

Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências Humanas e Naturais
Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental

Gustavo Martins Rocha

Avaliação do ITS1 e do ITS2 como *barcode* para Calanoida (CRUSTACEA, COPEPODA) marinhos e como marcador complementar para filogenia do grupo.

Vitória

2014

**Avaliação do ITS1 e do ITS2 como *barcode* para Calanoida
(CRUSTACEA, COPEPODA) marinhos e como marcador
complementar para filogenia do grupo.**

Gustavo Martins Rocha

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Oceanografia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Loureiro
Fernandes

Vitória

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Rocha, Gustavo Martins, 1988-

R672a Avaliação do ITS1 e ITS2 como barcode para calanoida
(crustacea, copepoda) marinhos e como marcador complementar
para filogenia do grupo/ Gustavo Martins Rocha . – 2014.

62 f. : il.

Orientador: Luiz Fernando Loureiro Fernandes.

Coorientador: Laura Roberta Pinto Utz.

Dissertação (Mestrado em Oceanografia Ambiental) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas
e Naturais.

1. Zooplâncton marinho. 2. Marcadores genéticos. 3. Biologia
molecular. 4. Animais - Identificação. 5. Animais marinhos. 6.
Atlântico, Oceano. I. Fernandes, Luiz Fernando Loureiro. II. Utz,
Laura Roberta Pinto. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 55



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA
AMBIENTAL

**"Avaliação do ITS1 e do ITS2 Como *Barcode* para Calanoida
(CRUSTACEA, COPEPODA) Marinhos e Como Ferramenta
Complementar Para Filogenia do Grupo"**

Gustavo Martins Rocha

Prof. Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador - Examinador Interno UFES

Profa. Dra. Ana Paula Cazerta Farro
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno UFES

Profa. Dra. Daniela Milstein
Instituto de Botânica - São Paulo
Examinador Externo IBT

Vitória, 06 de junho de 2014.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, por terem me dado apoio e me incentivado desde o momento em que decidi fazer o curso de Ciências Biológicas. Agradeço por eles terem me permitido ir atrás dos meus sonhos e me encorajado a lutar pelos meus objetivos. Agradeço por todas as vezes que se interessaram pelos meus interesses e compartilharam as minhas conquistas.

Agradeço também à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida, ao programa Br-BOL (*Brazilian Barcode of Life*), em especial para Mariana Cabral de Oliveira, pelo financiamento da pesquisa, aos profissionais responsáveis pelo Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUC-RS, em especial ao Dr. Eduardo Eizirik, ao Dr. Maurício Reis Bogó e ao Dr. Sandro Luis Bonatto por terem me disponibilizado estrutura de laboratório, assim como profissionais altamente qualificados para auxiliar em meus experimentos laboratoriais durante o período que estive lá.

É engraçado como curso de mestrado é tão curto a ponto de estarmos em constante correria e preocupação com prazos, mas ao mesmo tempo nos faz olhar para trás, ao nos aproximarmos do seu término, e termos a sensação de que se passou muito mais do que os 2 anos de praxe. Parece não ser possível que tanto foi realizado durante este curto espaço de tempo.

Iniciei com uma ideia de projeto que teve que ser modificada e adaptada ao longo do caminho, e durante este momento de dúvida eu contei com a ajuda de pessoas a quem não poderia deixar de agradecer. Primeiramente meus pais, por sempre terem me dado força e me “garantido” que tudo daria certo.

Também devo agradecer aos meus orientadores, Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes e Dra. Laura Roberta Pinto Utz, por terem se mantidos serenos, confiantes no meu trabalho e me mantendo em meu caminho sob sua guia e sua orientação. Senti meus passos mais firmes com a ajuda de vocês. Um agradecimento muito

especial também deve ser mandado para além do trópico de Câncer. Para a Dra. Grace Wyngaard da universidade James Madison, na Virgínia. Thank you very much for all your attention, sympathy and suport! It would be a lot harder without your help!

Agradeço muito aos amigos que fiz durante este período, que me ajudaram a não surtar de vez e jogar tudo para o alto. Eles me mostraram que problemas aparecem para todos nós, e com a boa companhia de pessoas que se importam com a gente tudo é superado de forma bem mais agradável. A isto devo agradecer à: Tiago, Manuel, Maísa, Talita, Laurinha (só gente fina! Gandes amigos!), Fabrício (me tirou da rua da amargura! haha), Fernanda e Adriana (me ajudaram de mais no lab!), Ítalo e Isadora (duas figurassas!), Fernando (sabe de tudo o rapaz!), Fabíola, Gabriela, Kerstin e Camila (estagiárias 1, 2, 3 e 4, respectivamente hehe), Henrique, Anelise e Carla (me deram uma força desde a primeira vez que estive pelo Sul)... Agradeço a todos!!

E acima de tudo eu agradeço a menina mais linda, que durante os meus piores momentos esteve comigo me dando o apoio que eu precisava. E mesmo quando era ela quem passava por momentos complicados ainda reservava forças para me passar palavras de carinho, me relaxando por saber que depois que fizesse o meu melhor, me receberia com o sorriso mais lindo do mundo, qualquer que tivesse sido o resultado desta jornada. Muito obrigado por tudo Jojo!! Obrigado por ter nos permitido aproveitar o melhor que pudemos desta distância, e pelo amadurecimento que conquistamos depois de tudo isso. Hoje nós sabemos que o bem que a proximidade traz a distância não faz esquecer!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1. Barcode	11
1.2. Copepoda, Calanoida	14
1.3. Filogenia de Calanoida	16
2. HIPÓTESE	17
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo geral	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. REREFÊNCIAS	18
5. RESUMO	24
6. ABSTRACT	25
7. INTRODUÇÃO	26
8. MATERIAL E MÉTODOS	28
8.1. Amostragem e triagem	28
8.2. Extração de DNA, PCR e sequenciamento	30
8.3. Análises moleculares - distância genética	31
8.4. Distinção entre espécies com base nos <i>indels</i> - nova metodologia	31
8.5. Análises moleculares - filogenia	32
9. RESULTADOS	33
9.1. Taxa de sucesso de cada marcador molecular	33

9.2. Distâncias genéticas	35
9.3. Distinção entre espécies com base no <i>indels</i> - nova metodologia	38
9.4. Filogenia para cada marcador molecular (COI, ITS1 e ITS2)	40
9.5. Filogenia com sequências concatenadas (COI-ITS1-ITS2) para cada superfamília	41
9.6. Filogenia com sequências concatenadas (COI-ITS1-ITS2) para Calanoida	47
10. DISCUSSÃO	49
10.1. Utilidade do ITS1 e ITS2 como barcode	49
10.2. <i>Lucicutia flavicornis</i> e especiação críptica	50
10.3. COI	51
10.4. Distinção entre espécies com base nos <i>indels</i> - nova metodologia	52
10.5. Filogenia	53
11. CONCLUSÃO	55
12. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
13. REFERÊNCIAS	56

LISTA DE TABELAS

TABELA I: Informações das coletas.....	30
TABELA II: Lista de espécies identificadas no estudo com as respectivas taxas de amplificação e sequenciamento para cada marcador molecular.....	34
TABELA III: <i>Distância genética intraespecífica e interespecífica para cada marcador molecular analisado.....</i>	36
TABELA IV: Distância genética intraespecífica tendo <i>L. flavicornis</i> como dois grupos genéticos separados.....	38
TABELA V: Distância genética intraespecífica e interespecífica, com base nos <i>indels</i> , para cada marcador molecular analisado.....	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mapa amostral.....	29
FIGURA 2: Gel de agarose de PCR contaminado.....	34
FIGURA 3: Árvore filogenética construída com base no ITS1 e ITS2 para a espécie <i>Lucicutia flavicornis</i>	37
FIGURA 4: Árvore filogenética de 36 indivíduos de Calanoida por <i>Neighbor-Joining</i> , construídas com base no COI.....	42
FIGURA 5: Árvore filogenética construída com base no ITS1.....	43
FIGURA 6: Árvore filogenética construída com base no ITS2	44
FIGURA 7: Árvore filogenética construída com base na sequência concatenada do ITS1-ITS2-COI para as espécies da superfamília Megacalanoidea.....	45
FIGURA 8: Árvore filogenética construída com base na sequência concatenada do ITS1-ITS2-COI para as espécies da superfamília Clausocalanoidea.....	46
FIGURA 9: Árvore filogenética construída com base na sequência concatenada do ITS1-ITS2-COI para as espécies da superfamília Augaptiloidea,.....	47
FIGURA 10: Árvore filogenética construída com base na sequência concatenada do ITS1-ITS2-COI para as espécies da superfamília Centropagoidea,.....	48
FIGURA 11: Árvore filogenética construída com base na sequência concatenada do ITS1-ITS2-COI para as espécies de Calanoida.....	49

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. *Barcode*

A utilização de uma sequência de DNA curta para a identificação molecular de espécies vem sendo utilizada há décadas como auxiliar na identificação morfológica e classificação de organismos (Chikuni et al., 1990; Arnason et al., 1991). Porém a popularização do DNA *Barcoding* data de 2003, quando foi proposta a criação e desenvolvimento de um banco de dados de DNA, onde as sequências estariam ligadas ao nome de uma determinada espécie; como uma ferramenta prática e confiável para auxiliar a identificação de espécies (Hebert et al., 2003).

Hebert et al. (2003), estabelecem a região 5' do gene mitocondrial *citocromo c oxidase 1* (COI), com aproximadamente 600pb, como cerne de um sistema global de identificação molecular de animais. Os autores concluem que “quando totalmente desenvolvido, o sistema de identificação pelo COI fornecerá uma solução confiável, com bom custo-benefício e acessível para o problema da identificação de espécies” e que “Este sistema de identificação microgenômico permitirá a discriminação da vida pela análise de um pequeno segmento do genoma, representando uma abordagem extremamente promissora para a diagnose da diversidade biológica”.

A partir de Hebert et al. (2003), o COI se popularizou como marcador molecular universal para geração de *barcode*. Isto se deve principalmente à confirmação da diferença entre a distância genética intraespecífica e a distância genética interespecífica, característica deste marcador para grande parte dos grupos animais (Greenstone et al., 2005; Bucklin et al., 2007; Smith et al., 2007; Jennings et al., 2010; Lowenstein et al., 2010) e essencial para uma identificação específica confiável. Porém existem outras vantagens do COI que reforçam a sua importância como *barcode* para estes grupos como: a padronização do seu sequenciamento (com o desenvolvimento de *primers* universais para a sua amplificação), a ausência de deleções e inserções (*indels*) em sua estrutura (o que poderia causar dificuldades de alinhamento entre espécies evolutivamente distantes), a limitada recombinação que este gene está sujeito (por ser de herança exclusivamente materna) e por possuir muitas cópias em uma mesma célula (o que otimiza a sua amplificação) (Bucklin et al., 2011).

A padronização do método de amplificação e sequenciamento do COI acabou por tornar a geração de sequências deste marcador mais simples e eficiente, com redução dos custos tanto financeiro como de tempo. Com isso, foi implantado em 2007 o *Barcode of Life Data System* (BOLD) (<http://www.boldsystems.org/>), um banco de dados de acesso público, criado com o objetivo de arquivar sequências de COI para todas as espécies conhecidas. O banco de dados cresceu ao longo dos últimos anos e oferece aos pesquisadores uma forma prática de coletar, gerir e analisar dados de DNA *Barcode* (Retnasingham & Hebert, 2007). Atualmente, existem mais de 3.000.000 sequências de DNA no banco de dados do BOLD. No Brasil foi criado o Br-BOL como consórcio brasileiro ligado ao BOLD para identificação molecular da biodiversidade brasileira (<http://www.brbol.org/pt-br>).

Porém o COI tem se mostrado problemático para alguns grupos animais. Dentre estes incluem-se os Filos Porifera e Ctenophora, além de Cnidários da Classe Anthozoa. Para estes grupos animais, a evolução do COI se mostrou lenta demais para permitir uma discriminação confiável entre espécies proximalmente aparentadas (Calderón et al., 2006). Além disso, de uma forma geral, o COI é conhecido por não apresentar um bom sinal filogenético em um espectro variado de níveis taxonômicos. Estudos demonstram sua utilidade em solucionar relações evolutivas entre espécies proximalmente aparentadas, mas perdendo a confiabilidade para níveis taxonômicos mais abrangentes quando utilizado sem dados complementares (Bucklin et al., 1999, 2003; Goetze, 2003).

A descoberta de grupos problemáticos tem levado cientistas a buscarem novos marcadores moleculares que possam servir como *barcode* em alternativa ao COI. Para poríferos, por exemplo, o COI parece ter evolução muito lenta, não permitindo a distinção entre diferentes espécies. Como alternativa tem se testado o I3-M11, que é uma região específica presente no COI, assim como o ITS (*Internal Transcribed Spacer*), que é parte não funcional do genoma nuclear (Erpenbeck et al., 2006; Park et al., 2007).

Outro banco de dados público de sequências de DNA é o GenBank, criado em 1982, como parte do *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*. Diferentemente do BOLD, o GenBank possui sequências em seu banco de dados de

outros marcadores moleculares que não o COI, possuindo atualmente um total de mais de 170.000.000 sequências arquivadas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Para a subclasse Copepoda, o COI tem sido utilizado como marcador molecular para identificação de espécies, inclusive com inúmeras descobertas de espécies crípticas (Goetze, 2003; Chen & Hare, 2008; Blanco-Bercial et al., 2011). Por auxiliar na identificação específica, a identificação molecular tem sido de grande importância para o desenvolvimento de estudos de diversidade, pois possibilita a identificação de organismos mesmo no estágio juvenil (copepoditos) e até mesmo a identificação de organismos ainda no estágio larval (Llinás 2008). Além disso, o COI também tem sido utilizado para estudos populacionais biogeográficos envolvendo a ordem Calanoida; com os padrões de diversidade intraespecífica, em alguns casos, evidenciando uma marcada estruturação populacional (Goetze, 2003; 2011).

Estes estudos têm demonstrando como este marcador possui taxa de evolução relativamente mais acelerada neste grupo animal, porém eles acabam ficando restritos à algumas famílias de Calanoida que possuem maior facilidade de amplificação deste marcador, como a família Calanidae por exemplo. E para outros estudos, que objetivaram testar o COI como *barcode* para Calanoida foi necessário o desenvolvimento de *primers* específicos para ampliação das espécies problemáticas (Blanco-Bercial et al., 2011; Prosser et al., 2013). As dificuldades de se trabalhar com o COI em estudos com Calanoida ainda são relativamente pouco documentadas na literatura. Recentemente, no ano de 2013, foi publicado um estudo que avaliou a sequência conjunta do ITS2 e 28S como *barcode* para Calanoida, em substituição ao COI (Hirai et al., 2013). Neste estudo, a eficiência de sequenciamento do ITS2-28S foi consideravelmente maior do que a do COI (79,5% e 31,6% respectivamente). Apesar de menor em relação ao COI, a diferença entre a distância intraespecífica e interespecífica também existe entre as sequências de ITS2-28S, o que demonstra que este marcador também pode ser utilizado para identificação molecular em nível específico. Porém estudos neste sentido estão em sua fase inicial, e mais testes devem ser realizados para, possivelmente, uma futura consolidação de um marcador molecular alternativo ao COI para identificação de espécies de Calanoida.

O marcador molecular nuclear *Internal Transcribed Spacer* (ITS) possui duas subunidades: ITS1 e ITS2. Elas se repetem em *tandem* ao longo do genoma,

possuindo muitas cópias, o que facilita sua amplificação, mesmo a partir de pequenas quantidades de tecido. Este pequeno trecho do genoma nuclear vem sendo utilizado com sucesso na identificação de plantas medicinais (Chen et al., 2010; Han et al., 2013), formigas (Pilgrim & Pitts, 2006), poríferos (Park et al., 2007), cnidários (Calderón et al., 2006), copépodes (Chu et al., 2001) e já foi utilizado, juntamente com outras sequências, para auxiliar na identificação de espécies proximamente aparentadas de calanoides marinhos (Chen & Hare, 2008; Goetze, 2010; Machida & Tsuda, 2010). Além disso, também já foi avaliada a sua utilidade para estudos filogenéticos com plantas (Schultz et al., 2005), Cnidários (Vollmer & Palumbi, 2004; Grajales et al., 2007) e calanoides (Marszalek et al., 2009). Foi constatado que, apesar de evoluir suficientemente rápido para permitir análises filogenéticas em nível de gênero e espécie (Wyngaard et al. 2010), este fragmento do genoma nuclear possui uma porção bem conservada que também permite análises em níveis mais abrangentes (Schultz et al., 2005; 2006).

1.2. Copepoda, Calanoida

Copépodes marinhos são pequenos crustáceos (0,2-12mm de comprimento), podendo apresentar hábito de vida pelágico, bento-pelágico ou bentônico. Sua distribuição vertical engloba desde as camadas superficiais de água, até profundidades abissais (Bradford-Grieve et al., 1999). São possivelmente o grupo animal mais abundante do planeta, podendo representar cerca de 80% e 90% da densidade total do zooplâncton marinho (Ramaiah & Nair, 1997).

Atualmente 10 ordens de Copepoda são reconhecidas: Platycopioidea, Calanoida, Misophrioida, Harpacticoida, Monstrilloidea, Mormonilloidea, Gelyelloidea, Cyclopoida, Siphonostomatoida e Poecilostomatoida (Ho, 1990).

Calanoida é a ordem mais abundante e diversa de Copepoda, sendo provavelmente a ordem animal mais abundante do mundo. É composta, em sua grande maioria, por animais epipelágicos. São sexualmente dimórficos e a fertilização ocorre por cópula, quando o macho transfere o espermatóforo para o somito genital da fêmea, onde ele fica estocado no receptáculo genital. Os ovos fertilizados ficam acoplados à fêmea, unidos por uma membrana externa, formando o saco ovífero. O desenvolvimento é

indireto, com o organismos passando por uma fase larval (nauplio) e até cinco fases juvenis (copepodito) (Huys & Boxshall, 1991).

