



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
MARINHA E AMBIENTES COSTEIROS**

**VARIAÇÃO GÊNICA, ASSIMETRIA E EQUILÍBRIO DO
DESENVOLVIMENTO EM POPULAÇÕES DE *Iphigenia*
brasiliensis (Lamarck, 1818) DA COSTA DO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO**

ALAN BONNER DA SILVA COSTA

**Niterói
Agosto 2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
MARINHA E AMBIENTES COSTEIROS**

**VARIAÇÃO GÊNICA, ASSIMETRIA E EQUILÍBRIO DO
DESENVOLVIMENTO EM POPULAÇÕES DE *Iphigenia*
brasiliensis (Lamarck, 1818) DA COSTA DO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO**

ALAN BONNER DA SILVA COSTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha e Ambientes Costeiros, Departamento de Biologia Marinha, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Marinha e Ambientes Costeiros.

Orientadores:
Prof. Dr. Edson Pereira da Silva
Prof. Dra. Michelle Rezende Duarte

Niterói
Agosto 2017

C 837 Costa, Alan Bonner da Silva

Variação gênica, assimetria e equilíbrio do desenvolvimento em populações de *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818) da costa do Estado do Rio de Janeiro/Alan Bonner da Silva Costa. - Niterói: [s. n.], 2017.

36 f.

Dissertação – (Mestrado em Biologia Marinha e Ambientes Costeiros) – Universidade Federal Fluminense, 2017.

1. Variação (Genética). 2. Genética populacional. 3. Bivalve.
4. Assimetria. 5. Aloenzima. 6. *Iphigenia brasiliensis*. I. Título.

CDD.: 575.1

**VARIAÇÃO GÊNICA, ASSIMETRIA E EQUILÍBRIO DO DESENVOLVIMENTO EM
POPULAÇÕES DE *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818) DA COSTA DO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Alan Bonner da Silva Costa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha e Ambientes Costeiros, Departamento de Biologia Marinha, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Marinha e Ambientes Costeiros.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Michelle Rezende Duarte
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Carlos Alberto da Conceição Andrade
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Flavio da Costa Fernandes (Membro Externo)
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

Prof. Dr. Edson Pereira da Silva (Membro Suplente)
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Júlio César Monteiro (Membro Externo Suplente)
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

AGRADECIMENTOS

São tempos difíceis para quem faz e para quem quer fazer ciência no Brasil. Os que deviam apoiar e fomentar tal atividade preferem encaminhar os recursos para outros interesses, aumentando o espectro que a palavra “desafio” tem quando associada à atividade científica. Para minha sorte, tive pessoas do meu lado que ajudaram neste tempo em que tentei fazer ciência. A elas vão meus agradecimentos.

Edson e Michelle, meus pais acadêmicos, por toda ajuda, paciência, orientação, ideologia e brincadeiras que ajudaram a tornar este processo possível e, sobretudo, por não desistirem de mim quando eu já tinha desistido. Maíra, pela competência, seriedade e eficiência no trabalho de morfometria e nas coletas. Augusto, por dividir os momentos bons e ruins e por ser “um Porto Seguro para a minha tarioba”. Ana, que não tinha relação direta nenhuma com o processo, mas ajudou como se dela fosse. Jéssica, Barta, Tate, Sara, Tainara e Felipe, por serem os melhores caçadores-coletores que se tem notícia na história recente. Eu jamais teria conseguido sem a ajuda de cada um de vocês. Muito obrigado por me ajudarem tanto quanto ajudaram.

É preciso agradecer, também, àqueles que não tiveram relação direta com a produção deste documento, mas que tem um papel importante na minha vida. Aos meus pais e minha irmã, por serem minha base e estarem sempre perto mesmo estando quase sempre longe. À Nathália, que esteve do meu lado enquanto tudo desabava. E aos amigos que permaneceram e ajudaram a retirar os escombros. Obrigado por estarem por perto nos momentos difíceis que, infelizmente, foram muitos. Espero que continuemos juntos agora que a casa começa a se remontar e que eu possa receber vocês no novo-velho teto que estou construindo.

Gostaria de agradecer também à CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Marinha e Ambientes Costeiros-UFF por todo o suporte durante o curso.

Por fim, e mais importante, à classe trabalhadora. Sou um privilegiado que pode pensar durante dois anos sendo remunerado para tal, graças ao esforço de sol a sol que fizeram. Portanto, espero que, de alguma forma, este trabalho sirva a vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	05
4. RESULTADOS.....	16
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÃO.....	29
7. REFERÊNCIAS.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Enzimas usadas, com abreviações, número de comissão (E.C.), número de subunidades, número de <i>loci</i> interpretados e tampões utilizados.....	06
Tabela 2. Sistemas de tampão utilizados e receita dos tampões de gel e eletrodo.....	06
Tabela 3. Receitas dos sistemas de tampão usados para revelação.....	08
Tabela 4. Receitas dos sistemas enzimáticos revelados.....	09
Tabela 5. Tamanho médio de amostra, número médio de alelos por <i>locus</i> , e heterozigosidades médias observadas e esperadas das populações do estado do Rio de Janeiro.....	17
Tabela 6. Frequências Alélicas.....	18
Tabela 7. Probabilidades (P) de equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	20
Tabela 8. Heterozigosidades por <i>locus</i>	21
Tabela 9. Tipos de assimetria encontrados para cada medida em cada ambiente e localidade para os seis pontos analisados.....	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos locais de coleta ao longo da costa sudeste do estado do Rio de Janeiro.....	05
Figura 2. Resumo do método de eletroforese de aloenzimas.....	11
Figura 3. Localização das seis medidas realizadas para cada valva de cada indivíduo.....	14
Figura 4. Regressão entre heterozigosidade média observada e assimetria da altura da valva (hei).....	23
Figura 5. Relação entre heterozigosidade média esperada e assimetria da medida de comprimento do umbo até a extremidade ventral direita (x).....	23
Figura 6. Relação entre heterozigosidade esperada para o <i>locus Pgm</i> e assimetria da medida de comprimento do umbo até a extremidade ventral direita (x).....	24
Figura 7. Relação entre heterozigosidade multilocus e assimetria individual da altura da valva.....	24
Figura 8. Relação entre heterozigosidade multilocus e assimetria individual da largura da valva.....	25
Figura 9. Relação entre heterozigosidade multilocus e assimetria individual na localidade Niterói.....	25

RESUMO

Aspectos relacionados às variações gênica e morfológica podem ser importantes indicativos sobre o equilíbrio do desenvolvimento de populações naturais, especialmente quando estudados em conjunto. Tais relações podem oferecer indícios sobre o estado de ser das populações em questão que podem servir, por exemplo, como referencial para ações de manejo e conservação de espécies exploradas pelo ser humano. *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818) é um exemplo de espécie com este perfil. Bastante comum em ambientes estuarinos tropicais da costa oeste do Oceano Atlântico, este molusco bivalve é explorado como recurso alimentar e econômico por parte das populações costeiras onde vivem, como ocorre, por exemplo, na costa do estado do Rio de Janeiro (Brasil). A fim de aferir os níveis de desequilíbrio do desenvolvimento da espécie e os fatores responsáveis por isto em escala regional, foram associadas medidas de assimetria e variação gênica de *I. brasiliensis* em diferentes locais e ambientes da costa do estado do Rio de Janeiro. Nesse sentido, foi estimada a variação gênica, determinados os tipos e os níveis de assimetria que a espécie apresenta nos diferentes locais e ambientes e investigados as possíveis relações entre os parâmetros genéticos da espécie e o equilíbrio do desenvolvimento (inferido a partir dos tipos e níveis de assimetria e de suas relações com a variação gênica). Os resultados indicaram a presença generalizada de assimetria que variou entre direcional e flutuante, na dependência do ambiente. Os coeficientes de regressão entre variação gênica e valores de assimetria apresentaram resultados estatisticamente significativos na dependência dos *loci* e medidas utilizadas. Dessa forma, *I. brasiliensis* é mais um exemplo de molusco bivalve no qual os efeitos do ambiente e variação gênica sobre o equilíbrio do desenvolvimento puderam ser demonstrados, contudo, apresentando relações que variam entre as diferentes medidas e pontos estudados. Dessa forma, esse trabalho oferece informações sobre as relações entre o estado das populações naturais de *I. brasiliensis* e as variáveis ambientais e genéticas. Espera-se que esses resultados possam ser úteis como subsídio para as iniciativas de exploração e manejo da espécie na costa sudeste do Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Aloenzimas, Asimetria, Equilíbrio do Desenvolvimento, Manguezal, Moluscos Bivalves, Variação Gênica.

ABSTRACT

Genetic and morphological variation may be important indicatives of the developmental instability of natural populations, especially when studied together. Correlations among them can be used, for example, for management and conservation strategies of exploited species. *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818) is a very common mollusk in tropical estuarine environments on the west coast of the Atlantic Ocean which is used as food and economically exploited by “caiçaras”, for example, in the state of Rio de Janeiro (Brazil). In order to estimate levels of developmental instability in this species and its relation with environmental and genetic variables, measurements of asymmetry and genetic variation were taken and related at different places and environments in the coast of the state of Rio de Janeiro. Genetic variation and the asymmetry were determined for different sampling sites and environments as well as the relation among them. Results indicated a generalized presence of asymmetry, although being sometimes directional and sometimes fluctuating on dependence of the environment. Regarding genetic variation and asymmetry relations, they were statistically significant in the dependence of the *loci* and measures used. Thus, *I. brasiliensis* is another example of a mollusk bivalve which developmental stability is under dependence of the effects of the environment and gene variation. However, statistically significant relations vary among measures, sampling sites and environment. In conclusion, the results offer information on the relations between environmental and genetic variables on developmental stability of natural populations of *I. brasiliensis* that can be of importance for conservation and management of the species of southeastern Brazilian coast.

KEY WORDS: Alozymes, Asymmetry, Bivalve Molluscs, Developmental Stability, Genetic Variation, Mangrove.

1. INTRODUÇÃO

Iphigenia brasiliensis (Lamarck 1818) é uma espécie de bivalve da família Donacidae que habita substratos arenosos e areno-lodosos de águas rasas em regiões estuarinas (Domaneschi & Lopes 1988). Conhecida no Brasil como “tarioba”, os indivíduos dessa espécie apresentam a superfície externa da concha lisa, com linhas de crescimento irregulares e a forma da concha pouco inflada nos indivíduos juvenis e mais alongada e moderadamente inflada nos indivíduos adultos, que podem chegar a até 70 mm de comprimento (Narchi 1972).

A espécie ocorre na Flórida (EUA), em parte do Caribe, no Suriname, no Brasil entre os estados de Santa Catarina ($29^{\circ}19'46"S\ 49^{\circ}42'39"W$) e Pará ($0^{\circ}07'04"S\ 49^{\circ}23'17"W$) e no Uruguai (Rios 1994). Em algumas partes da costa brasileira, a espécie é explorada como recurso de subsistência, sendo consumida pelas populações caiçaras (Lima et al. 2017) e comercializada em mercados de produtos pesqueiros (Monteles et al. 2009; Souto & Martins 2009). A espécie também apresenta potencial como bioindicadora, especialmente de resíduos domésticos, industriais e agrícolas, devido ao seu tamanho relativamente grande em relação aos outros bivalves, sua abundância nas populações naturais, sua mobilidade limitada e por sua sensibilidade a produtos químicos no ambiente marinho (Lima et al. 2017). A despeito disso e do potencial da espécie para o cultivo são poucos os trabalhos que podem ser encontrados com *I. brasiliensis* (Narchi 1972; Mesquita et al. 2001; Boehs et al. 2010; Ceuta et al. 2010; Moreira et al. 2011; Silva et al. 2012; Silva et al. 2013; Silva et al. 2016) sendo, a maioria deles, restritos a questões locais.

