.

Durante os últimos anos, os biólogos perceberam que eficientes estratégias de conservação exigem não apenas os dados ecológicos, mas também o conhecimento da estrutura geográfica das populações, onde marcadores moleculares são uma ferramenta importante para identificar unidades populacionais que merecem gestão separada com alta prioridade para conservação (CATAUDELLA *et al*, 2010).

Entende-se por população o grupo de indivíduos de uma espécie que convivem em uma determinada área geográfica num dado tempo (TOWNSEND *et al*, 2006). Cada população apresenta uma estrutura própria, que é resultado de características intrínsecas da espécie, de fatores ambientais e de interações intra e interespecíficas (RICKLEFS & MILLER, 2000). A população é uma unidade importante no estudo da Ecologia, uma vez que evolui e se adapta ao ambiente, comportando-se de forma dinâmica no ecossistema (BEGON *et al*, 2006). Tornando

assim importante os estudos das unidades populacionais para sua maior compreensão.

Considerando a importância ecológica do molusco *Melampus coffeus* no ecossistema manguezal, seu potencial como bioindicador e sua distribuição em estuários submetidos a diversos níveis de pressão antrópica, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar a diversidade genética de suas populações ao longo de toda a costa Cearense.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a variabilidade e o grau de diferenciação genética das populações de *Melampus coffeus* ao longo da costa Cearense.

2.2 Objetivos específicos

- Estimar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de *M. coffeus* em estuários do Ceará.
- Inferir o passado demográfico e o grau de estruturação genética entre as diferentes populações.
- Identificar o nível de diferenciação genética dos organismos cearenses com espécimes da Flórida e Porto Rico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O estado do Ceará possui uma área de 148016 km², com cerca de 570 km de extensão da linha de costa, sendo 182,25 km² de área de manguezais (SEMACE, 2006). Em todo o estado, são encontradas quatro bacias hidrográficas principais e onze complementares. Dos rios que compõem essas bacias, 22 desembocam no mar, formando no litoral, zonas estuarinas ocupadas pela vegetação de mangue (IBAMA, 2005; SEMACE, 2006). A coleta dos espécimes de *Melampus coffeus* foi realizada nos três estuários da região metropolitana de Fortaleza (Rios Ceará, Cocó e Pacoti) e nos estuários dos Rios Guriú, Acaraú e Barra Grande. Os critérios utilizados para escolha dos locais de coleta foram: localização, ambientes que sofrem impactos negativos e, principalmente, por haver dados morfológicos e ambientais de *M. coffeus* nesses locais.

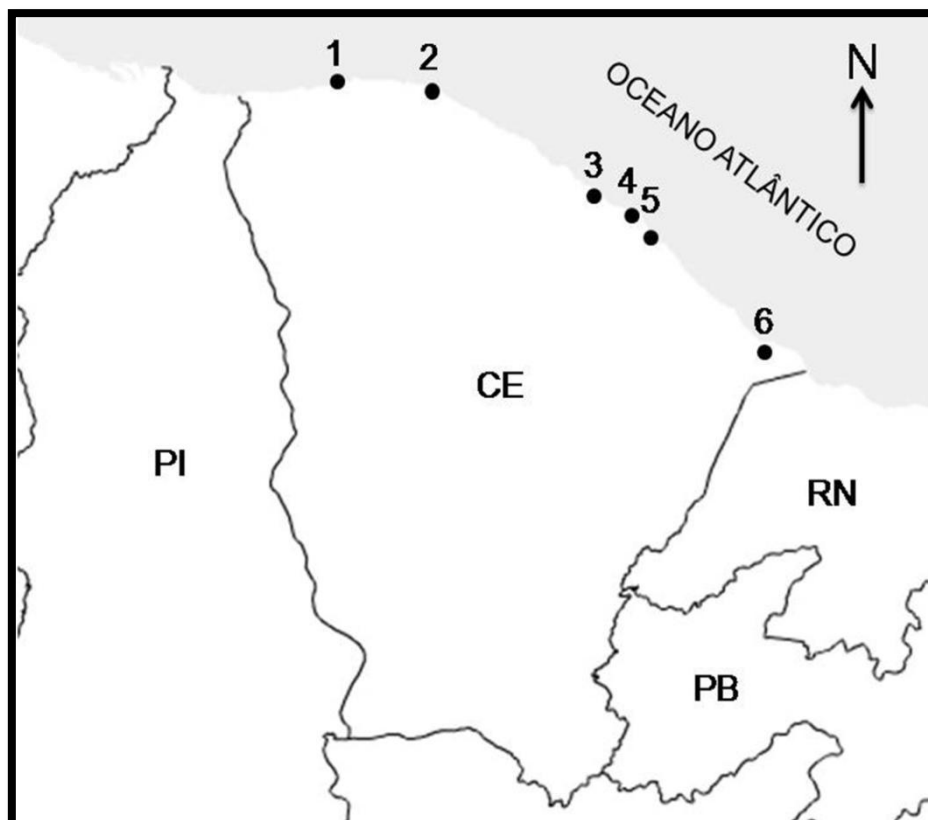


Figura 2 – Mapa do Ceará indicando os manguezais onde foram realizadas as coletas. Legenda: 1. Guriú, 2. Acaraú, 3. Ceará, 4. Cocó, 5. Pacoti e 6. Barra Grande.

O Estuário do Rio Guriú (02°52'S; 40°34'W) está localizado na divisa dos municípios de Jijoca de Jericoacoara e Camocim, no litoral oeste do estado do Ceará, distante cerca de 300 km de Fortaleza. O Rio Acaraú (02°49'S; 40°05'W) nasce na serra das matas, na região centro-oeste do Ceará, se estende por 315 km no sentido sul-norte e desemboca no Oceano Atlântico, no município de Acaraú. O Rio Ceará (03°44'S; 38°37'W) nasce na serra de Maranguape e percorre cerca de 60 km até desaguar no Oceano Atlântico. Na sua foz, é encontrado o manguezal com área de 11,58 km² distribuído entre os municípios de Fortaleza e Caucaia (MARTINS, 2002). O Rio Cocó (03°46'S; 38°26'W) nasce na serra de Aratanha, no município de Pacatuba, e deságua em Fortaleza nas proximidades da Praia do Futuro. O Rio Pacoti (03°49'S; 38°25'W) é o maior dos cursos d'água que atravessa a região metropolitana de Fortaleza percorrendo cerca de 150 km desde sua nascente na serra de Baturité até desembocar no mar (OLIVEIRA *et al*, 1988). O Estuário de Barra Grande, na foz do Rio Arrombado, está localizado na cidade de Icapuí (04°42'S; 37°21'W), no extremo leste do estado do Ceará e distante 200 km de Fortaleza.

3.2 Coleta e obtenção do material genético

Em cada estuário foram coletados, manualmente, 30 indivíduos de *M. coffeus* que se encontravam no substrato ou sobre o tronco das árvores do mangue. Em seguida foram acondicionados em caixa térmica e levados vivos ao Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Em laboratório, foi retirado um pedaço de tecido do pé de cada indivíduo, com uso de material devidamente esterilizado, e colocados em tubos Eppendorf contendo Álcool Etílico a 95% v/v e mantidos a baixas temperaturas para preservação do material genético.

A extração do DNA total foi feita seguindo um protocolo incluindo o detergente catiônico CTAB e digestão por proteinase K (modificado de HOELZEL *et al*, 1998). O processo se iniciou com o descarte do álcool que conserva o tecido e

posterior lavagem da amostra com solução TE 1x (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8,5) por 5 minutos para eliminação de resíduos de Álcool. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e, no mesmo tubo, adicionou-se 700 µL do tampão de lise (TE 1x e SDS 20%, em proporção de 19:1) e 30 µL de proteinase K a 10 mg/ml. Logo após, o tecido foi macerado de forma mecânica, e se incubou em banho-maria a 65 °C por 1 hora. A seguir, foi adicionado 700 µl da solução CTAB 10% (Brometo de Cetiltrimetilamônio) com NaCl 5 M em proporção de 1:1 e incubado em banho-maria a 55 °C por 1 hora. Com todo tecido digerido, homogenizou-se a solução e posterior descarte de 700 µl da mesma e adição de igual volume de Clorofórmio: Álcoolisoamílico (24:1). Centifugou-se por 5 minutos a 20.000 g em temperatura ambiente. Repetiu-se esse procedimento até o sobrenadante ficar claro. Em seguida, foi transferida a parte superior da solução bifásica com uma ponteira de 1.000 µl, sem encostar a ponteira na interface, para um novo tubo Eppendorf de fundo cônico. Foi adicionado 700 µl de Álcool Isopropílico e centrifugado por 5 minutos a 10.000g em uma temperatura de 4°C. Foi descartado o sobrenadante e o precipitado depositado no fundo do tubo foi lavado com 500 µl de Etanol 70 % por centrifugação a 1.300 g a 4 °C por 15 minutos. Eliminar o sobrenadante e deixar o tubo aberto a temperatura ambiente por 20 minutos para evaporação do etanol residual. Decorrido o tempo, o DNA total extraído foi ressuspendido com 100 µl de TE 1x.

As reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram conduzidas com os reagentes nas concentrações finais de 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂, Tampão proprietário pH 8,5, 0,5 µM de cada *primer* resultando em um volume de 10 µL. Para as amplificações foi utilizada um termociclador modelo Techne TC-512. Os *primers* utilizados foram HCO 2198 - (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) e LCO 1490 - (GGTCAACAATCATAAAGATATTGG) (FOLMER *et al*, 1994). As condições para amplificação foram: desnaturação inicial por 5 min a 94 °C; 30 ciclos divididos em desnaturação (40 s a 94 °C), anelamento (1 min a 48 °C) e extensão (1 min a 72 °C); extensão final por 10 min a 72 °C. A confirmação da amplificação do gene *COI* foi feita através da eletroforese em gel de agarose a 1% contendo Brometo de Etídio, seguida de visualização sob o ultravioleta em transiluminador

O seqüenciamento foi realizado diretamente a partir dos produtos de PCR não purificados, com o uso do conjunto de seqüenciamento Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies) em reações de 10 uL seguindo as instruções do fabricante. O resultado do seqüenciamento por ciclagem foi lido no equipamento ABI 3100 do Núcleo de Genômica e Bioinformática, da Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará.

3.3 Análise molecular

As seqüências foram alinhadas e editadas para obtenção da seqüência consenso usando o algoritmo Clustal W contido no programa MEGA versão 5 (TAMURA *et al*, 2011). Os índices de diversidade molecular (número de haplótipos e sítios polimórficos, diversidade haplotípica e nucleotídica) foram obtidos através do programa DnaSP versão 5 (LIBRADO & ROZAS, 2009). Os testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu, AMOVA e *mismatch distribution* foram realizados através do programa Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER *et al*, 2005). A análise da diferença entre as populações a partir da comparação das seqüências feitas par a par foi realizada no programa MEGA versão 5 (TAMURA *et al*, 2011). Uma rede de haplótipos foi construída através do programa Network 4.6.1.0 (BANDELT *et al*, 1999) para facilitar a visualização do relacionamento entre os haplótipos e como esses estão distribuídos nos diferentes estuários.

As análises foram realizadas em duas esferas. A primeira a nível local onde foram consideradas na análise somente as seqüências oriundas dos estuários Cearenses e os manguezais foram divididos em três grupos, baseado na localização geográfica. A segunda foi a comparação entre os exemplares do Ceará e amostras da costa da Flórida - EUA e Porto Rico (DENNIS & HELLBERG, 2010), disponíveis publicamente no sítio GenBank. Os códigos de acesso referentes a estas seqüências estão catalogadas no anexo A.

O número de haplótipos foi estabelecido por contagem direta. A diversidade gênica ou diversidade haplotípica (H_d) se trata da probabilidade de duas seqüências escolhidas aleatoriamente de uma população serem diferentes (LI, 1997). A diversidade de nucleotídeos (π) foi computada como sendo a probabilidade

de que dois nucleotídeos homólogos escolhidos ao acaso sejam diferentes entre si (NEI, 1987; TAJIMA, 1983).

A existência de estruturação genética entre as populações foi testada através da análise de variância molecular (AMOVA) com todos os trechos agrupados em três níveis hierárquicos: entre grupos, entre populações dentro dos grupos e entre as populações. Foi calculada ainda a distância entre pares de populações baseada nas diferenças entre as mesmas a partir do valor de F_{ST} . A matriz de distância foi calculada entre todas as populações através do método de distância pareada (*pairwise difference*) baseada na diferença nucleotídica entre as sequências das populações.

Com relação às amostras da Flórida e Porto Rico foi feita uma separação das populações a partir dos locais de coleta cedidos pela depositante das sequências no GenBank. Considerando-se assim cinco populações: Matheson Hammock, Sarasota, Bonita Beach, Downtown Naples e Porto Rico.

A história demográfica das populações foi inferida através da análise de diferenças pareadas (*mismatch distribution*) (ROGERS & HARPENDING, 1992; SLATKIN & HUDSON, 1991), a qual é baseada no número de diferenças observadas entre todos os pares de sequências e representada pela frequência da distribuição destas diferenças. Esta distribuição apresenta padrões gráficos que caracterizam diferentes tipos de histórias demográficas. Segundo simulações, populações em equilíbrio demográfico longo e estável devem apresentar um padrão multimodal, enquanto que populações que experimentaram uma expansão recente apresentam geralmente uma distribuição unimodal (ROGERS & HARPENDING, 1992; SLATKIN & HUDSON, 1991). Gargalos populacionais são representados por distribuições próximas a zero ou bimodais e contato secundário entre populações que estiveram isoladas por longos períodos também é representado por um padrão bimodal (FRANKHAM *et al*, 2004).

Foram realizados os testes de neutralidade seletiva de Tajima (1989) e Fu (1997), que tem por fundamento testar o equilíbrio entre a perda de alelos por deriva e o aporte causado por mutações. Ambos os testes são baseados no modelo de sítios infinitos (*infinite-site model*) sem recombinação, apropriados para sequência de pequenos fragmentos de DNA (FU, 1997). O teste de Tajima (1989) compara

duas estimativas do parâmetro de mutação θ independentemente. A primeira estimativa é obtida através do número de sítios polimórficos e a segunda a partir da média da distribuição dos pares de diferenças. Já Fu (1997) compara o número observado de alelos com o de alelos esperados, caso a população se mantivesse constante.

4 RESULTADOS

Foram sequenciados fragmentos do DNA mitocondrial correspondente ao gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (*COI*), resultando em um conjunto de dados contendo 138 sequências com 426 pares de bases cada.

As sequências apresentaram 92 mutações, sendo 68 transições, substituições de purina por purina (adenina e guanina) ou pirimidina por pirimidina (citosina e guanina), e 24 transversões, substituições de purina por pirimidina. Não houve deleções.

Ao longo da sequência analisada foram identificados 77 sítios polimórficos, que representa 18% do total de sítios (Anexo B). Sendo que, dos locais onde houve substituições de nucleotídeos, 10 foram na primeira posição do códon, 1 na segunda e as demais na terceira posição, significando 86% do total. Apenas três substituições resultaram em mudança de aminoácido. No estuário do Guriú a mudança do aminoácido treonina por alanina foi resultado da substituição de nucleotídeo ocorrida na primeira posição do códon que, baseado no gene *COI* humano, corresponde à posição 110. No Cocó, a substituição ocorrida na primeira posição do códon resultou na mudança de leucina por isoleucina e a ocorrida na segunda posição substituiu a alanina por valina. Nesse estuário, as mudanças ocorreram nas posições 44 e 73 do gene *COI* humano, respectivamente.

Foram encontrados 81 haplótipos para as 138 sequências, com diversidade haplotípica de 0,894 e nucleotídica de 0,00528. A distribuição dos haplótipos entre os estuários ocorreu, na sua maioria, de forma exclusiva, onde 73 haplótipos apareceram somente uma vez e estes se apresentaram interligados, independente do estuário de origem. O haplótipo1 foi o que ocorreu com maior frequência, aparecendo 45 vezes nas seguintes quantidades entre os estuários: 6 no Guriú, 4 no Acaraú, 6 no Ceará, 10 no Cocó, 11 no Pacoti e 8 no Barra Grande. Os demais haplótipos apresentaram frequência não superior a três e distribuídos no máximo em três estuários (Figura 3).