Copépodes calanoides são extremamente bem sucedidos na colonização de ambientes tanto salinos, como salobros e de água doce (Huys & Boxshall, 1991). A distribuição horizontal e vertical destes organismos nos oceanos é ampla. Espécies cosmopolitas e bipolares são típicas de águas profundas. Espécies epipelágicas raramente são cosmopolitas, devido ao fato deste ambiente ser fortemente influenciado por mudanças climáticas e hidrográficas, dificultando a adaptação por imprimir aos organismos diferentes condições ambientais. Apesar disso, algumas espécies epipelágicas têm ampla distribuição geográfica. O hábitat dos calanóides pelágicos pode ser dividido nas seguintes zonas verticais: ambiente epipelágico (0-200m), ambiente mesopelágico (200-750m), ambiente batipelágico (750-3000m) e ambiente abissal (>3000m). Muitos copépodes realizam migração vertical, podendo ser encontrados em diferentes profundidades, em diferentes momentos do dia, do ano e do ciclo de vida (Ambler & Miller 1987).

Os copépodes possuem reconhecida importância ecológica. Este grupo de metazoários é responsável, por exemplo, pelo controle populacional do fitoplâncton; o que pode ocorrer tanto por predação direta, como por predação do microzooplâncton (protozoários, ciliados, tintinídeos, etc), que também se alimentam do fitoplâncton (Leising et al., 2005; Zervoudaki et al., 2007). Também são importantes por realizarem a transferência de energia para níveis tróficos superiores do ambiente pelágico. As diferentes espécies de copépodes preenchem nichos ecológicos de produtores primários, secundários e até terciários e são importante fonte de lipídeos para peixes por exemplo (Ratnayake & Ackman, 1979; Schukat et al., 2013). Os copépodes também realizam a ciclagem vertical de nutrientes através da termoclina devido à sua extensa migração vertical diária (Cushing, 1950; Ambler & Miller, 1987) e ao afundamento das pelotas fecais (Urrere & Knauer, 1981).

Além da citada importância ecológica, os copépodes também possuem importância científica. Por serem organismos de ciclo de vida curto e sensíveis aos padrões físico-químicos do ambiente, eles apresentam resposta populacional rápida às variações ambientais, representando com isso uma importante ferramenta para o diagnóstico e monitoramento de impactos ambientais (Veado & Resgalla 2005) e também de

mudanças climáticas globais (Beaugrand & Reid, 2003; Beaugrand, 2003; Richardson, 2008; Reygondeau & Beaugrand, 2011). Além disso, são utilizados também como ferramenta para diagnósticos hidrodinâmicos como eventos de ressurgência e reconhecimento de massas de água, por exemplo (Verheye & Field, 1992; Resgalla, 2011; Schukat et al., 2013;).

1.3. Filogenia de Calanoida

Análise filogenética com base em dados morfológicos das diferentes Ordens de Copepoda definiu a Ordem Calanoida como grupo irmão da Ordem Platycopioida (Ho, 1990), e estudos filogenéticos moleculares comprovaram a monofilia da ordem Calanoida (Blanco-Bercial et al., 2011). Acredita-se que os copépodes calanóides tiveram origem bentônica ou bentopelágica, evoluindo até se tornarem atualmente os colonizadores de maior sucesso no ambiente pelágico. A marcante conservação de formas e estruturas é característica na evolução destes organismos (Bradford-Grieve, 2002). Como resultado disto, as diferenças morfológicas e morfométricas que distinguem algumas espécies são muito sutis ou inexistentes (no caso das espécies crípticas) (Bucklin et al., 1995).

A organização taxonômica de Copepoda mais aceita hoje em dia é a estabelecida por Andronov (1974) e modificada por Fosshagen e Liffé (1985) e Park (1984), tendo como base os caracteres morfológicos. Porém, nosso entendimento da história evolutiva destes organismos é bastante limitado pela ausência de registro fóssil e pelos efeitos complexos da variação ambiental através da história geológica dos oceanos. A filogenia com base em caracteres moleculares se apresenta então como uma ferramenta de complementação da informação morfológica para dar maior embasamento e precisão na inferência de parentesco evolutivo entre as espécies. Alguns estudos têm sido realizados utilizando genes nucleares e mitocondriais para estabelecer as relações evolutivas de calanóides em diversos níveis taxonômicos. Genes de evolução mais acelerada como o COI têm se mostrado úteis para análises entre espécies proximamente aparentadas (Bucklin et al., 1999; Machida et al., 2005; Costa et al., 2011), enquanto genes de evolução mais lenta como os nucleares têm sido utilizados para análises em níveis taxonômicos mais abrangentes, pois sua informação não se satura tão rapidamente devido às múltiplas substituições em um

determinado sítio molecular (Bucklin et al., 2003; Hirai et al., 2013). Porém, para se ter resultados mais confiáveis acerca das relações evolutivas entre as espécies deste grupo é indicado a utilização de ambos os tipos de marcadores moleculares (Cummings et al., 1995, Braga et al., 1999). As relações evolutivas entre as espécies desta ordem têm sido concordantes com o que se havia estabelecido com base nos dados morfológicos, com algumas exceções, principalmente nas relações entre Superfamílias (Bucklin et al., 2003; Blanco-bercial et al., 2011; Hirai et al., 2013).

2. HIPÓTESE

O ITS1 e o ITS2 são marcadores moleculares mais indicados do que o COI para a geração de *barcode* para Copepoda, Calanoida.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar se o ITS1 e o ITS2 são marcadores moleculares indicados para a geração de *barcode* para Copepoda Calanoida e construir a filogenia do grupo com base nas sequências concatenadas de ITS1-ITS2-COI.

3.2. Objetivos específicos

1 - Gerar sequências moleculares de ITS1, ITS2 e COI de copépodes calanóides do Atlântico Ocidental.

2 - Avaliar a taxa de sucesso de amplificação e sequenciamento do ITS1, ITS2 de copépodes calanóides e comparar com as do COI para o mesmo grupo animal.

3 - Analisar o hiato entre a maior distância intraespecífica e a menor distância interespecífica do ITS1 e do ITS2 em copépodes calanoides para aferir sua eficácia para identificação de espécies deste grupo animal.

4 - Construir filogenia da ordem Calanodia com base em marcadores moleculares com taxa de evolução diferentes (COI, ITS1 e ITS2).

4. REFERÊNCIAS

Ambler, J. W., & Miller, C. B. (1987). Vertical habitat-partitioning by copepodites and adults of subtropical oceanic copepods. *Marine Biology*, 94/4: 561–77. DOI: 10.1007/BF00431403

Andronov, N. V. (1974). Phylogenetic relations of large taxa within the suborder Calanoida (Crustacea, Copepoda). *Zoologicheskyy Zhurnal*, 53: 1002–12.

Arnason, U., Spilliaert, R., Pálsdóttir, A., & Arnason, A. (1991). Molecular identification of hybrids between the two largest whale species, the blue whale (*Balaenoptera musculus*) and the fin whale (*B. physalus*). *Hereditas*, 115/2: 183–9.

Beaugrand, G. (2003). Long-term changes in copepod abundance and diversity in the north-east Atlantic in relation to fluctuations in the hydroclimatic environment. *Fisheries Oceanography*, 12/4: 270–83.

Beaugrand, G., & Reid, P. C. (2003). Long-term changes in phytoplankton, zooplankton and salmon related to climate. *Global Change Biology*, 9: 801–17.

Blanco-Bercial, L., Álvarez-Marqués, F., & Bucklin, A. (2011). Comparative phylogeography and connectivity of sibling species of the marine copepod *Clausocalanus* (Calanoida). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 404/6: 108–15. Elsevier B.V. DOI: 10.1016/j.jembe.2011.05.011

Blanco-Bercial, L., Bradford-Grieve, J., & Bucklin, A. (2011). Molecular phylogeny of the Calanoida (Crustacea: Copepoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59/1: 103–13. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/j.ympev.2011.01.008

Bradford-Grieve, J. M. (2002). Colonization of pelagic realm by calanoid copepods. *Hydrobiologia*, 485: 223–44.

Bradford-Grieve, J. M., Markhaseva, E. L., Rocha, C. E. F., & Abiahy, B. (1999). Copepoda. *South Atlantic Zooplankton*, pp. 869–1098.

Braga, E., Zardoya, R., Meyer, a., & Yen, J. (1999). Mitochondrial and nuclear rRNA based copepod phylogeny with emphasis on the Euchaetidae (Calanoida). *Marine Biology*, 133/1: 79–90. DOI: 10.1007/s002270050445

Bucklin, a., Wiebe, P. H., Smolenack, S. B., Copley, N. J., Beaudet, J. G., Bonner, K. G., Farber-Lorda, J., et al. (2007). DNA barcodes for species identification of

euphausiids (Euphausiacea, Crustacea). *Journal of Plankton Research*, 29/6: 483–93. DOI: 10.1093/plankt/fbm031

Bucklin, A., Frost, B. W., Bradford-Grieve, J., Allen, L. D., & Copley, N. J. (2003). Molecular systematic and phylogenetic assessment of 34 calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae. *Marine Biology*, 142: 333–43. DOI: 10.1007/s00227-002-0943-1

Bucklin, A., Frost, B. W., & Kocher, T. D. (1995). Molecular systematics of six *Calanus* and three *Metridia* species (Calanoida : Copepoda). *Marine Biology*, 121: 655–64.

Bucklin, A., Guarnieri, M., Hill, R. S., Bentley, A. M., & Kaartvedt, S. (1999). Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive , species-specific PCR. *Hydrobiologia*, 401: 239–54.

Bucklin, A., Steinke, D., & Blanco-Bercial, L. (2011). DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Annual Review of Marine Science*, 3: 471–508. DOI: 10.1146/annurev-marine-120308-080950

Calderón, I., Garrabou, J., & Aurelle, D. (2006). Evaluation of the utility of COI and ITS markers as tools for population genetic studies of temperate gorgonians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 336: 184–97. DOI: 10.1016/j.jembe.2006.05.006

Chen, G., & Hare, M. P. (2008). Cryptic ecological diversification of a planktonic estuarine copepod, *Acartia tonsa*. *Molecular ecology*, 17: 1451–68. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03657.x

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., et al. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS one*, 5/1: 1–8. DOI: 10.1371/journal.pone.0008613

Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa, T., & Kato, S. (1990). Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat science*, 27/2: 119–28. DOI: 10.1016/0309-1740(90)90060-J

Chu, K. H., Li, C. P., & Ho, H. Y. (2001). The first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in crustacea. *Marine biotechnology*, 3: 355–61. DOI: 10.1007/s10126001-0014-5

Costa, K. G., Vallinoto, M., & Costa, R. M. (2011). Molecular identification of a new cryptic species of *Acartia tonsa* (Copepoda , Acartiidae) from the Northern coast of Brazil , based on mitochondrial COI gene sequences. *Journal of Coastal Research*, 64: 359–63.

Cummings, M. P., Otto, S. P., & Wakeley, J. (1995). Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Molecular biology and evolution*, 12/5: 814–22.

Cushing, B. D. H. (1950). THE VERTICAL MIGRATION OF PLANKTONIC CRUSTACEA. *Fisheries Laboratory, Lowestoft*, 1828: 158–92.

Erpenbeck, D., Hooper, J. N. a., & Worheide, G. (2006). CO1 phylogenies in diploblasts and the “Barcoding of Life” - are we sequencing a suboptimal partition? *Molecular Ecology Notes*, 6/2: 550–3. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01259.x

Fosshagen, A., & Liffé, T. M. (1985). Two new genera of Calanoida and a new order of Copepoda from the marine caves of Bermuda. *Sarsia*, 70: 345–58.

Goetze, E. (2003). Cryptic speciation on the high seas; global phylogenetics of the copepod family Eucalanidae. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270/11: 2321–31. DOI: 10.1098/rspb.2003.2505

———. (2010). Species discovery in marine planktonic invertebrates through global molecular screening. *Molecular ecology*, 19: 952–67. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04520.x

———. (2011). Population differentiation in the open sea: insights from the pelagic copepod *Pleuromamma xiphias*. *Integrative and comparative biology*, 51/4: 580–97. DOI: 10.1093/icb/icr104

Grajales, A., Aguilar, C., & Sánchez, J. a. (2007). Phylogenetic reconstruction using secondary structures of Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2, rDNA): finding the molecular and morphological gap in Caribbean gorgonian corals. *BMC evolutionary biology*, 90/7: 1–9. DOI: 10.1186/1471-2148-7-90

Greenstone, M. H., Rowley, D. L., Heimbach, U., Lundgren, J. G., Pfannenstiel, R. S., & Rehner, S. a. (2005). Barcoding generalist predators by polymerase chain reaction: carabids and spiders. *Molecular ecology*, 14/10: 3247–66. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02628.x

Han, J., Zhu, Y., Chen, X., Liao, B., Yao, H., Song, J., Chen, S., et al. (2013). The short ITS2 sequence serves as an efficient taxonomic sequence tag in comparison with the full-length ITS. *BioMed research international*, 1–7. DOI: 10.1155/2013/741476

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of The Royal Society B*, 270/2: 313–21. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218

Hirai, J., Shimode, S., & Tsuda, A. (2013). Evaluation of ITS2-28S as a molecular marker for identification of calanoid copepods in the subtropical western North Pacific. *Journal of Plankton Research*, 0/0: 1–13. DOI: 10.1093/plankt/fbt016

Ho, J. (1990). Phylogenetic Analysis of Copepod Orders. *Journal of Crustacean Biology*, 10/3: 528–36.

Huys, R., & Boxshall, G. A. (1991). *Copepod Evolution*, Vol. 12, p. 468. DOI: 10.2307/1548852

- Jennings, R. M., Bucklin, A., & Pierrot-Bults, A. (2010). Barcoding of arrow worms (Phylum Chaetognatha) from three oceans: genetic diversity and evolution within an enigmatic phylum. *PloS one*, 5/4: e9949. DOI: 10.1371/journal.pone.0009949
- Leising, A. W., Pierson, J. J., Halsband-Lenk, C., Horner, R., & Postel, J. (2005). Copepod grazing during spring blooms: Can *Pseudocalanus newmani* induce trophic cascades? *Progress in Oceanography*, 67: 406–21. DOI: 10.1016/j.pocean.2005.09.009
- Llinás, L. (2008). *Distribution , Reproduction , and Transport of Zooplankton in the Western Arctic*.
- Lowenstein, J. H., Burger, J., Jeitner, C. W., Amato, G., Kolokotronis, S.-O., & Gochfeld, M. (2010). DNA barcodes reveal species-specific mercury levels in tuna sushi that pose a health risk to consumers. *Biology letters*, 6/5: 692–5. DOI: 10.1098/rsbl.2010.0156
- Machida, R. J., Miya, M. U., Nishida, M., & Nishida, S. (2005). Molecular phylogeny and evolution of the pelagic copepod genus *Neocalanus* (Crustacea: Copepoda). *Marine Biology*, 148/10: 1071–9. DOI: 10.1007/s00227-005-0140-0
- Machida, R. J., & Tsuda, A. (2010). Dissimilarity of species and forms of planktonic *Neocalanus* copepods using mitochondrial COI, 12S, nuclear ITS, and 28S gene sequences. *PloS one*, 5/4: 1–6. DOI: 10.1371/journal.pone.0010278
- Marszalek, M. a., Dayanandan, S., & Maly, E. J. (2009). Phylogeny of the genus *Hesperodiaptomus* (Copepoda) based on nucleotide sequence data of the nuclear ribosomal gene. *Hydrobiologia*, 624/1: 61–9. DOI: 10.1007/s10750-008-9666-8
- Park, M.-H., Sim, C.-J., Baek, J., & Min, G.-S. (2007). Identification of genes suitable for DNA barcoding of morphologically indistinguishable Korean Halichondriidae sponges. *Molecules and cells*, 23/2: 220–7.
- Park, T. (1984). Phylogeny of calanoid copepods. *Syllogeus*, 58: 191–6.
- Pilgrim, E. M., & Pitts, J. P. (2006). A Molecular Method for Associating the Dimorphic Sexes of Velvet Ants (Hymenoptera : Mutillidae). *Journal of the kansas entomological society*, 79/3: 222–30.
- Prosser, S., Martínez-Arce, A., & Elías-Gutiérrez, M. (2013). A new set of *primers* for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular ecology resources*, 13/6: 1–5. DOI: 10.1111/1755-0998.12132
- Ramaiah, N., & Nair, V. R. (1997). Distribution and abundance of copepods in the pollution gradient zones of Bombay Harbour-Thana creek-Bassein creek, west coast of India. *Indian Journal of Marine Science*, 26: 20–5.

