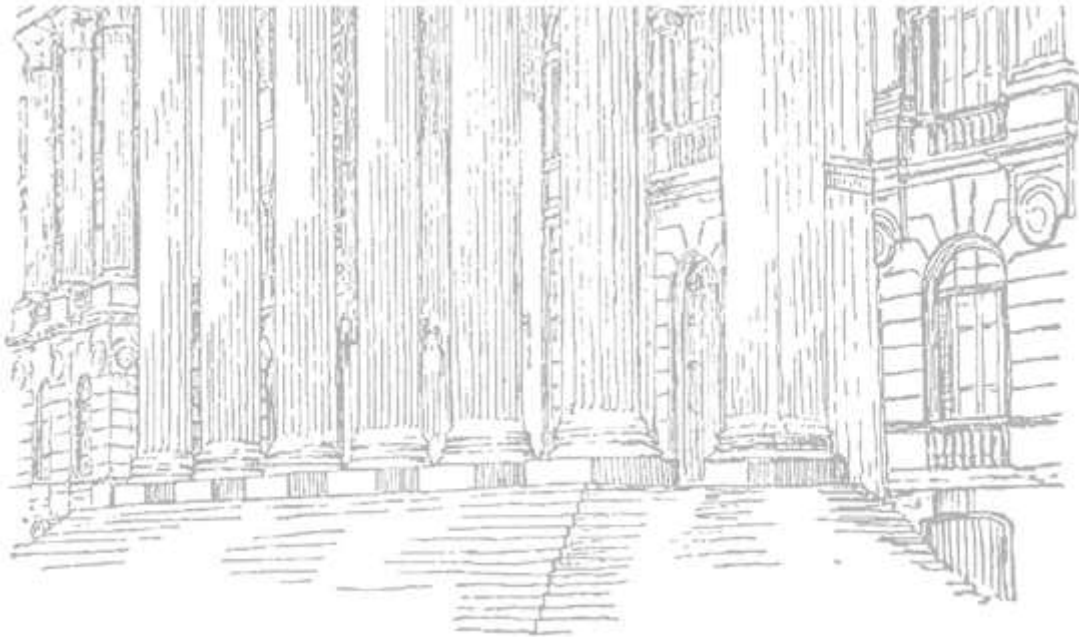


JOYCE ANA TEIXEIRA



**Diversidade genética de *Diplosoma listerianum* (Aplousobranchia, Didemnidae)
da costa brasileira: um possível complexo de espécies**



Curitiba, 2015

JOYCE ANA TEIXEIRA

**Diversidade genética de *Diplosoma listerianum* (Aplousobranchia, Didemnidae)
da costa brasileira: um possível complexo de espécies**

Monografia apresentada para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas pelo Departamento de Zoologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosana Moreira da Rocha (Dep. Zoologia - UFPR)

Co-orientadora: Msc. Livia de Moura Oliveira (Programa de Pós-Graduação em Zoologia - UFPR)

Curitiba, 2015

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos aos meus pais, Dimas e Soeli, por serem meu exemplo e meu porto-seguro, por todo o amor e compreensão, demonstrado das formas mais diversas possíveis.

À minha avó, Jaci, pelo exemplo de mulher guerreira que levo para a vida.

À Rosana M. Rocha pela oportunidade de estágio e orientação, por ter aberto para mim as portas do fantástico mundo das Ascídias, compartilhar comigo o seu conhecimento e por ser um exemplo de profissional.

À minha Livia de Moura Oliveira por compartilhar comigo sua experiência, pelo auxílio nas análises e também por ter me contagiado com a mais autêntica dedicação paraibana.

Aos colegas de laboratório, em especial à Nadia e ao Rodolfo, por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência com minhas dúvidas e brincadeiras e pela companhia na rotina do laboratório, acompanhada de boa música.

Aos amigos de graduação (Luciana, Karla, Lilian, Érica e Luiz), por estarem presentes em momentos bons e ruins, por terem sempre me incentivado quando estive desmotivada e também por todas as conversas filosóficas.

