

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**FILOGEOGRAFIA DE *Brachidontes puniceus* (GMELIN, 1791) NO
ARQUIPÉLAGO DE CABO VERDE**

Mestrado em Biologia Marinha
Especialização em Ecologia e Conservação Marinha

Evandro Pires Lopes

2009

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**FILOGEOGRAFIA DE *Brachidontes puniceus* (GMELIN, 1791) NO
ARQUIPÉLAGO DE CABO VERDE**

Mestrado em Biologia Marinha
Especialização em Ecologia e Conservação Marinha

Evandro Pires Lopes

Dissertação Orientada por:
Professora Doutora Rita Castilho

2009

O conteúdo deste relatório é de exclusiva responsabilidade do autor:

Evandro Pires Lopes

Dedicatória:

A minha mãe que apesar de estar longe me dá todo o apoio e carinho.

Agradecimentos

No momento em que acabo esta dissertação, não podia deixar de agradecer a todos aqueles que deram o seu precioso contributo para a realização da do meu mestrado que culmina com a entrega e defesa dos resultados do trabalho realizado.

Nesta nota, quero particularizar o meu agradecimento:

À Professora Doutora Rita Castilho pela competência com que orientou esta minha tese e o tempo que generosamente me dedicou transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos, com paciência, lucidez e confiança. Sem a sua ajuda e financiamento parcial para colheita das amostras, não seria possível este trabalho.

À equipa do Biocongroup: Doutora Regina Cunha pela ajuda preciosa na execução dos trabalhos, análises e discussão dos resultados; Cláudia Patrão, Davide Reis e Gonçalo Silva pelo auxílio na parte laboratorial e análise de dados; Márcio Coelho pelo companheirismo e troca de ideias, sempre com boa vontade e amizade; A todos, obrigada pela oportunidade de aprender.

Ao Vice-reitor da Universidade do Algarve Professor Doutor Pedro Ferré por tudo o que fez no momento da requisição do visto de entrada em Portugal.

À minha namorada Mónica Chantre em Cabo Verde que esteve sempre do meu lado me apoiando nos bons e maus momentos.

Aos meus familiares pelo incentivo recebido ao longo destes anos. A minha mãe Maria Filomena Leite Pires que tanto me adora e preocupa comigo, pelo apoio de longe e principalmente pelo respeito que me ensinou a ter para com os meus estudos. Ao meu irmão Alvino Reis e a Minha prima Izolinda, por serem os familiares que mais me apoiaram em Portugal e pelo tempo e sorriso que me dedicaram. A todos os meus familiares em Cabo Verde e em Portugal que sempre se preocuparam comigo um obrigada pelo amor, alegria e atenção dispensada.

À Direcção Geral da Juventude (DGJ) de Cabo Verde na pessoa de Zélia Leite por não ter poupado esforços em me apoiar com um bilhete de passagem a Cabo Verde no momento da amostragem.

Aos meus melhores amigos em Portugal e aos professores do Departamento de Ciências do Mar e do Ambiente da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve pelo carinho, atenção e amizade.

Ao pessoal do laboratório e ao Centro de Ciências do Mar (CCMAR) que me forneceu boas condições laboratoriais para a execução do trabalho que conduziu a realização da presente dissertação.

A todos o meu profundo obrigado.

Resumo

A espécie *Brachidontes puniceus* (Gmelin, 1791) é um bivalve pertencente a família Mytilidae, habita fendas rochosas e lagoas de marés. Trata-se de uma espécie que tem uma distribuição restrita à costa ocidental africana e arquipélago de Cabo Verde (desde a Mauritânia até Angola) existindo um registo incerto na ilha de Natal. Tendo como objectivo fazer uma análise filogeográfica baseada em sequências parciais do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (*coxI*), amostraram-se as ilhas de Santo Antão, São Vicente, Santa Luzia, São Nicolau, Sal, Boavista, Maio e Santiago. Foram sequenciadas 115 amostras obtendo um total de 37 haplótipos, sendo 6 destes partilhados entre ilhas. A rede de haplótipos apresenta uma configuração em estrela, com um haplótipo central presente em todas as ilhas, rodeado por haplótipos raros e pouco distintos entre si. A variabilidade haplotípica detectada foi alta (65-89%) e a variabilidade nucleotídica baixa (0.14-0.35%). A variância genética entre pares de ilhas não foi estatisticamente significativa, o que indica que não há diferenças genéticas entre as ilhas ($P > 0.69$). Os valores significativos dos testes de neutralidade ($R^2 = 0.0169$, $D^* = -2.54$), as análises de variância molecular e a distribuição em estrela dos haplótipos sugerem uma expansão populacional rápida de *B. puniceus* em Cabo Verde. O desenvolvimento planctotrófico das larvas e o tempo que estas passam na coluna de água, constitui um factor de dispersão para a espécie, sendo provavelmente o factor chave que impede a diferenciação genética entre ilhas.

Palavras-chave: *Brachidontes puniceus*; Cabo Verde; desenvolvimento planctotrófico; expansão populacional.

Abstract

The bivalve species *Brachidontes puniceus* (Gmelin, 1791) belongs to the family Mytilidae, inhabiting rock fissures and tidal lagoons on rocky shores. This species has a distribution restricted to the West African coast (from Mauritania to Angola) and Cape Verde Islands with an uncertain record in the Christmas Island. To perform a phylogeographic analysis of *B. puniceus* from the Cape Verde Islands based on partial mitochondrial sequence data (cytochrome oxidase subunit I - *coxI*), the islands of Santo Antão, São Vicente, Santa Luzia, São Nicolau, Sal, Boavista, Maio and Santiago were sampled. In total, 115 samples were sequenced and 39 haplotypes were found, with 6 of them shared between the islands. The haplotype network has a star-like configuration with a central haplotype present in all islands, surrounded by rare haplotypes, with few mutational steps apart. Haplotype diversity was high (65-89%) and nucleotide diversity low (0.14-0.35%). The genetic variance between pairs of islands was not statistically significant, indicating the lack of genetic differences between islands ($P > 0.69$). The significant values for the neutrality tests ($R_2 = 0.0169$, $D^* = -2.54$) combined with the analysis of molecular variance (AMOVA) and the star-like haplotype distribution, suggests that the population of *B. puniceus* suffered a rapid and probably recent population expansion in the archipelago. The planktotrophic larval development and the time that larvae spend in the water column may be a vehicle for dispersal of this species preventing genetic differentiation among islands.

Key-words: *Brachidontes puniceus*; Cape Verde Islands; planktotrophic larval development; population expansion.

Índice

Resumo	i
Abstract	ii
Índice das Figuras.....	iv
Índice de Tabelas	vi
INTRODUÇÃO	1
I-MATERIAIS E MÉTODOS	13
1.1. AMOSTRAGEM	13
1.2. EXTRACÇÃO DE ADN	15
1.3. AMPLIFICAÇÃO DO ADN PELA TÉCNICA DA PCR	17
1.4. ELETROFORESE EM GEL	20
1.5. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR PARA SEQUENCIAÇÃO	22
1.6. ANÁLISE DE DADOS.....	23
II- RESULTADOS.....	26
III - DISCUSSÃO	30
CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	40

Índice das Figuras

Figura 1 - Localização Geográfica do Arquipélago de Cabo Verde.	3
Figura 2 - Ilustração das correntes que atravessam o Arquipélago de Cabo Verde. Corrente fria das Canárias gira para Oeste e Nordeste enquanto a Contracorrente equatorial vinda do Sul dirige para Noroeste (Adaptado de Almada, 1993).	4
Figura 3 - Exemplares de <i>B. puniceus</i> (in www.idscaro.net).	6
Figura 4 - Mapa de distribuição do <i>B. puniceus</i> (Segundo Guerreiro & Reiner, 2000; Poppe & Poppe, 2009; Honkoop et al., 2008; Trausel & Slieker, 2009; Gofas et al., 1985).	7
Figura 5 - Marcas concêntricas e radiais no lado externo da concha da espécie <i>B. puniceus</i> (foto: E. Lopes, 2009).	7
Figura 6 - Variação da coloração externa das conchas de <i>B. puniceus</i> (fotos: E. Lopes, 2006; www.idscaro.net , 2009).	8
Figura 7 – Aglomerações de <i>B. puniceus</i> na ilha do Sal (foto: Evandro Lopes, 2009).	8
Figura 8 - Esquema ilustrativo do interior de um exemplar do <i>B. puniceus</i> (Adaptado de Fischer <i>et al.</i> , 1981).	9
Figura 9 - Redes de haplótipos e árvore filogenética obtida por Lee & Ó Foighil (2005) ilustrando os tempos de divergência entre a espécie <i>B. puniceus</i> e <i>B. exustus</i>	10
Figura 10 - Área de estudo: Ilhas amostradas (a cinza) com os respectivos pontos de amostragem assinaladas na orla costeira bem como as coordenadas (N/W).	13
Figura 11 - Costa rochosa da Baía das Gatas onde foi realizada uma das amostragens (foto: Evandro Lopes, 2009).	14
Figura 12 - Amostras de <i>B. puniceus</i> em enclaves na Praia de Ervatão, ilha de Boavista (foto: Evandro Lopes, 2009).	14
Figura 13 - Equipamento usado na amostragem (foto: Evandro Lopes, 2009).	15
Figura 14 - Localização do músculo adutor posterior usado na extração de ADN.	16

Figura 15 - Esquema ilustrativo da reacção de PCR no primeiro ciclo (Adaptado de ncbi.nlm.nih.gov, 2009).....	18
Figura 16 - Representação esquemática de um Ciclo de temperaturas efectuado na reacção de PCR (Adaptado de www.mun.ca/biology/scarr/PCR_simplified.html).....	18
Figura 17 - Esquema ilustrativo dos resultados da reacção de PCR durante os três primeiros ciclos. Os iniciadores são representados pelas cores Vermelho (<i>forward</i>) e preto (reverso). As moléculas verdes e amarelos são as cópias da região amplificável do ADN (Adaptado de ncbi.nlm.nih.gov, 2009).	19
Figura 18 - Ilustração esquemática da eletroforese em gel de agarose: 1- Aplicação das amostras em Gel de Agarose; 2- Aspecto do gel final da eletroforese; 3- Visualização das bandas no trans-iluminador (à luz UV); 4 - Fotografia do Gel (M- Marcador de pesos moleculares; A e B – Amostras de ADN).....	21
Figura 19 - Rede de haplótipos obtida a partir das sequências de COX1 para as populações <i>B. puniceus</i> de Cabo Verde. Cada traço representa uma mutação e cada cor representa uma ilha. O tamanho dos círculos é proporcional a frequência dos haplótipos e os haplótipos partilhados estão numerados.	27
Figura 20 - Distribuição geográfica dos haplótipos. Cada cor representa um haplótipo. Os haplótipos específicos de cada ilha foram agrupados e representados com a cor preta. O tamanho dos círculos representa o número de amostras de cada zona e os valores entre parêntesis representam o número de indivíduos que contêm o referido haplótipo.	28
Figura 21 – Distribuição das frequências nucleotídicas entre pares de sequências.....	29

Índice de Tabelas

Tabela 1- Localização UTM/GPS dos pontos de amostragem.....	14
Tabela 2 - Volumes e concentrações dos reagentes usados na reacção de PCR do COXI.	20
Tabela 3 – Parâmetros da diversidade genética. PIS = locais parcimoniosamente informativos, H = número de haplótipos, h = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica e d.p. = desvio padrão.....	26

INTRODUÇÃO

A filogeografia é um ramo da biogeografia cujo objectivo é o estudo das relações filogenéticas entre organismos relacionados e os processos responsáveis pela sua distribuição geográfica. Trata-se de uma aproximação integrada incluindo dados paleontológicos, demográficos, genética de populações, etologia, e geografia histórica (Avice, 2000).

O aparecimento em 1983 da reacção da polimerase em cadeia (PCR) foi crucial no desenvolvimento da genética de populações e da filogeografia. Com este avanço tecnológico a informação contida nas sequências de ADN tornou-se mais acessível (Avice, 1998). A taxa de evolução do ADN mitocondrial é 5 a 10 vezes maior que o ADN nuclear e, por estar protegido por uma membrana, o torna extremamente importante quando do estudo de espécimes biológicas antigas, cujo ADN nuclear em cópia única, geralmente encontra-se degradado (Avice, 2000). A alta taxa de substituição de bases possibilita que seja observada uma ou mais diferenças na sequência nucleotídica das regiões variáveis do ADNmt, quando indivíduos da mesma linhagem materna ou de uma mesma família são comparados (Brown *et al.*, 1979). Nos estudos de sistemática molecular, os genes mitocôndriais que têm vindo a ser mais utilizados são os que codificam o citocromo oxidase subunidade I (*coxI*), citocromo oxidase subunidade II (*coxII*), citocromo *b* (*cob*), e os genes ribossomiais 16S rRNA e 12S rRNA.

A Biogeografia das ilhas é um campo dentro da Biogeografia que tenta estabelecer e explicar os factores que afectam a riqueza de espécies em ilhas. Foi designada na década de 1960 pelos ecologistas Robert MacArthur da Universidade de Princeton e Wilson EO de Harvard. Propuseram que o número de espécies em qualquer ilha reflecte um equilíbrio entre o ritmo de novas espécies que a colonizam e o ritmo a que as populações de espécies estabelecidas se extinguem (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007).

A imigração é afectada pela distância de uma ilha a partir de uma fonte de colonos. Geralmente essa fonte é o continente, mas também pode ser outras ilhas. Ilhas que estão mais isoladas são menos propensas a receber imigrantes. A taxa de extinção, uma vez que uma espécie consegue colonizar uma ilha, é afectada pelo tamanho da ilha. Ilhas maiores contêm habitats de grandes áreas de e mais variedades. Com habitats

maiores e diversificados, reduz-se as probabilidades de extinção e aumenta o número de espécies que será bem sucedido após a emigração. Existe alguns princípios gerais na colonização de ilhas:

- 1) Grau de isolamento - Quanto mais próxima for a ilha de outra massa de terra, maior a probabilidade de colonização.
- 2) Comprimento de isolamento - Quanto mais antiga, maior a probabilidade de ser colonizada.
- 3) Tamanho da ilha - Quanto maior a ilha, mais espécies irão provavelmente se estabelecer. Pode facilitar uma maior diversidade.
- 4) O isolamento geográfico reduz o fluxo genético entre as populações.
- 5) Com o tempo, as populações colonizadoras vão divergindo geneticamente da população parental, devido a selecção natural, mutação e/ou deriva genética.
- 6) Localização em relação às correntes oceânicas (influências nos nutrientes, peixes, aves, e nos padrões de fluxo de sementes).

