

**MÔNICA PAIVA QUAST**

**INVESTIGAÇÃO DE LIMITES ESPECÍFICOS EM *CORBULA*  
(CORBULIDAE: BIVALVIA) DO SUDESTE E SUL DO BRASIL, COM  
BASE EM MARCADORES MOLECULARES**

**CAMPINAS**

**2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**MÔNICA PAIVA QUAST**

**INVESTIGAÇÃO DE LIMITES ESPECÍFICOS EM *CORBULA***  
**(CORBULIDAE: BIVALVIA) DO SUDESTE E SUL DO BRASIL, COM**  
**BASE EM MARCADORES MOLECULARES**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Mônica Paiva Quast*  
*Antonia Cecília Zacagnini Amaral*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da UNICAMP para  
obtenção do Título de Doutora em  
Ecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Antonia Cecília Zacagnini Amaral

Coorientadora: Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

**CAMPINAS,**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Q28i Quast, Mônica Paiva, 1977-  
Investigação de limites específicos em Corbula  
(Corbulidae: Bivalvia) do Sudeste e Sul do Brasil, com  
base em marcadores moleculares / Mônica Paiva Quast.  
– Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Antonia Cecilia Zacagnini Amaral.  
Coorientador: Vera Nisaka Solferini.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Corbulidae. 2. Taxonomia molecular. 3.  
Delimitação de espécies. 4. Material formolizado. I.  
Amaral, Antonia Cecilia Zacagnini, 1948-. II. Solferini,  
Vera Nisaka, 1957-. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Species boundaries in Corbula (Corbulidae: Bivalvia) from South-Southeastern Brazil based on molecular markers

**Palavras-chave em Inglês:**

Corbulidae

Molecular taxonomy

Species delimitation

Formalin-fixed specimens

**Área de concentração:** Ecologia

**Titulação:** Doutora em Ecologia

**Banca examinadora:**

Antonia Cecilia Zacagnini Amaral [Orientador]

Eliane Pintor de Arruda

Juliana José

José Eduardo Marian

Flavio Dias Passos

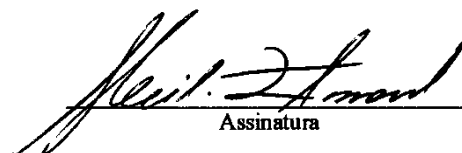
**Data da defesa:** 31-01-2013

**Programa de Pós Graduação:** Ecologia

Campinas, 31 de janeiro de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Profª. Dra. Antonia Cecilia Zacagnini Amaral  
(Orientadora)

  
Assinatura

Profª. Dra. Eliane Pintor de Arruda

  
Assinatura


Dra. Juliana José

  
Assinatura

Dr. José Eduardo Amoroso Rodriguez Marian

  
Assinatura

Prof. Dr. Flavio Dias Passos

  
Assinatura

Dra. Sonia Cristina da Silva Andrade

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Gustavo Muniz Dias

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Andre Victor Lucci Freitas

\_\_\_\_\_  
Assinatura



## Oração da PCR

Polimerase nossa, que estais no tubo,  
Otimizada seja a vossa reação;  
Venham a vós os nucleotídeos;  
Seja feito o alongamento,  
Assim *in vitro* como *in situ*;  
A banda nossa de cada dia nos dai hoje;  
Perdoai nossos erros de pipetagem,  
Assim como nós perdoamos a vossa estocasticidade;  
Não deixei formar bandas inespecíficas  
E livrai-nos de todo arrasto;  
Amém!

Autoria: M. P. Quast e A.O. Simões

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Cecília, que, de novo, confiou em mim e topou entrar em um mundo completamente diferente.

À minha coorientadora, Vera, pelas sugestões dadas para a realização do projeto e pela disponibilização do laboratório.

À FAPESP e à CAPES, pela concessão de bolsas de doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e aos Departamentos de Biologia Animal e de Genética e Evolução e Bioagentes do IB/Unicamp, pela disponibilização de recursos e infraestrutura para a realização da tese.

Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira, por disponibilizar equipamentos em seu laboratório.

Ao CEBIMar-USP, pela utilização da infraestrutura durante as coletas.

A todos que contribuíram com material biológico para a execução deste trabalho; em especial à Profa. Dra. Sônia Godoy Bueno Carvalho Lopes, que disponibilizou o material do IB/USP que se encontrava sob sua responsabilidade; e ao Dr. José Carlos Tarasconi, que cedeu parte de sua coleção particular.

À Profa. Dra. Eliane Pintor Arruda, pela identificação dos espécimes e compartilhamento do material.

À Profa. Dra. Eliane Pintor Arruda, à Dra. Márcia Regina Denadai e à Dra. Juliana José, pelas sugestões e considerações da pré-banca.

À Célia, secretária da Pós, por sempre dar um jeito em tudo.

À Silvana, por quebrar inúmeros galhos e sempre conseguir aquela informação que estava faltando.

À Célia, técnica do Laboratório de Diversidade Genética, sempre disposta a ajudar e se desdobrar para que os alunos possam trabalhar e se preocupar “só” com suas pesquisas.

Ao Thiago de Paula, por me apresentar o protocolo que finalmente fez as coisas andarem.

À Rute Clemente Carvalho e ao Carlos Tonhatti, por valiosas dicas de laboratório.

À Ana Cristina Donke, pela inestimável ajuda para separar as partes moles das conchas.

Aos companheiros de laboratório: Rachel, Guilherme, Micael, Thalita, Nathalia, Giulia, Tatiana, Aninha, Angélica, Juliana Vitali, Hélio, Décio, Élen, Rafael, Henrique, Luiz, Mauricio, João Giudice, João Vitonis, Camila Macrini, Fernanda, Priscila, Thadeu, Tércia... enfim, a todos, pelas trocas de experiências, pelas conversas, pela descontração nos momentos difíceis.

Em especial, aos amigos:

Léo, pelos muitos cafés, pelo ombro nas horas difíceis, por conferir a bibliografia da tese (nunca mais você se prontifica, né?);

Renata, pelas trocas de experiências no laboratório, pelas conversas virtuais, pelos mapas, pelas dicas valiosíssimas sobre formatação de figuras e textos, que me pouparam muito tempo;

Camila, pelos papos no almoço, pelas idas à feirinha, pelas caminhadas na lagoa (não foram tantas, mas foram divertidas);

Ju, minha “personal nerd”, pela ajuda com as análises, em especial com o Mac, pelos papos virtuais e pessoais, por entender todas minhas tirações de sarro e levar numa boa;

Marcela, por tantas discussões sobre ciência e sobre a vida, pelas risadas, pelas caminhadas na lagoa, por ter segurado a barra quando precisei, por entender esse meu jeito de ser.

Ao Prof. Sérgio Furtado dos Reis, por permitir a utilização da “casinha”, mas principalmente pelos nossos estudos e nossas discussões, que foram fundamentais para esta tese e para minha vida.

Aos meus pais, que, lá atrás, me deram todas as condições para que eu chegasse onde cheguei.

A Mel, Luna, Mila, Babinka e Spot, por terem sido minhas companhias durante a “fase de reclusão”, e garantirem meu riso diário e a dose necessária de (in)sanidade.

Ao André, no profissional: pela leitura da tese e de tantos relatórios, pela ajuda fundamental com os procedimentos de laboratório, pelo socorro com reagentes e ponteiras. E no pessoal: por estar sempre ao meu lado - no matter what - por ser quem é e me aceitar como eu sou, e me apoiar em todas minhas decisões, por mais malucas que possam parecer...

# Índice

Resumo .....	viii
Abstract.....	ix
Apresentação .....	1
Referências bibliográficas .....	6
1.Desenvolvimento de metodologias para obtenção de sequências de DNA de material de coleção.....	11
Resumo.....	11
1.1. Introdução.....	12
1.2. Material e Métodos.....	16
1.2.1. Material biológico .....	16
1.2.2. Desenvolvimento de protocolo de extração.....	18
1.2.3. Desenvolvimento de <i>primers</i> específicos.....	24
1.3. Resultados.....	27
1.3.1. Desenvolvimento de protocolo de extração.....	27
1.3.2. Desenvolvimento de <i>primers</i> específicos.....	30
1.4. Discussão .....	33
1.5. Referências bibliográficas .....	41
Apêndice 1 – Protocolos de extração de DNA total.....	60
Apêndice 2 - Preparação da solução de sílica.....	72
2.Delimitação de espécies de <i>Corbula</i> (Corbulidade, Bivalvia) da costa sudeste e sul do Brasil.....	73
Resumo.....	73
2.1. Introdução.....	74
2.2. Material e métodos .....	78
2.2.1. Obtenção de sequências.....	78
2.2.2. Delimitação de espécies .....	80
2.3. Resultados.....	87
2.4. Discussão.....	93
2.5. Referências bibliográficas .....	103
Considerações Finais .....	131

## Resumo

Espécies são unidades fundamentais da biologia e sua identificação é essencial para a pesquisa nos mais diversos campos. Esta tarefa, no entanto, é dificultada por limites interespecíficos naturalmente mal definidos, especialmente em ambientes marinhos, onde complexos de espécies crípticas são comuns. Assim, a delimitação de espécies tem recebido grande atenção nos últimos anos e técnicas moleculares têm se mostrado de grande importância para a questão. *Corbula* (Bivalvia: Corbulidae) é um gênero frequente e ecologicamente importante em comunidades bentônicas marinhas de sublitoral. A taxonomia do grupo é bastante confusa, em parte devido à plasticidade fenotípica das conchas que dificulta o estabelecimento de limites morfológicos entre as espécies. O presente estudo teve como objetivo estudar, com base em sequências de dois marcadores moleculares (COI e 16S), os limites entre seis espécies de *Corbula* morfológicamente identificadas da costa sudeste e sul do Brasil, de forma a testar a delimitação morfológica. Como se trata de espécies predominantemente de sublitoral, o material analisado encontrava-se preservado em álcool, havendo sido fixado em formol. Dessa forma, fez-se necessário o desenvolvimento de protocolos específicos de extração e amplificação. Uma combinação de extração orgânica com adsorção em sílica mostrou-se o melhor método de extração de DNA total. Para as reações de amplificação, a utilização de *nested* PCR produziu resultados superiores à PCR direta. As análises de delimitação utilizaram quatro métodos diferentes, dois baseados em árvores (GMYC e Brownie) e dois não (regra das 4x e ABGD). Os resultados divergiram entre métodos e marcadores, mas a combinação das diferentes linhas de evidência permitiu corroborar a delimitação morfológica de três espécies (*Corbula caribaea*, *Corbula tryoni* e *Corbula lyoni*). Os indivíduos identificados como *Corbula patagonica* dividiram-se em duas espécies distintas. O único indivíduo de *Corbula aequivalvis* foi considerado distinto das outras espécies e um indivíduo atribuído a *Corbula* sp1 não pôde ser distinguido de *C. caribaea*.

## Abstract

Species are fundamental unities in many biological studies and, being so, their identification is essential for researches in many different fields. This task, however, is complicated by badly defined interspecies boundaries, especially in the sea, where cryptic species are quite common. Species delimitation has been receiving much attention, and molecular techniques have been proved of great value to the matter. *Corbula* (Bivalvia, Corbulidae) is frequent and ecologically important genus in benthic marine communities. Nevertheless, its taxonomy is confusing, in part due to a plastic shell, which makes it difficult to establish species boundaries. This study aimed to analyze the COI and 16S sequences of six morphologically identified *Corbula* species occurring off the South-Southeastern Brazilian coast. Being a mainly sublittoral genus, most of the analyzed material had been previously sampled, fixed in formalin and preserved in alcohol. Hence, initially specific protocols for DNA extraction and PCR were developed. Better results were obtained with an extraction protocol combining organic extraction and silica adsorption. The nested PCR yielded more product than the direct PCR. Delimitation analyses were conducted with four different methods: two tree based (GMYC and Brownie) and two non-tree based (4x rule and ABGD). Different methods and markers produced different delimitations, but the combined evidence supports the morphological delimitation of three species: *Corbula caribaea*, *Corbula tryoni* and *Corbula lyoni*. Individuals assigned to *Corbula patagonica* were separated into two molecular species. Only one individual of *Corbula aequivalvis* was analyzed and it was distinguished from other species. One individual assigned to *Corbula* sp1 could not be distinguish from *C. caribaea*.

## Apresentação

O crescente interesse pela biodiversidade em diversos campos, como conservação, biologia evolutiva e ecologia (Jinbo *et al.* 2011), contrasta com uma grande proporção dessa diversidade que permanece desconhecida (Monaghan *et al.* 2009). Diversos autores apontam, então, para a necessidade de acelerar os inventários e descobertas de novas espécies (Hebert *et al.* 2003, Monaghan *et al.* 2009, Jinbo *et al.* 2011, Esselstyn *et al.* 2012). Uma forma de atingir este objetivo é a utilização de ferramentas moleculares, que ganharam grande destaque principalmente com o código de barras de DNA (*DNA barcode*) proposto por Hebert *et al.* (2003) e a criação do *Consortium for the Barcode of Life* (CBoL, <http://barcoding.si.edu>). A utilização de informações do DNA traz diversas vantagens sobre a morfologia (Graur e Li 2000, Avise 2004). Para a taxonomia, a principal delas é o fato de serem características estritamente herdáveis, que não sofrem, portanto, influência ambiental. Além disso, é possível obter uma grande quantidade de caracteres, com estados bem definidos. Em termos de estudos evolutivos, a utilização do DNA torna mais simples o desenvolvimento de modelos matemáticos, uma vez que há apenas quatro estados de caráter.

A popularização das técnicas moleculares gerou, inicialmente, um conflito entre a taxonomia tradicional, baseada principalmente na morfologia, e a molecular. Moritz e Hillis (1996), no entanto, destacam que a verdadeira preocupação dos sistematistas deveria ser a adequação das características estudadas, independentemente de sua natureza, para responder às questões propostas. Esta visão tem prevalecido nos últimos anos, e mesmo

aqueles que não apoiam a descrição da diversidade com base apenas em dados moleculares reconhecem a importância de uma abordagem multidisciplinar, chamada de taxonomia integrada (Dayrat 2005, Meyer e Paulay 2005, Sauer e Hausdorf 2012).

A taxonomia integrada tem sido uma das áreas que mais cresce dentro da biologia. Cada vez mais autores chamam a atenção para a necessidade de se utilizar dados de diferentes fontes nos estudos de biodiversidade, ressaltando a inclusão de dados moleculares (Ferri *et al.* 2009, Winker 2009). Para tanto, é necessário que sejam geradas informações sobre a diversidade das espécies em nível molecular, e muitos são os trabalhos dedicados à delimitação específica com base em marcadores moleculares. Especial atenção tem sido dada a casos para os quais a taxonomia tradicional, baseada principalmente na morfologia, é de difícil aplicação, como meiofauna (Tang *et al.* 2012), fungos (Powell *et al.* 2011), nemátodes (Ferri *et al.* 2009), tardígrados (Blaxter *et al.* 2004) e microorganismos (Powell 2012). Devido à plasticidade de suas conchas, que causa, muitas vezes, dificuldades na identificação e delimitação de espécies (Puillandre *et al.* 2009), a taxonomia de moluscos também têm se beneficiado de métodos moleculares, embora ainda poucos estudos malacológicos utilizem esses dados como evidência no nível de espécie (Mikkelsen 2011).

Os moluscos bivalves da família Corbulidae Lamarck, 1818 são facilmente reconhecidos morfologicamente (Coan 2002). Sua monofilia já foi evidenciada molecularmente por Giribet e Wheeler (2002) e Taylor *et al.* (2007), mas a taxonomia infra-familiar é confusa, com diagnoses imprecisas e extensas listas de sinônimos (Anderson 1996, Mikkelsen e Bieler 2001, Coan 2002). Coan (2002) afirmou que mais caracteres devem ser estudados para resolver os problemas taxonômicos da família; porém, como



ressaltaram Mikkelsen e Bieler (2001), caracteres da concha de corbulídeos, tradicionalmente usados na taxonomia do grupo, parecem pouco robustos e inconsistentes para distinguir grupos infrafamiliares. Assim, a taxonomia do grupo provavelmente deve se beneficiar de estudos moleculares.

A família Corbulidae ocorre em todo o mundo, com exceção dos polos, e compreende cerca de 85 espécies (Coan *et al.* 2000). São animais pequenos (geralmente, menores que 2 cm), que se enterram superficialmente no substrato, principalmente lamoso, ocorrendo normalmente em profundidades maiores que 4 m. A concha é grossa e inequivalve, sendo a valva direita maior, e frequentemente com um prolongamento na região posterior (rosto). A charneira bastante típica apresenta, na valva direita, um dente cardinal robusto e, na valva esquerda, uma estrutura geralmente côncava (condróforo), que se projeta além do platô da charneira e na qual o resílio está preso. Os lobos do manto são fundidos, com uma pequena abertura pediosa, além das aberturas sifonais; o pé é pequeno, comprimido e bissado (Coan *et al.* 2000).

No Brasil, a família é frequente, tendo sido uma das mais coletadas durante o Programa “Biodiversidade Bêntica Marinha no Estado de São Paulo” (BIOTA/FAPESP – Bentos Marinho) (Arruda *et al.* 2011) e também um dos grupos de bivalves mais abundantes no levantamento realizado pelo Programa “Avaliação do Potencial Sustentável de Recursos Vivos na Zona Econômica Exclusiva”, REVIZEE - Score Sul (Arruda *et al.* 2004). Como no resto do mundo, os corbulídeos no Brasil são comuns principalmente na região sublitorânea, mas alguns trabalhos registraram sua presença também na região entremarés, onde são menos abundantes (Arruda e Amaral 2003).

Em número de táxons, segundo Rios (1994), a família está representada no Brasil

por oito espécies marinhas: *C. (Corbula) caribaea* d'Orbigny, 1853; *C. (Corbula) lyoni* Pilbsbry, 1897; *C. (Corbula) patagonica* d'Orbigny, 1846; *C. (Corbula) tryoni* E. A. Smith, 1880; *C. (Caryocorbula) cymella* Dall, 1881; *C. (Caryocorbula) dietziana* C. B. Adams, 1852; *C. (Juliacorbula) aequivalvis* Philippi, 1836 e *C. (Varicorbula) operculata* Philippi, 1848. Recentemente, Arruda *et al.* (2007) descreveram uma nova espécie, *Corbula tarasconii*, para a costa da Bahia, aumentando o número de espécies brasileiras para nove. As espécies brasileiras, assim como a maioria das outras espécies de Corbulidae, foram descritas originalmente como pertencentes ao gênero *Corbula*, e diferentes subgêneros foram criados. Vokes (1945) realizou uma revisão taxonômica do grupo e elevou estes subgêneros a gêneros, apresentando boas diagnoses para cada um. Abbott (1974), seguido por outros autores (por exemplo, Rios 1994) incluiu novamente os subgêneros em *Corbula*, sem, contudo, apresentar justificativas para isso. Atualmente, um trabalho de revisão está sendo conduzido e aponta para a necessidade de se reevidenciar os subgêneros (E. P. Arruda, com. pess.). No entanto, como este trabalho ainda não foi concluído e restam algumas dúvidas sobre as reais circunscrições dos gêneros, optou-se por manter, no presente, todas as espécies como pertencentes ao gênero *Corbula*.

Quanto à distribuição, os poucos estudos realizados até o presente revelam que *C. lyoni* e *C. patagonica* ocorrem do sudeste brasileiro ao Golfo Novo, na costa argentina; *C. dietziana*, *C. cymella*, *C. aequivalvis* e *C. operculata*, desde o sul dos Estados Unidos até a costa sudeste do Brasil; *C. tryoni* do nordeste brasileiro até o Uruguai; e *C. caribaea* tem uma distribuição mais ampla, indo do sul dos Estados Unidos até o Golfo Novo (Castellanos 1967, Rios 1994).

Algumas espécies de Corbulidae registradas para o Brasil, assim como outras da família,

apresentam extensas listas de sinônimos (Warmke e Abbott 1961, Altena 1971, Abbott 1974, Rios 1994, Mikkelsen e Bieler 2001). Atualmente, a Profa. Eliane Pintor Arruda (Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR-Campus Sorocaba) está preparando uma revisão taxonômica das espécies brasileiras e desenvolvendo estudos morfológicos e morfométricos da concha. Uma vez que este trabalho exigiu uma cuidadosa identificação dos espécimes por parte de E. P. Arruda, surgiu a oportunidade para uma análise molecular dessas espécies, de forma que esta pudesse ser comparada com a delimitação morfológica, testando, assim, a hipótese de delimitação proposta pela taxonomista. Neste contexto, a presente tese teve como objetivo delimitar molecularmente as espécies de *Corbula* das regiões Sudeste e Sul do Brasil. Para tanto, foram analisados espécimes atribuídos a cinco espécies, *C. caribaea*, *C. tryoni*, *C. patagonica*, *C. lyoni* e *C. aequivalvis* (Figura A). Além disso, foram estudados exemplares de uma morfoespécie, denominada *Corbula* sp1.

Uma vez que o material havia sido previamente coletado e, muitas vezes, fixado em formol, houve a necessidade de primeiro se desenvolver métodos adequados de extração de DNA e amplificação. O que muitas vezes é uma parte trivial das análises moleculares revelou-se de grande importância quando se trata de material preservado sem o objetivo específico de análises moleculares. O primeiro capítulo apresenta, então, os resultados para os diversos métodos testados e uma discussão sobre a melhor abordagem para se trabalhar com material de coleção.

O segundo capítulo trata das análises de delimitação propriamente ditas. São apresentadas considerações sobre possíveis causas dos padrões observados. Também é feita uma breve discussão sobre os métodos utilizados, tratando de suas vantagens e desvantagens.

## Referências bibliográficas

- Abbott, R. T. 1974. *American Seashells*. 2a. edição. van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Altena, C. O. 1971. The marine Mollusca of Suriname (Dutch Guiana) holocene and recent. Part II: Bivalvia and Scaphopoda. *Zoologische Verhandliger* **119**: 1-100.
- Anderson, L. C. 1996. The family Corbulidae (Mollusca: Bivalvia). *Bulletins of American Paleontology* **110**: 5-34.
- Arruda, E. P. e A. C. Z. Amaral. 2003. Spatial distribution of mollusks in the intertidal zone of sheltered beaches in southeastern of Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* **20**: 291-300.
- Arruda, E. P., M. P. Quast, M. J. Chelini, S. G. B. Lopes, M. A. O. Gonçalves, A. A. Araújo, e A. C. Z. Amaral. 2004. Classe Bivalvia. pp: 88-96. In A. C. Z. Amaral e C. L. D. B. Rossi-Wongtschowski. *Biodiversidade Bentônica da Região Sudeste do Brasil – Plataforma Externa e Talude Superior*. Instituto Oceanográfico/USP, São Paulo.
- Arruda, E. P., O. Domaneschi, J. d. A. Francisco, e J. C. N. de Barros. 2007. *Corbula tarasconii*, a new species of Corbulidae (Bivalvia) from offshore Brazil. *Nautilus* **121**: 201-209.
- Arruda, E. P., M. R. Denadai, M. P. Quast, e A. A. C. Z. 2011. Bivalvia. pp: 236-250. In: A. C. Z. Amaral e S. A. H. Nallin. *Biodiversidade e Ecossistemas Bentônicos Marinhos do Litoral Norte de São Paulo, Sudeste do Brasil*. e-book: <http://www.ib.unicamp.br/biblioteca/pubdigitais>
- Avise, J. C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2a. edição. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland.

- Blaxter, M., B. Elsworth, e J. Daub. 2004. DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an unexpected diversity of tardigrades. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **271**: S189-S192.
- Castellanos, Z. J. A. 1967. Catalogo de los moluscos bonaerenses. *Annales de la Comission de Investigación Científica de la Provincia de Buenos Aites, La Plata*: 268-271.
- Coan, E. V. 2002. The eastern Pacific recent species of the Corbulidae (Bivalvia). *Malacologia* **44**: 47-105.
- Coan, E. V., P. V. Scott, e F. R. Bernard. 2000. *Bivalve seashells of Western North America*. Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**: 407-415.
- Esselstyn, J. A., B. J. Evans, J. L. Sedlock, F. A. A. Khan, e L. R. Heaney. 2012. Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule-coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. *Proceedings of the Royal Society, Series B* **279**: 3678-3686.
- Ferri, E., M. Barbuto, O. Bain, A. Galimberti, S. Uni, R. Guerrero, H. Ferte, C. Bandi, C. Martin, e M. Casiraghi. 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology* **6**: 1.
- Giribet, G. e W. Wheeler. 2002. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology* **121**: 271-324.
- Graur, D. e W. Li. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. 2ª. edição. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland.

- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, e J. R. DeWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **270**: 313-321.
- Jinbo, U., T. Kato, e M. Ito. 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science* **14**: 107-124.
- Meyer, C. P. e G. Paulay. 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biology* **3**: 2229-2238.
- Mikkelsen, P. M. 2011. Speciation in modern marine bivalves (Mollusca: Bivalvia): Insights from the published record. *American Malacological Bulletin* **29**: 217-245.
- Mikkelsen, P. M. e R. Bieler. 2001. *Varicorbula* (Bivalvia: Corbulidae) of the western Atlantic: Taxonomy, anatomy, life habits, and distribution. *Veliger* **44**: 271-293.
- Monaghan, M. T., R. Wild, M. Elliot, T. Fujisawa, M. Balke, D. J. G. Inward, D. C. Lees, R. Ranaivosolo, P. Eggleton, T. G. Barraclough, e A. P. Vogler. 2009. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology* **58**: 298-311.
- Moritz, C. e D. M. Hillis. 1996. Molecular Systematics: COntext and Controversies, pp: 1-13. *In*: Hillis, D. M., C. Moritz e B. K. Mable (eds). *Molecular Systematics*. 2a. edição. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland.
- Powell, J. R. 2012. Accounting for uncertainty in species delineation during the analysis of environmental DNA sequence data. *Methods in Ecology and Evolution* **3**: 1-11.
- Powell, J. R., M. T. Monaghan, M. Oepik, e M. C. Rillig. 2011. Evolutionary criteria outperform operational approaches in producing ecologically relevant fungal species inventories. *Molecular Ecology* **20**: 655-666.
- Puillandre, N., M. Baylac, M.-C. Boisselier, C. Cruaud, e S. Samadi. 2009. An integrative approach to species delimitation in *Benthomangelia* (Mollusca: Conoidea). *Biological Journal of the Linnean Society* **96**: 246-255.

- Rios, E. C. 1994. *Seashells of Brazil*. 2ª. edição. Editora da FURGS, Rio Grande.
- Sauer, J. e B. Hausdorf. 2012. A comparison of DNA-based methods for delimiting species in a Cretan land snail radiation reveals shortcomings of exclusively molecular taxonomy. *Cladistics* **28**: 300-316.
- Tang, C. Q., F. Leasi, U. Obertegger, A. Kieneke, T. G. Barraclough, e D. Fontaneto. 2012. The widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity surveys of the meiofauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 16208-16212.
- Taylor, J. D., S. T. Williams, E. A. Glover, e P. Dyal. 2007. A molecular phylogeny of heterodont bivalves (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta): new analyses of 18S and 28S rRNA genes. *Zoologica Scripta* **36**: 587-606.
- Warmke, G. e R. T. Abbott. 1961. *Caribbean Seashells. A Guide to the Marine Mollusks of Puerto Rico and other West Indian Islands, Bermuda and the Lower Florida Keys*. Dover Publications, New York.
- Winker, K. 2009. Reuniting phenotype and genotype in biodiversity research. *BioScience* **59**: 657-665.



Figura A. Espécies de *Corbula* analisadas no presente estudo. A e B: *Corbula caribaea*; C: *Corbula tryoni*; D: *Corbula patagonica*; E: *Corbula lyoni*; F: *Corbula aequivalvis*. Barras de escala = 1 mm.



# 1. Desenvolvimento de metodologias para obtenção de sequências de DNA de material de coleção

## Resumo.

A utilização de material de coleções para obtenção de sequências de DNA abre novas possibilidades de estudo, como análises de variação temporal e de espécies de difícil obtenção. No entanto, os processos utilizados para a preservação desse material afetam o DNA, o que requer o desenvolvimento de protocolos específicos para esse tipo de estudo. Com o objetivo de se obter sequências de DNA para um estudo de limites específicos de *Corbula*, foram testados diferentes protocolos de extração de DNA total bem como de PCR. Para a extração, os melhores resultados foram obtidos com um protocolo que combina a extração orgânica com um método caseiro de adsorção em sílica, além da lavagem prévia do tecido em tampão e do tempo prolongado de lise com proteinase K. Para as reações de amplificação, a técnica *nested* PCR, usando *primers* internos específicos, mostrou-se superior à PCR direta. Os primeiros sequenciamentos feitos revelaram um alto índice de contaminação. Medidas tomadas a partir daí, como desinfecção da bancada com hipoclorito de sódio e exposição das pipetas à luz UV, mostraram-se eficazes em reduzir a amplificação de sequências indesejadas.

## 1.1. Introdução

Coleções biológicas têm sido formadas ao longo dos séculos por diferentes motivos, desde a simples vontade de colecionar até a organização sistemática do conhecimento científico (Puillandre *et al.* 2012a). Como consequência, as coleções hoje existentes, mesmo as que não tenham sido originalmente concebidas para fins científicos, têm grande valor para diversas áreas de pesquisa, constituindo um registro da biodiversidade ao longo do tempo (Wandeler *et al.* 2007, Rainbow 2009, Hoeksema *et al.* 2011), além de um registro da história da taxonomia dos seres vivo (Puillandre *et al.* 2012a).

Originalmente, as coleções foram criadas para preservar aspectos morfológicos das espécies. Recentemente, no entanto, tem crescido o interesse em usar coleções como fonte de material para estudos moleculares. Este material possibilita o estudo genético de populações já extintas (Hoeksema *et al.* 2011) ou a análise do efeito de ações antropogênicas sobre populações (Rainbow 2009). O material depositado em coleções também torna viável o estudo de espécies difíceis de coletar, como as representantes da macrofauna bentônica de grandes profundidades (Chase *et al.* 1998a, Zardus *et al.* 2006). O estudo molecular desse material, no entanto, demanda um trabalho específico e cuidadoso.

Espécimes de coleções científicas encontram-se preservados de alguma forma. Para espécies da macrofauna bentônica marinha, a preservação normalmente é feita em etanol 70%. Antes disso, porém, as amostras muitas vezes são fixadas em formol, como parte do procedimento de coleta de projetos de levantamento faunístico. Assim, a extração e amplificação de DNA a partir de espécimes de coleção tem se mostrado possível, mas bastante complexa. Vários autores já relataram estratégias para estes estudos (Nishiguchi *et*

*al.* 2002, Schander e Halanych 2003, Boyle *et al.* 2004, Bucklin e Allen 2004, Tang 2006), mas estes trabalhos estão longe de esgotar o assunto. Não há um consenso sobre a melhor técnica de extração de DNA total e protocolos de amplificação bem sucedidos em alguns trabalhos não são eficientes em outros.

O procedimento de extração de DNA pode ser dividido em seis etapas. Na primeira, o tecido é macerado ou triturado, quebrando mecanicamente as células. Na etapa seguinte, chamada de lise, o macerado é suspenso em uma solução contendo algum detergente, antioxidantes, EDTA e um agente tamponante, visando à solubilização de membranas lipoproteicas e denaturação de proteínas. Essa suspensão é, então, incubada a uma temperatura entre 40° e 60°C. A terceira etapa é a extração propriamente dita: o DNA é separado dos outros componentes celulares e, em seguida, na quarta etapa, é recuperado, geralmente por precipitação com algum álcool. O DNA, então, passa por uma limpeza na quinta etapa, para remoção de compostos não desejados que ainda estejam presentes. Na última etapa, o DNA é ressuspenso em uma solução tamponada.

Os métodos de extração diferem entre si basicamente na terceira etapa, ou seja, no modo como o DNA é separado dos outros componentes. Nos métodos orgânicos, essa separação é feita com solventes orgânicos (fenol, clorofórmio e álcool isoamílico). As proteínas e outros componentes celulares são dissolvidos na fase orgânica, enquanto o DNA permanece na fase aquosa. É feita, então, a precipitação do DNA. Outro grupo de métodos trabalha com a ligação seletiva do DNA a algum suporte sólido (sílica ou resina de troca iônica): enquanto o DNA permanece ligado ao suporte, os outros componentes celulares são lavados. O DNA é então recuperado através da lavagem com uma solução que reverte a ligação. Este é o método dos kits que utilizam membranas de sílica adaptadas em

colunas; neste caso, o DNA é lavado da membrana com a própria solução tampão em que será armazenado, eliminando a etapa de precipitação. O último grupo de métodos envolve a precipitação das proteínas por sais (*salting-out*); usando altas concentrações de sais, como acetato de potássio ou acetato de amônio, as proteínas e outros componentes são precipitados, e, em seguida, o DNA é recuperado da fase aquosa.

A amplificação ou reação em cadeia da polimerase (PCR na sigla em inglês) é uma reação de síntese *in vitro* de cópias de um segmento específico de DNA, na presença de uma enzima DNA-polimerase. A reação se baseia no anelamento e extensão de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*), que delimitam a sequência de DNA alvo. A repetição de ciclos de denaturação das moléculas de DNA, anelamento de *primers* e extensão resulta na amplificação exponencial da sequência desejada (Becker *et al.* 1996).