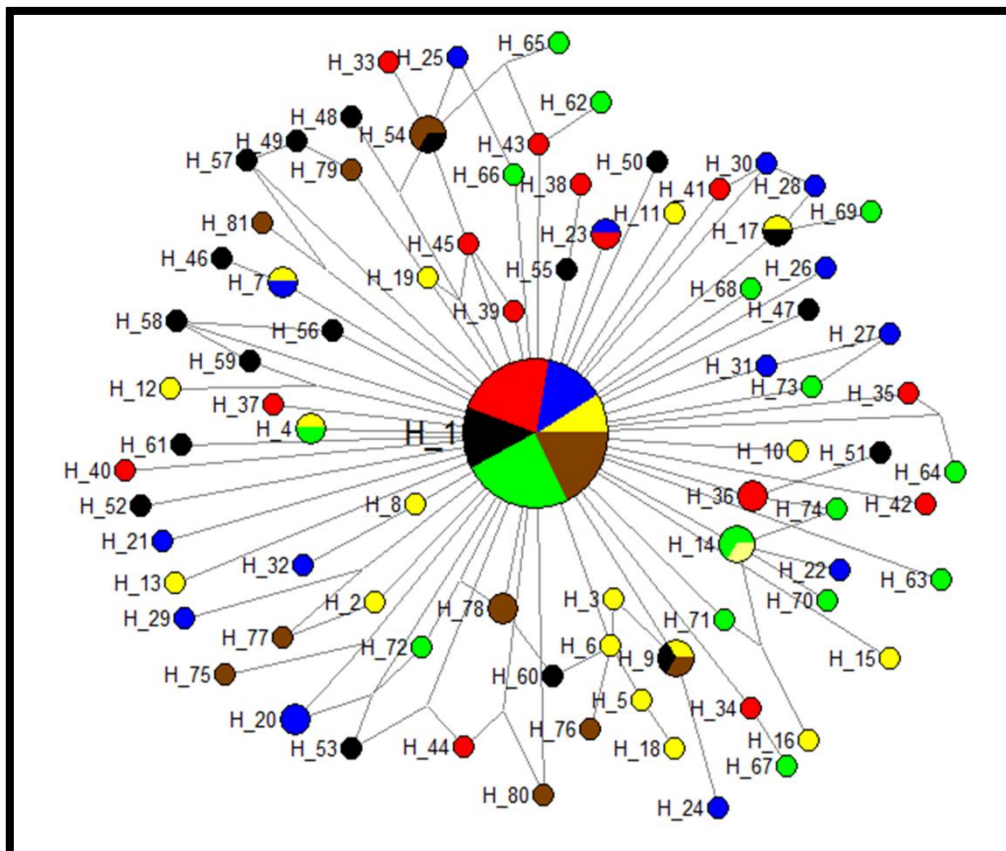


Figura 3 - Rede de haplótipos dos exemplares de *M. coffeus* analisados no Ceará. Legenda: As cores dos círculos indicam a origem do haplótipo. Amarelo=Acaraú, Preto=Guriú, Azul=Ceará, Vermelho=Cocó, Verde=Pacoti, Marron=Barra Grande. O diâmetro do círculo indica a proporção de ocorrência.

Baseado nas localizações geográficas dos estuários, foram considerados três grupos: o primeiro com os estuários do Guriú e Acaraú; o segundo com o Ceará, Cocó e Pacoti; o terceiro com o estuário de Barra Grande. Realizando a distribuição dos haplótipos que ocorreram com frequência superior a um, observou-se que não houve isolamento dos haplótipos entre os grupos. Os grupos 1 e 3, apesar DAE uma distância geográfica maior, apresentaram três haplótipos em comum, os de número 1, 9 e 54. Os grupos 1 e 2 tiveram os haplótipos 1, 7 e 14 em comum entre eles. A distribuição desses haplótipos está apresentada na figura 4.

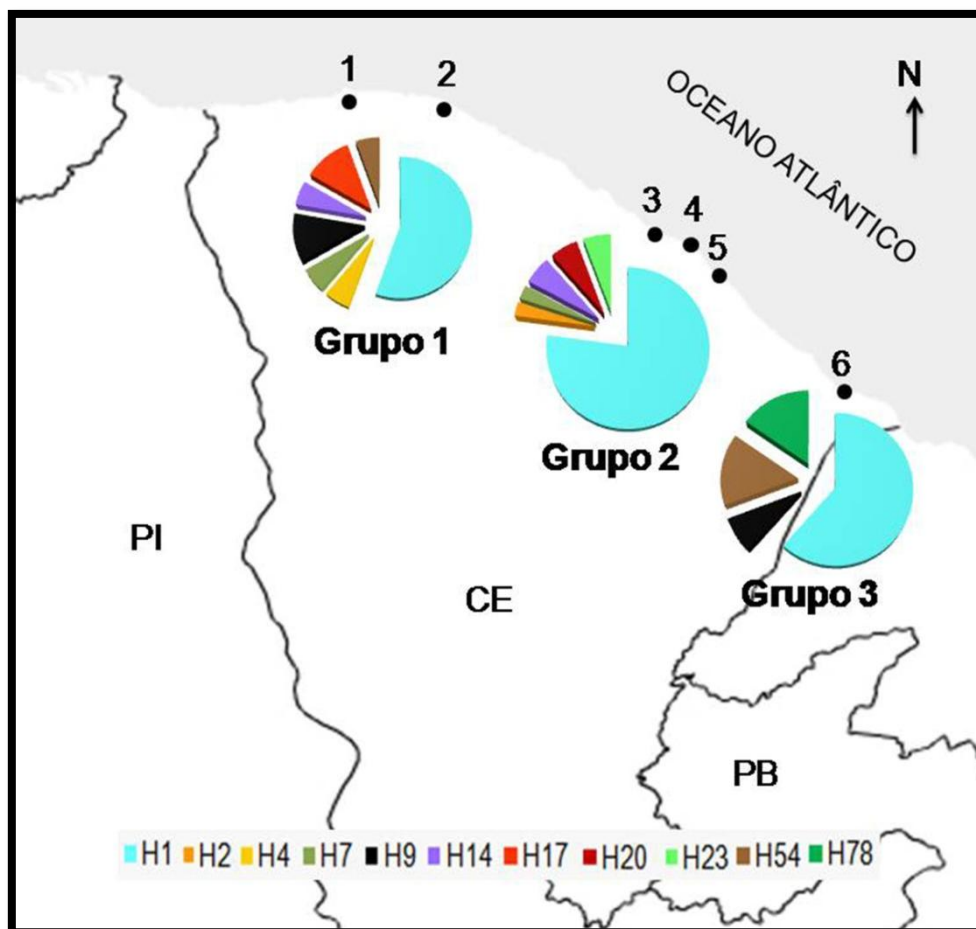


Figura 4 – Distribuição dos haplótipos com freqüência maior que um entre os grupos. Legenda: Grupo 1 – 1. Guriú e 2. Acaraú; Grupo 2 – 3. Ceará, 4. Cocó e 5. Pacoti; Grupo 3 – 6. Barra Grande.

O estuário do Rio Guriú teve 24 indivíduos de *M. Coffeus* analisados com ocorrência de 19 haplótipos e 0,946 de diversidade haplotípica. As sequências nesse estuário apresentaram 23 sítios polimórficos e 25 substituições nucleotídicas.

Em Acaraú, fez-se a análise de 22 indivíduos e constatou-se a presença de 19 haplótipos com diversidade haplotípica de 0,974. Esse estuário teve em suas sequências 19 sítios polimórficos e substituições nucleotídicas.

No estuário do Rio Ceará obteve-se 15 haplótipos e diversidade haplotípica de 0,924 em 21 sequências analisadas. Ocorreram 26 substituições nucleotídicas e presença de 24 sítios polimórficos.

O estuário do Rio Cocó teve 25 sequências analisadas com 15 haplótipos encontrados e diversidade haplotípica de 0,847. Os sítios polimórficos e as substituições nucleotídicas foram 20.

Do Rio Pacoti obteve-se 27 sequências onde ocorreram 16 haplótipos e diversidade haplotípica de 0,840. Foram detectados 26 sítios polimórficos e 27 substituições nucleotídicas.

No estuário de Barra Grande foram analisadas 19 sequências e se encontrou 10 haplótipos com diversidade haplotípica de 0,825. As substituições nucleotídicas ocorreram em 16 sítios e foram 17 no total. Os resultados dos índices de diversidade molecular estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1 - Índices de diversidade molecular das populações Cearenses. Legenda: N: nº de sequências; h: nº de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; π : diversidade nucleotídica; S: sítios polimórficos; Ts/Tv: Transições/Transversões.

	<i>Guriú</i>	<i>Acaraú</i>	<i>Ceará</i>	<i>Cocó</i>	<i>Pacoti</i>	<i>Barra Grande</i>
<i>N</i>	24	22	21	25	27	19
<i>h</i>	19	19	15	15	16	10
<i>Hd</i>	0,946	0,974	0,924	0,847	0,840	0,825
π	0,00541	0,00536	0,00661	0,00411	0,00546	0,00464
<i>S</i>	23	19	24	20	26	16
<i>Ts/Tv</i>	19/6	17/2	21/5	14/6	22/5	14/3

O teste AMOVA revelou que a estruturação genética entre as populações foi baixa, que constatou-se pelo índice de fixação $F_{ST}=0,00690$ com valor estatístico $p=0,02$. Os resultados desta análise também demonstraram que a maior parte da variação genética ocorrida está distribuída dentro das populações com 99,31% do total das variações.

A comparação par a par do valor de F_{ST} de todas as populações foram analisados com o objetivo de verificar se as populações apresentam alguma estruturação genética em comparação entre elas. Foram obtidas diferenças significativas somente entre os estuários do Acaraú e Cocó e entre o Guriú e Pacoti, porém com índices bastantes baixos para todas (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação em pares dos valores dos índices de fixação (F_{ST}) das populações cearenses. Os valores em negrito indicam resultado significativo com $p<0.05$.

	<i>Acaraú</i>	<i>Ceará</i>	<i>Cocó</i>	<i>Guriú</i>	<i>Pacoti</i>
<i>Ceará</i>	0,0145	-			
<i>Cocó</i>	0,0199	0,0069	-		
<i>Guriú</i>	0,0061	0,0039	-0,0008	-	
<i>Pacoti</i>	0,0123	0,0047	0,0038	0,0101	-
<i>Barra Grande</i>	0,0108	0,0005	0,0043	-0,0100	0,0102

A diferença entre as populações obtida através do número de substituições apresentou valores baixos que variaram entre 0,004 e 0,006, indicando baixo grau de divergência entre os estuários (Tabela 3).