A teoria da biogeografia de ilhas é muito utilizada hoje em dia no campo da biologia da conservação. Permite a criação de reservas, parques naturais e áreas marinhas protegidas com intuito de diminuir a influência antropogénica no processo de extinção das espécies insulares. No que concerne a diversidade de espécies, a biogeografia insular descreve uma especiação alopátrica, em que surgem novos grupos de genes pela selecção natural de um gene isolado. A biogeografia de ilhas também é útil na análise de especiação simpátrica em que espécies diferentes surgem de uma espécie ancestral em uma mesma área. Isso dá-se devido aos escassos recursos insulares que fazem com que haja alta competição e por conseguinte a especiação (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007).

Os arquipélagos oceânicos apresentam um elevado número de endemismos (“hot spots” de biodiversidade) resultantes do seu isolamento. A colonização desses habitats remotos depende, de uma forma geral, de eventos fortuitos de colonização e o seu biota é frequentemente uma amostra parcial da biodiversidade continental.

O arquipélago de Cabo Verde representa um sistema modelo muito adequado para estudo de filogeografia pelo elevado grau de endemismo e pela diversidade de ambientes que têm um papel de grande relevo nos processos de especiação. Situa-se a 600 km da costa Ocidental Africana, entre os paralelos 14°50`N-17°20`N e os

meridianos 22°40`W-25°30`W. É constituído por 10 ilhas e 5 ilhéus de origem vulcânica, (Figura 1), divididos em dois grupos básicos: ilhas de Barlavento (Santo Antão, São Vicente, Santa Luzia, São Nicolau, Sal e Boavista) e ilhas de Sotavento (Maio, Santiago, Fogo e Brava) (Almada & Lopes, 1998; Medina *et al.*, 2007).

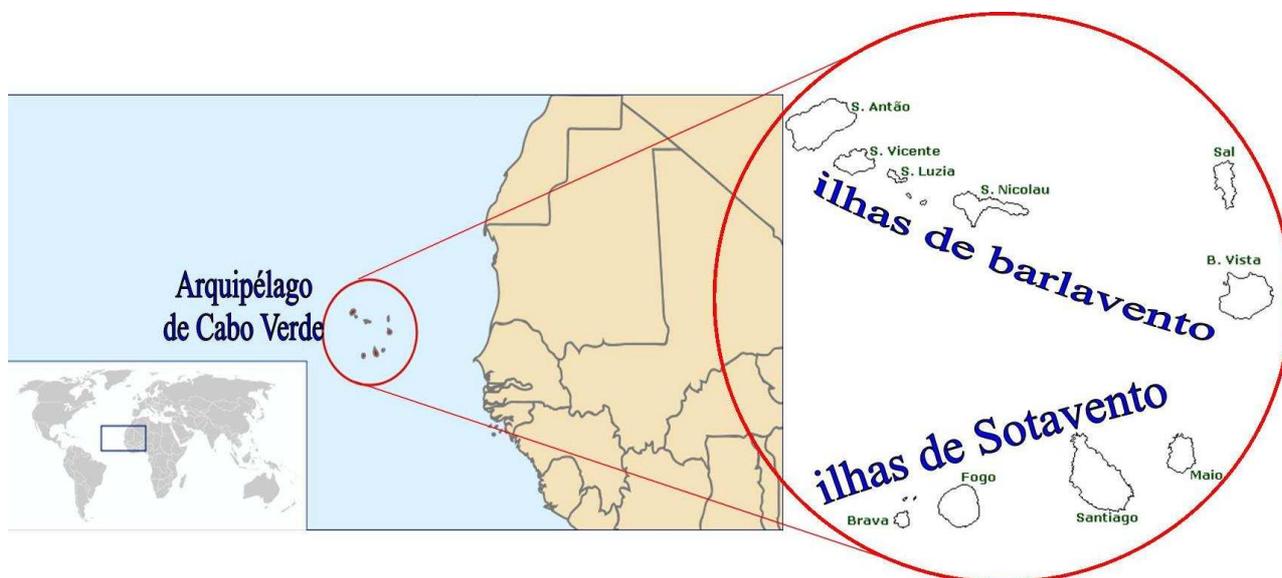


Figura 1 - Localização Geográfica do Arquipélago de Cabo Verde.

Possui uma linha da costa de 2.000 km, uma superfície de 4033 km², uma Zona Económica Exclusiva (ZEE) de 734.265 km² e uma plataforma continental de 5.394 km². É definido como região de clima tropical seco, com costas e fundos de declive muito inclinados podendo atingir 4.000 m entre as ilhas (Instituto Hidrográfico, 1968; Bravo de Laguna, 1985; Almada, 1993; DGMP, 1998).

As ilhas de São Vicente, Santa Luzia, ilhéu Branco, Ilhéu Raso e São Nicolau se encontram na mesma plataforma que representa aproximadamente 30 % da placa continental do arquipélago, condicionando a diversidade de recursos haliêuticos naquela zona. As ilhas do Sal, Boavista e Maio detêm uma plataforma mais extensa com profundidades inferiores a 200 metros (Almada, 1993).

O arquipélago está situado na parte sul da corrente das Canárias (corrente fria na periferia oriental do anticiclone dos Açores) que se estende ao longo da Costa Norte Ocidental Africana. Esta corrente é de fraca velocidade (15cm/s) e junta-se à corrente alísea do norte nas latitudes de Cabo Verde, o que faz aumentar a sua velocidade para 20cm/s (Medina *et al.*, 2007).

As ilhas do Sotavento, e as ilhas do Sal e Boavista, para além de sofrerem a influência da Corrente das Canárias, são também influenciadas pela Contracorrente equatorial (Figura 2).

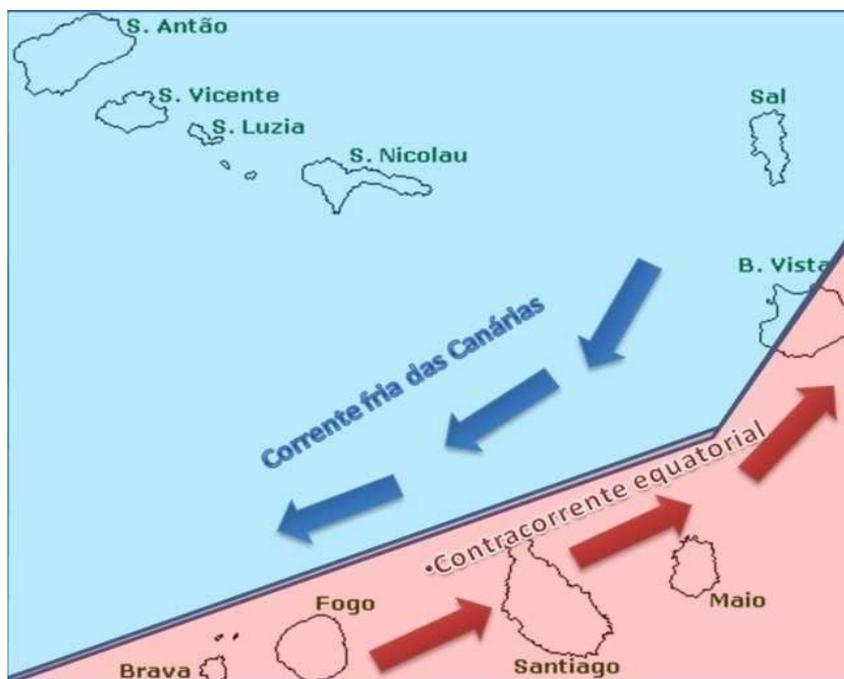


Figura 2 - Ilustração das correntes que atravessam o Arquipélago de Cabo Verde. Corrente fria das Canárias gira para Oeste e Nordeste enquanto a Contracorrente equatorial vinda do Sul dirige para Noroeste (Adaptado de Almada, 1993).

De Dezembro a Junho, quando a força do anticiclone dos Açores aumenta, há um aumento da força dos ventos alísios do norte e conseqüente aumento da força das águas da corrente do Norte e da corrente das Canárias. Como resultado, essas águas banham por completo as ilhas de Cabo Verde. De Julho a Novembro, ocorre o contrário: o anticiclone dos Açores diminui a sua força, há uma diminuição dos ventos alísios do Norte e, por conseguinte, diminui a força da corrente do norte e das Canárias. Nesta, essas águas do norte só atingem as ilhas de Santo Antão, São Vicente, Santa Luzia, São Nicolau e a parte norte da ilha do Sal. As restantes ilhas são banhadas então pela Contracorrente equatorial, que se desloca de ocidente para oriente. Das interações entre essas duas massas de água (Corrente das Canárias e Contracorrente equatorial) formam-se frentes hidrológicas, ideais para a concentração de biodiversidade marinha (Almada, 1993).

A variação da temperatura superficial da água do mar (18°C a 27°C) permite dividir a zona em duas épocas: uma época fria de Dezembro a Junho, com água cujo a

temperatura média oscila entre 22-23°C e uma época quente, cujo a temperatura média oscila entre 26-27°C. Além disso, as ilhas são temporariamente, atravessadas por uma frente quente entre os meses de Junho a Julho e de Outubro a Novembro. Os ventos alísios predominantes durante os meses de Janeiro a Junho são do sector Nordeste, cujas velocidades máximas são de 5 a 8 nós (Almada & Lopes, 1998).

Sendo um país subtropical, Cabo Verde possui uma grande diversidade biológica apesar da biomassa ser reduzida (Rolan, 2005). Mesmo estando afastado das zonas de *upwelling* activo da região (costa do Sul do Sahara, Mauritânia), possui um efeito ciclónico à volta das ilhas que provoca um afloramento das águas profundas, ricas em nutrientes, sendo um enriquecimento local que se compara a um *upwelling*. Segundo dados de campanhas oceanográficas realizadas na Zona Económica Exclusiva de Cabo Verde (ZEE), a produtividade primária das águas varia de 150-500 mg de C/m²/dia o que o insere na categoria de águas de alta produtividade (Almada, 1993). Apesar disso, poucos estudos filogenéticos têm sido feitos nas ilhas, e a maior parte baseados em espécies terrestres (répteis e anfíbios) como é o caso dos trabalhos de Greer (1976), Joger (1993), Carranza *et al.* (2001), Brehm *et al.* (2001) e Jesus *et al.*, (2002).

No que respeita a espécies marinhas, o género *Conus* constitui o único grupo que tem vindo a ser alvo de estudos filogenéticos. A diversidade deste grupo no arquipélago documentada por Duda e Rolán (2005) e Cunha *et al.* (2005; 2008), tornou-se num dos exemplos mais emblemáticos de como o desenvolvimento larvar associado a repetidas variações do nível do mar influenciam profundamente a estrutura genética e a diversidade da fauna marinha do ambiente insular. A filogenia desse género baseada na análise do ADNmt revelou a existência de 49 espécies endémicas no arquipélago, divididas em 2 grupos principais relacionados com o tamanho da concha: de “concha grande”, variando de 37 a 75 mm, e de “concha pequena entre 10 a 29 mm (Cunha *et al.*, 2005). A distribuição geográfica das espécies de “concha pequena” restringe-se a uma única ilha ou mesmo uma única baía (Duda & Rolan, 2005). As espécies de “concha grande” podem ocorrer em mais de uma ilha e em várias baías.

A fauna malacológica do arquipélago de Cabo Verde é muito rica, estando documentadas cerca de cinquenta espécies pertencentes à classe Bivalvia, sendo que algumas estão limitadas a pequenas áreas (Guerreiro & Reiner, 2000). Uma das poucas espécies presente em todas as ilhas é o bivalve *Brachidontes puniceus* (Gmelin, 1791).

O Género *Brachidontes* (Swainson, 1840) pertence à classe Bivalvia, família Mytilidae. A sua origem remota ao Período Jurássico (Aguirre *et al.*, 2006). Esse género possui larvas planctotróficas que podem permanecer no plâncton até 40 dias (Fields & Moore, 1983; Campos & Ramorino, 1980), o que facilita a dispersão, resultando em pequenas variações genéticas de populações para populações (Van den Broeck *et al.*, 2008). Estes constituem a fauna inter-mareal com uma tolerância enorme a variações de temperatura e de salinidade (Terranova *et al.*, 2007). Esta fauna está associada a substratos duros, apoiando-se por meio de uma estrutura de fixação denominada bisso (Barnes *et al.*, 2005).

A espécie *B. puniceus* (Figura 3) habita fissuras rochosas e lagoas de marés, em costas rochosas nomeadamente na linha do médio litoral (Guerreiro & Reiner, 2000).



Figura 3 - Exemplos de *B. puniceus* (in www.idscaro.net).

Trata-se de uma espécie parecida com o mexilhão comestível mas de tamanho reduzido. Apresenta uma distribuição restrita à Costa Ocidental Africana e a Ilha de Natal no Oceano Índico (Figura 4). Abrange todas as ilhas do arquipélago de Cabo Verde e alguns países da África continental como Mauritânia, Gabão, Gana, Senegal e Angola (MASDEA, 2009; Guerreiro & Reiner, 2000; Poppe & Poppe, 2009; Honkoop *et al.*, 2008; Trausel & Sliker, 2009; Gofas *et al.*, 1985). O registo referente à ilha do Natal é dúbio e necessita de confirmação.

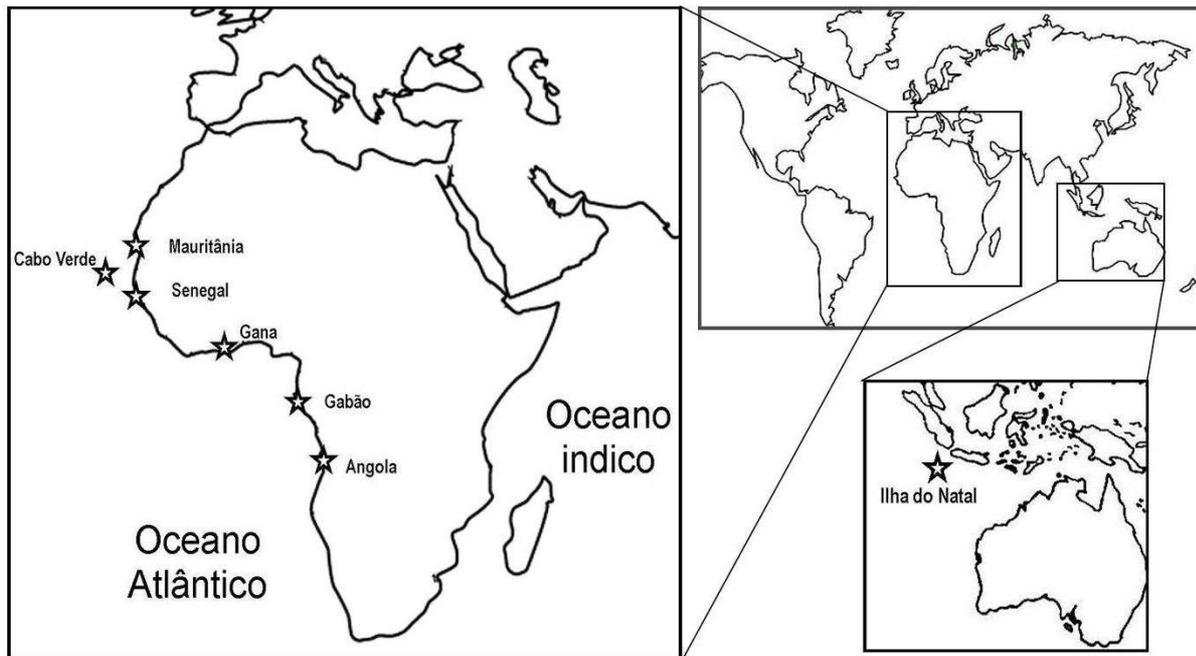


Figura 4 - Mapa de distribuição do *B. puniceus* (Segundo Guerreiro & Reiner, 2000; Poppe & Poppe, 2009; Honkoop et al., 2008; Trausel & Slieker, 2009; Gofas et al., 1985).