O primeiro problema para a extração de DNA de material de coleção surge da degradação das moléculas de DNA. Amostras extraídas de tecidos fixados tendem a apresentar apenas fragmentos curtos e em pequeno número (Bucklin e Allen 2004). Além da degradação, o formol se liga firmemente aos tecidos (Nishiguchi *et al.* 2002) e promove *cross-link* (ligação química entre polímeros) das moléculas de DNA entre si e com proteínas (Bucklin e Allen 2004, Tang 2006). Essas ligações dificultam as reações de amplificação, uma vez que as moléculas de DNA se tornam indisponíveis para a polimerase. Acredita-se que esse *cross-link* não seja destrutivo e possa ser revertido (Tang 2006). Muito tem se discutido sobre como superar esse obstáculo (Tang 2006), mas ainda não se sabe exatamente como o formol atua sobre o DNA, o que dificulta medidas mais efetivas (Shedlock *et al.* 1997, Schander e Halanych 2003, Boyle *et al.* 2004). Neste

contexto, têm se mostrado fundamentais a troca de experiências com outros pesquisadores e a utilização de informações disponíveis em fóruns e listas de discussão na Internet (por exemplo, [www.protocol-online.org](http://www.protocol-online.org); [www.uoguelph.ca/mmnw](http://www.uoguelph.ca/mmnw); [www.bio.net/biomail/listinfo/mol-evol](http://www.bio.net/biomail/listinfo/mol-evol)), como ressaltam Nishiguchi *et al.* (2002) e Tang (2006).

Dentre os campos em que o uso de informações obtidas de sequências de DNA tem sido ampliado, está a taxonomia. A chamada taxonomia integrada tem sido uma das áreas que mais cresce dentro da biologia. Cada vez mais autores chamam a atenção para a necessidade de utilizar dados de diferentes fontes nos estudos de biodiversidade, ressaltando a inclusão de dados moleculares (Ferri *et al.* 2009, Winker 2009). O uso de sequências de DNA para auxiliar na identificação de espécies tem sido cada vez mais frequente (Ferri *et al.* 2009, Guarniero *et al.* 2010, Cox *et al.* 2012, Fernandez *et al.* 2012), especialmente em sistemas em que esta identificação é intrinsecamente difícil (Knowlton 1993, Tang *et al.* 2012). Por exemplo, a família Corbulidae (Bivalvia) é um grupo bem definido tanto morfológicamente quanto molecularmente (Giribet e Wheeler 2002, Taylor *et al.* 2007). A taxonomia infrafamiliar, no entanto, apresenta uma série de controvérsias (Keen 1969, Rios 1994, Anderson 1996, Coan *et al.* 2000, Mikkelsen e Bieler 2001, Coan 2002). As dificuldades são notórias em nível de espécie, onde diagnoses imprecisas levam a extensas listas de sinônimos observadas nos trabalhos de revisão do grupo (Keen 1969, Anderson 1996, Coan *et al.* 2000, Mikkelsen e Bieler 2001, Coan 2002).

Estudos moleculares de Corbulidae esbarram no fato dessa família ocorrer principalmente no sublitoral (Coan *et al.* 2000), o que dificulta uma coleta específica. Por outro lado, suas espécies são frequentemente coletadas por projetos de levantamento faunístico e monitoramento de áreas, o que significa que há grande disponibilidade de

material, porém fixado e preservado em via úmida. Assim, no contexto do objetivo geral do presente trabalho, de estudar a diversidade molecular das espécies de *Corbula*, mostrou-se necessário, primeiro, desenvolver uma metodologia, para extração e amplificação de DNA adequada.

## **1.2. Material e Métodos**

### **1.2.1. Material biológico**

O material utilizado neste trabalho provém de diferentes projetos realizados ao longo da costa sudeste e sul do país (Tabelas 1.1 e 1.2; Figura 1.1), sendo coletado predominantemente no sublitoral. Dessa forma, não é possível detalhar os métodos de coleta de cada um. Porém, de modo geral, coletas da macrofauna bentônica neste ambiente seguem uma metodologia semelhante à de Amaral e Rossi-Wongtschowski (2004) e Amaral *et al.* (2006), que envolve, primeiramente, a fixação do sedimento coletado em formol 6% e posterior triagem em peneiras de malha maior que 0,5 mm. Após a triagem, os animais coletados são preservados em etanol 70%. Coletas na região entremarés, como as realizadas pelo projeto BIOTA/FAPESP – Bentos Marinho, também envolvem a coleta de sedimento para posterior triagem em peneiras. Neste caso, no entanto, normalmente não há a fixação deste sedimento em formol 6%. Os animais são fixados diretamente em etanol 70%, após a triagem na peneira.

A área abrangida no estudo se estende do norte do Estado do Rio de Janeiro (Bacia de Campos) até o norte do Estado de Santa Catarina (Enseada de Zimbros). Há um predomínio de coletas no Estado de São Paulo, especialmente São Sebastião. Neste município, além da existência do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMAR/USP), há também o Terminal Marítimo Almirante Barroso (Tebar), cujo monitoramento nos anos de 2002 e 2003 resultou na coleta de indivíduos aqui analisados. A Bacia de Campos também está bem representada devido à presença de material proveniente do monitoramento realizado na área pela Petrobrás, entre os anos de 1991 e 1992. Por fim, também há um grande número de indivíduos da Enseada de Zimbros, no Estado de Santa Catarina, graças ao trabalho do presidente do Centro de Estudos Marinhos do Atlântico Sul, Dr. José Carlos Tarasconi. As datas de coleta também variam bastante. O material mais antigo é de 1979/1980, coletado pela Profa. Dra. Sônia Godoy Bueno Carvalho Lopes (USP), em Ubatuba, SP. No entanto, a maior parte das coletas foi feita há cerca de 20 anos ou menos. Todo o material foi previamente analisado e identificado pela Profa. Eliane Pintor Arruda.

Além deste material coletado previamente, algumas coletas foram realizadas com o intuito de se obter material recente para servir como controles positivos no desenvolvimento do protocolo de extração e também para desenvolvimento de *primers* específicos (Tabela 1.3). Para o desenvolvimento do protocolo de extração, utilizaram-se espécimes de *Perna perna* e *Brachidontes* sp. (Mytilidae) e *Sphenia* sp. (Myidae), espécies facilmente encontradas na região entremarés de costões rochosos, motivo pelo qual foram escolhidas. Estes indivíduos foram coletados no costão da praia do Itararé, Município de São Vicente, SP (23°58'S 46°21'W), e congelados a -20°C para posterior extração do

DNA. A utilização desse material visou à verificação da eficiência dos protocolos de extração e de PCR para moluscos bivalves, bem como dos reagentes utilizados. Indivíduos de *Corbula* sp. também foram coletados, principalmente para o desenvolvimento de *primers* específicos. Essas coletas foram realizadas de forma exploratória na Baía do Araçá, Município de São Sebastião, SP (23°49'S 45°24'W), tanto na região entremarés, onde há um registro prévio da ocorrência de Corbulidae (Arruda e Amaral 2003), quanto no sublitoral. Na região entremarés, a coleta foi realizada próxima à linha da maré baixa, com o auxílio de pá e peneira. Também foi utilizado material coletado da mesma forma e no mesmo local pelo Prof. Flávio Dias Passos (Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – IB/Unicamp). No sublitoral, foi utilizada uma draga retangular (boca 10 x 40 cm) arrastada por três vezes entre 2 e 5 m de profundidade. Os arrastos foram realizados até se perceber que a rede estava cheia. O sedimento obtido foi triado em seguida com água corrente em peneira de malha 1 mm. Os indivíduos de *Corbula* encontrados foram fixados em álcool absoluto e identificados como *C. caribaea*. Ao longo deste texto, o termo “recém-coletado” é usado para se referir a esses espécimes que, embora fixados, foram coletados há pouco tempo. Por outro lado, o termo “material de coleção” refere-se ao material previamente coletado, citado anteriormente.

### **1.2.2. Desenvolvimento de protocolo de extração**

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Diversidade Genética do Departamento de Genética e Evolução e Bioagentes



(IB/Unicamp). Diversos protocolos foram testados, tanto em material recém (congelado e fixado) quanto previamente coletado. Três métodos básicos foram utilizados, a partir dos quais se testaram modificações (Tabela 1.4 - protocolos completos no Apêndice 1). Optou-se primeiramente pela utilização de um método de extração orgânica com lise por CTAB, baseado no protocolo de Doyle e Doyle (1987). A partir deste protocolo, três outros foram testados (protocolos 1, 2, 3), inclusive um já em uso no Laboratório de Diversidade Genética (protocolo 1). Duas das principais alterações desses protocolos em relação ao de Doyle e Doyle (1987) foram feitas na etapa de lise: utilização de proteinase K e tempo de incubação prolongado. Outra alteração diz respeito à precipitação de DNA, feita a temperatura ambiente por Doyle e Doyle (1987), mas em freezer ou biofreezer nos protocolos testados. Também o tempo de precipitação foi prolongado para até 72h.

Outro método de extração utilizado foi o de adsorção em membrana de sílica. Este método está implementado em kits comerciais de extração, como os da QIAGEN. Utilizando o kit QIAamp DNA FFPE Tissue (QIAGEN), foram testadas as alterações sugeridas por Chase *et al.* (1998b - protocolo 4, desenvolvido especificamente para moluscos fixados em formol) e A. G. McArthur (com. pess. - Consultor privado em genômica e bioinformática, Hamilton, Canadá; protocolo 5). Além disso, os mesmos protocolos foram testados com o kit NucleoSpin Tissue (MN). A principal alteração em relação ao protocolo sugerido no manual do kit é o tempo de lise bastante prolongado (96h no total, sendo a proteinase K acrescentada ao fim das primeiras 24h). Um terceiro kit, também da MN, foi utilizado: o NucleoSpin Tissue XS, semelhante ao NucleoSpin Tissue, porém com as colunas mais estreitas, facilitando a extração de DNA a partir de pequenas quantidades de tecido. Para utilizar este kit, foi feita uma adaptação do protocolo de Chase

*et al.* (1998b), reduzindo-se os volumes das soluções utilizadas (protocolo 6). Para tanto, procurou-se seguir as proporções sugeridas no manual do kit NucleoSpin Tissue XS.

O terceiro método testado foi o *salting-out*, utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Este método foi adaptado por C. Dayton ([www.dmacc.cc.ia.us/instructors/cmeckerman/formalin/Formalin\\_Fixed\\_DNA.htm](http://www.dmacc.cc.ia.us/instructors/cmeckerman/formalin/Formalin_Fixed_DNA.htm)) para extração de DNA de material fixado em formol (protocolo 7), utilizando um kit equivalente (Gentra Puregene, QIAGEN). As principais alterações são o tempo prolongado de lise e a incubação do tecido em GTE antes de se iniciar o processo de extração. Essa incubação é feita em grande quantidade de tampão (10 ml) durante 72h, com troca do tampão a cada 24h.

Algumas das alterações feitas são, na verdade, passos de outros protocolos. Por exemplo, no protocolo 3, que utiliza a extração orgânica, a etapa de lise baseou-se no protocolo de Chase *et al.* (1998b), que utiliza a extração por adsorção em membrana de sílica. Tais combinações de protocolos são comuns (Nishiguchi *et al.* 2002). Por exemplo, no Laboratório Jodrell (Royal Botanic Garden, Kew, Inglaterra) a extração orgânica é seguida pela adsorção em membrana de sílica para obter amostras de DNA de maior qualidade, inclusive de material de herbário, que apresenta DNA degradado. O protocolo utilizado nesse laboratório também foi testado, com um tempo de lise mais prolongado (protocolo 8).

O protocolo sugerido por de Paula (2009) também é uma combinação da extração orgânica com a adsorção em sílica, semelhante ao protocolo 8. Trata-se, porém, de uma versão caseira (sem o uso de kits comerciais), comumente utilizada para a extração de DNA de fósseis (Hoss e Paabo 1993, Rohland e Hofreiter 2007). O método baseia-se em lise com

tampão de guanidina (GuSCN ou GuHCl) seguida de extração orgânica com clorofórmio. As etapas seguintes envolvem a adsorção em sílica propriamente dita e a lavagem com etanol 95%. Por fim, uma solução de Tris-HCl com pH básico é utilizada para a eluição final. Ao protocolo de Paula (2009) foi acrescentado um passo de lavagem dos tecidos antes do início do procedimento de extração (protocolo 9). Para isso, os tecidos foram deixados imersos em 10 ml de GTE por 72h, trocando a solução a cada 24h, seguindo Shedlock *et al.* (1997). Além disso, acrescentou-se proteinase K ao tampão de lise. Optou-se também por picar cuidadosamente o tecido em vez de macerá-lo. Quando se trata de material de coleção, este procedimento é considerado mais adequado do que a maceração, para reduzir a possibilidade de fragmentação das moléculas de DNA (Tang 2006). Para testar este protocolo, foi feita a extração de DNA total de cinco indivíduos de espécies diferentes, incluindo um coletado na região entremarés da Baía do Araçá, conforme item 1.2.1. Para efeito comparativo, paralelamente foi feita uma extração seguindo o protocolo 6, protocolo este que havia dado os melhores resultados até então. Nesta extração paralela, foi utilizado o mesmo número de indivíduos, das mesmas espécies e provenientes das mesmas amostras que os utilizados para o método caseiro. Para *C. patagonica*, que apresenta tamanho maior, um único indivíduo foi dividido, e a extração da região anterior feita por um método e a da região posterior pelo outro.

#### 1.2.2.1. Testes dos protocolos de extração

Inicialmente, após cada extração, foi feita a quantificação em gel de agarose 1%. Porém, a maior parte das amostras não apresentava bandas. A consulta a pesquisadores que

trabalham com DNA degradado (A. G. McArthur; A.O. Simões – IB/Unicamp; com. pess.) confirmou que este normalmente é o caso quando se trata de amostras de coleção. Foi sugerido que, mesmo assim, fosse tentada a amplificação de marcadores pela PCR.

Para estas reações, quatro marcadores foram usados, também visando a sua possível utilização nas análises posteriores, de delimitação de espécies: o gene da citocromo oxidase 1 (COI), o gene do RNA ribossomal 16S (ambos mitocondriais) e os dois espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal (ITS1 e ITS2, ambos nucleares).

Para a COI, inicialmente foi utilizado o par de *primers* universais de Folmer *et al.* (1994), que amplifica uma região de cerca de 700bp (Tabela 1.5). Este tamanho de fragmento, no entanto, é três vezes maior que o considerado ideal, quando se trabalha com DNA degradado (200 a 300bp - Chase *et al.* 1998b, Schander e Halanych 2003, Boyle *et al.* 2004, Bucklin e Allen 2004), e o sucesso nas amplificações a partir de material de coleção foi próximo de zero. Assim, desenharam-se pares de *primers* que amplificassem uma região menor do COI. Para tanto, foi utilizado DNA de material coletado na Baía do Araçá, extraído de acordo com o protocolo 2, adaptado de Doyle e Doyle (1987). O DNA extraído foi utilizado para a amplificação do gene COI, com os *primers* universais. Em seguida, procedeu-se o sequenciamento do produto de PCR purificado. Utilizando-se a ferramenta *online* Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) foram desenhados dois pares de *primers*, flanqueando cerca de 200bp (Tabela 1.5).

Para a amplificação do marcador 16S foi utilizado o par de *primers* universais sugerido por Palumbi (1996). Este par já foi utilizado com sucesso em outros trabalhos com bivalves (Jarnegren *et al.* 2007, Kong e Li 2009) e amplifica uma região de 500bp. Para o ITS1 e o ITS2, foram desenhados *primers* com o auxílio das ferramentas disponíveis *online*

Primer3Plus e Primaclade (<http://www.umsl.edu/services/kellogg/primaclade.html>). Os *primers* foram desenhados a partir de sequências de DNA ribossomal obtidas no GenBank das espécies *Potamocorbula amurensis*, Corbulidae (EF035108.1), Corbulidae sp. (EF579691.1), e *Mya arenaria*, Myidae (EF035092.1, AF348987.1, AB126332.1). As sequências foram alinhadas com o programa MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), e os *primers* desenhados na região dos genes 18S e 5.8S (flanqueando o ITS1, com cerca de 460bp) e 5.8S e 28S (flanqueando o ITS2, com cerca de 480bp).

A partir de um protocolo de amplificação já em uso no Laboratório de Diversidade Genética, foram feitas alterações para sua otimização. Os parâmetros de temperatura dos passos da PCR foram modificados de forma que os primeiros cinco ou dez ciclos tivessem uma temperatura de anelamento de 5°C a 10°C menor do que a temperatura usada nos ciclos restantes (total de 40 ciclos). Esse procedimento visa aumentar a quantidade de produto amplificado e, ao mesmo tempo, reduzir a amplificação de materiais contaminantes (Boyle *et al.* 2004). Também foram testadas reamplificações, seguindo indicações de Roux (1995) e Shedlock *et al.* (1997), utilizando-se as mesmas concentrações dos reagentes e 1 µl do produto de PCR obtido na primeira reação, e os mesmos parâmetros de temperatura e tempo.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp, em um sequenciador capilar Prism 377 (Perkin Elmer). As sequências complementares obtidas foram editadas no programa ChromasPro

(Technelysium Pty Ltd) e comparadas com sequências disponibilizadas no GenBank para confirmação da sua identidade, isto é, se se tratavam do marcador correto e se não eram sequências de contaminantes. Foram utilizadas para as análises apenas sequências cujo melhor *match* (baixo número de falsos positivos – *E-value* – e *score* do alinhamento acima de 50) foi com uma espécie de bivalve. Essa abordagem foi adotada porque já foi verificado que nem sempre o melhor *match* no GenBank é a sequência filogeneticamente mais próxima (Jarnegren *et al.* 2007, Mikkelsen *et al.* 2007).

### **1.2.3. Desenvolvimento de *primers* específicos**

Como, idealmente, deve-se trabalhar com fragmentos pequenos quando se trata de DNA degradado (até 300bp), os *primers* utilizados para amplificar o 16S, o ITS1 e o ITS2 nos testes dos protocolos não seriam os mais adequados, apesar de ter sido obtido sucesso nas ampliações. Além disso, os pares de *primers* inicialmente desenhados para o COI não deram bons resultados. Assim, procurou-se desenvolver novos pares de *primers* que amplificassem regiões menores dos fragmentos testados.

Para tanto, foram utilizadas sequências obtidas do material de teste com os *primers* universais, no caso do 16S e do COI, ou com os *primers* desenhados no presente estudo, no caso dos ITS. Para o 16S e os ITS, foi possível utilizar uma sequência de cada uma das cinco espécies (*C. caribaea*, *C. aequivalvis*, *C. lyoni*, *C. patagonica* e *C. tryoni*). Apesar de haver material recém-coletado apenas para *C. caribaea*, que seria o ideal para o desenho dos *primers*, a análise dos cromatogramas das sequências do 16S e dos ITS de material de

coleção revelou que estas eram de boa qualidade. Para o COI, apenas sequências de *C. caribaea* puderam ser obtidas com o par de *primers* universais, a partir do material recém-coletado. Assim, utilizou-se também uma sequência de *Varicorbula dissimilis* disponível no GenBank (AF 120669). Para cada marcador, as sequências foram alinhadas usando o aplicativo *online* MAFFT. A partir desse alinhamento, foi possível identificar as regiões mais conservadas de cada um. Utilizando, então, a ferramenta *online* Primer3Plus desenharam-se *primers* nestas regiões. Para tanto, foi utilizada uma das sequências (o Primer3Plus aceita como *input* apenas uma sequência) e os parâmetros: comprimento do *primer* entre 18 e 25 pares de base;  $T_M$  entre 55°C e 65°C, com ótimo em 60°C, e diferença de  $T_M$  entre *primers* do mesmo par de no máximo 7°C; conteúdo de GC entre 40% e 60%, com ótimo em 50%; e comprimento do produto de 150 a 300 pares de base. Os outros parâmetros foram mantidos como na configuração automática do aplicativo. Os pares de *primers* assim obtidos foram comparados com o alinhamento para verificar se a sequência consenso continha sítios ambíguos. Deu-se preferência para *primers* com o mínimo de ambiguidade possível.

Os *primers* foram, então, utilizados em reações de amplificação de DNA extraído de material tanto recém-coletado quanto fixado. Foram testadas diferentes temperaturas de anelamento e concentrações de reagentes, especialmente o magnésio, para se verificar a eficiência dos *primers*. Também foi testado o procedimento de PCR aninhada (*nested* PCR). Primeiramente, foram feitas reações de amplificação de fragmentos maiores, usando os *primers* universais (16S e COI) ou os desenhados no presente estudo (ITS1 e ITS2), denominados, então, *primers* externos. Em seguida, os produtos dessas reações foram utilizados em novas reações, dessa vez para amplificar os fragmentos menores, utilizando

os *primers* desenhados conforme descrito acima, denominados, então, *primers* internos. Todas as reações foram otimizadas e, uma vez obtidos os melhores protocolos, procederam-se as amplificações do DNA extraído de material de coleção (Tabela 1.2) seguindo o protocolo de extração 9. O sucesso das amplificações *nested* foi checado em gel de agarose 1,5% e os produtos, purificados e sequenciados como já descrito. As sequências complementares obtidas foram editadas no programa ChromasPro. Como há sobreposição entre os dois fragmentos do 16S (Figura 1.4), para essa região gênica foi criada uma única sequência de consenso (*contig*), denominada 16S. As sequências construídas foram comparadas com o banco de dados GenBank, por meio da ferramenta BLAST, como descrito anteriormente. Foram utilizadas para as análises subsequentes apenas sequências cujo melhor *match* foi com uma espécie de bivalve. As sequências obtidas foram, então, alinhadas com o aplicativo *online* MAFFT e os alinhamentos foram ajustados manualmente no programa Mesquite versão 2.75 (Maddison e Maddison 2011).

#### **1.2.4. Procedimentos para reduzir contaminações**

Os primeiros sequenciamentos revelaram uma alta taxa de contaminação por DNA de outros organismos estudados no mesmo laboratório, reforçando a necessidade de procedimentos mais rigorosos para reduzir essas contaminações. Assim, adotaram-se medidas seguindo indicações de diversos autores (Schander e Halanych 2003, Tang 2006, Wnadelier *et al.* 2007). Para a extração, a etapa inicial de maceração passou a ser realizada em um laboratório que ainda não havia sido utilizado para análises moleculares, no



Departamento de Biologia Animal do IB/Unicamp. Esta etapa é considerada mais crítica em termos de contaminação pelo fato de o material ficar exposto durante todo o tempo de maceração. Nas etapas seguintes, o tempo de exposição restringe-se àquele de abertura dos tubos de microcentrífuga para a adição de reagentes. Antes do início de cada maceração, a bancada foi limpa com papel toalha e NaClO 30%, seguido de etanol 70%. As micropipetas utilizadas foram deixadas por 15 minutos sob radiação UV. Para cada indivíduo, foi utilizado um conjunto de pinça, lâmina de vidro e lâmina de metal, que, após o uso, foi lavado em água corrente com detergente e, depois, deixado em NaOH 1M por 30 minutos. Em seguida, os instrumentos foram lavados em água destilada e deionizada, deixando-os de molho por 30 minutos, com uma troca da água após 15 minutos. O material assim lavado foi seco e guardado entre folhas de papel toalha limpas, sem contato com o ar até a próxima extração. Os procedimentos de limpeza da bancada e de descontaminação das micropipetas foram adotados também antes da etapa final (extração orgânica + extração com sílica) e das reações de PCR. Além disso, todos os reagentes foram mantidos como de uso exclusivo para este estudo.

### **1.3. Resultados**

#### **1.3.1. Desenvolvimento de protocolo de extração**

No total, foram feitas 99 extrações de DNA para se testar os diferentes protocolos (Tabela 1.4). Foi utilizado predominantemente material de coleção. Em casos em que

houve dúvida sobre a eficácia do método e/ou dos reagentes, extraiu-se DNA também de material recém-coletado, tanto de *Corbula* quanto de outras espécies, como forma de controle. Como explicado no item 2.2.1, o sucesso dos protocolos foi verificado por amplificação e sequenciamento dos fragmentos. Dos cinco pares de *primers* usados nestes testes (Tabela 1.5), apenas o que gera o fragmento COI\_car\_1 não obteve nenhum sucesso na amplificação, apesar da otimização. No total, 98 produtos de PCR (18 do marcador 16S, 22 do ITS1, 21 do ITS2, e 37 do COI\_car\_2) foram sequenciados para verificação da identidade das sequências. Uma extração foi considerada bem sucedida se a sequência de pelo menos um dos fragmentos amplificados a partir do DNA extraído apresentou um bom *match* no GenBank. A exceção foi o fragmento COI\_car\_2, que gerou sequências com o *match* correto apenas para espécimes de *C. caribaea*. Para as outras espécies, apesar de os cromatogramas apresentarem-se bons (picos evidentes e sem leituras ambíguas ou sobrepostas), a busca no GenBank não identificou as sequências como sendo semelhantes ao COI. Levantou-se a hipótese de que, nestas espécies, outra região do genoma foi amplificada, uma vez que o alinhamento das sequências permite verificar que se trata do mesmo fragmento. A hipótese é apoiada pelo fato de os *primers* terem sido desenhados a partir de sequências de *C. caribaea*. Mesmo assim, como os cromatogramas apresentavam boa qualidade, as extrações que geraram estes fragmentos foram consideradas bem sucedidas.

A extração por adsorção em sílica (protocolos 4, 5 e 6) apresentou, no geral, melhores resultados dentre os protocolos sem combinação de técnicas. As modificações feitas por A. G. MacArthur (protocolo 5) ao protocolo de Chase *et al.* (1998b - protocolo 4) resultaram em um sucesso três vezes maior que o do protocolo original. Por outro lado,

nenhuma das extrações por *salting-out* foi bem sucedida, tanto de material previamente coletado quanto de material recente, mesmo com as modificações do protocolo 7. A extração orgânica apresentou em torno de 30% de sucesso para o material de coleção, mas foi bastante eficiente para material recém-coletado (dados não quantificados). Assim, foi o método escolhido para as extrações para obtenção de sequências para o desenho de *primers* para o COI, conforme item 1.2.3.

A combinação de extração orgânica com posterior adsorção em sílica utilizando kit comercial (protocolo 8) não obteve melhores resultados do que a extração orgânica sozinha. No entanto, a versão caseira desse método (protocolo 9) produziu os melhores resultados dentre os protocolos testados. A comparação da extração por esse método com o protocolo 6 mostra sua superioridade (Tabela 1.6), especialmente quando analisamos as extrações 19.4 e 20.4. O material 19.4 (protocolo 9) foi o único a resultar em ampliações de todos os fragmentos. Parte do indivíduo utilizado nesta extração foi utilizada para uma extração pelo protocolo 6 (extração 20.4). Apesar de originário do mesmo indivíduo, o material extraído desta forma resultou em amplificação apenas de dois fragmentos. Também é interessante observar que, para material recém-coletado (extrações 19.5 e 20.5), apenas o material extraído com protocolo 9 resultou em ampliações. Assim, o protocolo 9 foi escolhido como método para a extração de DNA de material de coleção de *Cobula* sp. no presente estudo.

### 1.3.2. Desenvolvimento de *primers* específicos

Foram desenhados dez pares de *primers* no total (Tabela 1.7), sendo quatro para o COI, e dois para cada um dos outros marcadores. A análise dos alinhamentos das sequências dos marcadores mitocondriais revelou uma grande variabilidade e poucas regiões apresentavam-se conservadas o suficiente para o desenho de *primers*, que, de qualquer forma, apresentavam muitos sítios ambíguos. Dessa maneira, optou-se por um maior número de pares para o COI. A mesma estratégia, porém, não foi possível para o 16S, pois, além de um número maior de *gaps* (que reduzem o número de regiões para o desenho de *primers*), este marcador apresentou as regiões mais conservadas ricas em GC. Assim, apenas dois pares puderam ser desenhados sem comprometer a qualidade destes. O mesmo problema (regiões conservadas ricas em GC) foi observado no alinhamento do ITS1, o que também reduziu as possibilidades de *primers* para este marcador, apesar de apresentar diversas regiões conservadas. Por fim, o alinhamento do ITS2 apresentou um grande número de *gaps* e apenas dois pares puderam ser desenhados, mas estes, ao contrário dos *primers* para os outros marcadores, não continham ambiguidades.

Dos dez pares desenhados, sete apresentaram algum sucesso nas amplificações; os outros três não geraram bandas apesar de todo o processo de otimização. De modo geral, esses pares de *primers* apresentaram maior número de amplificações bem sucedidas, com uma alta concentração de produto do que os pares utilizados para os testes de protocolos de extração. No entanto, em muitas delas foram geradas bandas múltiplas (Figura 1.2, A e C), persistentes mesmo com as otimizações, como aumento da temperatura de anelamento e/ou a redução na concentração do magnésio. Por outro lado, as reações *nested* com os sete pares

que apresentaram algum sucesso resultaram em bandas únicas com boa concentração de produto, com exceção de um dos pares (37 e 38 - Figura 1.2, B e D). Para este, as amplificações *nested* resultaram em, praticamente, nenhum produto e, quando reduzida a especificidade da reação (seja pela redução da temperatura seja pelo aumento na concentração de magnésio), apenas arrastos foram obtidos. Dessa forma, dos 10 pares inicialmente desenhados, seis apresentaram bons resultados (Tabela 1.7). As figuras 1.3, 1.4 e 1.5 mostram a posição destes pares, juntamente com os *primers* utilizados como externos para a amplificação *nested*.

#### 1.3.2.1. Otimização do processo de amplificação

Uma vez estabelecido que a técnica *nested* gerava melhores resultados, procedeu-se a otimização do processo de amplificação. A primeira amplificação, feita com os *primers* externos, passou a ser realizada com um protocolo de subida passo a passo (*step up*), a fim de garantir uma maior quantidade de moléculas para a segunda amplificação. No *step up*, o primeiro ciclo é feito com uma temperatura de anelamento bastante baixa e esta é aumentada em 1°C por ciclo, por 15 a 20 ciclos, até atingir uma temperatura um pouco mais elevada que a temperatura de anelamento ideal do *primer*. Em seguida, mais ciclos são realizados com a temperatura de anelamento ideal ou até mais baixa. As reações foram feitas em um volume total de 30 µl, contendo 1x PCR\* Buffer (Fermentas), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 0,3µM de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas), 0,9µl de albumina bovina a 0,1% (BSA), 2 µl da amostra de DNA. O termociclador foi programado da seguinte forma: 2 minutos de

denaturação inicial a 94°C; 16 ciclos de: denaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 30 segundos em *step up*, extensão por 30 segundos a 72°C; 20 ciclos de: denaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 30 segundos, extensão por 30 segundos a 72°C; extensão final por 10 minutos a 72°C. As temperaturas de anelamento utilizadas para cada par de *primers* podem ser vistas na tabela 1.8 Tabela 1.8.

Os produtos destas reações foram, então, utilizados como moldes para a segunda amplificação, a *nested*, feita com um par de *primers* internos. As reações foram feitas em um volume total de 30 µl, contendo 1x PCR\* Buffer (Fermentas), 2mM (para *primers* 27 e 28, e 29 e 30) ou 2,5mM (para os demais *primers*) de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 0,3µM de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas), 0,9µl de albumina bovina a 0,1% (BSA), 1 µl do produto de PCR. O termociclador foi programado da seguinte forma: 2 minutos de denaturação inicial a 94°C; 5 ciclos de: denaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 30 segundos, extensão por 30 segundos a 72°C; 25 ciclos de: denaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 30 segundos, extensão por 30 segundos a 72°C; extensão final por 10 minutos a 72°C. As temperaturas de anelamento para cada par de *primers* são dadas na tabela 1.8.

O DNA total extraído dos 565 indivíduos de *Corbula* (Tabela 1.2) foi utilizado como molde para amplificações *nested*, seguindo os protocolos otimizados. A taxa de sucesso variou bastante entre os pares de *primers*. As mais altas foram observadas para os dois subfragmentos do 16S: 80,75% para o 16Sa (*primers* 27 e 28), e 93,68% para o 16Sb (*primers* 29 e 30). Por outro lado, os dois subfragmentos do COI apresentaram as taxas mais baixas: 42,18% para o COIa (*primers* 23 e 24), e 46,78% para o COIb (*primers* 25 e

26). Os *primers* para os ITS tiveram sucesso intermediário: 65,76% para o ITS1 (*primers* 31 e 32) e 59,73% para o ITS2 (*primers* 35 e 36).

Para o sequenciamento, procurou-se priorizar os produtos de PCR de indivíduos que tiveram os seis marcadores amplificados, a fim de construir matrizes de alinhamento comparáveis entre si. Dessa forma, foram obtidas sequências para 110 indivíduos. De modo geral, as sequências obtidas com os dois pares de *primers* do COI apresentaram a melhor qualidade. Para o ITS2 e o 16Sa, também foram obtidos bons cromatogramas. Por outro lado, as sequências obtidas com os *primers* 29 e 30 (16Sb) apresentaram a pior qualidade e casos de contaminação por material humano foram comuns, o que tornou necessária a repetição do sequenciamento (com produtos de PCR diferentes). Com o ITS1 houve problemas em relação à qualidade dos cromatogramas, mas não de contaminação. O alinhamento final do COIa apresentou 197 sítios, sendo 97 informativos (86 se forem desconsiderados os *gaps*). Para o COIb, dos 220 sítios 135 eram informativos (128 sem os *gaps*). Para o 16S, o alinhamento final continha 466 sítios, sendo 369 informativos (347 sem os *gaps*). O ITS1 apresentou 285 sítios (277 e 245 informativos com e sem *gaps* respectivamente) e o ITS2, 317, sendo 244 informativos (188 desconsiderando os *gaps*). O total de sítios informativos considerando os quatro marcadores, sem os *gaps*, é 994.