À Rosane Cavet Martins por ter transformado a Coordenação do Curso de Ciências Biológicas num lugar muito além de suas funções; por todo o carinho e dedicação.

Ao Professor Mário Antonio Navarro da Silva pelo empréstimo de equipamentos essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Thiago Carlisbino por todo o carinho, paciência e companheirismo desde o meu primeiro dia de graduação.

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho e para minha formação, meu muito obrigada.

*"The beauty of a living thing is not the atoms
that going into it, but the way those atoms are put together"*

Carl Sagan

Resumo

Ascídias são organismos marinhos bentônicos pertencentes ao filo Chordata, com aproximadamente 3000 espécies conhecidas. Por serem sésseis, sua dispersão está ligada à capacidade de natação da larva, que dura apenas algumas horas. São conhecidos vários casos desses organismos que se distribuem mundialmente e atualmente sabe-se que essas ocorrências globais estão ligadas também às atividades humanas, tais como as navegações, causando a introdução de espécies em locais onde não existiam originalmente. Frente a essas questões, se faz necessário o estudo destas espécies que habitam diversas regiões, através de ferramentas moleculares aliadas às técnicas morfológicas clássicas. Neste trabalho foram realizadas análises morfológicas e moleculares de espécimes brasileiros de *Diplosoma listerianum* pertencentes à Coleção de Ascidiacea do Departamento de Zoologia - UFPR. Foram analisados espécimes provenientes da costa brasileira através de observações em microscopia óptica e análises filogenéticas pelos métodos de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana utilizando um fragmento de DNA mitocondrial (COI). Foram encontrados três clados de espécimes brasileiros e uma amostra brasileira agrupada com haplótipos japoneses. Esses resultados mostraram uma diversidade genética não reconhecida anteriormente e poderão ajudar a esclarecer a origem e a estruturação genética das populações encontradas no Brasil, além de contribuir para o esclarecimento do relacionamento entre esses clados em escala global.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. A classe Ascidiacea	1
1.2. A família Didemnidae (Giard, 1872)	2
1.3. O gênero <i>Diplosoma</i> (McDonald, 1859)	2
1.4. <i>Diplosoma listerianum</i> (Milne-Edwards, 1841)	3
2. Material e Métodos	4
2.1. Análises Morfológicas	5
2.1.1. Confecção de Lâminas permanentes.....	6
2.2 ANÁLISES MOLECULARES	7
2.2.1. Extração de DNA.....	7
2.2.2. PCR (Reação em cadeia da Polimerase).....	8
2.2.3. Purificação.....	9
2.2.4. Sequenciamento.....	9
2.2.5. Análises filogenéticas	10
3. Resultados	10
3.1. Análises Morfológicas	10
3.2. Análises Moleculares	14
3.2.1. Sequências obtidas.....	14
3.2.2. Máxima Parcimônia.....	14
3.2.3. Máxima Verossimilhança	17
3.2.4. Inferência Bayesiana	18
4. Discussão.....	19
5. Conclusão	20
6. Referências Bibliográficas	21
Anexo 1	25

1. Introdução

1.1. A classe Ascidiacea

A classe Ascidiacea, pertencente ao subfilo Tunicata, é composta por organismos marinhos, bentônicos e incrustantes, solitários ou coloniais, que habitam diversas regiões e profundidades, desde o entre marés até grandes profundezas. Podem ser facilmente reconhecidos por sua morfologia externa que é composta pela túnica de tunicina, isômero da celulose, e seus dois sifões para circulação de água no corpo do animal. Existem pequenas variações desse padrão entre animais solitários e coloniais. O ciclo de vida é marcado pela presença de uma larva girinóide, livre-natante, portadora de notocorda em sua cauda que persiste por um curto período de tempo antes de fixar-se no substrato, onde ocorre a metamorfose (Monniot *et al.* 1991).