A concha do *B. puniceus* é pequena, sólida, com forma sub-triangular estreita no sentido anterior. É largamente arredondada no sentido posterior e os umbos são subterminais arredondados. A mesma é fortemente esculpida com estrias radiais ligeiramente granuladas e marcas concêntricas fortemente demarcadas (Figura 5).



Figura 5 - Marcas concêntricas e radiais no lado externo da concha da espécie *B. puniceus* (foto: E. Lopes, 2009).

A coloração externa da concha varia entre as cores preta, roxa, castanho-escuro ou castanho claro (Figura 6).

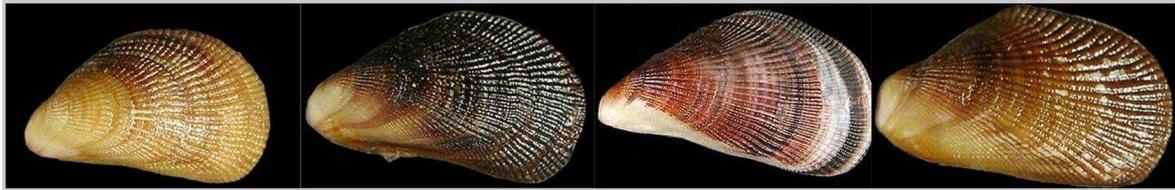


Figura 6 - Variação da coloração externa das conchas de *B. puniceus* (fotos: E. Lopes, 2006; www.idscaro.net,2009).

O interior é madreperla na retaguarda e esbranquiçado acima em direcção ao umbo. A dimensão média é de 10 mm e pode atingir os 20 mm de comprimento (Guerreiro & Reiner, 2000).

Os organismos do género *Brachidontes* colonizam, de forma considerável, ranhuras e poças do intertidal (Figura 7) e, em certas zonas, pode ser o organismo dominante com muitos milhares de indivíduos por metro quadrado (Guerreiro & Reiner, 2000). Frequentemente, as suas densas camadas formadas apoiam a riqueza da epifauna e comunidades de invertebrados de infauna dos tipos: Porífera (esponjas), Cnidária (incluindo hidrozoários, corais e anêmonas), Anelídea, Crustacea, Mollusca (Bivalves e Gastropodes), Briozoária, Equinodermata e algas. São organismos filtradores que se alimentam de partículas em suspensão na água, como microalgas e partículas orgânicas. São predados por estrelas-do-mar, ouriços, gastrópodes e caranguejos.



Figura 7 – Aglomerações de *B. puniceus* numa costa rochosa da ilha do Sal (foto: Evandro Lopes, 2009).

No interior da concha do bivalve (Figura 8) são várias as marcas e formações com interesse para a taxonomia da espécie. A impressão da linha paleal não contém seio e as marcas dos músculos adutores anteriores e posteriores são anisomiárias (a marca do músculo adutor anterior é menor que a posterior) (Barnes *et al.*, 2005).

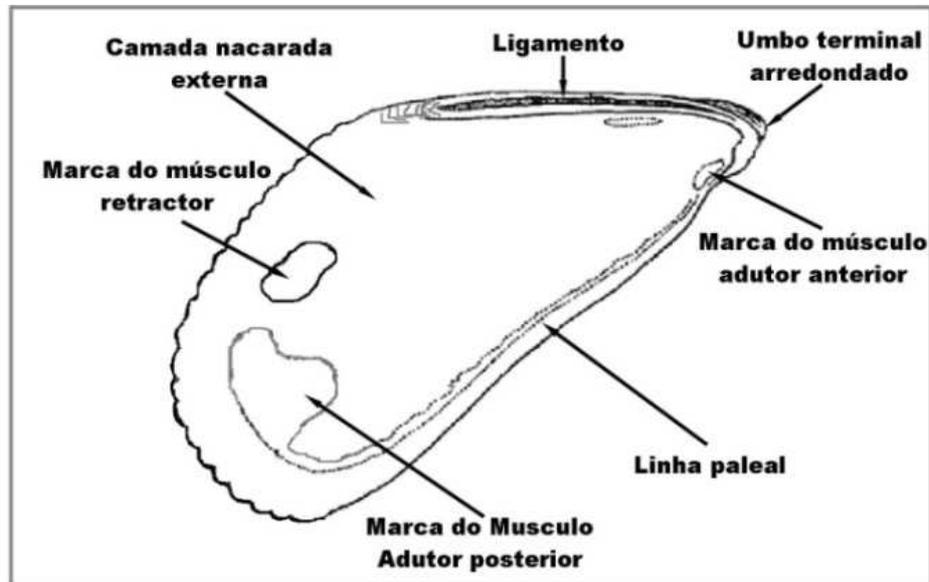


Figura 8 - Esquema ilustrativo do interior de um exemplar do *B. puniceus* (Adaptado de Fischer *et al.*, 1981).

O ligamento, estrutura quitinosa e elástica situada no bordo dorsal das valvas e que as mantém unidas, está localizado internamente e a charneira é do tipo *Cryptodonta* (sem dentes) (Barnes *et al.*, 2005).

No que se refere à reprodução, *B. puniceus* apresenta sexos separados e liberta os seus gâmetas para a água onde ocorre a fertilização. Dá origem a uma larva velíger que permanece na coluna de água por aproximadamente 40 dias (Fields & Moore, 1983; Campos & Ramorino, 1980). Depois de terminado esse período, ocorre o assentamento das larvas em locais com substrato duro, de preferência em rochas

Sendo da mesma família dos Mytilidea, forma o mesmo tipo de aglomerados de grande densidade, aderindo ao substrato rochoso e a outros substratos duros, por meio dos filamentos do bisso que, por sua vez, são segregados por uma glândula especial na base do pé. Esses filamentos do bisso aderem ao substrato duro fazendo com que o mexilhão tenha maiores capacidades de sobrevivência no ambiente intertidal (Lucas *et al.*, 2002)

Algumas espécies, dentro do género *Brachidontes*, têm vindo a ser alvos de estudos moleculares, nomeadamente na análise da estrutura das populações, em diferentes países, como é o caso dos trabalhos de Aguirre *et al.* (2006), Lee & Ó Foighil (2004, 2005) no Atlântico Oeste, e Terranova *et al.*, (2007) no Índico - Pacífico. Os trabalhos de Lee & Ó Foighil (2005) mostraram que a espécie *B. puniceus*, está separada da espécie *B. exustus* por um total de 43 mutações mas entre os indivíduos da espécie *B. puniceus* as diferenças não ultrapassam as 3 mutações (Figura 9). Ao estimar uma árvore filogenética por inferência Bayesiana com os tempos de divergência, verificou que a espécie *B. puniceus* está mais perto do Clado de *B. exustus* das Bahamas.

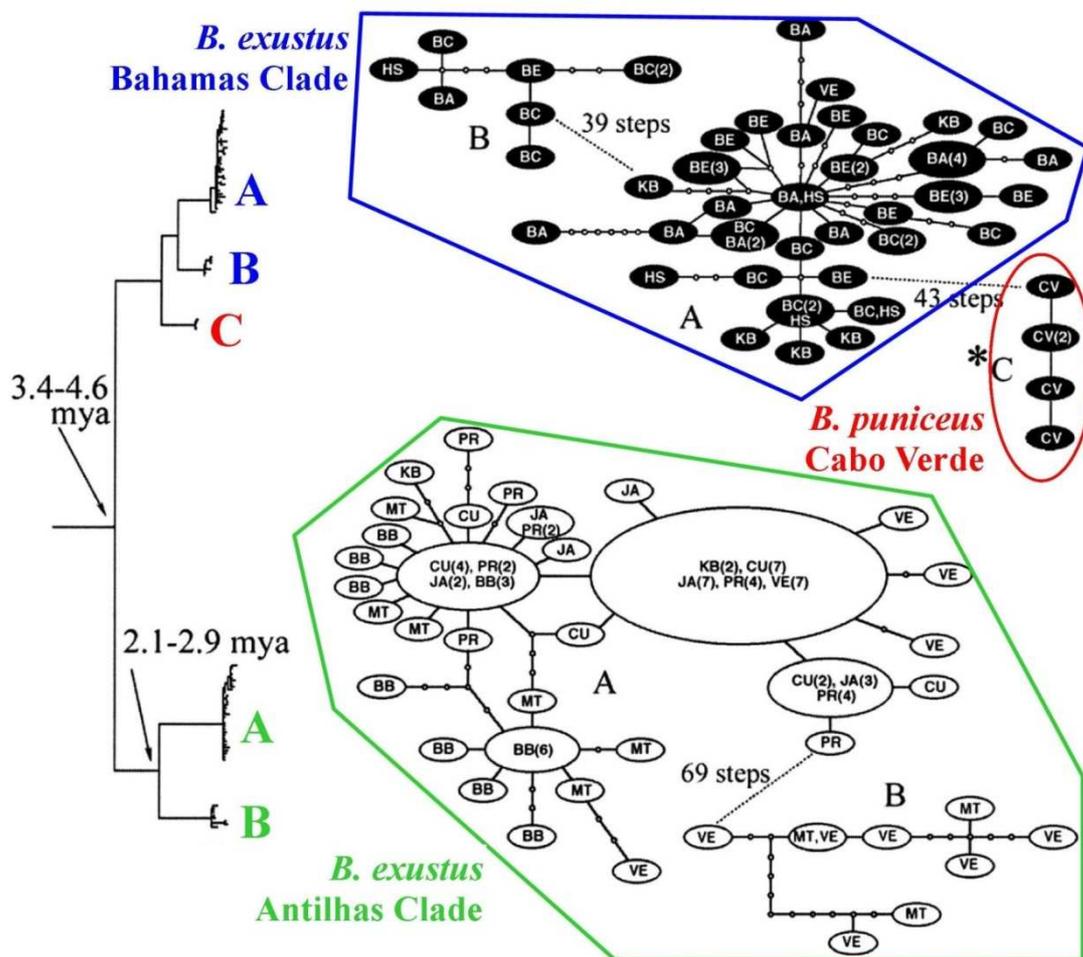


Figura 9 - Redes de haplótipos e árvore filogenética obtida por Lee & Ó Foighil (2005) ilustrando os tempos de divergência entre a espécie *B. puniceus* e *B. exustus*.

Alguns estudos baseados na análise das variações fenotípicas entre populações de espécies marinhas existentes em Cabo Verde têm demonstrado a existência de possíveis barreiras físicas entre as ilhas. Analisando dados de capturas de 18 espécies de

peixes demersais, Medina *et al.* (2007) demonstraram uma separação aparente entre as ilhas de Cabo Verde. Um total de quatro grupos de ilhas foi evidenciado: Grupo 1 (ilhas de Santo Antão, São Vicente, Santa Luzia e São Nicolau); grupo 2 (Ilha do Sal, Boavista e Maio); Grupo 3 (ilha do Fogo e da Brava) e o Grupo 4 composto unicamente pela ilha de Santiago. Foi demonstrado também que a distribuição e a densidade dessas espécies nas ilhas variam numa proporção directa com o tamanho da plataforma continental dessas ilhas. As barreiras físicas existentes entre as ilhas poderá estar a causar variações fenotípicas em certas espécies, como é o caso da espécie de peixe de recife *Cephalopis taeniops* (Medina *et al.*, 2008). No entanto, as interacções entre as correntes que atravessam o arquipélago (Corrente das Canárias e Contra Corrente do Norte) e a fisionomia do fundo marinho, provocam uma certa conectividade entre as ilhas. Essa conectividade é dinâmica e tem um carácter sazonal o que representa um veículo de dispersão larvar (Medina *et al.*, 2007).

Em moluscos marinhos, o tipo de desenvolvimento larvar tem grande influência na dispersão da espécie. Existem dois tipos principais de acordo com a existência (planctónico) ou não (lecitotrófico) de uma fase pelágica. Dentro do tipo planctónico existe ainda a sub-divisão em planctotrófico, na qual estão incluídos os organismos que se alimentam de plâncton na coluna de água por um tempo determinado. As espécies com desenvolvimento lecitotrófico necessitam das reservas do ovo durante a sua fase larvar não se observando nenhuma fase pelágica, ou se existente, é de curta duração. Relativamente à capacidade de dispersão, espécies de desenvolvimento planctotrófico exibem a maior capacidade de dispersão, pelo facto de poderem permanecer mais tempo na coluna de água sendo transportadas passivamente pelas correntes oceânicas (Jablonski, 1986). Em contraste, espécies lecitotróficas apresentam uma capacidade de dispersão mais reduzida, tendo no entanto taxas de especiação mais elevada resultante da existência de menor fluxo genético entre populações distantes (Scheltema, 1971).

Neste estudo, foram analisados padrões de diversificação da espécie *Brachidontes puniceus* no arquipélago de Cabo Verde usando sequências parciais do gene citocromo oxidase - subunidade I. Tendo a espécie *B. puniceus* uma distribuição abrangente a todas as ilhas do arquipélago de Cabo Verde, a análise filogenética usando dados moleculares pode contribuir para o conhecimento da variabilidade genética da espécie e do processo de colonização das várias ilhas.