#### **1.4. Discussão**

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que é possível obter sequências de DNA de boa qualidade a partir de material de coleção. A melhor abordagem

nestes casos é a combinação de um protocolo de extração orgânica seguida por adsorção em sílica com reações de amplificação *nested* utilizando *primers* específicos.

A maior eficiência da combinação da adsorção em sílica com uma extração orgânica prévia já havia sido constatada para material de coleção em formol e embebido em parafina (Farrugia *et al.* 2010). Estes autores aliaram a extração orgânica ao uso de colunas dos kits, ao invés do uso de uma solução de sílica, obtendo melhores resultados com este protocolo do que com a utilização apenas das colunas. No entanto, a maior eficiência de um método caseiro para a etapa de adsorção em sílica ainda não foi totalmente comprovada, embora estudos genéticos de fósseis deem preferência a este método (Hoss e Paabo 1993, Rohland e Hofreiter 2007). Uma das vantagens desse protocolo é a possibilidade de se otimizar as quantidades e, principalmente, concentrações dos tampões, permitindo um melhor ajuste de acordo com o material que se tem. Além disso, ele se apresentou como uma forma eficiente de se eliminar inibidores de PCR (Rohland e Hofreiter 2007). Dadas essas vantagens e sua utilização bem sucedida para fósseis (Hoss e Paabo 1993, Rohland e Hofreiter 2007), poríferos (de Paula 2009) e bivalves de coleção, provavelmente a extração orgânica associada a um método caseiro de adsorção em sílica deve gerar bons resultados de forma geral para amostras que contenham DNA degradado.

Quando se considera apenas os métodos simples de extração (sem combinações), a vantagem da adsorção em sílica sobre outros (extração orgânica e por *salting-out*) já foi relatada por Chase *et al.* (1998b), pois evita as perdas de DNA, que ocorrem tanto na extração orgânica quanto na precipitação com álcool, e elimina mais eficientemente compostos secundários. O protocolo desenvolvido por estes autores, no entanto, não foi tão eficiente no presente estudo. Por outro lado, as modificações sugeridas por A. G.



MacArthur resultaram em um sucesso maior. Provavelmente, a utilização de tampão de eluição aquecido e a incubação a 70°C da membrana de sílica com este tampão favorecem o desprendimento das moléculas de DNA e este deve, então, ser um passo importante ao se trabalhar com material de coleção. É interessante observar que a extração de DNA de indivíduos recém-coletados com kits comerciais não resultou em nenhuma amplificação bem sucedida. Esse resultado é surpreendente uma vez que tais kits são amplamente utilizados com bons resultados. É possível que, neste caso, o método utilizado não seja eficiente na remoção de mucopolissacarídeos, que inibem a reação de amplificação (Sokolov 2000). Nestas situações, o protocolo do Laboratório Jodrell (protocolo 8), que também combina extração orgânica seguida de purificação com sílica, se mostrou bastante eficiente.

O trabalho com DNA de material de coleção envolve lidar com dois problemas principais: a degradação do DNA (Bucklin e Allen 2004) e, caso tenha havido fixação em formol, o *cross-link* (ligação química entre polímeros) das moléculas de DNA entre si e com proteínas (Bucklin e Allen 2004, Tang 2006). Dentre as principais estratégias para lidar com o *cross-link* está a lavagem do tecido (Shedlock *et al.* 1997), isto é, a incubação em tampão por um período prolongado (alguns dias), para que o excesso de formol seja eliminado, bem como qualquer resíduo de álcool. O acréscimo dessa etapa ao protocolo de Chase *et al.* (1998b) gerou melhores resultados do que este protocolo sozinho (protocolos 4 e 6; Tabela 1.4), o que indica que realmente é uma etapa importante. No presente estudo, foram testados os tampões GTE, como proposto por Shedlock *et al.* (1997), e o TE, sugerido por Schander e Halanych (2003), e não foi possível observar diferenças entre eles.

Além do *cross-link*, a menor quantidade de DNA e o menor tamanho dos fragmentos também são consequências da fixação em formol que constituem obstáculo para trabalhar com este tipo de material. Como forma de lidar com este problema, o ideal é utilizar um tempo de incubação bastante prolongado na etapa de lise para que seja liberada uma maior quantidade de DNA (Bucklin e Allen 2004). Protocolos encontrados na literatura sugerem até sete dias para esta etapa (Chase *et al.* 1998b, Schander e Halanych 2003), mas o protocolo aqui desenvolvido obteve bons resultados com 24h de incubação, o que reduz bastante o tempo necessário para uma extração. Outro facilitador na etapa de lise é a proteinase K (Schander e Halanych 2003, Bucklin e Allen 2004). Este reagente é especialmente indicado para materiais fixados em formol por ser uma forma de liberar moléculas de DNA que estejam ligadas a proteínas (Tang, 2006) e sua utilização trouxe bons resultados para o presente estudo. Por fim, uma última forma de lidar com a reduzida quantidade de DNA é a eluição final em um pequeno volume de tampão, de forma a obter o DNA mais concentrado. No protocolo aqui sugerido, são utilizados 50 µl, cerca de metade do volume de eluição normalmente utilizado para material recente.

Modificações na PCR são também essenciais para lidar com o DNA fragmentado. A utilização de fragmentos menores e *primers* específicos é comumente recomendada (Chase *et al.* 1998b, Schander e Halanych 2003, Boyle *et al.* 2004, Bucklin e Allen 2004), bem como a reamplificação em casos de obtenção de pouco ou nenhum produto de PCR (Roux 1995, Shedlock *et al.* 1997). No entanto, a *nested* PCR aqui utilizada, que é uma forma de combinar essas abordagens, produziu melhores resultados. No presente estudo, mesmo utilizando *primers* específicos flanqueando um fragmento pequeno de DNA, as reações de amplificação resultaram em pouco ou nenhum produto, ou, ao contrário, em um excesso de

bandas (Figura 1.2, A). Para as reações com pouco ou nenhum produto, as tentativas de reamplificação utilizando o mesmo par de *primers*, como sugerido por Roux (1995) e Shedlock *et al.* (1997), falharam completamente. Nestes casos, não foi possível observar a formação de bandas no gel de agarose, somente arrastos. Este resultado foi persistente mesmo com as modificações sugeridas, como a diluição do produto de PCR e a redução no número de ciclos. A abordagem *nested*, no entanto, gerou bons resultados, produzindo bandas do tamanho esperado, com boa concentração de DNA e “limpas” (sem arrastos ou restos de *primers*).

A *nested* PCR é amplamente utilizada em trabalhos com tecido fixado em formol e embebido em parafina (por exemplo, Park *et al.* 2010, Almeida *et al.* 2012, Kang *et al.* 2012). No entanto, a parafina cria um ambiente mais estável que o álcool para a preservação do tecido (Tang 2006), o que, de certa forma, facilita o trabalho com esse tipo de material. Apenas recentemente um trabalho indicou seu uso para tecidos preservados em meio aquoso (Zhang 2010). O autor relata um aumento no número de amplificações bem sucedidas de quase 100% em relação à PCR direta quando a técnica *nested* é utilizada. Além de aumentar a quantidade de produto, a *nested* PCR torna a reação mais específica, uma vez que reduz a probabilidade de amplificação de sequências contaminantes (Roux 1995), especialmente se são utilizados *primers* específicos. Vale ressaltar que outras alterações nos protocolos de PCR também visam aumentar a quantidade de produto e/ou a especificidade da reação, como a utilização de ciclos em *step up* na primeira reação, ciclos iniciais com temperatura de anelamento diferente dos finais na segunda reação e BSA em ambas (Roux 1995, Boyle *et al.* 2004).

A importância de se utilizar *primers* específicos pode, de certo modo, ser avaliada pelos resultados obtidos com os *primers* desenhados para o COI. Para esta região gênica, foram desenhados seis pares de *primers* no total, dos quais três resultaram em ampliações bem sucedidas. O sequenciamento dos produtos de um destes pares, no entanto, revelou que apenas para *C. caribaea* o marcador correto havia sido amplificado. Este par de *primers* foi desenhado a partir de uma sequência de *C. caribaea*. Possivelmente, um deles, ou ambos, se anela em uma região variável do COI, presente apenas em *C. caribaea*. Assim, para esta espécie, as sequências obtidas com estes *primers* correspondem ao fragmento esperado do COI, enquanto para as outras espécies outro fragmento foi amplificado. Em uma segunda tentativa de desenhar *primers* específicos, uma sequência de *C. caribaea* e uma de *V. dissimilis* foram utilizadas. Mesmo assim, os sucessos de amplificação para os dois pares de *primers* obtidos foram os mais baixos dentre os *primers* desenhados, mesmo com a presença de ambiguidades. Sendo assim, a utilização de *primers* específicos aumenta a probabilidade de que só a sequência da espécie estudada seja amplificada, uma vez que os melhores resultados foram obtidos para *C. caribaea*, única espécie estudada utilizada para o desenho dos *primers* para o COI. No entanto, este fato resultou em um menor número de ampliações para estes *primers* em comparação com os outros pares, que foram desenhados a partir de sequências das cinco espécies estudadas.

Por fim, mas não menos importante, outro aspecto deve ser levado em conta quando se trabalha com material de coleção é a contaminação (Schander e Halanych 2003, Wandeler *et al.* 2007). Normalmente, esse tipo de material não é coletado com o intuito de se extrair DNA e, conseqüentemente, é manipulado sem os devidos cuidados. Assim, espera-se que haja principalmente uma grande contaminação por material humano. Neste

caso, o desenho de *primers* específicos ajuda a reduzir a amplificação e o sequenciamento de contaminantes. No entanto, mesmo nestes casos, pode haver a amplificação de sequências não desejadas, se os *primers* estiverem em regiões muito conservadas. É, provavelmente, o caso dos *primers* 29 e 30 do presente estudo, que resultaram, muitas vezes, no sequenciamento do gene humano. Isso leva a crer, inclusive, que o grande sucesso nas amplificações com este par seja resultado de contaminações.

Outro tipo de contaminação é a que ocorre durante os procedimentos laboratoriais. Como o DNA de material de coleção é fragmentado e em pouca quantidade, qualquer molécula contaminante constitui um grande competidor para a reação de amplificação (Schander e Halanych 2003). Esse tipo de contaminação, no entanto, é mais simples de controlar. No presente estudo, os primeiros sequenciamentos resultaram em 50% de sequências de outras espécies estudadas no laboratório. Medidas adotadas depois, seguindo diversas indicações (Schander e Halanych 2003, Tang 2006, Wandeler *et al.* 2007) reduziram essa contaminação para zero.

O sucesso médio das amplificações observado no presente estudo, de aproximadamente 65%, foi próximo ao observado por Zhang (2010) para peixes fixados em formol (63%). No entanto, é um valor maior do que o registrado em literatura para outros organismos da macrofauna bentônica - 44% para bivalves e gastrópodes (Boyle *et al.* 2004) e 27% para esponjas (Vargas *et al.* 2012). Desconsiderando o valor para o par 29 e 30, que pode estar inflado devido a contaminações, o sucesso no presente estudo ainda é maior, 60%. Isso provavelmente é devido à *nested* PCR que, como comprovada por Zhang (2010), resulta em mais amplificações do que a PCR direta, utilizada por outros autores.

Ainda no mesmo trabalho, Boyle *et al.* (2004) relataram uma taxa de sucesso muito inferior para marcadores nucleares em relação aos mitocondriais. No presente estudo, não se verificou esta relação. As taxas para os ITS foram intermediárias entre as dos marcadores mitocondriais. Isso se deve, possivelmente, ao fato de os ITS, ao contrário do marcador utilizado por Boyle *et al.* (2004), estarem presentes em múltiplas cópias no genoma, assim como os marcadores mitocondriais. As taxas para os dois subfragmentos do COI foram surpreendentemente baixas, principalmente considerando que possuem menos de 200bp. Porém, como já considerado anteriormente, isso pode ser devido à forma como os *primers* foram desenhados, utilizando, dentre as espécies estudadas, apenas sequências de *C. caribaea*.

O sequenciamento revelou uma boa variabilidade em cada marcador. Para os ITS, no entanto, a análise das matrizes de alinhamento levantou dúvidas sobre a origem das cópias sequenciadas. Aparentemente, cópias parálogas foram sequenciadas, o que não havia sido detectado nos primeiros sequenciamentos. Assim, embora outros estudos em bivalves indiquem os ITS para análises filogenéticas entre espécies próximas (Kallersjo *et al.* 2005, Cheng *et al.* 2006, Vierna *et al.* 2010, Salvi e Mariottini 2012), preferiu-se descartar estes dois marcadores para as análises seguintes (Capítulo 2).

Trabalhar com DNA de material de coleção é possível. No desenvolvimento de um protocolo de extração de DNA total deste tipo de material, a melhor abordagem é a combinação de diferentes técnicas. Especial atenção deve ser dada aos passos que maximizam a quantidade de DNA obtida. Para as reações de amplificação, recomenda-se a utilização da técnica *nested*, que resulta em uma boa quantidade de produto. Trabalhar com fragmentos pequenos e *primers* específicos também garantem bons resultados. Embora

custoso, esse tipo de trabalho permite que se estude a imensa diversidade genética que se encontra em coleções científicas de museu e particulares, além de possibilitar o melhor aproveitamento de materiais que só podem ser obtidos fixados, como coletas de sublitoral.

### 1.5. Referências bibliográficas

- Almeida, P. R., C. P. Andrade, L. L. Almeida, L. G. S. Oliveira, L. A. Castro, P. Zlotowski, S. C. da Silva, e D. Driemeier. 2012. Nested-PCR for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial alveolar swabs, frozen tissues and formalin-fixed paraffin-embedded swine lung samples: Comparative evaluation with immunohistochemical findings and histological features. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **32**: 715-720.
- Amaral, A. C. L. e C. L. D. B. Rossi-Wongtschowski (eds). 2004. *Biodiversidade Bentônica da Região Sudeste-Sul do Brasil - Plataforma Externa e Talude Superior*. EDUSP, São Paulo.
- Amaral, A. C. Z., A. E. Rizzo, e E. P. Arruda. 2006. *Manual de Identificação dos Invertebrados Marinhos da Região Sudeste-Sul do Brasil*. EDUSP, São Paulo.
- Anderson, L. C. 1996. The family Corbulidae (Mollusca: Bivalvia). *Bulletins of American Paleontology* **110**: 5-34.
- Arruda, E. P. e A. C. Z. Amaral. 2003. Spatial distribution of mollusks in the intertidal zone of sheltered beaches in southeastern of Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* **20**: 291-300.
- Becker, J. M., G. A. Caldwell, e E. A. Zachgo. 1996. *Biotechnology: a Laboratory Course*. 2a. edição. Academic Press, Dan Diego.

- Boyle, E. E., J. D. Zardus, M. R. Chase, R. J. Etter, e M. A. Rex. 2004. Strategies for molecular genetic studies of preserved deep-sea macrofauna. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **51**: 1319-1336.
- Bucklin, A. e L. D. Allen. 2004. MtDNA sequencing from zooplankton after long-term preservation in buffered formalin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**: 879-882.
- Chase, M. R., R. J. Etter, M. A. Rex, e J. M. Quattro. 1998a. Bathymetric patterns of genetic variation in a deep-sea protobranch bivalve, *Deminucula atacellana*. *Marine Biology* **131**: 301-308.
- Chase, M. R., R. J. Etter, M. A. Rex, e J. M. Quattro. 1998b. Extraction and amplification of mitochondrial DNA from formalin-fixed deep-sea mollusks. *Biotechniques* **24**: 243-247.
- Cheng, H. L., X. P. Meng, H. J. Ji, Z. G. Dong, e S. Y. Chen. 2006. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal RNA gene in representatives of the clam family Veneridae (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Shellfish Research* **25**: 833-839.
- Coan, E. V. 2002. The eastern Pacific recent species of the Corbulidae (Bivalvia). *Malacologia* **44**: 47-105.
- Coan, E. V., P. V. Scott, e F. R. Bernard. 2000. *Bivalve seashells of western North America*. Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara.
- Cox, C. L., A. R. D. Rabosky, J. Reyes-Velasco, P. Ponce-Campos, E. N. Smith, O. Flores-Villela, e J. A. Campbell. 2012. Molecular systematics of the genus *Sonora* (Squamata: Colubridae) in central and western Mexico. *Systematics and Biodiversity* **10**: 93-108.
- de Paula, T. S. 2009. O complexo *Cliona celata* Grant, 1826 (Porifera, Demospongiae) na América do Sul: uma abordagem molecular e morfológica. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.



- Doyle, J. J. e J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.
- Farrugia, A., C. Keyser, e B. Ludes. 2010. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Science International* **194**: E25-E28.
- Fernandez, R., A. Almodovar, M. Novo, B. Simancas, e D. J. Diaz Cosin. 2012. Adding complexity to the complex: New insights into the phylogeny, diversification and origin of parthenogenesis in the *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta, Lumbricidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **64**: 368-379.
- Ferri, E., M. Barbuto, O. Bain, A. Galimberti, S. Uni, R. Guerrero, H. Ferte, C. Bandi, C. Martin, e M. Casiraghi. 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology* **6**: 1.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, e R. Vrijenhoek. 1994. DNA *primers* for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**: 294-299.
- Giribet, G. e W. Wheeler. 2002. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology* **121**: 271-324.
- Guarniero, I., F. Plazzi, A. Bonfitto, A. Rinaldi, M. Trentini, e M. Passamonti. 2010. The bivalve mollusc *Maetra corallina*: genetic evidence of existing sibling species. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **90**: 633-644.
- Hoeksema, B. W., J. van der Land, S. E. T. van der Meij, L. P. van Ofwegen, B. T. Reijnen, R. W. M. van Soest, e N. J. de Voogd. 2011. Unforeseen importance of historical collections as baselines to determine biotic change of coral reefs: the Saba Bank case. *Marine Ecology-an Evolutionary Perspective* **32**: 135-141.

- Hoss, M. e S. Paabo. 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research* **21**: 3913-3914.
- Jarnegren, J., C. Schander, J. A. Sneli, V. Ronningen, e C. M. Young. 2007. Four genes, morphology and ecology: distinguishing a new species of *Acesta* (Mollusca; Bivalvia) from the Gulf of Mexico. *Marine Biology* **152**: 43-55.
- Kallersjo, M., T. von Proschwitz, S. Lundberg, P. Eldenas, e C. Erseus. 2005. Evaluation of ITS rDNA as a complement to mitochondrial gene sequences for phylogenetic studies in freshwater mussels: an example using Unionidae from north-western Europe. *Zoologica Scripta* **34**: 415-424.
- Kang, I., D. Kim, K. Han, H. W. Seo, Y. Oh, C. Park, J. Lee, M. Gottschalk, e C. Chae. 2012. Optimized protocol for multiplex nested polymerase chain reaction to detect and differentiate *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from pigs with polyserositis. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire* **76**: 195-200.
- Keen, M. 1969. Superfamily Myacea Lamarck, 1890. pp: 691-699 In: R. C. Moore (ed.). *Treatise on Invertebrate Paleontology*. Part N, vol.1: Mollusca 6. Geological Society of America and University of Kansas Press, Lawrence.
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 189-216.
- Kong, L. F. e Q. Li. 2009. Genetic evidence for the existence of cryptic species in an endangered clam *Coelomactra antiquata*. *Marine Biology* **156**: 1507-1515.
- Maddison, W. P. e D. R. Maddison. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>.
- Mikkelsen, P. M. e R. Bieler. 2001. *Varicorbula* (Bivalvia: Corbulidae) of the western Atlantic: Taxonomy, anatomy, life habits, and distribution. *Veliger* **44**: 271-293.

- Mikkelsen, N. T., C. Schander, e E. Willassen. 2007. Local scale DNA barcoding of bivalves (Mollusca): A case study. *Zoologica Scripta* **36**: 455-463.
- Nishiguchi, M. K., P. Doukakis, M. Egan, D. Kizirian, A. Phillips, L. Prendini, H. C. Rosenbaum, E. Torres, Y. Wyner, R. Desalle, e G. Giribet. 2002. DNA Isolation Procedures. pp 249-287 *In*: R. DeSalle, G. Giribet, e W. C. Wheeler (eds). *Techniques in Molecular Systematics and Evolution*. Birkhäuser, Heidelberg.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. pp 205-247 *In* D. M. Hillis, C. Moritz, e B. K. Mable (eds). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Park, J. S., Y. A. Kang, S. Y. Kwon, H. I. Yoon, J. H. Chung, C. T. Lee, e J. H. Lee. 2010. Nested PCR in lung tissue for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *European Respiratory Journal* **35**: 851-857.
- Puillandre, N., P. Bouchet, M. C. Boisselier-Dubayle, J. Brisset, B. Buge, M. Castelin, S. Chagnoux, T. Christophe, L. Corbari, J. Lambourdiere, P. Lozouet, G. Marani, A. Rivasseau, N. Silva, Y. Terry, S. Tillier, J. Utge, e S. Samadi. 2012. New taxonomy and old collections: integrating DNA barcoding into the collection curation process. *Molecular Ecology Resources* **12**: 396-402.
- Rainbow, P. S. 2009. Marine biological collections in the 21st century. *Zoologica Scripta* **38**: 33-40.
- Rios, E. C. 1994. *Seashells of Brazil*. 2a. edição. Editora da FURGS, Rio Grande.
- Rohland, N. e M. Hofreiter. 2007. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols* **2**: 1756-1762.
- Roux, K. H. 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods and Applications* **4**: 185-194.

- Salvi, D. e P. Mariottini. 2012. Molecular phylogenetics in 2D: ITS2 rRNA evolution and sequence-structure barcode from Veneridae to Bivalvia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **65**: 792-798.
- Schander, C. e K. M. Halanych. 2003. DNA, PCR and formalinized animal tissue - a short review and protocols. *Organisms Diversity & Evolution* **3**: 195-205.
- Shedlock, A. M., M. G. Haygood, T. W. Pietsch, e B. P. 1997. Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens. *BioTechniques* **22**: 394-400.
- Sokolov, E. P. 2000. An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissues. *Journal of Molluscan Studies* **66**: 573-575.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, e S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-2739.
- Tang, C. Q., F. Leasi, U. Obertegger, A. Kieneke, T. G. Barraclough, e D. Fontaneto. 2012. The widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity surveys of the meiofauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 16208-16212.
- Tang, E. P. Y. (ed). 2006. *Path to effective recovering of DNA from formalin-fixed biological samples in natural history collections: Workshop summary*. National Academies Press, Washington.
- Taylor, J. D., S. T. Williams, E. A. Glover, e P. Dyal. 2007. A molecular phylogeny of heterodont bivalves (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta): new analyses of 18S and 28S rRNA genes. *Zoologica Scripta* **36**: 587-606.
- Vargas, S., A. Schuster, K. Sacher, G. Buettner, S. Schatzle, B. Laeuchli, K. Hall, J. N. A. Hooper, D. Erpenbeck, e G. Woerheide. 2012. Barcoding sponges: An overview based on comprehensive sampling. *Plos One* **7**: e39345.

- Vierna, J., A. Martinez-Lage, e A. M. Gonzalez-Tizon. 2010. Analysis of ITS1 and ITS2 sequences in *Ensis* razor shells: suitability as molecular markers at the population and species levels, and evolution of these ribosomal DNA spacers. *Genome* **53**: 23-34.
- Vokes, H. E. 1945. Supraspecific groups of the pelecypod family Corbulidae. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **86**:5-32.
- Wandeler, P., P. E. Hoeck, e L. F. Keller. 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 634-642.
- Winker, K. 2009. Reuniting phenotype and genotype in biodiversity research. *BioScience* **59**: 657-665.
- Zardus, J. D., R. J. Etter, M. R. Chase, M. A. Rex, e E. E. Boyle. 2006. Bathymetric and geographic population structure in the pan-Atlantic deep-sea bivalve *Deminucula atacellana* (Schenck, 1939). *Molecular Ecology* **15**: 639-651.
- Zhang, J. 2010. Exploiting formalin-preserved fish specimens for resources of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* **10**: 935-941.

Tabela 1.1. Relação dos espécimes de *Corbula* previamente coletados utilizados para desenvolvimento de protocolo de extração.

<b>Espécie</b>	<b>Projeto</b>	<b>Localidade</b>	<b>Data</b>	<b>Profundidade (m)</b>	<b>N</b>
<i>Corbula caribaea</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	1991/1992	15-67	4
<i>Corbula caribaea</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/1992	23-27	2
<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/2002		4
<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	ago-set/1994		1
<i>Corbula caribaea</i>		Juatinga, RJ	mai-jun/1999	64	1
<i>Corbula aequivalvis</i>		Ubatuba, SP	1979/1980		17
<i>Corbula lyoni</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	1991/1992	40-67	5
<i>Corbula lyoni</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/2003		1
<i>Corbula lyoni</i>		Santos, SP	nov/1998	38-45	4
<i>Corbula lyoni</i>		São Francisco do Sul, SC	nov/1998	50-60	4
<i>Corbula patagonica</i>	BIOTA	Caraguatatuba, SP	29.07.2001	44	1
<i>Corbula patagonica</i>	BIOTA	São Sebastião, SP	12.09.2001	21	1
<i>Corbula patagonica</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/1992	13 e 51	6
<i>Corbula patagonica</i>		Enseada de Zimbros, SC	29.12.1992	3-6	1
<i>Corbula tryoni</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	jul/1991	80	1
<i>Corbula tryoni</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/1992	50-57	1
<i>Corbula tryoni</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	1991/1992	80	3
<i>Corbula tryoni</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/2002		1
<i>Corbula tryoni</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	abr/1997	35-40	3
<i>Corbula tryoni</i>		Litoral Sul de São Paulo	out-dez/1998	35-42	5
Total					63

Tabela 1.2. Relação de espécimes de *Corbula* provenientes de material de coleção e recém-coletados (indicados pó \*), utilizados para a extração de DNA total segundo o protocolo 9 (Apêndice 1) e posterior amplificação por *nested* PCR.

<b>Espécie</b>	<b>Projeto/Coletor</b>	<b>Localidade</b>	<b>Data</b>	<b>Profundidade (m)</b>	<b>N</b>
<i>Corbula caribaea</i> *	F. D. Passos	São Sebastião, SP	abr/2010	entremarés	6
<i>Corbula caribaea</i>	Fauna de Praia	São Sebastião, SP	08.04.1997	entremarés	13
<i>Corbula caribaea</i>	Fauna de Praia	São Sebastião, SP	22.07.1997	entremarés	13
<i>Corbula caribaea</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/1992	40	4
<i>Corbula caribaea</i>	S. Lopes	Ubatuba, SP			5
<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/2002		17
<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jan/2003		21
<i>Corbula caribaea</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	mai/1997	35-40	6
<i>Corbula caribaea</i>		Litoral Norte do Paraná	nov/1997	45	4
<i>Corbula caribaea</i>		Lage de Santos, SP	mai/1998	35-40	2
<i>Corbula caribaea</i>		Lage de Santos, SP	nov/1998	35-40	1
<i>Corbula caribaea</i>		Santos, SP	nov/1998	38-45	7
<i>Corbula caribaea</i>		São Francisco do Sul, SC	nov/1998	50-60	1
<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	29.12.1992	3-6	7
<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	nov-dez/1993	3-6	28
<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	ago-set/1994		30
<i>Corbula caribaea</i>		Picinguaba, SP			25
<i>Corbula aequivalvis</i>	S. Lopes	Ubatuba, SP			8
<i>Corbula aequivalvis</i>		Ubatuba, SP	07.03.2001		1
<i>Corbula aequivalvis</i>		Ubatuba, SP	1979/1980		2
<i>Corbula aequivalvis</i>		Enseada de Zimbros, SC	out-dez/1998	5-8	1
<i>Corbula lyoni</i>	C. Magenta	São Sebastião, SP	nov/1998		2
<i>Corbula lyoni</i>	DEPROAS	Cabo Frio, RJ	18.02.2001	100	1
<i>Corbula lyoni</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/1992	85	11
<i>Corbula lyoni</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	mai/1997	35-40	26
<i>Corbula lyoni</i>		Lage de Santos, SP	mai/1998	35-40	5
<i>Corbula lyoni</i>		Jureia, SP	jul/2000	42	4
<i>Corbula lyoni</i>		Paranaguá, PR	nov-dez/2000	44-48	3
<i>Corbula patagonica</i>	BIOTA	Caraguatatuba, SP	16.10.2001	25	1
<i>Corbula patagonica</i>	BIOTA	Caraguatatuba, SP	30.07.2001	25	8
<i>Corbula patagonica</i>	DEPROAS	Cabo Frio, RJ	18.02.2001	100	4
<i>Corbula patagonica</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/1992	51-85	35
<i>Corbula patagonica</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/2002		2
<i>Corbula patagonica</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jan/2003		1
<i>Corbula patagonica</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	mai/1997	35-40	4
<i>Corbula patagonica</i>		Litoral Norte do Paraná	nov/1997	45	13

(cont.)

(cont.)

<b>Espécie</b>	<b>Projeto/Coletor</b>	<b>Localidade</b>	<b>Data</b>	<b>N</b>
<i>Corbula patagonica</i>		Lage de Santos, SP	mai/1998	35-40 7
<i>Corbula patagonica</i>		Santos, SP	nov/1998	38-45 6
<i>Corbula patagonica</i>		São Francisco do Sul, SC	nov/1998	50-60 5
<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/2000	42 24
<i>Corbula patagonica</i>		Enseada de Zimbros, SC	29.12.1992	3-6 1
<i>Corbula patagonica</i>		Juatinga, RJ	mai-jun/99	64 7
<i>Corbula patagonica</i>		Enseada de Zimbros, SC	nov-dez/1993	3-6 1
<i>Corbula patagonica</i>		Paranaguá, PR	nov-dez/2000	44-48 6
<i>Corbula patagonica</i>		Enseada de Zimbros, SC	nov-dez/1993	3-6 1
<i>Corbula</i> sp1	TEBAR	São Sebastião, SP	jan/2003	1
<i>Corbula</i> sp1		Barra de Santos	nov/1998	38-45 2
<i>Corbula</i> sp1		Jureia, SP	jul/2000	42 2
<i>Corbula tryoni</i>	DEPROAS	Cabo Frio, RJ	18.02.2001	100 30
<i>Corbula tryoni</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/92	51-85 30
<i>Corbula tryoni</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	mai/1997	35-40 31
<i>Corbula tryoni</i>		Litoral Norte do Paraná	nov/1997	45 18
<i>Corbula tryoni</i>		Paranaguá, PR	nov/1997	4 1
<i>Corbula tryoni</i>		Bertioga, SP	fev/1998	28-35 16
<i>Corbula tryoni</i>		Lage de Santos, SP	mai/1998	35-40 3
<i>Corbula tryoni</i>		Santos, SP	nov/1998	38-45 4
<i>Corbula tryoni</i>		Jureia, SP	jul/2000	42 25
<i>Corbula tryoni</i>		Paranaguá, PR	28.08.1996	58 5
<i>Corbula tryoni</i>		Enseada de Zimbros, SC	ago-set/1994	1
<i>Corbula tryoni</i>		Juatinga, RJ	mai-jun/1999	64 10
<i>Corbula tryoni</i>		Paranaguá, PR	nov-dez/2000	44-48 6
Total				565

Tabela 1.3. Relação de espécimes recém-coletados utilizados para desenvolvimento de protocolos de extração e/ou desenho de *primers* específicos para *Corbula*.

<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>Data</b>	<b>N</b>
<i>Brachidontes</i> sp.	Praia de Itararé, São Vicente, SP	22.03.2008	3
<i>Corbula caribaea</i>	Baía do Araçá, São Sebastião, SP	ago/09	3
<i>Corbula caribaea</i>	Baía do Araçá, São Sebastião, SP	abr/10	6
<i>Corbula caribaea</i>	Baía do Araçá, São Sebastião, SP	20.04.2009	6
<i>Perna perna</i>	Praia de Itararé, São Vicente, SP	22.03.2008	6
<i>Sphenia fragilis</i>	Baía do Araçá, São Sebastião, SP	ago/09	1
<i>Sphenia fragilis</i>	Praia de Itararé, São Vicente, SP	22.03.2008	12
Total			37



Tabela 1.4. Comparação das principais diferenças, em cada etapa, entre os protocolos de extração de DNA total testados. Numeração dos protocolos como no Apêndice 1; Pré-extração = lavagem do tecido; N = número total de extrações feitas; Nf = número de extrações feitas de material de coleção; TS = taxa de sucesso das extrações (conforme explicado no texto); T = tempo; pK = proteinase K; Incubação = incubação em temperatura alta (55-70°C); V = volume em µl; SEVAG = clorofórmio/álcool isoamílico (24:1); NH<sub>4</sub>Ac = acetato de amônio; NaAc = acetato de sódio; GuHCL – hidrocloreto de guanidina.

