



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR**  
**PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**VARIABILIDADE DA REGIÃO ITS-1 DO CLUSTER RIBOSSÔMICO NUCLEAR EM  
POPULAÇÕES DE OSTRAS DE TRÊS ESTUÁRIOS DA COSTA CEARENSE.**

**RÉGIS FERNANDES VASCONCELOS**

**FORTALEZA - CE**  
**MARÇO DE 2009**

**RÉGIS FERNANDES VASCONCELOS**

**VARIABILIDADE DA REGIÃO ITS DO CLUSTER RIBOSSÔMICO NUCLEAR EM  
POPULAÇÕES DE OSTRAS DE TRÊS ESTUÁRIOS DA COSTA CEARENSE.**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de MESTRE.

**Orientador: Prof. Rodrigo Maggioni, Ph.D.**

**FORTALEZA – CE  
MARÇO DE 2009**

**RÉGIS FERNANDES VASCONCELOS****VARIABILIDADE DA REGIÃO ITS DO CLUSTER RIBOSSÔMICO NUCLEAR EM  
POPULAÇÕES DE OSTRAS DE TRÊS ESTUÁRIOS DA COSTA CEARENSE.**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de MESTRE.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Rodrigo Maggioni, Ph.D (Orientador)  
Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof.<sup>a</sup> Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira, Ph.D (Examinadora interna)  
Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Luis Fernando Fernandes Marins, Ph.D (Examinador externo)  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Rio Grande – FURG

*Às duas mulheres da minha vida,  
minha querida mãe, Ivone, e  
minha amada noiva, Lívia.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao Criador de todas as coisas, Jeová Deus, por ter permitido a realização deste trabalho.

Ao meu amor, Lívia, pelo incentivo, apoio e compreensão nos momentos difíceis que surgiram.

À minha mãe Ivoneide, pelos anos de ajuda, compreensão, apoio e educação que não me faltaram na vida.

Ao meu pai Wilson, pelo apoio, companheirismo e por toda ajuda que me prestou durante a realização deste curso.

Aos meus tios, Cleide e Ferreirinha, pelo apoio e pelos momentos agradáveis que me proporcionaram.

Aos meus irmãos, Victor e Thiago, pelo companheirismo e compreensão.

Ao meu orientador, Prof. Rodrigo Maggioni, pelo grande incentivo, compreensão e otimismo que me transmitiu diante das dificuldades que surgiram.

À Prof.<sup>a</sup> Tereza Cristina, por quem tenho muito respeito e admiração, pela experiência, ética profissional e valores que me repassou.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Diagnósticos de Enfermidades de Organismos Aquáticos – CEDECAM/LABOMAR, representado pela Prof.<sup>a</sup> Tereza Cristina, João Mafaldo, Cândida, Graça e Rubens pela compreensão e ajuda que me prestaram durante a realização das análises biomoleculares.

Ao Prof. Thalles Grangeiro e à Tuana Oliveira, pela colaboração com as análises realizadas no Laboratório de Genética Molecular da UFC.

Ao Grupo de Estudos de Moluscos Bivalves – GEMB/LABOMAR/UFC, representado pelo Max e pela Rachel, por tantos anos de companheirismo, lutas e conquistas que foram realizadas neste grupo.

Ao Michel e à Samara que através do Núcleo de Genômica e Bioinformática – NUGEN/UECE prestaram grande ajuda com treinamentos e pela amizade e companheirismo que ficaram mais do que provados.

Ao Luiz Bezerra (Buda) pela amizade e ajuda com os mapas utilizados nesta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro prestado durante a realização do Mestrado.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	viii
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	ix
<b>RESUMO</b>	x
<b>ABSTRACT</b>	xi
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	14
<b>3.1. Biologia das Ostras</b>	14
<b>3.2. Estudos Taxonômicos de Ostras na Costa Brasileira</b>	15
<b>3.3. Utilização da Região ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>) em Estudos de Variabilidade Gênica</b>	16
<b>3.4. Caracterização dos Estuários Estudados</b>	17
<b>3. OBJETIVOS</b>	21
<b>3.1. Objetivo Geral</b>	21
<b>3.2. Objetivos Específicos</b>	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	22
<b>4.1. Coleta de amostras biológicas</b>	22
<b>4.2. Extração do DNA Total</b>	25
<b>4.3. Reação em Cadeia de Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i> – PCR)</b>	25
<b>4.5. Sequenciamento</b>	26
<b>4.6. Análise de Variabilidade da Região ITS-1</b>	27
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	30
<b>6. CONCLUSÕES</b>	37
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	38

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** DNA ribossômico nuclear de eucariotos segundo Harris & Crandall (2000), ilustrando os genes 18S, 5,8S e 28S e os espaçamentos ITS-1 e ITS-2, que tipicamente possuem cerca de 600 e 1000 pares de bases, respectivamente. 17
- Figura 2.** Fotografias mostrando espécimes de *C.cf.rhizophorae* presas às raízes de *R. mangle*. 22
- Figura 3.** Fotografias mostrando espécimes de *C.cf.brasiliana*: parcialmente enterrado no substrato (2a) e preso à raiz de *R. mangle* (2b). 23
- Figura 4.** Imagem de satélite mostrando os pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) nos estuários dos rios Ceará, Cocó e Pacoti. 24
- Figura 5.** Eletroforese evidenciando a amplificação da região ITS-1 em ostras *C.cf.brasiliana* (4a) e *C.cf.rhizophorae* (4b). 30
- Figura 6.** Árvore de *neighbour-joining* para o gênero *Crassostrea* baseada em sequências de ITS-1. 32
- Figura 7.** Árvore de máxima parcimônia para o gênero *Crassostrea* baseada em sequências de ITS-1. 34
- Figura 8.** Distribuição de sequências de *C.cf.rhizophorae* nos estuários dos rios Pacoti, Cocó e Ceará. 35

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Seqüências de ITS-1 para *Crassostrea* retiradas do *GenBank* e incluídas nas análises filogenéticas, com as abreviações de cada espécie utilizada neste trabalho.

27



## LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1** – Sequências Consenso de ITS-1 Completo para *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae*, obtidas na presente pesquisa. 47
- ANEXO 2** – Alinhamento das sequências de ITS-1 para *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae* obtidas na presente pesquisa com sequências descritas no *GenBank* para o gênero *Crassostrea* e utilizadas na análise de máxima parcimônia. 48

## RESUMO

Classificações taxonômicas de ostras são problemáticas, pois estes organismos possuem características morfológicas pouco informativas. A variabilidade da região ITS do cluster ribossômico tem sido bastante utilizada em estudos filogenéticos e taxonômicos, visto que esta região apresenta uma variabilidade relativamente elevada e fácil amplificação por termociclagem. A ostra *Crassostrea brasiliana* foi, por décadas, confundida com *C. rhizophorae*, entretanto, estudos recentes indicam que são duas espécies biologicamente distintas. Esta pesquisa objetivou analisar a variabilidade da região ITS-1 de populações de ostras *C. rhizophorae* em três estuários da costa do Estado do Ceará e investigar a presença de uma segunda espécie de ostra pertencente ao gênero *Crassostrea*. Exemplos da ostra nativa *C. cf. rhizophorae* foram coletados nos estuários da costa cearense para análise de variabilidade populacional. Foram coletados também espécimes de *C. cf. brasiliana* para estudo de filogenia e comparação com o primeiro grupo de ostras. Após extração de DNA e amplificação por PCR da região ITS-1, seqüências desta região foram obtidas para análise filogenética realizada através dos métodos de *neighbour-joining* e máxima parcimônia. Sequências de ITS-1 descritas no *GenBank* para 35 indivíduos, representando 12 espécies de ostras do gênero *Crassostrea*, e mais duas seqüências de *Saccostrea glomerata* (grupo externo), foram utilizadas para os alinhamentos com as seqüências obtidas na presente pesquisa. A variabilidade intraespecífica de *C.cf.rhizophorae* foi estudada pelo método da máxima parcimônia. Seqüências inéditas de ITS-1 completo foram obtidas para *C.brasiliana* e *C.rhizophorae*, com 427 e 439 pb, respectivamente. A árvore de *neighbour-joining* evidenciou a clara separação de *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae* em ramos distintos (100%), confirmando a ocorrência de, pelo menos, duas espécies de *Crassostrea* no local de estudo. O estudo sugere a ocorrência de *C.brasiliana* no Estado do Ceará. Embora alguns autores tenham considerado *C.brasiliana* sinônimo de *C.virginica*, em nosso estudo, *C.virginica* mostrou-se muito mais próxima de *C.rhizophorae*, com forte agrupamento (100%). A árvore de máxima parcimônia mostrou que as seqüências de *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae* formaram um grupo monofilético com as demais espécies de *Crassostrea* em 100% das repetições. *C.cf.brasiliana* apresentou-se na base do ramo monofilético de *Crassostrea* e, portanto, foi o grupo mais próximo de *S.glomerata*. Esta árvore também mostrou a separação dos exemplares de *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae* em ramos distintos (100%), evidenciando o forte sinal filogenético observado na análise. Novamente, *C.cf.rhizophorae* mostrou-se próxima de *C.virginica*. A análise de máxima parcimônia para variabilidade intraespecífica de *C.cf.rhizophorae* nos três estuários estudados mostrou a formação de 7 diferentes seqüências para *C.cf.rhizophorae*. A ligação entre as seqüências encontradas sugere a presença de fluxo gênico entre as populações estudadas e a ocorrência de seqüências exclusivas pode indicar a formação de populações residentes em cada um dos estuários analisados. A região ITS-1 mostrou-se ideal para estudos de filogenia de ostras e estudos de variabilidade gênica populacional. A confirmação de uma segunda espécie de ostra pertencente ao gênero *Crassostrea* na costa cearense é relevante para uma melhor gestão destes recursos, que possuem grande importância ecológica, econômica e social para nosso Estado.

**Palavras-chave:** *Crassostrea*, ITS, filogenia, taxonomia, ostras.

## ABSTRACT

Oyster taxonomic classifications are problematic, because these organisms have few informative morphological characteristics. The oyster *C.brasiliana* was, for decades, confused with *C.rhizophorae*. However, recent studies indicate that the two species are biologically distinct. In order to help solving systematic issues among mollusks the nuclear ribosomal ITS region has been often used in phylogenetic and taxonomic studies. ITS presents high variability and relatively easy amplification by thermocycling. The present study aimed at examining the variability of the ITS-1 region of oyster populations of *C.rhizophorae* in three estuaries from Ceará State, as well as investigating the presence of a second *Crassostrea* species in the region. Individuals of the native oyster *C.cf.rhizophorae* were collected in the estuaries of Ceará for analysis of population variability. We also collected individuals of *C.cf.brasiliana* for study of phylogeny and evaluation of taxonomic status. After DNA extraction and ITS-1 amplification, sequences were obtained for phylogenetic and population analysis. In addition to these sequences, 35 ITS-1 sequences were retrieved from GenBank, representing 12 species of *Crassostrea* oysters. Two additional sequences of *Saccostrea glomerata* were used as outgroup. Phylogenetic trees were inferred through *neighbor-joining* and maximum parsimony methods. Intraspecific variability in *C.cf.rhizophorae* was studied through a nested clade maximum parsimony method. Complete ITS-1 sequences were obtained for *C.brasiliana* and *C.rhizophorae* with 427 and 439 bp, respectively. The *neighbor-joining* tree showed a clear separation between *C.cf.brasiliana* and *C.cf.rhizophorae* branches (100% bootstrap support), confirming the occurrence of at least two species of *Crassostrea* in Ceará. Although *C. brasiliana* has been considered synonymous with *C.virginica*, the results presented here indicate that *C.virginica* is much closer to *C.rhizophorae*. The same basic topology was observed in the maximum parsimony tree. That tree also showed a clear separation between *C.cf.brasiliana* and *C.cf.rhizophorae* branches (100% bootstrap support). Maximum parsimony analysis of intraspecific variability of *C.cf.rhizophorae* for the three estuaries studied showed 7 different sequences for *C.cf.rhizophorae*. The network between these sequences suggests the presence of limited gene flow between populations. ITS-1 seems to be ideal for studies of phylogeny of oysters and has shown to be informative for population studies as well. The confirmation of the presence of a second species of oysters belonging to the genus *Crassostrea* in Ceará will have direct consequences in the management of these resources, which have marked ecological, economic and social importance to our state.

**Keywords:** *Crassostrea*, ITS, phylogeny, taxonomy, oysters.

## 1. INTRODUÇÃO

Os moluscos constituem o segundo maior grupo do Reino animal, em número de espécies (BARNES & HARRISON, 1994). Segundo dados da FAO (2006), os moluscos constituíram o terceiro mais importante grupo de organismos cultivados na aquicultura com uma produção correspondente a 22,3% do total produzido pelo setor no ano de 2004.

As ostras têm desempenhado um importante papel no cenário da aquicultura brasileira e mundial. Além de proporcionar uma nova fonte de alimento, a ostreicultura apresenta-se como alternativa importante para minimizar os problemas sociais e econômicos de comunidades, que antes viviam da pesca artesanal e que atualmente sofrem com o evidente declínio da atividade. Em virtude do extrativismo irracional dos recursos naturais, a implantação da ostreicultura apresenta-se como boa opção para a preservação ambiental e o desenvolvimento sustentável dos recursos pesqueiros (DANTAS NETO, 2001).

Alguns estudos têm considerado também a importância dos moluscos bivalves como bioindicadores de poluição em ambientes aquáticos, uma vez que possuem a capacidade de acumular, principalmente em suas brânquias e intestino, substâncias e microrganismos presentes na água (e.g. DAVID et al., 2005; PLEJDRUP et al., 2006; BROWN et al., 2006). De acordo com NUNES & PARSONS (1998), os moluscos bivalves acumulam, através da filtração, todos os agentes bióticos e abióticos que se encontram na água, principalmente na massa visceral, lúmen do intestino e hepatopâncreas.

Ostras do gênero *Crassostrea* (GUILDING, 1828) ocorrem em praticamente todo o litoral brasileiro presas à substratos como raízes de mangue e rochas na zona intertidal (NASCIMENTO, 1991; RIOS, 1994), possuindo grande importância comercial como produto de atividades extrativas e de cultivo, além de desempenhar um importante papel ecológico como organismos filtradores.

Segundo HEDGECOCK & OKAZAKI (1984), ostras do gênero *Crassostrea* possuem afinidades sistemáticas incertas e intensas semelhanças morfológicas, o que dificulta a identificação das espécies.

Classificações taxonômicas de ostras são problemáticas, pois estes organismos possuem características morfológicas pouco informativas. A coloração e morfologia das conchas são muito variáveis e sensíveis às variações ambientais. Assim, identificações baseadas em características externas da concha como cor, formato e estrutura são extremamente susceptíveis a erros (TACK et al., 1992; WANG et al., 2004).

Diversos estudos biomoleculares têm sido desenvolvidos com o intuito de investigar as relações filogenéticas existentes entre estes organismos e tentar elucidar os problemas taxonômicos existentes, produzindo bons resultados (IGNACIO et al., 2000; LAPÈGUE et al., 2002; LAZOSKI, 2004; PIE et al., 2006; VARELA et al. 2007; REECE et al., 2008).

O DNA ribossômico nuclear (rDNA) de organismos eucarióticos é formado pelos genes 18S, 5.8S e 28S e por dois espaçamentos internos chamados de ITS 1 e 2 (*Internal Transcribed Spacer*) (HARRIS & CRANDALL, 2000). Considerando a alta variabilidade da região ITS, sequências desta região têm sido frequentemente usadas em estudos taxonômicos e filogenéticos (YU et al., 2006).

Dessa forma, tendo em vista a dificuldade existente na utilização de características morfológicas em estudos taxonômicos de ostras, a identificação e diferenciação das espécies de ostras que ocorrem no Estado do Ceará através de ferramentas biomoleculares é imprescindível para uma melhor gestão destes recursos, que possuem grande importância ecológica, econômica e social para nosso Estado.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Biologia das Ostras

A classe Bivalvia abrange moluscos comprimidos lateralmente que possuem o corpo envolvido por duas conchas, ou valvas, articuladas em sua porção dorsal por um ligamento córneo (RUPPERT & BARNES, 1996). As ostras são moluscos bivalves sésseis que habitam substratos firmes em águas costeiras rasas, com ocorrência desde a faixa equatorial até cerca de 64 °N e 44 °S na faixa de frio moderado, sendo considerada um alimento de alto valor nutritivo devido elevada concentração de proteína, minerais, glicogênio e vitaminas (GALTSOFF, 1964; WAKAMATSU, 1973).