Espécies estuarinas com larga distribuição longitudinal e sujeitas a uma ampla gama de variáveis ambientais, como é o caso de *I. brasiliensis*, apresentam, geralmente, uma grande variação tanto em traços morfológicos quanto na sua composição genética (Nevo 1978; Attrill et al. 2001; Bilton et al. 2002). Mais que isso, tem sido demonstrado que estas formas de variação não são independentes entre si, apresentando diferentes níveis e formas de correlação (Mitton 1978; Yezerinac et al. 1992). Por exemplo, tem sido encontrado que desvios de simetria para forma e tamanho entre o lado esquerdo e direito do corpo dos indivíduos podem estar associados a diferentes formas de estresse ambiental e genético, fenômeno conhecido como assimetria flutuante (Van Valen 1962). Essa assimetria

flutuante (AF) pode se tornar tanto mais acentuada quanto maior o estresse ambiental (poluição, degradação de habitat, parasitismo etc.) ou genético (endocruzamento, hibridização, redução do tamanho populacional etc.) aos quais os indivíduos estão submetidos (Leary & Allendorf 1989; Clarke 1993) e é um reflexo dos efeitos do estresse sobre o equilíbrio do desenvolvimento dos organismos.

O equilíbrio do desenvolvimento (ED) é a capacidade que um genótipo tem de produzir repetidamente o mesmo fenótipo nas mesmas condições ambientais (Lerner 1954; Møller 1997; Van Dongen 2006). A ruptura deste equilíbrio gera o chamado desequilíbrio do desenvolvimento, que se manifesta como variação fenotípica devido a quebras na integração morfológica (Klingenberg 2008) e na canalização genética, isso é, o fato de um organismo ser capaz de produzir um determinado fenótipo mesmo com mudanças no conjunto de genes e no ambiente responsável pela sua formação (Waddington 1942; Siegal & Bergman 2002). A aferição do desequilíbrio do desenvolvimento pode ser feita pela avaliação do número de variantes para um fenótipo normalmente expresso (Rasmuson 1960) ou pela inferência de assimetria flutuante (Palmer & Strobeck 2003).

Da mesma forma que medidas de assimetria flutuante, características genéticas como os níveis de heterozigosidade de uma população ou valor de heterozigosidade multilocus (MLH) dos indivíduos podem ser indicativos de equilíbrio do desenvolvimento ou da sua ruptura (Soulé 1979; Mitton 1993). Isso porque tais características estão associadas à eficiência das atividades fisiológicas e metabólicas dos organismos. Mais que isso, tem sido demonstradas relações entre níveis de variação gênica das populações e características como taxa de crescimento, viabilidade e resistência a doenças (Ledig *et al.* 1983; Koehn & Gaffney 1984; Mitton & Grant 1984; Zouros *et al.* 1988; Ferguson & Drahushchak 1990; Gaffney 1990; Westerdahl 2007; Zachos *et al.* 2009). Assim, a associação de características morfológicas (como as medidas de assimetria) e genéticas (como medidas de heterozigosidade populacional e MLH de indivíduos) em estudos que pretendem investigar os efeitos do estresse sobre o equilíbrio do desenvolvimento de populações naturais são fundamentais (Parsons 1992; Mitton 1995).

Neste trabalho, foram associadas medidas de assimetria flutuante e variação gênica de *I. brasiliensis* em diferentes locais e ambientes, com o objetivo de avaliar o equilíbrio do desenvolvimento de populações da espécie. Espera-se que os

resultados aqui obtidos possam oferecer informações sobre as relações entre estado de populações naturais desta espécie e variáveis ambientais e genéticas, bem como oferecer subsídios para as iniciativas de exploração e manejo da espécie na costa sudeste do Brasil.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Estudar os padrões de variação gênica e assimetria em populações da espécie *Iphigenia brasiliensis* na costa do estado do Rio de Janeiro.

Objetivos específicos

- Estimar parâmetros básicos de genética de populações (frequências gênicas, número médio de alelos, grau de polimorfismo, heterozigozidade observada e esperada e probabilidades para o equilíbrio de Hardy-Weinberg) para a espécie *I. brasiliensis* na costa do estado do Rio de Janeiro;
- Definir os níveis e formas de assimetria das valvas da concha da espécie;
- Testar as possíveis relações entre variação gênica e assimetria em três locais (Rio das Ostras, Niterói e Paraty) e dois ambientes (canal e manguezal) na costa do estado do Rio de Janeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Foram coletados 278 indivíduos da espécie *Iphigenia brasiliensis* em três localidades ao longo da costa do estado do Rio de Janeiro (RJ, Brasil): Rio das Ostras ($22^{\circ}32'02''$ S $41^{\circ}56'08''$ W), Niterói ($22^{\circ}57'58''$ S $43^{\circ}02'41''$ W) e Paraty ($23^{\circ}12'41''$ S $44^{\circ}42'55''$ W) (Figura 1). As coletas ocorreram entre os meses de outubro de 2016 e fevereiro de 2017. Em cada uma destas localidades, foram amostrados indivíduos em dois ambientes diferentes (manguezal e canal), num total de seis pontos de coleta (dois pontos em cada localidade).

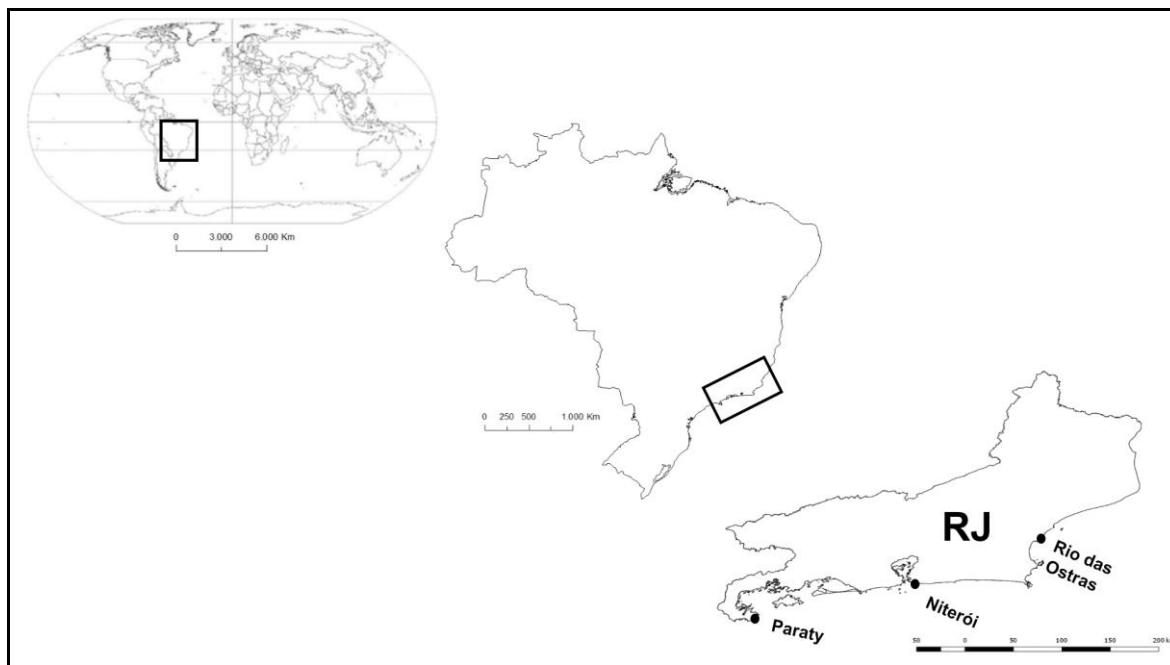


Figura 1. Distribuição dos locais de coleta ao longo da costa sudeste do estado do Rio de Janeiro.

A coleta foi realizada cavando o substrato com as mãos em cerca de 20 cm de profundidade, da mesma forma que foi realizado em outros trabalhos com a espécie (Mesquita *et al.* 2001; Ceuta *et al.* 2010; Silva *et al.* 2012; Silva *et al.* 2017). Após a coleta, todo o material coletado foi acomodado em baldes com água do mar e um pouco do substrato e, depois, transportados ainda vivos para o laboratório (caso das coletas em Niterói e Rio das Ostras). No caso da coleta na localidade de Paraty, o material foi acondicionado em caixas de isopor com gelo seco e depois transportados para o laboratório.

No laboratório, cada espécime foi descarnado e a parte mole de todos os indivíduos foi estocada e mantida em *freezer* a -20º até a realização do trabalho de eletroforese. As conchas foram limpas e armazenadas em caixas até a realização do trabalho de morfometria.

Eletroforese de Aloenzimas

A variação gênica foi amostrada com base em oito sistemas enzimáticos interpretados como 12 *loci* gênicos (*α-Est-1*, *α-Est-2*, *Lap-1*, *Lap-2*, *Mdh*, *Me-1*, *Me-2*, *Pep-1*, *Pep-2*, *Pgd*, *Pgi* e *Pgm* - Tabela 1) pelo método de eletroforese de aloenzimas, consolidado em estudos sobre variação gênica (Schlötterer 2004), principalmente por permitir a amostragem de muitos *loci* gênicos a baixo custo (Silva 2009). Para tal, foram utilizados dois sistema de tampão, o Tris-Hidróxido de Lítio pH 8,0 e o Tris Citrato pH 8,0 (Selander *et al.* 1971), descritos na Tabela 2.

Tabela 1. Enzimas usadas, com abreviações, número de comissão (E.C.), número de subunidades, número de *loci* interpretados e tampões utilizados.

*1 = monomérica; 2 = dimérica; 4 = tetramérica

Abreviatura	Enzima	Nº E.C.	Nº sub.*	Nº loci	Tampão
<i>α-Est</i>	Esterase, alfa	3.1.1.1	1	2	TC 8,0
<i>Lap</i>	Leucina aminopeptidase	3.4.1.1	1	2	TLiOH
<i>Mdh</i>	Desidrogenase do malato	1.1.1.37	2	1	TC 8,0
<i>Me</i>	Enzima málica	1.1.1.40	4	2	TC 8,0
<i>Pep (Gly-Phe)</i>	Peptidase (Glicil-Fenilalanina)	3.4.13.18	2	2	TLiOH
<i>Pgd</i>	Desidrogenase do fosfogliconato	1.1.4.4	2	1	TLiOH
<i>Pgi</i>	Isomerase da glicose-6-fosfato	5.3.1.9	2	1	TC 8,0
<i>Pgm</i>	Fosfoglicomutase	2.7.5.1	1	1	TC 8,0

Tabela 2. Sistemas de tampão utilizados e receita dos tampões de gel e eletrodo.