Protocolo	Pré-Extração		Quebra mecânica	Lise		Extração	Precipitação		Limpeza	Eluição	N	Nf	TS	
	T	Tampão	pK	T	Composto	T	Composto	Incubação	V					
1	-		pistilo	sim	70'	SEVAG	isopropanol	-	etanol 70%+NH <sub>4</sub> Ac	não	20-30	4	4	0,25
2	-		pistilo	sim	4h- <i>overnight</i>	SEVAG	NaAc +isopropanol	30'-3d	etanol 70%	sim	20-30	16	3	0,33
3	48h	TE	pistilo	sim	96h	SEVAG	NaAc+ isopropanol	30'-3d	etanol 70%	sim	20-30	6	3	0,33
4	-		-	sim	96h	sílica (kit)	-		tampão (kit)	não	200	17	17	0,18
5	-		-	sim	96h	sílica (kit)	-		tampão (kit)	sim	50	8	8	0,50
6	48h	TE	-	sim	96h	sílica (kit)	-		tampão (kit)	sim	20	15	13	0,38
7	72h	GTE	lâmina	sim	48h	<i>salting-out</i>	isopropanol	24-48h	etanol 70%	sim	30-40	20	10	0
8	-		lâmina	sim	96h	SEVAG/sílica (kit)	-		tampão (kit)	sim	50	8	6	0,33
9	72h	GTE	lâmina	sim	24h	SEVAG/sílica (caseiro)	-		GuHCl+Tris-HCl+ etanol 95%	sim	50	5	4	0,75
Total											99	69		

Tabela 1.5: Informações sobre os *primers* testados. *Primers* LCO1490 e HCO2198 obtidos de Folmer *et al* (1994); 16Sar-5' e 16Sbr-3' obtidos de Palumbi (1996); sequência dos *primers* no sentido 5'-3'; tamanhos dos fragmentos em número aproximado de pares de bases (bp).

<i>Primer</i>			<i>Fragmento</i>	
Nome/Número	Sequência	Tm (°C)	Nome	Tamanho (bp)
LCO1490 (1)	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	56,7	COI	710
HCO2198 (2)	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	62,6		
16Sar-5' (7)	CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT	54,2	16S	500
16Sbr-3' (8)	CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	56,3		
9	CCT CCA TAT TGG GGG TAG GT	64,5	COI_car_1	233
10	CTA GAC CCG TTG GGT CAA AA	55,3		
11	TCA GTT CCT GAA AGG CTG CT	62,4	COI_car_2	169
12	TTA TTC GTG CAA ACG CCA TA	55,8		
13	AAA TCC GCC TTA CAA GTG	60,4	ITS1	460
14	CAA TGT GCG TTC AAG ATG T	58		
15	ACA ACT CTA TGC GGT GGA T	60,4	ITS2	478
16	CTC CGC TTA CTG ATA TGC TT	58,4		

Tabela 1.6. Comparação de sucesso de amplificação entre os protocolos de extração 6 e 9.  
\*Partes diferentes do mesmo indivíduo foram utilizadas para as duas extrações; \*\*material recém-coletado.

Protocolo	Número da extração	Espécie	Fragmento			
			16S	ITS1	ITS2	COI_car_2
9	19.1	<i>C. caribaea</i>	-	+	+	+
	19.2	<i>C. caribaea</i>	-	-	-	-
	19.3	<i>C. tryoni</i>	-	-	-	+
	19.4	<i>C. patagonica</i> *	+	+	+	+
	19.5	<i>C. caribaea</i> **	+	+	+	+
6	20.1	<i>C. caribaea</i>	-	-	-	-
	20.2	<i>C. caribaea</i>	-	-	+	-
	20.3	<i>C. tryoni</i>	-	-	+	+
	20.4	<i>C. patagonica</i> *	-	-	+	+
	20.5	<i>C. caribaea</i> **	-	-	-	-

Tabela 1.7. *Primers* desenhados para amplificação de pequenos fragmentos em *Corbula*. Sequência dos *primers* no sentido 5'-3'; tamanho do fragmento em número aproximado de pares de bases (bp); \*pares com bons resultados nas amplificações de material de coleção .

<i>Primer</i>			<i>Fragmento</i>	
Número	Sequência	Tm (°C)	Região gênica	Tamanho (bp)
19	GTTTGCCCGAATGAATAATG	61,7	COI	241
20	MGAACGCCCATTTCCCHAAG	63,5		
21	CCCCMAAGRHTGCTTAATG	61,5	COI	170
22	CRTTATTYATYCGGGCAAAC	52,5		
23	GTTTTCTWTDGTTGGCTGGTTTG	65,3	COI*	194
24	YATTAARGGMACCAACCAAT	42,5		
25	RGAAATATTGGWCATTCHGG	53,7	COI*	223
26	TAGTTAARGCCCCWGCHAAA	57,9		
27	GTAACGGYTGCGGTKMRTAG	65,4	16S*	169
28	SATRGGGTCTTCTCGTCTWT	48,6		
29	GACGAGAAGACCCYATGGAKC	61,5	16S*	228
30	ATCCAACATCGAGGTCGCAAACC	71,9		
31	AAWYCCSCCTWACAAGTGCC	53,8	ITS1*	241
32	CGMCGGAGACRATTCGTTCA	60,6		
33	CACACTACCTTGCCCTACCC	63,3	ITS1	250
34	TGSKTTCAAGATGTCGATGT	62,1		
35	GTCCGTCTCGAGAGTTCAGC	64,2	ITS2*	216
36	TTCAGCGGGTAGTCTCGTCT	63,9		
37	GCAGGACACATTGAACATCG	64,3	ITS2	244
38	CTGTCAGCGGCCACTTC	68,6		

Tabela 1.8. Pares de *primers* e temperaturas de anelamento utilizados para a amplificação de DNA proveniente de material de coleção de *Corbula*. *Primer 1*: LCO1490; *primer 2*: HCO2198; *primer 7*: 16Sar-5'; *primer 8*: 16Sbr-3'; outros *primers* seguem a mesma numeração das tabelas 1.5 e 1.7. Ta I: temperatura de anelamento inicial do *step up*; Ta F: temperatura de anelamento final do *step up*; Ta D: temperatura de anelamento dos demais ciclos da primeira amplificação; Ta 1: temperatura de anelamento dos primeiros cinco ciclos; Ta 2: temperatura de anelamento dos 25 ciclos finais.

Região gênica	<i>Primers externos</i>				<i>Primers internos</i>			
	Par	Ta I (°C)	Ta F (°C)	Ta D (°C)	Par	Nome do fragmento	Ta 1 (°C)	Ta 2 (°C)
COI	1&2	40	55	40	23&24	COIa	40	50
					25&26	COIb	40	50
16S	7&8	40	55	45	27&28	16Sa	49	59
					29&30	16Sb	55	65
ITS1	13&14	45	60	53	31&32	ITS1	49	59
ITS2	15&16	45	60	53	35&36	ITS2	49	59

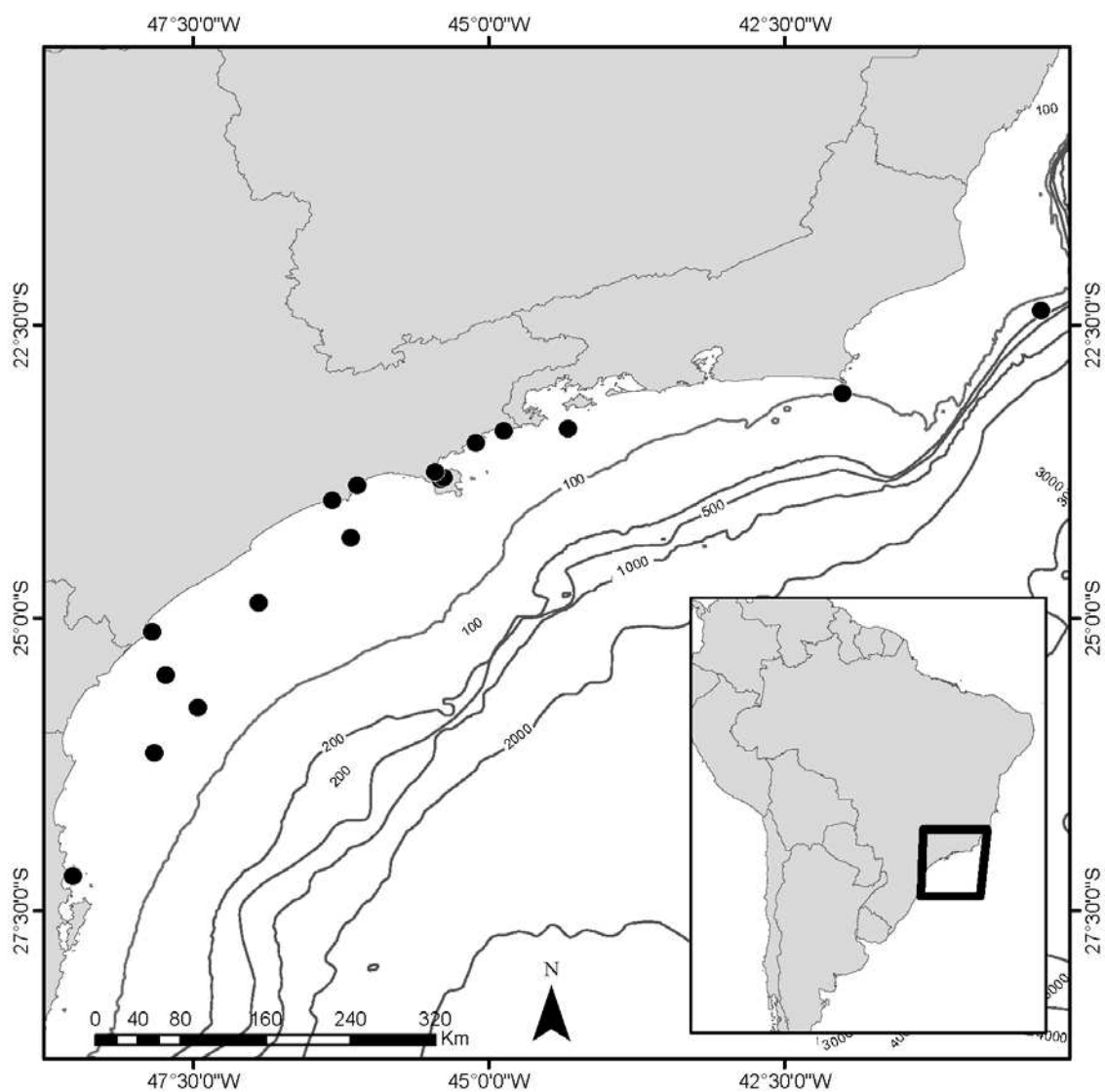


Figura 1.1. Áreas de coleta dos diversos projetos dos quais foram obtidos espécimes de *Corbula* para o presente estudo. Alguns pontos se referem a coordenadas aproximadas devido à abrangência da área ou por falta de dados precisos de coleta (as coordenadas foram, então, aproximadas dadas localidade e profundidade).

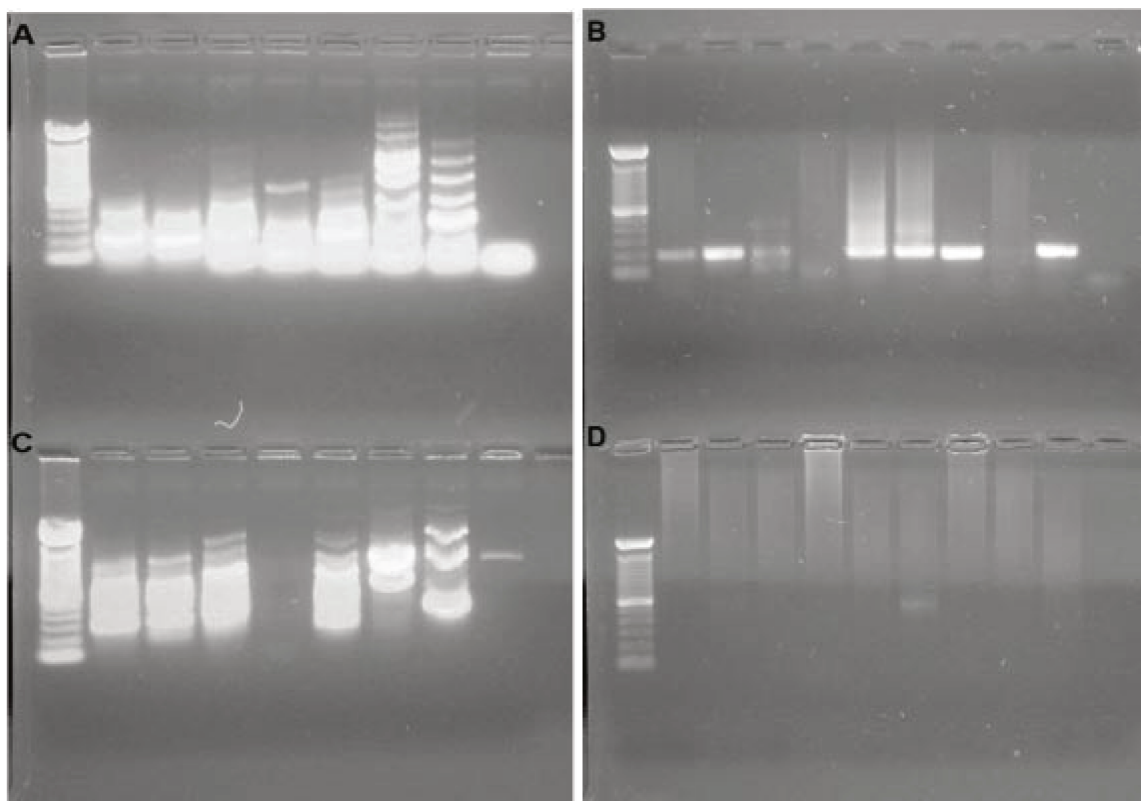


Figura 1.2. Géis de agarose 1,5% contendo produtos de reações de amplificação direta e amplificação *nested* com os pares de *primers* 31 e 32, e 37 e 38. A. Reação direta, *primers* 31 e 32; B. Reação *nested*, *primers* 31 e 32; C. Reação direta, *primers* 37 e 38; D. Reação *nested*, *primers* 37 e 38.

1 CCAAAAATCAAAACAAATGAATAACAATATAGGGTCCCCTAGACCCGTTGGGTCAAAA  
 1→

61 AAAMCTTGTATTAAAATTKCGGTCYAAAAAAGCATAGTTAARGCMCCWGCYAAAAC TGG  
 26→

121 CATWGCTAAAATYAAWARAAATSYYGTAATACCAATRGAMCTACARAAMARWGGWACCCG

181 AWGRAAATCCYYATGRACYCCMGAWCGCCCATTYCCYCARGTWGYRTAAAAATTAATAGA

241 AGCCATAATAGAAGASSTWCCCCAATATGKARRGAYARRATWARAAARTCWAYTGCRGS

301 MCCRGAATGYCCAATATTTTCYWGAYARRGGMGGRTAMAGMGTYCAWCCCCCYCCRAAACC  
 25←

361 MCCATCMGYATWAYRGARAAAAATAATAACCYKAWAGAAGCMGGTAWWAYYCAAACCT

421 WACRTTATTTTCATYCGKGC AAACGCCATATCSGGCATT TGYARYATTARRGGMACCAACC  
 24→

481 ARTTWCCAAATCCWCCYATTSTTATWGGYATWACYAAAAAAAAARATYATAATTAACCAT

541 GCCTKGTWACAATTATATTATAAAGCTGWGGRTCATTAAGCAKYCTTTSRGGRRCYGACA

601 RCTCYARACGAATMARMAYSytaarmccwgtkcccacCAAACCAGCCCAAAAAGAAAACA  
 23←

661 TAARRTAYAAGGTRCCAWTMTYTTTAGATTTTGGTTGACCAA  
 2←

Figura 1.3. Localização dos *primers* na sequência consenso entre *Corbula caribaea* e *Varicorbula dissimilis* do marcador COI. Pares de *primers* usados conjuntamente marcados no mesmo tom e/ou com bordas; setas indicam o sentido da extensão. *Primer* 1 incompleto.

1 GCCTGGTTTAAACAAAAACAYRTCTSYYYWRRWWKWWTSWAATRWTARGRGTMGGCSCCTG  
 7→

61 CCCGGTGGGATGCKGWGRGCATTCGTAAACGGTYGCGGTTMGTAGCYGYRCTAAGGTAGC  
 27→

121 GYAATARGTTGTCCTTTAAWTGGGGAARRGWATGAATGGKTTGACGTGGKMWAAGCTGTC

181 TCYTTWAYAAWMWKYRAAATTTWCTTTKTAGTGAAAAGGCTKWRATATTTGTAAWAGACG  
 TWTCTGC  
 29→  
 28←

241 AGAAGACCCYATSGAKCTTGGATTRWTRTWGYWATTRWRTWWKGMKYARGAAGTTTTACT  
 TCTTCTGGGRTAS

301 GGGRCAGTAGGRAKRTATAWARWAWTMYTCYTTTATTTTRARRGATCCTYATGTGGGGAGG

361 TGTTTAGTTTATMARAACTATAATGCTTCTGTGTRARRTMAMARGAAAAAGYTACCSTR

421 GGGATAACAGCGKWATCYKTTWMKMGAGRWCTWATYGWARAAMRGGWTTGCGACCTCGAT  
 30←

481 GTTGGATTTTRGGWAKMCTTGCWTGGTTGYRGGMGCTARKSGRGTAGGACTGTTTCGTCCTT

541 TGATACCCAACGTGATCTG  
 8←

Figura 1.4. Localização dos *primers* na sequência consenso entre as espécies de *Corbula* do marcador 16S. Pares de *primers* usados conjuntamente marcados no mesmo tom e/ou com bordas; setas indicam o sentido da extensão. *Primers* 7 e 8 incompletos.





## Apêndice 1 – Protocolos de extração de DNA total

### Extração orgânica – Protocolo de Doyle e Doyle, 1987

- 1) Aquecer 5 a 7,5 ml de tampão CTAB (2% brometo de cetil-trimetil-amônio, 1,4 M NaCl, 0,2%  $\beta$ -mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100mM Tris-HCl, pH 8,0) a 60°C em banho-maria
- 2) Macerar de 0,5 a 1,0 g de tecido foliar fresco em tampão pré-aquecido
- 3) Incubar a 60°C por 30 minutos agitando ocasionalmente
- 4) Adicionar um volume equivalente ao da amostra de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1)
- 5) Centrifugar a temperatura ambiente (autores utilizam 6000xg por 10 minutos)
- 6) Retirar a fase aquosa (superior), transferindo para um novo tubo
- 7) Adicionar 2/3 do volume de isopropanol gelado, invertendo o tubo (se necessário, incubar a temperatura ambiente *overnight*)
- 8) Centrifugar por 1 a 2 minutos; retirar o sobrenadante e adicionar o tampão de lavagem
- 9) Incubar por 20 minutos no mínimo; centrifugar para precipitar o DNA
- 10) Descartar sobrenadante e deixar secar a temperatura ambiente
- 11) Ressuspender em 1 ml de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4)
- 12) Adicionar RNase em uma concentração final de 10  $\mu$ g/ml; incubar por 30 minutos (37°C)
- 13) Diluir a amostra em 2 volumes de TE, adicionar acetato de amônio em uma concentração final de 2,5 M; misturar por inversão
- 14) Adicionar 2,5 volumes de etanol gelado, misturando gentilmente
- 15) Centrifugar (10 minutos, 10000xg, refrigerado)
- 16) Deixar secar a temperatura ambiente e ressuspender em um volume apropriado de TE

**Extração por adsorção em membrana de sílica – Protocolo do kit QIAamp FFPE Tissue (QIAGEN)**

- 1) Cortar cerca de 25 mg de tecido
- 2) Colocar em um tubo de 1,5 ml e adicionar 180  $\mu$ l de ATL
- 3) Adicionar 20  $\mu$ l de proteinase K , agitar no vórtex e incubar a 55°C até total lise do tecido (entre 1 e 3 horas), agitando ocasionalmente
- 4) Agitar no vórtex por 15 segundos
- 5) Adicionar 200  $\mu$ l de AL, agitar no vórtex, incubar por 10 minutos a 70° C
- 6) Adicionar 200  $\mu$ l de etanol 96-100%, agitar no vórtex
- 7) Transferir a amostra para a coluna colocada em um tubo de 2 ml
- 8) Centrifugar (1 minuto, 6000xg); descartar o tubo coletor juntamente com o líquido recolhido
- 9) Colocar a coluna em um novo tubo coletor de 2 ml, adicionar 500  $\mu$ l de AW1
- 10) Centrifugar (1 minuto, 6000xg); descartar o tubo coletor juntamente com o líquido recolhido
- 11) Colocar a coluna em um novo tubo coletor de 2 ml, adicionar 500  $\mu$ l de AW2
- 12) Centrifugar (3 minutos, 20000xg ou velocidade máxima); descartar o tubo coletor juntamente com o líquido recolhido
- 13) Colocar a coluna em um tubo de 1,5 ou 2 ml, pipetar 200  $\mu$ l de AE, diretamente na membrana
- 14) Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto
- 15) Centrifugar (1 minuto, 6000xg)
- 16) Repetir a ressuspensão (passos de 13 a 15), utilizando um novo tubo

**Extração por precipitação de proteínas por sais – Protocolo do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega)**

- 1) Macerar 40 mg do material
- 2) Adicionar 600  $\mu$ l da solução de lise nucléica e agitar no vórtex
- 3) Incubar a 65°C por 15 minutos
- 4) Adicionar 3  $\mu$ l de RNase, invertendo o tubo de 2 a 5 vezes; incubar a 37°C por 15 minutos
- 5) Deixar a amostra esfriar até a temperatura ambiente (5 minutos)
- 6) Adicionar 200  $\mu$ l da solução de precipitação de proteína e agitar no vórtex por 20 segundos
- 7) Centrifugar (3 minutos; 13000-16000xg)
- 8) Remover sobrenadante (contém o DNA) e transferi-lo para um novo tubo com 600  $\mu$ l de isopropanol a temperatura ambiente
- 9) Misturar gentilmente por inversão
- 10) Centrifugar (1 minuto, 13000-16000xg)
- 11) Descartar o sobrenadante, adicionar 600  $\mu$ l de etanol 70% a temperatura ambiente e inverter o tubo
- 12) Centrifugar (1 minuto, 13000-16000xg)
- 13) Remover o etanol; deixar o tubo secar invertido sobre papel toalha por 15 minutos
- 14) Adicionar 100  $\mu$ l de solução de reidratação e incubar por 1 hora a 65°C

**Protocolo 1:** Extração orgânica (adaptado de Doyle e Doyle, 1987)

- 1) Macerar o material com 100  $\mu$ l de CTAB 2%, 2  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol e 5  $\mu$ l de proteinase K (10 mg/ml)
- 2) Adicionar 100  $\mu$ l de CTAB 2%
- 3) Incubar a 60°C por 70 minutos
- 4) Adicionar 200  $\mu$ l de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1)
- 5) Centrifugar (10 minutos, 7700 rpm, 8°C)
- 6) Retirar o sobrenadante e colocar em novo tubo
- 7) Agitar no vórtex e incubar no gelo por 2 minutos  
Repetir de 4 a 7 duas vezes
- 8) Adicionar 350  $\mu$ l de isopropanol e agitar
- 9) Centrifugar (10 minutos, 7700 rpm, 8°C)
- 10) Descartar sobrenadante e ressuspender o DNA em 350  $\mu$ l de etanol 70% e 20  $\mu$ l de acetato de amônio 10 mM
- 11) Incubar a -80°C por 30 minutos ou *overnight*
- 12) Centrifugar (20 minutos, 12000 rpm, 8°C)
- 13) Descartar o sobrenadante e secar o tubo invertido em papel toalha
- 14) Ressuspender o DNA em TE (20 a 30  $\mu$ l)

**Protocolo 2:** Extração orgânica (adaptado de Doyle e Doyle, 1987)

- 1) Macerar o material, 100 µl de CTAB 2%, 2 µl de β-mercaptoetanol, 5 µl de proteinase K (10 mg/ml)
- 2) Adicionar mais 100 µl de CTAB
- 3) Incubar a 60°C por 4h ou *overnight*, agitando eventualmente
- 4) Adicionar 200 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e agitar rapidamente no vórtex
- 5) Centrifugar (10 minutos, 7700 rpm, 8°C)
- 6) Remover a camada superior (contendo DNA), transferindo para um novo tubo; evitar remover a camada inferior!  
Repetir de 4 a 6 duas vezes
- 7) Adicionar acetato de sódio 3 M de acordo com a fórmula:  
$$\text{Vol (NaAc) } \mu\text{l} = \text{Vol x (fase aquosa) } \mu\text{l} \times 0,04$$
- 8) Adicionar isopropanol 100% de acordo com a fórmula:  
$$\text{Vol (isopropanol) } \mu\text{l} = \text{Vol (fase aquosa) } \mu\text{l} \times 0,65$$
- 9) Inverter o tubo gentilmente até que as fases estejam completamente misturadas
- 10) Incubar a -20°C por 30 minutos ou de 1 a 3 dias para amostras com pouco DNA
- 11) Centrifugar (20 minutos, 12000 rpm, 8°C)
- 12) Descartar o álcool
- 13) Lavar o *pellet* com etanol 70%; descartar o álcool  
Repetir a lavagem
- 14) Deixar o tubo secar invertido em papel toalha
- 15) Ressuspender o DNA em 20 a 30 µl de TE, incubando por 15 minutos a 65°C

**Protocolo 3:** Extração orgânica (adaptado de Doyle e Doyle, 1987, e Chase *et al.* 1998b)

- 1) Lavar o material por 48 horas em TE a 4°C, trocando o tampão ao fim das primeiras 24 horas
- 2) Macerar o material, 100 µl de CTAB 2%, 2 µl de β-mercaptoetanol, 5 µl de proteinase K (50 mg/ml)
- 3) Adicionar mais 100 µl de CTAB
- 4) Incubar a 55°C por 24 horas, agitando eventualmente
- 5) Adicionar mais 5 µl de proteinase K e incubar por mais 72 horas, agitando eventualmente
- 6) Adicionar 200 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e agitar rapidamente no vórtex
- 7) Centrifugar (10 minutos, 7700 rpm, 8°C)
- 8) Remover a camada superior (contendo DNA), transferindo para um novo tubo; evitar remover a camada inferior! Repetir de 4 a 6 duas vezes
- 9) Adicionar acetato de sódio 3 M de acordo com a fórmula:  
$$\text{Vol (NaAc) } \mu\text{l} = \text{Vol x (fase aquosa) } \mu\text{l} \times 0,04$$
- 10) Adicionar isopropanol 100% de acordo com a fórmula:  
$$\text{Vol (isopropanol) } \mu\text{l} = \text{Vol (fase aquosa) } \mu\text{l} \times 0,65$$
- 11) Inverter o tubo gentilmente até que as fases estejam completamente misturadas
- 12) Incubar a -20°C por 30 minutos ou de 1 a 3 dias para amostras com pouco DNA
- 13) Centrifugar (20 minutos, 12000 rpm, 8°C)
- 14) Descartar o álcool
- 15) Lavar o *pellet* com etanol 70%; descartar o álcool; repetir a lavagem
- 16) Deixar o tubo secar invertido em papel toalha
- 17) Ressuspender o DNA em 20 a 30 µl de TE, incubando por 15 minutos a 65°C

**Protocolo 4:** Extração por adsorção em membrana de sílica (adaptado por Chase *et al.* 1998b)

- 1) Colocar indivíduos inteiros em tubos e adicionar 200  $\mu$ l de ATL
- 2) Incubar por 24h a 55°C
- 3) Adicionar 5  $\mu$ l de proteinase K (50 mg/ml) e mais 95  $\mu$ l de ATL
- 4) Incubar por mais 72h a 55°C
- 5) Agitar no vórtex por 15 segundos
- 6) Adicionar 300  $\mu$ l de AL, agitar no vórtex, incubar por 10min a 70° C
- 7) Adicionar 300  $\mu$ l de etanol 96-100%, agitar no vórtex
- 8) Transferir a amostra para a coluna colocada em um tubo de 2 ml
- 9) Centrifugar (1 minuto, 8000 rpm); descartar o tubo coletor juntamente com o líquido recolhido
- 10) Colocar a coluna em um novo tubo coletor de 2 ml, adicionar 500  $\mu$ l de AW1
- 11) Centrifugar (1 minuto, 8000 rpm); descartar o tubo coletor juntamente com o líquido recolhido
- 12) Colocar a coluna em um novo tubo coletor de 2 ml, adicionar 500  $\mu$ l de AW2
- 13) Centrifugar (3 minutos, velocidade máxima); descartar o tubo coletor juntamente com o líquido recolhido
- 14) Colocar a coluna em um tubo de 1,5 ou 2 ml, pipetar 200  $\mu$ l de tris-HCl, pH8,0, diretamente na membrana
- 15) Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto
- 16) Centrifugar (1 minuto, 8000 rpm)



**Protocolo 5:** Extração por adsorção em membrana de sílica (adaptado de Chase *et al.* 1998b)

- 1) Colocar indivíduos inteiros em tubos e adicionar 200  $\mu$ l de ATL/T1
- 2) Incubar por 24h a 55°C
- 3) Adicionar 5  $\mu$ l de proteinase K (50 mg/ml) e mais 95  $\mu$ l de ATL/T1
- 4) Incubar por mais 72h a 55°C, agitando ocasionalmente
- 5) Agitar no vórtex por 15 segundos
- 6) Adicionar 200  $\mu$ l de AL/B3, agitar no vórtex, incubar por 10min a 70° C
- 7) Adicionar 210  $\mu$ l de etanol 95%, agitar no vórtex
- 8) Transferir a amostra para a coluna colocada em um tubo de 2 ml
- 9) Centrifugar (1 minuto, 8000 rpm); descartar o tubo coletor juntamente com o líquido recolhido
- 10) Colocar a coluna em um novo tubo coletor de 2 ml, adicionar 500  $\mu$ l de AW1/B5
- 11) Centrifugar (1 minuto, 8000 rpm); descartar o tubo coletor juntamente com o líquido recolhido
- 12) Colocar a coluna em um novo tubo coletor de 2 ml, adicionar 500  $\mu$ l de AW2/B5
- 13) Centrifugar (3 minutos, velocidade máxima); descartar o tubo coletor juntamente com o líquido recolhido
- 14) Colocar a coluna em um tubo de 1,5 ou 2 ml, pipetar 50  $\mu$ l de AE/BE pré-aquecido a 70°C, diretamente na membrana
- 15) Incubar a 70°C por 5 minutos
- 16) Centrifugar (1 minuto, 8000 rpm)

**Protocolo 6:** Extração por adsorção em membrana de sílica (adaptado de Chase *et al.* 1998b, para o kit NucleoSpin XS, MN)

- 1) Lavar o material por 48 horas em PBS, trocando o tampão com 24 horas
- 2) Colocar indivíduos inteiros em tubos e adicionar 80 µl de T1
- 3) Incubar por 24h a 55°C
- 4) Adicionar 12 µl de proteinase K (23 mg/ml) e mais 40 µl de T1
- 5) Incubar por mais 72h a 55°C, agitando ocasionalmente
- 6) Agitar no vórtex por 15 segundos
- 7) Adicionar 80 µl de B3, agitar no vórtex, incubar por 10min a 70° C
- 8) Adicionar 80 µl de etanol 95%, agitar no vórtex
- 9) Transferir a amostra para a coluna colocada em um tubo de 2 ml
- 10) Centrifugar (1 minuto, 8000 rpm); descartar o tubo coletor juntamente com o líquido recolhido
- 11) Colocar a coluna em um novo tubo coletor de 2 ml, adicionar 50 µl de B5
- 12) Centrifugar (1 minuto, 8000 rpm); descartar o tubo coletor juntamente com o líquido recolhido
- 13) Colocar a coluna em um novo tubo coletor de 2 ml, adicionar 50 µl de B5
- 14) Centrifugar (3 minutos, velocidade máxima); descartar o tubo coletor juntamente com o líquido recolhido
- 15) Colocar a coluna em um tubo de 1,5 ou 2 ml, pipetar 20 µl de BE pré-aquecido a 70°C, diretamente na membrana
- 16) Incubar a 70°C por 5 minutos
- 17) Centrifugar (1 minuto, 8000 rpm)

Opcional: incubar a 90°C por 8 minutos com o tubo aberto para total remoção do álcool

**Protocolo 7:** Extração por precipitação de proteínas por sais (adaptado por C. Dayton)

- 1) Retirar 20 mg de material
- 2) Lavar o material em 10 ml de GTE por 72 horas trocando o GTE a cada 24 horas
- 3) Retirar a amostra do tampão e deixar secar a temperatura ambiente (ou a 55°C)
- 4) Cortar a amostras em pedaços menores (não macerar)
- 5) Colocar em um tubo com 500 µl de tampão de lise nucleica, 100 µl de proteinase K, 20 µl de DDT 1M
- 6) Incubar a 55°C por 24 horas
- 7) Adicionar mais 20 a 50 µl de proteinase K e 10 a 20 µl de RNase
- 8) Incubar por mais 24 horas a 55°C (ou 72 horas seguindo Chase *et al.* 1998b)
- 9) Deixar as amostras esfriar até a temperatura ambiente, colocando em gelo por 5 minutos
- 10) Adicionar 200 µl da solução de precipitação de proteína, invertendo o tubo 50 vezes (não usar vórtex)
- 11) Centrifugar (3 minutos, 13000-16000xg)
- 12) Transferir sobrenadante para um novo tubo e adicionar 600 µl de isopropanol 100% gelado, invertendo o tubo de 25 a 50 vezes
- 13) Incubar a -20°C por 24 a 48 horas
- 14) Centrifugar (20 a 30 minutos, 13000-16000xg, 4°C)
- 15) Retirar sobrenadante
- 16) Adicionar 200 µl de etanol 70% a temperatura ambiente, invertendo o tubo de 25 a 50 vezes
- 17) Centrifugar (3 minutos, 13000-16000 rpm)
- 18) Retirar o álcool e deixar o tubo secar invertido sobre um papel toalha
- 19) Ressuspender em 30 a 40 µl de solução de hidratação do DNA, incubando a 55°C por 1 hora