Ostras do gênero *Crassostrea* são amplamente distribuídas ao longo da costa brasileira, onde são encontradas em ambientes estuarinos, presas a substratos duros como rochas e raízes do manguezal na zona entre marés (NASCIMENTO, 1991; RIOS, 1994). Estes bivalves recebem a seguinte classificação taxonômica (ITIS, 2008):

**Reino** Animalia

**Filo** Mollusca

**Classe** Bivalvia Linnaeus, 1758

**Subclasse** Pteriomorphia Beurlen, 1944

**Ordem** Ostreoida Waller, 1978

**Superfamília** Ostreoidea

**Família** Ostreidae Rafinesque, 1815

**Gênero** Crassostrea Sacco, 1897

A ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) apresenta uma ampla distribuição geográfica que abrange a região Sul do Caribe, Venezuela, Suriname e praticamente toda a costa do Brasil até o Uruguai (RIOS, 1994), sendo uma das principais espécies de bivalve consumida no Nordeste brasileiro.

A ostra *Crassostrea brasiliana* (LAMARCK, 1819) consiste em uma espécie estuarina de ocorrência em quase toda a costa brasileira, desde o Estado de Santa

Catarina até o Maranhão e no Estado de São Paulo é muito apreciada pelo seu sabor. A espécie vem sendo estudada e descrita na literatura por diversos autores, sendo salientada a possibilidade de manejo e cultivo (CAMPOLIM & MACHADO, 1995; GALVÃO et al., 2000; PEREIRA et al., 2000a; PEREIRA et al., 2000b).

## 2.2. Estudos Taxonômicos de Ostras na Costa Brasileira

A ostra *C. brasiliiana* foi, por décadas, confundida com *C. rhizophorae*, entretanto, diferenças na morfologia larval e no desenvolvimento destas têm sido descritas, indicando que são duas espécies biologicamente distintas (ABSHER, 1989). De acordo com este autor, *C. brasiliiana* habita apenas o infralitoral, enquanto que *C. rhizophorae* pode ser encontrada em regiões entre marés presas a costões rochosos ou raízes de mangue *Rhizophora mangle*. Uma importante característica de *C. brasiliiana* é seu grande tamanho em relação à *C. rhizophorae* (NASCIMENTO, 1991). Segundo CHRISTO (2006), a espécie *C. rhizophorae* ocorre na região entre marés e pode atingir até 10 cm de altura de concha, enquanto que, a ostra *C. brasiliiana*, conhecida como “ostra-de-fundo”, ocorre no infralitoral sendo considerada uma espécie de grande porte e podendo alcançar mais de 20 cm de altura de concha.

Embora SINGARAJAH (1980) e RIOS (1994) tenham considerado *C. brasiliiana* sinônimo de *C. rhizophorae*, IGNACIO et al. (2000) apresentaram evidências genéticas que comprovam essa diferenciação a nível específico.

LAPÈGUE et al. (2002), ao investigarem a distribuição de ostras do mangue na América do Sul verificaram a presença da espécie *Crassostrea gasar* na costa brasileira. Estes autores levantaram a hipótese de *C. brasiliiana* e *C. gasar* serem a mesma espécie.

PIE et al. (2006), através do método RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), discriminaram apenas três espécies de ostras coletadas na costa brasileira: *C. brasiliiana*, *C. rhizophorae* e *C. gigas*. VARELA et al. (2007), observaram que a sequência do gene 16S rRNA depositado no *Genbank* por PIE et al. (2006) para *C. brasiliiana* é idêntica à de *C. gasar* estudada por LAPÈGUE et al. (2002), sugerindo que se tratam de uma única espécie. Estes autores realizaram análise da sequência do

gene 16S rRNA de 120 espécimes de ostras coletadas em nove locais diferentes da costa brasileira e identificaram a presença de apenas duas espécies: *C. gasar* (= *C. brasiliiana*) e *C. rhizophorae*.

CARRIKER & GAFFNEY (1996) consideraram *C. brasiliiana* sinônimo de *Crassostrea virginica* (GMELIN, 1791). Vale salientar que, de acordo com *Integrated Taxonomic Information System* (2008) e *Bay of Found Species Information* (2008), *Crassostrea virginica* é a nomenclatura válida que deve substituir os sinônimos *C. brasiliiana* e *C. floridensis* (SOWERBY, 1870).

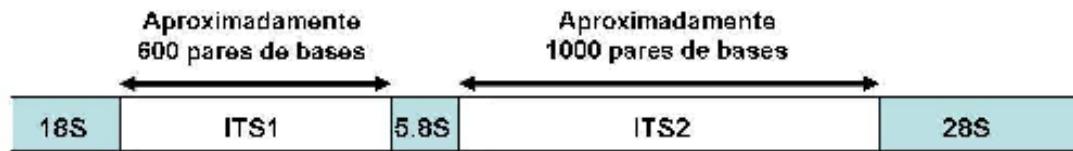
LAZOSKI (2004), após realizar estudo com marcadores moleculares nucleares e mitocondriais com cinco espécies de *Crassostrea* (*C. rhizophorae*, *C. brasiliiana*, *C. virginica*, *C. gigas* e *C. gasar*), sugere que *C. rhizophorae* e *C. brasiliiana* são as únicas, ou pelo menos as mais abundantes da costa brasileira. O autor conclui que as espécies *C. paraibensis* e *C. gasar* são, provavelmente, sinônimas de *C. brasiliiana* e que a sinonímia citada por alguns autores para *C. brasiliiana* e *C. virginica*, parece estar incorreta.

### **2.3. Utilização da Região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) em Estudos de Variabilidade Gênica**

Estudos de genética populacional de espécies marinhas têm recebido bastante atenção da comunidade científica, auxiliando o entendimento de padrões biogeográficos existentes em comunidades aquáticas (YU & CHU, 2006), e ajudando na identificação de condições ambientais adversas, que poderiam causar modificações indesejáveis na estrutura genética dos organismos e, em alguns casos, colocar em risco a sobrevivência e perpetuação da espécie.

O DNA ribossômico nuclear (rDNA) de organismos eucarióticos possui dois espaçamentos internos entre os genes 18S e 5.8S e os genes 5.8S e 28S, denominados ITS-1 e ITS-2 (*Internal Transcribed Spacer 1 and 2*), respectivamente (HILLIS & DIXON, 1991; HARRIS & CRANDALL, 2000) (Fig. 1).





**Figura 1.** DNA ribossômico nuclear de eucariotos segundo HARRIS & CRANDALL (2000), ilustrando os genes 18S, 5.8S e 28S e os espaçamentos ITS-1 e ITS-2, que tipicamente possuem cerca de 600 e 1000 pares de bases, respectivamente.

De acordo com HE et al. (2005), a região ITS do cluster ribossômico tem sido bastante utilizada em estudos filogenéticos e taxonômicos, visto que esta região apresenta uma variabilidade relativamente elevada e de fácil amplificação por termociclagem (e.g. CHU et al., 2001; MAGGIONI, 2002; TANGJINGJAI et al., 2003; NOVOA et al., 2005; CRUZ et al., 2006).

Pesquisas recentes têm utilizado a região ITS em estudos de variabilidade genética em moluscos bivalves, solucionando problemas taxonômicos existentes entre diversas espécies (e.g. INSUA et al., 2003; HE et al., 2005; YU et al., 2006; YU & CHU, 2006; REECE et al., 2008; WANG & GUO, 2008).

Considerando a importância dos moluscos bivalves, estudos que visam avaliar a variabilidade genética destes organismos em seu habitat natural são de fundamental importância para sua preservação.

#### **2.4. Caracterização dos Estuários Estudados**

A contaminação de origem antrópica em ambientes aquáticos tem contribuído para a sobre-exploração dos recursos pesqueiros e influenciando diretamente no potencial genético dos organismos aquáticos. Os principais impactos antropogênicos consistem em distúrbios nas comunidades fitoplanctônicas, deposição excessiva de matéria orgânica, hipoxia, contaminação genética de estoques selvagens, competição entre espécies, disseminação de doenças e ameaça à saúde pública (CLOERN, 2001; De JONGE et al., 2002; CURTIUS et al., 2003).

Conforme definição de PRITCHARD (1967), estuário é um corpo de água costeiro semi-fechado, com uma conexão livre com o mar aberto e dentro do qual a água marinha é diluída com a água doce proveniente da drenagem terrestre. Portanto, trata-se de ambiente naturalmente eutrofizado e capaz de suportar uma biomassa elevada de organismos, o que lhe confere importância econômica e, principalmente, ambiental.

O desenvolvimento em áreas costeiras, incluindo urbanização, agricultura intensiva e, em alguns casos, a aquicultura, pode promover alterações indesejáveis nos sistemas estuarinos. Estes problemas tornam-se cada vez mais comuns em países em desenvolvimento que, faltando tecnologia adequada para a utilização de sistemas de tratamento de águas residuais, promovem um aumento na descarga de nutrientes em ecossistemas costeiros, gerando condições de eutrofização artificial (GONZÁLEZ et al., 2008).

Outro fator que tem contribuído para a depleção dos estoques naturais de organismos aquáticos é a pressão que o extrativismo exerce sobre estes animais. De acordo com PEREIRA & SOARES-GOMES (2002), a exploração humana sobre as populações naturais e cultivadas produz impactos sobre a estrutura genética destas populações, causando uma perda de diversidade genética e podendo acarretar na quebra de conjuntos gênicos coadaptados e na perda de alelos exclusivos. A poluição marinha, gerada principalmente por fatores antrópicos, pode causar alterações na constituição genética dos organismos, trazendo danos ao material hereditário e trazendo como consequências mutações gênicas ou aberrações cromossômicas. O resultado pode ser a morte do indivíduo ou o desenvolvimento de neoplasias ou de mosaicos de células no organismo. Assim, a poluição marinha causa uma diminuição da adaptabilidade dos indivíduos afetados e pode, inclusive, representar uma ameaça à sobrevivência da população ou mesmo da espécie como um todo.

O Estado do Ceará possui 578 km de área costeira, apresentando uma grande diversidade de ecossistemas costeiros, onde predominam praias arenosas, extensos cordões de dunas e planícies flúvio-marinhas revestidas por manguezais (SEMACE, 1997).

O Estuário do Rio Pacoti (Eusébio - CE) possui aproximadamente 15 km de extensão, com 160 ha de manguezal, sendo que o decreto nº 25.778 de 15 de fevereiro de 2000 criou a Área de Proteção Ambiental do Rio Pacoti, com 2.915 ha, abrangendo os municípios de Fortaleza, Eusébio e Aquiraz (GORAYEB et al, 2005).

O Rio Pacoti é o maior dos cursos d'água que atravessam a região metropolitana de Fortaleza, estando sua nascente na vertente-oriental da Serra de Baturité, percorrendo cerca de 150 km até desembocar no mar. 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, disposição 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, 2009).

A bacia do rio Cocó (Fortaleza - CE), de acordo com o Plano Diretor de Drenagem, pode ser dividido em três grandes sub-bacias. A primeira, com uma área de 91,3 km<sup>2</sup> corresponde à parte superior do rio, controlada pelo açude do Gavião; a segunda engloba tanto a área a jusante do açude, drenada pelo próprio Cocó, como aquela drenada pelo riacho Lameirão com uma área de 230,2 km<sup>2</sup>; e a terceira compreendendo as áreas drenadas pelo rio Cocó e seu afluente rio Coaçu, com 195,7 km<sup>2</sup> (AUMEF, 1987).

O Estuário do Rio Cocó pode ser caracterizado como um ambiente fortemente impactado pelas atividades humanas ao longo da bacia de drenagem, devido aos baixos níveis de oxigênio dissolvido e altos valores de condutividade. A influência humana nas condições estuarinas se dá principalmente pela emissão de esgoto doméstico sem tratamento adequado (MOLISANI, 2005).

Tendo em vista o grande número de nichos ecológicos propiciados pela estrutura do ecossistema manguezal-estuário, utilizados por inúmeras espécies de animais, nos seus diferentes estágios de desenvolvimento, a fauna estuarina do Rio Cocó vem diminuindo gradativamente, em razão da caça e da pesca, poluição do rio e outras alterações que ocorrem na área (AUMEF, 1989).

A APA do Estuário do Rio Ceará (Fortaleza - CE), unidade de conservação de uso sustentável, criada por meio do Decreto nº 25.413, de 29 de março de 1999,

abrange uma área de 2.744,89 hectares e localiza-se na divisa dos Municípios de Fortaleza e Caucaia, a aproximadamente, 20 km do Centro de Fortaleza. Os principais problemas existentes na APA são decorrentes da ação antrópica, ocasionadas pela ocupação irregular das margens do Rio Ceará, com barracas para vendas de bebidas e alimentos, estaleiros e construções diversas, além de desmatamento, queimadas, e pesca predatória (SEMACE, 2009).

Organizações internacionais e agências ambientais reconhecem que avaliações de riscos não podem ser unicamente baseadas em análises químicas das amostras ambientais, visto que essa abordagem não fornece qualquer indicação de efeitos deletérios de mudanças ambientais sobre a biota (GRAY, 1992).

Recentemente, a utilização de marcadores moleculares tem sido proposta para identificação de condições ambientais adversas e de seus efeitos biológicos. Uma das características mais importantes dos marcadores biomoleculares é que eles têm a capacidade de identificar mudanças ambientais em níveis iniciais e, dessa forma, podem ser utilizados para prever e evitar danos de maior magnitude (CAJARAVILLE et al., 2000).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Analisar a variabilidade genética da região ITS-1 de populações de ostras *Crassostrea* sp. em estuários da costa do Estado do Ceará - Brasil.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Investigar a presença de duas espécies de ostra pertencentes ao gênero *Crassostrea* (*C.brasiliana* e *C.rhizophorae*) em estuários da costa cearense.
- Analisar a variabilidade da região ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer 1*) do *cluster* ribossômico em populações de *C. rhizophorae* coletadas nos estuários dos rios Pacoti (Eusébio - CE), Cocó (Fortaleza - CE) e Ceará (Fortaleza - CE).

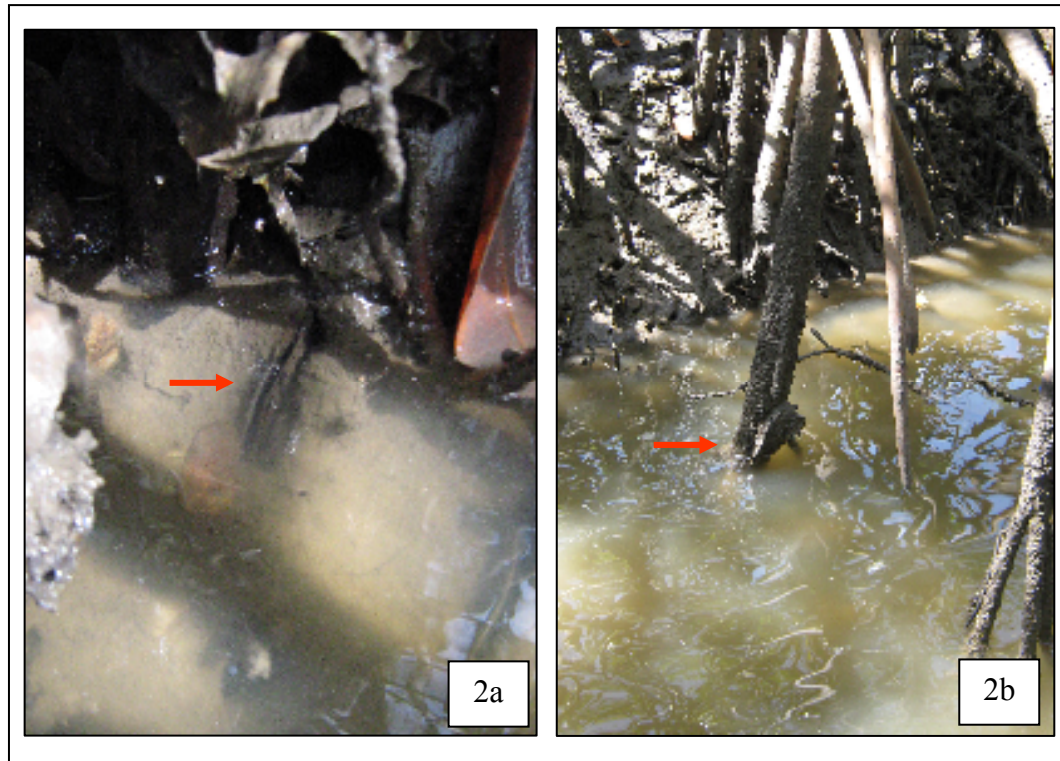
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Coleta de amostras biológicas

Exemplares da ostra nativa *C. cf. rhizophorae* foram coletados em julho de 2008 presas a raízes de *Rhizophora mangle* nos estuários dos rios Ceará (n = 30), Cocó (n = 30) e Pacoti (n = 30), totalizando 90 animais para análise de variabilidade populacional (Fig. 2). Foram coletados também espécimes de *C. cf. brasiliiana* (n = 30) enterradas na lama ou presas à troncos e raízes no Estuário do Rio Pacoti para estudo de filogenia e comparação com o primeiro grupo de ostras (Fig. 3). Os 120 animais foram transportados até o Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Diagnósticos de Enfermidades de Organismos Aquáticos – CEDECAM, do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, da Universidade Federal do Ceará – UFC, onde foi realizada a retirada de amostras do músculo adutor de cada indivíduo e conservadas em etanol MERCK® 95 % para utilização nas análises biomoleculares.