As ascídias alimentam-se a partir da captura de partículas em suspensão na água que passa pela faringe com fendas, e são direcionadas ao trato digestivo através do movimento de cílios. Uma das características importantes que separam esses animais em três ordens é a organização dessa faringe. A ordem Aplousobranchia possui a faringe mais simples, Phlebobranchia possui faringe vascularizada e com papilas para sustentação dos vasos e Stolidobranchia possui pregas na faringe, além da vascularização (Monniot *et al.* 1991). A posição das gônadas e do trato digestivo em relação à faringe também ocorre de forma diferente dentro das três ordens. Em Aplousobranchia o trato digestivo localiza-se posterior à faringe e as gônadas estão presentes dentro da alça intestinal ou ainda posterior ao trato digestivo, num pós abdome. Em Phlebobranchia o trato digestivo encontra-se no lado esquerdo da faringe na maioria das espécies e as gônadas estão presentes também nesse lado, associadas à alça intestinal. Em Stolidobranchia o trato digestivo encontra-se no lado esquerdo, mas as gônadas podem ocorrer nos dois lados do corpo, e estão associadas à parede do corpo (Kott, 2010).

A ordem Aplousobranchia é composta exclusivamente por animais coloniais e seu relacionamento com as outras ordens ainda é bastante discutido (Zeng & Swalla 2005). E em algumas análises filogenéticas (Turón & Lopéz-Legentil 2004) constata-se que, pela posição derivada do grupo, a organização colonial e a organização corporal dos zooides não são características plesiomórficas. Em todo o mundo são

registradas aproximadamente 3000 espécies de ascídias (Shenkar *et al.* 2015) e a ordem Aplousobranchia reúne cerca de um terço das espécies de toda a classe.

A possibilidade de colonizar diferentes ambientes, naturais ou artificiais, com diversas variações é um importante fator que favorece a bioinvasão, principalmente quando há ação antrópica envolvida na dispersão e subsídio de novos substratos a esses organismos, casos que vêm aumentando nos últimos anos, (Lambert 2001; Rocha *et al.* 2009), uma vez que a capacidade de dispersão desses animais é relativamente baixa.

1.2. A família Didemnidae (Giard, 1872)

Dentre as 12 famílias da ordem Aplousobranchia, Didemnidae é a mais diversa, com aproximadamente 600 espécies (Shenkar *et al.* 2015). Essa família é caracterizada pelos zooides pequenos divididos em tórax e abdome, faringe com três ou quatro fileiras de fendas, testículos esféricos, subdivididos ou não, com espermiduto reto ou em espiral. As colônias apresentam sistemas cloacais complexos e espículas na túnica que auxiliam na identificação morfológica das espécies, considerando que o tamanho diminuto dos zooides e sua simplificação podem acabar fornecendo pouca informação (Kott 2001).

1.3. O gênero *Diplosoma* (Mcdonald, 1859)

Esse gênero é caracterizado por zooides com tórax grande em relação ao abdome apresentando uma abertura atrial ampla, faringe com quatro fileiras de fendas, testículo composto por dois folículos e um espermiduto reto, além de cavidades cloacais muito amplas (Kott 2001). É o único gênero da família Didemnidae que não possui espículas calcárias na túnica, e essa é uma importante informação morfológica já utilizada em análises filogenéticas envolvendo toda a ordem Aplousobranchia (Moreno & Rocha 2008).

O gênero *Diplosoma* (Mcdonald, 1859) é composto por 43 espécies (Shenkar *et al.* 2015) das quais apenas três são registradas para a costa brasileira: *Diplosoma listerianum* (Milne-Edwards, 1841), *Diplosoma spongiforme* (Giard, 1872) (Rocha *et al.* 2012), e *Diplosoma citrinum* Rocha & Gamba, 2015 (Rocha *et al.* 2015).