- Ratnayake, W. N., & Ackman, R. G. (1979). Fatty alcohols in capelin, herring and mackerel oils and muscle lipids: I. Fatty alcohol details linking dietary copepod fat with certain fish depot fats. *Lipids*, 14/9: 795–803.
- Resgalla, C. (2011). The holoplankton of the Santa Catarina coast, southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 83/2: 575–88.
- Retnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7: 355–64.
- Reygondeau, G., & Beaugrand, G. (2011). Future climate-driven shifts in distribution of *Calanus finmarchicus*. *Global Change Biology*, 17/2: 756–66. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2010.02310.x
- Richardson, a. J. (2008). In hot water: zooplankton and climate change. *ICES Journal of Marine Science*, 65/3: 279–95. DOI: 10.1093/icesjms/fsn028
- Schukat, A., Auel, H., Teuber, L., Lahajnar, N., & Hagen, W. (2013). Complex trophic interactions of calanoid copepods in the Benguela upwelling system. *Journal of Sea Research*, 1–11. Elsevier B.V. DOI: 10.1016/j.seares.2013.04.018
- Schultz, J., Maisel, S., Gerlach, D., Müller, T., & Wolf, M. (2005). A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA Society*, 11: 361–4. DOI: 10.1261/rna.7204505.The
- Schultz, J., Müller, T., Achtziger, M., Seibel, P. N., Dandekar, T., & Wolf, M. (2006). The internal transcribed spacer 2 database--a web server for (not only) low level phylogenetic analyses. *Nucleic acids research*, 34: 1–4. DOI: 10.1093/nar/gkl129
- Smith, M. A., Wood, D. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W., & Hebert, P. D. N. (2007). DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104/12: 4967–72. DOI: 10.1073/pnas.0700050104
- Urrere, M. A., & Knauer, G. A. (1981). Zooplankton fecal pellet fluxes and vertical transport of particulate organic material in the pelagic environment. *Journal of Plankton Research*, 3/3: 369–87.
- Veado, L. D., & Resgalla, J. C. (2005). Alteração da comunidade zooplanctônica do saco dos limões após impacto das obras da via expressa sul - Baía sul da ilha de Santa Catarina. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 9/2: 65–73.
- Verheye, H. M., & Field, J. G. (1992). Vertical distribution and diel vertical migration of *Calanoides carinatus* (Kroyer , 1849) developmental stages in the southern Benguela upwelling region. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 158: 123–40.

Vollmer, S. V, & Palumbi, S. R. (2004). Testing the utility of internally transcribed spacer sequences in coral phylogenetics. *Molecular ecology*, 13/9: 2763–72. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2004.02265.x

Wyngaard, G. a, Hołyńska, M., & Schulte, J. a. (2010). Phylogeny of the freshwater copepod *Mesocyclops* (Crustacea: Cyclopidae) based on combined molecular and morphological data, with notes on biogeography. *Molecular phylogenetics and evolution*, 55/3: 753–64. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.02.029

Zervoudaki, S., Christou, E. D., Nielsen, T. G., Siokou-Frangou, I., Assimakopoulou, G., Giannakourou, a., Maar, M., et al. (2007). The importance of small-sized copepods in a frontal area of the Aegean Sea. *Journal of Plankton Research*, 29/4: 317–38. DOI: 10.1093/plankt/fbm018

ITS2 como *barcode* para Calanoida (CRUSTACEA, COPEPODA) marinhos e como marcador complementar para filogenia do grupo.

RESUMO

Calanoida é a ordem de Copepoda mais abundante do planeta, possuindo reconhecida importância ecológica e científica. Porém a acurada identificação taxonômica morfológica deste grupo de animais não é simples, requerendo um elevado grau de treinamento, principalmente quando se trabalha com animais em estágio larval e juvenil. A identificação molecular por meio de *barcode* se apresenta como uma alternativa para auxiliar na identificação específica destes organismos. O marcador mitocondrial *Cytocromo Oxidase I* (COI) é tido como padrão para identificação molecular de boa parte dos grupos animais, mas não se mostra tão eficiente para calanóides. Este estudo teve como objetivo testar as duas subunidades do marcador molecular nuclear *Internal Transcribed Spacer* (ITS1 e ITS2) como *barcode* para este grupo animal. Foram sequenciados o ITS1, ITS2 e COI de 105 indivíduos representando 14 famílias de Calanoida. As taxas de eficiência de sequenciamento dos marcadores nucleares foram bem superiores as do COI (98%, 91% e 34%, respectivamente). Além disso, foi observado um hiato entre as distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas nos marcadores moleculares nucleares que permitiram o agrupamento em, clados monofiléticos, de 100% das sequências dos indivíduos amostrados com as demais de sua mesma espécie para o ITS2 e com apenas *Pleuramma xiphias* como exceção para o ITS1. A filogenia do grupo, gerada com base nas sequências concatenadas de ITS1-ITS2-COI, se mostrou congruente com o que já se tem estabelecido em relação às relações evolutivas do grupo. Apesar da necessidade de estudos adicionais para confirmar os padrões aqui encontrados, podemos concluir que tanto o ITS1 como o ITS2 são marcadores moleculares de fácil sequenciamento para Calanoida e que o ITS2 possui variação genética suficiente para ser utilizados para geração de *barcode* para calanóides marinhos.

Palavras chave: *Barcoding*, COI, ITS1, ITS2, Zooplâncton, Atlântico Ocidental

ABSTRACT

Calanoida is the most abundant copepod Order in the world, having recognized ecological and scientific importance. But the accurate morphological taxonomic identification of this animal group is not simple, requiring years of experience and practice, especially when working with specimens in larval and juvenile stages. Thereat, molecular identification through DNA barcode is an important tool for assistance the identification of these organisms on the species taxonomic level. The mitochondrial marker Cytocromo Oxydase I (COI) is considered standard for molecular identification of most animal groups, but it doesn't seem as efficient for calanoid copepods. This study aimed to test the two subunits of the nuclear molecular marker Internal Transcribed Spacer (ITS1 and ITS2) as a barcode for this animal group. We tried to sequence ITS1, ITS2 and COI from 105 individuals representing 14 families of Calanoida. Sequencing success rates of nuclear markers were much higher than those from COI (98%, 91% and 34%, respectively). In addition, it was found a gap between intraspecific and interspecific genetic distances for the nuclear molecular markers that allow grouping 100% of the sampled individual's sequences with other individuals' from the same species in monophyletic clades for ITS2 and with one exception for ITS1. Phylogeny of Calanoida, based on ITS1-ITS2-COI concatenated sequences, proved to be congruent with what has already been established in relation to the evolutionary relationships of species in the group. Despite the need for additional studies to confirm the patterns found here, we can conclude, based in our results, that both ITS1 and ITS2 are molecular markers that are easy sequenced and have enough variation to be used for DNA barcoding of marine calanoids.

Key words: Barcoding, COI, ITS1, ITS2, Zooplankton, Western Atlantic

INTRODUÇÃO

Calanoida é a ordem de Copepoda mais abundante do planeta. Trata-se de um grupo de organismos extremamente diverso, com cerca de 1800 espécies marinhas reconhecidas (Bradford-Grieve et al., 1999). Este grupo de metazoários possui reconhecida importância ecológica. São responsáveis pelo controle populacional do fitoplâncton (Leising et al., 2005; Zervoudaki et al., 2007), pela transferência de energia para níveis tróficos superiores (Ratnayake & Ackman, 1979; Schukat et al., 2013), além de realizarem a ciclagem vertical de nutrientes através da termoclina devido à migração vertical (Cushing, 1950) e ao afundamento das pelotas fecais (Urrere & Knauer, 1981). Por serem organismos sensíveis e de resposta rápida às variações ambientais, são também importantes ferramentas para o monitoramento de impactos ambientais (Veado & Resgalla, 2005) e de mudanças climáticas globais (Beaugrand, 2003; Beaugrand & Reid, 2003; Richardson, 2008; Reygondeau & Beaugrand, 2011). Além disso, são utilizados como ferramenta para diagnósticos hidrodinâmicos, como eventos de ressurgência (Verheye & Field, 1992; Lopes et al., 1999; Schukat et al., 2013).

Para se realizar um estudo científico é necessária uma identificação confiável do organismo alvo em níveis taxonômicos específicos. Desta forma se possibilita uma interpretação correta dos padrões populacionais e das respostas das espécies aos padrões físico-químicos do ambiente (Chen & Hare, 2008).

A identificação taxonômica morfológica de Copepoda não é simples, requerendo um elevado grau de treinamento. Organismos em estágios larvais e juvenis podem ser extremamente complicados de se identificar ao nível de espécie. Além disso, tem-se identificado muitas espécies crípticas dentro do grupo, mostrando que muitas vezes a especiação em Copepoda pode ocorrer sem estar necessariamente associada a uma alteração morfológica (Goetze 2003, 2010; Machida & Tsuda, 2010; Blanco-Bercial et al., 2011). A identificação molecular é uma ferramenta importante neste cenário, pois possibilita uma identificação confiável de organismos em qualquer estágio de vida; além do reconhecimento de espécies crípticas. E com a padronização da metodologia,

o processo vem se tornando cada vez mais eficiente (Shokralla et al., 2012; Lindeque et al., 2013).

O *Barcode of Life Data System* (BOLD) é uma iniciativa mundial para criação de um banco de dados genético para todas as espécies conhecidas a partir de um fragmento curto de DNA. A variação genética deste fragmento deve possibilitar a identificação confiável de diferentes espécies. Esta técnica ficou conhecida como *DNA Barcoding*. No Brasil foi criado *Brazilian Barcode of Life* (Br-BOL), como o consórcio brasileiro ligado ao BOLD.

O gene mitocondrial *Cytocromo Oxidase I* (COI) se estabeleceu como marcador molecular para geração de *barcode*. O desenvolvimento de *primers* universais e a diferença na distância genética intra e interespecífica, sem sobreposições, elevaram o status deste como o marcador molecular padrão para identificação de espécies animais (Hebert et al., 2003).

Porém, existem problemas na utilização de genes mitocondriais como marcadores moleculares para identificação taxonômica e geração de *barcode*. O sequenciamento acidental de pseudogenes (sequência de DNA homóloga à mitocondrial, mas integrada ao genoma nuclear) pode levar à identificação errônea de um determinado organismo (Bucklin et al., 1999; Buhay, 2009). Além disso, estudos recentes demonstram que para uma série de grupos animais, apesar do COI apresentar uma boa resolução para a identificação em nível de espécie, este marcador apresenta grande dificuldade de amplificação, inclusive para grupos zooplanctônicos (Bucklin et al., 2010). Um exemplo disso é a Subclasse Copepoda, principalmente a ordem Calanoida (Böttger-Schnack & Machida, 2011; Hirai et al., 2013). A rápida taxa de evolução do COI em Calanoida torna difícil a utilização de *primers* universais para amplificação do gene mitocondrial para este grupo, se fazendo necessária a busca por um marcador molecular alternativo para geração de *barcode* para este grupo animal.

A região do genoma nuclear ribossomal conhecida como *Internal Transcribed Spacer* (ITS) é dividida em ITS1 e ITS2. Estes marcadores moleculares nucleares vêm sendo testados como *barcode* para muitos grupos de organismos que apresentam problemas de amplificação para o COI (Chen et al., 2010). Também foi demonstrada a utilidade do ITS1 e do ITS2 em estudos filogenéticos por apresentarem regiões bem

conservadas, mesmo em organismos filogeneticamente distantes (Chu et al., 2001; Schultz et al., 2005). Alguns trabalhos demonstram que esta região do genoma nuclear contém informação que pode ser utilizada, com sucesso, para distinção de diferentes espécies de Copepoda (Machida & Tsuda, 2010). O trabalho mais recente que busca uma alternativa ao COI para identificação de Calanoida avaliou a utilização do ITS2-28S para estes fins; comparando os resultados obtidos a partir dele com os obtidos pelo COI (Hirai et al., 2013).

Os objetivos deste trabalho são: avaliar a utilidade do ITS1 e do ITS2 como regiões moleculares diagnósticas para a identificação de copépodes calanóides marinhos, comparar os resultados obtidos com estes marcadores com os obtidos utilizando-se o COI, e construir a filogenia da ordem Calanoida tendo como base a sequência concatenada do COI, ITS1 e ITS2.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e triagem

Amostras de zooplâncton foram coletadas no Embaiamento de Tubarão, na a Cadeia Vitória-Trindade e sobre a Elevação de Rio Grande (Fig. 1) em três campanhas distintas em 2011. Todas as coletas foram realizadas utilizando os navios NOc. Antares e NHO Cruzeiro do Sul, pertencentes ao Grupamento de Navios Hidroceanográficos – GNHO da Diretoria de Hidrografia e Navegação – DHN (Marinha do Brasil).

A amostragem foi realizada utilizando uma rede de plâncton cilindro-cônica com 3 m de comprimento, abertura de 1 m de diâmetro e malha de 200 μ m equipada com um fluxômetro mecânico (General Oceanics 2030R). Foi utilizado um lastro para manter o conjunto submerso, sendo feito um arrasto vertical até a superfície a uma velocidade de 1m^{-s}. Todas as amostras foram imediatamente fixadas em álcool 99%.

Foram selecionadas um total de 11 amostras para triagem de Calanoida. Destas amostras, três foram coletadas na região do Embaiamento de Tubarão, seis ao longo da Cadeia Vitória-Trindade e duas sobre a Elevação de Rio Grande (Tabela I). Os

copépodos foram triados, em estereomicroscópio, sendo obtido um total de 108 indivíduos adultos, representando 21 espécies de Copepoda, sendo 20 pertencentes à Ordem Calanoida e 1 à Ordem Poecilostomatida (que foi utilizado como grupo externo nas análises filogenéticas). Depois de triados os organismos foram mantidos em álcool absoluto. A identificação em nível específico dos copépodos foi realizada com base em literatura especializada (Bjornberg, 1981; Hernández & Morales, 1994; Bradford-Grieve et al., 1999; Dias & Araújo, 2006).

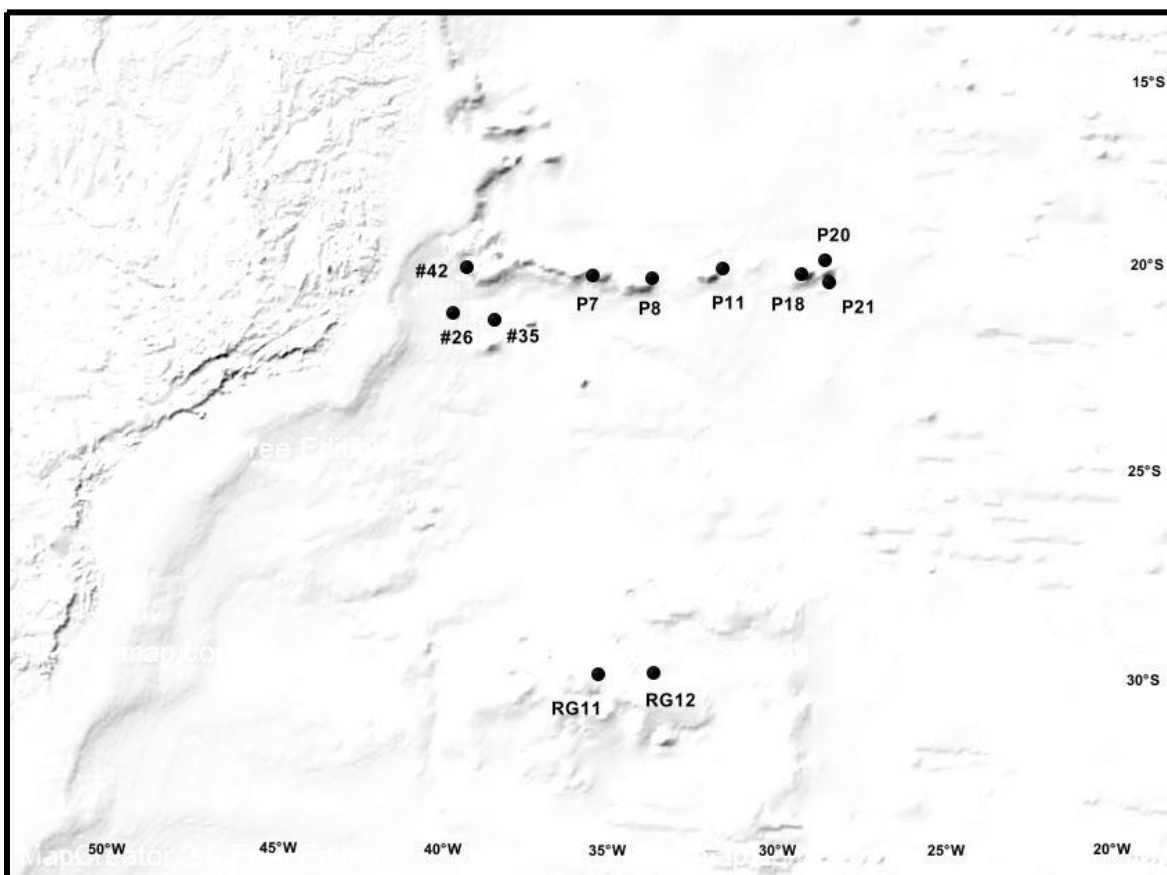


Figura 1. Mapa amostral da área de estudo. Os pontos pretos mostram a localização de cada ponto amostral. Informações das legendas estão na Tabela I. °

Tabela I: Informações das coletas

Região amostrada	Ponto amostral	Data de coleta	Latitude	Longitude	Profundidade
Cadeia Vitória-Trindade	P7	01/12/2011	20°40'76"s	034°45'95"o	56
	P8	01/12/2011	20°58'38"s	34°05'52"o	180
	P11	02/12/2011	20°45'43"s	031°50'73"o	80
	P18	04/12/2011	20°25'77"s	28°54'25"o	200
	P20	05/12/2011	20°28'72"s	028°49'11"o	200
	P21	05/12/2011	20°30'00"s	028°47'81"o	200
Embaimento de Tubarão	#26	14/12/2011	21°24'28"s	38°39'74"o	500
	#35	19/12/2011	21°22'09"s	37°11'02"o	1000
	#42	18/12/2011	20°37'96"s	38°23'63"o	500
Elevação de Rio Grande	RG11	15/11/2011	30°66'98"s	35°08'67"o	1124
	RG12	15/11/2011	30°67'15"s	33°08'67"o	1149

Extração de DNA, PCR e sequenciamento

Foi realizada extração do DNA de todos os 108 indivíduos utilizando kit de extração para reação direta de PCR “*Thermo Scientific Phire Animal Tissue Direct PCR Kit*” (Chum et al., 2012).