Tabela 3 - Número médio da diferença das sequências comparadas par a par entre as populações do estado do Ceará.

	<i>Acaraú</i>	<i>Ceará</i>	<i>Cocó</i>	<i>Guriú</i>	<i>Pacoti</i>
<i>Ceará</i>	0,006				
<i>Cocó</i>	0,005	0,005			
<i>Guriú</i>	0,005	0,006	0,005		
<i>Pacoti</i>	0,006	0,006	0,005	0,006	
<i>Barra Grande</i>	0,005	0,006	0,004	0,005	0,005

Através dos gráficos gerados a partir dos dados obtidos pela análise *mismatch distribution* observou-se que as populações, tanto para os estuários separados (Gráfico 1) como para todas as sequências juntas (Gráfico 2), possivelmente estão passando por um processo de expansão demográfica, evidenciada pela visualização dos gráficos que apresentaram tendência de distribuição unimodal e com valores médios de diferenças baixos em todos os estuários.

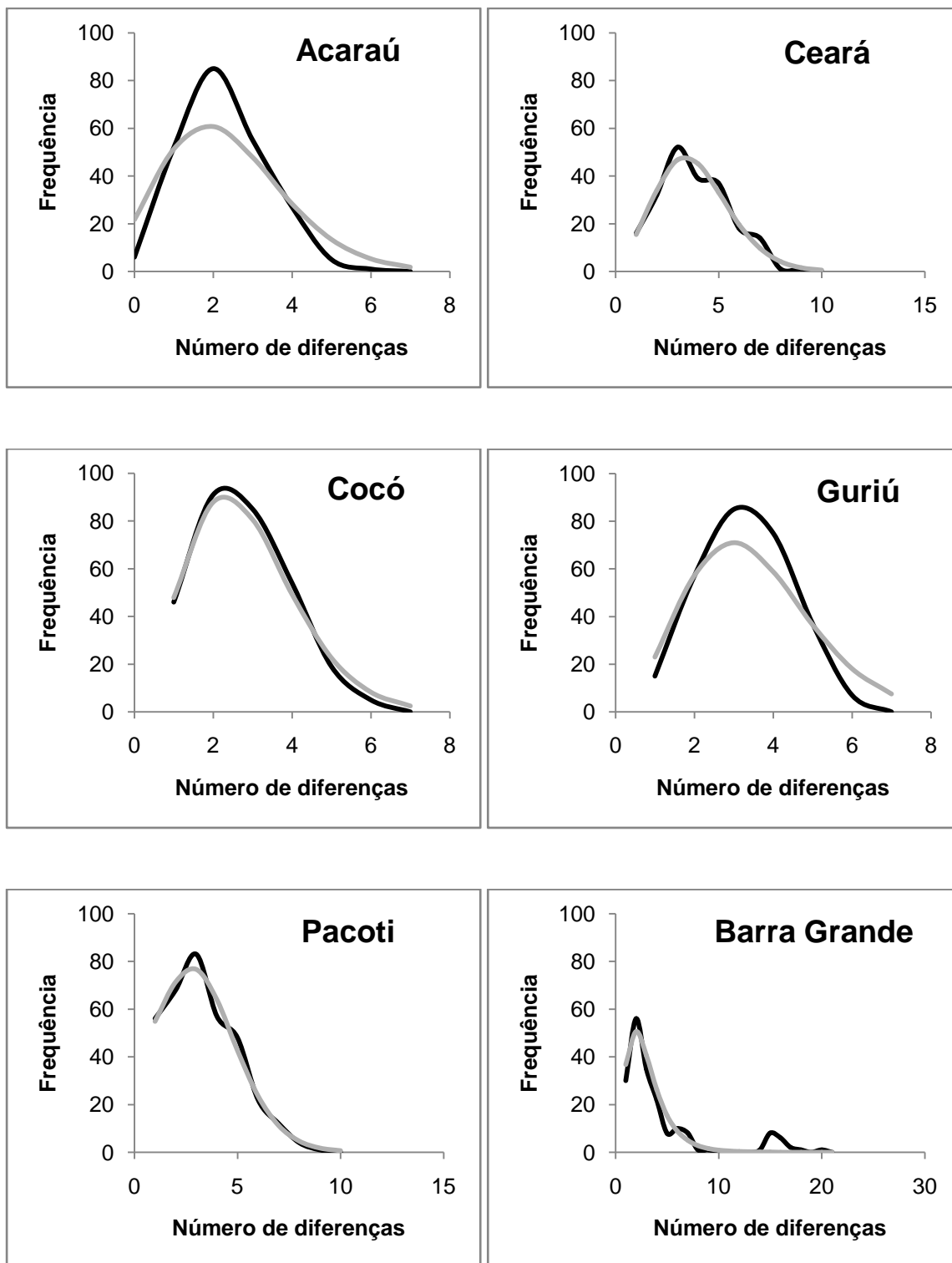


Gráfico 1 – Distribuição de frequência das diferenças em pares (*mismatch distribution*) das populações Cearenses. Legenda: linha em cinza indica tendência modelo linha em preto indica tendência obtida pelos valores da análise.

Alinhando as sequências de *M. coffeus* encontrados no Ceará com as disponíveis no GenBank, provenientes da Flórida e Porto Rico, obteve-se uma sequência consenso contendo 387pb. Onde no total foi gerado um banco de dados com 182 sequências.

Foram encontrados 107 haplótipos com diversidade haplotípica de 0,925 e diversidade nucleotídica de 0,0612. A sequência apresentou 111 sítios polimórficos e ocorreram 152 substituições nucleotídicas (Anexo C).

Através da AMOVA se observou que a variação ocorreu na sua maioria entre os grupos, com 84,80% do total da variação, e com 14,75% da variação ocorrendo entre as populações.

Comparando os valores de F_{ST} das populações de forma pareada obteve-se resultados que variaram de 0,581 a 0,973 indicando um alto grau de diferenciação entre as populações Cearenses e da Flórida e Porto Rico (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação em pares dos valores dos índices de fixação (F_{ST}) das populações Cearenses, da Flórida e Porto Rico. Os valores em negrito indicam resultado significativo com $p < 0.05$.

	<i>Acaraú</i>	<i>Ceará</i>	<i>Cocó</i>	<i>Guriú</i>	<i>Pacoti</i>	<i>Barra Grande</i>
<i>M. Hammock</i>	0,965	0,961	0,973	0,765	0,966	0,972
<i>Sarasota</i>	0,820	0,810	0,843	0,595	0,840	0,816
<i>Bonita</i>	0,822	0,810	0,846	0,581	0,842	0,818
<i>D. Naples</i>	0,887	0,879	0,902	0,691	0,898	0,887
<i>Porto Rico</i>	0,887	0,880	0,902	0,696	0,898	0,887

Com os valores obtidos pelo número médio das diferenças entre as sequências, que variaram entre 0,159 e 0,184, foi possível observar um grau intermediário de diferenciação entre as duas localidades (Tabela 6).

Tabela 6 - Número médio da diferença das sequências comparadas par a par entre as populações do estado do Ceará e as da Flórida e Porto Rico.

	<i>Acaraú</i>	<i>Ceará</i>	<i>Cocó</i>	<i>Guriú</i>	<i>Pacoti</i>	<i>Barra Grande</i>
<i>M. Hammock</i>	0,182	0,183	0,184	0,183	0,183	0,183
<i>Sarasota</i>	0,161	0,161	0,162	0,162	0,162	0,162
<i>Bonita</i>	0,159	0,159	0,160	0,160	0,159	0,160
<i>D. Naples</i>	0,175	0,175	0,176	0,176	0,176	0,176
<i>Porto Rico</i>	0,173	0,174	0,174	0,174	0,174	0,174

O padrão de distribuição do gráfico *mismatch distribution* apresentou uma tendência multimodal, onde indica que os organismos passam por um equilíbrio estável ao longo do tempo (Gráfico 3). Os testes de neutralidade apresentaram valores distintos. O D de Tajima apresentou valor positivo e não significativo o que sugere estabilidade populacional, já o Fs de Fu apresentou valor negativo e significativo que indica população em fase de expansão.

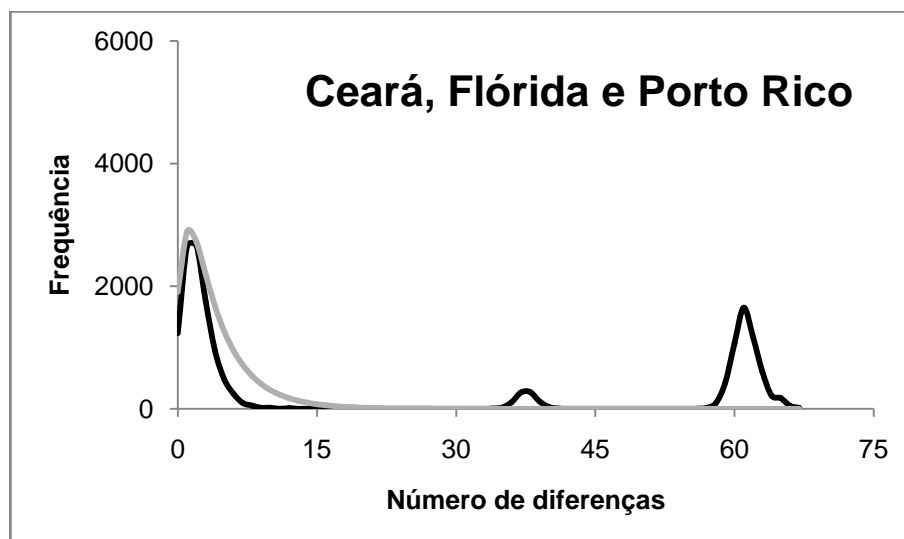


Gráfico 3 - Distribuição da frequência das diferenças em pares (*mismatch distribution*) das sequências provenientes do Ceará, Flórida e Porto Rico. Legenda: linha em cinza indica tendência modelo; linha em preto indica tendência obtida pelos valores da análise.