Tampão	Receita		Referência
	Eletrodos	Gel	
Tris-hidróxido de lílio pH 8,0	Hidróxido de lítio 2,51 g Ácido bórico 18,55 g Água destilada 1,0 L	Trizma base 3,63 g Ácido cítrico 1,05 g Água destilada 1,0 L	Selander <i>et al.</i> 1971
Tris Citrato pH 8,0	Tris 30,3 g Ácido cítrico 12,00 g Água destilada 1,0 L	Tampão Tris Citrato 8,47 ml Água destilada 212 ml	Selander <i>et al.</i> 1971

Para a execução das eletroforeses, um fragmento do tecido de cada espécime foi homogeneizado individualmente em ambiente refrigerado com o auxilio de um bastão de vidro em uma placa de acrílico perfurada mantida sobre uma placa de vidro com gelo, para evitar a proteólise e desnaturação das enzimas. Pedaços de papel de filtro (Whatman 3MM) de aproximadamente 2x15mm foram mergulhados no homogeneizado e, logo em seguida, colocados nos géis. Em cada gel, foi possível acondicionar 30 indivíduos.

O gel suporte para a eletroforese horizontal foi feito de amido 12,5% (27,5g de amido em 220ml de tampão). A solução de amido foi levada ao fogo até fervura e submetida ao vácuo para retirada das bolhas. A solução foi derramada sobre uma placa de vidro com um espaçador de acrílico de 6mm de altura e coberta com uma segunda placa de vidro. Após ser resfriado à temperatura ambiente (aproximadamente 5 min), o gel foi levado à geladeira por aproximadamente 20 min para atingir temperatura e consistência ideais para corrida. Depois disso, o gel foi cortado a uma distância de aproximadamente 3 cm de sua borda inferior, resultando em duas partes desiguais. Os papéis de filtro embebidos no homogeneizado foram colocados ordenadamente no gel (na parte maior). O gel foi, então, remontado. Uma gota de solução de azul de bromofenol foi adicionada em cada lateral do gel para servir como marcador de *front* de corrida. O gel foi, então, colocado em uma cuba de eletroforese horizontal para a corrida eletroforética.

As corridas eletroforéticas foram realizadas com as cubas dentro de uma geladeira, à temperatura média de 5°C, a uma potência média de 3,2 W e um período médio de 7 horas quando utilizado o tampão TC 8,0 e de 11 horas utilizando o tampão TLiOH. Após a corrida, o gel foi fatiado numa mesa de corte fixa na qual

existe um fio de aço inoxidável muito fino disposto em diagonal. As fatias foram de aproximadamente 1mm de espessura, portanto, para cada gel foi possível obter 5 ou 6 fatias. Destas, as duas fatias externas eram descartadas devido a produzirem uma má resolução das enzimas.

As fatias de gel foram colocadas em placas de acrílico e, posteriormente, adicionadas soluções reveladoras apropriadas para cada enzima, conforme Harris & Hopkinson (1978) e Richardson *et al.* (1986). As soluções reveladoras consistiram de um tampão com pH próximo do que é considerado ideal para a enzima, onde foram dissolvidos o substrato da enzima, seus cofatores e substâncias capazes de detectar a reação ou formação do produto. Nas Tabelas 3 e 4 estão as receitas dos tampões reveladores e das enzimas usadas neste trabalho, respectivamente.

Tabela 3. Receitas dos sistemas de tampão usados para revelação (Harris & Hopkinson 1978; Richardson *et al.* 1986).

Tampão	pH	Receita
TRIS Maleato 0,02M	5,3	Água destilada 1,0 L TRIZMA base 1,2 g Ácido maleico 2,3 g
TRIS HCl	8,0	Água destilada 1,0 L TRIS HCl 2,4 g

Tabela 4. Receitas dos sistemas enzimáticos revelados (Harris & Hopkinson 1978; Richardson *et al.* 1986). * dissolvido em 0,5mL de EtOH; ** dissolvido em 0,5mL de acetona; *** pré-incubado em ácido bórico por 30 minutos.

Enzima	Receita	Tampão de revelação
<i>a-Est</i>	<i>a</i> -naphthyl acetate 10mg* Fast blue 20mg	Tris Maleato
<i>Lap***</i>	L-Leucyl- <i>b</i> -Naphthylamide 15mg** Fast Black K 20mg <i>MgCl</i> ₂ 10mg	Tris Maleato
<i>Mdh</i>	NAD 8mg MTT 5mg PMS 1mg Malate 50mg	Tris HCl
<i>Me</i>	NADP 8mg MTT 5mg PMS 1mg <i>MgCl</i> ₂ 10mg Malate 50mg	Tris-HCl
<i>Pep</i>	Glycil Phenylaniline 5mg Ortho-Dianisidine 5mg Peroxidase 100 ml L-Aminoacid Oxidase 5mg <i>MgCl</i> ₂ 10mg	Tris Maleato
<i>Pgd</i>	Phospogluconate 20mg NADP 5mg MTT 5mg PMS 1mg <i>MgCl</i> ₂ 10mg	Tris-HCl
<i>Pgi</i>	NADP 3mg MTT 5mg PMS 1mg <i>MgCl</i> ₂ 25mg G6PDH 1,4u Fructose-6-phosphate 25mg	Tris HCl
<i>Pgm</i>	NADP 5mg MTT 5mg PMS 1mg <i>MgCl</i> ₂ 50mg G6PDH 25mg Glucose-1-phosphate 50mg	Tris HCl

Os padrões de bandas resultantes da revelação foram interpretados de forma mendeliana, de maneira conservadora, seguindo os padrões já encontrados para enzimas mono, di e tetraméricas (Harris & Hopkinson 1978; Richardson *et al.* 1986). Os alelos foram classificados de acordo com sua mobilidade anódica. O alelo mais rápido de cada *locus* foi designado “A”, o segundo “B”, e assim por diante. Esta interpretação foi desenhada em papel pautado. A obtenção das frequências

genotípicas observadas foi obtida através da contagem direta dos genótipos nas interpretações desenhadas no papel.

Após a interpretação, os géis foram colocados por 24 horas em uma solução fixadora de ácido acético a 7% para as enzimas desidrogenases (*Mdh*, *Me*, *Pgd*, *Pgi*, *Pgm*) e uma solução de 5 partes de metanol, 5 partes de água destilada e 1 de ácido acético (5:5:1) no caso das outras enzimas (*a-Est*, *Lap* e *Pep*). Em seguida, foram mergulhados por mais 24 horas em solução de glicerol 5%, etiquetados (nome da enzima, número do gel, tampão e data da eletroforese) e montados entre duas folhas de celofane embebidas na mesma solução de glicerol e deixados para secar por alguns dias a temperatura ambiente, sendo posteriormente arquivados. A Figura 2 representa, de forma resumida, as etapas do método de eletroforese realizado neste trabalho.

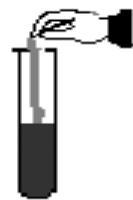
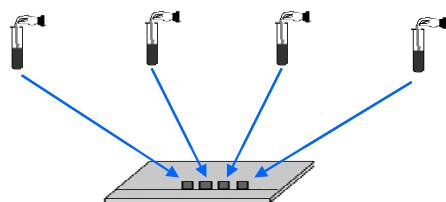
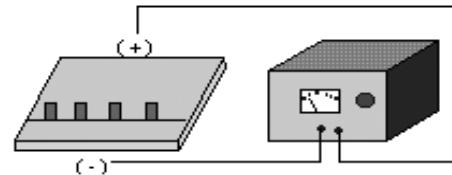
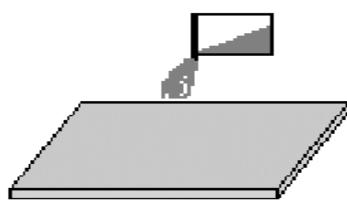
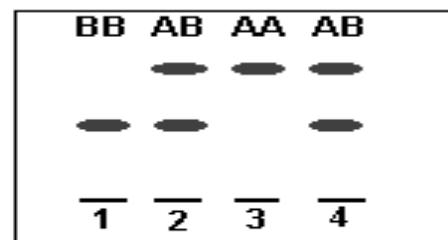
1) POPULAÇÃO NATURAL**2) INDIVÍDUO****3) AMOSTRA DE TECIDO DO INDIVÍDUO****4) HOMOGENEIZADO****5) GEL DE AMIDO COM AMOSTRAS DE HOMOGENEIZADO DE CADA INDIVÍDUO DA POPULAÇÃO****6) ELETROFORESE****7) COLORAÇÃO ESPECÍFICA DAS ALOENZIMAS****8) INTERPRETAÇÃO MENDELIANA DAS BANDAS NO GEL**

Figura 2. Resumo do método de eletroforese de aloenzimas (adaptado de Silva 2009).

Variação Gênica

Para as análises genéticas, foram utilizados os programas GENEPOP 3.3 (Rousset 2008), BIOSYS-2 (Swofford & Selander 1997), Fstat 2.9.3.2. (Goudet 2001), PAST 2.08 (Hammer *et al.* 2001) e Microsoft Excel para Windows. Os genótipos interpretados a partir dos géis foram usados para gerar as frequências gênicas de cada *locus* em cada população através da seguinte fórmula:

$$\text{Frequência (A)} = [(AA) + (AB)/2]/N$$

Onde:

AA e **AB** = contagem direta do número de indivíduos que apresentavam os genótipos homozigotos e heterozigotos presentes na amostra e,

N = tamanho da amostra.

Em populações diplóides, a distribuição dos genes em cada *locus* é governada pela lei de Hardy-Weinberg, obedecidos seus pressupostos. De acordo com essa lei, as frequências genotípicas são dadas pela soma dos quadrados das frequências alélicas. Assim, em um *locus* enzimático com dois alelos (A e B) e dadas as suas frequências (*p* e *q*, respectivamente), as frequências dos três genótipos correspondentes serão dadas pela seguinte equação:

$$\begin{aligned} (p + q)^2 &= 1 \\ p^2 + 2pq + q^2 &= 1 \end{aligned}$$

A comparação entre proporções genotípicas observadas com aquelas esperadas pela lei de Hardy-Weinberg é um procedimento fundamental em genética de populações. O teste do qui-quadrado é o mais comumente utilizado para testar a hipótese de diferenças significativas entre as proporções observadas e esperadas:

$$\chi^2 = \sum (o - e)^2/e$$

Onde:

o = proporção genotípica observada e,

e = proporção genotípica esperada.

Para os testes de conformidade ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi usado um teste exato (Rousset & Raymond 1995), no qual a hipótese nula foi de união ao acaso de gametas e, a hipótese alternativa, o déficit de heterozigotos. A significância dos valores de P obtidos foram corrigidos com a técnica de Bonferroni (Rice 1989):

$$P = \alpha/k$$

Onde:

α = nível de significância e,

k = número de testes realizados.

A heterozigosidade foi calculada de acordo com a fórmula:

$$H = \Sigma(h/r)$$

Onde:

r = número de *loci* e,

h = índice de diversidade gênica:

$$h = 1 - \sum p_i^2$$

Onde:

p = a frequência do alelo i do gene nesse *locus*.

O grau de polimorfismo corresponde ao número de *loci* polimórficos dividido pelo número total de *loci* analisados. Um *locus* foi considerado polimórfico quando mais de um alelo foi detectado.

A variação gênica também foi estimada em nível individual através da construção do genótipo multilocus de cada indivíduo (MLH). Para tanto, foram selecionados os *loci* α -Est-1, α -Est-2, *Mdh*, *Me-1*, *Pgi* e *Pgm*, que foram aqueles com resultados interpretáveis para o maior número de indivíduos em todos os seis pontos amostrados. Os valores de MLH dos indivíduos variaram entre zero (quando todos os seis *locus* eram homozigotos) e seis (quando todos os seis *locus* eram heterozigotos).