Após extração, o DNA foi amplificado através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Utilizou-se os *primers* universais para amplificação do mtCOI: LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (5'-TAAACTTCA GGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994). Para amplificação do ITS1 utilizou-se os *primers* F1665-18S (5'-CCGTCGCTACTACCGATTGAACG-3') e R73-5.8S (5'-GTGTCGATGTTTCATGTGTCCTGC-3'), e para amplificação do ITS2 utilizou-se os *primers*: F26-5.8S (5'-CTATACAGTGGATCATTGGCTC-3') e R52-28S (5'-TGGCCTGTTCCCGTTTCATTCGC-3') (Nonomura et al., 2008).

Todos os PCRs foram feitos com controle negativo e o protocolo foi realizado como segue: denaturação inicial de 5 minutos, 35 ciclos de denaturação por 5 segundos a 98°, anelamento de 5 segundos a 45° para o COI e 50° para o ITS1 e ITS2 e extensão por 20 segundos a 72° e por fim a extensão final de 1 minuto a 72°. Para o COI foram testados diferentes parâmetros e metodologias, como alteração da temperatura de anelamento e nas concentração dos reagentes, sendo a acima citada, a metodologia de maior eficiência.

O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1% e quantificado utilizando Low Mass Ladder. A purificação do produto de PCR foi realizada utilizando Polietilenoglicol 20% (PEG) e posteriormente enviado para sequenciamento na Macrogen, Coréia do Sul.

Análises moleculares: distância genética

Foram geradas sequências consenso utilizando as leituras dos *primers forward* e *reverse* para cada indivíduo utilizando o programa ChromasPro, versão 1.7.5 (Technelysium Pty Ltd, 2013). A edição das sequências de todos os marcadores foi realizada no programa Mega 6 (Tamura et al., 2013), bem como o alinhamento das sequências de COI utilizando o método de Clustal W. A autenticidade das sequências do marcador mitocondrial foi aferida após realização de BLAST de cada uma delas, com eliminação das que apresentaram identidade menor do que 95%. O alinhamento das sequências de ITS1 e ITS2 foi realizado no MAFFT versão 7 (Kato 2013), mais indicado para sequências que apresentam muitas deleções e inserções. Foi utilizado o modo automático para escolha do método para alinhamentos múltiplos.

A distância genética intra e interespecífica foi calculada para cada um dos marcadores moleculares utilizando o modelo evolutivo de 2 Parâmetros de Kimura com *Pairwise deletion* e 1000 replicações de *bootstrap* (Mega 6).

Distinção entre espécies com base nos *indels* - nova metodologia

Uma nova metodologia foi testada para utilização do ITS1 e do ITS2 como *barcode* para Calanoida. O objetivo era testar se, apenas com base nos *indels* (inserções e deleções), representados no alinhamento por espaços em branco, seria possível obter uma distinção entre diferentes grupos taxonômicos. Como o MEGA versão 6 não possui nenhuma ferramenta para que se leve em conta apenas a posição dos espaços em branco e não as substituições, com finalidade de cálculo de distância genética, uma nova abordagem teve que ser desenvolvida. Foi realizada substituição de todas as bases nitrogenadas por “G”, e todos os espaços em branco por “A”. A escolha de duas bases nitrogenadas púricas foi baseada no equilíbrio (mesmo peso) no cálculo de

distância genética. Este cálculo de distância genética intraespecífica e interespecífica foi realizado utilizando o modelo evolutivo de 2 Parâmetros de Kimura com *Pairwise deletion* e 1000 replicações de *bootstrap*.

Análises moleculares: filogenia

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando os métodos de *Neighbor-Joining*, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana (MEGA 6, ATGC: PhyML e MrBayes). Também foram construídas árvores filogenéticas das superfamílias de Calanoida presentes no estudo a fim de se esclarecer os parentescos evolutivos dentro de cada uma delas.

A análise de *Neighbor-Joining* foi realizada tendo como base cada um dos três marcadores moleculares de forma separada, para posterior comparação dos resultados com o que se tem estabelecido como filogenia de calanóides. Também foi realizada análise de *Neighbor-Joining* tendo como base a sequência concatenada do ITS1-ITS2-COI. Também foi obtida uma árvore filogenética pelo método de *Neighbor-Joining* para *Lucicutia flavicornis*, que apresentou diversidade intraespecífica relativamente alta. Para todos os casos foi utilizado o modelo evolutivo de 2 Parâmetros de Kimura com *Pairwise deletion* e 1000 replicações de *bootstrap*.

As análises de Máxima Verossimilhança e de Inferência Bayesiana foram realizadas tendo como base os três marcadores concatenados. Primeiramente foram analisadas, de forma separada, cada uma das superfamílias que tiveram mais de três espécies sequenciadas. Depois a análise foi realizada para todas as espécies de Calanoida presentes no estudo. A análise de Máxima Verossimilhança foi realizada utilizando o programa online ATGC: PhyML (Guindon et al. 2010). Já a Inferência Bayesiana foi realizada utilizando o software MrBayes v 3. 2. 2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Foi rodada a *Markov Chain Monte Carlo Chains* até que o desvio padrão entre as árvores fosse menor do que 0,01. O modelo evolutivo utilizado para as análises filogenéticas de Clausocalanoidea (*Calanoides carinatus* como grupo externo) e Centropagoidea (*Scolecithrix danae* como grupo externo) foi GRT + G; já para Megacalanoida (*Clausocalanus arcuicornis* como grupo externo), Augaptiloidea (*Neocalanus robustior* como grupo externo) e para Calanoida (*Corycaeus flaccus* como grupo externo) foi

GTR + I + G. Os modelos evolutivos foram gerados utilizando o software JModel Test (Posada, 2008). As árvores filogenéticas geradas com base em dados moleculares foram então comparadas com as informações sobre a filogenia do grupo baseada nos caracteres morfológicos disponíveis na literatura.

RESULTADOS

Taxa de sucesso de cada marcador molecular (COI, ITS1 e ITS2)

Os 105 copépodes Calanoidea, analisados no presente estudo, representam cinco Superfamílias, contendo: 14 Famílias, 17 gêneros e 20 espécies morfológicas (Tabela II). A taxa de sucesso de amplificação do COI foi espécie-específica, com espécies que amplificaram com muita facilidade e outras que não amplificaram nem mesmo com a utilização de diferentes parâmetros e metodologias. Foi obtida uma boa amplificação do COI para todos os indivíduos analisados de apenas sete espécies. Nenhum indivíduo foi amplificado com sucesso para este marcador para oito outras espécies (Tabela II). Foram detectados problemas de contaminação pela visualização do produto de PCR em gel de agarose, onde por muitas vezes foi constatada bandas de tamanho equivalente à do COI no controle negativo (Fig. 2). Ao todo, foram geradas 36 sequências de COI com tamanho aproximado de 670pb, o que representa uma taxa de eficiência de sequenciamento de 34,28% do total de indivíduos que tiveram o DNA extraído. Dentre estas, não foram encontrados *indels* e nem códons de parada, o que indica que não se tratavam de pseudogenes. Para o ITS1, todas as espécies tiveram todos os indivíduos amplificados com sucesso. Foram geradas um total de 103 sequências com aproximadamente 590pb, tendo, portanto, uma taxa de eficiência de sequenciamento de 98,09% do total de indivíduos que tiveram o DNA extraído (Tabela II). Já para o ITS2, apenas *Candacia pachydactyla* não teve uma taxa de sucesso de amplificação de 100%; dentre sete indivíduos, apenas um não foi amplificado para esta espécie. Foram geradas um total de 96 sequências com tamanho aproximado de 440pb, tendo, portanto, uma taxa de eficiência de sequenciamento de 91,42% do total de indivíduos que tiveram o DNA extraído (Tabela II).

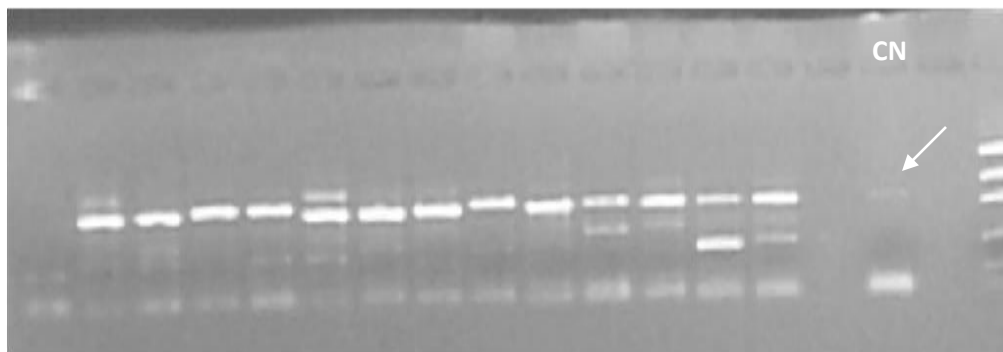


Figura 2. Imagem de gel de agarose, iluminado por luz UV, para visualização de bandas de PCR de COI. No canto direito observa-se uma banda no poço determinado para o controle negativo (CN), evidenciando a contaminação do PCR.

Tabela II: Lista de espécies identificadas no estudo com as respectivas taxas de amplificação e sequenciamento para cada marcador molecular.

Táxon	Espécie	N	Local de coleta	Amostra-PCR			Amostra-Sequenciamento		
				COI (%)	ITS1 (%)	ITS2 (%)	COI (%)	ITS1 (%)	ITS2 (%)
Clausocalanoidea									
Clausocalanidae	<i>Clausocalanus furcatus</i>	8	1-2-3	0	100	100	0	100	100
	<i>Clausocalanus arcuicornis</i>	7	1-2-3	0	100	100	0	100	100
Aetideidae	<i>Euchirella bitumida</i>	1	2	0	100	100	0	100	100
Euchaetidae	<i>Euchaeta marina</i>	6	1-2-3	17	100	100	17	100	83
	<i>Euchaeta media</i>	1	3	100	100	100	100	100	100
Scolecitrichidae	<i>Scolecithix danae</i>	9	1-2-3	44	100	100	22	100	89
Megacalanoidea									
Calanidae	<i>Neocalanus robustior</i>	9	1-2-3	100	100	100	56	100	100
	<i>Undinula vulgaris</i>	6	1-2	100	100	100	100	100	100
	<i>Calanoides carinatus</i>	2	2	100	100	100	100	100	100
	<i>Nannocalanus minor</i>	3	1	100	100	100	67	100	100
Paracalanidae	<i>Mecynocera clause</i>	4	1-3	0	100	100	0	100	100
Eucalanoidea									
Rhincalanidae	<i>Rhincalanus cornutus</i>	8	2	0	100	100	0	100	100
Eucalanidae	<i>Pareucalanus sewelli</i>	7	2-3	86	100	100	71	100	100

Continua

Tabela II: Continuação

Táxon	Espécie	N	Local de coleta	Amostra-PCR			Amostra-Sequenciamento		
				COI (%)	ITS1 (%)	ITS2 (%)	COI (%)	ITS1 (%)	ITS2 (%)
Augaptiloidea									
Augaptilidae	<i>Haloptilus spiniceps</i>	4	2/3	0	100	100	0	100	100
Lucicutidae	<i>Lucicutia flavicornis</i>	4	1	75	100	100	0	100	100
Metridinidae	<i>Pleuromamma xiphias</i>	8	2/3	100	100	100	75	100	100
	<i>Pleuromamma abdominalis</i>	6	1/2/3	83	100	100	50	100	100
Centropagoidea									
Candaciidae	<i>Candacia pachydactyla</i>	7	1/2	0	100	86	0	29	0
Temoridae	<i>Temora stylifera</i>	4	2	100	100	100	100	100	100
Pontellidae	<i>Labidocera acutifrons</i>	1	2	0	100	100	0	100	100
TOTAL		105		49	100	99	34	98	91

Número de indivíduos analisados por espécie, local de coleta, sucesso de PCR por indivíduos analisado e sucesso do sequenciamento por indivíduo analisado para cada um dos 3 marcadores moleculares utilizados no estudo: COI, ITS1, ITS2.

N- Número de indivíduos analisados

1 - Cadeia Vitória-Trindade

2- Embaiamento de Tubarão

3- Elevação de Rio Grande

Distâncias genéticas

A distância genética intraespecífica (d) para o COI variou entre 0,000 e 0,017. A espécie que teve a maior variação intraespecífica foi *Neocalanus robustior*. Duas espécies não apresentaram variação intraespecífica para este marcador: *Pleuromamma abdominalis* e *Scolecithrix danae*. A distância intraespecífica média do COI para as nove espécies que tiveram mais de um indivíduo sequenciado foi de 0,004. A menor distância genética interespecífica (d) foi de 0,129 entre as espécies *Undinula vulgaris* e *Nannocalanus minor*, ambos da família Calanidae. Esta foi menor do que a distância genética interespecífica entre as duas únicas espécies congêneres presentes no estudo, para este marcador, que foi de 0,240 entre *Pleuromamma abdominalis* e *Pleuromamma xiphias* (Tabela III).

Para o ITS1, a distância genética intraespecífica variou de 0,000 até 0,008, com média de 0,001. Sendo que a espécie que apresentou maior variação foi *Lucicutia flavicornis*. Das 17 espécies que tiveram mais de um indivíduo sequenciado para este marcador, nove não apresentaram nenhuma variação intraespecífica. A menor distância genética

interespecífica foi de 0,009 entre *Pleuromamma abdominalis* e *Pleuromamma xiphias* (Tabela III).

Já para o ITS2, a distância genética intraespecífica variou entre 0,000 e 0,004, com média de 0,000. Novamente a espécie com maior variação intraespecífica foi *Lucicutia flavicornis*. Dentre as 16 espécies com mais de um indivíduo sequenciado para este marcador, 13 não apresentaram nenhuma variação intraespecífica. A menor distância genética interespecífica foi de 0,007 entre *Pleuromamma abdominalis* e *Pleuromamma xiphias* (Tabela III).

Tanto para o ITS1 como para o ITS2, a espécie *Lucicutia flavicornis* apresentou diversidade intraespecífica bem maior do que a média das demais espécies para estes marcadores, sendo de 0,008 e 0,004 respectivamente. A filogenia dos quatro espécimes amostrados desta espécie demonstra que um deles é mais distante dos demais em termos de distância genética (Fig. 3). Ao se retirar este indivíduo do cálculo de distância genética intraespecífica para esta espécie e considerá-lo um agrupamento genético independente, a distância intraespecífica de *Lucicutia flavicornis* para o ITS1 e ITS2 diminui consideravelmente, passando a ser de 0,002 e 0,001 respectivamente. Com isso, as maiores distâncias genéticas intraespecíficas para o ITS1 e ITS2, encontradas no estudo, passam de 0,008 e 0,004 para 0,003 e 0,001 respectivamente (Tabela IV).

Tabela III: Distância genética intraespecífica e interespecífica para cada marcador molecular analisado.

Espécies	Variação intraespecífica (d)			Menor distância interespecífica (d) (n1-n2)		
	COI	ITS1	ITS2	COI	ITS1	ITS2
1- <i>Clausocalanus furcatus</i>	x	0,000	0,000	x	0,042- 2	0,014- 2
2- <i>Clausocalanus arcuicornis</i>	x	0,001	0,000	x	0,042- 1	0,014- 1
3- <i>Euchirella bitumida</i>	x	x	X	x	0,104- 5	0,099- 5
4- <i>Euchaeta marina</i>	x	0,000	0,000	x	0,109- 5	0,113- 5
5- <i>Euchaeta media</i>	x	x	X	0,195- 8	0,104- 3	0,099- 3
6- <i>Scolecithix danae</i>	0,000	0,000	0,000	0,211- 8	0,222- 3	0,163- 2
7- <i>Neocalanus robustior</i>	0,017	0,000	0,000	0,243- 5	0,136- 10	0,085- 9-10
8- <i>Undinula vulgaris</i>	0,012	0,000	0,000	0,129- 10	0,188- 10	0,088- 10
9- <i>Calanoides carinatus</i>	0,002	0,000	0,000	0,213- 8	0,145- 10	0,049- 10
10- <i>Nannocalanus minor</i>	0,006	0,000	0,000	0,129- 8	0,138- 7	0,049- 9

Continua

Tabela III: Continuação

Espécies	Variação intraespecífica (d)			Menor distância interespecífica (d) (n1-n2)		
	COI	ITS1	ITS2	COI	ITS1	ITS2
11- <i>Mecynocera clausi</i>	x	0,000	0,001	x	0,233- 10	0,213- 9
12- <i>Rhincalanus cornutus</i>	x	0,001	0,000	x	0,192- 13	0,159- 10
13- <i>Pareucalanus sewelli</i>	0,001	0,000	0,000	0,263- 8	0,192- 12	0,168- 12
14- <i>Haloptilus spiniceps</i>	x	0,001	0,000	x	0,164- 17	0,134- 15
15- <i>Lucicutia flavicornis</i>	x	0,008	0,004	x	0,196- 14	0,105- 16
16- <i>Pleuromamma xiphias</i>	0,002	0,003	0,000	0,240- 17	0,009- 17	0,007- 17
17- <i>Pleuromamma abdominalis</i>	0,000	0,003	0,000	0,240- 16	0,009- 16	0,007- 16
18- <i>Candacia pachydactyla</i>	x	0,003	x	x	0,367- 13	x
19- <i>Temora stylifera</i>	0,002	0,002	0,000	0,220- 8	0,335- 20	0,348- 17
20- <i>Labidocera acutifrons</i>	x	x	x	x	0,335- 19	0,531- 16

Distância genética intraespecífica e a menor distância interespecífica para cada uma das espécies analisada para o COI, ITS1 e ITS2.

Para as distâncias interespecíficas foi computado o menor valor para cada espécie (n1-n2) sendo: n1 = (d) e n2 = número da espécie com a menor distância interespecífica.

X - Não foi possível fazer o cálculo de distância genética.