Os resultados obtidos servirão para analisar várias questões: (1) influência do desenvolvimento larvar planctotrófico na dispersão da *B. puniceus* no arquipélago de Cabo Verde; (2) influência das correntes oceânicas na estrutura genéticas das populações norte e sul do arquipélago, e (3) análise da relação entre morfótipos e haplótipos. Propõem-se as hipóteses seguintes com respectivos cenários alternativos:

-Hipótese 1: existindo uma acção evidente do desenvolvimento larvar planctotrófico na dispersão da espécie, é esperada uma variabilidade genética reduzida entre ilhas em resultado da grande capacidade de dispersão de organismos planctotróficos o que provoca um aumento de fluxo genético. Alternativamente, encontrar-se-á estrutura genética nas populações examinadas, sendo esperada menor variabilidade genética dentro de cada ilha, e superior entre ilhas.

-Hipótese 2: separação das populações de *B. puniceus* localizadas nas ilhas a Barlavento (Santo Antão, S. Vicente, Sal, Santa Luzia, e São Nicolau) e a sotavento (Boavista, Maio, Santiago, Fogo e Brava) do arquipélago por acção das correntes das Canárias e Contracorrente Equatorial. Se este efeito se fizer sentir na dispersão de *B. puniceus*, é de esperar a existência de estrutura genética correspondente a estes 2 grupos. Alternativamente, não será encontrada qualquer estrutura genética entre os grupos mencionados.

-Hipótese 3: existência de uma relação entre morfotipos e haplótipos. Se o gene amplificado, ou outra região codificante ligado a este gene tiver alguma influência sobre o morfotipo, é de esperar que as distâncias genéticas intra-morfotipo (claro/escuro) sejam menores do que as distâncias genéticas entre morfotipos (claro e escuro).

I-MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Amostragem

No presente estudo, foram seleccionadas as zonas das ilhas previamente referenciadas com presença abundante da espécie (Figura 10). Para maximizar o sucesso das amostragens definiram-se os locais tendo como critérios de base: o *habitat* da espécie (intertidais rochosos), as condições geomorfológicas das ilhas (zonas costeiras hidrodinâmicas), o regime das correntes e acessibilidade. As ilhas do Fogo e da Brava não foram amostrados devido a escassez de transporte e de tempo. Nas restantes ilhas as amostragens foram realizadas nas seguintes zonas: Ilhas de Santo Antão (Ponta do Sol), São Vicente (Praia de Calhau), Santa Luzia (Ponta Branca), São Nicolau (Tarrafal), Sal (Baía de Murdeira), Boavista (Ervatão), Maio (Ponta Preta) e Santiago (Cidade Velha). Todos os pontos de amostragem foram geograficamente referenciadas (Tabela 1).

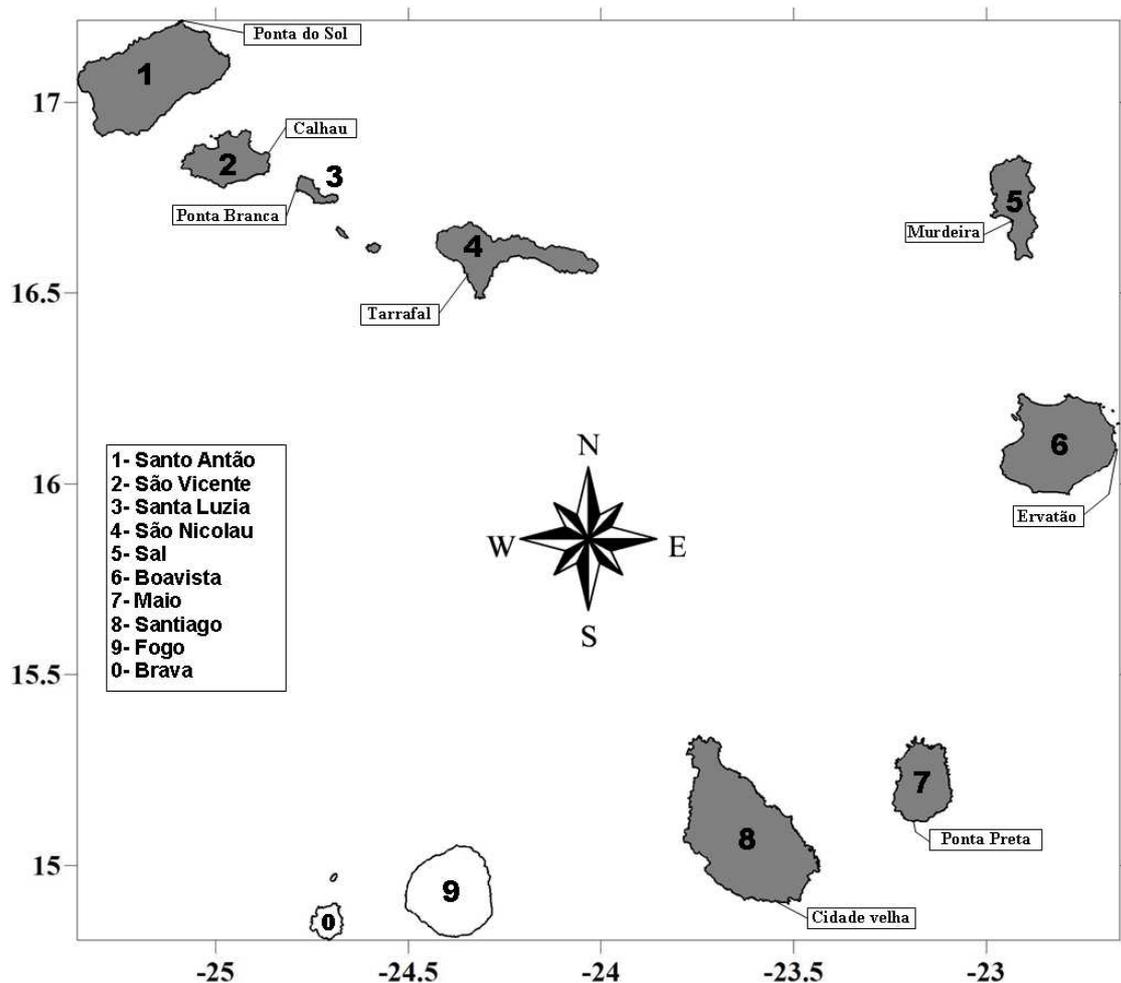


Figura 10 - Área de estudo: Ilhas amostradas (a cinza) com os respectivos pontos de amostragem assinaladas na orla costeira bem como as coordenadas (N/W).

Tabela 1- Localização UTM/GPS dos pontos de amostragem.

Ilha	Local	Nº de espécimes	Dados UTM			GPS	
			Zona	X	Y	Latitude	Longitude
São Vicente	Calhau	30+	26Q	727679	1864683	16 51'16"	-24 51'47"
São Nicolau	Tarrafal	20	26Q	781819	1832981	16 33'44"	-24 21'33"
Sal	Murdeira	30+	27Q	293499	1844776	16 40'36"	-22 56'11"
Boavista	Ponta de Ervatão	30+	27Q	318731	1774115	16 02'24"	-22 41'40"
Santiago	Cidade Velha	30+	27P	219588	1650546	14 54'53"	-23 36'23"
Santo Antão	Ponta do Sol	30+	26Q	702705	1903019	17 12'11"	-25 05'38"
Santa Luzia	Ponta Branca	8	26Q	735490	1856858	16 46'59"	-24 47'26"
Maio	Ponta Preta	30+	27P	262940	1673453	15 07'34"	-23 12'21"

A metodologia de trabalho baseou-se numa amostragem quantitativa. Pretendeu-se amostrar um mínimo de 30 indivíduos por local. As recolhas foram realizadas na zona intertidal e em costas rochosas. Procedeu-se a recolha manual por observação directa por serem organismos relativamente abundantes. Para obter maior área de exposição e acção na intertidal (relativamente as poças de maré) as recolhas foram realizadas, na maioria, nos períodos de baixa-mar (Figuras 11 e 12).



Figura 11 - Costa rochosa da Baía das Gatas onde foi realizada uma das amostragens (foto: Evandro Lopes, 2009).



Figura 12 - Amostras de *B. puniceus* em enclaves na Praia de Ervatão, ilha de Boavista (foto: Evandro Lopes, 2009).

O equipamento de recolha foi muito simples, constituído por um canivete, para retirar as amostras da rocha; um martelo, para quebrar pedaços de rocha em locais onde as amostras eram de difícil acesso; um GPS, para determinar a localização precisa da amostragem; um bloco de notas, para anotar os dados da amostragem; frascos, para

conservação das amostras; etanol 96%, para fixação as amostras; lápis/esferográfica, para as anotações; e máquina fotográfica (Figura 13).



Figura 13 - Equipamento usado na amostragem (foto: Evandro Lopes, 2009).

Os indivíduos colectados foram colocados em pequenos tubos de plástico devidamente etiquetados e mantidos em álcool 96%. Após uma semana, as amostras foram embrulhadas em papel absorvente, humedecidos com álcool 96% e colocados em pequenos sacos de plástico. Posteriormente, em laboratório, as amostras foram todas separadas sendo o tecido mantido em álcool 96% e as conchas colocadas em pequenos sacos de plástico, previamente etiquetados com um número de série a condizer com o mesmo número de série do respectivo organismo.

1.2. Extracção de ADN

Os métodos de extracção de ADN combinam processos físicos, químicos e mecânicos baseando-se na lise celular, limpeza (para a eliminação de proteínas, lípidos e ARN) e precipitação. Na lise celular usa-se tampões de extracção que contêm detergentes como SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) ou Triton X; uma molécula quelante (por ex. EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético) que retira os catiões da solução desestabilizando assim a membrana celular; Tris-HCl para manter o pH estável e proteinase K para degradar as proteínas e enzimas celulares. O tampão de extracção é

incubado conjuntamente com a amostra alvo de extracção a temperaturas entre 50°C a 70°C, com agitação permanente (Eguiarte *et al.*, 2007).

A limpeza é efectuada com sais (como acetato de potássio ou cloreto de sódio) que formam uma capa iónica sobre o ADN protegendo da degradação e, com RNase que elimina o ARN da amostra. A centrifugação permite separar as impurezas (o depósito) do ADN (o sobrenadante). Posteriormente o ADN é precipitado (por ex. com o uso de isopropanol frio) e é centrifugado a mais de 10.000 rpm. Uma vez precipitado, o ADN é lavado com um álcool (por ex. etanol a 70%) para eliminar todos os sais que permanecem na solução. Por último, elimina-se o etanol com uma centrifugação a mais de 10.000 rpm e deixam-se as amostras secarem a temperatura ambiente, para remover os restos de etanol (Falcón & Valera, 2007).

No presente estudo utilizou-se entre 20 a 50mg do músculo adutor posterior para extracção do ADN (Figura 14), seco por 12 horas à temperatura ambiente ou 3 horas a 55°C.



Figura 14 - Localização do músculo adutor posterior usado na extracção de ADN.

Em seguida, juntaram-se 600µl de tampão de extracção (10mM Tris, pH8; 1mM EDTA, pH8; 0,1% SDS), 20 µl de Proteinase K (20 mg/ml), para incubação durante 4 horas e a 55°C a 600rpm no agitador Thermomixer Eppendorf. Após arrefecimento à temperatura ambiente, adicionaram-se 3 µl RNase (4mg/ml) e procedeu-se a incubação à 37°C durante 30 min a 600 rpm.

A extracção de ADN foi efectuada pelo método salino (Sambrook *et al.* 2001) que consiste na adição de 200 µl de acetato de potássio e agitação permanente durante 20s para homogeneizar a amostra. As amostras são depois centrifugadas durante 5 minutos à velocidade máxima (13000 rpm) e o sobrenadante recolhido para um novo tubo. Seguidamente procede-se a precipitação do ADN da extracção por adição de 600µl de isopropanol frio e inversão do tubo várias vezes, seguida de uma incubação a -20°C durante 2h, nova centrifugação à temperatura ambiente (10 min à velocidade máxima) e eliminação do sobrenadante ficando, assim, o depósito (que contém ADN) no fundo do tubo. O ADN é lavado com 600 µl de etanol a 70% e centrifugado 10 min à velocidade máxima. Procede-se a remoção do etanol sobrenadante e o depósito é deixado a secar durante a noite para remoção dos restos de álcool. O obtido ADN é aluído em 100µl de água ultra pura.

1.3. Amplificação do ADN pela técnica da PCR

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - reacção em cadeia pela polimerase) foi inventada em 1993 por Kary Mullis rendendo-lhe o prémio Nobel da Química pelo desenvolvimento de um método que permite sintetizar, em poucas horas e *in vitro*, uma grande quantidade de um determinado fragmento de ADN. Esta técnica faz parte integrante da moderna biotecnologia molecular, tendo trazido um enorme progresso a áreas como o diagnóstico de doenças, medicina forense entre muitas outras, para além da investigação em Biologia (Biochemicals, 1999; Eguiarte *et al.*, 2007)

Durante a PCR são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de ADN em duas cadeias simples (Figura 15), permitindo então a ligação de oligonucleótidos iniciadores (*primers*), também em cadeia simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleótidos, obtidos por síntese química (Biochemicals, 1999).

Para amplificar uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de ADN a amplificar, nos seus terminais 3', de modo a permitir a actuação da ADN polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do ADN a amplificar (Biochemicals, 1999).

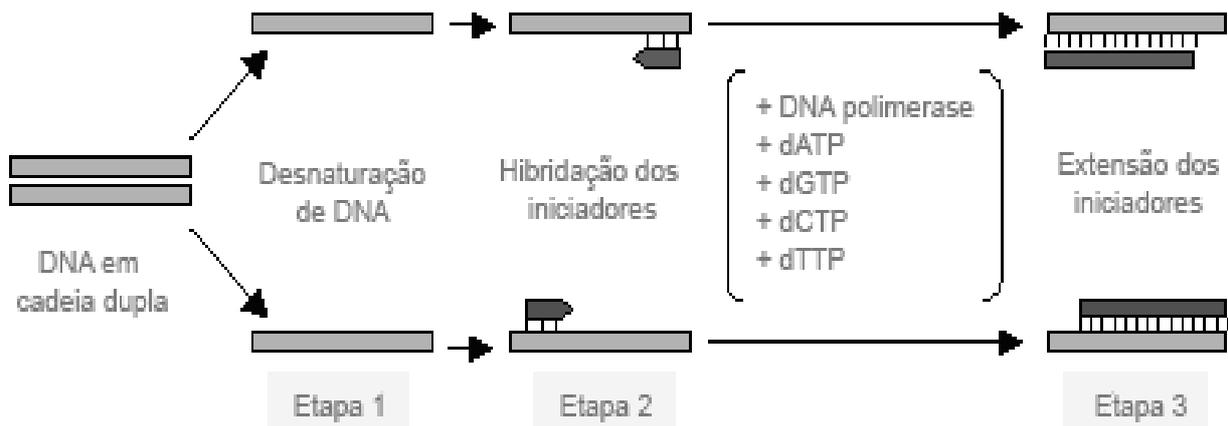


Figura 15 - Esquema ilustrativo da reacção de PCR no primeiro ciclo (Adaptado de ncbi.nlm.nih.gov, 2009).