**Figura 2.** Fotografias mostrando espécimes de *C.cf.rhizophorae* presas às raízes de *R. mangle*.



**Figura 3.** Fotografias mostrando espécimes de *C.cf.brasiliana*: parcialmente enterrado no substrato (2a) e preso à raiz de *R. mangle* (2b).

A área de estudo incluiu os estuários dos Rios Pacoti (Eusébio - CE), Cocó (Fortaleza - CE) e Ceará (Fortaleza - CE). Para *C. cf. rhizophorae*, os pontos de coleta localizaram-se nas coordenadas geográficas 03° 42' 09" S e 38° 35' 53" W (Ponto 1), 03° 46' 37" S e 38° 26' 20" W (Ponto 2) e 03° 50' 02" S e 38° 25' 10" W (Ponto 3) para os estuários dos rios Ceará, Cocó e Pacoti, respectivamente. Para *C. cf. brasiliiana* o ponto de coleta localizou-se no Estuário do Rio Pacoti nas coordenadas 03° 51' 16" S e 38° 24' 36" W (Ponto 4) (Fig. 4).



**Figura 4.** Imagem de satélite mostrando os pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) nos estuários dos rios Ceará, Cocó e Pacoti.



## 4.2. Extração do DNA Total

Para extração do DNA total das amostras seguiu-se o protocolo para DNAzol<sup>®</sup> (*Invitrogen Life Technologies*), estabelecido pelo fabricante.

Inicialmente, foi colocado aproximadamente 50 mg de tecido macerado de cada animal em tubos *ependorf* de 1,5 mL, juntamente com 500 µL de DNAzol, homogeneizando através de agitação as amostras e deixando-as em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos. Decorrido este período, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm / 10 minutos para precipitação do tecido excedente e impurezas. O sobrenadante foi recuperado e colocado em novos tubos, adicionando-se 500 µL de etanol absoluto, momento em que o DNA pôde ser observado como uma nuvem branca em meio à amostra. Novamente as amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso a temperatura ambiente por 3 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 rpm / 5 minutos para precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido com 500 µL de etanol 95%, invertendo-se suavemente os tubos por seis vezes e deixando-os em repouso por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e os tubos colocados em repouso por 10 minutos para secar. Finalmente o DNA foi solubilizado com 200 µL de hidróxido de sódio (NaOH) a 8 mM, adicionando-se ainda 20 µL de Hepes 0,1 M.

Todas as amostras foram quantificadas por espectrofotometria e padronizadas por diluição para a concentração de 50 ng/µL (solução de trabalho).

## 4.3. Reação em Cadeia de Polimerase (*Polimerase Chain Reaction* – PCR)

Para amplificação de região ITS-1, cada reação de PCR foi composta de: 29 µL de água ultra pura; 1x de tampão; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de dNTP's; 0,4 µM do *primer* ITS-1 *forward*; 0,4 µM do *primer* ITS-1 *reverse*; 2,5 U da enzima Platinum<sup>®</sup>Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*<sup>®</sup>); e 50 ng de DNA, em um volume total de 50 µL de reação. Os *primers* utilizados foram: ITS1-F (5'- CAC ACC GCC CGT CGC TAC TA -3') e ITS1-R (5'- ATT TAG CTG CGG TCT TCA TC -3') (CHU et al., 2001). A região de

anelamento dos *primers* situa-se nos genes 18S e 5.8S do rDNA para ITS1-F e ITS1-R, respectivamente.

O programa usado durante a termociclagem foi composto de uma desnaturação inicial a 94 °C / 1,5 minutos, seguida de 33 ciclos de 94 °C / 20 segundos (desnaturação), 60 °C / 30 segundos (anelamento dos *primers*) e 72 °C / 30 segundos (extensão), e uma extensão final a 72 °C / 5 minutos.

Todos os produtos de PCR foram observados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, e visualizados através de um transluminador ultravioleta. Utilizou-se o marcador 1 Kb DNA Plus (INVITROGEN®). As imagens obtidas foram fotodocumentadas e arquivadas.

#### 4.5. Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados através do *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Illustra™). Em seguida, as amostras foram levadas ao Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia - LemBiotech, da Universidade Federal do Ceará – UFC, para quantificação em um espectrofotômetro de espectro completo Nanodrop® ND-1000.

A reação de sequenciamento foi realizada no Laboratório de Genética Molecular, da Universidade Federal do Ceará - UFC, utilizando-se o *DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE™ DNA Analysis Systems* (Amersham Biosciences®). De acordo com o protocolo estabelecido, a reação foi composta de 4 µL do pré-mix fornecido no kit, 0,5 µM de *primer* e 5 µL de amostra contendo 60 ng de DNA diluído em água ultrapura, totalizando um volume de 10 µL por reação. O sequenciamento foi realizado em ambos os sentidos através dos *primers* ITS-1 *forward* e ITS-1 *reverse*, com quatro repetições para cada *primer*. As amostras foram distribuídas em placas de sequenciamento e levadas ao termociclador.

O programa de termociclagem utilizado para o sequenciamento foi constituído de 25 ciclos de 95 °C / 20 segundos, 50 °C / 15 segundos e 60 °C / 1 minuto.

Após execução do programa de sequenciamento foi realizada a precipitação por isopropanol das amostras, adicionando-se 20 µL de isopropanol 80 % em cada poço da

placa, e homogeneizando-as através de um *vortex mixer*. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4.000 rpm / 50 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e descartado através de um *spin* invertido da placa. Adicionou-se 45 µL de etanol 70 % para lavagem do pellet de DNA formado, centrifugando novamente a placa a 4.000 rpm / 10 minutos a 4 °C e descartando o sobrenadante por *spin* invertido. Adicionou-se 10 µL de *MegaBACE™ loading solution* para ressuspender o DNA, homogeneizando-se vigorosamente a solução por meio de um *vortex mixer*. Finalmente, as amostras foram encaminhadas ao seqüenciador automático modelo MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences®).

#### 4.6. Análise de Variabilidade da Região ITS-1

As sequências de ITS-1 obtidas para *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae* foram editadas e alinhadas através dos programas BioEdit versão 5.0.9 (HALL, 1999) e ClustalX versão 2.0.10 (THOMPSON et al., 1997) para estudo de variabilidade interespecífica. Foram selecionadas vinte sequências de ITS-1, sendo dez para *C.cf.brasiliana* e dez para *C.cf.rhizophorae*, para a obtenção de sequências consenso de ITS-1 para as duas espécies estudadas, e para o estudo de filogenia. A qualidade das sequências foi constatada por visualização dos eletroferogramas através do programa ChromasPro versão 1.49. Sequências de ITS-1 descritas no *GenBank* para 35 indivíduos, representando 12 espécies de ostras do gênero *Crassostrea*, foram utilizadas para os alinhamentos com as sequências obtidas na presente pesquisa. Mais duas sequências de *Saccostrea glomerata* foram utilizadas para formação de um grupo externo (Tab. 1).

**Tabela 1.** Sequências de ITS-1 para *Crassostrea* retiradas do *GenBank* e incluídas nas análises filogenéticas, com as abreviações de cada espécie utilizada neste trabalho.

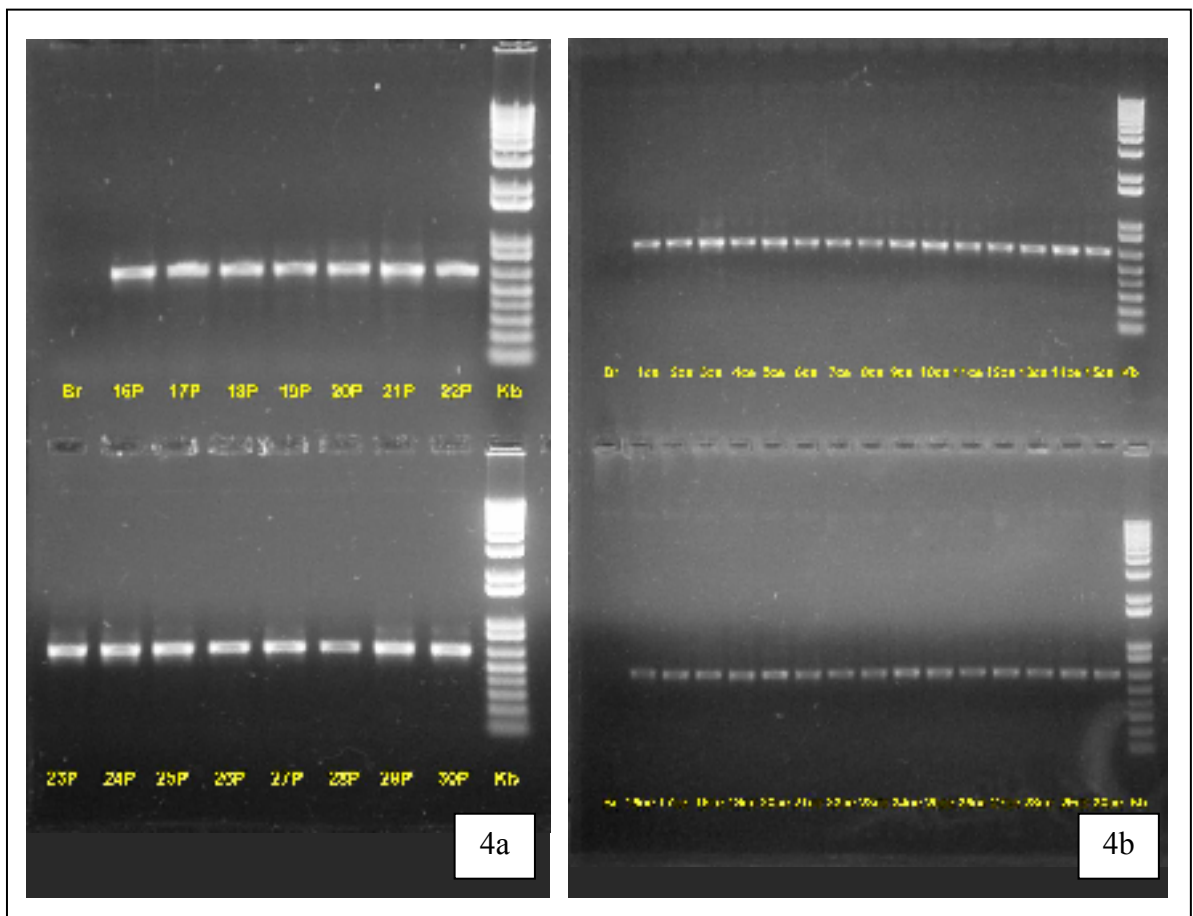
<b>Espécies</b>	<b>Quantidade de Sequências</b>	<b>Número de Acesso GenBank</b>
<i>Crassostrea angulata</i> (= C.ang)	03	FJ222346.1 FJ222350.1 FJ222352.1
<i>Crassostrea ariakensis</i> (= C.ari)	03	FJ222336.1 FJ222338.1 FJ222339.1
<i>Crassostrea belcheri</i> (= C.bel)	03	EU073248.1 EU073254.1 EU073259.1
<i>Crassostrea gigas</i> (= C.gig)	03	FJ222357.1 FJ222358.1 FJ222359.1
<i>Crassostrea gryphoides</i> (= C.gry)	03	EU073242.1 EU073245.1 EU073247.1
<i>Crassostrea hongkongensis</i> (= C. hon)	03	FJ222329.1 FJ222331.1 FJ222334.1
<i>Crassostrea iredalei</i> (= C.ire)	03	FJ222360.1 FJ222364.1 FJ222366.1
<i>Crassostrea madrasensis</i> (= C.mad)	03	EU073237.1 EU073239.1 EU073241.1
<i>Crassostrea nippona</i> (= C.nip)	03	EU072459.1 AB041760.1 AB377690.1
<i>Crassostrea rivularis</i> (= C.riv)	02	AY144598.1 DQ785895.1
<i>Crassostrea sikamea</i> (= C.sik)	03	FJ222340.1 FJ222344.1 FJ222345.1
<i>Crassostrea virginica</i> (= C.vir)	03	EU073341.1 EU073343.1 EU072460.1
<i>Saccostrea glomerata</i> (= S.glo)	02	EU073223.1 EU073224.1

Análises filogenéticas foram realizadas utilizando um *bootstrap* de 10.000 réplicas pelo método *neighbour-joining* (SAITOU & NEI, 1987) a partir do ClustalX 2.0.10. As análises também foram realizadas pelo método da máxima parcimônia através das ferramentas *Seqboot*, *Dnapars* e *Consense* do programa Phylip versão 3.68 (FELSENSTEIN, 2008), utilizando um *bootstrap* de 1.000 réplicas e 100 randomizações. Nesta análise utilizou-se a ostra *Saccostrea glomerata* como grupo externo, sendo o gênero *Saccostrea* considerado mais recente do que *Crassostrea* (BROCK, 1990). O programa utiliza o método de FITCH (1971) para contar o número de alterações de bases em uma dada árvore. As árvores filogenéticas foram visualizadas através do programa TreeView versão 1.6.6 (RODERIC, 1996).

Para análise de variabilidade genética intraespecífica de *C. rhizophorae* nos três estuários estudados, as sequências de ITS-1 obtidas, após editadas e alinhadas, foram analisadas pelo método da máxima parcimônia através do programa TCS 1.21 (CLEMENT et al., 2000). Nesta análise, tendo em vista limitações do programa TCS 1.21 para utilização de sequências com *gaps*, foram utilizadas sequências parciais (273 pares de bases) que não continham *gaps*, de vinte indivíduos, dos quais nove foram do Estuário do Pacoti, seis do Estuário do Cocó e cinco do Estuário do Ceará. A probabilidade de parcimônia foi calculada segundo TEMPLETON et al. (1992), com base em diferenças nas sequências utilizando um intervalo de confiança de 95%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as análises moleculares, a amplificação por PCR da região ITS-1 do *cluster* ribossômico foi realizada com sucesso para as 120 amostras de ostras coletadas, *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae*, gerando um *amplicon* de aproximadamente 650 pb (Fig. 5).



**Figura 5.** Eletroforese evidenciando a amplificação da região ITS-1 em ostras *C.cf.brasiliana* (4a) e *C.cf.rhizophorae* (4b). Marcador: 1 Kb DNA Plus (INVITROGEN®).

O alinhamento das dez sequências selecionadas para *C.cf.brasiliana*, gerou uma sequência consenso de ITS-1 completo com 427 pb. Para *C.cf.rhizophorae*, o alinhamento das dez sequências selecionadas, gerou uma sequência consenso de ITS-

1 completo com 439 pb (Anexo 1). Não foram encontradas sequências desta região depositadas no *GenBank* para estas espécies, tratando-se, portanto, de sequências inéditas de ITS-1 para *C.brasiliana* e *C.rhizophorae*.