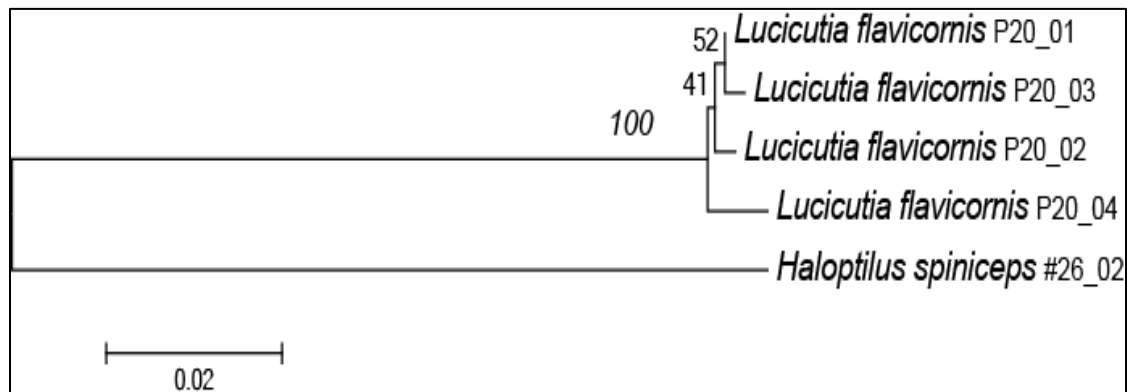


Figura 3. Árvore filogenética construída com base no ITS1 e ITS2 para a espécie *Lucicutia flavicornis*; utilizando o modelo evolutivo de 2 Parâmetros de Kimura, com *Pairwise deletion* e 1000 replicações de *bootstrap*.

Tabela IV: Distância genética intraespecífica tendo *L. flavicornis* como dois grupos genéticos separados.

Espécies	Variação intraespecífica (d)		
	COI	ITS1	ITS2
<i>Clausocalanus furcatus</i>	X	0,000	0,000
<i>Clausocalanus arcuicornis</i>	X	0,001	0,000
<i>Euchirella bitumida</i>	X	x	X
<i>Euchaeta marina</i>	X	0,000	0,000
<i>Euchaeta media</i>	X	x	X
<i>Scolecithix danae</i>	0,000	0,000	0,000
<i>Neocalanus robustior</i>	0,017	0,000	0,000
<i>Undinula vulgaris</i>	0,012	0,000	0,000
<i>Calanoides carinatus</i>	0,002	0,000	0,000
<i>Nannocalanus minor</i>	0,006	0,000	0,000
<i>Mecynocera clausi</i>	X	0,000	0,001
<i>Rhincalanus cornutus</i>	X	0,001	0,000
<i>Pareucalanus sewelli</i>	0,001	0,000	0,000
<i>Haloptilus spiniceps</i>	X	0,001	0,000
<i>Lucicutia flavicornis</i> tipo 1	X	0,002	0,001
<i>Lucicutia flavicornis</i> tipo 2	X	x	X
<i>Pleuromamma xiphias</i>	0,002	0,003	0,000
<i>Pleuromamma abdominalis</i>	0,000	0,003	0,000
<i>Candacia pachydactyla</i>	x	0,003	X
<i>Temora stylifera</i>	0,002	0,002	0,000
<i>Labidocera acutifrons</i>	x	x	X

Distância genética intraespecífica das espécies analisadas para o COI, ITS1, ITS2; considerando *Lucicutia flavicornis* como sendo formada por dois grupos genéticos distintos.

x - Não foi possível fazer o cálculo de distância genética intraespecífica.

Distinção entre espécies com base nos *indels* - nova metodologia

Tanto as sequências de ITS1 como de ITS2 apresentaram uma quantidade muito grande de espaços em branco no alinhamento; que são representações de inserções e/ou deleções no marcador molecular. Como estes não entram no cálculo de distância genética com base em *Pairwise deletion*, foi testada uma nova metodologia para utilização do ITS1 e ITS2 como *barcode*. Utilizamos apenas as posições dos espaços em branco como base de cálculo da distância genética intraespecífica e interespecífica. Neste caso, tanto para o ITS1 como para o ITS2, todas as espécies apresentaram 0,000 de variação intraespecífica. Para o ITS1 a menor distância interespecífica se deu entre *Pleuromamma abdominalis* e *Pleuromamma xiphias*, que

foi de 0,000, sendo o único caso de sobreposição de valores entre a distância intra e interespecífica. Já para o ITS2, tanto para este par de espécies como para *Clausocalanus furcatus* e *Clausocalanus acuiicornis* a variação interespecífica foi de 0,000. Os demais valores podem ser visualizados na Tabela V.

Tabela V: Distância genética intraespecífica e interespecífica, com base nos *indels*, para cada marcador molecular analisado.

Espécies	Variação intraespecífica (d)		Menor distância interespecífica (d) (n1 – n2)	
	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2
1- <i>Clausocalanus furcatus</i>	0,000	0,000	0,004 - 2	0,000 - 2
2- <i>Clausocalanus arcuicornis</i>	0,000	0,000	0,004 - 1	0,000 - 1
3- <i>Euchirella bitumida</i>	x	x	0,019 - 5	0,014 - 5
4- <i>Euchaeta marina</i>	0,000	0,000	0,059 - 5	0,031 - 5
5- <i>Euchaeta media</i>	x	x	0,019 - 3	0,014 - 3
6- <i>Scolecithix danae</i>	0,000	0,000	0,080 - 5	0,048 - 4
7- <i>Neocalanus robustior</i>	0,000	0,000	0,084 - 8	0,008 - 10
8- <i>Undinula vulgaris</i>	0,000	0,000	0,074 - 9	0,010 - 10
9- <i>Calanoides carinatus</i>	0,000	0,000	0,049 - 10	0,002 - 10
10- <i>Nannocalanus minor</i>	0,000	0,000	0,049 - 9	0,002 - 9
11- <i>Mecynocera clausi</i>	0,000	0,000	0,050 - 13	0,029 - 16 - 17
12- <i>Rhincalanus cornutus</i>	0,000	0,000	0,020 - 13	0,008 - 13
13- <i>Pareucalanus sewelli</i>	0,000	0,000	0,020 - 13	0,008 - 12
14- <i>Haloptilus spiniceps</i>	0,000	0,000	0,023 - 16 e 17	0,008 - 15
15- <i>Lucicutia flavicornis</i>	0,000	0,000	0,024 - 14	0,006 - 16 e 17
16- <i>Pleuromamma xiphias</i>	0,000	0,000	0,000 - 17	0,000 - 17
17- <i>Pleuromamma abdominalis</i>	0,000	0,000	0,000 - 16	0,000 - 16
18- <i>Candacia pachydactyla</i>	0,000	x	0,290 - 19	x
19- <i>Temora stylifera</i>	0,000	0,000	0,192 - 7	0,054 - 10
20- <i>Labidocera acutifrons</i>	x	x	0,294 - 7	0,330 - 4

Distância genética intraespecífica e a menor distância interespecífica, com base nos *indels*, para cada uma das espécies analisada para ITS1 e ITS2.

Para as distâncias interespecíficas foi computado o menor valor para cada espécie (n1-n2) sendo: n1 = (d) e n2 = número da espécie com a menor distância interespecífica.

x - Não foi possível fazer o cálculo de distância genética.

Filogenia para cada marcador molecular (COI, ITS1 e ITS2)

A árvore filogenética utilizando-se *Neighbor-Joining*, construída com base no COI, foi do tipo não enraizada, pois todas as sequências deste marcador, de organismos de outra ordem de Copepoda que não Calanoida, eram muito divergentes para serem alinhadas. Apesar de agrupar com sucesso os gêneros de Calanoida analisados no estudo, nenhuma das famílias de Calanoida, presentes no estudo, que não fossem compostas por espécies congêneres, foram agrupadas. (Fig. 4).

Para o ITS1 foi possível sequenciar três indivíduos de *Corycaeus flaccus*, da ordem Poecilostomatoidea, para serem utilizados como grupo externo. Para este marcador, a maior parte das espécies foram agrupadas com 100% de suporte de bootstrap, com exceção de *Clausocalanus arcuicornis*, que teve 98%. O gênero *Pleuromamma* teve 100% de suporte de bootstrap, porém a espécie *Pleuromamma xiphias* não formou um grupo monofilético, tendo indivíduos agrupados com *Pleuromamma abdominalis*. Todas as famílias ficaram agrupadas com mais de 98% de suporte de bootstrap, com exceção de Euchaetidae que teve 91%, Calanidae, que teve 71% e Eucalanidae que teve 73%. Em nível de superfamília, Megacalanoida não formou grupo monofilético, pois *Pareucalanus sewelli* e *Rhincalanus cornutus* (Eucalanoida) ficaram mais próximos das espécies da família Calanidae do que *Mecynocera clausi*. Eucalanoidea foi agrupado com 73% de bootstrap, Centropagoidea com 65%, Augaptiloidea e Clausocalanoidea com 100% (Fig 5-A).

Não obtivemos sequência do ITS2 para a espécie *Corycaeus flaccus*, e por isso foi necessária a adição de sequências provenientes do GenBank, para que servissem de grupo externo para a filogenia com base neste marcador. Foi possível alinhar sequências de três espécies de crustáceos Decapoda: *Lithodes aequispinus*, *Pandalus eous* e *Chionoecetes tanneri*. A maior parte das espécies foram agrupadas com mais de 98% de suporte de bootstrap, com exceção de *Pleuromamma abdominalis*, que obteve 88% de suporte e *Pleuromamma xiphias*, que teve 72%. Todas as famílias foram agrupadas com valores maiores que 98% de suporte de bootstrap, com exceção de Calanidae, que teve 94% e Euchaetidae, que não formou um grupo monofilético. Em nível de superfamília, Megacalanoidea não formou um grupo monofilético, Centropagoidea foi agrupado com 46% de suporte de bootstrap, enquanto

Augaptiloidea, Clausocalanoidea e Eucalanoidea foram agrupados em clados com 96%, 97% e 98% de suporte de *bootstrap* respectivamente. (Fig. 5-B).

Filogenia com sequências concatenadas (COI-ITS1-ITS2) para cada Superfamília

A análise filogenética por *Neighbor-Joining*, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana com base nas sequências concatenadas ITS1-ITS2-COI para cada uma das superfamílias de Calanoida presentes no estudo permitiu aferição do parentesco evolutivo entre alguns gêneros e famílias de Calanoida. Para a superfamília Megacalanoidea, foi confirmado parentesco entre *Neocalanus robustior*, *Nannocalanus minor*, *Calanoides carinatus* e *Undinula vulgaris*; pertencentes à família Calanidae. Estes formaram um grupo monofilético com altos valores de suporte em todos os três casos, com *Mecynocera clausi* (Paracalanidae), em um ramo mais externo da árvore. Porém as relações evolutivas dentro da família Calanidae não puderam ser bem estabelecidas, uma vez que os resultados variaram de uma análise para outra (Fig. 6). Já para a superfamília Clausocalanoidea as relações evolutivas foram mais esclarecidas. Nos três métodos utilizados para análise filogenética, as espécies *Clausocalanus furcatus* e *Clausocalanus arcuicornis* (Clausocalanidae) foram agrupadas em um grupo monofilético irmão do clado que agrupou *Euchaeta marina*, *Euchaeta media* (Euchaetidae) e *Euchirella bitumida* (Aetidae); com *Scolecithrix danae* (Scolecitrichidae), ficando em um ramo externo (Fig. 7). Para a superfamília Augaptiloidea, as relações evolutivas entre as espécies analisadas também ficaram bem estabelecidas. *Pleuromamma abdominalis* e *Pleuromamma xiphias* (Metrinidae) foram agrupadas em um grupo monofilético com alto valor de suporte, irmão ao clado composto pelas espécies *Lucicutia flavicornis* (Lucicutidae) e *Haloptilus spiniceps* (Augaptilidae) (Fig. 8). Dentro da superfamília Eucalanoidea, foram sequenciadas apenas duas espécies, não sendo possível, portanto, analisar o parentesco evolutivo dentro deste clado. Por sua vez, a filogenia da superfamília Centropagoidea mostra espécies bem distantes entre si evolutivamente. *Temora stylifera* e *Candacia pachydactyla* formaram um grupo monofilético com alto suporte de *bootstrap*, tendo *Labidocera acutifrons* como espécie irmã deste grupo (Fig. 9).

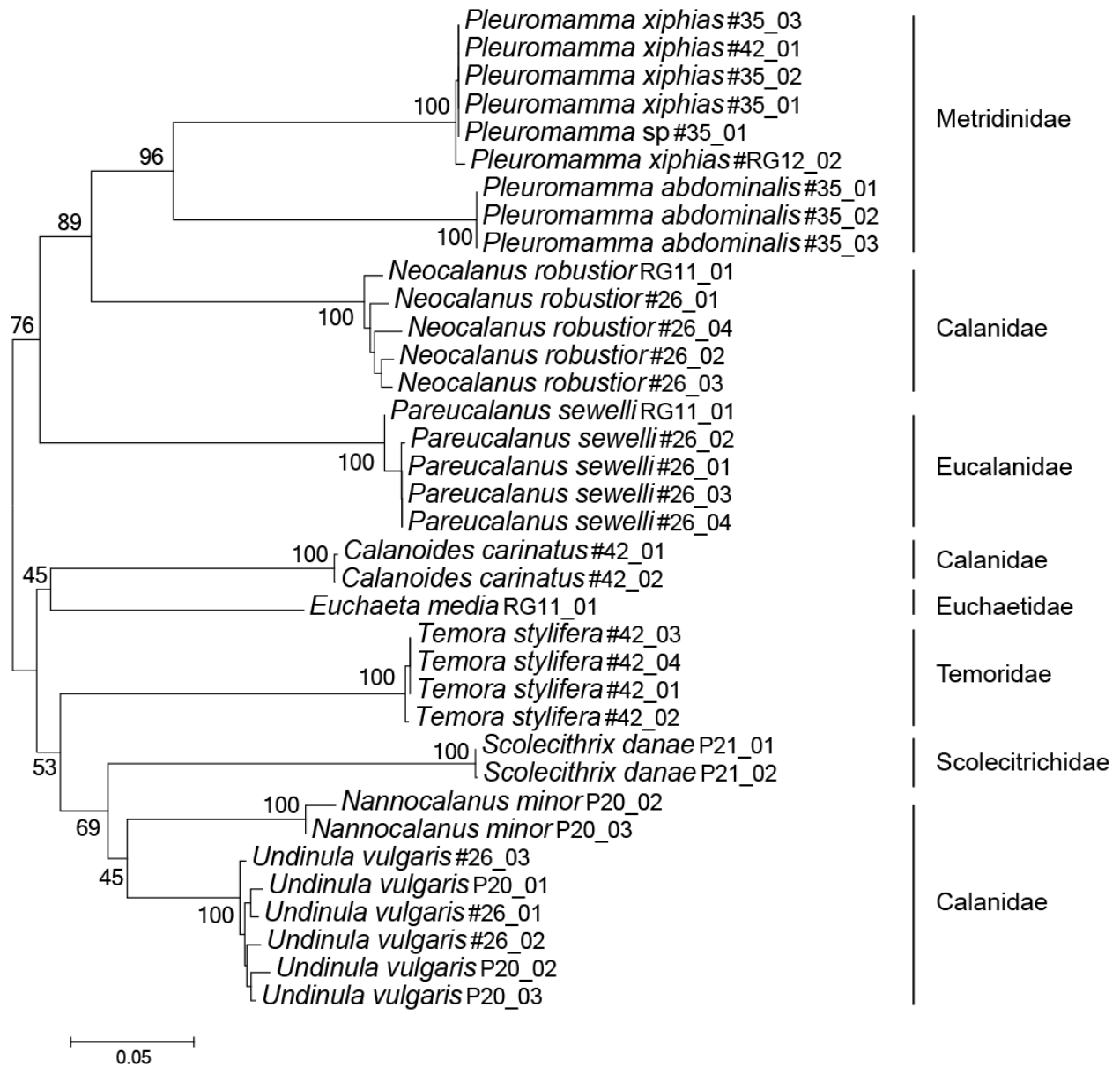


Figura 4. Árvore filogenética de 36 indivíduos de Calanoida por *Neighbor-Joining*, construídas com base no COI; utilizando o modelo evolutivo de 2 Parâmetros de Kimura, com *Pairwise deletion* e 1000 replicações de *bootstrap*.