Para realizar a PCR são necessárias pequenas quantidades do ADN-alvo, um tampão salino contendo a polimerase, oligonucleótidos iniciadores, os quatro desoxinucleótidos constituintes do ADN e o cofactor Mg^{2+} . Esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação (Figura 16) que consistem em:

- Desnaturação do ADN alvo pelo calor (tipicamente 1 minuto a 94-96°C), de modo a separar as duas cadeias;
- Associação dos iniciadores por ligações de hidrogénio ao ADN alvo em cadeia simples. Para permitir essa associação, a mistura de reacção é arrefecida (tipicamente a temperaturas entre 50 e 65°C, durante 1 minuto; a temperatura a usar depende da % GC da sequência a amplificar);
- Extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela ADN polimerase (tipicamente 1 minuto a 72°C);

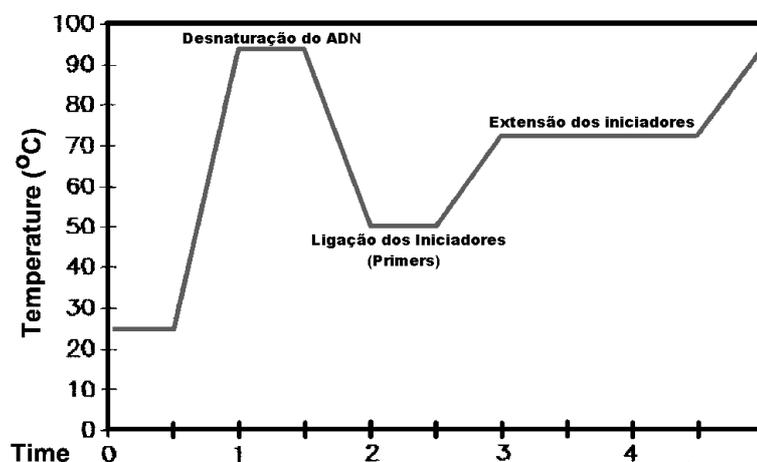


Figura 16 - Representação esquemática de um Ciclo de temperaturas efectuado na reacção de PCR (Adaptado de www.mun.ca/biology/scarr/PCR_simplified.html)

O processo envolvendo estes três passos, pode ser repetido várias vezes (25 a 30 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de ADN pré-existente (Figura 17). Em teoria, se for possível levar a cabo 25 ciclos de amplificação seguidos, a concentração de ADN aumentaria 225 milhões de vezes embora, na prática, devido a alguma ineficiência no processo de amplificação, esse aumento fique por um milhão de vezes (Eguiarte *et al.*, 2007).

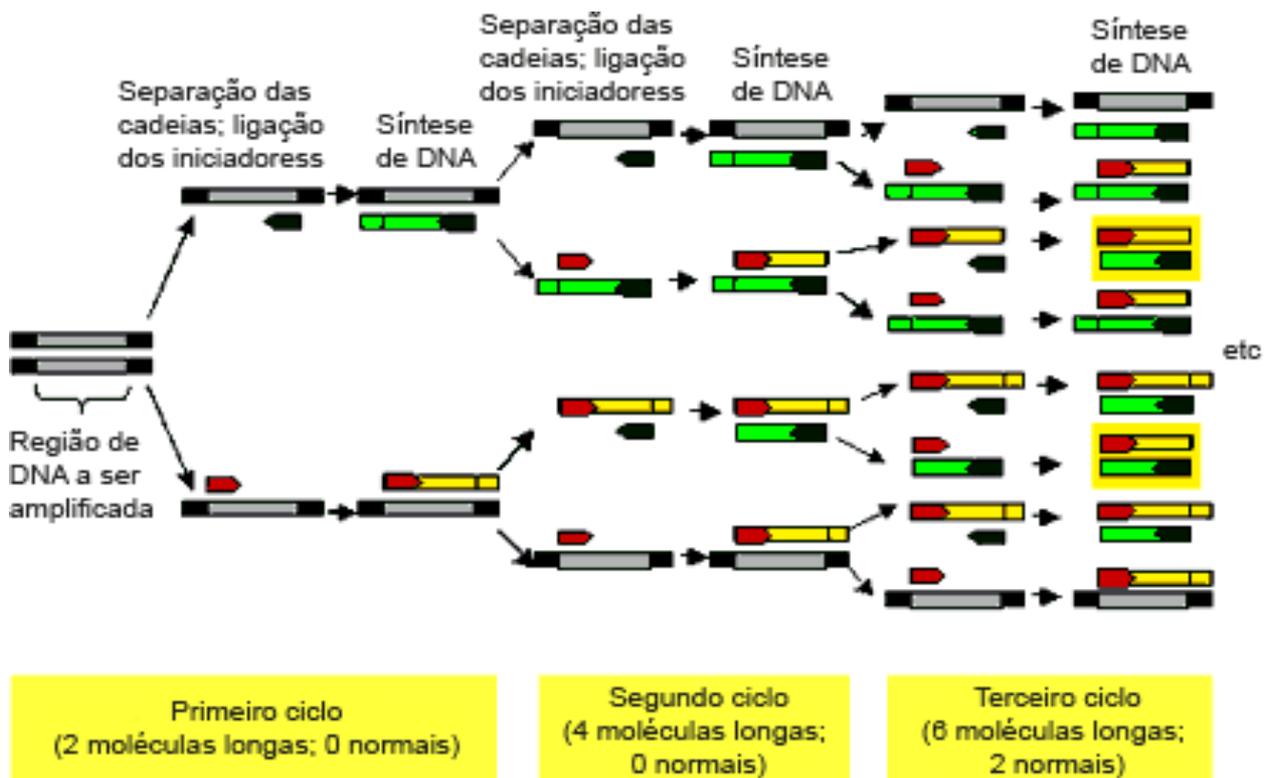


Figura 17 - Esquema ilustrativo dos resultados da reacção de PCR durante os três primeiros ciclos. Os iniciadores são representados pelas cores Vermelho (*forward*) e preto (reverso). As moléculas verdes e amarelos são as cópias da região amplificável do ADN (Adaptado de *ncbi.nlm.nih.gov*, 2009).

Como na técnica de PCR se encontram envolvidos vários ciclos de amplificação, foi desenvolvido equipamento que permite programar, de forma contínua e automatizada, os vários ciclos de aquecimento e arrefecimento. Para tal ser concretizável, as ADN polimerases utilizadas deverão ser termoestáveis, tendo tal sido conseguido com o isolamento da ADN polimerase da estirpe termofílica *Thermus aquaticus* (Taq ADN polimerase) que actua a temperaturas elevadas levando assim a um aumento da especificidade da reacção. De referir ainda que o produto de PCR pode ser visualizado após eletroforese em gel de agarose e o seu tamanho ser estimado por comparação com padrões lineares de ADN (Roche applied Science).

Para o *B. puniceus* o gene alvo de estudo foi o Citocromo *c* oxidase I (*coxI*), amplificados com iniciadores modificados do Folmer *et al.* (1994) (*coxI-F*: CCTTTATTTAACGTTTGGAA; *coxI-R*: GTCGTATTAAAATTCGATC). O fragmento do *coxI* foi amplificado com Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, Buffer A). Foi incluído um controle negativo na amplificação para despistagem de contaminações. A reacção de PCR foi realizada a um volume total de 25µl de acordo com a Tabela 3.

Tabela 2 - Volumes e concentrações dos reagentes usados na reacção de PCR do COXI.

Reagentes	Concentração do Stock	Para 1 reacção: 25 µl	
		Concentração dos reagentes na Reacção	Volume dos reagentes na Reacção
H2O	-	-	17,8 µl
PCR Buffer	10 X	1 X	2,5 µl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2 µl
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5 µl
<i>Primer Reverso</i>	10 mM	0,2 mM	0,5 µl
<i>Primer Forward</i>	10 mM	0,2 mM	0,5 µl
Taq Polimerase	5 U/ml	1 U/ml	0,2 µl
ADN	-	-	1 µl
TOTAL			25 µl

Os ciclos de amplificação foram iniciados com uma desnaturação de 94 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos, ligação dos iniciadores a 42 °C por 30 segundos e extensão com a *Taq* ADN polimerase a 72 °C por 1 minuto. A extensão final foi de 2 minutos a 72 °C.

1.4. Eletroforese em gel

A eletroforese em gel por acção de um campo eléctrico é frequentemente utilizada para separar e estimar o tamanho de fragmentos de ácidos nucleicos. Através da comparação da distância percorrida pelos fragmentos com a percorrida por fragmentos de peso molecular conhecido (padrões de peso molecular) é possível estimar o peso molecular de cada fragmento da amostra a analisar (Asuar, 2007).

A eletroforese de ADN é normalmente realizada em gel de agarose. Quando

sujeitos a um campo eléctrico, os ácidos nucleicos migram em direcção ao pólo positivo, uma vez que apresentam carga negativa a pH neutro. A agarose funciona como uma rede cujos poros deixam passar mais facilmente as moléculas mais pequenas que migram mais do que as de maiores dimensões. A migração de um fragmento de ADN na forma circular, como é o caso de um plasmídeo não digerido, é diferente da migração do mesmo plasmídeo sob a forma linear (após digestão com uma enzima de restrição). Por outro lado, moléculas com uma conformação mais compacta migram mais rapidamente do que moléculas com uma conformação molecular mais fragmentada (Asuar, 2007).

Depois de preparado o gel de agarose, este é imerso numa tina de eletroforese com uma solução tampão que estabelece a condução eléctrica com a fonte de alimentação. Uma vez aplicadas as amostras de ADN e o padrão de pesos moleculares (*Ladder*) nos poços, inicia-se a eletroforese. A aplicação do campo eléctrico é efectuada através de 2 eléctrodos situados paralelamente à fileira de poços. Terminada a separação electroforética, o gel deve ser imerso numa solução de Brometo de etídeo que permitirá a visualização das bandas de ADN por exposição a luz ultravioleta (Figura 18).

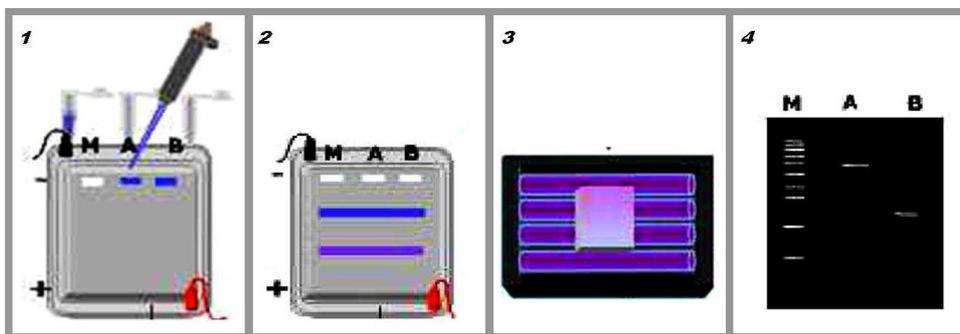


Figura 18 - Ilustração esquemática da eletroforese em gel de agarose: 1- Aplicação das amostras em Gel de Agarose; 2- Aspecto do gel final da eletroforese; 3- Visualização das bandas no trans-iluminador (à luz UV); 4 - Fotografia do Gel (M- Marcador de pesos moleculares; A e B – Amostras de ADN)

Os produtos de PCR amplificados nesse estudo foram separados em gel de agarose a 1% e Brometo de Etídeo (10ng/μl) a 90V por 25 minutos, seguida da visualização num trans-iluminador de luz ultra-violeta. A solução tampão utilizada para a eletroforese foi o TAE a concentração 1X. Os géis foram foto-documentados e o tamanho do fragmento de DNA foi estimado pela comparação com o padrão *Ladder* 100pb.

1.5. Purificação dos produtos de PCR para Sequenciação

Os produtos da PCR podem ser sequenciados directamente utilizando os métodos cíclicos de sequenciação, mas, precisa-se libertar dos iniciadores de PCR e da *Taq polimerase* antes para não inibir a sequenciação. Outros componentes, como enzimas ou componentes do tampão podem também causar problemas na sequenciação. Assim, o produto de PCR deve ser purificado antes de ser sequenciado. Existem vários métodos de purificação de produtos de PCR como a coluna de purificação, purificação da banda no Gel, precipitação em etanol, precipitação com esferas magnéticas, entre outros (Sambrook & Russell, 2001).

Na Purificação do gel recorta-se a banda e usa a beta agarose para retirar a agarose. Este método é usado no caso de a PCR não oferecer uma única banda limpa. As esferas magnéticas são usadas para vincular o produto de PCR e retirar os iniciadores, seguido de uma eluição do produto da PCR para fora das esferas. Na precipitação com coluna de rotação os produtos de PCR (> 100 pb) são retidas na coluna, enquanto os iniciadores e as proteínas são lavadas completamente (Quiagen, 2007). O método de purificação em etanol consiste numa lavagem do produto de PCR com etanol 100% e um sal (ex. acetato de Sódio), seguido de uma centrifugação. Recolhe-se o precipitado que contém o fragmento de PCR limpo e lava-se com etanol 70% (Sambrook & Russell, 2001).

No caso de haver mais de um produto de PCR na mesma amostra, nem a coluna de purificação nem a precipitação em etanol conseguirá isolar o produto desejado. Assim usa-se a purificação do gel para isolar o produto desejado. Uma outra alternativa muito usada é a repetição do PCR aumentando a temperatura de hibridação até que se tenha uma banda limpa.

A purificação do ADN do *B. puniceus* foi feita usando o método precipitação em etanol-acetato de sódio. O procedimento consistiu na transferência do produto de PCR para um tubo de 1.5 ml e adição de 80µl de água ultra pura, 10µl de acetato de sódio (3M, pH:6.8) e 200µl de etanol a 100%. Seguidamente, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a velocidade máxima e descartado o sobrenadante. O fragmento de ADN amplificado foi lavado com 200 µl de etanol a 70% e centrifugado por 10 min à velocidade máxima. Eliminou-se o etanol sobrenadante e o depósito foi deixado a secar

durante a noite a temperatura ambiente para remover os restos de álcool. No final o ADN foi eluído em 22µl de água ultra pura.

A quantificação do ADN nos produtos de PCR foi feita com um espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop 1000® usando um volume de 2 µl. As amostras que obtiveram valores superiores a 10ng/µl de ADN foram enviadas para sequenciação e as demais foram descartadas e repetidas as PCRs. A sequenciação foi realizada no sequenciador automático ABI Prism® 3130 Genetic Analyser dos Serviços de Sequenciação do CCMAR.