Assimetria

As valvas dos indivíduos de *I. brasiliensis* tiveram seis medidas lineares (Figura 3) tomadas com o auxílio de um paquímetro digital da marca *Mitutoyo* com precisão de 0,01 mm. A assimetria foi inferida, para cada uma das medidas tomadas, a partir da razão entre os valores obtidos para as valvas esquerdas e direitas de cada indivíduo (Palmer & Strobeck 1986). Um teste não-paramétrico de Wilcoxon foi usado para conferir se os valores de assimetria obtidos eram significativamente diferentes de zero e, também, para definir qual o tipo de assimetria presente (assimetria flutuante-AF, assimetria direcional-AD ou antissimetria-AS).

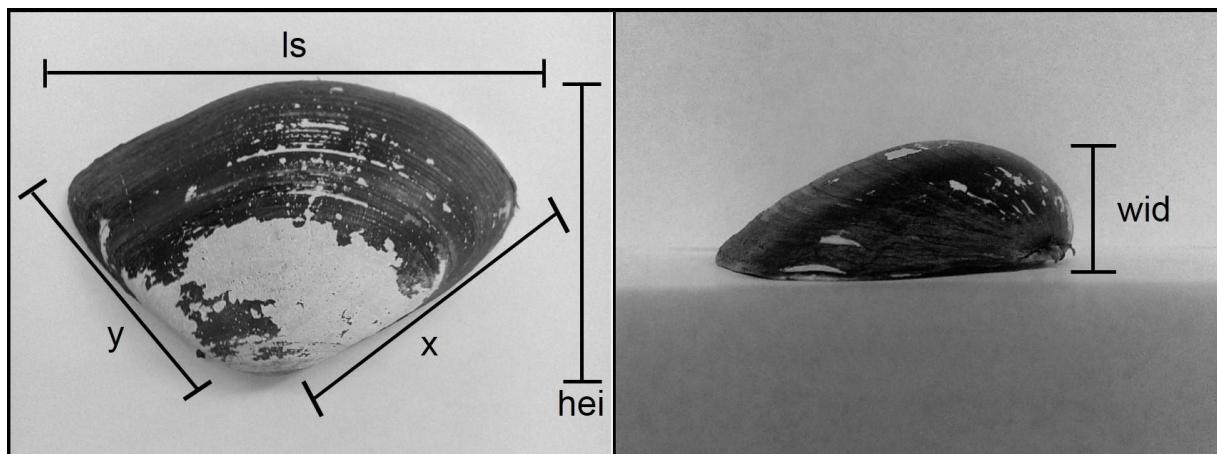


Figura 3. Localização das seis medidas realizadas para cada valva de cada indivíduo. Comprimento da valva (ls); altura da valva (hei); largura da valva (wid); peso da valva (wei); comprimento do umbo até a extremidade ventral direita (x) e comprimento do umbo até a extremidade ventral esquerda (y). As medidas ls, hei, wid e wei foram tomadas com base em outros trabalhos com moluscos bivalves (Christo et al. 2016; Silva 2016), enquanto as medidas x e y foram sugeridas por este trabalho.

Os níveis de assimetria das populações presentes nos seis pontos amostrados foram obtidos por um índice proposto em Palmer e Strobeck (1986), que consiste na variância do logaritmo da razão entre os lados direito e esquerdo de cada indivíduo:

$$\text{var}[\log(A_i)]$$

onde, $A_i = (R/L)$.

Foram utilizados testes de normalidade e um teste não-paramétrico (Teste de Wilcoxon) para aferir os tipos de assimetria presentes em cada uma das medidas em nível populacional.

Equilíbrio do desenvolvimento

As possíveis relações entre parâmetros genéticos e assimetria foram exploradas a partir de regressões lineares aplicadas entre os dados genéticos (valores de heterozigosidade observada e esperada média e por *loci* em nível populacional e MLH em nível individual) e os valores de assimetria em nível populacional e individual das medidas lineares das valvas. O mesmo foi feito para as heterozigosidades médias e os valores de assimetria entre as localidades e entre os ambientes.

4. RESULTADOS

Variação gênica

Um resumo dos valores de tamanho médio de amostra, número médio de alelos e dados gerais de heterozigosidade média observada e esperada para cada um dos seis pontos analisados está apresentado na Tabela 5. Os valores de heterozigosidade foram elevados para todos os seis pontos amostrados e sem diferenças significativas entre as localidades e os ambientes. Foi possível observar que a maior heterozigosidade observada no ambiente de canal se deu na localidade de Paraty, enquanto no ambiente de manguezal, a maior heterozigosidade observada ocorreu na localidade de Niterói. As menores heterozigosidades ocorreram na localidade de Niterói para o ambiente de canal e na localidade de Rio das Ostras para o ambiente de manguezal.

A Tabela 6 apresenta os resultados de frequências gênicas para todos os *loci* nas populações estudadas, bem como os respectivos tamanhos de amostra utilizados para cada *loci*. Os 12 *loci* gênicos interpretados apresentaram polimorfismo. As enzimas *α-Est*, *Lap*, *Me* e *Pep* apresentaram dois *loci* gênicos cada. Todas as outras enzimas apresentaram apenas um *locus*. Foi possível observar que os *loci* *Pep-1*, *Pep-2*, *Pgi* e *Pgm* foram os que apresentaram maior número de alelos, com 5 alelos cada, enquanto os *loci* *α-Est-1* e *α-Est-2* foram os menos polimórficos, com 3 alelos cada.

Tabela 5: Tamanho médio de amostra, número médio de alelos por *locus*, e heterozigosidades médias observadas e esperadas das populações do estado do Rio de Janeiro (Desvios-padrão entre parêntesis).

* Um locus foi considerado polimórfico quando mais de um alelo foi detectado

** Estimativa não-viciada (Nei 1978)

População	Tamanho médio de amostra	Nº médio de alelos	Heterozigosidade média	
			Observada	Esperada**
ROC	$35,8 \pm 4,8$	$3,7 \pm 0,2$	0,535 $\pm 0,049$	0,636 $\pm 0,028$
ROM	$28,2 \pm 2,9$	$3,6 \pm 0,2$	0,505 $\pm 0,040$	0,640 $\pm 0,020$
NIC	$26,5 \pm 3,0$	$3,5 \pm 0,2$	0,520 $\pm 0,047$	0,637 $\pm 0,030$
NIM	$21,0 \pm 3,2$	$3,3 \pm 0,1$	0,583 $\pm 0,053$	0,607 $\pm 0,026$
PAC	$37,3 \pm 4,7$	$3,8 \pm 0,3$	0,552 $\pm 0,047$	0,654 $\pm 0,029$
PAM	$25,3 \pm 2,3$	$3,3 \pm 0,1$	0,575 $\pm 0,071$	0,642 $\pm 0,019$

Tabela 6: Frequências alélicas

N = Tamanho de amostra; ROC = Rio das Ostras Canal; ROM = Rio das Ostras Manguezal; NIC = Niterói Canal; NIM = Niterói Manguezal; PAC = Paraty Canal; PAM = Paraty Manguezal

		Populações					
Loci	Alelo	ROC	ROM	NIC	NIM	PAC	PAM
<i>α-Est-1</i>	A	0,356	0,405	0,300	0,172	0,314	0,267
	B	0,356	0,500	0,357	0,552	0,402	0,317
	C	0,288	0,095	0,343	0,276	0,284	0,417
	N	52	37	35	29	51	30
<i>α-Est-2</i>	A	0,672	0,643	0,513	0,684	0,621	0,515
	B	0,319	0,274	0,461	0,289	0,379	0,470
	C	0,009	0,083	0,026	0,026	0,000	0,015
	N	58	42	38	19	58	33
<i>Lap-1</i>	A	0,280	0,250	0,154	0,294	0,350	0,167
	B	0,400	0,425	0,769	0,500	0,500	0,533
	C	0,260	0,325	0,191	0,191	0,150	0,133
	D	0,060	0,000	0,015	0,015	0,000	0,167
	N	25	20	13	34	10	15
<i>Lap-2</i>	A	0,227	0,221	0,394	0,308	0,186	0,250
	B	0,670	0,588	0,485	0,615	0,716	0,563
	C	0,091	0,191	0,121	0,077	0,098	0,188
	D	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	44	34	33	13	51	32
<i>Mdh</i>	A	0,208	0,298	0,125	0,121	0,373	0,129
	B	0,533	0,464	0,597	0,379	0,364	0,614
	C	0,258	0,238	0,278	0,500	0,264	0,257
	N	60	42	36	33	55	35
<i>Me-1</i>	A	0,178	0,244	0,284	0,129	0,163	0,274
	B	0,611	0,564	0,459	0,258	0,478	0,452
	C	0,211	0,192	0,257	0,500	0,348	0,274
	D	0,000	0,000	0,000	0,113	0,011	0,000
	N	45	39	37	31	46	31
<i>Me-2</i>	A	0,296	0,188	0,320	0,321	0,273	0,241
	B	0,556	0,583	0,420	0,464	0,455	0,426
	C	0,148	0,229	0,260	0,214	0,258	0,333
	D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000
	N	27	24	25	14	33	27

Continuação Tabela 6

<i>Loci</i>	<i>Alelo</i>	Populações					
		ROC	ROM	NIC	NIM	PAC	PAM
<i>Pep-1</i>	A	0,294	0,150	0,250	0,167	0,132	0,200
	B	0,441	0,125	0,250	0,000	0,353	0,600
	C	0,235	0,475	0,125	0,750	0,162	0,200
	D	0,029	0,175	0,375	0,083	0,338	0,000
	E	0,000	0,075	0,000	0,000	0,015	0,000
	N	17	20	8	6	34	10
<i>Pep-2</i>	A	0,111	0,423	0,375	0,000	0,300	0,173
	B	0,222	0,269	0,125	0,167	0,150	0,365
	C	0,389	0,000	0,083	0,500	0,200	0,327
	D	0,222	0,231	0,417	0,333	0,350	0,135
	E	0,056	0,077	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	9	13	12	3	10	26
<i>Pgd</i>	A	0,341	0,306	0,306	0,214	0,346	0,281
	B	0,432	0,139	0,500	0,321	0,365	0,313
	C	0,227	0,500	0,194	0,429	0,250	0,406
	D	0,000	0,056	0,000	0,036	0,038	0,000
	N	22	18	31	14	26	16
<i>Pgi</i>	A	0,024	0,115	0,077	0,279	0,150	0,000
	B	0,378	0,423	0,212	0,441	0,200	0,063
	C	0,293	0,288	0,096	0,279	0,112	0,271
	D	0,183	0,115	0,173	0,000	0,363	0,500
	E	0,122	0,058	0,442	0,000	0,175	0,167
	N	41	26	26	34	40	24
<i>Pgm</i>	A	0,133	0,065	0,146	0,386	0,103	0,200
	B	0,400	0,413	0,292	0,500	0,309	0,320
	C	0,333	0,304	0,313	0,091	0,426	0,340
	D	0,133	0,217	0,250	0,023	0,132	0,140
	E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,000
	N	30	23	24	22	34	25

A maioria dos *loci* não desviou significativamente do esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni (Tabela 7). Contudo, foram encontrados oito desvios significativos, mais do que o esperado ao acaso (3 *loci*). Em relação às heterozigosidades observadas por *locus*, a maior delas foi encontrada na localidade de Niterói no ambiente de manguezal para o *locus Pep-2*, enquanto a menor delas se deu na localidade de Paraty no ambiente de canal para o *locus Lap-2*. Já para as heterozigosidades esperadas, o maior valor foi encontrado para a localidade de Paraty no ambiente de canal para o *locus Pgi*, enquanto o menor valor foi encontrado na localidade de Rio das Ostras no ambiente canal para o *locus Lap-2* (Tabela 8).