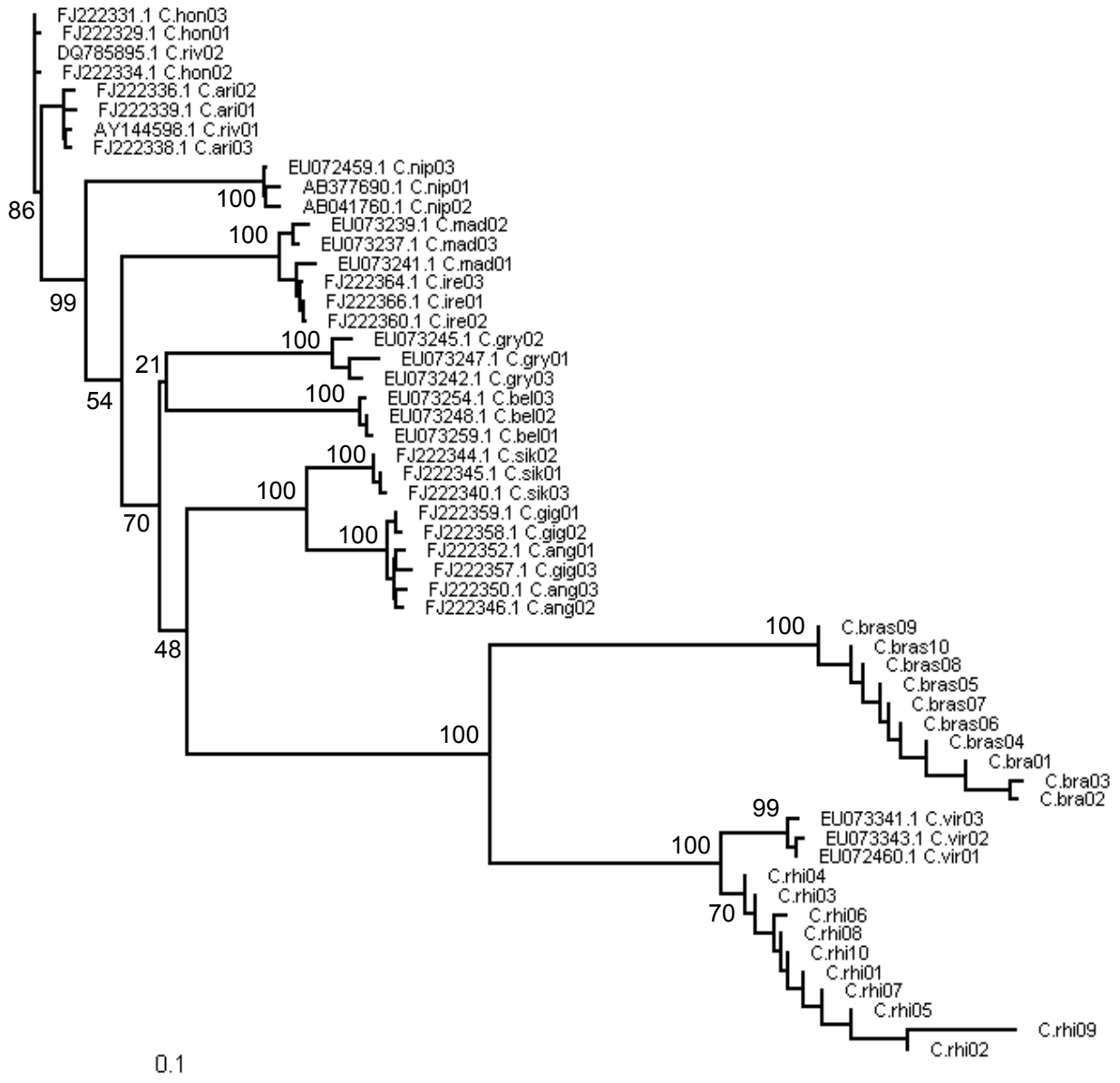
Na árvore de distância gerada pelo método *neighbour-joining* (Fig. 6) a partir do alinhamento de sequências de *C.cf.brasiliana* e de *C.cf.rhizophorae* com as sequências retiradas do *GenBank* (Tab. 1), as dez sequências de *C.cf.brasilliana* agruparam-se em sua totalidade (100%), ocorrendo o mesmo com as dez sequências de *C.cf.rhizophorae* (70%).

Ocorreu a clara separação de *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae* em grupos distintos (100%), confirmando a ocorrência de, pelo menos, duas espécies de *Crassostrea* no ambiente estuarino do Rio Pacoti-CE. VARELA et al (2007), ao estudarem filogenia de *Crassostrea* na costa brasileira, não encontraram *C.brasiliana* no Estuário do Rio Jaguaribe-CE, entretanto, os resultados encontrados na presente pesquisa sugerem a ocorrência desta espécie em nosso Estado. A mesma relação filogenética entre *C.brasiliana*, *C.rhizophorae* e *C.virginica* verificada por VARELA et al. (2007) ao estudarem a região 16S rRNA, foi observada no presente estudo com ITS-1 para *C.cf.brasiliana*, *C.cf.rhizophorae* e *C.virginica*, sugerindo que os espécimes coletados são, de fato, *C.brasiliana* e *C.rhizophorae*.

Apesar da sinonímia levantada anteriormente para estas duas espécies (SINGARAJAH, 1980; RIOS, 1994), diversos estudos comprovam esta diferenciação a nível específico (ABSHER, 1989; IGNACIO et al., 2000; LAPÈGUE et al., 2002; LAZOSKI, 2004; PIE et al., 2006; VARELA et al., 2007), corroborando o resultado encontrado na presente pesquisa.

Embora alguns autores tenham considerado *C.brasiliana* sinônimo de *C.virginica* (CARRIKER & GAFFNEY, 1996; *Integrated Taxonomic Information System*, 2008; *Bay of Found Species Information*, 2008), esta sinonímia não foi confirmada nesta pesquisa, sendo também questionada por LAZOSKI (2004). Em nosso estudo, *C.virginica* mostrou-se muito mais próxima de *C.rhizophorae*, com forte agrupamento (100%), sendo esta proximidade também observada em outros estudos (LAM & MORTON, 2003; VARELA et al., 2007). Vale salientar que estudos recentes consideraram

*C. brasiliensis* sinônimo da ostra africana do Atlântico *C. gasar* (LAPÈGUE et al., 2002; LAZOSKI, 2004; VARELA et al., 2007).



**Figura 6.** Árvore de *neighbour-joining* para o gênero *Crassostrea* baseada em sequências de ITS-1. Foi utilizado na análise um *bootstrap* de 10.000 réplicas.



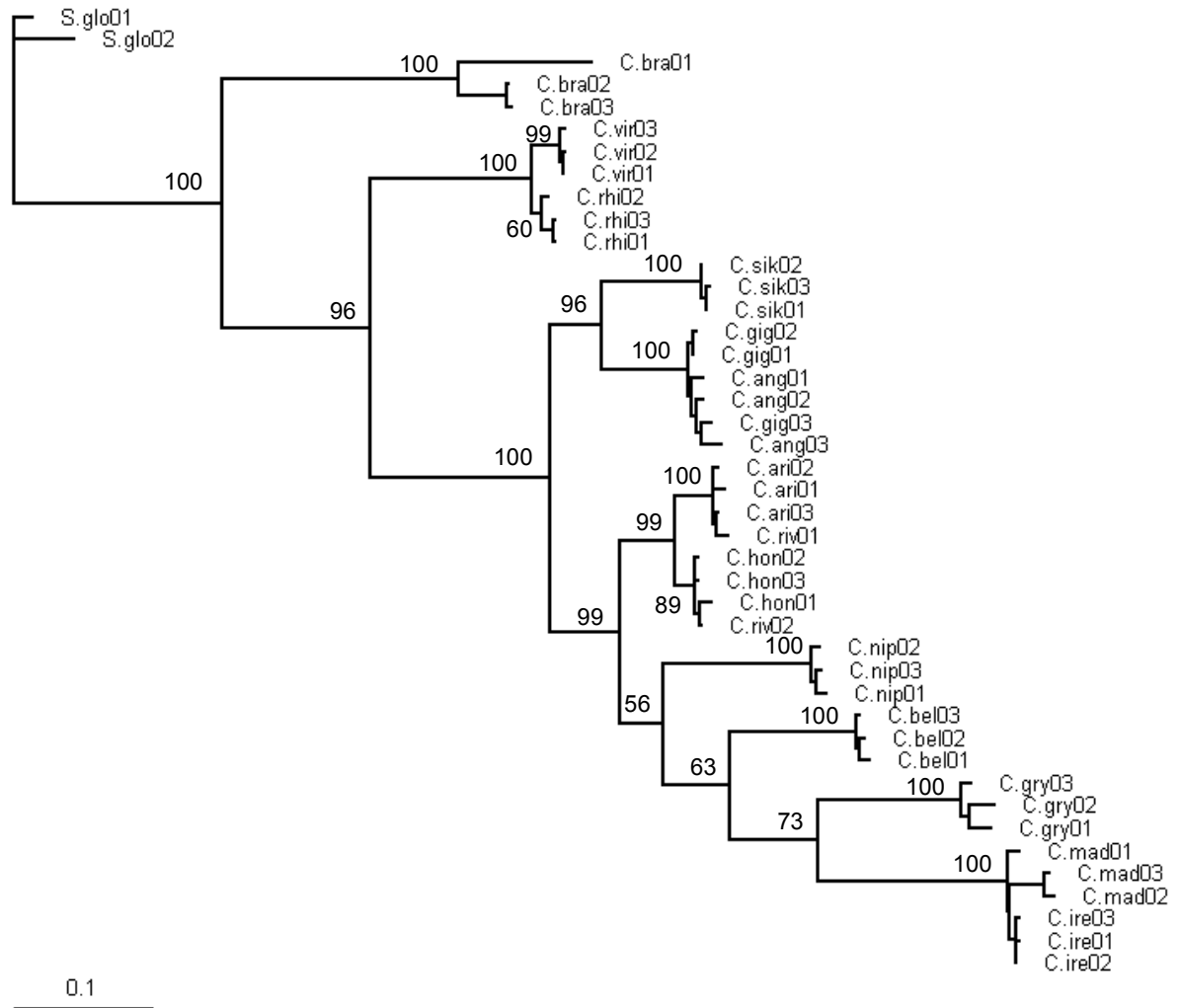
A árvore gerada pelo método da máxima parcimônia (Fig. 7), utilizando sequências de *Saccostrea glomerata* como grupo externo, mostra que as sequências de *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae* formaram um grupo monofilético com as demais espécies de *Crassostrea* em 100% das repetições geradas pelo *bootstrap*. (Anexo 2).

REECE et al. (2008) ao estudarem a filogenia de espécies asiáticas de *Crassostrea* com base em sequências de ITS-1, observaram que *C.virginica* ficou na base do ramo monofilético de *Crassostrea*. Em nosso estudo, ao incluirmos na análise sequências de *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae* juntamente com sequências das espécies asiáticas utilizadas no estudo daqueles autores, observamos que a topologia da árvore se manteve, entretanto, *C.cf.brasiliana* ocupou a base do grupo monofilético de *Crassostrea* ficando mais próxima do grupo externo (*S. glomerata*) e *C.cf.rhizophorae* formou um agrupamento com *C.virginica*.

A árvore de máxima parcimônia sugere que as espécies do continente americano *C. brasiliana*, *C. rhizophorae* e *C. virginica* podem ser mais antigas que as espécies asiáticas de *Crassostrea*. REECE et al. (2008), observaram uma topologia semelhante à encontrada no presente estudo confirmando a hipótese levantada.

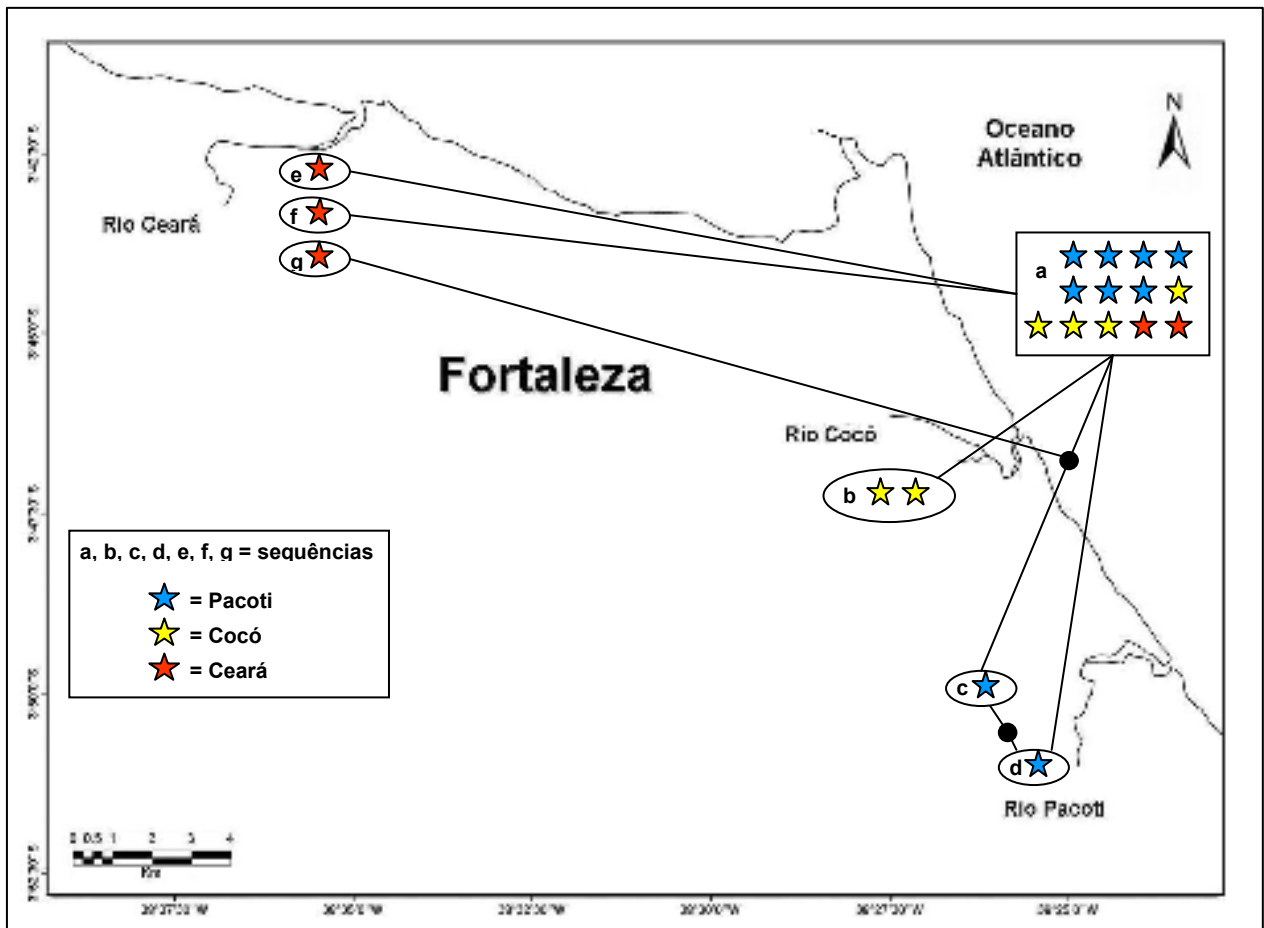
Assim como na árvore de *neighbour-joining*, a de máxima parcimônia também mostra a separação dos exemplares de *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae* em ramos distintos (100%), evidenciando o forte sinal filogenético observado na análise. Novamente, observa-se a proximidade entre a ostra nativa *C.cf.rhizophorae* e a ostra americana *C.virginica* com 100% de agrupamento. WANG & GUO (2008), estudando polimorfismos da região ITS em ostras pelo método RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), verificaram que não foi possível diferenciar *C.rhizophorae* de *C.virginica*. Em nosso estudo, a separação destas espécies em ramos distintos evidencia o potencial na utilização de sequências de ITS-1 para diferenciação de espécies.

A confirmação da ocorrência de duas espécies distintas de ostras do gênero *Crassostrea* nos estuários do Estado do Ceará é de grande importância para uma melhor gestão destes recursos, ressaltando o potencial de *C.brasiliana* para ostreicultura local em vista do grande tamanho alcançado por esta espécie.



**Figura 7.** Árvore de máxima parcimônia baseada em sequências de ITS-1 para os gêneros *Crassostrea* e *Saccostrea* (grupo externo). Foi utilizado na análise um *bootstrap* de 1.000 réplicas e 100 randomizações.

A análise de máxima parcimônia para variabilidade intraespecífica de *C.cf.rhizophorae* nos três estuários estudados mostrou a formação de 7 sequências para *C.cf.rhizophorae*: a, b, c, d, e, f, g (Fig. 8). No estuário do Pacoti ocorreu a presença de duas sequências exclusivas “c” e “d”, no Estuário do Cocó a sequencia exclusiva “b”, e no Estuário do Ceará as sequências exclusivas “e”, “f” e “g”. Embora tenha sido utilizado um pequeno número amostral, a formação de sequências únicas pode indicar a formação de populações residentes em cada um dos estuários analisados.