1.6. Análise de dados

As sequências de COXI obtidas foram alinhadas e editadas usando o programa GENEIOUS 3.6.1 (Drummond *et al.*, 2006). Esse processo consistiu no alinhamento automático e inspeção visual dos cromatogramas. Nos alinhamentos foram também introduzidas mais 3 haplótipos da ilha de Boavista (AY825105/106/107) e uma sequência da ilha do Sal (AY825108) retiradas no GenBank.

Sequências idênticas foram agrupadas no programa COLLAPSE 1.2 (Posada, 2004) para obtenção do número e frequência dos haplótipos. Os resultados foram usados na construção de uma rede de haplótipos baseada no critério de 95% de parsimônia no programa TCS (Clement *et al.*, 2000).

O índice de diversidade haplotípica (h) indica a probabilidade de dois haplótipos escolhidos ao acaso no conjunto de amostras serem diferentes, e juntamente com a variância foram estimados a partir das equações 8.4 de Nei (1987). O índice de diversidade nucleotídica (π) indica o número médio de diferenças nucleotídicas por local entre pares de haplótipos (Saitou & Nei, 1987) foi estimado a partir das equações 10.5 (Nei, 1987). Em qualquer dos casos, o desvio padrão é calculado a partir da raiz quadrada da variância. Os valores foram obtidos com o programa DNASP 5.00.07 (Rozas *et al.*, 2003) . As equações podem ser reduzidas às seguintes expressões:

$$h = n(1 - \sum x_i^2) / (n-1) \text{ (Nei 1987, equação 8.4)}$$

$$\pi = n / (n - 1) \sum x_i x_j \pi_{ij} \text{ (Nei 1987, equação 10.5)}$$

em que n é o número de sequências, x_i a frequência do haplótipo i na amostra, x_j a frequência do haplótipo j na amostra.

Os locais parsimoniosamente informativos (PIS), são por definição locais que contêm pelo menos dois nucleotídeos diferentes que ocorrem pelo menos duas vezes cada e foram estimados pelo PAUP*v4b10 (Swofford, 2002).

As diferenças nucleotídicas entre pares de sequências (*mismatch analysis*) foram usadas para testar hipóteses sobre a demografia histórica da população (Rogers *et al.*, 1996). O gráfico da distribuição do número de diferenças das sequências tem uma forma característica em populações com diferentes histórias demográficas e pode ser usado para distinguir populações estáveis das em crescimento. Populações que sofreram alterações drásticas da sua dimensão, têm caracteristicamente distribuições unimodais das diferenças nucleotídicas entre pares de indivíduos, consequência da elevada similaridade genética entre estes. Populações que não sofreram mudanças significativas no efectivo populacional, os indivíduos tiveram oportunidade de ao longo do tempo acumular mutações, resultando em distribuições multimodais das diferenças nucleotídicas entre pares de indivíduos (Rogers *et al.*, 1996; Frankham *et al.*, 2004). Esta análise foi feita usando o programa DnaSP (Rozas *et al.*, 2003).

Os testes de neutralidade podem também ser usados para inferência da demografia histórica. O teste de neutralidade de D^* Tajima (1989) baseia-se na distribuição das frequências de mutação e na distribuição de haplótipos, distinguindo as diferenças entre uma sequência de ADN evoluindo aleatoriamente ("neutra") e uma evolução no âmbito de um processo não-aleatório, incluindo selecção direccionada ou selecção equilibrada, expansão ou contracção demográfica. A evolução aleatória das sequências de ADN contém mutações sem efeito sobre a aptidão e sobrevivência de um organismo denominadas de "neutras", enquanto mutações que provocam a selecção são "não-neutras". Este teste identifica as sequências que não se encaixam no modelo da teoria de neutralidade, no equilíbrio entre mutação e deriva genética. Um valor negativo indica uma abundância excessiva de haplótipos de baixa frequência, uma evidência plausível de expansão demográfica recente (Tajima, 1989). Outro teste de neutralidade é o teste de R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) que se baseia na diferença entre o número de mutações e a média do número de diferenças nucleotídicas. Este teste possui maior poder de resolução para amostras pequenas. A um diminuto valor de R_2

corresponde evidência de expansão populacional. A probabilidade de rejeitar a hipótese nula (dimensão da população constante) relativamente à hipótese alternativa (crescimento ou diminuição drástica do efectivo populacional), foi avaliada através de simulações coalescentes, com o nível de significância de 5% (Rozas *et al.*, 2003).

A estrutura genética da população foi avaliada com base na variância molecular (AMOVA) utilizando o programa ARLEQUIN v3.1 (Excoffier *et al.*, 2006). O procedimento da AMOVA baseia-se na análise de variância das frequências alélicas tendo em conta o número de mutações entre haplótipos (distância genética) ou a frequência dos diferentes haplótipos. A matriz de distâncias euclidianas é testada tendo em conta as variâncias associadas aos diferentes níveis de estrutura genética (entre grupos, dentro de grupos e entre populações) utilizando permutações não paramétricas. Estes componentes de co-variância são utilizados para calcular os correspondentes índices F de Wright (Wright, 1951): F_{st} entre populações, F_{sc} dentro dos grupos e F_{ct} entre grupos (Excoffier *et al.*, 1992). Para os dados em estudo foram estimados os índices F e os respectivos níveis de significância considerando dois níveis de comparação: um único grupo (todas as ilhas) e dois grupos (Barlavento e Sotavento) que correspondem também a uma divisão relacionada com as principais correntes oceanográficas.

II- RESULTADOS

O número de indivíduos amostrados totaliza 208 espécimes variando entre um mínimo de 8 e um máximo de 30 por localidade nas 8 ilhas do arquipélago (Tabela 3). Foram sequenciadas 115 amostras correspondentes a 15-16 exemplares por ilhas, à excepção de Santa Luzia (7 indivíduos).

Do resultado da sequenciação obteve-se um alinhamento com 548 *pb* do gene COXI, com 43 substituições (42 transições e 1 transversão) e 6 locais parcimoniosamente informativos. As frequências nucleotídicas médias obtidas revelam elevadas percentagens de Timinas (42,0%), baixa percentagem de Citosinas (15,5%) e valores intermédios de Adeninas (22,6%) e Guaninas (19,9%). Foram obtidos no total 39 haplótipos, estando os valores dos números de haplótipos, diversidades haplotípica e diversidades nucleotídica representados na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros da diversidade genética. PIS = locais parcimoniosamente informativos, H = número de haplótipos, h = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica e d.p. = desvio padrão.

	Santo Antão	São Vicente	Santa Luzia	São Nicolau	Sal	Boavista	Maio	Santiago	Total
Amostras colectadas	30	30	8	20	30	30	30	30	208
Amostras sequenciadas	15	15	7	16	15	16	16	15	115
Sequências Genbank	-	-	-	-	1	3	-	-	4
Nº de locais variáveis	11	6	4	4	10	12	13	11	43
PIS	3	1	0	1	1	2	1	2	13
H	9	6	4	5	8	6	11	10	39
h	0,876	0,7048	0,7143	0,65	0,758	0,7018	0,875	0,8952	0,769
d.p.	(±0,07)	(±0,114)	(±0,181)	(±0,108)	(±0,11)	(±0,08)	(±0,081)	(±0,07)	(±0,037)
π (%)	0,348	0,198	0,209	0,141	0,248	0,312	0,333	0,309	0,266
d.p.	(±0,085)	(±0,052)	(±0,076)	(±0,033)	(±0,061)	(±0,132)	(±0,064)	(±0,058)	(±0,032)

As ilhas de Santo Antão, Maio e Santiago fazem parte do grupo de ilhas com maior diversidade haplotípica e simultaneamente com maior diversidade nucleotídica. As ilhas com menores diversidades haplotípica são: São Nicolau, São Vicente, Santa Luzia e Boavista, sendo que, à excepção desta última, todas tem também baixos valores de diversidade nucleotídica. Isto quer dizer que no primeiro grupo, não só há mais haplótipos, como estes são mais diferentes entre si e, no segundo grupo, há mais

haplótipos mais semelhantes entre si. Comparativamente, Boavista tem um número baixo de haplótipos, mas estes são muito distintos uns dos outros.

A rede de haplótipos construída apresenta uma configuração em estrela, com um haplótipo central muito frequente e vários haplótipos mais raros que diferem do alelo central num máximo de oito mutações (Figura 19).

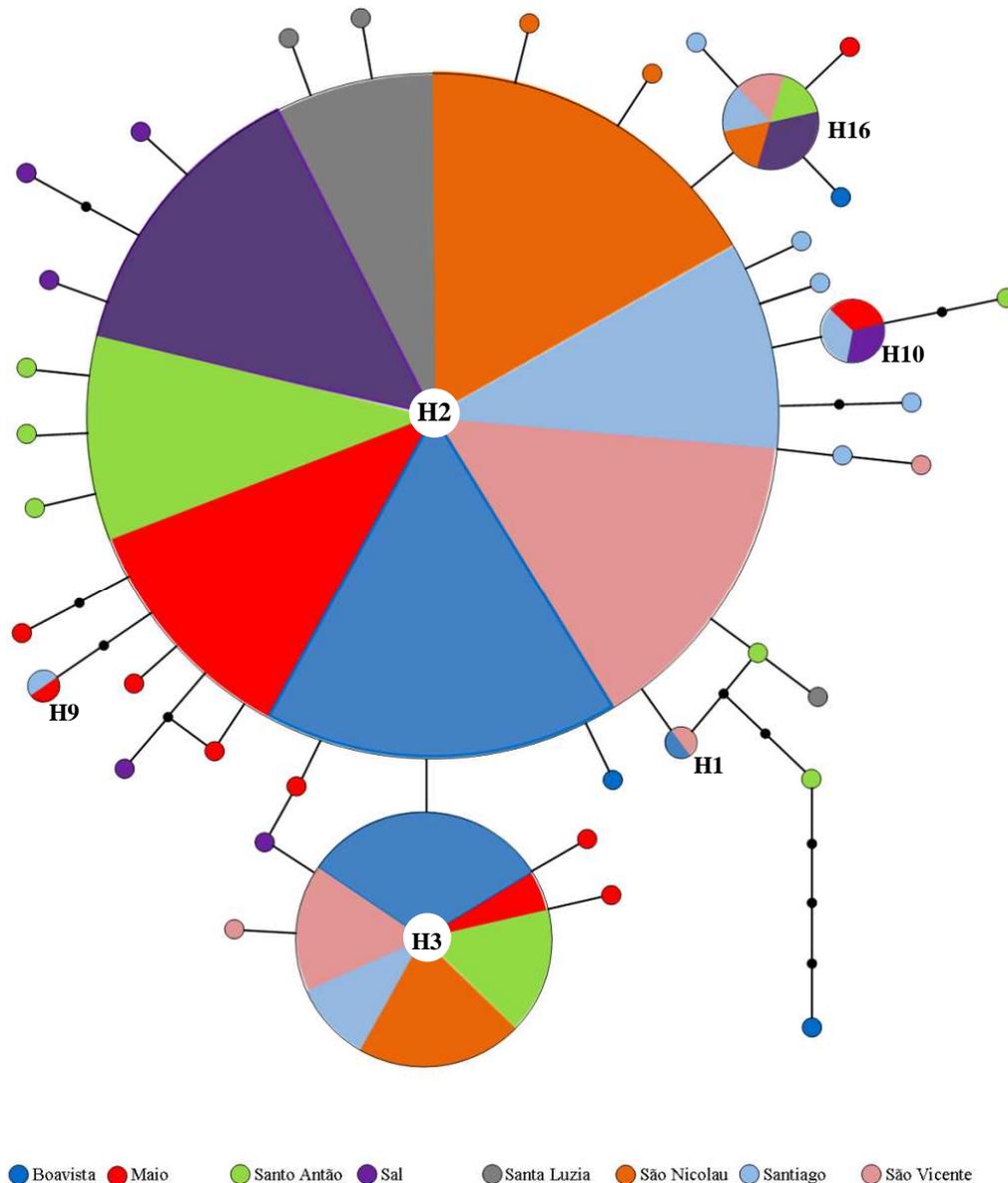


Figura 19 - Rede de haplótipos obtida a partir das sequências de COX1 para as populações *B. puniceus* de Cabo Verde. Cada traço representa uma mutação e cada cor representa uma ilha. O tamanho dos círculos é proporcional a frequência dos haplótipos e os haplótipos partilhados estão numerados.

A distribuição dos haplótipos por ilhas (anexo 1) evidencia o facto de, dos 39 haplótipos, somente 6 estarem presentes em todas as ilhas (Figura 20) e os restantes são únicos.

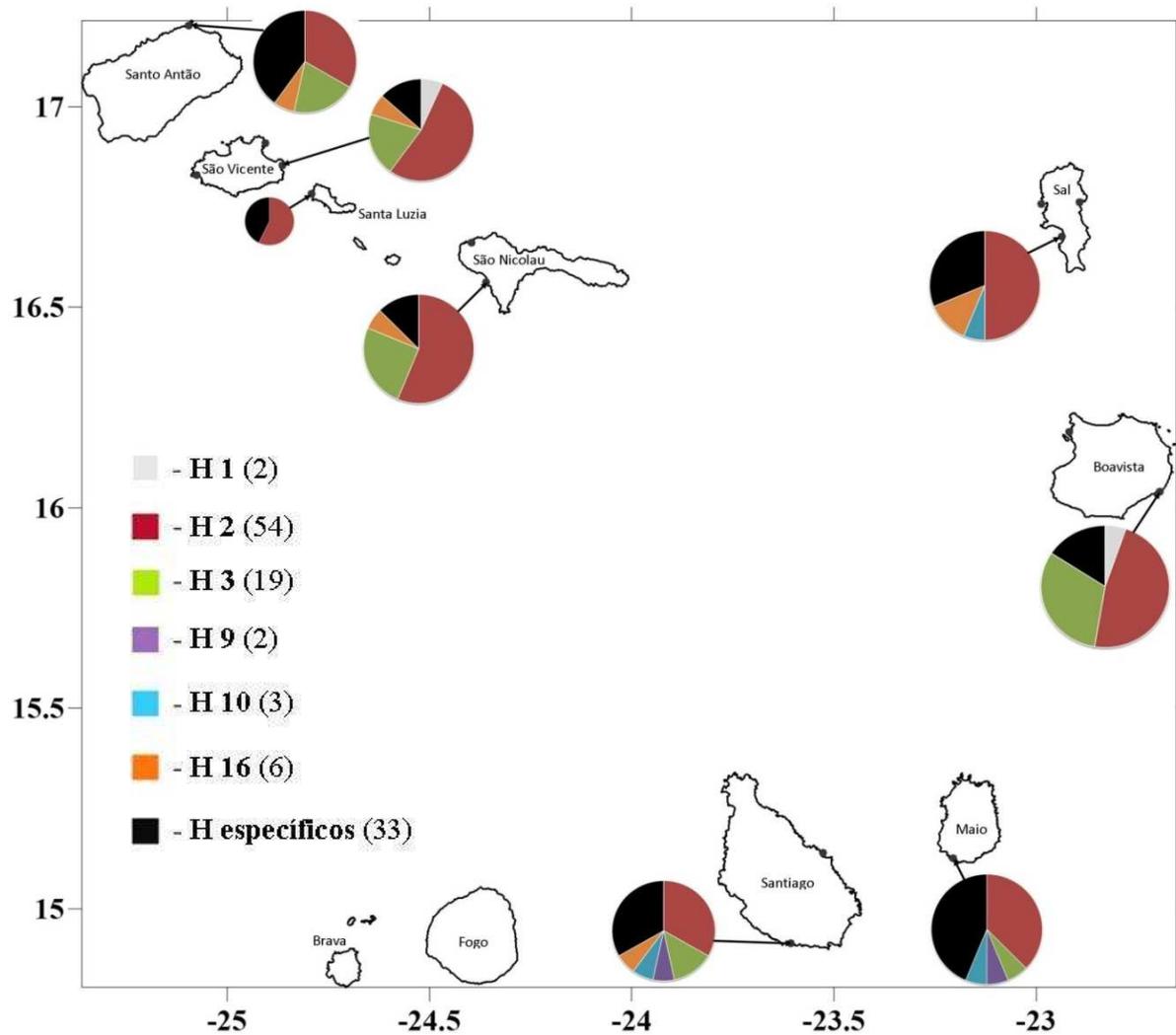


Figura 20 - Distribuição geográfica dos haplótipos. Cada cor representa um haplótipo. Os haplótipos específicos de cada ilha foram agrupados e representados com a cor preta. O tamanho dos círculos representa o número de amostras de cada zona e os valores entre parêntesis representam o número de indivíduos que contêm o referido haplótipo.