Tabela 7: Probabilidades (P) de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_0 : união de gametas ao acaso).

*Significativo após correção de Bonferroni - cada *locus* de cada ponto ($\alpha = 0,0083333$)

** Significativo após correção de Bonferroni - total por ponto ($\alpha = 0,083333$)

*** Significativo após correção de Bonferroni - total por *locus* ($\alpha = 0,0041667$)

	Populações						
	ROC	ROM	NIC	NIM	PAC	PAM	Total
Loci							
<i>a-Est-1</i>	0,0277	0,7360	0,6765	0,0750	0,2274	0,2963	0,0851
<i>a-Est-2</i>	0,0002	0,0046	0,0054	1,0000	0,0000*	0,0000*	0,0000**
<i>Lap-1</i>	0,0058	0,8326	0,5230	0,4428	0,5230	0,2071	0,0016
<i>Lap-2</i>	0,0875	0,0261	0,0013	0,5755	0,0000*	0,0000*	0,0000**
<i>Mdh</i>	0,3273	0,0121	0,6012	0,1517	0,0148	0,0194	0,0013
<i>Me-1</i>	0,1848	0,0031	0,0020	0,0072	0,2410	0,2421	0,0000**
<i>Me-2</i>	0,0128	0,7142	0,0093	0,5497	0,2496	0,0569	0,0048
<i>Pep-1</i>	0,2055	0,0589	0,0028	1,0000	0,0000*	0,0017	0,9999
<i>Pep-2</i>	0,0007	0,0060	0,0815	1,0000	0,1001	0,0280	0,0000**
<i>Pgd</i>	0,0111	0,0000*	0,0174	0,1224	0,0145	0,6877	0,0000**
<i>Pgi</i>	0,0000*	0,0180	0,0000*	0,7559	0,0062	0,2319	0,9999
<i>Pgm</i>	0,2291	0,0047	0,5448	0,0122	0,4126	0,6073	0,0093
TOTAL	0,9999	0,0000***	0,0000***	0,0512	0,9999	0,0000***	0,9999

Tabela 8: Heterozigosidades por *locus* (Hobs = heterozigozidade observada; Hesp = heterozigozidade esperada).

População	<i>α-Est-1</i>		<i>α-Est-2</i>		<i>Lap-1</i>		<i>Lap-2</i>		<i>Mdh</i>		<i>Me-1</i>	
	Hobs	Hesp	Hobs	Hesp	Hobs	Hesp	Hobs	Hesp	Hobs	Hesp	Hobs	Hesp
ROC	0,769	0,670	0,655	0,450	0,480	0,704	0,386	0,496	0,683	0,611	0,622	0,557
ROM	0,622	0,585	0,524	0,511	0,600	0,668	0,382	0,577	0,500	0,647	0,718	0,593
NIC	0,686	0,675	0,763	0,531	0,308	0,397	0,364	0,604	0,500	0,558	0,676	0,651
NIM	0,621	0,600	0,421	0,459	0,706	0,636	0,462	0,542	0,788	0,601	0,452	0,665
PAC	0,608	0,666	0,724	0,475	0,400	0,637	0,196	0,448	0,782	0,665	0,522	0,630
PAM	0,833	0,666	0,939	0,522	0,333	0,664	0,156	0,595	0,600	0,548	0,774	0,656

População	<i>Me-2</i>		<i>Pep-1</i>		<i>Pep-2</i>		<i>Pgd</i>		<i>Pgi</i>		<i>Pgm</i>	
	Hobs	Hesp	Hobs	Hesp	Hobs	Hesp	Hobs	Hesp	Hobs	Hesp	Hobs	Hesp
ROC	0,333	0,593	0,647	0,683	0,222	0,778	0,409	0,661	0,512	0,731	0,700	0,705
ROM	0,500	0,584	0,500	0,718	0,538	0,717	0,167	0,652	0,577	0,722	0,435	0,700
NIC	0,600	0,667	0,250	0,767	0,500	0,692	0,387	0,629	0,577	0,729	0,625	0,749
NIM	0,500	0,659	0,500	0,439	1,000	0,733	0,429	0,690	0,706	0,659	0,409	0,606
PAC	0,515	0,662	0,441	0,728	0,700	0,763	0,500	0,696	0,650	0,772	0,588	0,704
PAM	0,519	0,662	0,200	0,589	0,577	0,725	0,625	0,679	0,542	0,659	0,800	0,737

Assimetria

Um resumo dos dados de assimetria está mostrado na Tabela 9. Com relação às medidas lineares das valvas, todas elas revelaram evidência de assimetria que variou entre flutuante (AF) e direcional (AD). Não foi possível observar nenhuma tendência para as localidades amostradas (a exceção de Rio das Ostras Canal, onde todas as medidas se mostraram com AD) ou para as medidas (a exceção de x, para a qual todas as localidades e ambientes se mostraram com AD). Foi observada uma tendência para a assimetria do tipo flutuante no ambiente de manguezal e direcional no ambiente de canal, contudo, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 0,1573$, df= 1, p = 0,6916).

Tabela 9: Tipos de assimetria encontrados para cada medida em cada ambiente e localidade para os seis pontos analisados.

ls = comprimento da valva; hei = largura da valva; wid = altura da valva; x = comprimento do umbo até a extremidade ventral direita; y = comprimento do umbo até a extremidade ventral esquerda; wei = peso da valva.

AF = Medida que apresentou assimetria flutuante; AD = Medida que apresentou assimetria direcional

Ambiente	Localidade	Tipo e direção da assimetria					
		ls	hei	wid	x	y	wei
Canal	Rio das Ostras	AD	AD	AD	AD	AD	AD
	Niterói	AF	AF	AF	AD	AD	AD
	Paraty	AD	AF	AD	AD	AD	AD
Manguezal	Rio das Ostras	AF	AF	AD	AD	AD	AD
	Niterói	AD	AF	AF	AD	AF	AF
	Paraty	AF	AF	AD	AD	AD	AD

Equilíbrio do Desenvolvimento

Nível Populacional

As regressões lineares entre os valores de heterozigosidade média dos pontos amostrados e os valores de assimetria encontrados para cada medida foram realizadas levando em consideração o tipo de assimetria apresentado (AF ou AD), as localidades e os ambientes. Foram obtidos resultados significativos para as heterozigosidades observadas e a AF da altura da valva (hei; $R^2 = 0,815$, p = 0,0358; Figura 4) e para as heterozigosidades esperadas e a AD do comprimento do umbo até a extremidade ventral direita (x; $R^2 = 0,769$, p = 0,021; Figura 5). Não foram encontrados valores significativos entre as

heterozigosidades e assimetria quando as regressões foram realizadas levando em consideração as três localidades ou os dois ambientes amostrados.

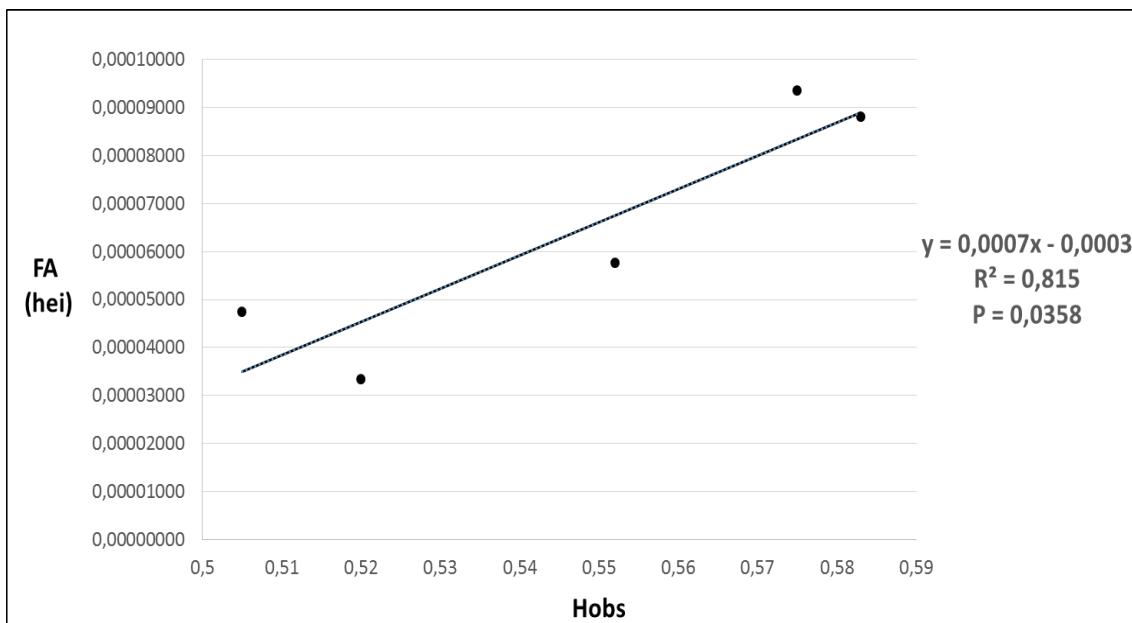


Figura 4: Regressão entre heterozigosidade média observada e assimetria da altura da valva (hei).

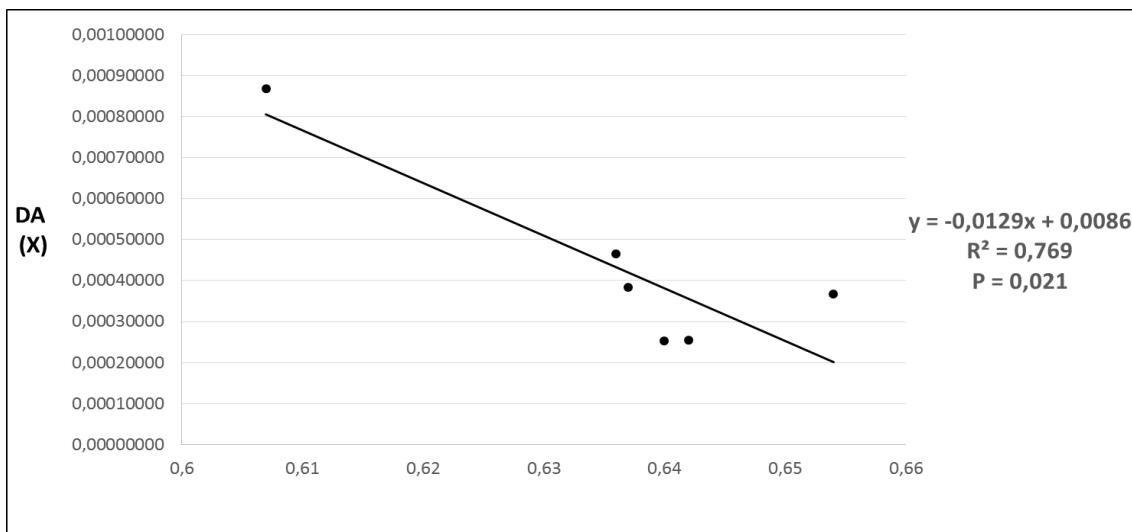


Figura 5: Regressão entre heterozigosidade média esperada e assimetria da medida de comprimento do umbo até a extremidade ventral direita (x).