Os haplótipos usados para a construção da rede foram os que apresentaram frequência igual ou superior a dois para que se tornasse possível a visualização clara e passível de interpretação.

A rede de haplótipos mostrou a formação de dois grupos, um formado pelos haplótipos encontrados no Ceará e outro formado pelos haplótipos oriundos da Flórida e Porto Rico sendo possível detectar uma clara diferenciação entre os grupos. No ramo principal, que liga o grupo do Ceará com o Norte, foi observado um elevado número de substituições, no mínimo 33, indicando que as sequências pertencentes aos dois grupos são bastantes diferentes (Figura 5).

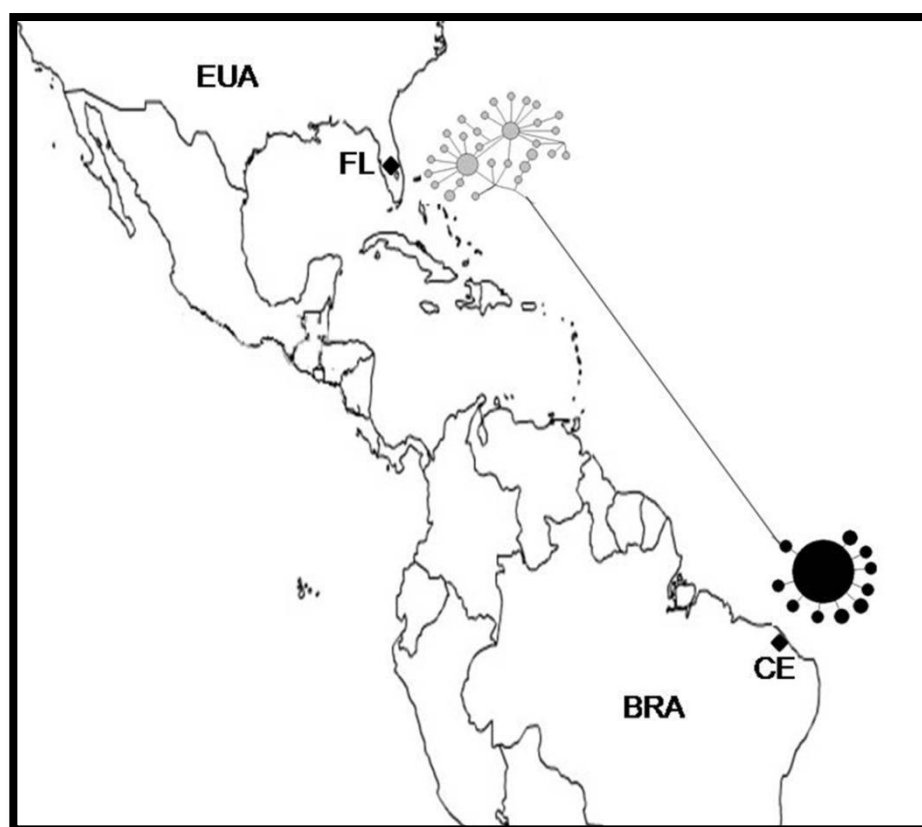


Figura 5 - Rede de haplótipos originários da Flórida, Porto Rico e os mais abundantes no Ceará. Legenda: Círculo preto: Ceará; Círculo cinza: Flórida e Porto Rico. O tamanho do círculo indica a frequência de ocorrência.

5 DISCUSSÃO

Maia (2010) em seu trabalho sobre a caracterização estrutural de manguezais do estado do Ceará identificou-os como sendo pouco desenvolvidos. Mesmo tendo baixo grau de desenvolvimento, os manguezais cearenses apresentam diferentes graus. Os bosques passam durante seu desenvolvimento de uma fase em que o terreno está ocupado por uma grande densidade de árvores e de diâmetro reduzido, como é o caso dos manguezais do Ceará, Acaraú e Guriú, a uma fase de maior amadurecimento, quando o mesmo é composto por poucas árvores de grande porte e volumoso como no manguezal do Cocó. Os manguezais dos estuários de Barra Grande e Pacoti estariam em uma fase intermediária desse processo. A composição específica também é diferente entre os locais, onde os manguezais do Ceará e Cocó apresentam a substituição de *Rhizophora mangle*, que é a espécie mais comum nos manguezais cearenses, por *Avicennia schaueriana*.

Maia (2010) constatou que *M. coffeus* apresenta maior tamanho e abundância em locais onde houve uma maior disponibilidade de recursos alimentares e abrigo e também em locais em que *R. mangle* é mais predominante, ou seja, a morfologia da concha e a densidade de *M. coffeus* variam entre os diferentes manguezais cearenses e essa distribuição parece estar fortemente relacionada com estrutura vegetal do habitat.

Apesar dos estuários apresentarem características diferentes que fez com que o *M. coffeus* apresentasse variações morfológicas, essas variações não foram encontradas em nível genético-molecular. Os valores de estruturação gênica apresentaram índices baixos de fixação entre os estuários cearense. Também não foi observada diferença entre os estuários na análise de comparação em pares do valor de F_{ST} , onde somente as comparações Cocó/Acaraú e Pacoti/Guriú apresentaram dados significativos com índices baixos indicando que os estuários são geneticamente iguais. Juntamente com os resultados das comparações par a par do índice de estruturação genética entre cada localidade e o F_{ST} para todas as sequências reforça o fato de que os exemplares encontrados ao longo da costa cearense estão incluídos em uma única população.

Por último constatou-se que as variações entre as sequências ocorreram na sua maioria dentro dos estuários. E que as diferenças nucleotídicas comparadas par a par entre os estuários apresentaram valores baixos. Espécimes de *M. coffeus* coletados na Flórida, Panamá, Curacao e Porto Rico apresentaram índices baixos de distância genética, supostamente os organismos do gênero *Melampus* são capazes de se dispersarem em longa distância (DENNIS & HELLBERG, 2010).

Supõe-se então que, apesar de existirem diferenças ambientais nos manguezais e variações morfológicas no *M. coffeus*, as mesmas não se refletiram em nível molecular onde as diferenças ocorridas foram de maneira fenotípica, possivelmente, por conta de não ter ocorrido tempo suficiente de exposição às condições diversas dos estuários para que ocorresse um padrão de diferenciação das populações nos manguezais a nível genético. Conclui-se que nos estuários estudados são encontrados indivíduos geneticamente semelhantes. Isso pode ser considerado um fator positivo para o uso de *M. coffeus* como bioindicador, já que as alterações fenotípicas agem primeiro que as genéticas, o que torna possível a tomada de medidas para preservação e conservação do habitat onde esses organismos apresentaram alterações.

A genética de populações de organismos marinhos com desenvolvimento larval pelágico tem sido caracterizada pela baixa diferenciação genética entre as mesmas, padrão este impulsionado pela alta capacidade de dispersão larval e uma possível mistura oceanica em larga escala (REICHOW & SMITH, 2001; RIVERA *et al*, 2004). No entanto, no complexo de moluscos, a existência de ambas as fases larval planctônica e fase adulta sésil torna difícil prever o grau de estruturação genética da população e o nível de fluxo gênico (KATSARES *et al*, 2008). Essas características podem explicar o baixo grau de diferenciação do *M. coffeus*.

Resultado similar foi encontrado por Gharbi *et al*, (2010) analisando o padrão de estruturação genética do bivalve *Ruditapes decussatus* ao longo da costa tunisiana usando os genes *COI* e *ITS1*, constatando um baixo grau de diferenciação entre as populações e que as diferenças ocorreram na sua maioria dentro das mesmas com 93% do total. Em outro trabalho feito com o pulmonado terrestre *Cryptozона siamensis* as suas populações apresentaram F_{ST} baixo e distância genética baixa o que sugere freqüentes fluxos bidirecionais de genes entre

populações de *C. siamensis* (PRASANKOK & PANHA, 2011). Indicando que os índices aqui usados para diferenciação genética nos dão resultados significativos.

Os organismos analisados apresentaram alto grau de polimorfismo, porém com os valores das substituições nucleotídicas entre as sequências baixas, indicando que as sequências entre os estuários são parecidas. Segundo Grant & Bowen (1998), valores baixos de diversidade nucleotídica são evidências de gargalos populacionais ou de eventos fundadores recentes.