**Protocolo 8:** Extração orgânica/adsorção em membrana de sílica (Laboratório Jodrell)

- 1) Picar material
- 2) Acrescentar 200 µl de CTAB e 1 µl de β-mercaptoetanol
- 3) Incubar a 55°C por 24 horas
- 4) Acrescentar 90 µl de CTAB, 0,5 µl de β-mercaptoetanol e 10 µl de proteinase K (20 mg/ml)
- 5) Incubar a 55°C por 72 horas
- 6) Adicionar 300 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitar por 2 minutos
- 7) Centrifugar (10 minutos, 13000 rpm)
- 8) Transferir o sobrenadante para um novo tubo  
Repetir de 6 a 8 duas vezes
- 9) Pipetar AL/etanol 95-100% (1:1) em uma coluna, e em seguida a amostra, na proporção de 5:1 (solução AL/etanol:solução de DNA)
- 10) Centrifugar (2 minutos, 10000 rpm)
- 11) Descartar tubo coletor e líquido recolhido; colocar coluna em novo tubo
- 12) Adicionar 500 µl de tampão de lavagem 1 (AW1 ou BW)
- 13) Centrifugar (2 minutos, 10000 rpm)
- 14) Descartar tubo coletor e líquido recolhido; colocar coluna em novo tubo
- 15) Adicionar 500 µl de tampão de lavagem 2 (AW2 ou B5)
- 16) Centrifugar (2 minutos, 13000 rpm)
- 17) Adicionar 50 µl de tampão de ressuspensão (AE ou BE) pré-aquecido a 70°C; incubar a 70°C por 5 minutos
- 18) Centrifugar (1 minuto, 8000 rpm)

**Protocolo 9:** Extração orgânica/adsorção em sílica (modificado de Paula 2009)

- 1) Deixar cada indivíduo imerso em 10 ml de GTE (Glicina 100mM, Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) por 72 horas em a 4°C, trocando o tampão a cada 24 horas
- 2) Picar cada indivíduo sobre uma lâmina de vidro com o auxílio de uma lâmina de metal
- 3) Transferir o tecido picado para tubo de microcentrífuga de 1,5 ml contendo 500 µl de tampão de lise (GuHCl 4M, Tris-HCl 10mM, EDTA 20mM, TritonX-100 0,65%, pH<6,5) e 20 µl de proteinase K (20 mg/ml)
- 4) Incubar por 24h a 60°C
- 5) Extração orgânica: acrescentar 500 µl de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 em cada tubo
- 6) Misturar por inversão
- 7) Centrifugar por 3 minutos a 2500xg
- 8) Transferir o sobrenadante para u novo tubo
- 9) Purificação com sílica: acrescentar 1000 µl de tampão de lise e 40 µl de solução de sílica (modo de preparo no Apêndice 2)
- 10) Incubar por 10 minutos, sobre a bancada, com agitação periódica
- 11) Centrifugar por 3 minutos a 2500xg descartando o líquido em seguida
- 12) Ressuspender o *pellet* de sílica em 1000 µl de solução de lavagem (GuHCl 4M, Tris-HCl 10mM, ph<6,5)
- 13) Centrifugar por 3 minutos a 2500xg, descartando o líquido em seguida
- 14) Ressuspender o *pellet* em 1000 µl de etanol 95%
- 15) Centrifugar por 3 minutos a 2500xg, descartando o líquido em seguida
- 16) Repetir passos 14 e 15
- 17) Incubar os tubos com tampa aberta em banho seco a 60°C, por 10 a 15 minutos, para secar a sílica
- 18) Ressuspender o *pellet* em 65 µl de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0)
- 19) Incubar a 60°C por 10 minutos, com agitação periódica
- 20) Centrifugar por 5 minutos a 11000xg
- 21) Retirar 50 µl do líquido, cuidadosamente, sem tocar a sílica, e transferir para um novo tubo; armazenar a -20°C

## **Apêndice 2 - Preparação da solução de sílica**

1. Em um tubo de Falcon, colocar 3 g de sílica em 25 ml de água MilliQ
2. Misturar bem, passando pelo vórtex, e deixar decantar por 24h
3. Descartar 22 ml do sobrenadante e completar novamente 25 ml de água MilliQ
4. Misturar bem, passando no vórtex, e deixar decantar por 5h
5. Descartar 22 ml do sobrenadante e acrescentar 30  $\mu$ l de HCl concentrado
6. Aliquotar em tubos de microcentrífuga conforme a necessidade de uso (preparar alíquotas cerca de 20% maiores que o necessário – por exemplo, alíquotas de 480  $\mu$ l para 10 extrações)
7. Autoclavar e guardar em local escuro; pode ser usada até seis meses após o preparo

## 2. Delimitação de espécies de *Corbula* (Corbulidade, Bivalvia) da costa sudeste e sul do Brasil

### Resumo.

A delimitação de espécies tem recebido grande atenção recentemente, tanto pela necessidade de se inventariar a biodiversidade do planeta quanto pela maior disponibilidade de dados moleculares. O uso de marcadores moleculares para este fim favorece especialmente táxons difíceis de se delimitar morfológicamente, como moluscos da família Corbulidae. Com o objetivo de analisar os limites específicos de *Corbula* das regiões Sudeste e Sul do Brasil, dois marcadores mitocondriais, COI e 16S, foram estudados por meio de quatro métodos de delimitação: GMYC, Brownie, a regra das 4x e o ABGD. Analisando as diferentes linhas de evidência, pôde-se concluir que, de modo geral, a delimitação molecular corrobora a identificação morfológica. Foi possível corroborar o *status* de três espécies (*Corbula caribaea*, *Corbula tryoni* e *Corbula lyoni*). Os indivíduos identificados como *Corbula patagonica* dividiram-se em duas espécies distintas. O único indivíduo de *Corbula aequivalvis* foi considerado distinto das outras espécies e um indivíduo atribuído a *Corbula* sp1 não pôde ser distinguido de *C. caribaea*. Os diferentes resultados obtidos com a utilização de diferentes marcadores e métodos ressaltam a importância de não se basear a taxonomia em apenas algumas fontes de informação.

## 2.1. Introdução

Espécies são uma unidade fundamental da biologia, sendo usadas como o nível hierárquico de referência em estudos das mais diversas áreas (Sites e Marshall 2004, Fujita *et al.* 2012). Assim, sua correta identificação, isto é, a atribuição de indivíduos a uma determinada espécie, é crucial para pesquisas biológicas. Antes da identificação, porém, é preciso estabelecer limites entre as espécies, ou seja, delimitá-las (Boykin *et al.* 2012). Contudo, esta não é uma questão trivial. Espécies, ao contrário de outros níveis de organização biológica, como células e tecidos, existem em um nível maior do que nós, organismos humanos, o que torna difícil, ou quase impossível, que consigamos delimitar uma espécie apenas olhando para ela (Queiroz 2007). Assim, delimitação de espécies tem recebido grande atenção nos últimos 15 anos (Knowlton 2000, Sites e Marshall 2003, 2004, Wiens 2007, Fujita *et al.* 2012).

A questão de delimitar espécies pode ser confundida com outro problema da biologia, o conceito de espécie (Sites e Marshall 2003, Queiroz 2007). Esta é provavelmente uma das grandes questões da biologia e numerosos conceitos já foram propostos e discutidos (Wilkins 2011). Queiroz (2007) fez uma avaliação de diversos deles e concluiu que todos possuem um elemento em comum, que ele utilizou para propor o conceito geral de espécies. De acordo com esse conceito, espécies são linhagens de metapopulações evoluindo independentemente. Estas linhagens seriam o elemento comum, e outras propriedades estabelecidas pelos diferentes conceitos para definir espécies são, na verdade, critérios operacionais para sua delimitação e não elementos essenciais para sua definição (Queiroz 2007). Essas propriedades surgem ao longo do processo de especiação,



sem uma ordem definida, de tal forma que um par de espécies que divergiu recentemente pode apresentar apenas algumas delas e não necessariamente as mesmas que outro par com o mesmo tempo de divergência, o que seria fonte de discordância entre os diferentes conceitos (Sites e Marshall 2004, Queiroz 2007). Dessa forma, ao se adotar o conceito de espécie proposto por Queiroz (2007), a presença de uma determinada propriedade deixa de ser necessária para se delimitar espécies. Por outro lado, a presença de diversas propriedades serve como corroboração dos limites inferidos.

Os critérios operacionais para delimitação de espécies podem ser baseados em árvores ou não (Sites e Marshall 2004). Essa divisão reflete, de certa forma, a natureza do problema: espécies estão no limite entre processos micro e macroevolutivos (Carstens e Dewey 2010). Assim, geneticistas de população tendem a abordar o problema por meio da análise de processos populacionais (critérios não baseados em árvores), enquanto sistematas tendem a utilizar uma abordagem filogenética (critérios baseados em árvores). Dado o crescente interesse na questão, diversos métodos têm sido propostos para delimitar espécies de acordo com diferentes critérios (Birky *et al.* 2005, 2010, Pons *et al.* 2006, Knowles e Carstens 2007, O'Meara 2010, Yang e Rannala 2010, Puillandre *et al.* 2012a). Uma abordagem bastante utilizada recentemente é combinar diferentes métodos para uma delimitação mais robusta (Leliaert *et al.* 2009, Bode *et al.* 2010, Hamilton *et al.* 2011, Bacon *et al.* 2012, Boykin *et al.* 2012, Fernandez *et al.* 2012, Paz e Crawford 2012).

O interesse pela delimitação de espécies foi renovado recentemente (Sites e Marshall 2003) devido à crescente necessidade de se conhecer nossa biodiversidade e também à popularização de técnicas moleculares (Fujita *et al.* 2012). Tradicionalmente, a taxonomia se baseia em caracteres morfológicos para identificação e delimitação de

espécies, mas a utilização de caracteres moleculares vem mudando o campo. Taxonomia integrada tem sido uma das áreas que mais cresce dentro da biologia. Cada vez mais autores chamam a atenção para a necessidade de utilizar dados de diferentes fontes nos estudos de biodiversidade, ressaltando a inclusão de dados moleculares (Ferri *et al.* 2009, Winker 2009). Para tanto, é necessário que sejam geradas informações sobre a diversidade das espécies em nível molecular, e muitos são os trabalhos dedicados à delimitação específica com base em marcadores moleculares (Pons *et al.* 2006, Guarniero *et al.* 2010, Claremont *et al.* 2011, Puillandre *et al.* 2012a, Puillandre *et al.* 2012b).

No ambiente marinho, em particular, o uso de informações obtidas por meio de análises moleculares tem se mostrado muito importante (Feral 2002, Claremont *et al.* 2011, Castelin *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012, Salvi e Mariottini 2012). Delimitar espécies neste ambiente é um grande desafio, pois são encontrados inúmeros exemplos de complexos específicos e limites pouco definidos entre espécies semelhantes (Knowlton 1993, Avise 2004, Miglietta *et al.* 2011). Além disso, a dificuldade de coleta em grandes profundidades (Boyle *et al.* 2004) faz com que a biodiversidade marinha seja pouco conhecida, especialmente para moluscos (Bouchet *et al.* 2002). Neste táxon, no qual as espécies são tradicionalmente descritas com base em caracteres conchiológicos (Puillandre *et al.* 2009, Mikkelsen 2011), estudos moleculares têm revelado níveis de diversidade diferentes dos encontrados em análises morfológicas (Adamkewicz e Harasewych 1996, Peek *et al.* 1997, Jozefowicz e Foighil 1998, Knowlton 2000, Jarnegren *et al.* 2007, Guarniero *et al.* 2010, Chen *et al.* 2011), indicando que basear a taxonomia do grupo apenas em caracteres morfológicos não é a abordagem mais adequada.

Apesar de a família Corbulidae ser um grupo bem definido tanto morfológicamente

quanto molecularmente (Giribet e Wheeler 2002, Taylor *et al.* 2007), suas espécies são reconhecidamente de difícil identificação com base em caracteres da concha (Mikkelsen e Bieler 2001, Coan 2002). As espécies brasileiras não são exceção, fato comprovado pelas extensas listas de sinônimos e pela confusa taxonomia do grupo. Das nove espécies registradas para o Brasil (Rios 1994, Arruda *et al.* 2007), cinco são analisadas no presente estudo: *Corbula (Corbula) caribaea* d'Orbigny, 1853; *C. (Corbula) lyoni* Pilbsbry, 1897; *C. (Corbula) patagonica* d'Orbigny, 1846; *C. (Corbula) tryoni* E. A. Smith, 1880; e *C. (Juliacorbula) aequivalvis* Philippi, 1836. Destas, *C. caribaea* apresenta os maiores problemas taxonômicos, tendo até outros sete epítetos associados a ela (Warmke e Abbott 1961, Altena 1971, Abbott 1974, Rios 1994). As outras espécies apresentam menos controvérsias na sua taxonomia, o que não indica que estejam bem delimitadas. Esta aparente estabilidade taxonômica pode ser devida aos poucos estudos realizados, principalmente por serem espécies encontradas com mais frequência no sublitoral.

Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar os limites específicos de *Corbula* das regiões Sudeste e Sul do Brasil com base em marcadores moleculares. Neste contexto, procurou-se verificar se a delimitação genética corresponde à identificação feita com base em caracteres da concha. Além disso, dado o crescente número de métodos para delimitação molecular, foi feita uma breve análise do desempenho de cada um dos utilizados no estudo. Dessa forma, o trabalho procurou trazer contribuições não só para a taxonomia de *Corbula* no Brasil, como também para a questão da delimitação de espécies como um todo.

## 2.2. Material e métodos

### 2.2.1. Obtenção de sequências

Foram estudados espécimes de cinco espécies de *Corbula*, *C. caribaea*, *C. aequivalvis*, *C. lyoni*, *C. patagonica* e *C. tryoni*, mais um indivíduo identificado apenas como *Corbula* sp1, de diferentes áreas das regiões Sudeste e Sul do país (Tabela 2.1; Figura 2.1). Cada indivíduo recebeu um código na seguinte forma XYYAA\_NNN, onde X representa a espécie, YY o local de coleta, AA o ano de coleta, e NNN é a numeração dada durante o processo de extração. O código foi dado visando a facilitar a interpretação dos resultados, especialmente durante a inspeção visual das árvores. A lista a seguir traz o significado de cada letra ou conjunto de letras.

Códigos para espécies:

C – *Corbula caribaea*

D – *Corbula aequivalvis*

L – *Corbula lyoni*

T – *Corbula tryoni*

P – *Corbula patagonica*

S – *Corbula* sp1

Códigos para locais de coleta:

BA - Ilha Bom Abrigo, SP

BC - Bacia de Campos

Be - Bertioga, SP

CF - Cabo Frio, RJ

EZ - Enseada de Zimbros, SC

Jr - Jureia, SP

Jt - Juatinga, RJ

LS - Laje de Santos, SP

Pa - Paranaguá, PR

PR - Litoral Norte do Paraná

Sa - Barra de Santos, SP

SF - São Francisco do Sul, SC

SS – São Sebastião, SP

O DNA total foi extraído usando uma combinação de extração orgânica e adsorção em sílica, conforme o capítulo anterior. Dois marcadores mitocondriais, COI e 16S, foram amplificados por PCR aninhada (*nested* PCR). Inicialmente, o marcador inteiro foi amplificado por iniciadores (*primers*) universais (Folmer *et al.* 1994, Palumbi 1996). Em seguida, os produtos dessas reações foram amplificados com pares de *primers* internos, dois para cada marcador (Tabela 2.2). As reações seguiram os parâmetros e as concentrações de reagentes determinados no primeiro capítulo.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp, em um sequenciador capilar Prism 377 (Perkin Elmer). As sequências complementares obtidas foram editadas no programa ChromasPro (Technelysium Pty Ltd). Para o COI, os *contigs* dos dois fragmentos (COIa e COIb) foram montados separadamente para cada indivíduo. Para o 16S, como há sobreposição entre os dois fragmentos (16Sa e 16Sb), as quatro sequências obtidas de cada indivíduo foram usadas para obter um único *contig*. As sequências assim construídas foram comparadas com o banco de dados GenBank, por meio da ferramenta BLAST. Foram utilizadas para as análises apenas sequências cujo melhor *match* foi com uma espécie de bivalve. Essa abordagem foi adotada porque já foi verificado que nem sempre o melhor *match* no GenBank é a sequência filogeneticamente mais próxima (Jarnegren *et al.* 2007, Mikkelsen *et al.* 2007).

As sequências obtidas foram alinhadas com o aplicativo *online* MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Os alinhamentos foram, então, editados

manualmente no programa Mesquite versão 2.75 (Maddison e Maddison 2011). As matrizes dos fragmentos COIa e COIb foram concatenadas, gerando uma matriz única para o COI. Para análise conjunta dos dois marcadores, foi criada uma matriz concatenada com os indivíduos em comum entre ambos. Para a determinação do modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos mais adequado a cada conjunto de dados (COI, 16S e matriz concatenada), foi utilizado o critério de informação bayesiano (BIC) implementado no programa jModelTest (Posada 2008).

### **2.2.2. Delimitação de espécies**

Inicialmente, foram obtidas árvores de gênicas coalescentes para os três conjuntos de dados, com o programa BEAST v1.7.4 (Drummond e Rambaut 2007), utilizando-se o modelo de substituição adequado a cada caso. Como *priori* para a árvore, foi utilizado o modelo de coalescência para população de tamanho constante. Para o relógio molecular, foi escolhido o modelo sem relação entre linhagens (*relaxed clock*), seguindo uma distribuição log-normal, com taxa média fixada em 1, para a obtenção de árvores ultramétricas (ver adiante). Para cada matriz, foram rodadas três cadeias com 50 milhões de gerações e os parâmetros e as árvores foram salvos a cada 5000. As verossimilhanças de cada cadeia foram verificadas no programa Tracer v1.5 (Drummond e Rambaut 2007). Uma vez constatadas a estabilização e a convergência destas verossimilhanças, bem como um número de amostras independentes maior que 200 para as cadeias conjuntamente, as árvores obtidas foram combinadas em um único arquivo com o programa LogCombiner

v1.7.4 (Drummond e Rambaut 2007), eliminando-se, antes, os primeiros 25% de cada cadeia (*burn in*). As 22503 árvores assim obtidas foram sumarizadas com o programa TreeAnnotator v1.7.4 (Drummond e Rambaut 2007) em uma única de máxima credibilidade de clados e nós com as medianas das alturas. Caso a análise no Tracer não apontasse a convergência entre as cadeias, novas cadeias foram rodadas para substituir as de menor verossimilhança.

Para o 16S e a matriz concatenada, o desvio padrão da taxa média da distribuição do relógio molecular foi maior do que 1 (1,74 para o 16S e 1,58 para a matriz concatenada). Além disso, as verossimilhanças não apresentaram uma boa estabilização ao longo das gerações e a maioria dos parâmetros teve menos do que 100 amostras independentes (o ideal é acima de 200). Assim, seguindo sugestão dos desenvolvedores do programa, três novas cadeias foram rodadas para cada marcador, mudando a distribuição do relógio molecular para exponencial. Como estas apresentaram uma maior estabilidade, as análises prosseguiram com estes dados da forma descrita anteriormente.

As árvores foram analisadas para verificar a existência de diferentes taxas de ramificação entre os níveis macro e microevolutivos, com base nos comprimentos dos ramos. Esta análise parte da premissa de que, no nível macroevolutivo (entre espécies), estes comprimentos são determinados pelos processos de especiação e extinção, enquanto que, no microevolutivo (dentro de espécies), processos de coalescência respondem pelos comprimentos (Rosenberg e Nordborg 2002, Wakeley 2006). Assim, Pons *et al.* (2006) propuseram um método para detectar mudanças nos comprimentos de ramos que estariam associadas à transição entre os níveis macro e microevolutivo e, conseqüentemente, a limites específicos. Os autores criaram um algoritmo que combina o processo de Yule,

usado para modelar o processo de especiação, com o coalescente, que modela as relações genealógicas intraespecíficas, criando o modelo geral misto Yule-coalescente (*General Mixed Yule-Coalescent* – GMYC). A análise calcula as verossimilhanças de diversos limites temporais para a transição entre o processo de Yule e o coalescente em uma árvore coalescente multiespécie. O ponto na escala temporal com a maior verossimilhança é considerado um estimador da transição entre os processos e, portanto, pode ser usado para inferir limites específicos (Powell 2012). Ramificações mais recentes que o ponto de transição são consideradas como intraespecíficas e as mais antigas, como eventos de especiação. Dessa forma, o método infere o número de espécies que há no conjunto de sequências analisado. Na sua versão original, ele detecta um ponto de transição único para a árvore toda, mas Monaghan *et al.* (2009) propuseram uma alternativa em que esse ponto varia entre as linhagens. Segundo os autores, essa abordagem com limites múltiplos reflete melhor o agrupamento de sequências em espécies. Uma vez determinado o limite (ou os limites, no caso da análise múltipla), é calculada uma razão de verossimilhanças entre o modelo GMYC e um modelo estritamente coalescente, que considera todos os indivíduos como pertencentes a uma única espécie. Se a verossimilhança do GMYC for significativamente maior, pode-se aceitar que a amostra contém o número de espécies determinado pelo modelo e suas delimitações podem ser visualizadas aplicando o(s) limite(s) à árvore de coalescência. Esta análise foi feita com o pacote splits (Ezard *et al.* 2009) para a plataforma R, com o auxílio de um script desenvolvido por Powell (2012), para realizar o teste para limites múltiplos. As árvores para esta análise devem ser ultramétricas e, por isso, os relógios moleculares foram estabelecidos com média fixa em 1:



dessa forma, os comprimentos de ramos obtidos são proporcionais ao tempo (Esselstyn *et al.* 2012).

O'Meara (2010) propôs um método para a delimitação de espécies a partir de um conjunto de árvores de genes. A vantagem desse método é levar em consideração as relações genealógicas de cada marcador individualmente, o que é perdido na concatenação de dados. Outra vantagem, esta compartilhada com o modelo GMYC, está em delimitar espécies sem que haja a necessidade de alguma designação *a priori* de espécies, ainda que putativas. O método, implementado no programa Brownie (O'Meara *et al.* 2006), parte da premissa que há fluxo gênico dentro, mas não entre as espécies (ou, pelo menos, que o fluxo interespecífico é irrelevante). Assim, as árvores de genes diferentes deveriam apresentar congruência nos ramos conectando espécies, mas não nos ramos intraespecíficos. Dentro de uma mesma espécie, processos microevolutivos fazem com que as relações genealógicas entre indivíduos sejam diferentes em árvores construídas com marcadores diferentes. Dessa forma, a incongruência entre árvores seria mais bem explicada pelo fato de os indivíduos pertencerem à mesma espécie (Niemiller *et al.* 2012). Para fazer a análise, é necessário que as árvores tenham as mesmas folhas, isto é, os mesmos indivíduos. Como não foi possível obter sequências completas para todos os indivíduos para os dois marcadores, novas matrizes foram geradas, eliminando-se as sequências presentes em apenas uma delas. Novas árvores foram obtidas, seguindo a metodologia já descrita. Segundo B. O'Meara (University of Tennessee - com. pess.), é necessária apenas uma árvore por marcador, para realizar a análise, embora possam ser utilizadas mais de uma. No entanto, para se utilizar mais de uma árvore por marcador, o método requer que cada uma receba uma ponderação e isto ainda não foi testado

extensivamente. Assim, optou-se por utilizar apenas a árvore de máxima credibilidade de clados de cada marcador. As duas árvores foram combinadas em um único arquivo e o programa utilizado nas suas configurações padrão.

Parâmetros da genética de populações também têm sido usados na identificação de possíveis espécies. Birky *et al.* (2005) propuseram um método que denominaram regra das 4x: grupos de indivíduos separados por uma distância genética maior que quatro vezes sua diversidade nucleotídica podem ser considerados espécies. A base teórica para este teste foi deduzida a partir das expectativas neutras de que indivíduos de uma mesma espécie compartilham um ancestral comum, em média, há  $2N_e$  gerações, onde  $N_e$  é o tamanho populacional efetivo (Birky *et al.* 2010). Assim, embora possa ser observada alguma estruturação dentro de uma espécie, *gaps* entre linhagens populacionais serão transientes e sempre com uma profundidade menor que  $2N_e$ . Porém, se a espécie é dividida em duas populações e estas passam a evoluir separadamente, elas formarão dois clados distintos na árvore genealógica. A distância entre estes clados tende a aumentar, até que se torna maior que  $2N_e$  e o *gap* separando-os, permanente. Esta separação se dará, em 95% dos casos, em  $4N_e$  gerações (Avice 2004), quando a distância média entre os clados será de  $8N_e\mu$ , distância suficiente para inferir monofilia recíproca também com 95% de probabilidade (Rosenberg 2003). Da genética de populações, temos o estimador de diversidade  $\theta = 2N_e\mu$ ; fazendo a substituição, podemos concluir que clados separados por uma distância maior que  $4\theta$  podem ser considerados espécies. Para aplicar este método, as árvores de coalescência foram analisadas e clados com probabilidade posterior (PP) acima de 95% foram considerados como espécies putativas para análise. No caso de clados com alta PP compostos por subclados também com alta PP (por exemplo, Car na árvore para o COI –

Figura 2.2), foi feita uma análise inicial comparando o clado maior com outros clados da árvore. Em seguida, os subclados foram comparados entre si, para verificar se estes poderiam ser considerados espécies distintas. Levou-se em consideração também a delimitação morfológica prévia para esta separação, ou seja, tomaram-se clados com  $PP > 0,95$  e que eram compostos, em sua maioria, por indivíduos de uma única espécie morfológica. Assim, clados como o composto por *C. caribaea*, *C. tryoni* e parte de *C. patagonica* na árvore para o 16S ( $PP = 0,96$  – Figura 2.3) não foram considerados na análise. Em alguns casos, um clado com  $PP < 0,95$  foi utilizado na análise por ser irmão de um clado analisado e/ou por se tratar de um clado com  $PP > 0,95$  em uma das outras árvores (por exemplo, Pat2 na árvore para o 16S).  $\theta$  foi calculado para cada um dos grupos assim separados, com o programa DnaSP 5.10 (Librado e Rozas 2009). A comparação entre dois grupos foi feita utilizando-se o maior  $\theta$  dentre os dois, multiplicado por quatro, e a distância genética entre os grupos, calculada no programa MEGA v.5 (Tamura *et al.* 2011), com os modelos de substituição mais adequados a cada caso e considerando variações nas taxas de mutação tanto entre sítios quanto entre linhagens.

Um método bastante discutido para a identificação e delimitação de espécies é o *DNA barcode*, proposto por Hebert *et al.* (2003), que se baseia em observações de que as distâncias genéticas entre indivíduos de uma mesma espécie são menores que as distâncias entre indivíduos de espécies diferentes. Alguns estudos tentaram estabelecer um valor mínimo de divergência para que se pudesse atribuir dois indivíduos a espécies distintas, mas nenhum valor proposto pôde ser generalizado para todas as formas de vida. Por outro lado, quando as frequências de ocorrências de distâncias par a par de um conjunto de dados são plotadas em um histograma, é possível observar uma descontinuidade na sua

distribuição entre a diversidade intraespecífica e a interespecífica, o chamado *barcode gap* (Meyer e Paulay 2005, Puillandre *et al.* 2012a, Puillandre *et al.* 2012b). Assim, indivíduos cuja distância genética esteja acima desse *gap* podem ser considerados de espécies distintas e aqueles com distâncias menores, como pertencentes à mesma espécie. Essa abordagem é interessante porque permite que se descubra o valor do *gap* para o conjunto de dados em questão, sem que haja a necessidade de definição *a priori* de espécies ou aceitação de premissas sobre o valor do *gap*. Por outro lado, ela pode ser problemática se as distâncias intra- e interespecíficas se sobrepõem e, assim, é difícil definir um limite visualmente (Meier *et al.* 2008). Neste contexto, Puillandre *et al.* (2012a) propuseram um método que detecta automaticamente o *gap*, mesmo quando há esta sobreposição, e separa as sequências em espécies putativas. A partir de possíveis limites de distâncias genéticas para pares da mesma espécie, o algoritmo faz uma partição preliminar das sequências e calcula o limite máximo para as distâncias dentro de cada partição. Considerando este limite como o máximo de variação intraespecífica, o algoritmo, então, identifica o *gap* na distribuição de distâncias par a par que potencialmente corresponderia ao *barcode gap*, ou seja, o primeiro *gap* que ocorre em uma distância maior do que a calculada no passo anterior. Os indivíduos são, então, separados em grupos de possíveis espécies e o método é aplicado novamente dentro de cada grupo até que não seja mais possível particionar um grupo. Para aplicar o método, foi utilizada a versão *online* do programa ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery* - Puillandre *et al.* 2012a) disponível em <http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>. Como *input*, utilizou-se uma matriz de distância par a par calculada com o programa MEGA v.5. Este cálculo foi efetuado com os modelos de substituição mais adequados a cada caso e considerando variações nas taxas de mutação tanto entre sítios quanto entre linhagens. Os

valores de distância intraespecífica *a priori* foram mantidos no padrão do programa (entre 0,001 e 0,1), assim como a largura relativa do *gap* (1,5). Para que fosse possível detectar o valor do *gap* em uma escala mais fina, o número de passos, isto é, quantos valores de distância intraespecífica *a priori* seriam testados, foi aumentado para 30. Também para uma melhor visualização do *gap*, o número de classes do histograma foi aumentado para 50.

### 2.3. Resultados

O alinhamento final do COI (matriz com os fragmentos COIa e COIb) apresentou 424 caracteres e 104 sequências, enquanto o do 16S continha 110 sequências e 466 caracteres. A matriz concatenada foi montada com 104 sequências (mesmos indivíduos da matriz do COI) e continha 890 caracteres. Para as análises que envolveram cálculo de distâncias (ABGD e regra das 4x), verificou-se que a presença de sequências incompletas influenciava no resultado, uma vez que sítios ambíguos ou com dados faltantes eram eliminados do cálculo (por exemplo, para o 16S, dos 466 caracteres, somente 83 eram aproveitados no cálculo). Assim, novas matrizes foram criadas para estas análises, eliminando-se sequências incompletas. Para o COI, esta matriz reduzida continha 99 sequências; para o 16S, 92; e a matriz concatenada, 86. As árvores obtidas com matrizes completas e reduzidas não diferiram entre si e, portanto, mantiveram-se os conjuntos completos de dados nessas análises. Para o COI e a matriz concatenada, o modelo evolutivo selecionado foi o HKY (Hasegawa *et al.* 1985) com variação da taxa entre sítios; para o 16S, foi selecionado o modelo TrN (Tamura e Nei 1993) também com variação entre sítios.

As árvores de coalescência mostraram que, de forma geral, os clados formados por indivíduos da mesma espécie possuem alta probabilidade posterior ( $PP > 0,95$  – Figuras 2.2, 2.3 e 2.4). Dentro destes clados, os ramos apresentaram probabilidade menor, geralmente  $PP < 0,75$ , com algumas exceções (por exemplo, clado Try1 para o 16S – Figura 2.3). As relações entre as espécies apresentaram probabilidades posteriores intermediárias. Os clados formados por *C. caribaea* e *C. lyoni* apresentaram  $PP > 0,95$  para os três conjuntos de dados. Para o COI e a matriz concatenada, houve, ainda, a formação de dois subclados (Car1 e Car2) com  $PP > 0,95$  dentro de *C. caribaea* (Figuras 2.2 e 2.4). *Corbula tryoni*, por outro lado, formou um único clado ( $PP = 1$ ) apenas para o COI (clado Try - Figura 2.2). Para os outros dois conjuntos de dados, dois clados (TryA e Try3) foram formados para esta espécie com  $PP > 0,90$ , mas a relação entre eles tem  $PP < 0,75$ . Além disso, dentro de TryA, formou-se outro clado (Try1) com  $PP > 0,95$  para ambos os conjuntos de dados, enquanto os outros indivíduos formaram um clado (Try2) com  $PP > 0,90$  apenas para a matriz concatenada (Figura 2.4). Apesar de, para o 16S, Try2 não existir com alta probabilidade posterior, os indivíduos pertencentes a ele foram considerados como um grupo para análises subsequentes. *Corbula patagonica* apresentou-se dividida em três clados na árvore do COI (PatA, Pat3, Pat4), sendo que PatA apresentou-se subdividido em dois clados com  $PP > 0,95$  (Pat1 e Pat2 – Figura 2.2). Os clados se repetem para a matriz concatenada, embora Pat3 tenha  $PP = 0,74$ . Para o 16S, *C. patagonica* também aparece dividida em quatro clados. No entanto, apenas dois deles, Pat1 e Pat2, correspondem a clados das outras árvores, embora Pat1 apenas parcialmente e Pat2 com  $PP = 0,80$ . Estes dois clados apareceram como irmãos, mas com  $PP < 0,75$ . Os outros dois clados de *C. patagonica*, Pat5 e Pat6, cada um com  $PP = 1$ , também são irmãos com  $PP < 0,75$ . São formados pelos mesmos

indivíduos de Pat3 e Pat4 das árvores para o COI e para a matriz concatenada, mais alguns indivíduos para os quais não foi possível obter sequências do COI. Porém, a composição dos clados difere entre os marcadores. O indivíduo identificado como *Corbula* sp1 foi inserido no clado de *C. caribaea* nas três árvores e a única sequência de *C. aequivalvis* (16S), no clado de *C. tryoni* (Figura 2.3).