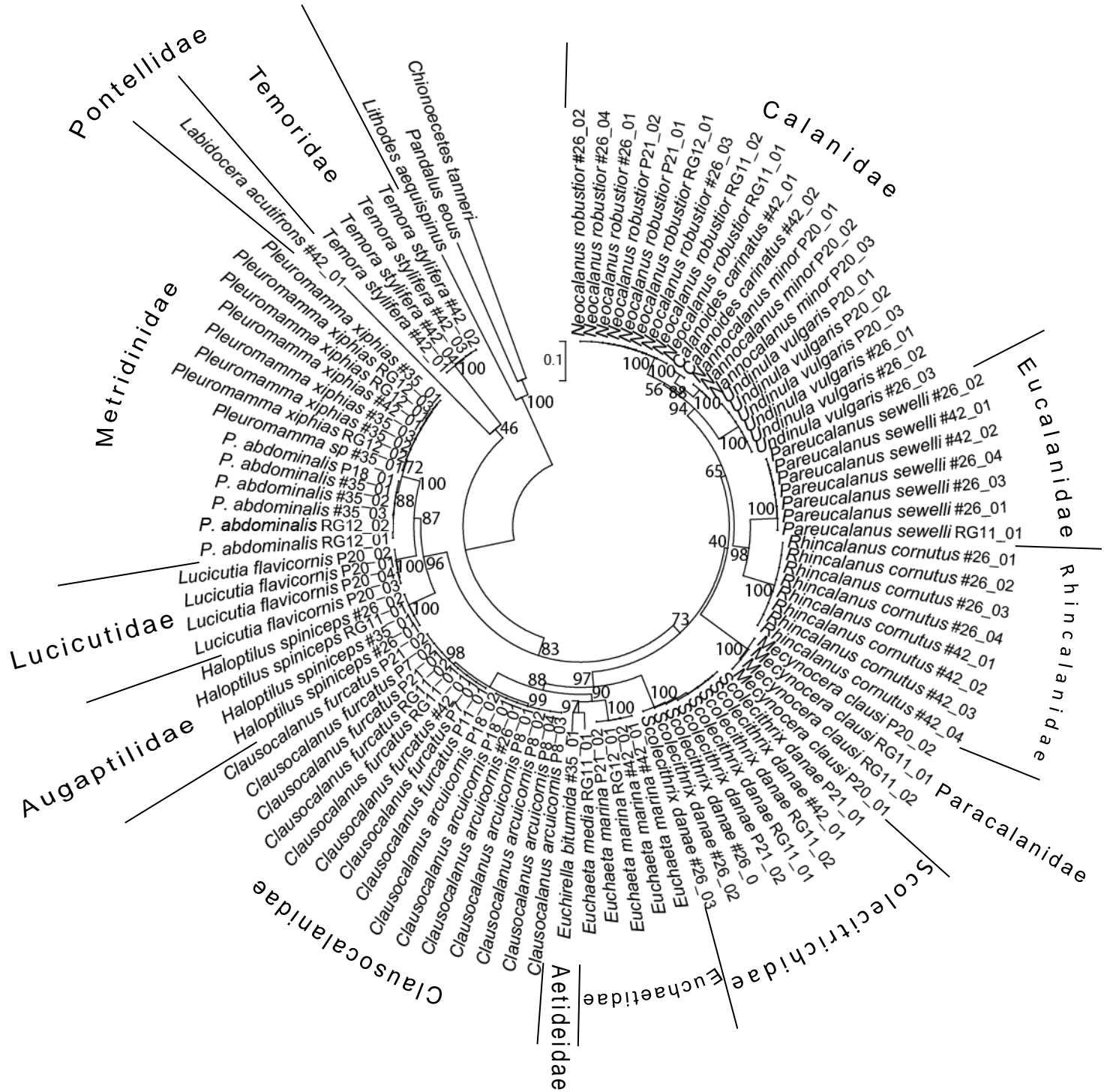


Figura 6. Árvore filogenética de *Neighbor-Joining*, construída com base no ITS2; utilizando o modelo evolutivo de 2 Parâmetros de Kimura, com *Pairwise deletion* e 1000 replicações de *bootstrap*.

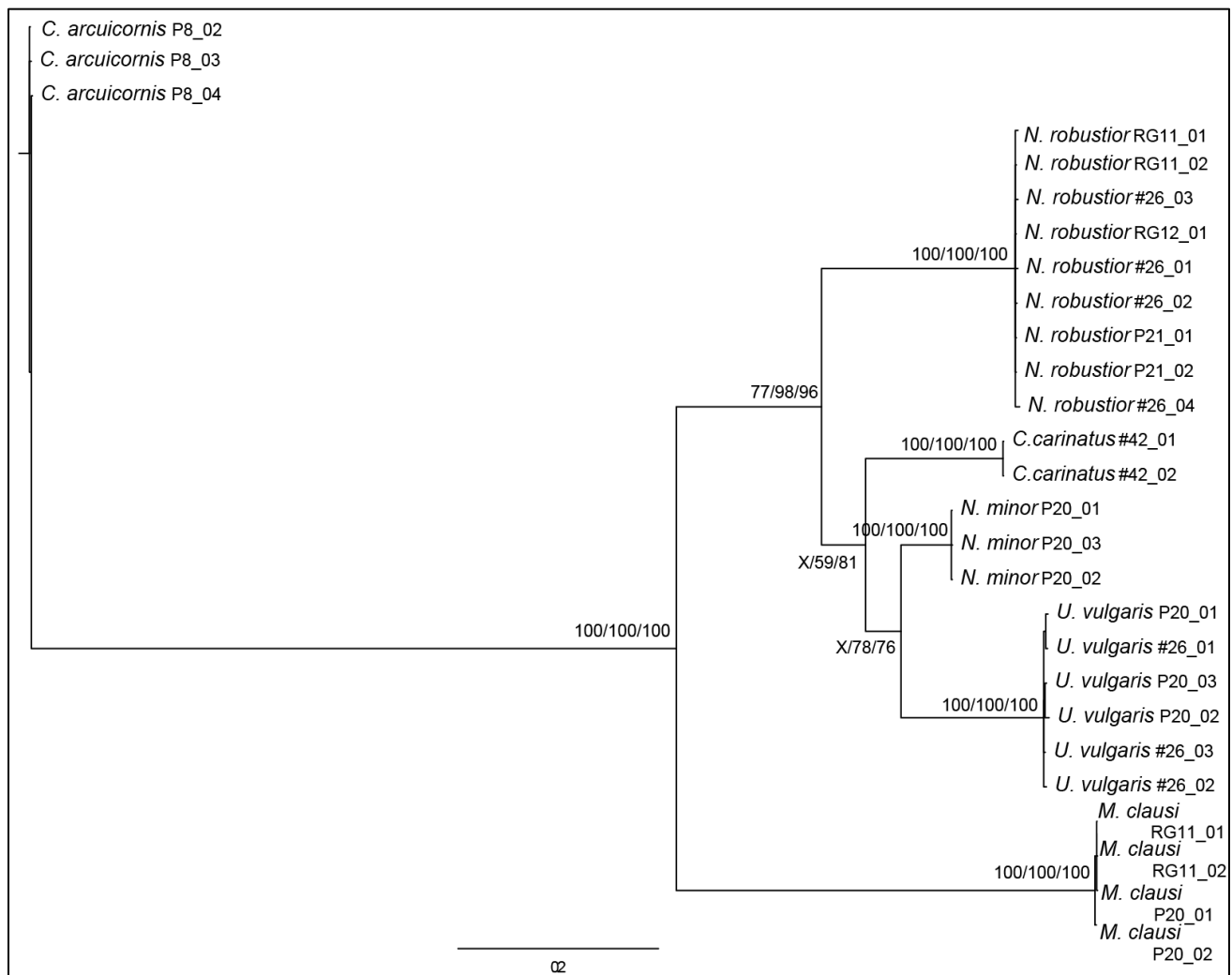


Figura 7. Árvore filogenética construída com base na sequência concatenada do ITS1-ITS2-COI para as espécies da superfamília Megacalanoidea, tendo *Clausocalanus arcuicornis* como grupo externo. Os valores de suporte de *bootstrap* são relativos às análises por: Máxima Verossimilhança, Inferência Bayesiana e *Neighbor-Joining* respectivamente.

X = Valores inferiores à 50%.

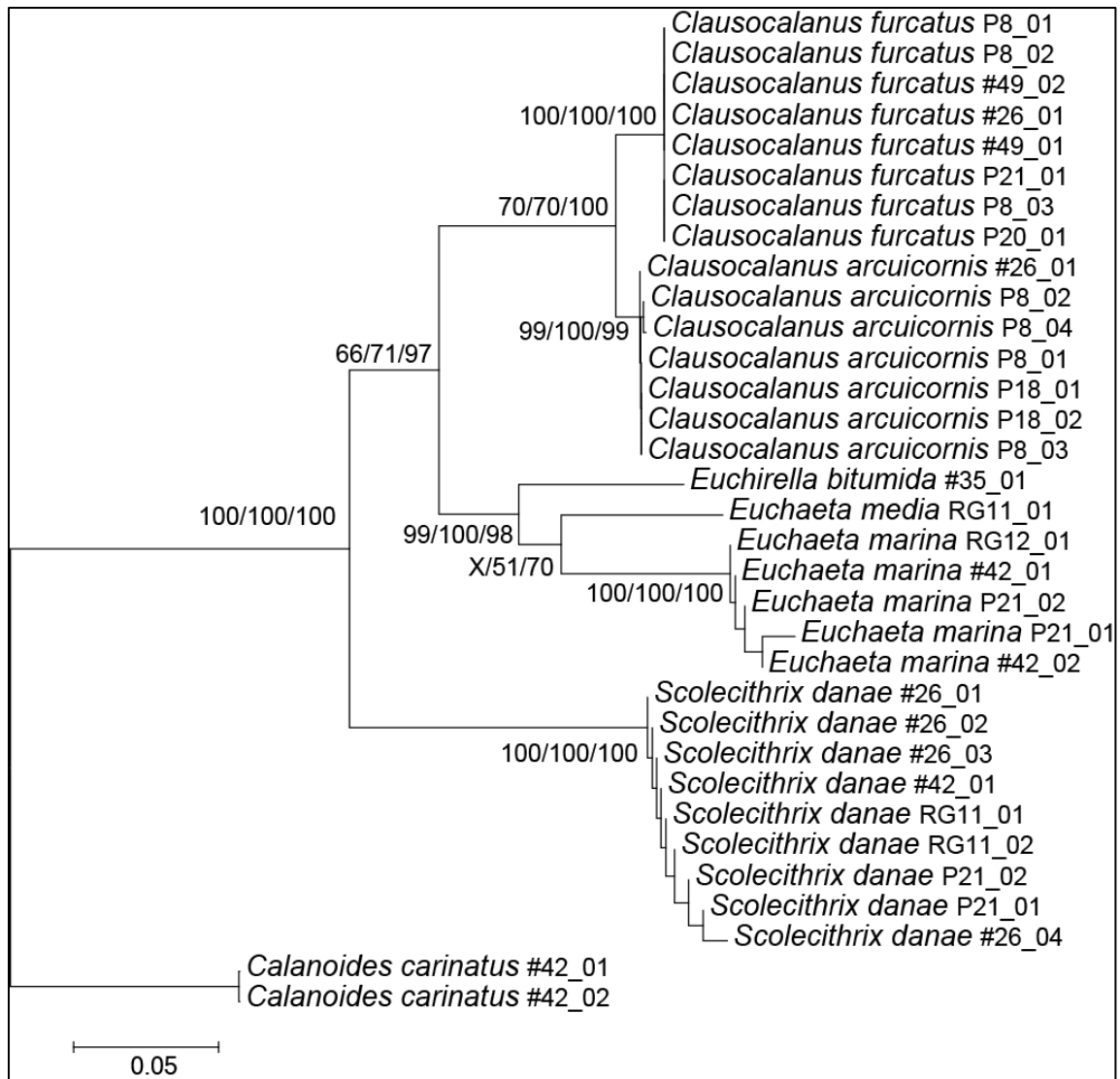


Figura 8. Árvore filogenética construída com base na sequência concatenada do ITS1-ITS2-COI para as espécies da superfamília Clausocalanoidea, tendo *Calanoides carinatus* como grupo externo. Os valores de suporte de *bootstrap* são relativos às análises por: Máxima Verossimilhança, Inferência Bayesiana e *Neighbor-Joining* respectivamente. X = Valores inferiores à 50%.

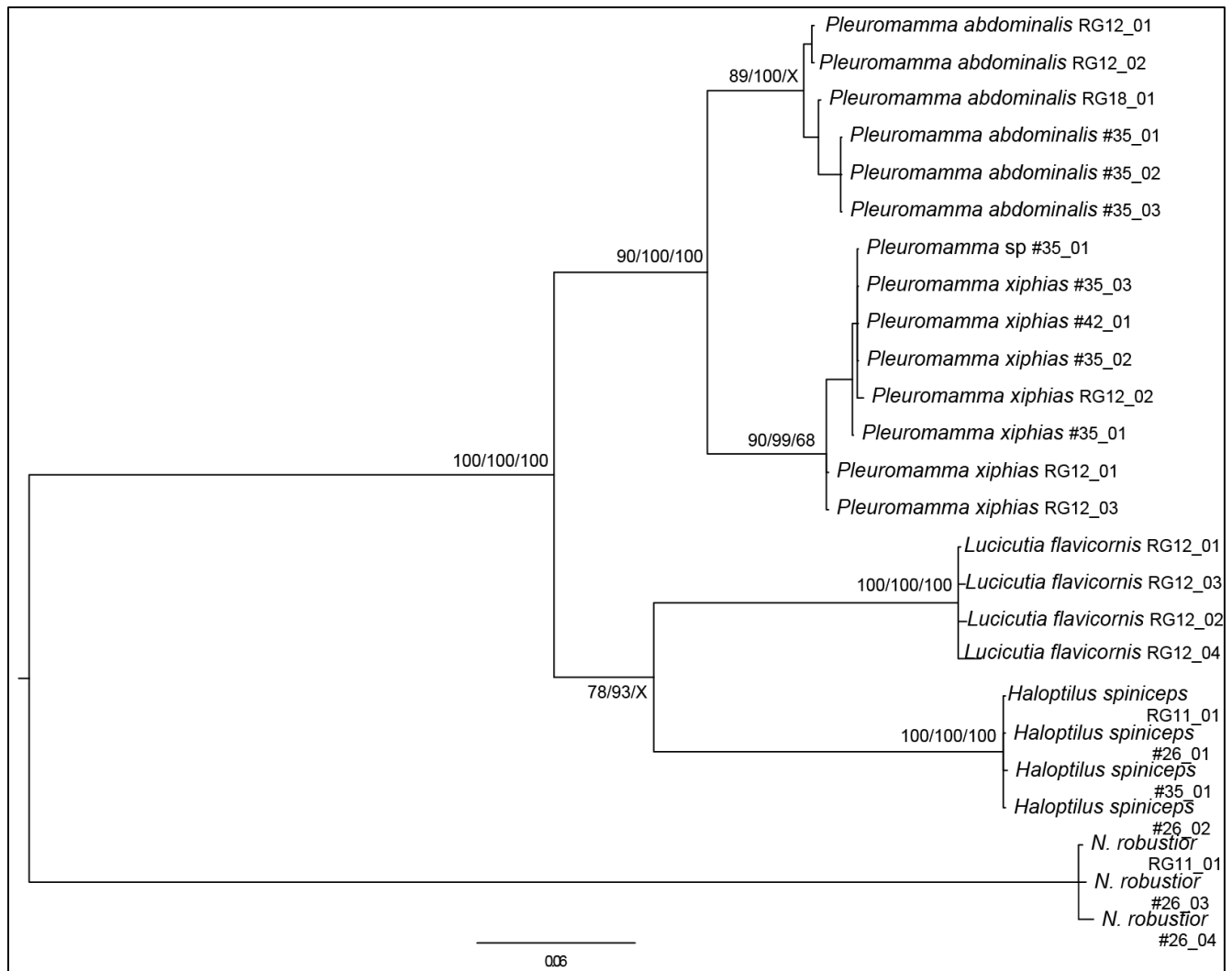


Figura 9. Árvore filogenética construída com base na sequência concatenada do ITS1-ITS2-COI para as espécies da superfamília Augaptiloidea, tendo *Neocalanus robustior* como grupo externo. Os valores de suporte de *bootstrap* são relativos às análises por: Máxima Verossimilhança, Inferência Bayesiana e *Neighbor-Joining* respectivamente. X = Valores inferiores à 50%.

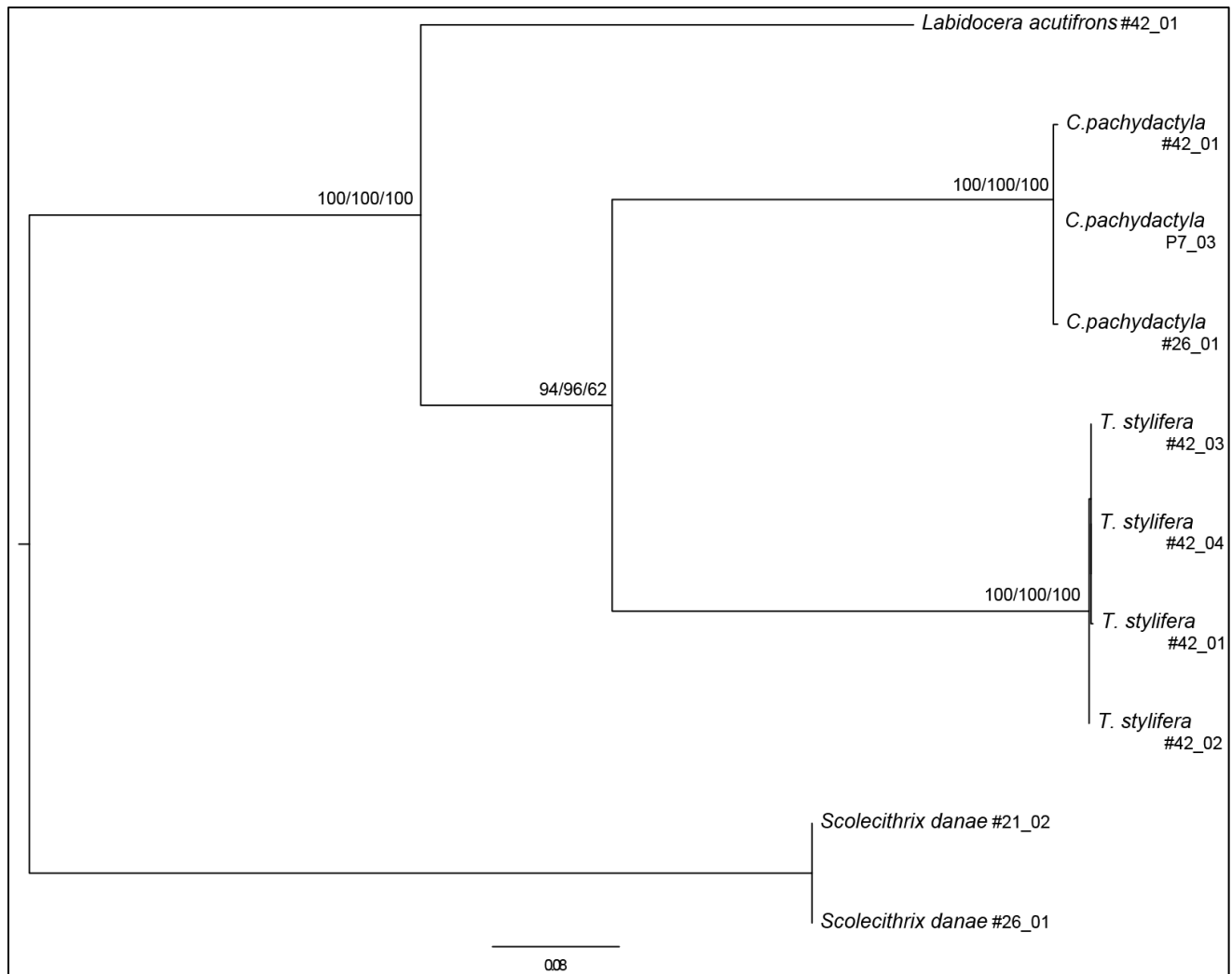


Figura 10. Árvore filogenética construída com base na sequência concatenada do ITS1-ITS2-COI para as espécies da superfamília Centropagoidea, tendo *Scolecithrix danae* como grupo externo. Os valores de suporte de *bootstrap* são relativos às análises por: Máxima Verossimilhança, Inferência Bayesiana e *Neighbor-Joining* respectivamente.
X = Valores inferiores à 50%.