O número de sítios polimórficos foi alto dentro de cada estuário, variando entre 16, em Barra grande, e 26, no Pacoti, quando comparadas com o número de espécimes analisados, 19 e 27 respectivamente. Apesar de estes dois estuários apresentarem graus de desenvolvimento igual e características estruturais semelhantes, os espécimes apresentaram um elevado grau de variação nas sequências dentro dos estuários. O número médio de substituições entre as sequências dentro de cada estuário foi de 1,75 no Cocó a 2,81 no Pacoti. O fato de serem estruturalmente distintos, os valores extremos de π não foram distantes, onde a variação ocorreu em um grau moderado indicando que as diferenças entre os estuários foram pequenas.

O número total de haplótipos e de diversidade haplotípica foi alta demonstrando uma alta variabilidade genética entre todas as sequências. A variabilidade intrapopulacional também foi alta, com valores de diversidade haplotípica variando de 0,825, em Barra Grande, a 0,974, em Acaraú. Dennis & Hellberg (2010) estudando a espécie co-gênera *M. bidentatus* na costa leste dos Estados Unidos encontrou valores de Hd elevados, nesse mesmo trabalho ele evidenciou um elevado grau de variação dentro das populações.

Diversos fatores podem explicar o alto grau de variabilidade genética entre populações, tais como o tamanho da população elevado, características da história de vida, heterogeneidade ambiental, distribuição geográfica. Que vem sendo observados para algumas espécies de moluscos (JOSÉ & SOLFERINI, 2007).

Os haplótipos ocorreram na sua maioria de forma exclusiva, porém o Haplótipo1 ocorreu em todos os estuários com uma frequência de 45 e os outros apareceram em mais de um estuário. A rede de haplótipos teve como suposto ancestral o Haplótipo 1 e os demais se inter-relacionado, não sendo possível a

detecção de um padrão de isolamento entre os estuários ou entre os haplótipos, onde a forma obtida foi similar a uma estrela. Redes de relações entre haplótipos que geram um padrão em forma de estrela centralizada, sugerem que esta população passou por uma recente expansão (SLATKIN & HUDSON, 1991).

Ma *et. al.* (2011) estudando populações do crustáceo *Scylla paramamosain* constatou que as mesmas apresentaram alto nível de diversidade genética e baixo nível de diferenciação, onde um dos aspectos para chegar a essa conclusão foi a obtenção de uma rede de haplótipos em forma de estrela centralizada que, segundo o autor, significa um evento histórico de expansão populacional.

O passado demográfico das populações de *M. coffeus* indica que as mesmas passam por um período de expansão ou por seleção recente, conclusão esta tomada a partir dos resultados obtidos com a análise *mismatch distribution* e pelos testes de neutralidade. Os gráficos da distribuição de diferenças par-a-par (*mismatch distribution*) mostraram uma tendência unimodal. Gráficos com esse tipo de distribuição indicam que essas populações experimentaram uma expansão recente (ROGERS & HARPENDING, 1992; SLATKIN & HUDSON, 1991). Os valores de D de Tajima e F_s de F_u apresentaram valores negativos indicando que a população está em expansão. Segundo Fu (1997) os valores da estatística F_s são bastante sensíveis a expansão demográfica, resultando em valores negativos elevados quando nesta condição. Conforme Oliveira-Neto (2007), valores negativos para ambas as estatísticas são característicos de expansões populacionais recentes. Mao *et al*, (2011) em sua pesquisa sobre a filogeografia molecular do *Ruditapes philippinarum* na costas chinesas e japonesas constatou que suas populações passam por um processo de expansão recente. Indicando que essas análises são eficientes na detecção do passado geográfico de moluscos

Em resumo, a partir dos resultados de diversidade nucleotídica baixa, diversidade haplotípica alta, rede de haplótipos em forma de estrela centralizada, *mismatch distribution* com padrão unimodal e teste de neutralidades com valores negativos indicam que não existe diferenciação genética entre as populações cearenses de *M. coffeus* que passaram por um gargalo evolutivo seguido por um

rápido crescimento com acúmulo de mutações (SLATKIN & HUDSON, 1991; SUN *et al*, 2012).

As populações do Ceará e as populações disponíveis no GenBank foram comparadas para verificação do grau de variabilidade entre elas. O nível de variação entre as sequências apresentaram índices elevados, demonstrando grandes diferenças entre as mesmas. Os valores elevados de H e Hd corroboram com a conclusão de que as duas localidades são diferentes. Outro dado que reforça essa diferença foi o obtido pela AMOVA, onde o grau de variação entre as sequências entre os grupos foi de 84,80% e 14,75% entre as populações. Indicando assim que os exemplares de *M. coffeus* da costa Cearense são supostamente diferentes dos encontrados no Porto Rico e Flórida.

As duas localidades apresentaram elevado grau de estruturação genética quando comparadas par a par. Os valores de *Fst* das populações variaram de 0,581 a 0,973 e todos estatisticamente significativos, valores mais que suficientes para concluir que existe diferença entre as mesmas, onde valores de *Fst* superiores a 0.25 caracterizam padrão positivo estruturação genética (WRIGHT, 1931). Dennis & Hellberg (2010) analisando o padrão de estruturação genética de *Melampus bidentatus* na costa Sudeste dos Estados Unidos constatou valores que indicam que a população do Sul e a população da costa Sudeste apresentam estruturação genética com valores de 0.23 e 0.27, respectivamente. Apresentaram também diferenças entre as sequencias com valores superiores a 20% entre populações do Norte, Sul e do Golfo do México.

O número médio das diferenças entre as sequências obtidos variaram de 0,159 a 0,184 sendo possível sugerir um grau intermediário de diferenciação entre as duas localidades. Uma porção de 648 pares de base (pb) do gene COI foi selecionada como marcador molecular padrão, denominado de *DNA barcoding*, através de uma proposta elaborada por Hebert *et al*, (2003) conhecida como *Consortium for the Barcodes of Life* (CBoL) e tem como objetivo padronizar e automatizar a identificação e descrição de toda biodiversidade. Para isso, a separação dos espécimes é realizada com base nos valores de distância genética das sequências, sendo estabelecido um limiar de dez vezes para tomada de decisão. Em princípio, dois haplogrupos seriam considerados como pertencentes a

espécies distintas se o polimorfismo nucleotídico intergrupos for pelo menos dez vezes maior que as diferenças intragrupos (HEBERT *et al*, 2004). Considerando esse critério para diferenciação pode-se afirmar que os dois halogrupos são compostos por espécies supostamente diferentes.

O padrão multimodal da distribuição da diferença em pares entre as sequências juntamente com o resultado obtido como teste de Tajima sugere que os espécimes de *M. coffeus* estão inclusos em populações que estão em equilíbrio demográfico longo e estável quando comparadas as duas localidades (ROGERS & HARPENDING, 1992; SLATKIN & HUDSON, 1991).

A rede de haplótipos mostra uma clara distinção entre os haplótipos oriundos costa sudeste Norte Americana e os cearenses. Onde dois grupos foram formados e ligados por um ramo principal, ramo este que apresentava vários sítios polimórficos onde se encontravam as diferenças entre os dois grupos. Supostamente essa diferença se dá pela distância geográfica entre as duas localidades ou pelas características ambientais distintas.

Os resultados aqui obtidos são um breve ensaio sobre os dados genéticos do *M. coffeus*, onde se fornece uma grande contribuição no conhecimento desses indivíduos que são importantes na ecologia dos manguezais. Porém, pesquisas futuras com uso de outros genes e/ou ferramentas associados se faz necessário para um maior conhecimento desses organismos a nível genético.

6 CONCLUSÕES

As populações de *M. coffeus* de estuários abrangendo toda a costa Cearense apresentaram um alto grau de variação em nível intrapopulacional e um baixo grau de variabilidade interpopulacional.

Não foi evidenciada diferenciação entre as populações com um baixo nível de estruturação genética.

As populações Cearenses, possivelmente, passaram por um gargalo demográfico seguido por um rápido crescimento com acúmulo de mutações e crescimento populacional recente.

Foi encontrado um alto grau de diferenciação entre as sequências das populações Cearenses e as da Flórida e Porto Rico, sugerindo inclusive de que se trata de espécies diferentes.

O alto grau de estruturação genética entre as localidades das Américas do Norte e do Sul sugere um período longo e estável de fixação no decorrer do tempo.