**Figura 8.** Distribuição de sequências de *C.cf.rhizophorae* nos estuários dos rios Pacoti, Cocó e Ceará.

Todas estas sequências encontraram-se interligadas com a sequência “a”, presente em todos os estuários com maior frequência que as demais. A relação existente entre as sequências encontradas nos três estuários sugere a presença de fluxo genético entre as populações, o que provavelmente ocorre devido a presença da corrente Sul-Equatorial. Essa informação é reforçada pelo fato de que ostras do gênero *Crassostrea* possuem larvas pelágicas que se dispersam por aproximadamente duas semanas percorrendo cerca de 1300 Km (De PAULA et al., 2008), e que a maior distância de linha de costa entre os estuários analisados não ultrapassa 30 km.

HILLIS & DIXON (2001) afirmam que sequências de ITS possuem uma baixa variabilidade dentro da espécie e uma alta variabilidade entre espécies. Em nosso estudo, verificou-se que esta região do rDNA apresentou uma considerável variabilidade para *C.rhizophorae* coletadas em regiões bastante próximas uma da outra, sugerindo a utilização desta região para estudos populacionais de ostras.

## 6. CONCLUSÕES

- Ocorrem em estuários da costa cearense, pelo menos, duas espécies de ostras para o gênero *Crassostrea*, provavelmente *C.rhizophorae* e *C.brasiliana*.
- O presente estudo sugere que as sinonímias citadas por alguns autores entre *C. brasiliana* e *C. rhizophorae* e entre *C. brasiliana* e *C. virginica* estão incorretas.
- *C. brasiliana* parece ser a mais antiga das ostras do gênero *Crassostrea* consideradas no estudo, seguida das espécies *C. rhizophorae* e *C. virginica*.
- A formação de sequências exclusivas pode indicar a formação de populações residentes de *C. rhizophorae* em cada um dos estuários analisados.
- A relação existente entre as sequências encontradas nos três estuários sugere a presença de fluxo genético entre as populações de *C. rhizophorae*.
- A região ITS-1 do rDNA mostrou-se adequada para estudos populacionais de ostras, apresentando uma considerável variabilidade intraespecífica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSHER, T. M. Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná – desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento. *Ph.D. Thesis, Oceanography Institute*, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

AUMEF - AUTARQUIA MUNICIPAL DE FORTALEZA. Análise do diagnóstico ambiental da área de proteção ambiental do rio Cocó. Fortaleza, 1987.

AUMEF - AUTARQUIA MUNICIPAL DE FORTALEZA. Proposta de ampliação das faixas de proteção da sub-bacia B2-Rio Cocó. Fortaleza: Secretaria de Desenvolvimento Urbano, 18p., 1989.

BARNES, R. D.; HARRISON, F. W. Introduction to the Mollusca, 1994. In: Harrison, F. W. & Kohn, A. J. (eds.) *Microscopic anatomy of invertebrates*. Wiley Liss, New York, USA, v.5, p. 1-12.

BAY OF FUNDY SPECIES INFORMATION. Disponível em: <http://www.marinebiodiversity.ca/BayOfFundy/speciesInfo.jsp?speciesInfo=Crassostrea%20floridensis>. Acesso em: 07 de maio de 2008.

BROCK, V. Intergeneric distances between *Ostrea*, *Crassostrea*, and *Saccostrea*, studied by means of crossed immunoelectrophoresis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 68:59-63, 1990.

BROWN, M.; DAVIES, I. M.; MOFFAT, C. F.; CRAFT, J. A. Application of SSH and a macroarray to investigate altered gene expression in *Mytilus edulis* in response to exposure to benzo[a]pyrene. *Marine Environmental Research* 62 P.128-135, 2006.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal

environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment* 247, p.295-311, 2000.

CAMPOLIM, M. B.; MACHADO I. C. Manejo de Bancos Naturais de Ostras, Depuração e Comercialização. Projeto aprovado e financiado pelo Programa de Execução Descentralizada/PNMA/MMA, Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, 1995.

CARRIKER, M. R.; GAFFNEY, P. M. A catalogue of selected species of living oysters (*Ostreacea*) of the world, 1996. In: VARELA, E. S.; BEASLEY, C. R.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; MARQUES-SILVA, N. S.; TAGLIARO, C. H. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. *Journal of Molluscan Studies*, p.1-6, 2007.

CHRISTO, S. W. Biologia Reprodutiva e Ecologia de Ostras do Gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil): Um Subsídio ao Cultivo. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia. Universidade Federal do Paraná, Tese de Doutorado, 146 p., 2006.

CHU, K. H.; LI, C. P.; HO, H. Y. The First Internal Transcribed Spacer (ITS-1) of Ribosomal DNA as a Molecular Marker for Phylogenetic and Population Analyses in Crustacea. *Mar. Biotechnol.* 3, p. 355-361, 2001.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9 (10): 1657-1660, 2000.

CLOERN, J. E. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 210, 223-253, 2001.

CRUZ, D. O.; JORGE, D. M. M.; PEREIRA, J. O. P.; TORRES, D. C.; SOARES, C. E. A.; FREITAS, B. M.; GRANGEIRO, T. B. Intraspecific variation in the first internal transcribed spacer (ITS-1) of the nuclear ribosomal DNA in *Melipona subnitida*

(Hymenoptera, Apidae), an endemic stingless bee from northeastern Brazil. *Apidologie* 37, p.376–386, 2006.

CURTIUS, A. J.; SEIBERT, E. L.; FIEDLER, H. D.; FERREIRA, J, F.; VIEIRA, P. H. F. Avaliando a contaminação por elementos traço em atividades de maricultura: resultados parciais de um estudo de caso realizado na ilha de Santa Catarina, Brasil. *Quím. Nova*, jan./fev., vol.26, n.1, p.44-52, 2003.

DANTAS NETO, M. P. A ostreicultura como atividade sustentável em Fortim, Ceará. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – Ceará, 98p., 2001.

DAVID, E.; TANGUY, A.; PICHAVANT, K.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal* 272, p.5635–5652, 2005.

De JONGE, V. N.; ELLIOTT, M.; ORIVE, E. Causes, historical development, effects and future challenges of a common environmental problem: eutrophication, *Hydrobiologia* 475/476, 1–19, 2002.

De PAULA, N. R. F.; GOMES, L. A.; MELO, A. G. C.; BEASLEY, C. R.; TAGLIARO, C. H. Estudos populacionais de *Crassostrea gasar* do Pará e do Maranhão usando o gene COI. *Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética*. Bahia Othon Palace Hotel, Salvador – BA, Brasil, 16 a 19 de setembro de 2008.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. State of World Aquaculture: 2006. Rome, 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/009/a0874e/a0874e00.htm>. Acesso em: 15 de março de 2009.



FELSENSTEIN, J. Phylogeny Inference Package - PHYLIP version 3.68. Department of Genome Sciences and Department of Biology University of Seattle - W.A, USA, 2008.

GALVÃO, M. S. N. PEREIRA, O. M.; MACHADO, I. C.; HENRIQUES, M. B. Aspectos reprodutivos da ostra *Crassostrea brasiliana* de manguezais do estuário de Cananéia (25o S; 48o W). Bol. Inst. Pesca, 26(2): 27-42, 2000.

GONZÁLEZ, F. U. T.; HERRERA-SILVEIRA, J. A.; AGUIRRE-MACEDO, M. L. Water quality variability and eutrophic trends in karstic tropical coastal lagoons of the Yucatán Peninsula. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76, 418-430, 2008.

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*, Uberlândia, 17 (33):143-152, dezembro de 2005.

GRAY, J. S. Biological and ecological effects of marine pollutants and their detection. *Mar. Pollut. Bull.* 25, p. 48-50, 1992.

HALL T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98, 1999.

HARRIS, D. J.; CRANDALL, K. A. Intragenomic Variation Within ITS-1 and ITS-2 of Freshwater Crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for Phylogenetic and Microsatellite Studies. *Mol. Biol. Evol.* 17(2):284–291, 2000.

HE, M.; HUANG, L.; SHI, J.; JIANG, Y. Variability of Ribosomal DNA ITS 2 and Its Utility in Detecting Genetic Relatedness of Pearl Oyster. *Marine Biotechnology* v.15, p. 40-45, 2005.

HEDGECOCK, D.; OKAZAKI, N. B. Genetic diversity within and between populations of American oysters (*Crassostrea*). *Malacologia* 25, p.535-549, 1984.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66 (4): 411-453, 1991.

IGNACIO, B. L., ABSHER T. M., LAZOSKI C., SOLÉ-CAVA A. M. Genetic evidence for the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. *Marine Biology* 136: 987-991, 2000.

INSUA, A.; LÓPEZ-PIÑÓN, M. J.; FREIRE, R.; MÉNDEZ, J. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae). *Genome* 46, p.595-604, 2003.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM – ITIS. Disponível em: [http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=7988](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=7988)  
1. Acesso em: 06 de maio de 2008.

LAM, K.; MORTON, B. Mitochondrial DNA and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta, Hong Kong, China. *Aquaculture* 228, p.1 –13, 2003.

LAPÈGUE, S.; BOUTET, I.; LEITÃO, A.; HEURTEBISE, S.; GARCIA, P.; THIRIOT-QUIÉVREUX, C.; BOUDRY, P. Trans-Atlantic Distribution of a Mangrove Oyster Species Revealed by 16S mtDNA and Karyological Analyses. *Biol. Bull.* 202, p.232–242, June 2002.

LAZOSKI, C. Sistemática molecular e genética populacional de ostras brasileiras (*Crassostrea* spp.). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Genética, 145p. 2004.

MAGGIONI, R. Evolutionary genetics of the *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* (crustacea: decapoda: penaeidae) from the brazilian coast. School of Biological Sciences / School of Ocean and Earth Science – University of Southampton, PhD Thesis, 99p. September 2002.

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.

NASCIMENTO, I. A. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *Crassostrea brasiliana* (Lamarck) in South and Central America. In: Estuarine and marine bivalve mollusk culture. (W. Menzel, ed.), 125–134. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991.

NOVOA, B.; POSADA, D.; FIGUERAS, A. Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *Journal of Fish Diseases* 28, p.331–338, 2005.

NUNES, A. J. P.; PARSONS G. J. Dynamics of tropical coastal aquaculture systems and the consequences to waste production. *World Aquaculture*, Baton Rouge, Louisiana-USA, v.29, n.2, p. 27-37, June 1998.

PEREIRA, O. M.; GELLI, V. C.; HENRIQUES, M. B.; MACHADO, I. C.; BASTOS A. A. Programa de desenvolvimento da criação ordenada de moluscos bivalves no Estado de São Paulo. São Paulo, Instituto de Pesca, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Série Relatórios Técnicos 02, 27p., 2000b.

PEREIRA, O. M.; MACHADO, I. C.; HENRIQUES, M. B.; GALVÃO, M. S. N.; BASTOS A. A. Avaliação do estoque da ostra *Crassostrea brasiliana* (LAMARCK, 1819) em bosques de manguezal da região estuário-lagunar de Cananéia (025°S; 048°W). *Bol. Inst. Pesca*, 26(1):17-31, 2000a.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. *Biologia Marinha*. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 382 p., 2002.

PIE, M. R.; RIBEIRO, R. O.; BOEGER, W. A.; OSTRENSKY, A.; FALLEIROS, R. M.; ANGELO, L. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. *Aquaculture Research* 37, p.1598-1600, 2006.

PLEJDRUPA, J. K.; SIMONSEN, V.; PERTOLDIC, C.; SCHØYEND, M.; BAYLEY, M. Genetic and morphological diversity in populations of *Nucella lapillus* (L.; neogastropoda) in response to tributyltin contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, p.146–154, 2006.

PRITCHARD, D. W. What is an estuary: a physical viewpoint. *American Association for the Advancement of Science*, 83, p.3-5, 1967.

REECE, K. S.; CORDES, J. F.; STUBBS, J. B.; HUDSON, K. L.; FRANCIS, E. A. Molecular phylogenies help resolve taxonomic confusion with Asian *Crassostrea* oyster species. *Mar. Biol.* 153:709–721, 2008.

RIOS, E. C. *Seashells of Brazil*. Editora da Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande - RS, 2ª Edição, 368p., 1994.

RODERIC, D. M. *Computer Applications in the Biosciences*, 12 p.357–358, 1996.

RUPPERT, E. E. & BARNES, R. D. *Zoologia dos invertebrados*. 6. ed. São Paulo: Roca, 1029p., 1996.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425, 1987.

SEMACE - SUPERINTENDÊNCIA ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. Diagnóstico sócio-ambiental da costa leste do Estado do Ceará. Fortaleza, 1997.

SEMACE - SUPERINTENDÊNCIA ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. APA do Estuário do Rio Ceará. Disponível em: <http://www.semace.ce.gov.br/biblioteca/unidades/APARioCeara.asp>. Acesso em: 10 de março de 2009.

SEMACE - SUPERINTENDÊNCIA ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. APA do Estuário do Rio Ceará. Disponível em: <http://www.semace.ce.gov.br/biblioteca/unidades/APARioPacoti.asp>. Acesso em: 14 de março de 2009.

SINGARAJAH, K. V. On the taxonomy, ecology and physiology of a giant oyster, *Crassostrea paraibanensis*, a new species. *Bulletin of Marine Science* 30, p.833–847, 1980.

TACK J. F.; BERGHE E.; POLK P. H. Ecomorphology of *Crassostrea cucullata* (Born, 1778) (Ostreidae) in a mangrove creek (Gazi, Kenya). *Hydrobiologia* 247:109–117, 1992.

TANGJINGJAI, W.; VERAKALASA, P.; SITTIPRANEED, S.; KLINBUNGA, S.; LEKPRAYOON, C. Genetic differences between *Tropilaelaps clareae* and *Tropilaelaps koenigerum* in Thailand based on ITS and RAPD analyses. *Apidologie* 34, p.513–524, 2003.

TEMPLETON, A. R.; CRANDALL, K. A.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633, 1992.

THOMPSON J. D.; GIBSON T. J.; PLEWNIAK F.; JEANMOUGIN F.; HIGGINS D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882, 1997.

VARELA, E. S.; BEASLEY, C. R.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; MARQUES-SILVA, N. S.; TAGLIARO, C.H. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. *Journal of Molluscan Studies*, p.1-6, 2007.

WAKAMATSU, T. A ostra de Cananéia e seu cultivo. São Paulo, Superintendência do Desenvolvimento do Litoral Paulista / Instituto Oceanográfico USP, 141p., 1973.

WANG, Y.; XU, Z.; GUO, X. Differences in the rDNA-Bearing Chromosome Divide the Asian-Pacific and Atlantic Species of *Crassostrea* (Bivalvia, Mollusca). *Biol. Bull.* 206: 46–54, February 2004.

WANG, Y.; GUO, X. ITS Length Polymorphism in Oysters and ITS Use in Species Identification. *Journal of Shellfish Research*, Vol. 27, n. 3, 489–493, 2008.

YU, D. H., CHU, K. H. Low genetic differentiation among widely separated populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* as revealed by AFLP. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 333, p.140–146, 2006.

YU, D. H.; JIA, X.; CHU, K. C. Common pearl oysters in China, Japan, and Australia are conspecific: evidence from ITS sequences and AFLP. *Fisheries Science* 72 : p.1183-1190, 2006.