Em função dos resultados anteriores, as heterozigosidades de cada *loci* (Tabela 2) foram regredidas em relação aos valores de assimetria das medidas hei e x, a fim de averiguar se algum dos *loci* amostrados poderia estar influenciando os resultados obtidos. Neste caso, foi encontrado um resultado

significativo entre as heterozigosidades esperadas para o *locus Pgm* e os valores de assimetria da medida x ($R^2 = 0,7572$, $p = 0,02419$; Figura 6).

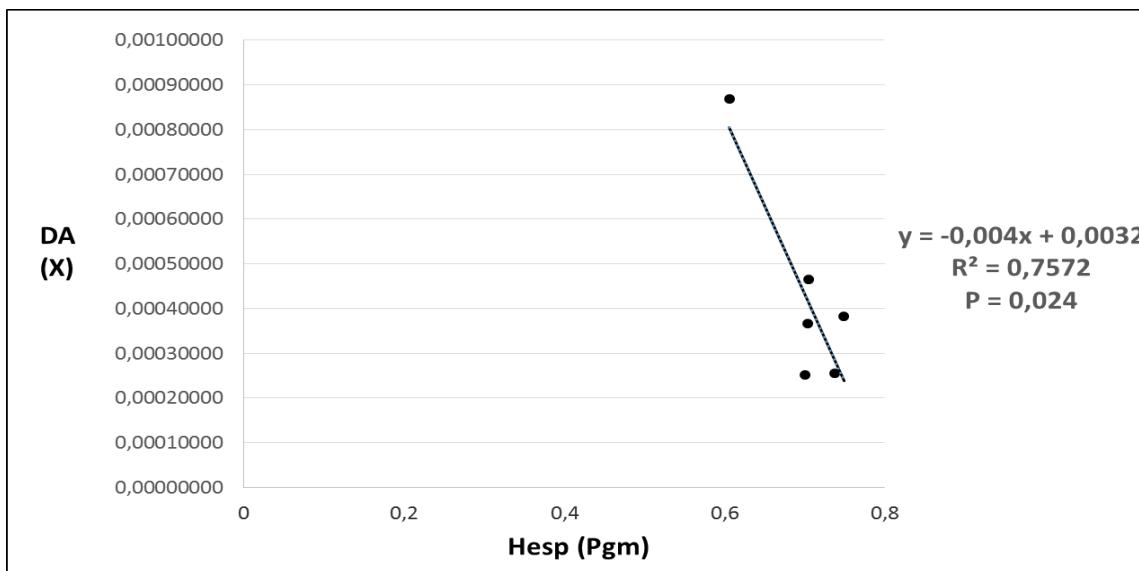


Figura 6: Regressão entre heterozigosidade esperada para o *locus Pgm* e assimetria da medida de comprimento do umbo até a extremidade ventral direita (x).

Nível individual

As regressões realizadas com os valores de MLH dos indivíduos foi realizada levando em consideração, também, os valores de assimetria encontrados para cada medida, as localidades e os ambientes. O valores de MLH apresentaram valores significativos de regressão com a assimetria de altura ($R^2 = 0,06$, $p = 0,038$; Figura 7) e largura da valva ($R^2 = 0,1003$, $p = 0,006$; Figura 8). Não foram encontrados valores significativos de regressão entre MLH e assimetria quando as regressões foram realizadas levando em consideração os ambientes, contudo, a localidade de Niterói apresentou um valor de coeficiente de regressão significativo entre MLH e a assimetria das seis medidas lineares ($R^2 = 0,064$, $p = 0,02811$; Figura 9).

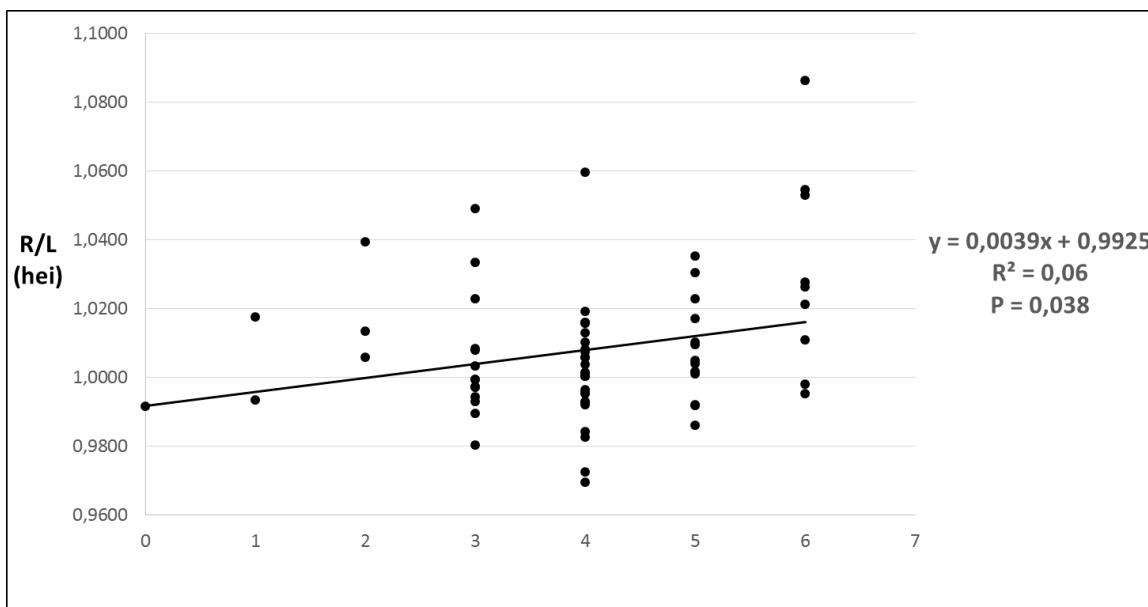


Figura 7: Regressão entre heterozigosidade multilocus e assimetria individual da altura da valva.

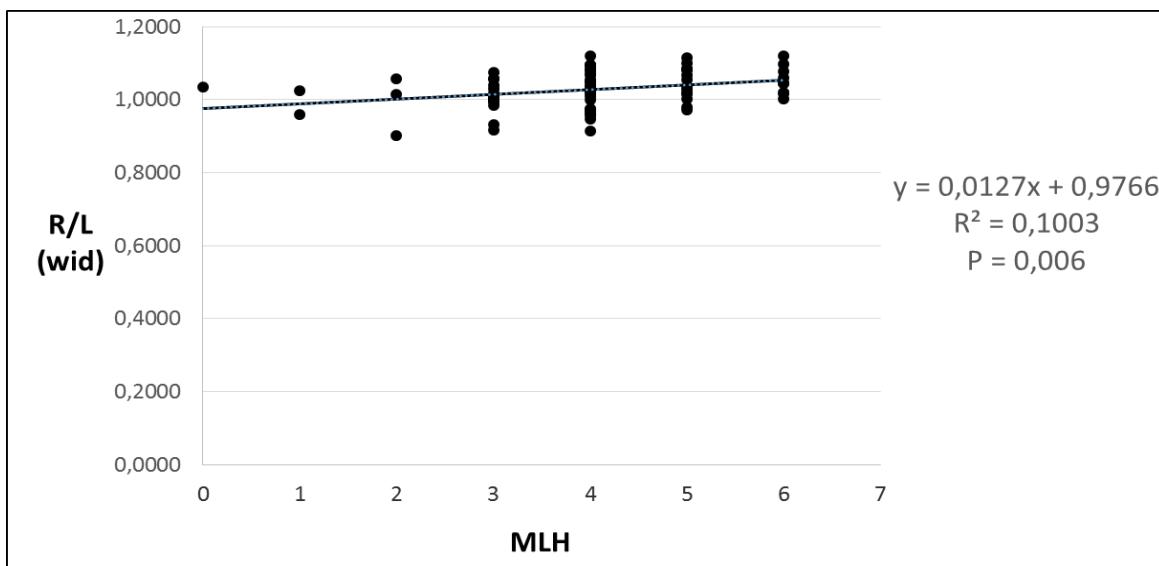


Figura 8: Regressão entre heterozigosidade multilocus e assimetria individual da largura da valva.

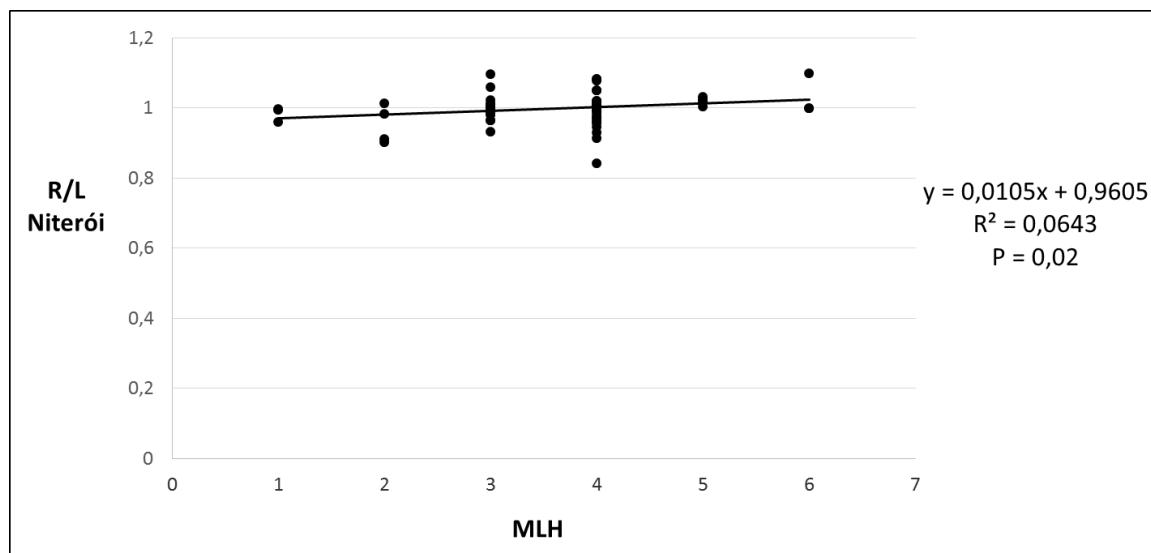


Figura 9: Regressão entre heterozigosidade multilocus e assimetria individual na localidade Niterói.