As análises sob o modelo GMYC não foram significativas em nenhum caso, isto é, de acordo com este teste, os indivíduos analisados podem ser considerados como pertencentes a uma única população ou espécie (modelo nulo). A análise multilocos, com o programa Brownie, detectou oito clados que poderiam ser considerados espécies. Quinze árvores foram geradas, com pequenas variações na composição de cada clado, e a Figura 2.5 apresenta uma dessas árvores. A principal diferença entre as árvores está na posição de alguns indivíduos de *C. tryoni* (TBe98\_193 e Tjr00\_358) e de *C. lyoni* (LBA97\_513, LBA97\_520, LBA97\_521 e LBA97\_523) que apareceram em diferentes clados conforme a árvore. Um dos clados corresponde a *C. caribaea*, juntamente com o indivíduo de *Corbula* sp1. *Corbula patagonica* foi dividida em três clados, sendo dois equivalentes a Pat1 e Pat2 das árvores de coalescência e o terceiro, a Pat3 e Pat4 do COI (ou Pat5 e Pat6 do 16S). Os indivíduos de *C. tryoni* formaram, em sua maioria, um único clado, com exceção de quatro deles. Estes constituem um clado à parte que corresponde, parcialmente, a Try1 das árvores para o 16S e para a matriz concatenada. *Corbula lyoni* foi separada em dois clados, mas um destes apresentou sua composição bastante variável entre as diferentes árvores, podendo seus componentes, com exceção de um, ser encontrados em outros clados.

Para a análise da regra das 4x, os indivíduos foram separados em grupos de acordo com os resultados das análises de coalescência (Figuras 2.2, 2.3 e 2.4). Houve diferença no

número de espécies delimitado por cada marcador. Para a matriz do COI, foram comparados seis clados (Car, Try, PatA, Pat3, Pat4 e Lyo – Figura 2.2), mais quatro subclados (Car1 e Car2 de Car, e Pat1 e Pat2 de PatA), totalizando oito possíveis espécies. Esta análise confirmou a maior parte das espécies morfológicas e os clados de *C. patagonica* como espécies (Tabela 2.3). A exceção foi o clado de *C. lyoni*, que apresentou uma alta variabilidade dentro do grupo e não pôde ser diferenciado de nenhum outro. Os dois subclados de *C. caribaea* (Car1 e Car2), assim como os dois de PatA (Pat1 e Pat2), também podem ser considerados como espécies distintas. Dessa forma, de acordo com a regra das 4x aplicada à matriz do COI, existem oito espécies neste conjunto de dados, se considerarmos *C. lyoni* como uma espécie com alta variabilidade.

Para o 16S, nove clados foram analisados pela regras das 4x (Car, TryA, Try3, Aeq, Pat1, Pat2, Pat5, Pat6, Lyo – Figura 2.3), mais dois subclados de TryA (Try1 e Try2), totalizando dez possíveis espécies. Novamente, a alta variabilidade de *C. lyoni* não permitiu que este clado fosse diferenciado dos outros (Tabela 2.4). Para algumas outras comparações entre espécies morfológicamente distintas, notavelmente as envolvendo o clado TryA, não foi possível delimitá-las, isto é, segundo a análise deveriam ser consideradas como a mesma espécie. No entanto, nestes casos a diferença entre o  $4x\theta_{\max}$  e a distância (d) foi muito pequena (por exemplo,  $4x\theta_{\max}=0,29$  e  $d=0,28$  entre Try3 e Pat1). Os clados TryA e Try3 foram considerados como uma única espécie. A análise dos subclados Try1 e Try2 revelou que estes não podem ser considerados espécies distintas e, também, não podem ser diferenciados de Try3. Assim, podemos concluir que todos os indivíduos de *C. tryoni* constituem um único grupo, distinto dos outros aqui analisados. Os clados Pat1 e Pat2 não puderam ser reconhecidos como espécies distintas, assim como Pat5 e Pat6, embora estes



apenas marginalmente ( $4x\theta_{\max} = 0,18$  e  $d=0,17$ ). A sequência de *C. aequivalvis*, apesar de estar inserida no clado TryA (Figura 2.3), foi analisada separadamente, pois sua inclusão no grupo aumentou consideravelmente a variabilidade deste. *Corbula aequivalvis* pôde ser reconhecida como uma espécie distinta de todas outras, com exceção de *C. lyoni*. Dessa forma, podemos considerar que a regra das 4x aplicada ao conjunto de dados do 16S permite delimitar seis espécies, se, da mesma forma que para o COI, considerarmos *C. lyoni* como uma espécie com alta variabilidade. Tendo em mente que *C. aequivalvis* não está presente na matriz do COI, o marcador 16S delimita, portanto, três espécies a menos que o COI.

Para a matriz concatenada, sete clados foram inicialmente analisados por meio da regra das 4x (Car, TryA, Try3, PatA, Pat3, Pat4, Lyo – Figura 2.4), mais dois subclados de Car (Car1 e Car2), dois de PatA (Pat1 e Pat2) e dois de TryA (Try1 e Try2), totalizando dez possíveis espécies. Também para a matriz concatenada, *C. lyoni* não pôde ser diferenciada dos outros clados (Tabela 2.5). Uma vez que a análise multilocos com o programa Brownie separou esta espécie em dois clados distintos, o clado mais estável (Lyo1) foi utilizado para uma nova análise. Com este conjunto reduzido de indivíduos, é possível diferenciar *C. lyoni* de todos os outros clados, com exceção de Pat3 e Pat4, para os quais  $d$  (0,39 e 0,40) é apenas um pouco menor que  $4x\theta_{\max}$  (0,42). Todos os clados estabelecidos puderam ser delimitados como espécies, com exceção de TryA e Try3, e Pat3 e Pat4. Os subclados de Car não foram considerados como espécies distintas, assim como os de PatA e TryA. Dessa forma, a regra das 4x aplicada à matriz concatenada de dados permite delimitar cinco espécies, novamente considerando *C. lyoni* como uma espécie com alta variabilidade.

A análise utilizando o ABGD produziu uma delimitação semelhante aos clados obtidos nas árvores de coalescência. Nenhum dos três histogramas permite verificar com certeza a presença do *barcode gap* (Figura 2.6), indicando uma ampla sobreposição entre as distâncias intra e interespecíficas. Mas os gráficos de números de grupos por distância intraespecífica *a priori* fornecem bons indícios (Figura 2.7). Para o COI, o *gap* pode ser identificado entre, aproximadamente, 2,8% e 7,3% de divergência (Figura 2.7, A). Considerando essas distâncias, as sequências podem ser particionadas em oito ou seis grupos. No entanto, um dos grupos da partição em oito é formado por apenas um indivíduo (LBA97\_520), que apareceu inserido em um clado na árvore gerada pelo programa. Optou-se, então, por considerar a separação desse indivíduo como um artefato do método, que leva em conta apenas distâncias e não as relações genealógicas. Dessa forma, temos duas partições para os dados, uma em sete grupos e outra em seis (Figura 2.8). Em ambas, *C. lyoni* e *C. tryoni* foram consideradas como espécies, e os indivíduos de *C. patagonica* foram separados em três grupos, ou seja, três espécies distintas, uma equivalente ao clado PatA, outra a Pat3 e a terceira, a Pat4. A diferença entre as duas partições está em como *C. caribaea* é tratada: na partição em sete grupos, a espécie foi dividida em dois, ao passo que na partição em seis, aparece como um único grupo.

Para o 16S, o *barcode gap* pôde ser verificado entre aproximadamente 2,5% e 6,2% de divergência (Figura 2.7, B). As sequências foram particionadas em nove e oito grupos (Figura 2.9). Três grupos foram formados por apenas um indivíduo cada, dentre eles a única sequência de *C. aequivalvis*. *Corbula caribaea* foi delimitada como uma única espécie, assim como a maior parte de *C. tryoni* e de *C. lyoni*. A diferença entre as duas partições está em *C. patagonica*. Na partição em nove grupos, a espécie foi dividida em

três: um equivalente a PatA, um a Pat5 e o terceiro a Pat6. Na partição em oito grupos, Pat5 e Pat6 são agrupados, formando o equivalente a PatB da análise multilocos, embora não constituam um clado monofilético na árvore gerada pelo programa.

Para a matriz concatenada, o *barcode gap* foi encontrado entre aproximadamente 2% e 3,5% (Figura 2.7, C), o que gerou uma partição em seis grupos (Figura 2.10). Estes grupos correspondem às espécies delimitadas morfológicamente, com exceção de *C. patagonica*, que foi dividida em dois grupos distintos, um equivalente a PatA e outro a PatB. Um indivíduo de *C. patagonica* (PSS03\_440) constitui o sexto grupo. A partição considerando-se uma distância *a priori* maior (por exemplo, 0,06) gerou um grupo formado por *C. tryoni* e o grupo PatB. Uma vez que estas espécies são morfológicamente distintas e em nenhuma outra análise os dois grupos apareceram como um clado monofilético, optou-se por considerar essa partição como acima do *barcode gap*.

A tabela 2.6 apresenta um resumo das delimitações obtidas pelos diferentes métodos.

## 2.4. Discussão

Os resultados obtidos pelos diferentes métodos de delimitação de espécies demonstram que a utilização de marcadores moleculares para tal fim precisa, assim como para caracteres de outras fontes, ser cautelosa. O número de espécies reconhecidas dentro da amostra estudada variou de um (GMYC para os três conjuntos de dados) a nove (ABGD, com uma distância *a priori* entre, aproximadamente, 2% e 4% para o 16S) e nenhum dos

métodos delimitou as mesmas espécies que a morfologia. Na discussão que se segue, é importante ter em mente que as conclusões apresentadas se referem ao material estudado, e a extrapolação para as espécies como um todo deve ser cuidadosa.

A maior diferença entre as análises moleculares e a morfológica está na separação dos indivíduos de *C. patagonica* em pelo menos duas espécies pelos métodos moleculares (com exceção do GMYC). Embora métodos e marcadores difiram em relação à subdivisão dos grupos ou não, podemos afirmar que PatA e PatB constituem linhagens geneticamente distintas apesar de morfológicamente semelhantes, o que permitiria classificá-las como espécies crípticas. A descoberta de espécies crípticas em análises moleculares geralmente revela a importância de variações morfológicas antes consideradas como plasticidade fenotípica. Em moluscos especificamente, muitas vezes descobre-se que pequenas diferenças na morfologia da concha são relevantes para a delimitação de espécies (Knowlton 2000, Guarniero *et al.* 2010, Kong *et al.* 2012).

Uma nova análise dos indivíduos classificados como *C. patagonica*, revelou que, os que foram incluídos em PatB, eram maiores e apresentavam concha nepiônica, enquanto as conchas dos incluídos em PatA eram pequenas, semelhantes às nepiônicas dos indivíduos de PatB (E. P. Arruda - com. pess.). *Corbula patagonica* é uma espécie que se encaixa no tipo de crescimento GF3 de Goodwin *et al.* (2008). Nas espécies com este padrão de crescimento, as conchas dos indivíduos menores são bem diferentes das dos maiores, devido a uma mudança no padrão de crescimento, e indivíduos maiores apresentam claramente uma concha nepiônica. Assim, muito provavelmente, o grupo PatB representa a espécie *C. patagonica*. Por outro lado, a semelhança entre as conchas dos espécimes de PatA e as conchas nepiônicas de PatB gerou a confusão na identificação, uma vez que se

acreditou que PatA correspondesse a indivíduos mais jovens. A análise mais detalha de suas conchas revelou que estas apresentam pústulas dispostas radialmente, o que as difere das conchas nepiônicas de *C. patagonica*, e as tornam mais semelhantes às de *C. chittyana* (E. P. Arruda – com. pess.).

Também é possível que não existam variações morfológicas compatíveis com as moleculares, situação bastante comum no ambiente marinho (Knowlton 1993). Nestes casos, é comum observar uma separação geográfica das linhagens, que pode levar à distinção genética, embora outras propriedades, incluindo caracteres morfológicos, não permitam, ainda, a delimitação das espécies (Palumbi 1994, Queiroz 2007, Kong e Li 2009). Por outro lado, não somente caracteres morfológicos podem distinguir duas espécies, e isso é especialmente válido no ambiente marinho, onde predominam sistemas de reconhecimento químicos (Knowlton 1993, Palumbi 1994). Assim, diversas outras fontes de informação, juntamente com análises moleculares, podem contribuir para a distinção de espécies crípticas, como caracteres anatômicos (Baker *et al.* 2004), história de vida (Boissin *et al.* 2008) e caracteres reprodutivos, como sincronização da eliminação de gametas (Knowlton 1993, Palumbi 1994). Para bivalves especificamente, já foi demonstrado que a especiação é fortemente influenciada por fatores ecológicos e fisiológicos (Mikkelsen 2011), o que indica que são estes caracteres que possivelmente vão diferenciar muitas espécies crípticas.

O clado PatA aparece dividido em dois subclados nas árvores de coalescência e algumas análises reconheceram estes como espécies distintas. Se realmente se trata de duas espécies ou de apenas uma, é merecedor de uma análise mais detalhada, utilizando-se mais marcadores. Os outros indivíduos de *C. patagonica*, agrupados em PatB, constituem uma

situação mais complexa. Eles não formam um clado monofilético em nenhuma das árvores de coalescência, mas, sim, dois clados cuja relação não é clara e que não são equivalentes entre COI e 16S. Situação semelhante pode ser observada para *C. tryoni*: apesar de formar um único clado com alta probabilidade posterior para o COI, nas árvores para o 16S e os dados concatenados, os indivíduos dessa espécie constituem dois ou três clados com alta probabilidade, mas a relação entre eles não é clara, podendo ser ou não parafiléticos. Nestes dois casos, portanto, não observamos um dos critérios operacionais para delimitação de espécies, a monofilia recíproca, isto é, não há congruência entre os diferentes marcadores com relação às ramificações que dão origem aos clados (Yang e Rannala 2010). Previsões da genética de populações indicam que é necessário um certo tempo para que a monofilia recíproca seja atingida em diversos locos (Rosenberg e Nordborg 2002, Wakeley 2006, Knowles e Carstens 2007). Assim, este pode ser um critério adotado para delimitar espécies, mas não é essencial para tanto (Rosenberg 2003, Queiroz 2007, Rosenberg 2007). Principalmente em espécies que divergiram há pouco tempo, espera-se que haja uma discordância entre as árvores gênicas (Knowles e Carstens 2007). Assim, apesar de não aparecerem como grupos monofiléticos nas árvores de coalescência, PatB e *C. tryoni* podem ser consideradas como duas espécies, já que outras evidências corroboram a hipótese.

*Corbula caribaea* é, sem dúvida, a espécie que causa maiores confusões taxonômicas e dificuldades na identificação. A delimitação molecular confirma que os indivíduos analisados pertencem a apenas uma espécie e, provavelmente, a variação morfológica observada é devida à plasticidade fenotípica da espécie. Interessantemente, o indivíduo identificado como *Corbula* sp1, considerado como uma possível espécie nova,

foi incluído dentro de *C. caribaea*, o que reforça a questão da dificuldade em se identificar a espécie. Apesar de a descoberta de espécies crípticas ser costumeiramente mais alardeada, especialmente quando se trata de enumerar as vantagens de métodos moleculares para estudos de biodiversidade (Stoeckle 2003, Janzen 2004), a falta de variabilidade genética subjacente à morfológica não é surpreendente, principalmente em moluscos, cuja morfologia da concha está sujeita às variações ambientais (Adamkewicz e Harasewych 1996, Peek *et al.* 1997, Claxton *et al.* 1998, Bichain *et al.* 2007, Funk e Reckendorfer 2008, Wilk e Bieler 2009, Mutanen *et al.* 2012). No caso de *C. caribaea*, a variação morfológica pode estar associada ao seu tipo de crescimento, classificado como GF2 (Goodwin *et al.* 2008). As conchas de espécies com este padrão crescem até um determinado tamanho, a partir do qual passam a apenas espessar, pelo depósito de material na face interna das valvas. A principal diferença entre as conchas de *Corbula* sp1 e *C. caribaea* está justamente na espessura das valvas (maior em *Corbula* sp1) e no condróforo, sendo que as diferenças observadas nesta estrutura podem ser devidas ao depósito de carbonato de cálcio sobre ela em *Corbula* sp1 (E. P. Arruda – com. pess.). Dessa forma, podemos concluir que os indivíduos identificados como *Corbula* sp1 são indivíduos mais velhos de *C. caribaea*.

No presente estudo, as análises utilizando apenas a COI separaram *C. caribaea* em duas. Na análise com o ABGD, essa separação foi observada apenas quando uma distância *a priori* menor foi considerada. Os indivíduos de uma dessas espécies delimitadas pela COI (Car2) foram todos coletados recentemente na Baía do Araçá, como parte do material utilizado para o desenvolvimento de *primers* específicos neste estudo. É possível que essa aparente divisão em duas espécies seja apenas uma forte estruturação populacional. Por outro lado, também é possível que tenha havido um evento de especiação há pouco tempo,

mas, dentre os marcadores analisados, apenas a COI já apresenta diferenciação suficiente para ser percebida (Queiroz 2007, Puillandre *et al.* 2009).

As análises de *C. lyoni* revelam que esta é uma espécie bastante variável, tanto que, pela regra das 4x, praticamente não foi possível distingui-la das outras espécies devido ao seu alto valor de  $\theta$ . Essa alta variabilidade pode ser notada nas árvores de coalescência. Os ramos dos clados formados por esta espécie são mais longos do que os das outras espécies, o que indica que a taxa de mutação por sítio em *C. lyoni* realmente é maior. Apesar disso, o ABGD delimitou *C. lyoni* como uma única espécie, provavelmente pelo algoritmo acomodar diferentes níveis de variação nas partições recursivas. Assim, preferiu-se considerar *C. lyoni* como uma única espécie.

Fica claro pelos resultados obtidos a importância de se utilizar diferentes critérios operacionais bem como marcadores na delimitação molecular de espécies. Quando propôs seu conceito geral de espécie, Queiroz (2007) apresentou como uma de suas vantagens a separação mais efetiva entre o problema do conceito de espécie e critérios operacionais para sua delimitação. Neste contexto, a delimitação de uma espécie deixa de ser função de uma única propriedade e passa ser uma hipótese corroborada (ou não) por diferentes evidências. Assim, por exemplo, apesar de a análise com o programa Brownie separar o clado PatA em duas espécies, outras linhas de evidência corroboram a hipótese de que PatA é uma única espécie. Também podemos concluir que *C. lyoni* é uma única espécie apesar de a regra das 4x não a distinguir das outras. Tal abordagem tem sido comum em trabalhos recentes de delimitação de espécies (Leliaert *et al.* 2009, Bode *et al.* 2010, Hamilton *et al.* 2011, Bacon *et al.* 2012, Boykin *et al.* 2012, Fernandez *et al.* 2012, Paz e Crawford 2012) e



nada mais é do que a abordagem tradicional de apoiar a taxonomia em diferentes fontes de informação.

Também é possível observar diferentes delimitações quando comparamos os dois marcadores utilizados. A utilização de apenas um marcador tem sido criticada por diversos autores (Carstens e Dewey 2010). Em especial, a iniciativa *DNA Barcoding* é alvo dessas críticas, por propor que se utilize apenas a COI para a identificação molecular de espécies (Knowles e Carstens 2007, Jinbo *et al.* 2011, Sauer e Hausdorf 2012). A utilização de apenas este marcador para as espécies de *Corbula* geraria um número maior de espécies do que a utilização do 16S ou que a combinação dos dois marcadores. Tang *et al.* (2012) também encontraram um maior número de espécies com a COI em relação ao 18S, em um estudo sobre diversidade da meiofauna. Fernandez *et al.* (2012) também observaram diferentes números de espécies delimitados em um grupo de minhocas com diferentes marcadores (COI e COII). Alguns autores (por exemplo, Pons *et al.* 2006, Puillandre *et al.* 2012a) sugerem que a análise molecular com apenas um marcador seja utilizada apenas como um primeiro passo na delimitação de espécies, gerando hipóteses a serem testadas com outras evidências. Assim, resultados obtidos com apenas um marcador devem ser analisados com cuidado e, preferencialmente, complementados com outras fontes de informação.

A utilização de diversos métodos de delimitação, além de prover diferentes linhas de evidência para a delimitação de espécies, também se faz necessária considerando que falta uma revisão ampla comparando os diferentes métodos e suas vantagens e desvantagens. O GMYC tem sido bastante utilizado recentemente (Monaghan *et al.* 2009, Powell *et al.* 2011, Esselstyn *et al.* 2012, Powell 2012), com bons resultados na maioria dos

estudos. No entanto, o método aparentemente sofre restrições em relação à amostragem, que ainda não foram bem compreendidas. Parece bem estabelecido que é necessário haver pelo menos de sete a dez indivíduos de cada espécie na amostra (Monaghan *et al.* 2009), embora estudos com números menores tenham obtido bons resultados (Leliaert *et al.* 2009, Bode *et al.* 2010). Além disso, as análises feitas por Powell *et al.* (2011) sugerem que um número mínimo de grupos coalescentes (espécies) deve estar presente na amostra para que o método consiga capturar a mudança entre o processo de especiação e o de coalescência. Ao fazer a análise com todas as amostras, estes autores encontraram, para um determinado subconjunto de seus dados, quatro espécies. Ao repetir a análise somente com este subconjunto, as mesmas quatro espécies foram encontradas, porém o modelo GMYC não apresentou um ajuste aos dados significativamente melhor que o modelo nulo, e os indivíduos foram considerados como pertencentes a uma única população. Estes resultados indicam que, aparentemente, cinco ou seis espécies, como no caso do presente estudo, não são suficientes para que o método consiga suporte estatístico para corroborar o modelo GMYC, mesmo que ele seja o verdadeiro. Assim, o método, embora bastante interessante, torna-se restrito em sua aplicação, uma vez que se faz necessária pelo menos uma estimativa *a priori* de números de espécies e de indivíduos por espécie na amostra. Além disso, o método utilizado para a reconstrução da árvore genealógica parece influenciar o resultado da análise. Sauer e Hausdorf (2012) obtiveram resultados diferentes na delimitação ao utilizar uma árvore coalescente, produzida por inferência bayesiana, e uma árvore de verossimilhança máxima, tornada ultramétrica posteriormente. Esse resultado indica que o método de reconstrução da árvore influencia na delimitação pelo GMYC, mas a extensão dessa influencia não é bem conhecida.

A análise proposta por O'Meara (2010) tem a vantagem de combinar a informação de diferentes árvores gênicas. Assim, mesmo que não haja monofilia recíproca em todos locos, são detectadas características topológicas que permitem inferir a existência de linhagens independentes (Knowles e Carstens 2007). É uma abordagem mais interessante que simplesmente concatenar dados, pois, neste caso, os marcadores passam a ser tratados como um único loco e perdem-se informações (Knowles e Carstens 2007, Niemiller *et al.* 2012). Sua grande vantagem é não necessitar de nenhuma alocação *a priori* dos indivíduos a espécies ou populações. Por outro lado, a influência do número de indivíduos e de locos analisados ainda não é bem compreendida (Niemiller *et al.* 2012), embora haja a indicação de pelo menos três locos, mas, idealmente, dez (Knowles e Carstens 2007). A utilização de um número menor de locos, como no presente estudo, leva ao aumento de falsos negativos, isto é, o método não consegue separar espécies distintas. O grande número de locos necessários pode ser a razão para esta análise ser pouco utilizada (Fujita *et al.* 2012). Outra crítica é o fato de espécies com forte estruturação populacional poderem ser divididas em duas ou mais espécies, uma vez que, nestas situações, as árvores gênicas tendem a ser mais semelhantes do que o esperado (O'Meara 2010, Niemiller *et al.* 2012). É possível que este tenha sido o caso de *C. lyoni* e *C. tryoni* no presente estudo.

A regra das 4x é um método bastante interessante por utilizar conceitos de genética de populações na delimitação de espécies e não ter limitações com relação ao número de indivíduos e espécies presentes na amostra (Birky *et al.* 2005, Birky *et al.* 2010). Por outro lado, tem a desvantagem de exigir a definição *a priori* de grupos a serem testados, o que pode não ser uma tarefa simples. No presente estudo, por exemplo, alguns clados com baixa probabilidade posterior tiveram que ser considerados na análise por serem irmão de

clados com alta probabilidade posterior. *Corbula lyoni* apresentou-se como um grande desafio para este método, já que somente considerando um subgrupo da espécie (Lyo1, detectado previamente pela análise Brownie) foi possível considerá-la como uma espécie distinta das outras. Fernandez *et al.* (2012) encontraram situação semelhante para minhocas, nas quais uma espécie com alta variabilidade não foi corretamente delimitada. Da mesma forma, se duas espécies divergiram recentemente ou retêm polimorfismos ancestrais, podem não ser detectadas pelo método (Druzhinina *et al.* 2012), como pode ser o caso dos subclados de PatA e PatB.

A aplicação *online* ABGD é um método recentemente disponibilizado para a delimitação de espécies (Puillandre *et al.* 2012a). Além de não exigir a definição *a priori* de grupos a serem testados, o método lida com uma das críticas feitas ao *DNA barcode*, que é o estabelecimento de limites fixos de variação para se delimitar as espécies (Papadopoulou *et al.* 2008, Koehler e Johnson 2012). A existência de um *gap* entre as distâncias intra e interespecífica já foi demonstrada em diversos estudos, inclusive para bivalves (Mikkelsen *et al.* 2007, Guarniero *et al.* 2010, Chen *et al.* 2011). Nestes trabalhos, não foi observada sobreposição entre as duas distribuições e a utilização do *barcode* para identificar ou delimitar espécies não é problemática. Porém, quando essa sobreposição ocorre, como no presente estudo, a utilização do *gap* para delimitar espécies não é tão simples (Meyer e Paulay 2005). O algoritmo implementado no ABGD lida bem com essa situação e conseguiu delimitar espécies, em grande parte concordantes com a morfologia, mesmo não sendo possível detectar visualmente um *gap* nas distribuições das distâncias. Inclusive, como já citado, foi o método que melhor lidou com a alta variabilidade intraespecífica de *C. lyoni*. Uma desvantagem do ABGD é a utilização de apenas um loco. A abordagem

multilocos é mais interessante, especialmente em casos de espécies que divergiram há pouco tempo. O método é bastante recente, mas os trabalhos que o utilizaram obtiveram bons resultados (Castelin *et al.* 2012, Paz e Crawford 2012, Puillandre *et al.* 2012b); apenas Tang *et al.* (2012) consideram que outros métodos utilizados, entre eles o GMYC, tiveram uma performance melhor. Mais estudos comparativos são necessários para se entender melhor suas limitações.

A abordagem molecular para delimitação das espécies de *Corbula* aqui analisadas permite corroborar a identificação morfológica para *C. caribaea*, *C. tryoni* e *C. lyoni*. As análises indicam que *C. patagonica* é, na verdade, um complexo com pelo menos duas espécies crípticas. O representante da suposta espécie nova, *Corbula* sp1, não pôde ser distinguido de *C. caribaea*, enquanto o único indivíduo de *C. aequivalvis* pôde ser diferenciado das outras espécies. A incongruência nas delimitações obtidas com diferentes marcadores e métodos reforçam que a taxonomia molecular, assim como a tradicional, deve se valer de diferentes linhas de evidência.

## 2.5. Referências bibliográficas

Abbott, R. T. 1974. *American Seashells*. 2a. edição. van Nostrand Reinhold Company, New York.

Adamkewicz, S. L. e M. G. Harasewych. 1996. Systematics and biogeography of the genus *Donax* (Bivalvia: Donacidae) in eastern North America. *American Malacological Bulletin* **13**: 97-103.

- Altena, C. O. 1971. The marine Mollusca of Suriname (Dutch Guiana) Holocene and recent. Part II: Bivalvia and Scaphopoda. *Zoologische Verhandliger* **119**: 1-100.
- Arruda, E. P., O. Domaneschi, J. D. A. Francisco, e J. C. N. de Barros. 2007. *Corbula tarasconii*, a new species of Corbulidae (Bivalvia) from offshore Brazil. *Nautilus* **121**: 201-209.
- Avise, J. C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2a. edição. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland.
- Bacon, C. D., M. J. McKenna, M. P. Simmons, e W. L. Wagner. 2012. Evaluating multiple criteria for species delimitation: an empirical example using Hawaiian palms (Arecaceae: Pritchardia). *Bmc Evolutionary Biology* **12**: 23.
- Baker, A. M., F. Sheldon, J. Somerville, K. F. Walker, e J. M. Hughes. 2004. Mitochondrial DNA phylogenetic structuring suggests similarity between two morphologically plastic genera of Australian freshwater mussels (Unionoida : Hyriidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 902-912.
- Bichain, J.-M., M.-C. Boisselier-Dubayle, P. Bouchet, e S. Samadi. 2007. Species delimitation in the genus *Bythinella* (Mollusca: Caenogastropoda: Rissoidae): A first attempt combining molecular and morphometrical data. *Malacologia* **49**: 293-311.
- Birky, C. W., C. Wolf, H. Maughan, L. Herbertson, e E. Henry. 2005. Speciation and selection without sex. *Hydrobiologia* **546**: 29-45.
- Birky, C. W., Jr., J. Adams, M. Gemmel, e J. Perry. 2010. Using population genetic theory and DNA Sequences for species detection and identification in asexual organisms. *Plos One* **5**: e10609.
- Bode, S. N. S., S. Adolfsson, D. K. Lamatsch, M. J. F. Martins, O. Schmit, J. Vandekerkhove, F. Mezquita, T. Namiotko, G. Rossetti, I. Schoen, R. K. Butlin, e K. Martens. 2010. Exceptional cryptic diversity and multiple origins of

- parthenogenesis in a freshwater ostracod. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 542-552.
- Boissin, E., J. P. Feral, e A. Chenuil. 2008. Defining reproductively isolated units in a cryptic and syntopic species complex using mitochondrial and nuclear markers: the brooding brittle star, *Amphipholis squamata* (Ophiuroidea). *Molecular Ecology* **17**: 1732-1744.
- Bouchet, P., P. Lozouet, P. Maestrati, e V. Heros. 2002. Assessing the magnitude of species richness in tropical marine environments: exceptionally high numbers of molluscs at a New Caledonia site. *Biological Journal of the Linnean Society* **75**: 421-436.
- Boykin, L. M., K. F. Armstrong, L. Kubatko, e P. D. Barro. 2012. Species delimitation and global biosecurity. *Evolutionary Bioinformatics* **8**: 1-37.
- Boyle, E. E., J. D. Zardus, M. R. Chase, R. J. Etter, e M. A. Rex. 2004. Strategies for molecular genetic studies of preserved deep-sea macrofauna. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **51**: 1319-1336.
- Carstens, B. C. e T. A. Dewey. 2010. Species delimitation using a combined coalescent and information-theoretic approach: An example from North American *Myotis* bats. *Systematic Biology* **59**: 400-414.
- Castelin, M., J. Lorion, J. Brisset, C. Cruaud, P. Maestrati, J. Utge, e S. Samadi. 2012. Speciation patterns in gastropods with long-lived larvae from deep-sea seamounts. *Molecular Ecology* **21**: 4828-4853.
- Chen, J., Q. Li, L. Kong, e H. Yu. 2011. How DNA barcodes complement taxonomy and explore species diversity: The case study of a poorly understood marine fauna. *Plos One* **6**: e21326.
- Claremont, M., S. T. Williams, T. G. Barraclough, e D. G. Reid. 2011. The geographic scale of speciation in a marine snail with high dispersal potential. *Journal of Biogeography* **38**: 1016-1032.

- Claxton, W. T., A. B. Wilson, G. L. Mackie, e E. G. Boulding. 1998. A genetic and morphological comparison of shallow- and deep-water populations of the introduced dreissenid bivalve *Dreissena bugensis*. *Canadian Journal of Zoology- Revue Canadienne De Zoologie* **76**: 1269-1276.
- Coan, E. V. 2002. The eastern Pacific recent species of the Corbulidae (Bivalvia). *Malacologia* **44**: 47-105.
- Drummond, A. J. e A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *Bmc Evolutionary Biology* **7**: 214.
- Druzhinina, I. S., M. Komon-Zelazowska, A. Ismaiel, W. Jaklitsch, T. Mullaw, G. J. Samuels, e C. P. Kubicek. 2012. Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology* **49**: 358-368.
- Esselstyn, J. A., B. J. Evans, J. L. Sedlock, F. A. A. Khan, e L. R. Heaney. 2012. Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule-coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. *Proceedings of the Royal Society, Series B* **279**: 3678-3686.
- Ezard, T., T. Fujisawa, e T. Barraclough. 2009. splits: SPecies' Limits by Threshold Statistics. [r-forge.r-project.org/project/splits](http://r-forge.r-project.org/project/splits)
- Feral, J. P. 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **268**: 121-145.
- Fernandez, R., A. Almodovar, M. Novo, B. Simancas, e D. J. Diaz Cosin. 2012. Adding complexity to the complex: New insights into the phylogeny, diversification and origin of parthenogenesis in the *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta, Lumbricidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **64**: 368-379.
- Ferri, E., M. Barbuto, O. Bain, A. Galimberti, S. Uni, R. Guerrero, H. Ferte, C. Bandi, C. Martin, e M. Casiraghi. 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA



- barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology* **6**: 1.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, e R. Vrijenhoek. 1994. DNA *primers* for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**: 294-299.
- Fujita, M. K., A. D. Leache, F. T. Burbrink, J. A. McGuire, e C. Moritz. 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* **27**: 480-488.
- Funk, A. e W. Reckendorfer. 2008. Environmental heterogeneity and morphological variability in *Pisidium subtruncatum* (Sphaeriidae, Bivalvia). *International Review of Hydrobiology* **93**: 188-199.
- Giribet, G. e W. Wheeler. 2002. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology* **121**: 271-324.
- Goodwin, D. H., L. C. Anderson e P. D. Roopnarine. 2008. Evolutionary origins of novel conchologic growth patterns in tropical American corbulid bivalves. *Evolution & Development* **10**: 642-656.
- Guarniero, I., F. Plazzi, A. Bonfitto, A. Rinaldi, M. Trentini, e M. Passamonti. 2010. The bivalve mollusc *Maetra corallina*: genetic evidence of existing sibling species. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **90**: 633-644.
- Hamilton, C. A., D. R. Formanowicz, e J. E. Bond. 2011. Species delimitation and phylogeography of *Aphonopelma hentzi* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae): Cryptic diversity in North American tarantulas. *Plos One* **6**: e26207.
- Hasegawa, M., H. Kishino, e T. A. Yano. 1985. Dating of the human ape splitting by a molecular clock of mitochondrial-DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**: 160-174.

- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, e J. R. DeWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **270**: 313-321.
- Janzen, D. H. 2004. Now is the time. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **359**: 731-732.
- Jarnegren, J., C. Schander, J. A. Sneli, V. Ronningen, e C. M. Young. 2007. Four genes, morphology and ecology: distinguishing a new species of *Acesta* (Mollusca; Bivalvia) from the Gulf of Mexico. *Marine Biology* **152**: 43-55.
- Jinbo, U., T. Kato, e M. Ito. 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science* **14**: 107-124.
- Jozefowicz, C. J. e D. O. Foighil. 1998. Phylogenetic analysis of southern hemisphere flat oysters based on partial mitochondrial 16S rDNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **10**: 426-435.
- Knowles, L. L. e B. C. Carstens. 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology* **56**: 887-895.
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 189-216.
- Knowlton, N. 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* **420**: 73-90.
- Koehler, F. e M. S. Johnson. 2012. Species limits in molecular phylogenies: a cautionary tale from Australian land snails (Camaenidae: Amplirhagada Iredale, 1933). *Zoological Journal of the Linnean Society* **165**: 337-362.
- Kong, L. F. e Q. Li. 2009. Genetic evidence for the existence of cryptic species in an endangered clam *Coelomactra antiquata*. *Marine Biology* **156**: 1507-1515.

- Kong, L., A. Matsukuma, I. Hayashi, Y. Takada, e Q. Li. 2012. Taxonomy of *Macridiscus* species (Bivalvia: Veneridae) from the Western Pacific: Insight based on molecular evidence, with description of a new species. *Journal of Molluscan Studies* **78**: 1-11.
- Leliaert, F., H. Verbruggen, B. Wysor, e O. De Clerck. 2009. DNA taxonomy in morphologically plastic taxa: Algorithmic species delimitation in the *Boodlea* complex (Chlorophyta: Cladophorales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **53**: 122-133.
- Librado, P. e J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- Maddison, W. P. e D. R. Maddison. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>.
- Meier, R., G. Zhang, e F. Ali. 2008. The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the "Barcoding Gap" and leads to misidentification. *Systematic Biology* **57**: 809-813.
- Meyer, C. P. e G. Paulay. 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biology* **3**: 2229-2238.
- Miglietta, M. P., A. Faucci. e F. Santini. 2011. Speciation in the sea: Overview of the symposium and discussion of future directions. *Integrative and Comparative Biology* **51**: 449-455.
- Mikkelsen, P. M. e R. Bieler. 2001. *Varicorbula* (Bivalvia: Corbulidae) of the Western Atlantic: Taxonomy, anatomy, life habits, and distribution. *Veliger* **44**: 271-293.
- Mikkelsen, N. T., C. Schander, e E. Willassen. 2007. Local scale DNA barcoding of bivalves (Mollusca): A case study. *Zoologica Scripta* **36**: 455-463.
- Mikkelsen, P. M. 2011. Speciation in modern marine bivalves (Mollusca: Bivalvia): Insights from the published record. *American Malacological Bulletin* **29**: 217-245.

- Monaghan, M. T., R. Wild, M. Elliot, T. Fujisawa, M. Balke, D. J. G. Inward, D. C. Lees, R. Ranaivosolo, P. Eggleton, T. G. Barraclough, e A. P. Vogler. 2009. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology* **58**: 298-311.
- Mutanen, M., A. Hausmann, P. D. N. Hebert, J.-F. Landry, J. R. de Waard, e P. Huemer. 2012. Allopatry as a Gordian not for taxonomists: Patterns of DNA barcode divergence in Arctic-Alpine Lepidoptera. *Plos One* **7**: e47214.
- Niemiller, M. L., T. J. Near, e B. M. Fitzpatrick. 2012. Delimiting species using multilocus data: Diagnosing cryptic diversity in the southern cavefish, *Typhlichthys subterraneus* (Teleostei: Amblyopsidae). *Evolution* **66**: 846-866.
- O'Meara, B. C. 2010. New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. *Systematic Biology* **59**: 59-73.
- O'Meara, B. C., C. Ane, M. J. Sanderson, e P. C. Wainwright. 2006. Testing for different rates of continuous trait evolution using likelihood. *Evolution* **60**: 922-933.
- Palumbi, S. R. 1994. Genetic-divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **25**: 547-572.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. pp 205-247 In D. M. Hillis, C. Moritz, e B. K. Mable (eds). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Papadopoulou, A., J. Bergsten, T. Fujisawa, M. T. Monaghan, T. G. Barraclough, e A. P. Vogler. 2008. Speciation and DNA barcodes: testing the effects of dispersal on the formation of discrete sequence clusters. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **363**: 2987-2996.
- Paz, A. e A. J. Crawford. 2012. Molecular-based rapid inventories of sympatric diversity: A comparison of DNA barcode clustering methods applied to geography-based vs clade-based sampling amphibians. *Journal of Bioscience* **37**: 1-10.

- Peek, A. S., R. G. Gustafson, R. A. Lutz, e R. C. Vrijenhoek. 1997. Evolutionary relationships of deep-sea hydrothermal vent and cold-water seep clams (Bivalvia : Vesicomidae): Results from mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *Marine Biology* **130**: 151-161.
- Pons, J., T. Barraclough, J. Gomez-Zurita, A. Cardoso, D. Duran, S. Hazell, S. Kamoun, W. Sumlin, e A. Vogler. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* **55**: 595-609.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253-1256.
- Powell, J. R. 2012. Accounting for uncertainty in species delineation during the analysis of environmental DNA sequence data. *Methods in Ecology and Evolution* **3**: 1-11.
- Powell, J. R., M. T. Monaghan, M. Oepik, e M. C. Rillig. 2011. Evolutionary criteria outperform operational approaches in producing ecologically relevant fungal species inventories. *Molecular Ecology* **20**: 655-666.
- Puillandre, N., M. Baylac, M.-C. Boisselier, C. Cruaud, e S. Samadi. 2009. An integrative approach to species delimitation in *Benthomangelia* (Mollusca: Conoidea). *Biological Journal of the Linnean Society* **96**: 696-708.
- Puillandre, N., A. Lambert, S. Brouillet, e G. Achaz. 2012a. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* **21**: 1864-1877.
- Puillandre, N., M. V. Modica, Y. Zhang, L. Sirovich, M. C. Boisselier, C. Cruaud, M. Holford, e S. Samadi. 2012b. Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology* **21**: 2671-2691.
- Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* **56**: 879-886.
- Rios, E. C. 1994. *Seashells of Brazil*. 2a. edição. Editora da FURGS, Rio Grande.

- Rosenberg, N. 2003. The shapes of neutral gene genealogies in two species: Probabilities of monophyly, paraphyly, and polyphyly in a coalescent model. *Evolution* **57**: 1465-1477.
- Rosenberg, N. A. 2007. Statistical tests for taxonomic distinctiveness from observations of monophyly. *Evolution* **61**: 317-323.
- Rosenberg, N. A. e M. Nordborg. 2002. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* **3**: 380-390.
- Salvi, D. e P. Mariottini. 2012. Molecular phylogenetics in 2D: ITS2 rRNA evolution and sequence-structure barcode from Veneridae to Bivalvia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **65**: 792-798.
- Sauer, J. e B. Hausdorf. 2012. A comparison of DNA-based methods for delimiting species in a Cretan land snail radiation reveals shortcomings of exclusively molecular taxonomy. *Cladistics* **28**: 300-316.
- Sites, J. W. e J. C. Marshall. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 462-470.
- Sites, J. W. e J. C. Marshall. 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **35**: 199-227.
- Stoeckle, M. 2003. Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *Bioscience* **53**: 796-797.
- Tamura, K. e M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**: 512-526.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, e S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-2739.

- Tang, C. Q., F. Leasi, U. Obertegger, A. Kieneke, T. G. Barraclough, e D. Fontaneto. 2012. The widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity surveys of the meiofauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 16208-16212.
- Taylor, J. D., S. T. Williams, E. A. Glover, e P. Dyal. 2007. A molecular phylogeny of heterodont bivalves (Mollusca : Bivalvia : Heterodonta): new analyses of 18S and 28S rRNA genes. *Zoologica Scripta* **36**; 587-606.
- Wakeley, J. 2006. *Coalescent Theory - An Introduction*. 1a. edição. Roberts & Company Publishers, Greenwood Village.
- Warmke, G. e R. T. Abbott. 1961. *Caribbean Seashells. A Guide to the Marine Mollusks of Puerto Rico and other West Indian Islands, Bermuda and the Lower Florida Keys*. Dover Publications, New York.
- Wiens, J. J. 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology* **56**: 875-878.
- Wilk, J. e R. Bieler. 2009. Ecophenotypic variation in the flat tree oyster, *Isognomon alatus* (Bivalvia: Isognomonidae), across a tidal microhabitat gradient. *Marine Biology Research* **5**: 155-163.
- Wilkins, J. S. 2011. Philosophically speaking, how many species concepts are there? *Zootaxa* **2765**: 58-60.
- Winker, K. 2009. Reuniting phenotype and genotype in biodiversity research. *BioScience* **59**: 657-665.
- Yang, Z. H. e B. Rannala. 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 9264-9269.

Tabela 2.1. Lista dos indivíduos utilizados nas análises de delimitação de espécies de *Corbula* com base em marcadores moleculares. Espécie: identificação feita com base na morfologia da concha.

Indivíduo	Espécie	Projeto/coletor	Local	Data	Código
001	<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/02	CSS02_001
006	<i>Corbula caribaea</i>		Litoral Norte do Paraná	nov/97	CPR97_006
013	<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jan/03	CSS03_013
017	<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	ago-set/94	CEZ94_017
019	<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	ago-set/94	CEZ94_019
021	<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	ago-set/94	CEZ94_021
057	<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	ago-set/94	CEZ94_057
063	<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/02	CSS02_063
078	<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	29.12.1992	CEZ92_078
079	<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	nov-dez/93	CEZ93_079
102	<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/03	CSS03_102
107	<i>Corbula caribaea</i>	F. D. Passos	São Sebastião, SP	abr/10	CSS10_107
108	<i>Corbula caribaea</i>	F. D. Passos	São Sebastião, SP	abr/10	CSS10_108
109	<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/03	CSS03_109
110	<i>Corbula caribaea</i>	F. D. Passos	São Sebastião, SP	abr/10	CSS10_110
111	<i>Corbula caribaea</i>	F. D. Passos	São Sebastião, SP	abr/10	CSS10_111
112	<i>Corbula caribaea</i>	F. D. Passos	São Sebastião, SP	abr/10	CSS10_112
134	<i>Corbula caribaea</i>		Santos, SP	nov/98	CSa98_134
143	<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	nov-dez/93	CEZ93_143
151	<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	ago-set/94	CEZ94_151
154	<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	ago-set/94	CEZ94_154
158	<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	nov-dez/93	CEZ93_158
164	<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/03	CSS03_164
165	<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/03	CSS03_165
166	<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jan/03	CSS03_166
178	<i>Corbula caribaea</i>		Enseada de Zimbros, SC	ago-set/94	CEZ94_178
181	<i>Corbula caribaea</i>	Fauna de Praia	São Sebastião, SP	22.07.1997	CSS97_181
184	<i>Corbula caribaea</i>	Fauna de Praia	São Sebastião, SP	22.07.1997	CSS97_184
185	<i>Corbula caribaea</i>	Fauna de Praia	São Sebastião, SP	22.07.1997	CSS97_185
190	<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/02	CSS02_190
191	<i>Corbula tryoni</i>		Santos, SP	nov/98	TSa98_191
192	<i>Corbula tryoni</i>		Bertioga, SP	fev/98	TBe98_192
193	<i>Corbula tryoni</i>		Bertioga, SP	fev/98	TBe98_193
194	<i>Corbula tryoni</i>		Bertioga, SP	fev/98	TBe98_194
196	<i>Corbula tryoni</i>	DEPROAS	Cabo Frio, RJ	18.02.2001	TCF01_196
204	<i>Corbula tryoni</i>		Litoral Norte do Paraná	nov/97	TPR97_204

(cont.)



(cont.)

<b>Indivíduo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Projeto/coletor</b>	<b>Local</b>	<b>Data</b>	<b>Código</b>
205	<i>Corbula tryoni</i>		Paranaguá, PR	28.08.1996	TPa96_205
209	<i>Corbula tryoni</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/92	TBC92_209
210	<i>Corbula tryoni</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/92	TBC92_210
212	<i>Corbula tryoni</i>		Jureia, SP	jul/00	TJr00_212
236	<i>Corbula tryoni</i>		Juatinga, RJ	mai-jun/99	TJt99_236
241	<i>Corbula tryoni</i>		Santos, SP	nov/98	TSa98_241
244	<i>Corbula tryoni</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/92	TBC92_244
246	<i>Corbula tryoni</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/92	TBC92_246
248	<i>Corbula tryoni</i>		Jureia, SP	jul/00	TJr00_248
262	<i>Corbula tryoni</i>		Jureia, SP	jul/00	TJr00_262
265	<i>Corbula tryoni</i>		Litoral Norte do Paraná	nov/97	TPR97_265
279	<i>Corbula tryoni</i>	DEPROAS	Cabo Frio, RJ	18.02.2001	TCF01_279
300	<i>Corbula tryoni</i>		Jureia, SP	jul/00	TJr00_300
302	<i>Corbula tryoni</i>		Jureia, SP	jul/00	TJr00_302
304	<i>Corbula tryoni</i>		Jureia, SP	jul/00	TJr00_304
305	<i>Corbula tryoni</i>		Jureia, SP	jul/00	TJr00_305
308	<i>Corbula tryoni</i>		Jureia, SP	jul/00	TJr00_308
309	<i>Corbula tryoni</i>		Jureia, SP	jul/00	TJr00_309
313	<i>Corbula tryoni</i>		Paranaguá, PR	nov/97	TPa97_313
357	<i>Corbula tryoni</i>		Jureia, SP	jul/00	TJr00_357
358	<i>Corbula tryoni</i>		Jureia, SP	jul/00	TJr00_358
359	<i>Corbula tryoni</i>		Bertioga, SP	fev/98	TBe98_359
360	<i>Corbula tryoni</i>		Bertioga, SP	fev/98	TBe98_360
361	<i>Corbula tryoni</i>		Bertioga, SP	fev/98	TBe98_361
368	<i>Corbula tryoni</i>	DEPROAS	Cabo Frio, RJ	18.02.2001	TCF01_368
385	<i>Corbula patagonica</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/92	PBC92_385
387	<i>Corbula patagonica</i>		Santos, SP	nov/98	PSa98_387
440	<i>Corbula patagonica</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jan/03	PSS03_440
441	<i>Corbula patagonica</i>		Lage de Santos, SP	mai/98	PLS98_441
446	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_446
449	<i>Corbula patagonica</i>		São Francisco do Sul, SC	nov/98	PSF98_449
450	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_450
451	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_451
452	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_452
455	<i>Corbula patagonica</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/92	PBC92_455
457	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_457
458	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_458
460	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_460
461	<i>Corbula patagonica</i>		São Francisco do Sul, SC	nov/98	PSF98_461

(cont.)

(cont.)

Indivíduo	Espécie	Projeto/coletor	Local	Data	Código
467	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_467
470	<i>Corbula patagonica</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/92	PBC92_470
473	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_473
474	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_474
475	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_475
476	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_476
477	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_477
479	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_479
480	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_480
481	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_481
482	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_482
484	<i>Corbula patagonica</i>		Jureia, SP	jul/00	PJr00_484
492	<i>Corbula patagonica</i>	Monitoramento	Bacia de Campos	fev-mar/92	PBC92_492
504	<i>Corbula aequivalvis</i>		Enseada de Zimbros, SC	out-dez/98	DEZ98_504
511	<i>Corbula lyoni</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	mai/97	LBA97_511
513	<i>Corbula lyoni</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	mai/97	LBA97_513
518	<i>Corbula lyoni</i>		Paranaguá, PR	nov-dez/00	LPa00_518
520	<i>Corbula lyoni</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	mai/97	LBA97_520
521	<i>Corbula lyoni</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	mai/97	LBA97_521
523	<i>Corbula lyoni</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	mai/97	LBA97_523
524	<i>Corbula lyoni</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	mai/97	LBA97_524
530	<i>Corbula lyoni</i>		Lage de Santos, SP	mai/98	LLS98_530
536	<i>Corbula lyoni</i>		Jureia, SP	jul/00	LJr00_536
537	<i>Corbula lyoni</i>		Jureia, SP	jul/00	LJr00_537
538	<i>Corbula lyoni</i>		Jureia, SP	jul/00	LJr00_538
549	<i>Corbula lyoni</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	mai/97	LBA97_549
551	<i>Corbula lyoni</i>		Ilha do Bom Abrigo, SP	mai/97	LBA97_551
565	<i>Corbula</i> sp1		Jureia, SP	jul/00	SJr00_565
14.2	<i>Corbula caribaea</i>	M. Quast	São Sebastião, SP	abr/09	CSS09_14.2
15.1	<i>Corbula caribaea</i>	M. Quast	São Sebastião, SP	abr/09	CSS09_15.1
18.1	<i>Corbula caribaea</i>	M. Quast	São Sebastião, SP	ago/09	CSS09_18.1
18.2	<i>Corbula caribaea</i>	M. Quast	São Sebastião, SP	ago/09	CSS09_18.2
18.3	<i>Corbula caribaea</i>	M. Quast	São Sebastião, SP	ago/09	CSS09_18.3
2.2	<i>Corbula caribaea</i>	TEBAR	São Sebastião, SP	jul/02	CSS02_2.2
6.2	<i>Corbula caribaea</i>		Juatinga, RJ	mai-jun/99	CJt99_6.2

Tabela 2.2. *Primers* utilizados nas reações em cadeia da polimerase. Tamanho: tamanho do fragmento amplificado em pares de bases. Sequências dos *primers* no sentido 5'-3'.

<b>Marcador</b>	<b>Primer forward</b>	<b>Primer reverso</b>	<b>Tamanho</b>
COI <sup>a</sup>	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	700
COIa	GTTTTCTWDTGGGCTGGTTTG	YATTAARGGMACCAACCAAT	194
COIb	RGAAATATTGGWCATTCHGG	TAGTTAARGCCCCWGCHAAA	223
16S <sup>b</sup>	CGCCTGTTTAACAAAAACAT	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	550
16Sa	GTAACGGYTGCGGTKMRTAG	SATRGGGTCTTCTCGTCTWT	169
16Sb	GACGAGAAGACCCYATGGAKC	ATCCAACATCGAGGTCGCAAACC	228

<sup>a</sup>-(Folmer *et al.* 1994)

<sup>b</sup>-(Palumbi 1996)

Tabela 2.3. Análise da regra das 4x para *Corbula* com o marcador COI: valores de  $\theta$  e  $4x\theta$ , para cada clado determinado nas árvores de coalescência, e matriz de comparação entre  $\theta_{\max}$  e distâncias genéticas entre clados. Diagonal inferior da matriz: distâncias genéticas entre os clados; diagonal superior: maior valor de  $4x\theta$  dentre os dois clados; valores sombreados indicam qual dos dois valores comparados (distância genética ou  $4x\theta$ ) é maior, para cada par de clados; subclados são comparados apenas entre si. Nomenclatura dos clados de acordo com a figura 2.2. Valores arredondados para duas casas decimais.

	$\theta$	$4x\theta$	Car	Try	PatA	Pat3	Pat4	Lyo	Lyo1	Car1	Car2	Pat1	Pat2
<b>Car</b>	0,03	0,13		0,13	0,14	0,13	0,14	0,46	0,30	x	x	x	x
<b>Try</b>	0,01	0,06	0,28		0,14	0,06	0,14	0,46	0,30	x	x	x	x
<b>PatA</b>	0,03	0,14	0,22	0,24		0,14	0,14	0,46	0,30	x	x	x	x
<b>Pat3</b>	0,00	0,02	0,29	0,10	0,25		0,14	0,46	0,30	x	x	x	x
<b>Pat4</b>	0,03	0,14	0,36	0,29	0,35	0,16		0,46	0,30	x	x	x	x
<b>Lyo</b>	0,11	0,46	0,44	0,37	0,41	0,33	0,29		x	x	x	x	x
<b>Lyo1</b>	0,08	0,30	0,37	0,29	0,35	0,26	0,25	x		x	x	x	x
<b>Car1</b>	0,01	0,05	x	x	x	x	x	x	x		0,05	x	x
<b>Car2</b>	0,01	0,03	x	x	x	x	x	x	x	0,09		x	x
<b>Pat1</b>	0,01	0,02	x	x	x	x	x	x	x	x	x		0,04
<b>Pat2</b>	0,01	0,04	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,07	

Tabela 2.4. Análise da regra das 4x para *Corbula* com o marcador 16S: valores de  $\theta$  e  $4x\theta$ , para cada clado determinado na árvore de coalescência, e matriz de comparação entre  $\theta_{\max}$  e distâncias genéticas entre clados. Diagonal inferior da matriz: distâncias genéticas entre os clados; diagonal superior: maior valor de  $4x\theta$  dentre os dois clados; valores sombreados indicam qual dos dois valores comparados (distância genética ou  $4x\theta$ ) é maior, para cada par de clados; subclados são comparados apenas entre si. Nomenclatura dos clados de acordo com figura 2.3. Valores arredondados para duas casas decimais.

	$\theta$	$4x\theta$	Car	TryA	Try3	Aeq	Pat1	Pat2	Pat5	Pat6	Lyo	Try1	Try2
<b>Car</b>	0,02	0,08		0,31	0,13	0,08	0,29	0,11	0,18	0,12	0,97	x	x
<b>TryA</b>	0,08	0,31	0,40		0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,97	x	x
<b>Try3</b>	0,03	0,13	0,38	0,14		0,13	0,29	0,13	0,18	0,13	0,97	0,13	0,51
<b>Aeq</b>	-		0,58	0,41	0,43		0,29	0,11	0,18	0,12	0,97	x	x
<b>Pat1</b>	0,07	0,29	0,32	0,30	0,28	0,52		0,29	0,29	0,29	0,97	x	x
<b>Pat2</b>	0,03	0,11	0,27	0,27	0,24	0,48	0,11		0,18	0,12	0,97	x	x
<b>Pat5</b>	0,05	0,18	0,35	0,26	0,21	0,47	0,37	0,30		0,18	0,97	x	x
<b>Pat6</b>	0,03	0,12	0,40	0,31	0,23	0,51	0,38	0,35	0,17		0,97	x	x
<b>Lyo</b>	0,24	0,97	0,91	0,76	0,74	0,70	0,84	0,74	0,62	0,75		x	x
<b>Try1</b>	0,00	0,01	x	x	0,09	x	x	x	x	x	x		0,51
<b>Try2</b>	0,13	0,51	x	x	0,20	x	x	x	x	x	x	0,11	

Tabela 2.5. Análise da regra das 4x para *Corbula* com a matriz concatenada (COI + 16S): valores de  $\theta$  e  $4x\theta$ , para cada clado determinado na árvore de coalescência, e matriz de comparação entre  $\theta_{\max}$  e distâncias genéticas entre clados. Diagonal inferior da matriz: distâncias genéticas entre os clados; diagonal superior: maior valor de  $4x\theta$  dentre os dois clados; valores sombreados indicam qual dos dois valores comparados (distância genética ou  $4x\theta$ ) é maior, para cada par de clados; subclados são comparados apenas entre si. Nomenclatura dos clados de acordo com a figura 2.4. Valores arredondados para duas casas decimais.

	$\theta$	$4x\theta$	Car	TryA	Try3	PatA	Pat3	Pat4	Lyo	Lyo1	Car1	Car2	Try1	Try2	Pat1	Pat2
<b>Car</b>	0,03	0,10		0,17	0,10	0,22	0,10	0,23	0,68	0,42	x	x	x	x	x	x
<b>TryA</b>	0,04	0,17	0,37		0,17	0,22	0,17	0,23	0,68	0,42	x	x	x	x	x	x
<b>Try3</b>	0,01	0,05	0,34	0,08		0,22	0,05	0,23	0,68	0,42	x	x	0,05	0,20	x	x
<b>PatA</b>	0,05	0,22	0,27	0,28	0,25		0,22	0,23	0,68	0,42	x	x	x	x	x	x
<b>Pat3</b>	-		0,32	0,18	0,15	0,30		0,23	0,68	0,42	x	x	x	x	x	x
<b>Pat4</b>	0,06	0,23	0,37	0,29	0,26	0,37	0,09		0,68	0,42	x	x	x	x	x	x
<b>Lyo</b>	0,17	0,68	0,61	0,51	0,49	0,56	0,43	0,41		x	x	x	x	x	x	x
<b>Lyo1</b>	0,11	0,42	0,57	0,46	0,43	0,53	0,39	0,40	x		x	x	x	x	x	x
<b>Car1</b>	0,02	0,07	x	x	x	x	x	x	x	x		0,07	x	x	x	x
<b>Car2</b>	0,01	0,03	x	x	x	x	x	x	x	x	0,06		x	x	x	x
<b>Try1</b>	0,01	0,04	x	x	0,04	x	x	x	x	x	x	x		0,20	x	x
<b>Try2</b>	0,05	0,20	x	x	0,10	x	x	x	x	x	x	x	0,05		x	x
<b>Pat1</b>	0,04	0,14	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		0,14
<b>Pat2</b>	0,02	0,07	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,10	

Tabela 2.6. Resumo dos resultados da delimitação de espécies de *Corbula* com base em marcadores moleculares. N spp: número de espécies delimitadas de acordo com a análise; Táxons: nomes dados aos táxons de acordo com as árvores de coalescência.

		Uniloco				Multilocos	
Marcador		GMYC	4x	ABGD		Brownie	
COI	N spp	1	8	7	6	N spp	8
	Táxons	<i>Corbula</i> sp	Car1 Car2 Try Pat1 Pat2 Pat3 Pat4 Lyo	Car1 Car2 Try PatA Pat3 Pat4 Lyo	Car Try PatA Pat3 Pat4 Lyo	Táxons	Car Try-parcial Try1-parcial Pat1 Pat2 PatB Lyo1 Lyo2
16S	N spp	1	6	9	8		
	Táxons	<i>Corbula</i> sp	Car Try PatA PatB Lyo Aeq	Car Try PatA Pat5 Pat6 Lyo Aeq	Car Try PatA PatB Lyo Aeq 204 530		
Dados concatenados	N spp	1	5	6			
	Táxons	<i>Corbula</i> sp	Car Try PatA PatB Lyo	Car Try PatA PatB Lyo	440		

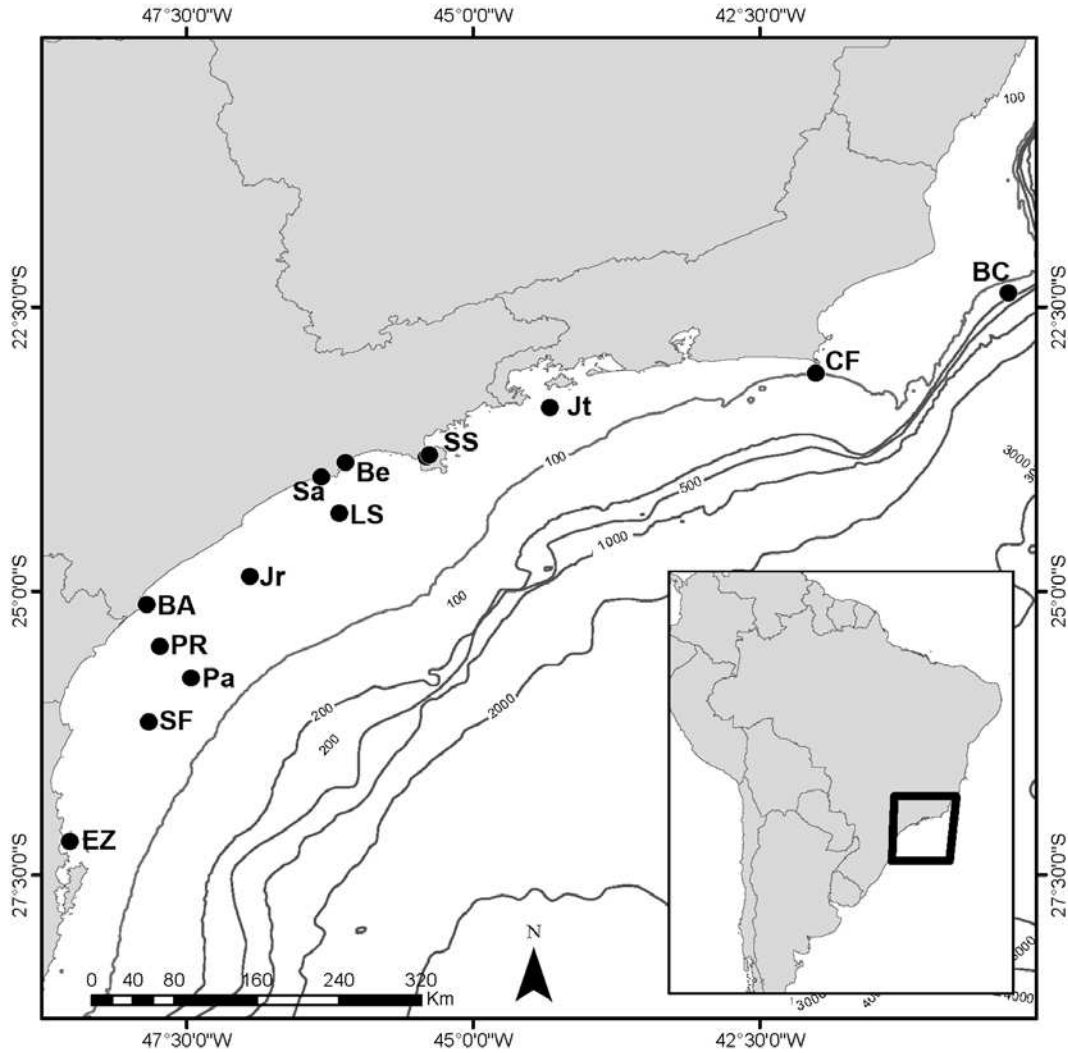


Figura 2.1. Áreas de coleta dos diversos projetos dos quais foram obtidos espécimes de *Corbula* para análises moleculares. Alguns pontos se referem a coordenadas aproximadas devido à abrangência da área (por exemplo, Bacia de Campos) ou por falta de dados precisos de coleta (as coordenadas foram aproximadas dadas localidade e profundidade). BA - Ilha do Bom Abrigo, SP; BC - Bacia de Campos; Be - Bertioga, SP; CF - Cabo Frio, RJ; EZ - Enseada de Zimbros, SC; Jr - Jureia, SP; Jt - Juatinga, RJ; LS - Laje de Santos, SP; Pa - Paranaguá, PR; PR - Litoral Norte do Paraná; Sa - Barra de Santos, SP; SF - São Francisco do Sul, SC; SS – São Sebastião, SP.