**ANEXO 1 – Sequências Consenso de ITS-1 Completo para *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae*, obtidas na presente pesquisa.**

```
>ITS1 Completo C.brasiliana (427 bp)|
TTA ACA AAA ACA AAA CGG TGA CAA CCT AAT GAC GGA ATG TCG TTC AAA TAC
AGT CGG ACC GAC CTC CCA ACT TCC AGT CCA CCG CCT GCG ACC AGG TCG CGG
CGG CGG CGG GAG GGG TCC GGC GCC TCG CTC GGG AAA ACG GGC GCC TTG GGC
CGT CGC AGC GAA AGC TCC GTC GCC TTA AGT TCA GAC AGG CTC GAC CGG CAG
ACC CCG GGC CAT CGG AAC GGT GGG TCG CAA AAA CAC TTT TAA CCG CTC GGC
ATC GTC GGT AGG TTG GCA CCG ATG TTG TAA GCA CCC GAG TAT GTA CTT CTT
CGA GTA TAC GAG ACA TTT CAG ACA AGA AAA ACG AGG GTT TAC CCC CTC GGG
GGT CGA GCC CGG CGT ACC TCG TTG CGC GCC GCT GGC CGA CCC GAA TGG CAA
AAG AAA AGC TTA TTT TGA C
```

```
>ITS1 Completo C.rhizophorae (439bp)
TTA ACA AAA CAA AAT TTC GAT CAT GCG ATC GAA ACT GGT GAC AAA CAC GTC
AGA ATG GCA AAC CGA AAA TGT CGG ACC GGC CCC CCT CGA CGC GAC CAG GTC
GCG CAG GGG GGC CAG GAG GGG TTC GGC GAC TCG CCG GGG GTT TTT TCC TCC
GGC GCT TTG GGC CGT CGC AGC CGC CTA GGC TCC GTC GCC TTA AGT ACA GAC
GAG GCT CGA CCG CGA CCC CGG GCC TTC GGA ACG GTG GGT CGC TTC AAA TGA
ACC GCT CGG CAT CGT CGG TAG GTT GGC ACC GAT GTT ATA AGC ACC CGA GTA
TGT ACT TCC TCA CGT ATA CAA AAA TTC ATT GCA AAA AAA CAA AGG AGG GGA
TGG GAA AGC CCC TCG GTC GTT TGC CCG GCG TTC TTC GTT GCG CGC CGC GGC
CGA CCG AAC TAT TAC TGT GAC CAT ATG TGA C
```

**ANEXO 2 – Alinhamento das sequências de ITS-1 para *C.cf.brasiliana* e *C.cf.rhizophorae* obtidas na presente pesquisa com sequências descritas no *GenBank* para o gênero *Crassostrea* e utilizadas na análise de máxima parcimônia.**

CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment

```

FJ222329.1_C.hon01      TTAACAAAAA-----GCAA-TCGGGCTCGTTGGCA-GAGCA-
FJ222331.1_C.hon03      TTAACAAAAA-----GCAA-TCGGGCTCGTTGGCA-GAGCA-
DQ785895.1_C.riv02      TTAACAAAAA-----GCAA-TCGGGCTCGTTGGCA-GAGCA-
FJ222334.1_C.hon02      TTAACAAAAA-----GCAA-TCGGGCTCGTTGGCA-GAGCA-
AY144598.1_C.riv01      TTAACAAAAA-----GCAAATCGGGCTCGTTGGCA-GAGCA-
FJ222338.1_C.ari03      TTAACAAAAA-----GCAAATCGGGCTCGTTGGCA-GAGCA-
FJ222339.1_C.ari01      TTAACGAAAA-----GCAAATCGGGCTCGTTGGCA-GAGCA-
FJ222336.1_C.ari02      TTAACAAAAA-----GCAAATCGGGCTCGTTGGCA-GAGCA-
FJ222366.1_C.ire01      TTAACAAAAGAGATCTAAAAA-TCGGGCTCGTTGGCAAGAGCA-
FJ222360.1_C.ire02      TTAACAAAAGAGATCTAAAAA-TCGGGCTCGTTGGCAAGAGCA-
FJ222364.1_C.ire03      TTAACAAAAGAGATCTAAAAA-TCGGGCTCGTTGGCAAGAGCA-
EU073241.1_C.mad01      TTAACAAAAGAGATCTAAAAA-TCGGGCTCGTTGGCAAGAGCA-
EU073239.1_C.mad02      TTAACAAAAGAGATCTAAAAAATCGGGCTCGTTGGCAAGAGCA-
EU073237.1_C.mad03      TTAACAAAAGAGATCTAAAAA-TCGGGCTCGTTGGCAAGAGCA-
EU073259.1_C.bel01      TTAACAAAAA-----AAAA-TCGGGCTCGTTGGCA-GAGCA-
EU073254.1_C.bel03      TTAACAAAAA-----AAAAATCGGGCTCGTTGGCA-GAGCA-
EU073248.1_C.bel02      TTAACAAAAA-----AAAAATCGGGCTCGTTGGCA-GAGCA-
EU073247.1_C.gry01      TTAACAAAAAG---CAAGCAATCGGGCTCGTTGGTA-GAGCA-
EU073242.1_C.gry03      TTAACAAAAA-G---CAAGCAATCGGGCTCGTTGGTA-GAGCA-
EU073245.1_C.gry02      TTAACAAAAAG---CAAGCAATCGGGCTCGTTGGTA-GAGCA-
AB377690.1_C.nip01      TTAACAAAAA-----AAGCATCGGGCTCGTCGGCA-GAGCA-
AB041760.1_C.nip02      TTAACAAAAA-----AAGCATCGGGCTCGTCGGCA-GAGCA-
EU072459.1_C.nip03      TTAACAAAAA-----AAGCATCGGGCTCGTCGGCA-GAGCA-
FJ222345.1_C.sik01      TTAACAAAAA-----AACATCGGGGCTCGTTGGCA-GAGCAA
FJ222340.1_C.sik03      TTAACAAAAA-----AACATCGGGGCTCGTTGGCA-GAGCAA
FJ222344.1_C.sik02      TTAACAAAAA-----AACATCGGGGCTCGTTGGCA-GAGCAA
FJ222359.1_C.gig01      TTAACAAAAC-----AAAATCGGGGCTCGTTGGCA-GAGCGA
FJ222358.1_C.gig02      TTAACAAAAC-----AAAATCGGGGCTCGTTGGCA-GAGCGA
FJ222352.1_C.ang01      TTAACAAAAA-----CAAATCGGGGCTCGTTGGCA-GAGCGA
FJ222350.1_C.ang03      TTAACACAAA-----AAATCGGGGCTCGTTGGCA-GAGCGA
FJ222357.1_C.gig03      TTAACAAAAA-----ACAATCGGGGCTCGTTGGCA-GAGCGG
FJ222346.1_C.ang02      TTAACACAAA-----A-AATCGGGGCTCGTTGGCA-GAGCGA
C.rhi01                  TTAACAAAAC-----AAAATTTTCGATCAT-----GCGA
C.rhi03                  TTAACAAAAC-----AAAATTTTCGATCAT-----GCGA
C.rhi02                  TTAACAAAAC-----AAMATTTTCGATCAT-----GCGA
EU072460.1_C.vir01      TTAACAAAAC-----AAAATTTTCGATCAT-----GCGA
EU073343.1_C.vir02      TTAACAAAAC-----AAAATTTTCGATCAT-----GCGA
EU073341.1_C.vir03      TTAACAAAAC-----AAAATTTTCGATCAT-----GCGA
C.bra01                  TTAACAAAAC-----AAAACGGTG-----ACAA
C.bra03                  TTAACAAAAC-----AAAACGGTG-----ACAA
C.bra02                  TTAACAAAAC-----AAAACGGTG-----ACAA
EU073224.1_S.glo01      TTAACAAAAG-----ACAATGG-G-----GCAA
EU073223.1_S.glo02      TTAACAAAACA-----A-AATGG-G-----GCAA
***** * * *

```



```

FJ222329.1_C.hon01      CCGAG-CAAGGGCAACGAAAAAC---AACACAGCCGAGGGG-TTGCTGCTGTTTGGCACAA
FJ222331.1_C.hon03      CCGAG-CAAGGGCAACGAAAAAC---AACACAGCCGAGGGG-TTGCTGCTGTTTGGCACAA
DQ785895.1_C.riv02      CCGAG-CAAGGGCAACGAAAAAC---AACACAGCCGAGGGG-TTGCTGCTGTTTGGCACAA
FJ222334.1_C.hon02      CCGAG-CAAGGGCAACGAAAAAC---AACACAGCCGAGGGG-TTGCTGCTGTTTGGCACAA
AY144598.1_C.riv01      CCGAGGCAAGGGCAACGAAAAA-----CACAGCCGAGGGG-TTGCTGC-----ACAA
FJ222338.1_C.ari03      CCGAGGCAAGGGCAACGAAAAA-----CACAGCCGAGGGG-TTGCTGC-----ACAA
FJ222339.1_C.ari01      CCGAGGCAAGGGCAACGAAAAA-----CACAGCCGAGGGG-TTGCTGC-----ACAA
FJ222336.1_C.ari02      CCGAGGCAAGGGCAACGAAAAA-----CACAGCCGAGGGG-TTGCTGC-----ACAA
FJ222366.1_C.ire01      CCGA----GGGGCAAGAAAA---AA-CACAGCCGAGGGGGTTGCTGCTGTTTGGACAA
FJ222360.1_C.ire02      CCGA----GGGGCAAGAAAA---AA-CACAGCCGAGGGGGTTGCTGCTGTTTGGACAA
FJ222364.1_C.ire03      CCGA----GGGGCAAGAAAA---AA-CACAGCCGAGGGGGTTGCTGCTGTTTGGACAA
EU073241.1_C.mad01      CCGA----GGGGCAAGAAAA---AAACACAGCCGAGGGGGTTGCTGCTGTTTGGACAA
EU073239.1_C.mad02      CCGA----GGGGCAAGAAAA---AA-CACAGCCGAGGGGGTTGCTGCTGTTTGGACAA
EU073237.1_C.mad03      CCGA----GGGGCAAGAAAA---AA-CACAGCCGAGGGGGTTGCTGCTGTTTGGACAA
EU073259.1_C.bel01      CCGAC--AAGGGCAAAAAGAACGAGAAAACACAGCCGAGGGTTTTGGCTGCTGTTT-----T
EU073254.1_C.bel03      CCGAC--AAGGGCAAAAAGAACGAGAAAACACAGCCGAGGGTTTTGGCTGCTGTTT-----T
EU073248.1_C.bel02      CCGAC--AAGGGCAAAAAGAACGAGAAAACACAGCCGAGGGTTTTGGCTGCTGTTT-----T
EU073247.1_C.gry01      CCGAC--AAGGGCAAAAAGAACGAGAAAACAGAAAACACAGCCGAGGGGGTTGCTGATGTTCAAGAGAC
EU073242.1_C.gry03      CCGAC--AAGGGCAAAAAGAACGAGAAAACAGAAAACACAGCCGAGGGGGTTGCTGATGTTCAAGAGAC
EU073245.1_C.gry02      CCGAC--AAGGGCAAAAAGAACGAGAAAACAGAAAACACAGCCGAGGGGGTTGCTGATGTTCAAGAGAC
AB377690.1_C.nip01      CCGAG--GACGGCAACGAAAAC---GAAACACAGCCGAGGGG-TTGCTGCTGTTT-----
AB041760.1_C.nip02      CCGAG--GACGGCAACGAAAAC---GAAACACAGCCGAGGGG-TTGCTGCTGTTT-----
EU072459.1_C.nip03      CCGAG--GACGGCAACGAAAAC---GAAACACAGCCGAGGGG-TTGCTGCTGTTT-----
FJ222345.1_C.sik01      CCGA----AGGGCAACGAAAAC---AAAACACAGCCGAGGGG-TTGTTTTTGGCAAAACAAAA
FJ222340.1_C.sik03      CCGA----AGGGCAACGAAAAC---AAAACACAGCCGAGGGG-TTGTTTTTGGCAAAACAAAA
FJ222344.1_C.sik02      CCGA----AGGGCAACGAAAAC---AAAACACAGCCGAGGGG-TTGTTTTTGGCAAAACAAAA
FJ222359.1_C.gig01      CCGAG---AGGCTAACGCAA---AAACACAGCCGAGGG---TTGTTGTT-----
FJ222358.1_C.gig02      CCGAG---AGGCTAACGCAA---AAACACAGCCGAGGG---TTGTTGTT-----
FJ222352.1_C.ang01      CCGAG---AGGCTAACGCAA---AAACACAGCCGAGGG---TTGTTGTT-----
FJ222350.1_C.ang03      CCGAG---AGGCTAACGCAA---AA-CACAGCCGAGGG---TTGTTGTT-----
FJ222357.1_C.gig03      CCGAG---AGGCTAACGCAA---AA-CACAGCCGAGGG---TTGTTGTT-----
FJ222346.1_C.ang02      CCGAG---AGGCTAACGCAA---AA-CACAGCCGAGGG---TTGTTGTT-----
C.rhi01                  TCGAA--ACTGGTGACAAA-----CACGTCAGAATGGCAAACCG-----
C.rhi03                  TCGAA--ACTGGTGACAAA-----CACGTCAGAATGGCAAACCG-----
C.rhi02                  TCGAA--ACTGGTGACAAA-----CACGTCAGAATGGCAAACCG-----
EU072460.1_C.vir01      TCGAA--AC-GGTGACAAA-----CACGTCAGAATGGCAAACCA-----
EU073343.1_C.vir02      TCGAA--AC-GGTGACAAA-----CACGTCAGAATGGCAAACCA-----
EU073341.1_C.vir03      TCGAA--AC-GGTGACAAA-----CACGTCAGAATGGCAAACCA-----
C.bra01                  CCTAA---TGACGGAATGTC---GTTCAAATACAGTCG--GACCG-----
C.bra03                  CCTCA---TGACGGAATGTC---GTTCAAATACAGTCG--GACCG-----
C.bra02                  CCCAA---TGACGGAATGTC---GTTCAAATACAGTCG--GACCG-----
EU073224.1_S.glo01      ACCAT---TGGCAAAAACCAT---CTCATGGTTCGAGATG--TAACG-----
EU073223.1_S.glo02      ACCAT---TGGCAAAA-CCAT---CTCATGGTTCGAGATG--TAACG-----

```

\*

\*

\*



```

FJ222329.1_C.hon01      -AGGCC--GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCTGGGT-----TG-----ATAAA-C
FJ222331.1_C.hon03      -AGGCC--GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCTGGGT-----TG-----ATAAA-C
DQ785895.1_C.riv02      -AGGCC--GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCTGGGT-----TG-----ATAAAAC
FJ222334.1_C.hon02      -AGGCC--GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCTGGGT-----TG-----ATAAAAC
AY144598.1_C.riv01      -AGGCC--GAGGGATAC-GGCCA-CTCGCTGGGT-----TTTTTTGAAAAAAC
FJ222338.1_C.ari03      -AGGCC--GGGGATAC-GGCCA-CTCGCTGGGT-----TT---TGATAAAC
FJ222339.1_C.ari01      -AGGCC--GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCTGGGT-----TT----GATAAAC
FJ222336.1_C.ari02      -AGGCC--GAGGGATAC-GGCCA-CTCGCTGGGT-----TT----GATAAAAA
FJ222366.1_C.ire01      -AGGCC--GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCGGGGA-AAGAAAAAGGTGTTGTTAGCCTTC
FJ222360.1_C.ire02      -AGGCC--GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCGGGGA-AAGAAAAAGGTGTTGTTAGCCTTC
FJ222364.1_C.ire03      -AGGCC--GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCGGGGA-AAGAAAAAGGTGTTGTTAGCCTTC
EU073241.1_C.mad01      -AGGCC--GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCGGGGGAAAGAAAAAGGTGTTGTTAGCCTTC
EU073239.1_C.mad02      -AGGCC--GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCGGGGGAAAGAAAAAGGTGTTGTTAGCCTTC
EU073237.1_C.mad03      -AGGCC--GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCGGGGGAAAGAAAAAGGTGTTGTTAGCCTTC
EU073259.1_C.bel01      -AGGCC--GAGGGATCC-GAAGA-CTCGCAGCAGT-----CCTCTG-----CT
EU073254.1_C.bel03      -AGGCC--GAGGGATCC-GAAGA-CTCGCAGCAGT-----CCCT-----CT
EU073248.1_C.bel02      -AGGCC--GAGGGATCC-GAAGA-CTCGCAGCAGT-----CCTC-----T
EU073247.1_C.gry01      -AGGCCT-GAGGGATCC-GGAGA-CTCGCGGGGT-----CTCGAGAGAGACTC
EU073242.1_C.gry03      -AGGCCT-GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCGGGGT-----CTCGAGAGAGACTC
EU073245.1_C.gry02      -AGGCCT-GAGGGATCC-GGCCA-CTCGCGGGGT-----CTCGAGAGAACTC
AB377690.1_C.nip01      -AGGCC--GAGGGATAC-GGCCA-CTCGCTTGGG---GGTTCGGTTCAAAGCCTCTCCC
AB041760.1_C.nip02      -AGGCC--GAGGGACAC-GGCCA-CTCGCTTGGG---GGTTCGGTTCAAAGCCTTTCCC
EU072459.1_C.nip03      -AGGCC--GAGGGATAC-GGCCA-CTCGCTTGGG---GGTTCGGTTCAAAGCCTTTCCC
FJ222345.1_C.sik01      -AGGCC--GAGGGATCC-GCCGA-CTCGCTGGGT-----T
FJ222340.1_C.sik03      -AGGCC--GAGGGATCC-GCCGA-CTCGCTGGGT-----T
FJ222344.1_C.sik02      -AGGCC--GAGGGATCC-GCCGA-CTCGCTGGGT-----T
FJ222359.1_C.gig01      -AGGCC--GAGGGATCCAGGCCA-CTCGCTGGAGG-----GTTTAT---C
FJ222358.1_C.gig02      -AGGCC--GAGGGATCCAGGCCA-CTCGCTGGAGG-----GTTTAT---C
FJ222352.1_C.ang01      -AGGCC--GAGGGATCCAGGCCA-CTCGCTGGAGG-----GTTTAT---C
FJ222350.1_C.ang03      -AGGCC--GAGGGATCCAGGCCA-CTCGCTGGGGG-----GTTTATTTCC
FJ222357.1_C.gig03      -AGGCC--GAGGGATCCAGGCCA-CTCGCTGGAGG-----GTTTATTT-C
FJ222346.1_C.ang02      -AGGCC--GAGGGATCCAGGCCA-CTCGCTGGAGG-----GTTTAT---C
C.rhi01                  GGGGCCAGGAGGGGTTT-GGCCA-CTCGCCGGGGT-----GTTTTTTC
C.rhi03                  GGGGCCAGGAGGGGTTT-GGCCA-CTCGCCGGGGT-----GTTTTTTC
C.rhi02                  GGG-CCAGGAGGGGTTT-GGCCA-CTCGCCGGGGG-----TTTTTTTC
EU072460.1_C.vir01      GAG-CCAGGAGGGGTTT-GGCCA-CTCGCCGGGGG-----TATCTTTC
EU073343.1_C.vir02      GAG-CCAGGAGGGGTTT-GGCCA-CTCGCCGGGGG-----TATCTTTC
EU073341.1_C.vir03      GAG-CCAGGAGGGGTTT-GGCCA-CTCGCCGGGGG-----TATCTTTC
C.bra01                  GG---CGGGAGGGGTCCGGCGC-CTCGCTCGGGAAAAACG-----
C.bra03                  GG---CGGGAGGGGTCCGGCGC-CTCGCTCGGGAAAAACG-----
C.bra02                  GG---CGGGAGGGGTCCGGCGC-CTCGCTCGGGAAAAACG-----
EU073224.1_S.glo01      GGGGTGCGGAGAGAAAAACGCTAT-CTCTTTCGGTGGTTCT-----
EU073223.1_S.glo02      GGGGTGCGGAGAGAAAAACGCTAT-CTCTTTCGGTGGTACCT-CGTTGGCAGAGGCCGCAAC