5. DISCUSSÃO

Os valores encontrados para os parâmetros de variação gênica neste trabalho são altos e semelhantes àqueles vistos em outros trabalhos com moluscos bivalves num geral (Nevo 1978; Ward *et al.* 1992). A hipótese mais aceita para justificar tal padrão de variação gênica é a atuação em baixa intensidade da deriva gênica (Nei 1975; 2005) nos ambientes e localidades analisados, devido aos grandes tamanhos populacionais característicos de *Iphigenia brasiliensis*. Outra explicação possível é a de que estes indivíduos estão em ambientes que sofrem variações sazonais, o que favorece a manutenção dos polimorfismos nestas populações através da seleção natural (Clarke 1975; Nevo 1975), podendo esta ser uma seleção a favor dos heterozigotos ou uma seleção diversificadora com a ocorrência de fluxo genético extensivo. A família Donacidae, a qual pertence *I. brasiliensis*, apresenta reprodução sexuada com liberação e união dos gametas na coluna d'água e a formação de larvas planctônicas sendo, portanto, carregadas pelas correntes marinhas até seu estabelecimento no substrato, o que faz com que eles se espalhem por quilômetros de distância (Conn 1991). Contudo, o desenho experimental desenvolvido nesse trabalho não permitiu testes específicos para essas hipóteses.

Em relação às assimetrias, o maior número de medidas que apresentaram AF no ambiente de manguezal em relação ao de canal se deve, provavelmente, a algumas condições a que estes ambientes estão sujeitos. Todos os manguezais amostrados têm sofrido vários tipos de degradação de origem antrópica, como a entrada de efluentes domésticos, desmatamento e aterramentos (Fonseca & Drummond 2003; Lodi 2003; Bernini *et al.* 2014; Fontenelle & Corrêa 2014; Thomaz *et al.* 2014; Araujo *et al.* 2017), o que tem como consequência um incremento das condições de anoxia e toxicidade do ambiente (Defew *et al.* 2005; Reef *et al.* 2010; Panda *et al.* 2013). Por exemplo, Moreira *et al.* (2011) identificaram, durante o período do verão (mesma estação na qual os indivíduos desse trabalho foram amostrados), uma alta concentração de coliformes fecais tanto na água quanto na parte mole de indivíduos de *I. brasiliensis* amostrados no manguezal da localidade de Paraty. Com relação ao ambiente de canal amostrado neste trabalho, todas as localidades apresentaram uma conexão próxima e direta com o oceano, estando menos sujeitos aos efeitos de degradação ambiental. Contudo, no ambiente de canal que ocorrem oscilações

constantes e periódicas de temperatura e salinidade (Berrêdo *et al.* 2008; Monteiro *et al.* 2002). Assim, embora ambos os ambientes estejam sujeitos a estresse ambiental parece que aqueles de origem antrópica têm um efeito maior sobre o equilíbrio do desenvolvimento dos indivíduos da espécie *I. brasiliensis*.

O grande número de medidas que apresentaram AD mesmo no ambiente de manguezal está, provavelmente, relacionado ao sentido biológico que essa assimetria tem em moluscos. Existem evidências de que diversas espécies de bivalves apresentam AD como padrão corporal (Palmer 1996; Briones & Guiñez 2008). Um exemplo é *Perumytilus purpuratus*, espécie de substrato duro na qual a valva direita é consideravelmente mais alongada que a esquerda (Briones & Guiñez 2005). Funcionalmente, a diferença de forma das valvas auxilia na fixação e na estabilização no substrato (Palmer 2005) e, em alguns casos, melhora a eficiência de filtração (Savazzi 1984), o que representa uma vantagem para os seus portadores e justifica a presença dominante deste tipo de assimetria em moluscos, de forma geral.

Os resultados significativos encontrados entre heterozigosidade multilocus e assimetria na espécie *I. brasiliensis* indicam uma relação entre variação gênica e equilíbrio do desenvolvimento. Tal resultado está de acordo com o que é, geralmente, encontrado na literatura, que indica que altos níveis de variação gênica contribuem para a estabilidade do desenvolvimento (Mitton & Grant 1984; Palmer & Strobeck 1986; Mitton 1993; 1995). Uma relação como essa foi encontrada analisando-se 103 indivíduos no canal de Cape Cod (Massachusetts, EUA), a MLH (4 *loci*) e 14 medidas da valva do molusco bivalve *Mytilus edulis* (Mitton & Koehn 1985). A explicação associada a esses resultados é de que a heterozigosidade favorece um crescimento e desenvolvimento mais regulares, tamponando os efeitos da variação ambiental (natural ou advinda de efeitos antropogênicos) e genética (redução do tamanho de população, endocruzamento etc.) (Leamy & Klingenberg 2005).

As regressões realizadas entre as heterozigosidades médias e os valores de assimetria (direcional e flutuante) de cada medida para os seis pontos de coleta indicaram uma relação de sentido contrário entre variação gênica e equilíbrio do desenvolvimento em relação a que foi encontrada em nível individual. A medida hei apresentou um valor de regressão significativo entre a heterozigosidade e AF, resultado espelhado na regressão realizada entre

heterozigosidade e AD observado para a medida x. Análises de metadados (Vøllestad *et al.* 1999) indicam que a relação positiva entre variação gênica e equilíbrio do desenvolvimento, embora predominante, não é exclusiva na literatura. Mais que isso, as relações encontradas são, geralmente, fracas de um ponto de vista estatístico, variando entre grupos taxonômicos próximos (Leary *et al.* 1984; Blanco *et al.* 1990; Karakousis & Trianaphyllidis 1992; Kazakov & Titov 1993; Moran *et al.* 1997; Vøllestad & Hindar 1997) e até mesmo dentro de uma única espécie (Britten 1996). Por exemplo, foram encontradas correlações positivas e significativas em regressões entre as heterozigosidades de 13 *loci* e valores de assimetria de 12 medidas de dentes pre-molares de indivíduos adultos de *Lepus europaeus* da Áustria, o que não pode ser observado para os mesmos *loci* e medidas dos juvenis (Suchentrunk 1993). Além disso, a diferença entre os sentidos das regressões encontrada para MLH, heterozigosidades médias e assimetria observada nesse trabalho pode estar associada ao fato de que o conjunto de dados não é o mesmo, sendo a MLH uma subamostragem de toda a variação gênica amostrada, uma vez que foram usados para composição da MLH seis *loci* do total de doze e apenas os indivíduos que apresentaram resultados interpretáveis para esses seis *loci*.

De todos os *loci* amostrados, *Pgm* foi o único que apresentou valor de regressão estatisticamente significativo com os dados de assimetria direcional. A relação entre *Pgm* e diferentes elementos da adaptação (taxa de crescimento, variação de tamanho etc.) já foi demonstrada para diferentes organismos (Ferguson & Ihssen 1991; Ward & Elliott 1993; Hosken *et al.* 2000). Um exemplo de relação negativa entre *Pgm* e assimetria foi descrito para indivíduos machos heterozigotos de *Agelaius phoeniceus* que apresentavam maiores níveis de assimetria flutuante em relação aos homozigotos (Weatherhead *et al.* 1999). Tal resultado, porém, deve ser tomado com cuidado, uma vez que *I. brasiliensis* e *Agelaius phoeniceus* são espécies de grupos taxonômicos muito distantes evolutivamente, vivendo em habitats completamente distintos.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, a espécie *Iphigenia brasiliensis* apresentou assimetria em todos os seis pontos estudados. Na maioria dos casos, essa assimetria era do tipo direcional, mas foram observados casos de AF em cinco dos seis pontos e em cinco das seis medidas tomadas, na maioria dos casos associada com o ambiente de manguezal. Em relação às relações entre os valores de heterozigosidade e assimetria, eles indicaram uma regressão positiva entre heterozigosidade e assimetria flutuante, tanto para as médias dos valores quanto para o locus *Pgm*. As regressões entre os valores de MLH e assimetria flutuante, por sua vez, apresentaram uma regressão negativa. Estes resultados, de forma geral, são indicativos da ocorrência de desequilíbrio do desenvolvimento em *I. brasiliensis* associada tanto a fatores de estresse ambiental quanto em ligação (direta ou indireta) com *loci* específicos como é o caso de *Pgm*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araujo AV, Dias CO & Bonecker SLC (2017) Differences in the structure of copepod assemblages in four tropical estuaries: Importance of pollution and the estuary hydrodynamics. *Marine Pollution Bulletin*, 115:412-420.
- Attrill MJ, Stafford R & Rowden AA (2001) Latitudinal diversity patterns in estuarine tidal flats: indications of a global cline. *Ecography*, 24:318-324.
- Bernini E, Santos CFNR, Lage-Pinto F, Chagas GP & Rezende CE (2014) Fitossociologia de florestas de mangue plantadas e naturais no estuário do Rio das Ostras, Rio de Janeiro, Brasil. *Biotemas*, 27(1):37-48.
- Berrêdo JF, Costa ML & Progene MPS (2008) Efeitos das variações sazonais do clima tropical úmido sobre as águas e sedimentos de manguezais do estuário do rio Marapanim, costa nordeste do Estado do Pará. *Acta Amazonica*
- Bilton DT, Paula J & Bishop JDD (2002) Dispersal, Genetic Differentiation and Speciation in Estuarine Organisms. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55:937-952.
- Blanco G, Sánchez JA, Vasques E, Garcáa E & Rubio J (1990). Superior developmental stability of heterozygotes at enzyme loci in *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 84:199-209.
- Boehs G, Villalba A, Ceuta LO & Luz JR (2010) Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). *Journal of Invertebrate Pathology*, 103:43-47.
- Briones C & Guiñez R (2005) Asimetría bilateral de la forma de las valvas y posición espacial en matrices del chorito *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, 78:3-14.
- Briones C & Guiñez R (2008) Una revisión de la asimetría bilateral en bivalvos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(1):1-6.
- Britten HB (1996) Meta-analyses of the association between multilocus heterozygosity and fitness. *Evolution*, 50:2158-2164.
- Ceuta LO, Boehs G & Santos JJB (2010) Hermaphroditism among dioecious *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) (Mollusca, Psammobiidae) and *Iphigenia brasiliiana* (Lamarck, 1818) (Mollusca, Donacidae) on the Cachoeira River Estuary, Ilhéus, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 70(1):125-127.
- Chisto SW, Ferreira AL & Absher TM (2016) Aspectos Reprodutivos de Mexilhões (Bivalvia, Mollusca) no Complexo Estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 42(4):924-936.
- Clarke GM (1975) The contribution of ecological genetics to evolutionary theory: Detecting the direct effects of natural selection on particular polymorphic loci. *Genetics*, 79:101-113.
- Clarke GM (1993) Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environmental Pollution*, 82(2):207-211.
- Conn DB (1991) *Atlas of invertebrate reproduction and development*. Wiley-Liss, New York, 252 p.