1.4. *Diplosoma listerianum* (Milne-Edwards, 1841)

Essa espécie é caracterizada por colônias translúcidas, que permitem a visualização dos zoides, e que podem ser encontradas sobre substratos artificiais ou naturais e sobre outros organismos, como mexilhões e até mesmo outras ascídias. Os zoides possuem uma pequena variação em sua coloração devido à pigmentação presente no epitélio, principalmente na região abdominal e na região apical do tórax (Figura 1) que pode variar entre bege e marrom escuro (Kott 2001).

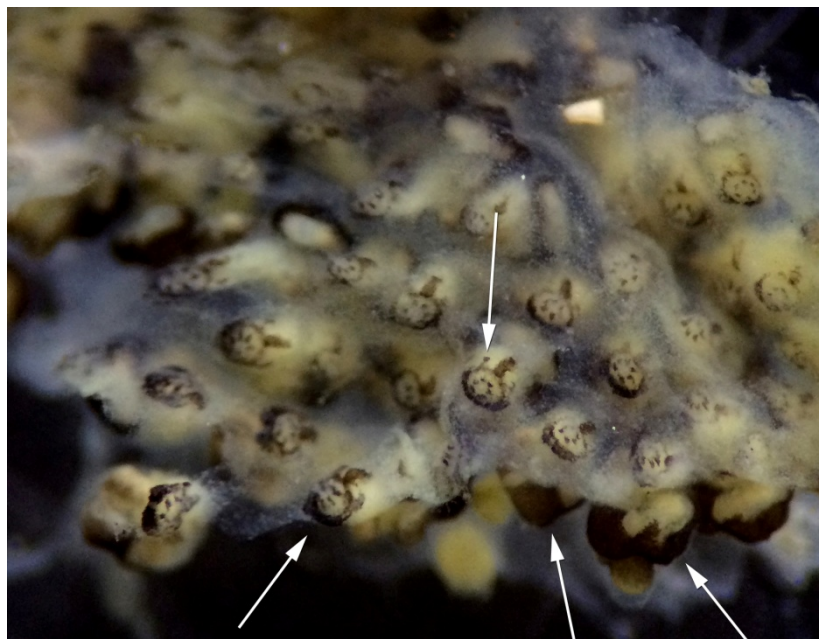


Figura 1: Pigmentação do epitélio na região torácica e abdominal dos zoides.

Diplosoma listerianum foi originalmente descrita para o nordeste do oceano Atlântico (Milne-Edwards, 1841) e atualmente é distribuída mundialmente (Lambert 2001; 2002). No Brasil, *D. listerianum* já foi registrada nos estados de Santa Catarina (Rocha *et al.* 2009), Paraná (Rocha & Faria 2005; Rocha & Kremer 2005), São Paulo (Rocha *et al.* 2011), Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Pernambuco e Rio Grande do Norte (Lotufo 2002).

Por conta dessa ampla ocorrência e de pequenas variações morfológicas relacionadas com a contração do zóide e na coloração das colônias, são registradas 34 sinonímias para essa espécie (Shenkar *et al.* 2015). Apesar de apresentarem pequenas variações, não é possível separar morfológicamente *D. listerianum* em mais de uma espécie. Dessa forma, os estudos moleculares são a

chave para entender se *D. listerianum* compõe apenas uma espécie ou um complexo de espécies crípticas, como já são conhecidas em outros gêneros de tunicados (Zhan *et al.* 2010, Tarjuelo *et al.* 2001).

Algumas características fisiológicas e ecológicas conferem a *Diplosoma listerianum* habilidades que facilitam a bionvasão, apesar de apresentar larvas com menor período de natação antes da fixação e metamorfose em relação a outras espécies (Lane 1973). Apresentam capacidade de reter e selecionar esperma exógeno no oviduto (Bishop & Riland, 1991; Bishop & Sommerfeldt, 1996), é bastante comum a fusão de colônias e possuem alta capacidade de reprodução assexuada por brotamento (Sommerfeldt *et al.* 2003). Essa espécie também já foi relatada como pioneira, com uma sobrevivência maior ao inverno do que outras ascídias, além das colônias atingirem maturidade sexual num curto período de tempo, em aproximadamente um mês (Rocha 1991).