Os haplótipos mais frequentes, H2 e H3, com 54 e 19 sequências respectivamente, estão presentes em todas as ilhas, exceptuando as ilhas de Santa Luzia e Sal onde o H3 não foi encontrado. A frequência do haplótipo H2 nas ilhas varia entre 33% (em Santiago e Santo Antão) a 57% (Ilha de Santa Luzia). As ilhas de Santo Antão e Maio são aquelas que têm mais haplótipos específicos (67% e 64% respectivamente) e São Vicente São Nicolau as que menores percentagens têm (13%). As ilhas do Sotavento cabo-verdiano, Santiago e Maio, partilham o mesmo haplótipo H10.

A análise da estrutura populacional, considerando todas as ilhas como um único *pool* genético através de AMOVA, resultou num *Fst* estatisticamente não diferente de zero. Este resultado é idêntico, quer se tenha em conta as frequências haplotípicas ou a

distância genética entre haplótipos. Mesmo assim, foi testado ao nível de organização, considerando dois grupos, Sotavento-Barlavento com variações (com a ilha de Boavista sendo incluída no grupo Sotavento, no grupo Barlavento ou excluída) ou ainda 3 grupos com Boavista formando um grupo sozinho. Nenhuma dessas análises resultaram num índice de F_{st} positivo e os valores de P foram sempre maiores que 0,69. Daqui se poderá concluir que não existe qualquer associação entre a distribuição dos haplótipos e a geografia.

O teste neutralidade D (Tajima, 1989) para o total das sequências, resultou num valor negativo e estatisticamente significativo ($D = -2.54$; $P < 0,001$). O teste R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) resultou num valor positivo também estatisticamente significativo para o total das sequências ($R_2 = 0.0169$; $P = 0,002$).

A Figura 21 mostra o gráfico da *mismatch analysis* para o total de sequências, com os valores observados e os simulados segundo uma diminuição ou aumento brusco do efectivo populacional e de população constante. No gráfico é evidente a distribuição unimodal das frequências nucleotídicas, evidência que suporta uma demografia histórica associada a fenómenos de diminuição ou aumento brusco do efectivo populacional.

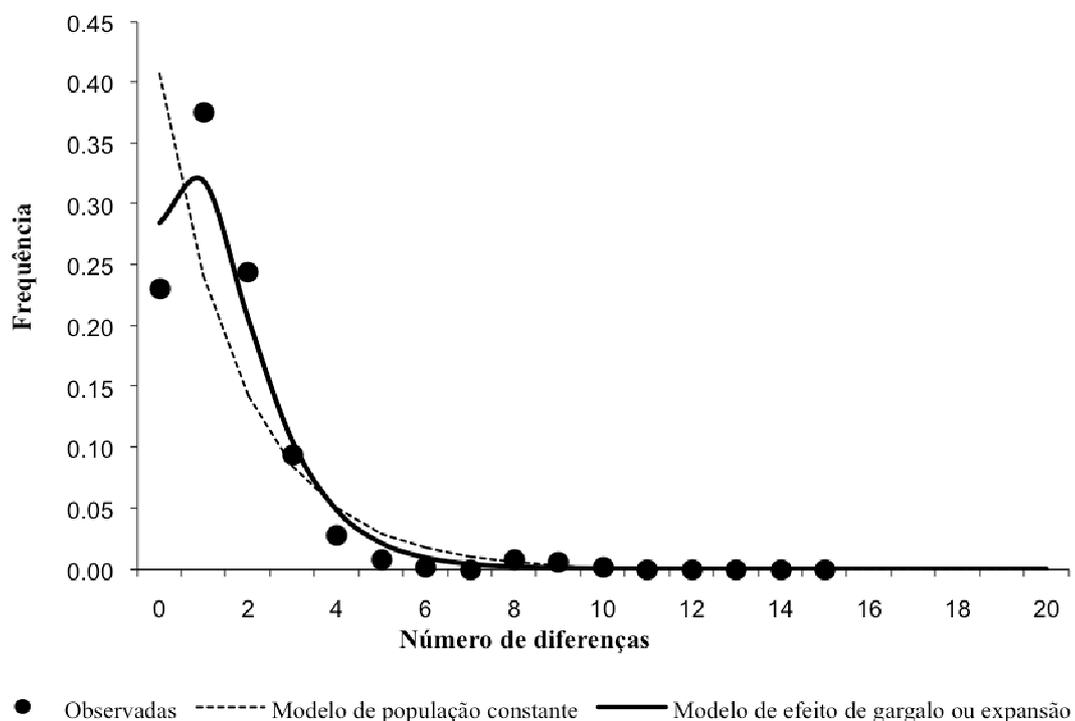


Figura 21 – Distribuição das frequências nucleotídicas entre pares de sequências.

III - DISCUSSÃO

Análise da variabilidade genética de *B. puniceus* no arquipélago de Cabo Verde

A existência do haplótipo H2 presente em mais de 50% das amostras analisadas (Figura 19), converte-o no mais provável ancestral a partir do qual se originaram os restantes 38 haplótipos. Segundo Templeton *et al.* (1995) os haplótipos de distribuição geográfica ampla e que estão localizadas no interior da rede de haplótipos, seriam haplótipos de origem mais antiga, enquanto haplótipos restritos, que estão localizados nas extremidades da rede, teriam uma origem mais recente. De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, a rede de haplótipos nesse caso pode ser mais informativa do que uma construção filogenética, embora não se consiga demonstrar qualquer relação entre a variabilidade genética com a distribuição geográfica.

O grande número de haplótipos únicos com poucas mutações em relação ao haplótipo central traduz-se num valor de diversidade nucleotídica muito reduzido e de diversidade haplotípica grande. Esta relação é normalmente consequência de uma expansão rápida da população a partir de uma população inicial reduzida (Grant & Bowen, 1998). Os índices de neutralidade, D^* e R_2 , com valores negativos ou muito perto de zero, respectivamente, mas ambos estatisticamente significativos, apoiam a hipótese de a população se encontrar em expansão demográfica. E o resultado gráfico da *mismatch analysis*, com uma forma unimodal, sugere também que os dados se adaptam também ao modelo diminuição ou aumento brusco do efectivo populacional (Rogers *et al.*, 1996).

Influência do desenvolvimento larvar na dispersão de *B. puniceus* no arquipélago de Cabo Verde

A inexistência de diferenças significativas na variância genética dos indivíduos amostrados nas oito ilhas (valores nulos de F_{st}) sugere a existência de fluxo genético extenso ao longo de todo o arquipélago de Cabo Verde. A duração da fase larvar planctotrófica de *B. puniceus* até 40 dias de permanência na coluna de água (Fields & Moore, 1983; Campos & Ramorino, 1980) parece ser suficiente para manter o fluxo genético entre ilhas. É previsível que organismos com fases larvares relativamente

extensas, como é o caso do grupo em estudo, apresentem uma grande capacidade de dispersão e fluxo genético o que se traduziria em ausência de estrutura genética. No entanto, descreveram-se recentemente casos de espécies marinhas com uma longa fase pelágica com elevado potencial de dispersão mantêm distribuições restritas em resultado de um conjunto de mecanismos que englobam por exemplo retenção larvar determinada por condições oceanográficas ou comportamentais (Palumbi, 2003; Taylor, 2003).

Efeito das correntes na dispersão de *B. puniceus* no arquipélago de Cabo Verde

A corrente das Canárias e a Contracorrente Equatorial deveriam exercer uma influência de modo provocar uma separação das populações de *B. puniceus* localizadas nas ilhas a Barlavento (Santo Antão, S. Vicente, Sal, Santa Luzia, e São Nicolau) e as mais a Sul (Boavista, Maio, Santiago, Fogo) do arquipélago. Isto considerando que esta espécie apresenta uma fase larvar que lhe permite dispersar passivamente por acção das correntes marinhas. Esta separação nestes dois grupos foi observada no estudo de Medina *et al.* (2008) realizado em peixes de recife da espécie *Cephalopolis taeniops* no qual se observou a existência de dois fenótipos diferentes correspondentes a cada um dos grupos. Este trabalho não analisou geneticamente os grupos alvos. No entanto, do ponto de vista oceanográfico, esse isolamento é menos acentuado durante a estação fria (Dezembro a Abril) do que na estação quente (Maio a Novembro). O hidrodinamismo em volta das ilhas na estação fria implica um aumento da conectividade entre estas e conseqüente aumento da dispersão larvar. As espécies com fases de vida larvar longas, como é o caso do *B. puniceus*, são as mais influenciadas por essas variações oceanográficas (Medina *et al.*, 2007) podendo favorecer um assentamento aleatório.

A ausência de qualquer diferenciação genética nas populações de *B. puniceus* das ilhas do Barlavento e do Sotavento é um resultado inesperado sugerindo que o efeito das correntes das Canárias e Contracorrente Equatorial não é suficientemente forte para provocar a disjunção dos dois grupos, ou então, não foi detectado com este marcador mitocondrial. Outra explicação a ter em consideração relativamente à ausência de diferenças significativas entre grupos é o facto da confluência das duas correntes poder criar “giros” em volta das ilhas (Medina *et al.*, 2007) o que provocaria uma mistura aleatória das larvas provenientes de ilhas diferentes.

É igualmente possível que, pelo facto da expansão desta espécie no arquipélago ser recente, não tenha decorrido ainda tempo suficiente para aumentar a divergência genética entre populações. A utilização de outro tipo de marcadores mais variáveis como por exemplo microsátélites, ou AFLP's (amplified fragment length polymorphism), poderá fornecer indicações mais conclusivas sobre o efeito real das correntes na dispersão destes organismos.

Relação entre morfotipos e haplótipos de *B. puniceus*

Verificou-se que os exemplares de *B. puniceus* apresentam dois morfotipos: as formas claras e as escuras. Os exemplares mais escuros encontram-se nas zonas mais expostas ao sol, onde as rochas são igualmente escuras, o que poderia sugerir a existência de algum tipo de mimetismo em resposta ao ataque de eventuais predadores. Poder-se-ia portanto esperar a existência de selecção positiva sobre a cor escura e a ocorrência de uma relação entre cor da concha e o haplótipo correspondente. As formas mais claras ocorrem em zonas mais abrigadas do intertidal, nomeadamente em poças de maré, rochas coralinas, enclaves e onde as rochas são igualmente mais claras, não estando tão susceptíveis à predação. A ocorrência de elevada divergência genética mantida por selecção natural sobre o tamanho e espessura da concha foi registada em gastrópodes marinhos do género *Littorina* que ocorrem nas zonas superior e inferior do intertidal (Rolán-Alvarez *et al.*, 2004). No presente estudo, não foi encontrada qualquer relação entre cor do exemplar e haplótipo, o que sugere que poderá apenas tratar-se de um polimorfismo.

CONCLUSÕES

Este estudo com uma cobertura geográfica ampla no arquipélago de Cabo Verde permitiu evidenciar a conectividade existente entre as ilhas do arquipélago, relativamente a *B. puniceus*. Os resultados indicam que:

- Existe uma elevada variabilidade haplotípica (65-89%) e baixa variabilidade nucleotídica (0.14-0.35%) nas populações de *B. puniceus* no arquipélago de Cabo Verde;
- Não foi encontrada nenhuma relação directa entre a distribuição e frequência dos haplótipos e a geografia. Não se encontraram diferenças significativas na variabilidade genética entre pares de ilhas e entre agrupamentos de ilhas;
- Os índices de diversidade, os testes de neutralidade e a distribuição em estrela dos haplótipos sugerem que a população sofreu uma expansão rápida e provavelmente recente.
- O desenvolvimento planctotrófico das larvas e o tempo de permanência no plâncton constitui um veículo para a dispersão da espécie, o que pode manter o fluxo genético entre populações, impedindo a diferenciação genética entre as ilhas;
- Não se registou um efeito visível da acção da Corrente das Canárias e da Contracorrente Equatorial sobre a dispersão de *B. puniceus* no arquipélago
- Na foi demonstrada nenhuma relação entre morfotipos e haplótipos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, M., Perez, S e Sirch, Y. (2006). Morphological variability of *Brachidontes Swainson* (Bivalvia, Mytilidae) in the marine Quaternary of Argentina (SW Atlantic). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **239**: 100-125p.
- Almada, E. (1993). Caracterização Oceanológico das Zonas de Pesca da ZEE do Arquipélago de Cabo Verde. Instituto Nacional de Desenvolvimento das Pescas, República de Cabo Verde.
- Almada, E. e Lopes, J. (1998). Diversidade Biológica de Cabo Verde: Análise e hierarquização das pressões humanas sobre a DB marinha e identificação das prioridades para a sua conservação e utilização sustentável. Direcção Geral do Ambiente, República de Cabo Verde.
- Asuar, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. In L. Eguiarte, V.Souza e X.Aguirre (ed.), *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, 574p.
- Avice, J. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. 3ª edição. Harvard Univ Press. 447p.
- Avice, J. (1998). The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, **4**:371-379p.
- Barnes, R., Rupert, E e Fox, RS. (2005). *Zoologia dos Invertebrados-Uma Abordagem Funcional-Evolutiva*. 7ª Edição. Editora Roca. São Paulo.
- Biochemicals, R.M. (1999). PCR Applications Manual. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim in <http://www.roche-applied-science.com/index.jsp>
- Bravo de Laguna, J. (1985). Plates-formes insulaires et zone économique exclusive à la République du Cap-Vert. Projet pour le renforcement du Secrétariat d'Etat aux Pêche du Cap-Vert, CVI/82/003/Rapport Technique. FAO, **6**:1-28p.
- Brehm, A., Jesus, J, Pinheiro, M e Harris, D. (2001). Relationships of scincid lizards (*Mabuya* spp; Reptilia: Scincidae) from the Cape Verde islands based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **2**:311-316p.
- Brown, W., George, M e Wilson, A. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **4**:1967-1971p.
- Campos, B. e L. Ramorino. (1980). Larval and early benthic stages of *Brachidontes granulata* (Bivalvia: Mytilidae). *Veliger* **22**: 277-281p.
- Carranza, S., Arnold, E, Mateo, J e López-Jurado, L. (2001). Parallel gigantism and complex colonization patterns in the Cape Verde scincid lizards *Mabuya* and *Macroscincus* (Reptilia: Scincidae) revealed by mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society of London-B-Biological Sciences*, **1476**:1595-1604p.