- Defew LH, Mair JM & Guzman HM (2005) An assessment of metal contamination in mangrove sediments and leaves from Punta Mala Bay, Pacific Panama. *Marine Pollution Bulletin*, 50:547-552.
- Domaneschi O & Lopes SGBC (1988) Familia Donacidae Fleming, 1828: Parte I. Informativo Sbma, 87:9-12.
- Ferguson MM & Drahushchak LR (1990) Disease resistance and enzyme heterozygosity in rainbow trout. *Heredity*, 64:413-417.
- Ferguson MM & Ihssen PE (1991) Distribution and Phenotypic Correlates of Variation at Enzyme Coding Loci in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* from the Lower Laurentian Great Lakes. *Canadian Journal of Aquatic Science*, 48:1308-1315.
- Fonseca SM & Drummond JA (2003) O valor de existência de um ecossistema costeiro tropical através da disposição ao trabalho voluntário: O caso da Lagoa de Itaipu (Niterói, RJ). *Ambiente & Sociedade*, 5(2):85-107.
- Fontenelle TH & Corrêa WB (2014) Impactos da urbanização no espelho d'água dos sistemas lagunares de Itaipu e de Piratininga, Niterói (RJ), entre 1976 e 2011. *Boletim de Geografia*, 32(2):150-157.
- Gaffney PM (1990) Enzyme Heterozygosity, Growth Rate, and Viability in *Mytilus edulis*: Another Look. *Evolution*, 44(1):204-210.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 02 jul 2017.
- Hammer Ø, Harper DAT & Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1):1-9.
- Harris H & Hopkinson DA (1978) Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Hosken DJ, Blanckenhorn WU & Ward PI (2000) Developmental stability in yellow dong flies (*Scathophaga stercoraria*): fluctuating asymmetry, heterozygosity and environmental stress. *Journal of Evolutionary Biology*, 13(6):919-926.
- Karakousis Y & Triantaphyllidis C (1992) Heterozygosity and morphological variability in brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from Greece. *Zoologische Anzeiger*, 228:149-155.
- Kazakov RV & Titov SF (1993) Population genetics of salmon, *Salmo salar* L., in northern Russia. *Aquaculture and Fisheries Management*, 24:495-506.
- Klingenberg CP (2008) Morphological Integration and Developmental Modularity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 39:115-132.
- Koehn RK & Gaffney PM (1984) Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 82(1):1-7.
- Leamy LJ & Klingenberg CP (2005) The Genetics and Evolution of Fluctuating Asymmetry. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 36:1-21.
- Leary RF & Allendorf FW (1989) Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: Implications for conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 4(7):214-217.

- Leary RF, Allendorf FW & Knudsen KL (1984) Superior developmental stability of heterozygotes at enzyme loci in salmonid fishes. *American Naturalist*, 124:540-551.
- Ledig FT, Guries RP & Bonefeld BA (1983) The Relation of Growth to Heterozygosity in Pitch Pine. *Evolution*, 37(6):1227-1238.
- Lerner IM (1954) Genetic homeostasis. Oliver & Boyd, London, 134 p.
- Lima SFB, Lucena RA, Santos GM, Souza JW, Christoffersen ML, Guimarães CR & Oliveira GS (2017) Inventory of mollusks from the estuary of the Paraíba River in northeastern Brazil. *Biota Neotropica*, 17(1):1-12.
- Lodi L (2003) Seleção e uso do habitat pelo boto-cinza, *Sotalia guianensis* (Van Bénéden, 1864) (Cetacea, Delphinidae), na Baía de Paraty, Estado do Rio de Janeiro. *Bioikos*, 17(1/2):5-20.
- Mesquita EFM, Abreu MG & Lima FC (2001) Aspectos gametogênicos e histoquímicos de *Iphigenia brasiliiana* (Lamarck) (Bivalvia, Donacidae) da Lagoa de Itaipu, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18(2):523-528.
- Mitton JB & Grant MC (1984) Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15:479-499.
- Mitton JB & Koehn RK (1985) Shell shape variation in the blue mussel, *Mytilus edulis* L., and its association with enzyme heterozygosity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 90:73-80.
- Mitton JB (1978) Relationship between heterozygosity for enzyme loci and variation of morphological characters in natural populations. *Nature*, 273:661-662.
- Mitton JB (1993) Enzyme heterozygosity, metabolism, and developmental stability. *Genetica*, 89:47-65.
- Mitton JB (1995) Enzyme heterozygosity and developmental stability. *Acta Theriologica*, 40(Suppl. 3):33-54.
- Møller AP (1997) Developmental Stability and Fitness: A Review. *The American Naturalist*, 149(5):916-932.
- Monteiro SM, El-Robrini M & Alves ICC (2015) Dinâmica Sazonal de Nutrientes em Estuário Amazônico. *Mercator*, 14(1):151-162.
- Monteles JS, Castro TCS, Viana DCP, Conceição FS, França VL & Funo ICSA (2009) Percepção Socio-Ambiental das Marisqueiras no Município de Raposa, Maranhão, Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 4(2):34-45.
- Moran P, Izquierdo JI, Pendas AM & Garcia-Vazquez E (1997). Fluctuating asymmetry and isozyme variation in Atlantic salmon: relation to age of wild and hatchery fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 126:194-199.
- Moreira AS, Leão MVP, Santos SSF, Jorge AOC & Silva CRG (2011) Qualidade sanitária da água e de bivalves *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818) na praia do Jabaquara, Paraty, RJ. *Revista Biociências*, 17(1):66-71.
- Narchi W (1972) On the biology of *Iphigenia brasiliensis* Lamarck, 1818 (Bivalvia, Donacidae). *Proceedings of the Malacological Society of London*, 40:79-91.

- Nei M (1975) Molecular Population genetics and Evolution. North Holland, Amsterdam, 288 p.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3):583-590.
- Nei M (2005) Selectionism and Neutralism in Molecular Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 22(12):2318-2342.
- Nevo E (1975) Genetic Variation as a Test of Natural Selection. *Proceedings of the National American Society*, 72(6): 2145-2149.
- Nevo E (1978) Genetic Variation in Natural Populations: Patterns and Theory. *Theoretical Population Biology*, 13:121-177.
- Palmer AR & Strobeck C (1986) Fluctuating asymmetry: Measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 17:391-421.
- Palmer AR & Strobeck C (2003) Fluctuating asymmetry analyses revisited. In: Polak M (ed) *Developmental Instability (DI): Causes and Consequences*. Oxford University Press. Oxford, p. 279-319.
- Palmer AR (1996) From symmetry to asymmetry: Phylogenetic patterns of asymmetry variation in animals and their evolutionary significance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:14279-14286.
- Palmer AR (2005) Antisymmetry. In: Hallgrímsson B, Hall BK (eds) *Variation*. Elsevier. Amsterdam, p. 359-397.
- Panda SS, Chaturvedi N, Dhal NK & Rout NC (2013) An assessment of heavy metal accumulation in mangrove species of Bhitarkanika, Odisha, India. *Research in Plant Biology*, 3(6):1-5.
- Parsons PA (1992) Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity*, 68:361-364.
- Rasmuson M (1960) Frequency of morphological deviants as a criterion of developmental stability. *Hereditas*, 46:511-535.
- Reef R, Feller IC & Lovelock CE (2010) Nutrition of mangroves. *Tree Physiology*, 30:1148-1160.
- Rice WR (1989) Analysing tables of statistical tests. *Evolution*, 43:223-225.
- Richardson BJ, Baverstock PR & Adams M (1986) Allozyme electrophoresis - a handbook for animal systematics and population studies. Academic Press Inc., Sydney, 410p.
- Rios EC (1994) Seashells of Brazil. Editora da FURG, Rio Grande, 492 p.
- Rousset F & Raymond M (1995) Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, 140:1413-1419.
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1):103-106.
- Savazzi E (1984) Adaptive significance of shell torsion in mytilid bivalves. *Paleontology*, 27:307-314.
- Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5:63-69.

- Selander RK, Smith MH, Yang SY, Johnson WE & Gentry JR (1971) Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*, I: Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in Genetics*, 6:49-70.
- Siegal ML & Bergman A (2002) Waddington's canalization revisited: Developmental stability and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16):10528-10532.
- Silva EP (2009) Genética Marinha. In: Soares-Gomes A & Pereira RC (eds) Biologia Marinha . Interciências. Rio de Janeiro, p. 49-70.
- Silva MGEPE, Macêdo SJ & Silva HKP (2013) Avaliação das concentrações de metais-traço em moluscos bivalves *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) e *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818) no estuário do rio Ipojuca - Ipojuca - PE, Brasil. *Tropical Oceanography*, 41(1-2):154-172.
- Silva PP, Peso-Aguilar MC & Paz JRL (2016) Biometria e proporção sexual de *Iphigenia brasiliiana* (Lamarck, 1818) (Bivalvia, Donacidae) da Baía de Guarapuá, Cairu, BA. *Arquivos de Ciências do Mar*, 49(2):7-14.
- Silva PP, Peso-Aguilar MC & Ribeiro G (2012) Ciclo gametogênico e comportamento reprodutivo de *Iphigenia brasiliiana* (Mollusca, Bivalvia, Donacidae) no estuário do rio Subaé, Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. *Iheringia - Série Zoologia*, 102(4):359-369.
- Soulé ME (1979). Heterozygosity and developmental stability: another look. *Evolution*, 33:396-401.
- Souto FJB & Martins VS (2009) Conhecimentos etnoecológicos na mariscagem de moluscos bivalves no Manguezal do Distrito de Acupe, Santo Amaro - BA. *Biotemas*, 22(4):207-218.
- Suchentrunk F (1993) Variability of minor tooth traits and allozymic diversity in brown hare *Lepus europaeus* populations. *Acta Theriologica*, 38(Suppl. 2):59-69.
- Swofford DL & Selander RB (1997) Biosys-2, a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. University of Illinois, Urbana.
- Thomaz FR, Lambert PM & Herms FW (2014) Estudo hidrológico de cheias do rio Perequê-Açu no trecho urbano da cidade de Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. In: Pereira SD, Freitas JG, Bergamasch S & Rodrigues MAC (eds). *Formação E Ocupação de Litorais Nas Margens Do Atlântico*. Editora RedeBraspor. Rio de Janeiro, p. 299-320.
- Van Dongen S (2006) Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: Past, present and future. *Journal of Evolutionary Biology*, 19: 1727-1743.
- Van Valen L (1962) A Study of Fluctuating Asymmetry. *Evolution*, 16(2):125-142.
- Vøllestad LA & Hindar K (1997) Developmental stability and environmental stress in *Salmo salar* (Atlantic salmon). *Heredity*, 78:215-222.
- Vøllestad LA, Hindar K & Møller AP (1999) A meta-analysis of fluctuating asymmetry in relation to heterozygosity. *Heredity*, 83:206-218.
- Waddington CH (1942) Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters. *Nature*, 150:563-565.

- Ward RD & Elliot NG (1993) Heterozygosity and Morphological Variability in the Orange Roughy, *Hoplostethus atlanticus* (Teleostei: Trachichthyidae). Canadian Journal of Aquatic Sciences, 50:1641-1649.
- Ward RD, Skibinski DOF & Woodwork M (1992). Protein Heterozygosity, Protein Structure, and Taxonomic Differentiation. In: Hecht MK, Wallace B & MacIntyre RJ (eds) Evolutionary Biology. Plenum Press. New York, p. 73-159.
- Weatherhead PJ, Dufour KW, Lougheed SC & Eckert CG (1999) A test of the good-genes-as-heterozygosity hypothesis using red-winged blackbirds. Behavioral Ecology, 10(6):619-625.
- Westerdahl H (2007) Passerine MHC: genetic variation and disease resistance in the wild. Journal of Ornithology, 148:469-477.
- Yezerinac SM, Lougheed SC & Handford P (1992) Morphological Variability and Enzyme Heterozygosity: Individual and Population Level Correlations. Evolution, 46(6):1959-1964.
- Zachos FE, Hajji GM, Hmwe SS, Hartl GB, Lorenzini R & Mattioli S (2009) Population Viability Analysis and Genetic Diversity of the Endangered Red Deer *Cervus elaphus* Population from Mesola, Italy. Wildlife Biology, 15(2):175-186.
- Zouros E, Romero-Dorey M & Mallet AL (1988) Heterozygosity and Growth in Marine Bivalves: Further Data and Possible Explanations. Evolution, 42(6):1332-1341.