Nos últimos anos, com a popularização das ferramentas moleculares vários estudos têm mostrado que as técnicas morfológicas, já amplamente utilizadas, aliadas com as moleculares são muito úteis para responder questões importantes, principalmente relacionadas às espécies com ampla distribuição global (Pérez-Portela *et al.* 2007, 2009; Stefaniak *et al.* 2009).

Para esclarecer a questão em relação à possível especiação críptica de *Diplosoma listerianum* foi realizado um estudo com amostras provenientes de diversas localidades ao redor do mundo (Pérez-Portela *et al.* 2013) que concluiu que *D. listerianum* é um complexo de espécies crípticas formado por quatro clados monofiléticos que divergem, geneticamente, em 20%. Porém, nesse estudo não foram incluídos espécimes provenientes da costa brasileira, o que justifica a realização do presente trabalho.

2. Material e Métodos

Os espécimes de *Diplosoma listerianum* estudados pertencem à Coleção Científica de Ascidiacea do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (DZUP/ UFPR). A coleção científica contém 69 exemplares acondicionados em formol (4%) para os estudos morfológicos e 40 amostras de tecido conservadas em etanol (96%) para estudos moleculares desta espécie.

2.1. Análises Morfológicas

Os espécimes da coleção científica acondicionados em formol foram separados por estado e posteriormente selecionadas amostras de coletas diversas, afim de representar diferentes localidades (Figura 2) (Anexo 1). Também foram observadas amostras de anos diferentes. As amostras analisadas compreendem espécimes de substratos naturais e artificiais.