- Clement, M., Posada, D e Crandall, K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **10**:1657-1659p.
- Cunha, R., Castilho, R, Rüber, L e Zardoya, R. (2005). Patterns of cladogenesis in the venomous marine gastropod genus *Conus* from the Cape Verde Islands. *Systematic biology*, **54**: 634-650p.
- Cunha, R., Tenório, M, Afonso, C, Castilho, R e Zardoya, R. (2008). Replaying the tape: recurring biogeographical patterns in Cape Verde *Conus* after 12 million years. *Molecular Ecology*, **17**: 885-901p.
- DGMP (1998). Gestão da Zona Costeira, 1 -Atlas da natureza da costa e da ocupação do litoral. Reconhecimento fotográfico. República de Cabo Verde, 76p.
- Drummond, A., Kearse, M, Heled, J e Moir, R. (2006). GENEIOUS.
- Duda, T. and Rolan, E. (2005). Explosive radiation of Cape Verde *Conus*, a marine species flock. *Molecular ecology*, **14**: 267-272p.
- Eguiarte, L., Souza, V and Aguirre, X. (2007). *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, México.
- Excoffier, L., Smouse, P e Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **2**:479p.
- Excoffier, L., Laval, G e Schneider, S. (2006). Arlequin (Version 3.1): an integrated softwarepackage for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 47-50p.
- Falcón, L. e Valera, A. (2007). *Extracion de ácidos nucleicos*. In L. Eguiarte, V.Souza e X.Aguirre (ed.), *Ecologia Molecular*. Instituto Nacional de Ecología, México, 574p.
- Fields, A. e Moore E. (1983). The larval biology of *Brachidontes modiolus* (Linne', 1767) Bivalvia: Mytilidae). *Veliger* **26**:52-61p.
- Fischer, W., Bianchi, G., Scott, W.B. (eds), 1981. FAO species identification sheets for fishery purposes. Eastern Central Atlantic; fishing area 34, 47 (in part). Canada Funds-in-Trust. Ottawa, Department of Fisheries and Oceans Canada, by arrangement with the Food and Agriculture Organization of the United Nations, vols. I-VII: pag.var.
- Folmer, O., Black, M, Hoeh, W, Lutz, R e Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **5**:294-299p.
- Frankham, R., Ballou, J e Briscoe, D. (2004). *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press, 220p.
- Gofas, S., Afonso, J.P., Brandão, M. (1985). *Conchas e Moluscos de Angola* =

- Coquillages et Mollusques d'Angola. [Shells and molluscs of Angola].* Universidade Agostinho / Elf Aquitaine Angola. Angola. 140 p.
- Grant, W. e Bowen, B. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, **5**:415p.
- Greer, A. (1976). On the evolution of the giant Cape Verde scincid lizard *Macroscincus coctei*. *Journal of Natural History*, **6**:691-712p.
- Guerreiro, A. e Reiner, F. (2000). *Moluscos marinhos da ilha de Sao Vicente (Arquipélago Cabo Verde)*. 1ª Edição. Câmara Municipal de Oeiras, Oeiras, 279p.
- Honkoop, P.J.C., Berghuis, E.M., Holthuijsen, S., Lavaleye, M.S.S. e Piersma, T. (2008). Molluscan assemblages of seagrasscovered and bare intertidal flats on the Banc d'Arguin, Mauritania, in relation to characteristics of sediment and organic matter. *J Sea Res* **60**:255–263p.
- Instituto Hidrográfico. (1968). Roteiro do Arquipélago de Cabo Verde. Vol II, Lisboa.
- Jablonski D. (1986). Larval ecology and macroevolution in marine invertebrates. *Bulletin of Marine Science*, **39**(2):565-587p.
- Jesus, J., Brehm, A e Harris, D. (2002). Relationships of *Tarentola* (Reptilia: Gekkonidae) from the Cape Verde Islands estimated from DNA sequence data. *Amphibia-Reptilia*, **1**:47-54p.
- Joger, U. (1993). On two collections of reptiles and amphibians from the Cape Verde Islands, with descriptions of three new taxa. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg*, **159**:437-444p.
- Lee, T. e Ó Foighil, D. (2004). Hidden Floridian biodiversity: mitochondrial and nuclear gene trees reveal four cryptic species within the scorched mussel, *Brachidontes exustus*, species complex. *Molecular Ecology*, **13**: 3527-3542p.
- Lee, T., Ó Foighil, D. (2005). Placing the Floridian marine genetic disjunction into a regional evolutionary context using the scorched mussel, *Brachidontes exustus*, species complex. *Evolution*, **59**: 2139-2158p.
- Lucas, J., Vaccaro, E and Waite, J. (2002). A molecular, morphometric and mechanical comparison of the structural elements of byssus from *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Experimental Biology*, **205**: 1807-1817p.
- MASDEA (2009). *Brachidontes puniceus* (Gmelin, 1791). in Vanden Berghe, E. (Ed) (2009). Marine Species Database for Eastern Africa in <http://www.vliz.be/vmdcdata/masdea/masdea.php?p=taxdetails&id=225213>
- Medina, A., Brêthes, J, Sévigny, J e Zakardjian, B. (2007). How geographic distance and depth drive ecological variability and isolation of demersal fish communities in an archipelago system (Cape Verde, Eastern Atlantic Ocean). *Marine Ecology*, **3**:404-417p.

- Medina, A., Brêthes, J e Sévigny, J. (2008). Habitat fragmentation and body-shape variation of African hind *Cephalopholis taeniops* (Valenciennes) in an archipelago system (Cape Verde, eastern Atlantic Ocean). *Journal of Fish Biology*, **4**:902-925p.
- Nei, M.. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia Univ Pr, New York, USA.
- Nei, M. e Li, W. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **10**:5269-5273p.
- Palumbi, S. (2003). Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, **13** (1):146-158p.
- Poppe G. T. e Poppe P. (2009) Conchology, inc. in <http://www.conchology.be/?t=33&family=MYTILIDAE>
- Posada, D. (2004). COLLAPSE: describing haplotypes from sequence alignments. University of Vigo, Vigo, Spain.
- Quiagen. (2007). *QIAamp® DNA Stool Handbook*. 2ª edição.
- Ramos-Onsins, S. e Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, **12**:2092-2100p.
- Roche applied Science. *PCR Applications Manual*. 3ª Edição. in www.roche-applied-science.com
- Rogers, A., Fraley, A, Bamshad, M, Watkins, W e Jorde, L. (1996). Mitochondrial mismatch analysis is insensitive to the mutational process. *Molecular biology and evolution*, **7**:895-902p.
- Rolan-Alvarez, E., Carballo, M., Galindo, J., Moran, P., Fernandez, B., Caballero, A., Cruz, R., Boulding, E.G., Johannesson, K. (2004). Nonallopatric and parallel origin of local reproductive barriers between two snail ecotypes. *Molecular Ecology*, **13** (11):3415-3424p.
- Rolán, E. (2005). *Malacological Fauna from the Cape Verde Archipelago*. Conchbooks, Germany.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J, Messeguer, X e Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**: 2496-2497p.
- Saitou, N. e Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, **4**:406-425p.
- Sambrook, J. e Russell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. VOI 1, 3ªed. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.
- Scheltema R.S. (1971). Larval dispersal as a means of genetic exchange between geographically separated populations of shallow-water benthic marine gastropods.

Biol Bull Woods Hole Mar Biol Lab. **140**:284-322p.

Swofford, D. (2002). *PAUP* phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **3**:585-595p.

Taylor M.S. e Hellberg M.E. (2003). Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science* **299**:107-109p.

Templeton, A., Routman, E e Phillips, C. (1995). Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, **2**:767-782p.

Terranova, M., Lo Brutto, S, Arculeo, M e Mitton, J. (2007). A mitochondrial phylogeography of *Brachidontes variabilis* (Bivalvia: Mytilidae) reveals three cryptic species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **45**: 289-298p.

Trausel J. e Slieker F. (2009). Natural History Museum Rotterdam - Mytilidae - Show all families. *in* www.nmr-pics.nl/Mytilidae/album/index.htm

Van den Broeck, H., Breugelmans, K, De Wolf, H e Backeljau, T. (2008). Completely disjunct mitochondrial DNA haplotype distribution without a phylogeographic break in a planktonic developing gastropod. *Marine Biology*, **153**: 421-429p.

Whittaker, R. e Fernández-Palacios, J. (2007). *Island biogeography: ecology, evolution, and conservation*. Oxford University Press, USA.

Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annual Eugenics* **15**:323-354.

Sites consultados

- www.idscaro.net/.../bival/pl_mytilidae_1.htm, *ultimo acesso 26-04-2009*
- www.zipcodezoo.com/Animals/B/Brachidontes_puniceus/", *ultimo acesso 26-04-2009*
- www.ncbi.nlm.nih.gov/books *ultimo acesso 26-04-2009*
- www.mun.ca/biology/scarr/PCR_simplified.html *ultimo acesso em Setembro de 2009*
- www.vliz.be/vmdcdata/masdea/masdea.php?p=taxdetails&id=225213 *último acesso em Setembro de 2009*

ANEXOS

Anexo 1 -Tabela das frequências dos haplótipos obtidos para *B. puniceus* em todas as ilhas.

Haplótipo	Ilhas								Total de indivíduos com mesmo haplótipo
	Boavista	Maio	Santo Antão	Sal	Santa Luzia	São Nicolau	Santiago	São Vicente	
H 1	1							1	2
H 2	9	6	5	8	4	9	5	8	54
H 3	6	1	3			4	2	3	19
H 4	1								1
H 5	1								1
H 6	1								1
H 7		1							1
H 8		1							1
H 9		1					1		2
H 10		1		1			1		3
H 11		1							1
H 12		1							1
H 13		1							1
H 14		1							1
H 15		1							1
H 16			1	2		1	1	1	6
H 17			1						1
H 18			1						1
H 19			1						1
H 20			1						1
H 21			1						1
H 22			1						1
H 23				1					1
H 24				1					1
H 25				1					1
H 26				1					1
H 27				1					1
H 28					1				1
H 29					1				1
H 30					1				1
H 31						1			1
H 32						1			1
H 33							1		1
H 34							1		1
H 35							1		1
H 36							1		1
H 37							1		1
H 38								1	1
H 39								1	1

Anexo 2 -Soluções necessárias ao processo de extracção de ADN por extracção salina:

Acetato de potássio

-
- 5 M de acetato de potássio (60 ml)
 - 11.5 ml de ácido acético Glacial
 - 28.5 ml H₂O ultra pura

Obs: Misturar tudo e manter à temperatura ambiente. O Resultado da solução é 3M referente ao Potássio e 5M referente ao Acetato.

Acetato de Sódio 3M, pH: 6.8

-
- 408.1 g de Acetato de Sódio.3H₂O
 - 800 ml H₂O ultra pura

Obs: Ajustar o pH da solução a 6.8 com ácido acético glacial e adicionar água até atingir os 1000ml.

Agarose 1% (Eletroforese)

-
- 10g agarose em pó
 - 990 ml TAE 1X

Obs: Agitar no agitador magnético por algumas horas a temperaturas superiores a 60 °C até que o pelet se dissolva. Manter à temperaturas acima de 50 °C.

Brometo de Etídio 10mg/ml (para Eletroforese)

-
- 1 g de Brometo de etídio
 - 100 ml H₂O ultra pura

Obs: Agitar no Agitador magnético por algumas horas até que o pelet se dissolva. Cobrir o recipiente com papel e manter num local escuro à 4 °C.

EDTA10 mM (pH 8)

-
- 4,65g de Dissodium ethilenediaminetetracetato.2H₂O (EDTA)
 - 1000 ml H₂O ultra pura

Obs: Misturar vigorosamente com o agitador magnético. Ajustar o pH a 8 com NaOH (~0.5g de NaOH em sal). Fazer aliquotas, autoclavar e manter à temperatura ambiente.

SDS 10%

-
- 100g de Dodecil sulfato de sódio (SDS)
 - 900ml H₂O ultra pura

Obs: Misturar vigorosamente no agitador magnético à temperatura de 68°C até a dissolução completa. Ajustar o volume a 1000 ml com H₂O e manter à temperatura ambiente.

Tampão Extração

-
- 10 mM Tris, pH 8
 - 1 mM EDTA, pH 8
 - 0,1 % SDS

Obs: Misturar tudo e manter à temperatura ambiente.

TAE 50X (solução de Stock)

-
- 242g de Tris Base (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)
 - 57.1 ml de Ácido acético glacial
 - 100 ml de 0.5 M EDTA (pH8)

Obs: Ajustar o volume final a 1000 ml com H₂O e manter à temperatura de 4°C.

TAE 1X (Concentração de trabalho na eletroforese)

-
- 20 ml TAE 50X
 - 980 ml H₂O ultra pura

Obs: Manter à temperatura de 4°C.

Tris 10 mM (pH 8)

-
- 1.36g de Tris base (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)
 - 800 ml H₂O ultra pura
 - 42 ml HCl

Obs: ajustar a 1000 ml com H₂O ultra pura, autoclavar e manter à temperatura ambiente.