```

\* \* \* \*\*

```

FJ222329.1_C.hon01      CCAA-GCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTC-----CTCG---TGAGG---CTCCGTCGCCT
FJ222331.1_C.hon03      CCAA-GCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTC-----CTCG---TGGGG---CTCCGTCGCCT
DQ785895.1_C.riv02      CCAA-GCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTC-----CTCG---TGGGG---CTCCGTCGCCT
FJ222334.1_C.hon02      CCAA-GCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTC-----CTCG---TGGGG---CTCCGTCGCCT
AY144598.1_C.riv01      CCAAAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTC-----CTCG---TGGGG---CTCCGTCGCCT
FJ222338.1_C.ari01      CCAAAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTC-----CTCG---TGGGG---CTCCGTCGCCT
FJ222339.1_C.ari01      CCAA-GCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTC-----CTCG---TGGGG---CTACGTCGCCT
FJ222336.1_C.ari02      CCAAAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTC-----CTCG---TGGGG---CTCCGTCGCCT
FJ222366.1_C.ire01      CCC--GCGCCTTGGGCCGTCGAAGCTTTCCCCAATTGGTTTTGGGTTG-CTCCGTCGCCT
FJ222360.1_C.ire02      CCC--GCGCCTTGGGCCGTCGAAGCTTTCCCCAATTGGTTTTGGGTTG-CTCCGTCGCCT
FJ222364.1_C.ire03      CCC--GCGCCTTGGGCCGTCGAAGCTTTCCCCAATTGGTTTTGGGTTG-CTCCGTCGCCT
EU073241.1_C.mad01      CCCCCGCGCTTTGGGCCGTCGAAGCTTTCCCCAATTGGTTTTGGGTTG-CTCCGTCGCCT
EU073239.1_C.mad02      CCC--GCGCCTTGGGCCGTCGAAGCTTTCCCCAATTGGTTTTGGGGGGGCTCCGTCGCCT
EU073237.1_C.mad03      CCC--GCGCCTTGGGCCGTCGAAGCTTTCCCCAATTGGTTTTGGGGGGGCTCCGTCGCCT
EU073259.1_C.bel01      GCT--GCGCCTTGGGCTGTGGAAGCCTT----GACT-----GG----CTCCGTCGCCT
EU073254.1_C.bel03      G-T--GCGCCTTGGGCTGTGGAAGCCTT----GACT-----GG----CTCCGTCGCCT
EU073248.1_C.bel02      GCT--GCGCCTTGGGCTGTGGAAGCCTT----GACT-----GG----CTCCGTCGCCT
EU073247.1_C.gry01      CCC--GCGCCTTGGGCAGTCGAAGCTCC----AATTTGGTTTGGG----CTCCGTCGCCT
EU073242.1_C.gry03      CCC--GCGCCTTGGGCAGTCGAAGCTCC----AATTTGGTTTGGG----CTCCGTCGCCT
EU073245.1_C.gry02      CCC--GCGCCTTGGGCAGTCGAAGCTCC----AATTTGGTTTGGG----CTCCGTCGCCT
AB377690.1_C.nip01      CCCCAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTTTTTT-CTTCGGAACAAAGGG-CTCCGTGGCCT
AB041760.1_C.nip02      CCCCAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTTTTTTCTTCGGAACAAAGGG-CTCCGTGGCCT
EU072459.1_C.nip03      CCC-AGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTTTTTTCTTCGGAACAAAGGG-CTCCGTGGCCT
FJ222345.1_C.sik01      TCTCAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTC-----CTCCTCCGAGGGG--CTCCGTGGCCT
FJ222340.1_C.sik03      TCTCAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTC-----CTCCTCCGAGGGG--CTCCGTGGCCT
FJ222344.1_C.sik02      TCTCAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCCTC-----CTCCTCCGAGGGG--CTCCGTGGCCT
FJ222359.1_C.gig01      TCTCAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCTTT-----CCTG-----CTCCGTGGCCT
FJ222358.1_C.gig02      TCTCAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCTTT-----CCTG-----CTCCGTGGCCT
FJ222352.1_C.ang01      TCTCAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCTTT-----CCTG-----CTCCGTGGCCT
FJ222350.1_C.ang03      TCTCAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCTTT-----CCTG-----CTCCGTGGCCT
FJ222357.1_C.gig03      TCTCAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCTTT-----CCTG-----CTCCGTGGCCT
FJ222346.1_C.ang02      TCTCAGCGCCTTGGGCCGTCGAAGCTTT-----CCTG-----CTCCGTGGCCT
C.rhi01                  CTCCGGCGCTTTGGGCCGTCGAGCCGC-----CTAGG-----CTCCGTGGCCT
C.rhi03                  CTCCGGCGCTTTGGGCCGTCGAGCCGC-----CTAGG-----CTCCGTGGCCT
C.rhi02                  CTCTGCGCTTTGGGCCGTCGAGCCGC-----CTAGG-----CTCCGTGGCCT
EU072460.1_C.vir01      CTCCGGCGCTTTGGGCCGTCGAGCCGC-----CTAGG-----CTCCGTGGCCT
EU073343.1_C.vir02      CTCCGGCGCTTTGGGCCGTCGAGCCGC-----CTAGG-----CTCCGTGGCCT
EU073341.1_C.vir03      CTCCGGCGCTTTGGGCCGTCGAGCCGC-----CTAGG-----CTCCGTGGCCT
C.bra01                  ---GGCGCCTTGGGCCGTCGAGCGA-----AAG-----CTCCGTGGCCT
C.bra03                  ---GGCGCCTTGGGCCGTCGAGCGA-----AAG-----CTCCGTGGCCT
C.bra02                  ---GGCGCCTTGGGCCGTCGAGCGA-----AAG-----CTCCGTGGCCT
EU073224.1_S.glo01      -GAGAGAGCCTTGGGCAGTCGAGCCGT----AACAGG-----CTCCGTGGCCT
EU073223.1_S.glo02      CGAGAAAGCCTTGGGCAGTCGAGCCG-----AACAGG-----CTCCGTGGCCT

```

\*\* \*\*\*\*\* \*\*

\*\* \*\*\* \*\*

```

FJ222329.1_C.hon01      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
FJ222331.1_C.hon03      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
DQ785895.1_C.riv02      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
FJ222334.1_C.hon02      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
AY144598.1_C.riv01      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGG--CCCCGGGCTAC---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
FJ222338.1_C.ari01      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGG--CCCCGGGCTAC---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
FJ222339.1_C.ari01      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGG--CCCCGGGCTAC---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
FJ222336.1_C.ari02      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGG--CCCCGGGCTAC---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
FJ222366.1_C.ire01      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CTCCGGGCTTT-TAAACGGTGGTGGGTGCGCAA
FJ222360.1_C.ire02      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CTCCGGGCTTT-TAAACGGTGGTGGGTGCGCAA
FJ222364.1_C.ire03      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CTCCGGGCTTT-TAAACGGTGGTGGGTGCGCAA
EU073241.1_C.mad01      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CTCCGGGCTTT-TAAACGGTGGTGGGTGCGCAA
EU073239.1_C.mad02      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CTCCGGGCTTT-TAAACGGTGGTGGGTGCGCAA
EU073237.1_C.mad03      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CTCCGGGCTTT-TAAACGGTGGTGGGTGCGCAA
EU073259.1_C.bel01      CAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACG-TGGGTGCGCC
EU073254.1_C.bel03      CAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCGCC
EU073248.1_C.bel02      CAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCGCC
EU073247.1_C.gry01      CAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CTCCGGGCTTATCTTGAACGGTGGGTGCGCAA
EU073242.1_C.gry03      CAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CTCCGGGCTTA-CCTGGAACGGTGGGTGCGCAA
EU073245.1_C.gry02      CAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CTCCGGGCTTA-CCTGGAACGGTGGGTGCGCAA
AB377690.1_C.nip01      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
AB041760.1_C.nip02      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
EU072459.1_C.nip03      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
FJ222345.1_C.sik01      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCGCTT
FJ222340.1_C.sik03      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCGCTT
FJ222344.1_C.sik02      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCGCTT
FJ222359.1_C.gig01      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGCGGGTGCCTA
FJ222358.1_C.gig02      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGCGGGTGCCTA
FJ222352.1_C.ang01      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCCTA
FJ222350.1_C.ang03      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCCTA
FJ222357.1_C.gig03      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCCTA
FJ222346.1_C.ang02      TAAGTACAGACGAG-CTCGACCGCGA--CCCCGGGCTTC---CGGAACGGTGGGTGCCTA
C.rhi01                  TAAGTACAGACGAGGCTCGACCGCGA--CCCCGGGCCTT---CGGAACGGTGGGTGCCTT
C.rhi03                  TAAGTACAGACGAGGCTCGACCGCGA--CCCCGGGCCTT---CGGAACGGTGGGTGCCTT
C.rhi02                  TAAGTACAGACGAGGCTCGACCGCGA--CCCCGGGCCTT---CGGAACGGTGGGTGCAT
EU072460.1_C.vir01      CAAGTACAGACGAGGCTCGACCGCGA--CCCCGGGCCTT---CGGAACGGTGGGTGCAT
EU073343.1_C.vir02      CAAGTACAGACGAGGCTCGACCGCGA--CCCCGGGCCTT---CGGAACGGTGGGTGCAT
EU073341.1_C.vir03      CAAGTACAGACGAGGCTCGACCGCGA--CCCCGGGCCTT---CGGAACGGTGGGTGCAT
C.bra01                  TAAGTTCAGACAGG-CTCGACCGGCAGACCCCGGGCCAT---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
C.bra03                  TAAGTTCAGACAGG-CTCGACCGGCAGACCCCGGGCCAT---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
C.bra02                  TAAGTTCAGACAGG-CTCGACCGGCAGACCCCGGGCCAT---CGGAACGGTGGGTGCGCAA
EU073224.1_S.glo01      TAAATACAGACGAG-CTCGACCGCGA---CCCGGGCT-T---TGACGGGGAAGGTGCGCAA
EU073223.1_S.glo02      TAAATTCAGA-GAG-CTCGACCGCGA---CCCGGGCT-T---TGACGGGGAAGGTGCGCAA
** * **** * ***** * **** * *****

```

```

FJ222329.1_C.hon01      AAAA---C-ACTATAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222331.1_C.hon03      AAA----C-ACTATAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
DQ785895.1_C.riv02      AAAA---C-ACTATAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222334.1_C.hon02      AAA----C-ACTATAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
AY144598.1_C.riv01      AA-----C-ACTATAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222338.1_C.ari01      AA-----C-ACTATAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222339.1_C.ari01      AA-----C-ACTATAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222336.1_C.ari02      AA-----C-ACTATAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222366.1_C.ire01      AA-----CAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222360.1_C.ire02      AA-----CAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222364.1_C.ire03      AA-----CAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
EU073241.1_C.mad01      AAA-----CAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
EU073239.1_C.mad02      AAA-----CAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
EU073237.1_C.mad03      AAA-----CAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
EU073259.1_C.bel01      C-----CTCAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
EU073254.1_C.bel03      C-----CTCAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
EU073248.1_C.bel02      C-----CTCAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
EU073247.1_C.gry01      CAAAACAA-ACAAAAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
EU073242.1_C.gry03      CAAAACAA-ACAAAAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
EU073245.1_C.gry02      CAAAACAA-ACAAAAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
AB377690.1_C.nip01      ACAA--A-CTCATAGCACTTGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
ABO41760.1_C.nip02      ACAA--A-CTCATAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
EU072459.1_C.nip03      ACAA--A-CTCATAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222345.1_C.sik01      CATTCA----AAAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222340.1_C.sik03      CATTCA----AAAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222344.1_C.sik02      CATTCA----AAAAGCACTCGGCATCGTCGGGAGGTTGGCCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222359.1_C.gig01      AAACAAAA-CAAAAAGCACTCGGCATCGTCGGGGGG-AAAACCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222358.1_C.gig02      AAACAAAA-CAAAAAGCACTCGGCATCGTCGGGGGG-AAAACCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222352.1_C.ang01      AAACAAAA-CAAAAAGCACTCGGCATCGTCGGGGGG-AAAACCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222350.1_C.ang03      AAACAAAA-CAAAAAGCACTCGGCATCGTCGGGGGG-AAAACCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222357.1_C.gig03      AAACAAAA-CAAAAAGCACTCGGCATCGTCGGGGGG-AAAACCTCGACGTTATAAGCACCC
FJ222346.1_C.ang02      AAACGAAA-CAAAAAGCACTCGGCATCGTCGGGGGG-AAAACCTCGACGTTATAAGCACCC
C.rhi01                  CAAA-----TGAACCGCTCGGCATCGTCGGTAGGTTGGCACCGATGTTATAAGCACCC
C.rhi03                  CAAA-----TGAACCGCTCGGCATCGTCGGTAGGTTGGCACCGATGTTATAAGCACCC
C.rhi02                  CAAA-----TGAACCGCTCGGCATCGTCGGTAGGTTGGCACCGATGTTATAAGCACCC
EU072460.1_C.vir01      CCAA-----TAAACCGCTCGGCATCGTCGGTAGGTTGGCACCGATGTTATAAGCACCC
EU073343.1_C.vir02      CCAA-----TAAACCGCTCGGCATCGTCGGTAGGTTGGCACCGATGTAATAAGCACCC
EU073341.1_C.vir03      CCAA-----TAAACCGCTCGGCATCGTCGGTAGGTTGGCACCGATGTTATAAGCACCC
C.bra01                  AAACACTT---TTAACCGCTCGGCATCGTCGGTAGGTTGGCACCGATGTTGTAAGCACCC
C.bra03                  AAACACTT---TTAACCGCTCGGCATCGTCGGTAGGTTGGCACCGATGTTGTAAGCACCC
C.bra02                  AAACACTT---TTAACCGCTCGGCATCGTCGGTAGGTTGGCACCGATGTTGTAAGCACCC
EU073224.1_S.glo01      AAC-----ACCGCTCGGCATCGTCGGTCATT--GTGCCGATGTTGTAAGCGCCC
EU073223.1_S.glo02      AAC-----ACCGCTCGGCATCGTCGGTCATT--GTTCCGATGTTGTAAGCGCCC
* * * * *