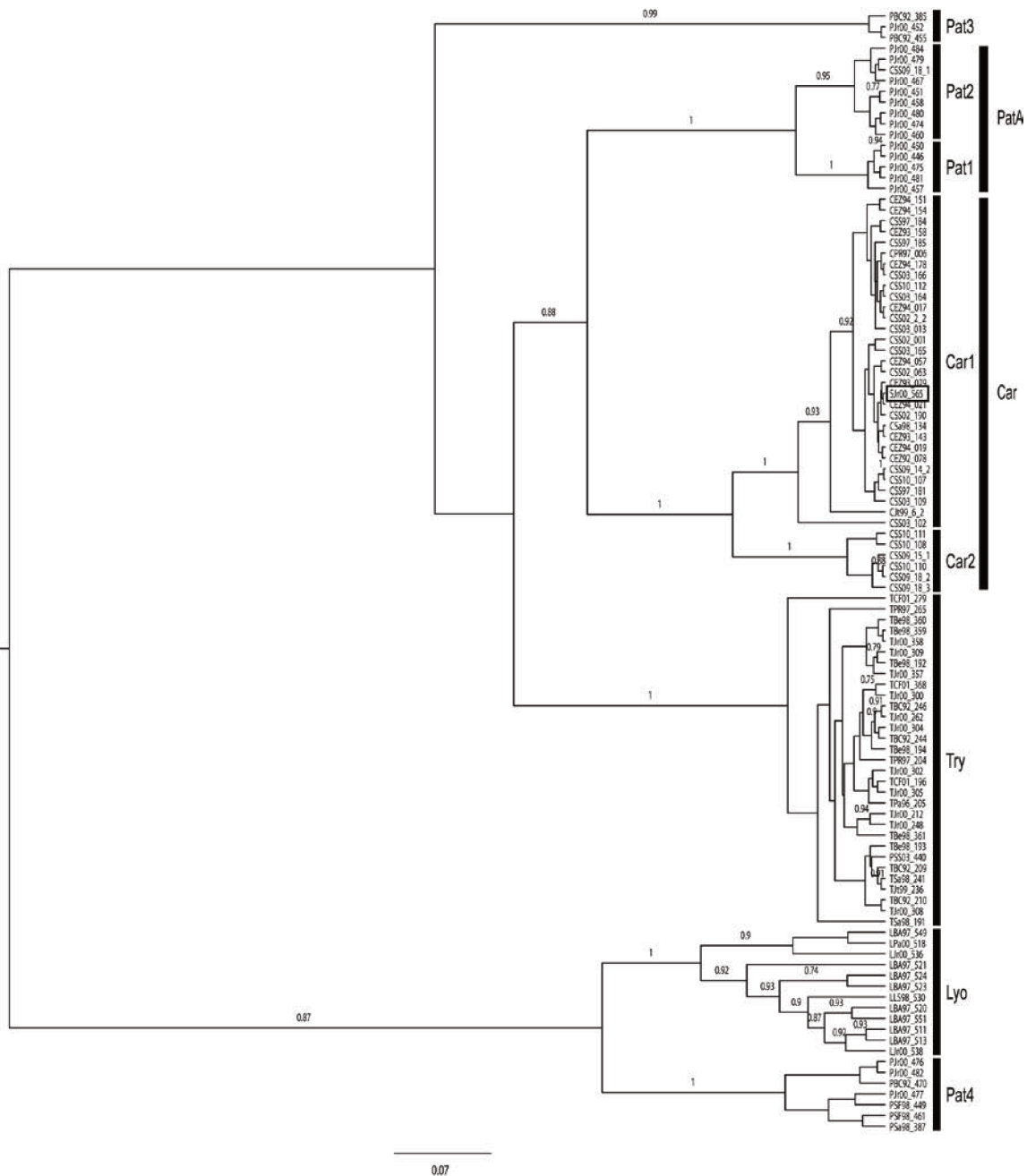


Figura 2.2. Árvore de máxima credibilidade obtida pela análise de coalescência das espécies de *Corbula* estudadas, obtida com o marcador COI. Sobre cada ramo, é dada sua probabilidade posterior; valores menores que 0,75 foram omitidos. À direita, estão indicados os grupos utilizados para a análise da regra das 4x. No retângulo, o indivíduo identificado como *Corbula* sp1 (SJr00\_565).



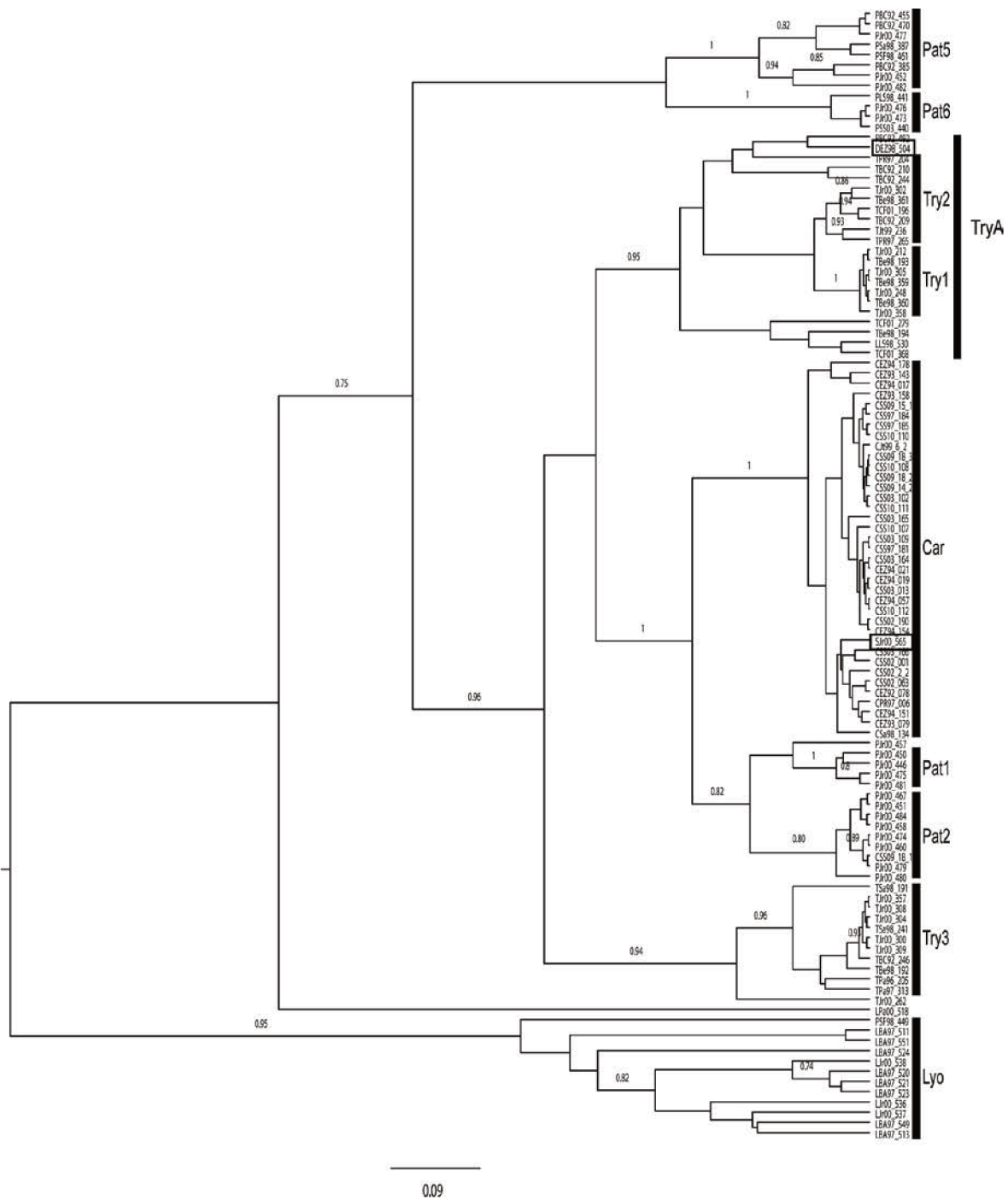


Figura 2.3. Árvore de máxima credibilidade obtida pela análise de coalescência das espécies de *Corbula* estudadas, obtida com o marcador 16S. Sobre cada ramo, é dada sua probabilidade posterior; valores menores que 0,75 foram omitidos. À direita, estão indicados os grupos utilizados para a análise da regra das 4x. Nos retângulos, o indivíduo identificado como *Corbula* sp1 (SJr00\_565) e a única sequência de *C. aequivalvis* (DEZ98\_504).



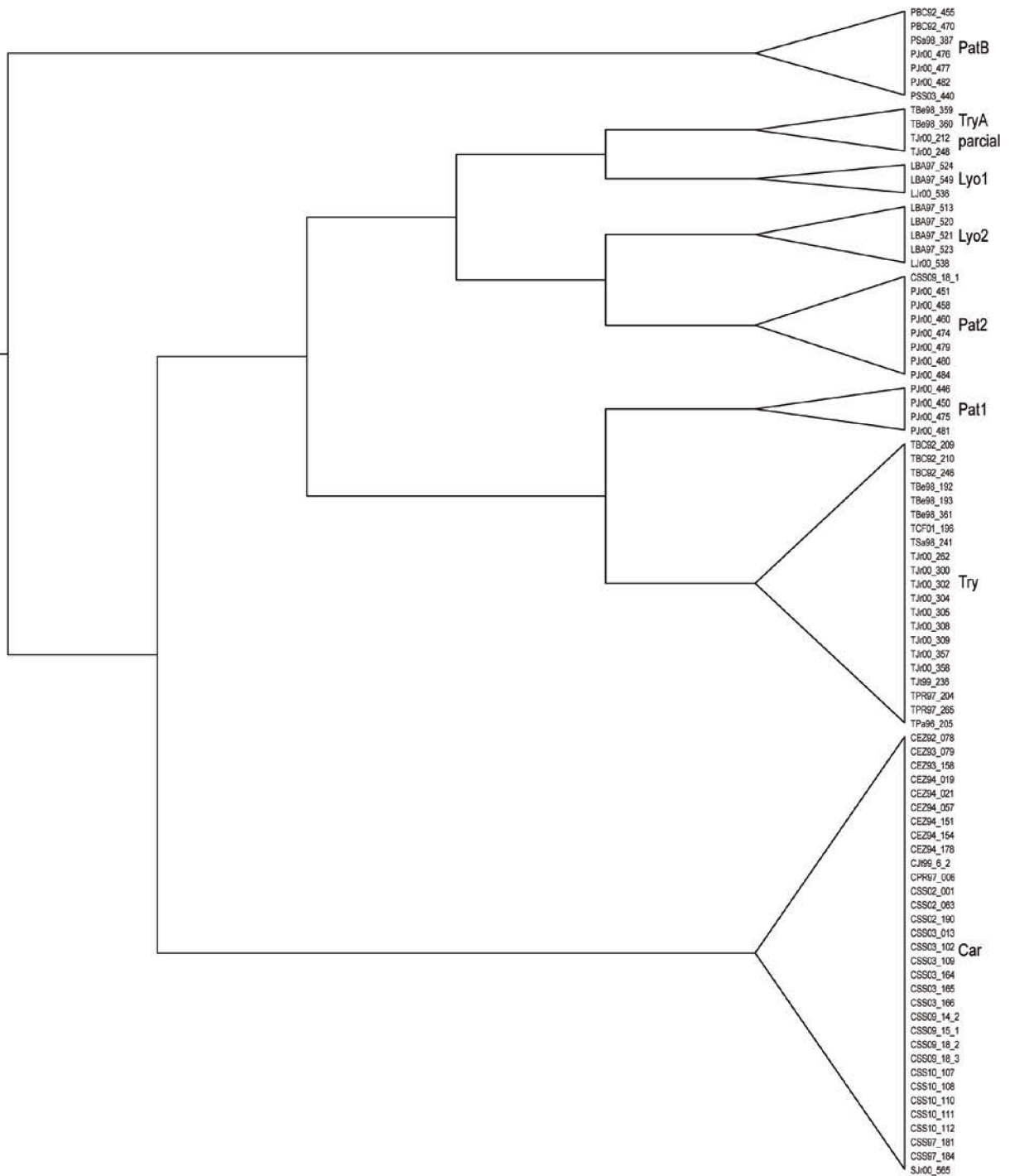


Figura 2.5. Árvore da análise multilocos, gerada pelo programa Brownie. À direita, o nome de cada grupo, de acordo com a nomenclatura a das figuras 2.2 a 2.4. *Corbula lyoni* aparece dividida em dois grupos, Lyo1 e Lyo2; o grupo PatB equivale aos grupos Pat3 e Pat 4 das árvores de coalescência para o COI e a matriz concatenada, e aos grupos Pat5 e Pat6, para o 16S.

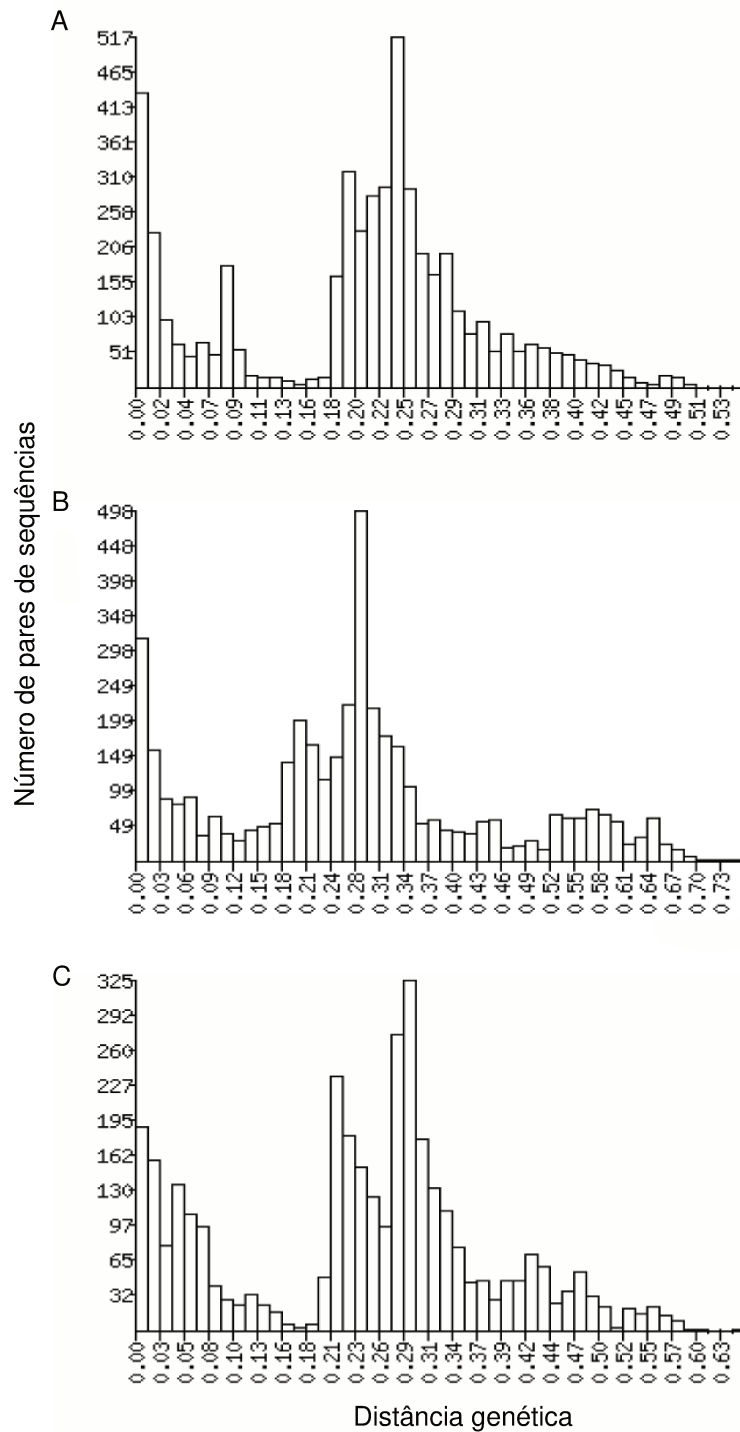


Figura 2.6. Frequência de ocorrência das distâncias genéticas par a par entre indivíduos de *Corbula* para cada um dos marcadores. A: COI; B: 16S; C: matriz concatenada. Histogramas gerados pelo programa ABGD.

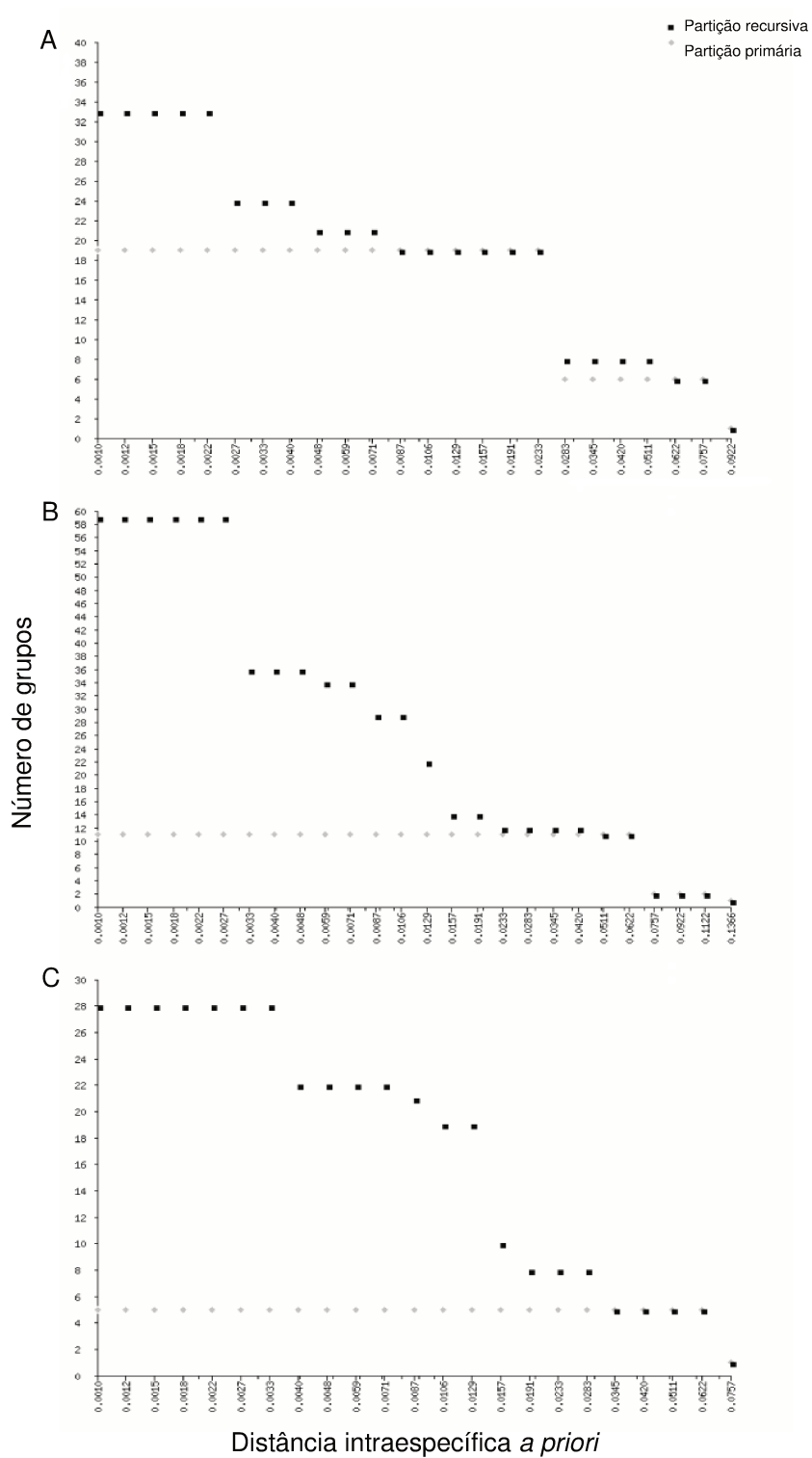


Figura 2.7. Número de grupos formados pelo ABGD para *Corbula* por cada partição (primária e recursiva) por distância intraespecífica considerada *a priori* para cada marcador. A: COI; B: 16S; C: matriz concatenada. Gráficos gerados pelo programa ABGD.

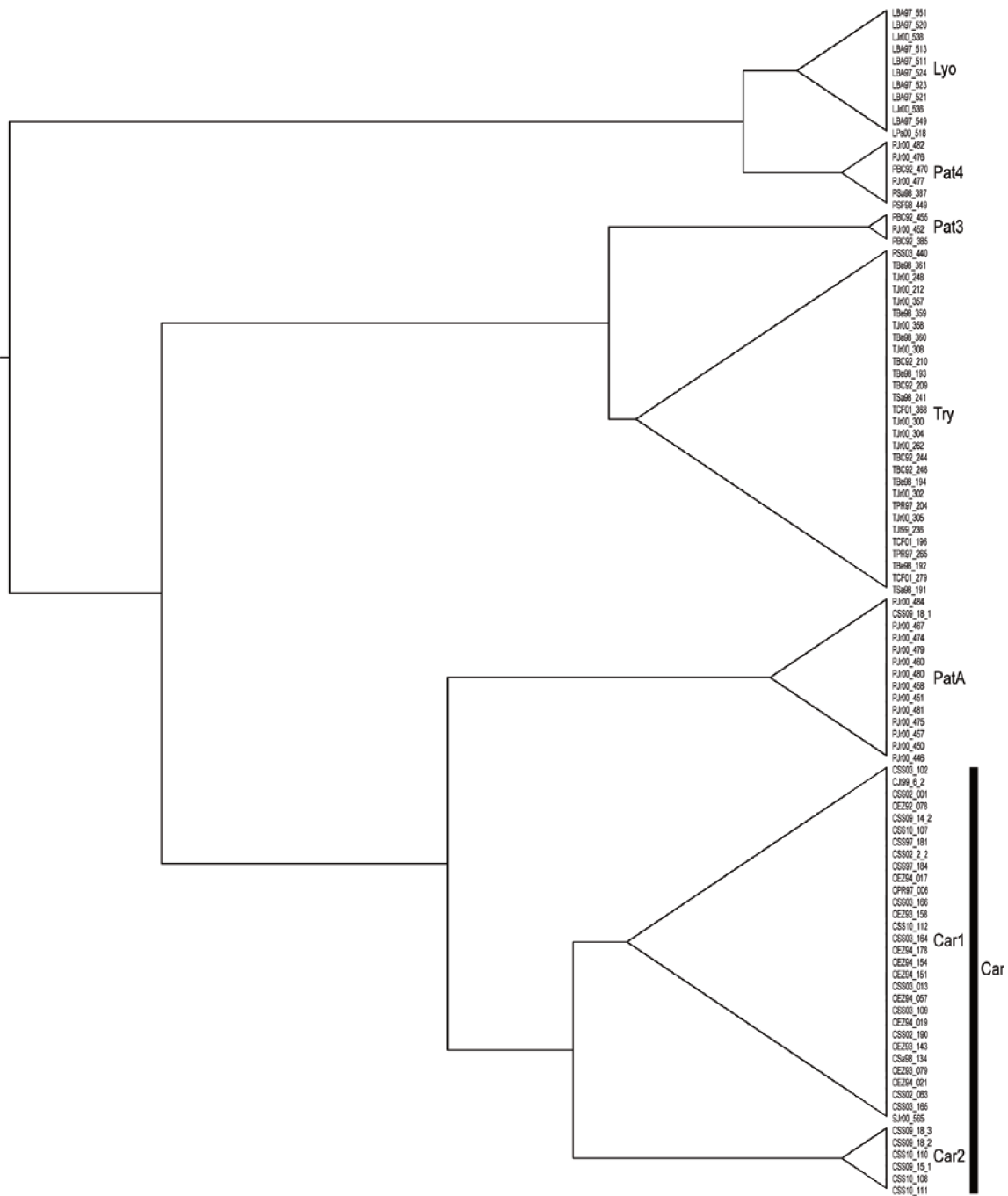


Figura 2.8. Árvore representando o agrupamento de indivíduos de *Corbula* gerado pelo ABGD para o marcador COI para distâncias intraespecíficas *a priori* entre 0,0283 e 0,0511; a barra preta representa a diferença no agrupamento, quando se considera distâncias entre 0,0622 e 0,0757 (os demais grupos permanecem os mesmos). A nomenclatura dos grupos segue a das figuras 2.2 a 2.4. Grupos formados por um único indivíduo, dentro de outro grupo, foram desconsiderados; estes indivíduos aparecem dentro do grupo maior, no qual foram inseridos.

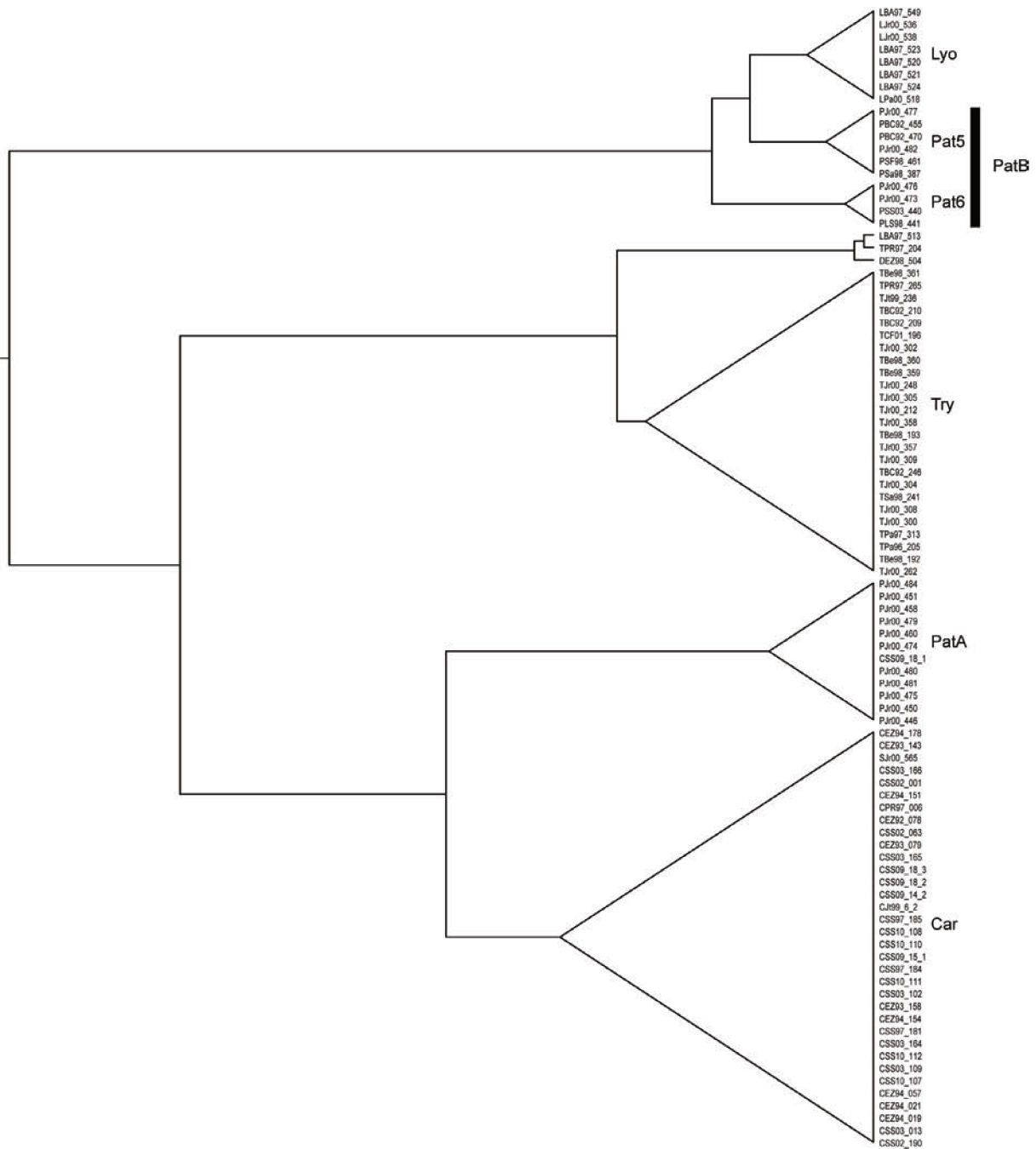


Figura 2.9. Árvore representando o agrupamento de indivíduos de *Corbula* gerado pelo ABGD para o marcador 16S para distâncias intraespecíficas *a priori* entre 0,0233 e 0,0420; a barra preta representa a diferença no agrupamento, quando se considera distâncias entre 0,0511 e 0,0622 (os demais grupos permanecem os mesmos). A nomenclatura dos grupos segue a das figuras 2.2 a 2.4. Grupos formados por um único indivíduo, dentro de outro grupo, foram desconsiderados; estes indivíduos aparecem dentro do grupo maior, no qual foram inseridos.

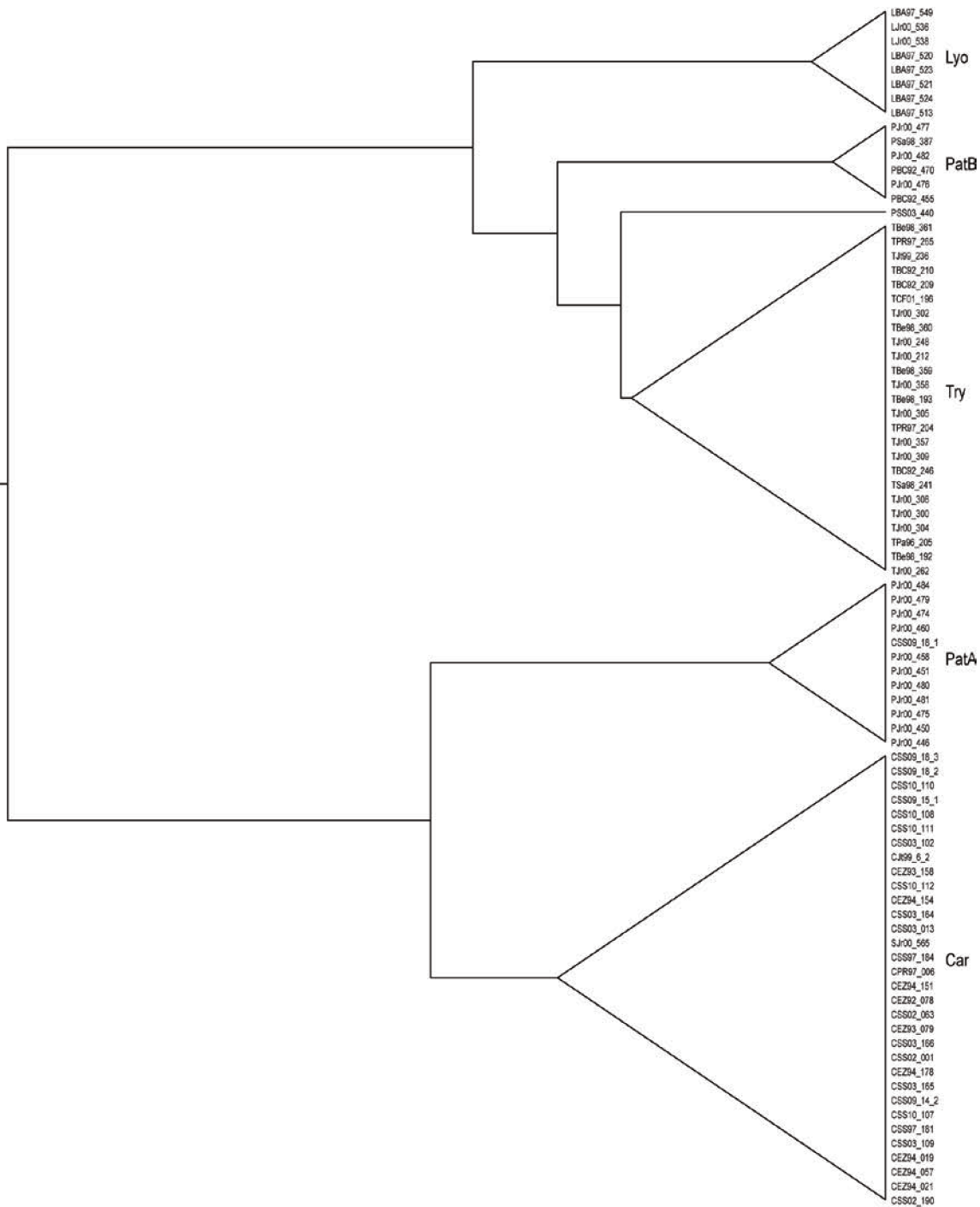


Figura 2.10. Árvore representando o agrupamento de indivíduos de *Corbula* gerado pelo ABGD para a matriz concatenada para distâncias intraespecíficas *a priori* entre 0,0191 e 0,0283. A nomenclatura dos grupos segue a das figuras 2.2 a 2.4. Grupos formados por um único indivíduo, dentro de outro grupo, foram desconsiderados; estes indivíduos aparecem dentro do grupo maior, no qual foram inseridos.



## Considerações Finais

- Das seis espécies de *Corbula* identificadas morfológicamente presentes nas amostras analisadas, quatro tiveram seu status confirmado: *C. caribaea*, *C. tryoni*, *C. lyoni* e *C. aequivalvis*. Pelas análises moleculares, os indivíduos de *C. patagonica* pertencem a duas espécies distintas e o indivíduo identificado como *Corbula* sp1 pertence a *C. caribaea*.
- Apesar de muitos protocolos existirem para se trabalhar com material de coleção, é necessário encontrar o mais adequado ao caso e, muitas vezes, testar modificações. Assim, ao se elaborar o cronograma de trabalho, é necessário dedicar um tempo maior a esta etapa. O conhecimento da literatura e o contato com outros profissionais são essenciais.
- Ao se trabalhar com material de coleção, especial atenção deve ser dada a procedimentos para se evitar contaminação.
- No presente estudo, os melhores resultados de extração foram obtidos com a combinação de extração orgânica com adsorção em sílica. Para as reações de amplificação, a técnica *nested* PCR mostrou-se superior à PCR direta. Trabalhar com *primers* específicos e fragmentos pequenos também é importante.
- A delimitação de espécies é uma área em expansão atualmente, em grande parte devido à popularização de técnicas moleculares, e muitos métodos vêm sendo propostos. Sendo assim, muitos deles ainda não foram amplamente testados e não se sabe exatamente suas limitações. Os resultados obtidos devem ser vistos com cuidado e, preferencialmente, corroborados com outras linhas de evidência.

- Dos métodos utilizados para a delimitação de espécies, a análise com os programas Brownie e ABGD pareceram as mais interessantes: a primeira por incorporar as diferenças entre os processos micro e macroevolutivos, e a segunda por lidar bem com a variabilidade dentro de cada linhagem.

- Estudos de delimitação de espécies devem trabalhar com hipóteses a serem corroboradas por diferentes linhas de evidência. Esta abordagem só é possível com a adoção do conceito geral de espécie, que separa o problema filosófico que é definir espécie do problema prático que é delimitar e identificar espécies.