Filogenia com sequências concatenadas (COI-ITS1-ITS2) para Calanoida

Nas análises filogenéticas com base em Neighbor-Joining, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana para as sequências concatenadas do ITS1-ITS2-COI de todas as espécies de Calanoida sequenciadas no estudo, a espécie *Corycaeus flaccus*, da ordem Poecilostomatoida, foi utilizada como grupo externo. As filogenias geradas pelas três formas de análise resultaram em árvores com resultados concordantes quanto ao parentesco evolutivo das espécies de Calanoida. Todos os gêneros, famílias e superfamílias foram agrupados, e todas as espécies foram agrupadas com

mais de 98% de valor de suporte nas três formas de análise. As exceções foram *Pleuromamma abdominalis* e *Pleuromamma xiphias*, que apresentaram valores um pouco inferiores em pelo menos uma das análises mencionadas (Fig. 10).

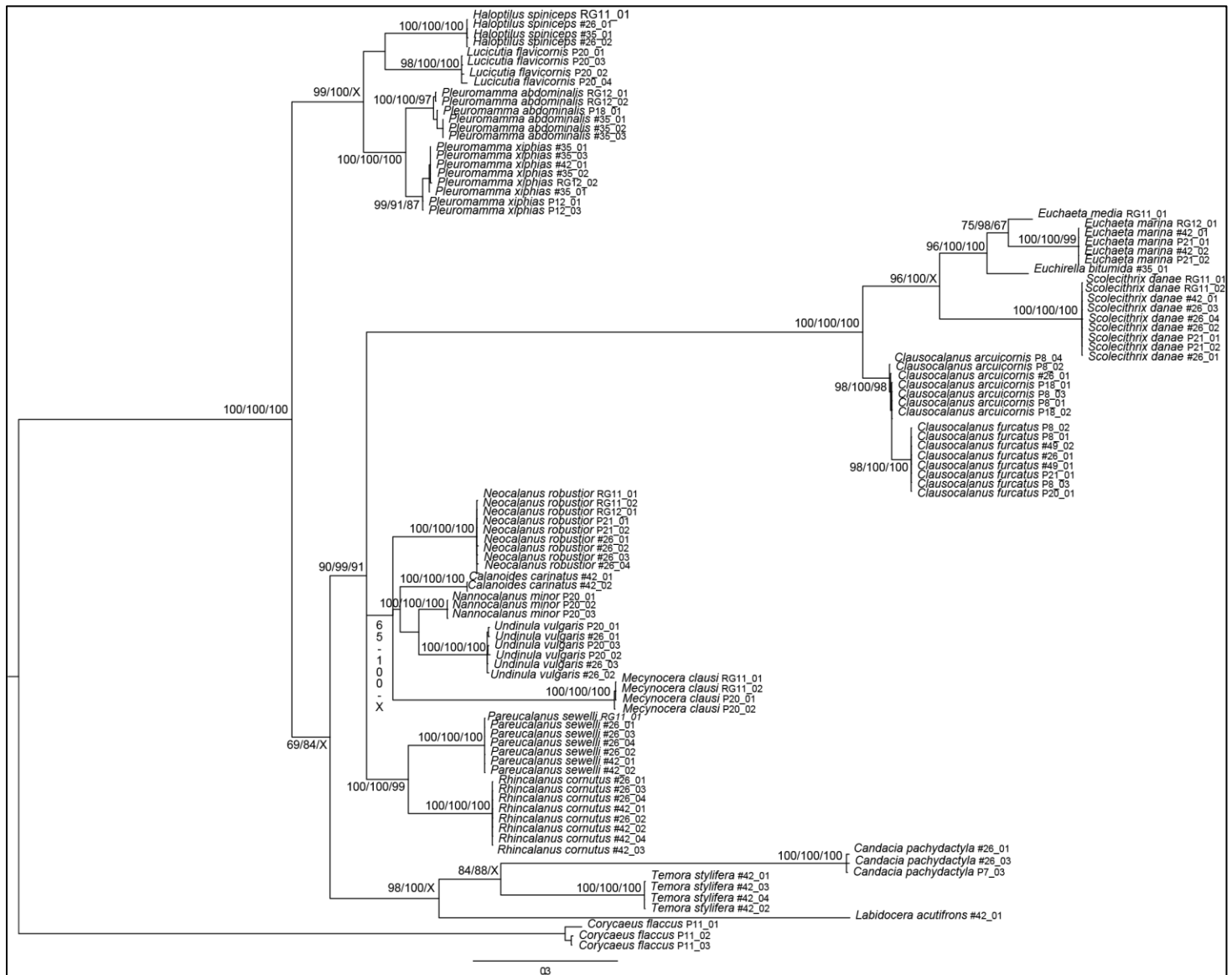


Figura 11. Árvore filogenética construída com base na sequência concatenada do ITS1-ITS2-COI para as espécies de Calanoida, tendo *Corycaeus flaccus* como grupo externo. Os valores de suporte de *bootstrap* são relativos às análises por: Máxima Verossimilhança, Inferência Bayesiana e *Neighbor-Joining* respectivamente.

X = Valores inferiores à 50%.

DISCUSSÃO

Utilidade do ITS1 e do ITS2 como barcode

Tanto o ITS1 como o ITS2 apresentaram sucesso superior ao do COI quanto às taxas de sequenciamento; respectivamente 98,09% e 91,42%. Quanto à resolução taxonômica, ambos apresentaram hiatos entre a distância intraespecífica e interespecífica (Tabela III), o que os qualifica como potenciais marcadores moleculares úteis para geração de *barcode* para Copepoda da ordem Calanoida do Atlântico Ocidental. Para tal seria indicado a padronização dos *primers* utilizados para amplificação e sequenciamento, garantindo assim o poder de comparação entre estudos em diferentes regiões do mundo. Os *primers* utilizados neste estudo (Nonomura et al., 2008), se mostraram muito úteis para esta função. As taxas de eficiência de sequenciamento obtidas no presente estudo são as maiores que temos conhecimento para este grupo de organismos (Llinás, 2008; Fangping et al., 2013; Hirai et al., 2013;).

O segmento ITS2 apresentou vantagens em relação ao segmento ITS1 como possível marcador molecular para *barcode* uma vez que, apesar de apresentar taxa de eficiência de sequenciamento um pouco menor (Tabela II), teve um hiato mais amplo e o seu sinal filogenético é melhor. O ITS2 agrupou corretamente todas as espécies analisadas por *Neighbor-Joining*, em clados monofiléticos, enquanto o ITS1 não formou um clado monofilético para a espécie de *Pleuromamma xiphias* (Fig. 5). Uma vantagem adicional do ITS2 sobre o ITS1 e sobre o COI é o seu menor tamanho, de aproximadamente 440pb. A vantagem de se usar uma sequência curta é devido a maior facilidade de amplificação de indivíduos, independentemente da idade da amostra e da qualidade da sua preservação (Hajibabaei et al., 2006). No entanto, este aspecto não pode ser testado no presente estudo visto que todas as amostras foram coletadas no mesmo ano e com a mesma metodologia de preservação.

Para o ITS1 e ITS2, a média das distâncias intraespecíficas foi de 0,001 e 0,000 respectivamente. Estes valores estão em concordância com os valores obtidos em outros estudos que avaliaram especificamente a diversidade intraespecífica desta

região do genoma nuclear em crustáceos e copépodes (Chu et al., 2001; Machida & Tsuda, 2010). No presente estudo a menor distância genética interespecífica tanto para o ITS1 como para o ITS2 foi entre as espécies *Pleuromamma abdominalis* e *Pleuromamma xiphias*. Hirai e colaboradores (2013) também observaram estas duas espécies como as mais próximas em um estudo desenvolvido com copépodes calanoides do oeste do Pacífico Norte, levantando a hipótese da especiação que originou as duas espécies ter ocorrido em um tempo relativamente recente.

***Lucicutia flavicornis* e especiação críptica**

Tanto para o ITS1 como para o ITS2, a espécie *Lucicutia flavicornis* apresentou diversidade intraespecífica bem maior do que a média das demais espécies para estes marcadores (Tabela III). Isso indicou a possibilidade de estarmos amostrando espécies crípticas. Este fato poderia estar erroneamente aumentando o limite máximo da distância intraespecífica dos dois marcadores nucleares para Calanoida e contribuindo para um estreitamento irreal do hiato para identificação molecular. Ao se retirar o indivíduo mais distante dos demais, segundo a filogenia por *Neighbor-Joining*, do cálculo de distância genética intraespecífica para esta espécie e considerá-lo uma espécie separada, a distância intraespecífica de *Lucicutia flavicornis* para o ITS1 e o ITS2 diminui consideravelmente (de 0,008 e 0,004 para 0,002 e 0,001 respectivamente), ficando assim bem próximo da média encontrada para as demais espécies que foi de 0,001 e 0,000 respectivamente. Em estudo recente, foi observada distância intraespecífica acima da média geral para quatro espécies de calanóides, *Lucicutia flavicornis* foi uma delas. Para estes casos, foi discutida a possibilidade de evidência para amostragem de espécies crípticas (Hirai et al., 2013). Considerando esta possibilidade, o hiato de identificação dos marcadores moleculares do presente estudo é expandido. O ITS1 passa a ter a maior distância intraespecífica de 0,003 e menor distância interespecífica de 0,009; já estes valores para o ITS2 ficam em 0,001 e 0,007 respectivamente (Tabela IV), aumentando ainda mais o grau de confiabilidade destes marcadores moleculares para a identificação molecular.

Por possuir uma maior taxa de mutação em Copepoda, o COI é utilizado para análise de grupos recentes em muitos estudos (Chen & Hare, 2008; Goetze, 2003; Blanco-Bercial et al., 2011), inclusive para análise populacional (Goetze, 2003; 2011). Com

isto ele poderia ter sido muito útil para elucidar a questão de estarmos lidando ou não com espécies crípticas. Porém, assim como para 50% das espécies analisadas neste estudo, não foi possível sequenciá-lo para *Lucicutia flavicornis*. Uma explicação alternativa para esta questão, em oposição à amostragem de espécies crípticas, seria a possibilidade de variabilidade intragenômica; um risco quando se trabalha com marcadores nucleares (Chu et al., 2001). Porém o fato do mesmo padrão ter sido encontrado em dois marcadores moleculares de forma independente para o mesmo indivíduo minimiza muito esta possibilidade.

COI

Foi evidenciada a grande dificuldade de amplificação do COI. Um problema para a amplificação deste marcador molecular, utilizando os *primers* universais, é a contaminação do PCR por material genético de organismos que não os organismos alvo, uma vez que os *primers* tem caráter generalista. Foram seguidos problemas com contaminação utilizando os *primers* universais de Folmer, além da não amplificação de muitas das espécies selecionadas para o estudo. A taxa de sucesso de geração de sequência foi de apenas 34,28%. Apenas três espécies: *Undinula vulgaris*, *Calanoides carinatus* e *Temora stylifera* tiveram 100% de eficiência de sequenciamento. Outras como *Clausocalanus furcatus*, *Clausocalanus arcuicornis*, *Euchirella bitumida*, *Euchaeta marina*, *Rhincalanus cornutus*, *Mecynocera clausi*, *Haloptilus spiniceps*, *Candacia pachydactyla*, *Lucicutia flavicornis* e *Labidocera acutifrons* não tiveram nenhum indivíduo sequenciado, apesar de esforços repetitivos de amplificar indivíduos que as representam. Foram encontrados resultados muito similares a estes em trabalhos anteriores (Hirai et al., 2013) ficando evidenciada a dificuldade de amplificação do COI para copépodes Calanoidea.

Alguns estudos focaram em desenvolver novos *primers* específicos para determinadas espécies de Copepoda (Blanco-Bercial et al., 2011; Costa et al., 2011) e para outros grupos zooplânctônicos (Prosser et al., 2013). Porém desta forma obtém-se sequências de tamanhos diferentes, o que dificulta a comparação destas com as de outros estudos, além de impossibilitar a padronização da metodologia para geração de *barcode*, o que é muito importante para a maior eficiência do processo. Isso é especialmente importante para Copepoda, pois se trata de organismos muito

abundantes, necessitando da identificação de um grupo muito grande de indivíduos tanto em estudos ecológicos como de genética populacional. O COI é um marcador com alta taxa de evolução para Calanoida, sendo inclusive utilizado para análises populacionais envolvendo espécies deste grupo taxonômico (Bucklin et al. 2003; Goetze 2011). Esta pode ser uma possível explicação para a dificuldade de amplificação, uma vez que algumas espécies provavelmente sofreram mutações no sítio de ligação dos *primers* universais, o que não permitiria a amplificação destas. O fato do COI possuir taxa de evolução rápida foi evidenciado no presente estudo pelos grandes valores de distâncias genéticas intra e interespecíficas encontrados para este marcador (Tabela III). Por outro lado sua capacidade de resolução taxonômica foi atestada para aquelas espécies que foram sequenciadas com sucesso. Existe um hiato entre a maior distância intraespecífica e a menor distância interespecífica que permite uma resolução taxonômica de confiança em nível de espécie (Tabela III). Estes resultados concordam com outros já obtidos para Copepoda (Bucklin et al., 1999; Bucklin et al., 2003).

Já foram testadas outras alternativas ao COI como *barcode* para Calanoida em outros estudos, como o marcador molecular ITS2-28S por exemplo (Hirai et al., 2013). Este apresentou taxa de eficiência de sequenciamento de 79,5% para um total de 244 indivíduos. A maior distância genética intraespecífica encontrada foi de 0,001, e a menor distância interespecífica foi 0,005. O segmento 28S também foi avaliado quanto a sua utilidade para identificação de espécies de copépodes calanóides do Ártico em um outro estudo, desenvolvido por Llinás (2008). Neste foi obtida uma taxa de eficiência de sequenciamento de 85%. Os animais analisados estavam todos em estágio naupliar, totalizando 1800 indivíduos.

Distinção entre espécies com base nos *indels* - nova metodologia

A nova metodologia para utilização do ITS1 e do ITS2 para identificação molecular de Calanoida desenvolvida no presente trabalho se baseia na constatação da presença de muitos *indels* nas sequências destes marcadores nucleares neste grupo de organismos. Este fato também foi constatado para outros grupos animais (Chu et al., 2001; Calderón et al., 2006). A grande quantidade de *indels* não impediu o alinhamento das sequências no presente estudo. Esta nova metodologia possui

vantagens em relação à metodologia tradicional uma vez que não é preciso verificar a qualidade de cada um dos pares de base de todas as sequências antes de se fazer o alinhamento. A edição das sequências se torna mais facilitada, bastando apenas que o software possua um comando de substituição de um conjunto inteiro de bases de uma só vez. Para o ITS1, ela se mostrou eficiente para distinção de espécies em todos os casos, com exceção das espécies do gênero *Pleuromamma*. Já para o ITS2 a metodologia não se mostrou eficiente para as espécies do gênero *Pleuromamma* e nem do gênero *Clausocalanus*, uma vez que as distâncias interespecíficas dentro destes grupos taxonômicos foi de 0,000, assim como para as distâncias intraespecíficas de todas as espécies de Calanoida sequenciadas. Apesar de não ter tido sucesso de distinção de espécies em 100% dos casos, esta é uma metodologia que pode ser testada com outros grupos taxonômicos que não Calanoida, bastando que também apresentem grande quantidade de deleções e inserções sem que este fato impeça o alinhamento das sequências. Já foram realizados cálculos de distância genética para identificação específica com base no ITS1 e ITS2 levando em conta as mutações e inserções-deleções para formigas (Pilgrim & Pitts, 2006).

Filogenia

A organização taxonômica de Copepoda mais aceita hoje em dia é a estabelecida com base em dados morfológicos por Andronov (1974) e modificada por Fosshagen e Liffé (1985) e Park (1984). Mais recentemente, Bradford-Grieve et al. (2010) realizaram um novo estudo filogenético baseado em caracteres morfológicos, obtendo resultados concordantes com os previamente estabelecidos. Em termos de taxonomia baseada em dados moleculares, a monofilia da ordem Calanoida foi confirmada (Blanco-Bercial et al., 2011) e as relações evolutivas entre as espécies desta ordem tem sido concordantes com o que se havia estabelecido com base nos dados morfológicos, com algumas exceções, principalmente nas relações entre Superfamílias (Bucklin et al., 2003; Blanco-Bercial et al., 2011; Hirai et al., 2013).