```

```

FJ222329.1_C.hon01      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATAGTTATTTT-----TACACAAAACC---
FJ222331.1_C.hon03      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATAGT--TTTT-----TACACAAAACC---
DQ785895.1_C.riv02      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATAGT--TTTT-----TACACAAAACC---
FJ222334.1_C.hon02      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATAGT--TTTT-----TACACAAAACC---
AY144598.1_C.riv01      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATAGT--TTTT-----TACACAAAACC---
FJ222338.1_C.ari03      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATAGT--TTTT-----TACACAAAACC---
FJ222339.1_C.ari01      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATAGT--TTTT-----ACACAAAACC---
FJ222336.1_C.ari02      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATAGT--TTTT-----TACACAAAACC---
FJ222366.1_C.ire01      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATGGTTTTGTT-----GAAAAACAACAAA--A
FJ222360.1_C.ire02      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATGGTTTTGTT-----GAAAAACAACAAA--A
FJ222364.1_C.ire03      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATGGTTTTGTT-----GAAAAACAACACA--A
EU073241.1_C.mad01      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATGGTTTTGTT-----GAAAAACAACAAA--A
EU073239.1_C.mad02      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATGGTTT-GTT-----GACAAAACAACAAA--A
EU073237.1_C.mad03      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATGGTTT-GTT-----GACAAAACAACAAA--A
EU073259.1_C.bel01      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCCATAGCTTTTCC-----AAAAATTAAACCCG
EU073254.1_C.bel03      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCCATAGCTTTTCC-----AAAAATTAAACCCG
EU073248.1_C.bel02      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCCATAGCTTTTCC-----AAAAATTAAACCCG
EU073247.1_C.gry01      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCAATAGATTGTT---TTGAACAAAACAACAAAACCCG
EU073242.1_C.gry03      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCAATAGATTGTT---TTGAACAAAACAACAAAACCCG
EU073245.1_C.gry02      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATAGATTGTTTCTTTTGAACAAAACAACAAAACCCG
AB377690.1_C.nip01      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATAGCTTTTTTA-----CACACAAAACAACCCG
AB041760.1_C.nip02      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATAGCTTTTTTA-----CACACAAAACAACCCG
EU072459.1_C.nip03      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCGATAGCTTTTTTA-----CACACAAAACAACCCG
FJ222345.1_C.sik01      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCAACAGATTTCCT-----ACACAAAACC---
FJ222340.1_C.sik03      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCAACAGATTTCCT-----ACACAAAACC---
FJ222344.1_C.sik02      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCAACAGATTTCCT-----ACACAAAACC---
FJ222359.1_C.gig01      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCAACAGATTTCCT-----ACACAAAACC---
FJ222358.1_C.gig02      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCAACAGATTTCCT-----ACACAAAACC---
FJ222352.1_C.ang01      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCAACAGATTTCCT-----ACACAAAACC---
FJ222350.1_C.ang03      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCAACAGATTTCCT-----ACACAAAACC---
FJ222346.1_C.ang02      GAGTATGTACTTTCTCACGTATACCAACAGATTTCCT-----ACACAAAACC---
C.rhi01                 GAGTATGTACTTCCTCACGTATACAAAATTCATTGC-----AAAAAGA-CA---
C.rhi03                 GAGTATGTACTTCCTCACGTATACAAAATTCATTGC-----AAAAAGA-CA---
C.rhi02                 GAGTATGTACTTCCTCACGTATACAAAATTCATTGC-----AAAAAAAACA---
EU072460.1_C.vir01      GAGTATGTACTTCCTCACGTATACAAATCTTCATTGC-----AAAAAAC-----
EU073343.1_C.vir02      GAGTATGTACTTCCTCACGTATACAAATCTTCATTGC-----AAAAAAC-----
EU073341.1_C.vir03      GAGTATGTACTTCCTCACGTATACAAATCGTCATTGC-----AAAAAAC-----
C.bra01                 GAGTATGTACTTCTTCGAGTATACGAGACATTT---C-----AGACAAGAAA---
C.bra03                 GAGTATGTACTTCTTCGAGTATACGAGACATTT---C-----AGACAAGAAA---
C.bra02                 GAGTATGTACTTCTTCGAGTATACGAGACATTT---C-----AGACAAGAAA---
EU073224.1_S.glo01      GAGTATGTACTTCT-CACGTATACGAAATCCTTATTT-----TGACGAGGAA---
EU073223.1_S.glo02      GAGTATGTACTTCT-CACGTATACGAAATCCTTATTT-----TGACGAGGAA---
*****  ***  *  *****

```

```

FJ222329.1_C.hon01      -----CGGGGCGGAGTCGGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCCCCT--CTGCTTTTT-----
FJ222331.1_C.hon03      -----CGGGGCGGAGTCGGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCCCCT--CTGCTTTTT-----
DQ785895.1_C.riv02      -----CGGGGCGGAGTCGGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCCCCT--CTGCTTTTT-----
FJ222334.1_C.hon02      -----CGGGGCGGAGTCGGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCCCCT--CTGCTTTTT-----
AY144598.1_C.riv01      -----CGGGGCGGAGTCGGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCCCC--TCTGCTTTTTT-----
FJ222338.1_C.ari01      -----CGGGGCGGAGTCGGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCCCC--TCTGCTTTTTT-----
FJ222339.1_C.ari01      -----CGGGGCGGAGTCGGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCCCCCTCTGCTTTTTT-----
FJ222336.1_C.ari02      -----CGGGGCGGAGTCGGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCCCC--TCTGCTTTTTT-----
FJ222366.1_C.ire01      AAA-CCCGGGGACGGGCGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCACCG--TCACTG-----
FJ222360.1_C.ire02      AAAACCCGGGGACGGGCGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCACCG--TCACTG-----
FJ222364.1_C.ire03      AAAACCCGGGGACGGGCGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCACCG--TCACTG-----
EU073241.1_C.mad01      AAAACCCGGGGACGGGCGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCCCG--TCACTG-----
EU073239.1_C.mad02      A---CCCGGGGATG--CGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCCCG--TCACTG-----
EU073237.1_C.mad03      A---CCCGGGGATG--CGGAGGCAGGC-----AAGTCCTCCCG--TCACTG-----
EU073259.1_C.bel01      GGGAGCAGAGCGCAAAA--GGAGGCAGGCA---AAGTCCTCCGCT--CCGCTTCTTC----
EU073254.1_C.bel03      GGGAGCAGAGCGCAAAAAGGAGGCAGGCA---AAGTCCTCCGCT--CCGCTTCTTC----
EU073248.1_C.bel02      GGGAGCAGAGCGCAAAAAGGAGGCAGGCA---AAGTCCTCCGCT--CCGCTTCTTC----
EU073247.1_C.gry01      GAGGGAGCGGAGTCAAA--GGAGGCAGGCC---AAGTCCTCAGT--CCGCTTTTTTTT-
EU073242.1_C.gry03      GAGGGAGCGGAGTCAAA--GGAGGCAGGCC---AAGTCCTCCCGT--CCGCTTTTTTTT-
EU073245.1_C.gry02      GAGG-AGCGGAGTCAAA--GGAGGCAGGCC---AAGTCCTCAGT--CCGCTTTTTTTT-
AB377690.1_C.nip01      G-----GGGGCGGAGTCGGGAGGCAGGCAATTAAGTCCTCAACT--CTGCTTTTTTTTT-
AB041760.1_C.nip02      G-----GGGGCGGAGTCGGGAGGCAGGCAATTAAGTCCTCAACT--CTGCTTTTTTTTT-
EU072459.1_C.nip03      G-----GGGGCGGAGTCGGGAGGCAGGCAATTAAGTCCTCAACT--CTGCTTTTTTTTT-
FJ222345.1_C.sik01      -----CGGGGGC-----GGAGTCGGG-----AGGCTCTGCTTT-----TTTC-----
FJ222340.1_C.sik03      -----CGGGGGC-----GGAGTCGGG-----AGGCTCTGCTTT-----TTTC-----
FJ222344.1_C.sik02      -----CGGGGGC-----GGAGTCGGG-----AGGCTCTGCTTT-----TTTC-----
FJ222359.1_C.gig01      -----CGGGA-GGC---GGAGTCGGCA---AGGCTCTTGCTT-----TTTTTTC----
FJ222358.1_C.gig02      -----CGGGA-GGC---GGAGTCGGCA---AGGCTCTTGCTT-----TTTTTTC----
FJ222352.1_C.ang01      -----CGGGAAGGC---GGAGTCGGCA---AGGCTCTTGCTT-----TTTTTTC----
FJ222350.1_C.ang03      -----CGGGAAGGC---GGAGTCGGCA---AGGCTCTTGCTT-----TTTTTTC----
FJ222357.1_C.gig03      -----CGGGA-GGC---GGAGTCGGCA---AGGCTCTTGCTT-----TTTTTTC----
FJ222346.1_C.ang02      -----CGGGA-GGC---GGAGTCGGCA---AGGCTCTTGCTT-----TTTTTTC----
C.rhi01                  -----AAGG-----AGGGGATGGGA---AAGCCCCTCGGT-----
C.rhi03                  -----AAGG-----AGGGGATGGGA---AAGCCCCTCGGT-----
C.rhi02                  -----AAGG-----AGGGGATGGGA---AAGCCCCTCGGT-----
EU072460.1_C.vir01      -----AAGG-----AGGGGATAGGA---AAGCCCCTCGGT-----
EU073343.1_C.vir02      -----AAGG-----AGGGGATAGGA---AAGCCCCTCGGT-----
EU073341.1_C.vir03      -----AAGG-----AGGGGATAGGA---AAGCCCCTCGGT-----
C.bra01                  -----AA-----CGAG---GGTT---TACCCCCTCGGGGGTC-----
C.bra03                  -----AA-----CGAG---GGTT---TACCCCCTCGGGGGTCAGACCCGG----
C.bra02                  -----AA-----CGAG---GGTT---TAGCCCCTCGGGGGTCAGACCCGG----
EU073224.1_S.glo01      -----GGGG-----TCGGGAGCAGGCA---AAGTCTCTCGGCTTTTCTTTCTC----
EU073223.1_S.glo02      -----GGGG-----TCGGGAGCAGGCA---AAGTCTCTCGGCTTTTCTTTCTC----

```

\* \* \*



```

FJ222329.1_C.hon01      ----CGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTTA
FJ222331.1_C.hon03      ----CGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTTA
DQ785895.1_C.riv02      ----CGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTTA
FJ222334.1_C.hon02      ----CGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTTA
AY144598.1_C.riv01      ----CGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTTA
FJ222338.1_C.ari01      ----CGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTTA
FJ222339.1_C.ari01      ----CGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTTA
FJ222336.1_C.ari02      ----CGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTTA
FJ222366.1_C.ire01      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTA-
FJ222360.1_C.ire02      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTA-
FJ222364.1_C.ire03      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTA-
EU073241.1_C.mad01      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTA-
EU073239.1_C.mad02      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGC-GCCGGACCGACCGAATTGGCATCTA-
EU073237.1_C.mad03      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGC-CCGCGACCGACCGAATTGGCATCTA-
EU073259.1_C.bel01      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTCA
EU073254.1_C.bel03      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTCA
EU073248.1_C.bel02      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTCA
EU073247.1_C.gry01      TTTCTGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCT--
EU073242.1_C.gry03      --TCTGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCT--
EU073245.1_C.gry02      --CTGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCT--
AB377690.1_C.nip01      -CTCGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGAGACCGACCGAATTGGCATCTTA
AB041760.1_C.nip02      -CTCGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGAGACCGACCGAATTGGCATCTTA
EU072459.1_C.nip03      -CTCGGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGAGACCGACCGAATTGGCATCTTA
FJ222345.1_C.sik01      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTTA
FJ222340.1_C.sik03      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTTA
FJ222344.1_C.sik02      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCTTA
FJ222359.1_C.gig01      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCATA
FJ222358.1_C.gig02      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGTGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCATA
FJ222352.1_C.ang01      -----GGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCATA
FJ222350.1_C.ang03      -----GGGG-TCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCATA
FJ222357.1_C.gig03      -----GGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCATA
FJ222346.1_C.ang02      -----GGGGGTCGGCCGGCGTACCTCGTTGCGCGCCGCGACCGACCGAATTGGCATCATA
C.rhi01                  -----CGTTTGCCCGGCGTTCTTCGTTGCGCGCCGCGGCCGACCGAACTATTACTGTG
C.rhi03                  -----CGTTTGCCCGGCGTTCTTCGTTGCGCGCCGCGGCCGACCGAACTATTACTGTG
C.rhi02                  -----CGTTTGCCCGGCGTTCTTCGTTGCGCGCCGCGGCCGACCGAACTATTACTGTG
EU072460.1_C.vir01      -----CGTTTGCCCGGCGTTCTTCGTTGCGCGCCGCGGCCGACCGAACTATTACTGTG
EU073343.1_C.vir02      -----CGTTTGCCCGGCGTTCTTCGTTGCGCGCCGCGGCCGACCGAACTATTACTGTG
EU073341.1_C.vir03      -----CGTTTGCCCGGCGTTCTTCGCTGCGCGCCGCGGCCGACCGAACTATTACTGTG
C.bra01                  -----
C.bra03                  -----CGTACCTCGTTGCGCGC--CGCTGGCCGACCCGAATGGCAAAAAGAAA----GC
C.bra02                  -----CGTACCTCGTTGCGCGC--CGCTGGCCGACCCGAATGGCAAAAAGAAA----GC
EU073224.1_S.glo01      -----GGTCGCGTCAGGCGTACCTCGTTGCGCGCCTCGACCGGCCGAATCACTTTTGGC
EU073223.1_S.glo02      -----GGTCGCGTCAGGCGTACTTCGTTGCGCGCCTCGACCGGCCGAATCACTTTTGGC

```

FJ222329.1_C.hon01	CTT-----TTTTGACAACTC
FJ222331.1_C.hon03	CTT-----TTTTGACAACTC
DQ785895.1_C.riv02	CTT-----TTTTGACAACTC
FJ222334.1_C.hon02	CTT-----TTTTGACAACTC
AY144598.1_C.riv01	CTT-----TTT-GACAACTC
FJ222338.1_C.ari03	CTT-----TTT-GACAACTC
FJ222339.1_C.ari01	CTT-----TTT-GACAACTC
FJ222336.1_C.ari02	CTT-----TTT-GACAACTC
FJ222366.1_C.ire01	-----TTT-GACAACTC
FJ222360.1_C.ire02	-----TTT-GACAACTC
FJ222364.1_C.ire03	-----TTT-GACAACTC
EU073241.1_C.mad01	-----TTT-GACAACTC
EU073239.1_C.mad02	-----TTTAGACAACTC
EU073237.1_C.mad03	-----TTTAGACA-CTC
EU073259.1_C.bel01	CTTTTTTTGGTTTTTGACAACTC
EU073254.1_C.bel03	CTTTTTTTGGTTTTTGACAACTC
EU073248.1_C.bel02	CTTTTTCTGGTTTTTGACAACTC
EU073247.1_C.gry01	-----TTGACAACTC
EU073242.1_C.gry03	-----TTGACAACTC
EU073245.1_C.gry02	-----TTGACAACTC
AB377690.1_C.nip01	TTT-----TT--GACAACTC
AB041760.1_C.nip02	TTT-----TTTTGACAACTC
EU072459.1_C.nip03	TTT-----TTT-GACAACTC
FJ222345.1_C.sik01	CTT-----TTTTGACAACTC
FJ222340.1_C.sik03	CTT-----TTTTGACAACTC
FJ222344.1_C.sik02	CTT-----TTTTGACAACTC
FJ222359.1_C.gig01	CTA-----TTTTGACAACTC
FJ222358.1_C.gig02	CTA-----TTTTGACAACTC
FJ222352.1_C.ang01	CTA-----TTTTGACAACTC
FJ222350.1_C.ang03	CTA-----TTTTGACAACTC
FJ222357.1_C.gig03	CTA-----TTTTGACAACTC
FJ222346.1_C.ang02	CTA-----TTTTGACAACTC
C.rhi01	ACC-----ATATGTGACAACTC
C.rhi03	ACC-----ATATGTGACAACTC
C.rhi02	ACC-----ATATGTGACAACTC
EU072460.1_C.vir01	ACC-----ATATGCGACAACTC
EU073343.1_C.vir02	ACC-----ATATGCGACAACTC
EU073341.1_C.vir03	ACC-----ATATGTGACAACTC
C.bra01	-----
C.bra03	TTA-----TTTTGACAACTC
C.bra02	TTA-----TTTTGACAACTC
EU073224.1_S.glo01	ATC-----TATTGACAACTC
EU073223.1_S.glo02	ATC-----TATTGACAACTC