REFERÊNCIAS

- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York : Chapman & Hall, 1994. 511p.
- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Second Edition. Massachusetts : Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2004. 684p.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P. & RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol Biol Evol**, v.16, p.37-48, 1999.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C.R. & HARPER, J.L. **Ecology – From individuals to ecosystems**. 4ª Edição. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2006. p. 759.
- BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA. **In Evolution of Genes and Proteins** (Nei, M. & Koehn, R. K. eds.), Massachusetts, p.62-88, 1983.
- CATAUDELLA, R. *et al.* Genetic variability of *Austropotamobius italicus* in the Marches region: implications for conservation. **Aquatic Conserv: Mar Freshw Ecosyst**, v.20, p.261–268, 2010.
- CHO, E.S. *et al.* Population genetic structure of the ark shell *Scapharca broughtonii* Schrenck from Korea, China, and Russia based on COI gene sequences. **Marine biotechnology**, v.9, p.203–216, 2007.
- DAYRAT, B. *et al.* Phylogenetic relationships and evolution of pulmonate gastropods (Mollusca): New insights from increased taxon sampling. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.59, p.425–437, 2011.
- DENNIS, A.B. & HELLBERG, M.E. Ecological partitioning among parapatric cryptic species. **Molecular Ecology** v.19, p.3206–3225, 2010.
- ELLISON, A.M. & FARNSWORTH, E.J. Anthropogenic disturbance of Caribbean Mangrove ecosystems: past impacts, present trends and future predictions. **Biotropica**, v.28, p.549-565, 1996.
- ELLISON, A.M. & FARNSWORTH, E.J. Mangrove communities. *In*: M. D. Berthness, S. Gaines & M. E. Hey (eds). **Marine Community Ecology**. Sinauer Press, Sunderland, USA, capítulo 16, p.423 – 442, 2001.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G. & SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.
- FOLMER, O. *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v.3, p.294–299, 1994.

FONDO, E.N. & MARTENS, E.E. Effects of mangrove deforestation on macrofaunal densities, Gazi bay, Kenya. **Mangroves and Salt Marshes**, v.2, p.75-83, 1998.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D. & BRISCOE, D.A. **A Primer of Conservation Genétics**. Cambridge University Press, 2004. p.220.

FU, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v.147, p.915-925, 1997.

GHARBI, A. *et al.* Genetic variation and population structure of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* along the Tunisian coast inferred from mtDNA and ITS1 sequence analysis. **Biologia**, v.65, n.4, p.688—696, 2010.

GORAYEB, A.; SILVA, E.V.; MEIRELES, A.J.A. Impactos Ambientais e Propostas de Manejo Sustentável para a Planície Flúvio-Marinha do Rio Pacoti – Fortaleza/Ceará. **Sociedade & Natureza**, v.17, n.33, p.143-152, 2005.

GRANT W.S. & BOWEN, B.W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **The Journal of Heredity**, v.89, p.415-426, 1998.

HEBERT, P.D.N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**, v.270, p.313-321, 2003.

HEBERT, P.D.N. *et al.* Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS biology**, v.2, p.1657-1663, 2004.

HOELZEL, A.R. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*, 2nd ed. IRL Press, Oxford, 1998. p.445.

IBAMA. **Diagnóstico da atividade de carcinicultura no Estado do Ceará**. Fortaleza: MMA, 2005. p.240.

JOSE, J. & SOLFERINI, V.S. Population genetics of *Collisella subrugosa* (Patellogastropoda: Acmaeidae): evidence of two scales of population structure. **Genetica**, v.130, p.73–82, 2007.

LACERDA, L.D. Manguezais: florestas de beira mar. **Ciência Hoje**, v.3, p.63-70. 1984.

LIBRADO, P. & ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v.25, p.1451-1452, 2009.

KATSARES, V. Genetic structure of the endangered species *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) inferred from mtDNA sequences. **Biologia**, v.63, n.3, p.412—417, 2008.

KETMAIER, V.; GIUSTI, F. & CACCONI, A. Molecular phylogeny and historical biogeography of the land snail genus *Solatopupa* (Pulmonata) in the peri-Tyrrhenian area. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.39, p.439–451, 2006.

LACERDA, L. D. 1984. Manguezais: florestas de beira mar. *Ciência Hoje* 3: 63 - 70.

LI, W.H. **Molecular Evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. p.284.

LUGO, A.E. & SNEDAKER, S. The ecology of mangroves. **Annu. Rev. Ecol. & Syst.**, v.5, v.39 – 64, 1974.

MA, H.; MA, C. & MA, L. Population genetic diversity of mud crab (*Scylla paramamosain*) in Hainan Island of China based on mitochondrial DNA. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.39, p.434–440, 2011.

MAIA, R.C. **O uso do gastrópode *Melampus coffeus* (linnaeus, 1758) como indicador ecológico do estado de degradação ambiental dos manguezais do Ceará**. 2010. 222p. Tese (Doutorado em Biologia Marinha)-Departamento de Biologia Marinha, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense.

MAIA, R.C. & TANAKA, M.O. Avaliação de efeitos locais de espécies de mangue na distribuição de *Melampus coffeus* (Gastropoda, Ellobiidae) no Ceará, Nordeste do Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v.97, n.4, p.379 – 382, 2007.

MAO, Y. *et al.* Molecular phylogeography of *Ruditapes philippinarum* in the Northwestern Pacific Ocean based on COI gene. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.407, 171–181, 2011.

MARTINS, A.M.F.. Relationships within the Ellobiidae. *In*: Taylor, J.D. (ed.) **Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca**, v.24, p.285-294, Londres: Oxford University Press. 1996.

MARTINS, M.F. Expansão urbana e impactos ambientais: o caso da planície flúvio-marinha do rio Ceará. Relatório, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2002.

MCKEE, K.L. & FAULKNER, P.L. Mangrove peat analysis and reconstruction of vegetation history at the Pelican Cays, Belize. **Atoll Research Bulletin**, v.468, p.46-58, 2000.

MOOK, D. Absorption efficiencies of the intertidal mangrove dwelling mollusk *Melampus coffeus* and the rocky intertidal mollusk *Acanthopleura granulata* Gmelin. **Marine Ecology**, v. 7, p. 105–113, 1986.

MOLISANI, M.M. **Zoneamento Ecológico e Econômico (ZEE) da Zona Costeira do Estado do Ceará**. Caracterização das Condições Físico-Químicas dos Estuários do Estado do Ceará, 2005.

MONTEIRO, L.H.U. *et al.* Evolução das áreas de manguezal do litoral nordeste brasileiro entre 1978 e 2004. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, p. 36 – 42, 2004.

MORTON, J.E. 1955. The functional morphology of the british Ellobiidae (Gastropoda: Pulmonata) with special references to the digestive and reproductive systems. Philosophical Transactions of the Royal Society. **Biological Sciences**, v. 239, p. 89–160.

MOUSSALLI, A.; HERBERT, D.G.; STUART-FOX, D.A. Phylogeny of the cannibal snails of southern Africa, genus *Natalina sensu lato* (Pulmonata: Rhytididae): Assessing concordance between morphology and molecular data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, p. 167–182, 2009.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. p. 512.

NAGELKERKEN, I. *et al.* How important are mangroves and seagrass beds for coral-reef fish? The nursery hypothesis tested on an island scale. **Marine Ecology Progress Series**, v. 244, p. 299–305, 2002.

OLIVEIRA, A.M.E.; IRVING, M.A. & LIMA, H.H. Aspectos bioecológicos do estuário do rio Pacoti, Ceará, Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 27, p. 91-100, 1988.

OLIVEIRA-NETO, J.F. *et al.* Population genetics and evolutionary demography of *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). **Marine Ecology**, v. 28, p. 460–469, 2007.

PRASANKOK, P. & PANHA, S. Genetic structure of the common terrestrial pulmonate snail, *Cryptozonia siamensis* (Pfeiffer, 1856), in Thailand. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 449–457, 2011.

PROFFITT, C.E. & DEVLIN, D.J. Grazing by the intertidal gastropod *Melampus coffeus* greatly increases mangrove leaf litter degradation rates. **Marine Ecology Progress Series**, v. 296, p. 209-218, 2005.

PROFFITT, C.E. *et al.* Field and laboratory experiments on the consumption of mangrove leaf litter by the macrodetritivore *Melampus coffeus* L. (Gastropoda: Pulmonata). **Florida Scientist**, v. 56, p. 211-222, 1993.

RAULERSON, G.E. **Leaf litter processing by macrodetritivores in natural and restored neotropical mangrove forests**. 2004. 155p. Tese de Doutorado, Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Estados Unidos.

REICHOW, D. & SMITH, M.J. Microsatellites reveal high levels of gene flow among populations of the California squid *Loligo opalescens*. **Mol Ecol**, v. 10, p. 1101–1109, 2001.

RICKLEFS, R.E. & MILLER, G.L. **Ecology**. 4^a ed. Nova Iorque: W. H. Freeman and Company, 2000. p. 822.

RIOS, E.C. **Seashells of Brazil**. 2nd ed. Rio Grande: Museu Oceanográfico Prof. E.C. Rios da Fundação Universidade de Rio Grande, 1994. p. 368.

RIVERA, M.A.J.; KELLEY C.D. & RODERICK G.K. Subtle population genetic structure in the Hawaiian grouper, *Epinephelus quernus* (Serranidae) as revealed by mitochondrial DNA analysis. **Biol J Linn Soc**, v. 81, p. 449–468, 2004.

ROGERS, A.R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p. 552-569, 1992.

RUNDELL, R.J.; HOLLAND, B.S. & COWIE, R.H. Molecular phylogeny and biogeography of the endemic *Hawaiian Succineidae* (Gastropoda: Pulmonata). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 31, p. 246–255, 2004.