A análise filogenética por *Neighbor-Joining* tendo como base apenas as sequências de COI foi bastante diferente daquela pré-estabelecida com base na análise morfológica para o nível de família. Estudos demonstram que o COI possui uma taxa de variação muito grande em Calanoida e por esta razão não seria um marcador molecular muito

indicado para reconstruções filogenéticas para níveis mais abrangentes, sendo, porém recomendado para esclarecimento das relações evolutivas entre espécies congêneres (Bucklin et al., 1999; Costa et al., 2011). O COI tende a ter a sua informação saturada quando em estudos filogenéticos envolvendo níveis mais abrangentes, pois a maior parte das diferenças entre as sequências deste marcador são causadas por substituições, podendo resultar em múltiplas substituições em um mesmo sítio (Bucklin et al., 2003).

Chu et al., (2001) e Schultz et al., (2006) concluíram que o ITS1 e o ITS2 seriam bons apenas para análise taxonômica até o nível de gênero. Em outros estudos foi evidenciada a possibilidade de se analisar sequência de ITS2 entre espécies distantes filogeneticamente devido à manutenção de um trecho bem conservado neste marcador (Schultz et al., 2005). Com base nas sequências geradas pelo presente estudo pode-se aferir que a maior parte das diferenças entre as sequências de ITS1 e ITS2 se devem às inserções e deleções (*indels*), com isso o risco de saturação da informação filogenética é bastante reduzido, possibilitando estudos filogenéticos com níveis mais abrangentes.

Como mencionado nos resultados, mesmo quando analisado de forma independente, o ITS1 demonstrou bom sinal filogenético desde o nível de espécie até o nível de superfamília, tendo a única exceção com as espécies do gênero *Pleuromamma*. Já o ITS2 demonstrou bom sinal filogenético desde o nível de espécie até o nível de Subclasse, já que os Calanoida da Subclasse Copepoda puderam ser alinhados com três espécies de Decapoda, da Subclasse Eumalacostraca, que ficaram como grupo externo em uma árvore não enraizada. Tanto o ITS1 como o ITS2 agruparam todas as Superfamílias de Calanoida com altos valores de suporte de *bootstrap*, com exceção da Superfamília Megacalanoidea. Em estudos filogenéticos anteriores, tanto com bases moleculares (Blanco-Bercial et al., 2011) como com bases morfológicas (Bradford-Grieve et al., 2010), também foi observado pouco suporte para a Superfamília Megacalanoidea.

De uma forma geral os marcadores nucleares, ITS1 e ITS2 demonstraram um bom sinal filogenético desde o nível de espécie até níveis mais abrangentes, de família e superfamília, principalmente quando utilizados conjuntamente com marcadores com taxa de evolução mais rápida, como foi o caso do COI para este estudo. A análise

filogenética das sequências concatenadas COI-ITS1-ITS2 agrupou as espécies pertencentes às superfamílias propostas por Andronov (1974) e Park (1984). Desta forma, este estudo apresenta o ITS1 e o ITS2 como marcadores moleculares que podem ser utilizados para dar mais embasamento e suporte para a filogenia de Calanoida, permitindo análises tanto entre espécies, gêneros e famílias.

Grandes distâncias genéticas foram observadas entre as espécies de Centropagoidea, o que corrobora com os resultados obtidos anteriormente em outro estudo (Blanco-Bercial et al., 2011). As espécies desta superfamília ocupam uma grande variedade de nichos ecológicos, colonizando ambientes oceânicos, neríticos, estuarinos e de água doce (Huys & Boxshall, 1991). Desta forma são esperados eventos de especiação alopátrica mais frequentes, resultando em um menor tamanho populacional efetivo e conseqüentemente maior taxa de evolução. Uma explicação alternativa para este fato seria que as linhagens da superfamília surgiram a partir da sobrevivência à extinção do Cretáceo-Terciário e mais recentemente às variações do nível do mar levando-as a divergirem (Bradford-Grieve, 2002).

CONCLUSÃO

O ITS2 se mostrou mais efetivo na identificação de espécies de Calanoida do que o ITS1. O hiato entre a maior distância intraespecífica e a menor distância interespecífica do ITS2, para as espécies deste grupo animal, foi suficiente para permitir a identificação correta em 100% dos casos analisados. Para o ITS1 a única exceção se deu com o gênero *Pleuromamma*. Além disso, a taxa de eficiência de sequenciamento, de ambos os marcadores nucleares, utilizando-se os *primers* de Nonomura e colaboradores (2008) foi significativamente maior do que a do COI, utilizando-se os *primers* universais de Folmer e colaboradores (1994) possibilitando uma maior eficiência para geração de *barcodes*.

Os marcadores nucleares analisados no presente estudo também se mostraram de grande utilidade para análises filogenéticas até mesmo entre níveis taxonômicos mais abrangentes. Por outro lado, a acelerada taxa de evolução do COI permite apenas

análises entre espécies proximamente aparentadas, devido à saturação de sua informação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo é um passo importante para o estudo dos Calanoida do Atlântico Ocidental, por indicar uma metodologia que permite a identificação molecular confiável e de forma eficaz das espécies pertencentes a este grupo. Este foi o primeiro passo para a criação de um banco de dados com sequências de um marcador molecular que mostrou ser de grande utilidade para identificação específica de copépodes da ordem Calanoida, o grupo animal mais abundante da região.

Futuras perspectivas de estudo são de estabelecimento e expansão do banco de dados molecular contendo sequências de ITS2, de forma a servir de suporte para futuros projetos zooplanctônicos que necessitem de bases de identificação específica. Utilizando os dados moleculares em associação com os caracteres morfológicos, pode-se ter uma identificação mais precisa em nível de espécie, independente do estágio do ciclo de vida do animal. Com isso, abre-se a possibilidade para estudos de diversidade naupliar, cuja identificação morfológica em nível de espécie é extremamente complicada. Isto possibilitará aos pesquisadores fazerem novas perguntas ecológicas que poderão ser respondidas tendo como base, também, a ecologia larval. Apesar deste estudo ter sido realizado com uma ampla abrangência geográfica, estudos adicionais analisando uma maior quantidade de espécies congêneres, abrangendo uma área geográfica ainda maior, serão de extrema importância para certificação da manutenção do hiato entre a distância intraespecífica e interespecífica dos marcadores nucleares aqui analisados, algo essencial para se utilizar um marcador molecular como *barcode* para identificação de espécies.

REFERÊNCIAS

- Andronov, N. V. (1974). Phylogenetic relations of large taxa within the suborder Calanoida (Crustacea, Copepoda). *Zoologichesky Zhurnal*, 53: 1002–12.

- Beaugrand, G. (2003). Long-term changes in copepod abundance and diversity in the north-east Atlantic in relation to fluctuations in the hydroclimatic environment. *Fisheries Oceanography*, 12/4: 270–83.
- Beaugrand, G., & Reid, P. C. (2003). Long-term changes in phytoplankton, zooplankton and salmon related to climate. *Global Change Biology*, 9: 801–17.
- Bjornberg, T. K. S. (1981). Copepoda. *Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino*, pp. 587–679.
- Blanco-Bercial, L., Álvarez-Marqués, F., & Bucklin, A. (2011). Comparative phylogeography and connectivity of sibling species of the marine copepod *Clausocalanus* (Calanoida). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 404/6: 108–15. Elsevier B.V. DOI: 10.1016/j.jembe.2011.05.011
- Blanco-bercial, L., Bradford-grieve, J., & Bucklin, A. (2011). Molecular phylogeny of the Calanoida (Crustacea : Copepoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59/1: 103–13. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/j.ympev.2011.01.008
- Böttger-Schnack, R., & Machida, R. J. (2011). Comparison of morphological and molecular traits for species identification and taxonomic grouping of oncaeid copepods. *Hydrobiologia*, 666: 111–25. DOI: 10.1007/s10750-010-0094-1
- Bradford-Grieve, J. M. (2002). Colonization of pelagic realm by calanoid copepods. *Hydrobiologia*, 485: 223–44.
- Bradford-grieve, J. M., Boxshall, G. A., Ahyong, S. T., & Ohtsuka, S. (2010). Cladistic analysis of the calanoid Copepoda. *Invertebrate Systematics*, 24: 291–321.
- Bradford-Grieve, J. M., Markhaseva, E. L., Rocha, C. E. F., & Abiahy, B. (1999). Copepoda. *South Atlantic Zooplankton*, pp. 869–1098.
- Braga, E., Zardoya, R., Meyer, a., & Yen, J. (1999). Mitochondrial and nuclear rRNA based copepod phylogeny with emphasis on the Euchaetidae (Calanoida). *Marine Biology*, 133/1: 79–90. DOI: 10.1007/s002270050445
- Bucklin, A., Frost, B. W., Bradford-Grieve, J., Allen, L. D., & Copley, N. J. (2003). Molecular systematic and phylogenetic assessment of 34 calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae. *Marine Biology*, 142: 333–43. DOI: 10.1007/s00227-002-0943-1
- Bucklin, A., Guarnieri, M., Hill, R. S., Bentley, A. M., & Kaartvedt, S. (1999). Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive , species-specific PCR. *Hydrobiologia*, 401: 239–54.
- Bucklin, A., Hopcroft, R. R., Kosobokova, K. N., Nigro, L. M., Ortman, B. D., Jennings, R. M., & Sweetman, C. J. (2010). DNA barcoding of Arctic Ocean holozooplankton

- for species identification and recognition. *Deep-Sea Research II*, 57: 40–8. Elsevier. DOI: 10.1016/j.dsr2.2009.08.005
- Buhay, J. E. (2009). “COI-like” Sequences Are Becoming Problematic in Molecular Systematic and DNA Barcoding Studies. *Journal of Crustacean Biology*, 29/1: 96–110. DOI: 10.1651/08-3020.1
- Calderón, I., Garrabou, J., & Aurelle, D. (2006). Evaluation of the utility of COI and ITS markers as tools for population genetic studies of temperate gorgonians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 336: 184–97. DOI: 10.1016/j.jembe.2006.05.006
- Chen, G., & Hare, M. P. (2008). Cryptic ecological diversification of a planktonic estuarine copepod, *Acartia tonsa*. *Molecular ecology*, 17: 1451–68. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03657.x
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., et al. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one*, 5/1: 1–8. DOI: 10.1371/journal.pone.0008613
- Chu, K. H., Li, C. P., & Ho, H. Y. (2001). The first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in crustacea. *Marine biotechnology*, 3: 355–61. DOI: 10.1007/s10126001-0014-5
- Chum, P. Y., Haimes, J. D., André, C. P., Kuusisto, P. K., & Kelley, L. M. (2012). Genotyping of Plant and Animal Samples without Prior DNA Purification. *Journal of Visualized Experiments*, 67.
- Costa, K. G., Vallinoto, M., & Costa, R. M. (2011). Molecular identification of a new cryptic species of *Acartia tonsa* (Copepoda, Acartiidae) from the Northern coast of Brazil, based on mitochondrial COI gene sequences. *Journal of Coastal Research*, 64: 359–63.
- Cushing, B. D. H. (1950). THE VERTICAL MIGRATION OF PLANKTONIC CRUSTACEA. *Fisheries Laboratory, Lowestoft*, 1828: 158–92.
- Dias, C. O., & Araújo, A. V. (2006). Copepoda. *Atlas de zooplâncton da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira*, pp. 21–100.
- Fangping, C., Minxiao, W., Song, S., Chaolun, L., & Yongshan, Z. (2013). DNA barcoding of Antarctic marine zooplankton for species identification and recognition. *Advances in Polar Science*, 24/2: 119–27. DOI: 10.3724/SP.J.1085.2013.00119
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3/5: 294–9.

- Fosshagen, A., & Liffé, T. M. (1985). Two new genera of Calanoida and a new order of Copepoda from the marine caves of Bermuda. *Sarsia*, 70: 345–58.
- Goetze, E. (2003). Cryptic speciation on the high seas; global phylogenetics of the copepod family Eucalanidae. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270/11: 2321–31. DOI: 10.1098/rspb.2003.2505
- . (2010). Species discovery in marine planktonic invertebrates through global molecular screening. *Molecular ecology*, 19: 952–67. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04520.x
- . (2011). Population differentiation in the open sea: insights from the pelagic copepod *Pleuromamma xiphias*. *Integrative and comparative biology*, 51/4: 580–97. DOI: 10.1093/icb/icr104
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59/3: 307–21.
- Hajibabaei, M., Smith, M. A., Janzen, D. H., Rodriguez, J. J., Whitfield, J. B., & Hebert, P. D. N. (2006). A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, 6/4: 959–64. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01470.x
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of The Royal Society B*, 270/2: 313–21. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218
- Hernández, A. P., & Morales, E. S. (1994). *Copépodos pelágicos del Golfo de México y Mar Caribe - I. Biología y sistemática.*, p. 360.
- Hirai, J., Shimode, S., & Tsuda, A. (2013). Evaluation of ITS2-28S as a molecular marker for identification of calanoid copepods in the subtropical western North Pacific. *Journal of Plankton Research*, 0/0: 1–13. DOI: 10.1093/plankt/fbt016
- Huys, R., & Boxshall, G. A. (1991). *Copepod Evolution*, Vol. 12, p. 468. DOI: 10.2307/1548852
- Katoh, S. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772–80.
- Leising, A. W., Pierson, J. J., Halsband-Lenk, C., Horner, R., & Postel, J. (2005). Copepod grazing during spring blooms: Can *Pseudocalanus newmani* induce trophic cascades? *Progress in Oceanography*, 67: 406–21. DOI: 10.1016/j.pocean.2005.09.009

- Lindeque, P. K., Parry, H. E., Harmer, R. A., Somerfield, P. J., & Atkinson, A. (2013). Next Generation Sequencing Reveals the Hidden Diversity of Zooplankton Assemblages. *PloS one*, 8/11: 1–14. DOI: 10.1371/journal.pone.0081327
- Llinás, L. (2008). *Distribution , Reproduction , and Transport of Zooplankton in the Western Arctic*.
- Lopes, R. M., Brandini, F. P., & Gaeta, S. A. (1999). Distribution patterns of epipelagic copepods off Rio de Janeiro (SE Brazil) in summer 1991 / 1992 and winter 1992. *Hydrobiologia*, 411: 161–74.
- Machida, R. J., & Tsuda, A. (2010). Dissimilarity of species and forms of planktonic Neocalanus copepods using mitochondrial COI, 12S, nuclear ITS, and 28S gene sequences. *PloS one*, 5/4: 1–6. DOI: 10.1371/journal.pone.0010278
- Nonomura, T., Machida, R. J., & Nishida, S. (2008). Stage-V copepodites of *Calanus sinicus* and *Calanus jashnovi* (Copepoda: Calanoida) in mesopelagic zone of Sagami Bay as identified with genetic markers, with special reference to their vertical distribution. *Progress in Oceanography*, 77: 45–55. DOI: 10.1016/j.pocean.2008.02.001
- Park, T. (1984). Phylogeny of calanoid copepods. *Syllogeus*, 58: 191–6.
- Pilgrim, E. M., & Pitts, J. P. (2006). A Molecular Method for Associating the Dimorphic Sexes of Velvet Ants (Hymenoptera : Mutillidae). *Journal of the kansas entomological society*, 79/3: 222–30.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular biology and evolution*, 25: 1253–6.
- Prosser, S., Martínez-Arce, A., & Elías-Gutiérrez, M. (2013). A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular ecology resources*, 13/6: 1–5. DOI: 10.1111/1755-0998.12132
- Ratnayake, W. N., & Ackman, R. G. (1979). Fatty alcohols in capelin, herring and mackerel oils and muscle lipids: I. Fatty alcohol details linking dietary copepod fat with certain fish depot fats. *Lipids*, 14/9: 795–803.
- Reygondeau, G., & Beaugrand, G. (2011). Future climate-driven shifts in distribution of *Calanus finmarchicus*. *Global Change Biology*, 17/2: 756–66. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2010.02310.x
- Richardson, a. J. (2008). In hot water: zooplankton and climate change. *ICES Journal of Marine Science*, 65/3: 279–95. DOI: 10.1093/icesjms/fsn028
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylo- genetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–4.

- Schukat, A., Auel, H., Teuber, L., Lahajnar, N., & Hagen, W. (2013). Complex trophic interactions of calanoid copepods in the Benguela upwelling system. *Journal of Sea Research*, 1–11. Elsevier B.V. DOI: 10.1016/j.seares.2013.04.018
- Schultz, J., Maisel, S., Gerlach, D., Müller, T., & Wolf, M. (2005). A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA Society*, 11: 361–4. DOI: 10.1261/rna.7204505.The
- Schultz, J., Müller, T., Achtziger, M., Seibel, P. N., Dandekar, T., & Wolf, M. (2006). The internal transcribed spacer 2 database--a web server for (not only) low level phylogenetic analyses. *Nucleic acids research*, 34: 1–4. DOI: 10.1093/nar/gkl129
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular ecology*, 21: 1794–805. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–9.
- Technelysium Pty Ltd. (2013). ChromasPro version 1.7.5.
- Urrere, M. A., & Knauer, G. A. (1981). Zooplankton fecal pellet fluxes and vertical transport of particulate organic material in the pelagic environment. *Journal of Plankton Research*, 3/3: 369–87.
- Veado, L. D., & Resgalla, J. C. (2005). Alteração da comunidade zooplanctônica do saco dos limões após impacto das obras da via expressa sul - Baía sul da ilha de Santa Catarina. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 9/2: 65–73.
- Verheye, H. M., & Field, J. G. (1992). Vertical distribution and diel vertical migration of *Calanoides carinatus* (Kroyer , 1849) developmental stages in the southern Benguela upwelling region. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 158: 123–40.
- Zervoudaki, S., Christou, E. D., Nielsen, T. G., Siokou-Frangou, I., Assimakopoulou, G., Giannakourou, a., Maar, M., et al. (2007). The importance of small-sized copepods in a frontal area of the Aegean Sea. *Journal of Plankton Research*, 29/4: 317–38. DOI: 10.1093/plankt/fbm018