RUSSEL-HUNTER, W.D.; APLEY, M.L. & HUNTER, R D. Early life-history of *Melampus* and the significance of semilunar synchrony. **Biology Bulletin**, v. 143, p. 625-656, 1972.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal ecossistema entre a terra e o mar. **Caribbean Ecological Research**. São Paulo. 1995.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. *et al.* Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 3, p. 561-570, 2000.

SEMACE. **Manguezais do nordeste do Brasil**. Avaliação das áreas de manguezais dos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco. Fortaleza: SEMACE, 2006. p. 123.

SEMACE - SUPERINTENDÊNCIA ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. APA do Estuário do Rio Ceará. Disponível em: <<http://www.semace.ce.gov.br/2010/12/area-de-protecao-ambiental-do-estuario-do-rio-ceara/?pai=6>> Acesso em: 22 de Maio de 2012a.

SEMACE - SUPERINTENDÊNCIA ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. APA do Estuário do Rio Pacoti. Disponível em: <<http://www.semace.ce.gov.br/2010/12/area-de-protecao-ambiental-do-rio-pacoti/?pai=6.>> Acesso em: 22 de Maio de 2012b.

SLATKIN, M. & HUDSON, R.R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing population. **Genetics**, v. 129, p. 555-562, 1991.

SOTO, E. & LEIGHTON, G. Indicadores biológicos de ecossistemas marinhos de fondos blandos y su importancia en los programas de monitoreo ambiental.

Anais da VI Jornadas del CONAPHI – Chile, p. 1 – 15, 1999.

SUN, P. *et al.* Population genetic structure and demographic history of *Pampus argenteus* in the Indo-West Pacific inferred from mitochondrial cytochrome b sequences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 54–63, 2012.

TAJIMA, F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, v. 105, p. 437-460, 1983.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585-595, 1989.

TAMURA, K. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TOWNSEND, C.R., BEGON, M. & HARPER, J.P. **Fundamentos em Ecologia**. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora S/A, 2006. p. 593.

VANNUCCI, M. What is so special about mangroves? **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, p. 599 – 603, 2001.

VARJABENDIAN, R. 1995. Impactos sobre os manguezais. *In*: Y. S. Novelli (ed). Manguezal ecossistema entre a terra e o mar. Caribbean Ecological Research, São Paulo, capítulo 11: 49 -55.

VIANA, M. C. **Estudo do uso dos recursos naturais e evolução da paisagem na zona estuarina do rio Cocó – Fortaleza/CE**. 1996. Monografia de Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 100 p.

YUAN, T.; HE, M. & HUANG, L. Intraspecific genetic variation in mitochondrial 16S rRNA and COI genes in domestic and wild populations of Huaguizhikong scallop *Chlamys nobilis* Reeve. **Aquaculture**, v. 289, p. 19–25, 2009.

ANEXOS

ANEXO A – Códigos de acesso das sequências obtidas no GenBank

Código da sequência	Código de acesso GenBank	Local de coleta
MCAN01	HM154093.1	Matheson Hammock, FL
MCAN02	HM154092.1	Matheson Hammock, FL
MCAN03	HM154091.1	Matheson Hammock, FL
MCAN04	HM154090.1	Matheson Hammock, FL
MCAN05	HM154089.1	Matheson Hammock, FL
MCAN06	HM154088.1	Matheson Hammock, FL
MCAN07	HM154087.1	Matheson Hammock, FL
MCAN08	HM154086.1	Matheson Hammock, FL
MCAN09	HM154085.1	Matheson Hammock, FL
MCAN10	HM154084.1	Matheson Hammock, FL
MCAN11	HM154083.1	Sarasota, FL
MCAN12	HM154082.1	Sarasota, FL
MCAN13	HM154081.1	Sarasota, FL
MCAN14	HM154080.1	Sarasota, FL
MCAN15	HM154079.1	Sarasota, FL
MCAN16	HM154078.1	Sarasota, FL
MCAN17	HM154077.1	Sarasota, FL
MCAN18	HM154076.1	Bonita Beach, FL
MCAN19	HM154075.1	Bonita Beach, FL
MCAN20	HM154074.1	Bonita Beach, FL
MCAN21	HM154072.1	Bonita Beach, FL
MCAN22	HM154071.1	Bonita Beach, FL
MCAN23	HM154070.1	Bonita Beach, FL
MCAN24	HM154069.1	Downtown Naples, FL
MCAN25	HM154068.1	Downtown Naples, FL
MCAN26	HM154067.1	Downtown Naples, FL
MCAN27	HM154066.1	Downtown Naples, FL
MCAN28	HM154065.1	Downtown Naples, FL
MCAN29	HM154064.1	Downtown Naples, FL
MCAN30	HM154063.1	Downtown Naples, FL
MCAN31	HM154062.1	Downtown Naples, FL

MCAN32	HM154061.1	Downtown Naples, FL
MCAN33	HM154060.1	Downtown Naples, FL
MCAN34	HM154058.1	La Parguera, Porto Rico
MCAN35	HM154057.1	La Parguera, Porto Rico
MCAN36	HM154056.1	La Parguera, Porto Rico
MCAN37	HM154055.1	La Parguera, Porto Rico
MCAN38	HM154054.1	La Parguera, Porto Rico
MCAN39	HM154053.1	La Parguera, Porto Rico
MCAN40	HM154052.1	La Parguera, Porto Rico
MCAN41	HM154051.1	La Parguera, Porto Rico
MCAN42	HM154050.1	La Parguera, Porto Rico
MCAN43	HM154049.1	La Parguera, Porto Rico
MCAN44	HM154048.1	La Parguera, Porto Rico

Hap_69 TTCTCTCCTACCCATGGTTGTGGGATACAGCACATGCTGGTATATTGCCGGTGTAACTCGTCGAGCAGGAA
Hap_70 TTCTCTCTTCTACCCATGGTTGTGGGATATAGCACATGCTGGCATATTGCCGGTGTAACTCGTCGAGTAGGAA
Hap_71 TTCTCTCTTCTACCCATGGTTGTGGGATACAACACATGCTGGTATATTGCCGGTGTAACTCGTCGAGCAGGAA
Hap_72 TTCTCGCCTCTACCCATGGTTGTGGGATACAGCACATGCTGGTATATTGCCGGTGTAACTCGTCGAGCAGGAA
Hap_73 TTCTCTCTTCTACCTATGGTTGTGGGATACAGCACATGCTGGTATATTGCCGGTGTAACTCGTCGAGCAGGAA
Hap_74 TTCTCTCTTCTACCCATGGTTGTGGGATACAGCACATGCTGGCATATTGCCGGTGTAACTCGTCGAGCAGGAA
Hap_75 TTCTCTCTTTTACCCATGGTTGTGGGACACAGCACATGCTAGTATATTGCCGGTGTAACTCGTCGAGCAGGAA
Hap_76 TTCTCTCTTCTATCCATGGTTGTGGGATACAGCACGTGCTGGTATATTGCTGGTGTAAATCCTTGTGTCGAGCAGGAA
Hap_77 TTCTCTCTTCTACCCATGGTTGTGGGATACAGCACATGCTGGTATATTACCGGTGTAACTCGTCGAGCAGGAA
Hap_78 TTCTCCCTTCTACCCATGGTTGTGGGATACAGCACATGCTGGTATATTGCCGGTGTAACTCGTCGAGCAGGAA
Hap_79 TTCTCTCTTCTACCCATGGTTGTGGGATACAGCACATGCTGGTATATTGCCGGTGTAACTCGTCGAGCAGGAA
Hap_80 TTCTCTCTTCTACCCATGGTTGTGGGATACAGCACATGCTGGTATATTGCCGGTGTAACTCGTCGAGCAGGAA
Hap_81 TTTTCTCTTCTACCCATGGTTGTGGGATACAGCACATGCTGGTATATTGCCGGTGTAACTCGTCGAGCAGGAA

Hap_93 TTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAGAGTATTAATGCGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_94 TTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAGAGTATTAATGCGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_95 TTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAGAGTATTAATGCGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_96 TTCCCATTCAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAGAGTATTAATGCGCGTAGTGTAGCATACTCGTGGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_97 TTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCATAGCCACATGCTAGAGCATTAAATGCGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_98 TTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAACCACATGCTAGAGTATTAATGCGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_99 CTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAGAGTATTAATGCGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_100 TTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAGAGTATTAATGCGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_101 TTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAGAGCATTAAATGCGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_102 TTCTTATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAAAGTATTAATGCGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_103 TTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAGAGTATTAATGCGCGTAGTGTAGCATTCTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_104 TTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAGAGTATTAATACGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAGAG
Hap_105 TTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAGAGTATTAATGCGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_106 TTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAGAGTATTAATGCGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG
Hap_107 TTCTCATTAGCCCATGTTGTGCTGGGCATGGTATCACAGCCACATGCTAGAGTATTAATGCGCGTAGTGTAGCATACTTGTGCGGTTTAGTTTGAAGGAAAG