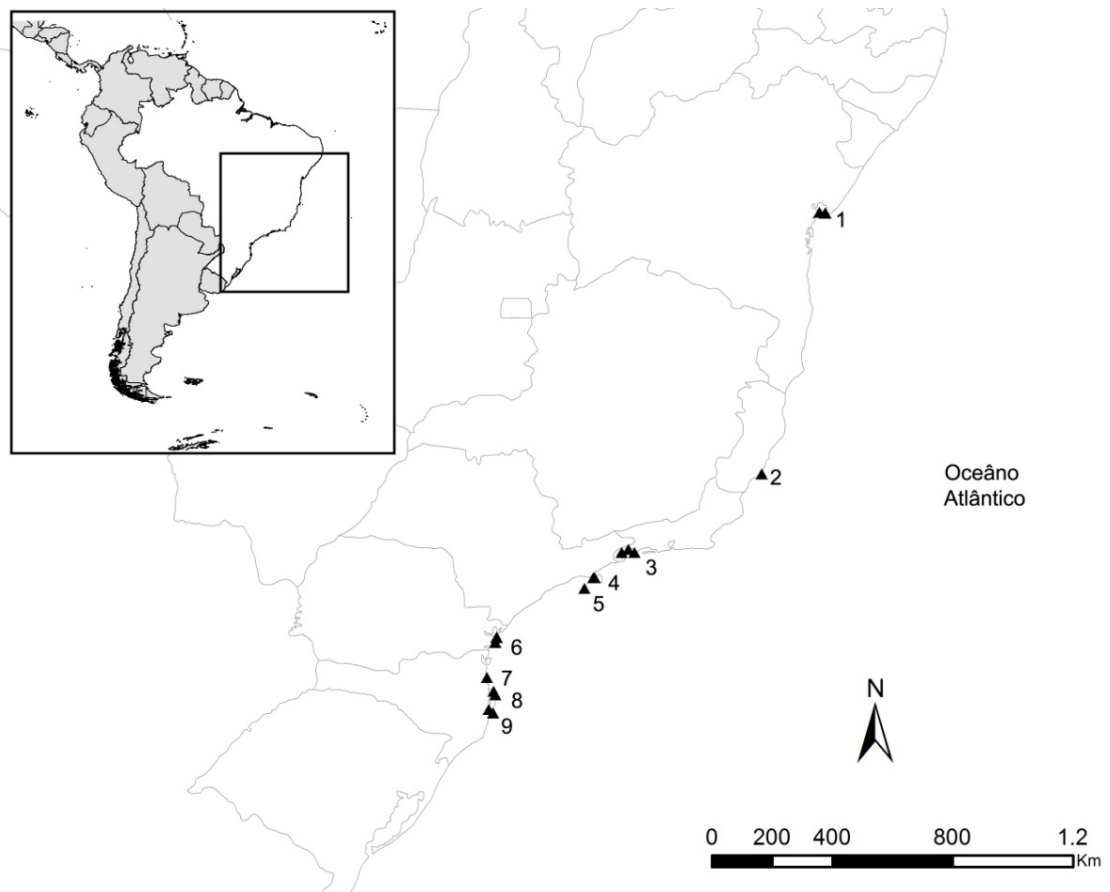


Figura 2: Localidades dos espécimes analisados morfológicamente neste estudo. Legenda: **Bahia:** 1- Baía de todos os Santos. **Espírito Santo:** 2- Ilha Escalvada. **Rio de Janeiro:** 3- Angra dos Reis, Arraial do Cabo, Cabo Frio e Parati. **São Paulo:** 4- São Sebastião. 5- Arquipélago de Alcatrazes. **Paraná:** 6- Ilha do Mel, Ilha de Currais e Ilha da Galheta. **Santa Catarina:** 7- Penha. 8- Arquipélago Arvoredo. 9- Florianópolis.

Após a seleção os exemplares foram analisados sob microscópio estereoscópio (Leica® MZ12₅) utilizando iluminador (Leica® CLS150X), com o auxílio de pinças, estiletos e lâminas para corte.

Utilizando o procedimento padrão para ascídias coloniais (Monniot & Monniot, 1972) as colônias foram seccionadas com o auxílio de lâmina de aço inox para

facilitar a retirada dos zooides e larvas, além de permitir a visualização da cavidade cloacal. Foram separados zooides e larvas, quando presentes, de cada exemplar para a confecção de lâminas permanentes.

Foram observadas características importantes na colônia, nos zooides e nas larvas, quando presentes. Para a colônia foi observada a cor e a consistência, tamanho, forma e espessura, organização de sistemas e amplitude da cavidade cloacal. Nos zooides foram tomadas medidas de referência como comprimento total, do tórax, do sifão oral e do abdome, número de fendas por fileira, nível de relaxamento do zooide e aparência das gônadas. Nas larvas foram observadas a quantidade e forma de ampolas e papilas adesivas, número de blastozooides e o comprimento do tronco.

2.1.1. Confecção de Lâminas permanentes

Os zooides e larvas selecionados foram corados utilizando Hematoxilina de Harris e passaram por uma série de desidratação. O material permaneceu imerso em placas de vidro côncavas por aproximadamente um minuto em etanol 70, 80 e 90% e posteriormente mais um minuto em álcool Butil.

Após esse processo os zooides e larvas foram depositados em lâmina de vidro para microscopia (25,4 x 76,2 x 1,2 mm) contendo resina epóxi Durcupan®, cobertos com lamínula de vidro (18 x 18 x 0,15 mm) e levados ao aquecedor de lâminas de 7 à 15 dias para completar a secagem da resina.

Depois de completamente secas, as lâminas foram observadas sob microscópio ótico Zeiss *Standart20*® e através de Microscópio de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC) Zeiss *AxioScope A1*®, fotografadas, e os zooides e larvas medidos com auxílio do *software Axio Vision*.

2.2 ANÁLISES MOLECULARES

2.2.1. Extração de DNA

Foram selecionadas 21 amostras de colônias conservadas em etanol para as análises moleculares (Figura 3) (Tabela 01). Das amostras selecionadas foram retirados aproximadamente 30 tórax para extração de DNA, de acordo com o procedimento descrito por Stefaniak *et al.* (2009), visando evitar a contaminação por DNA exógeno.

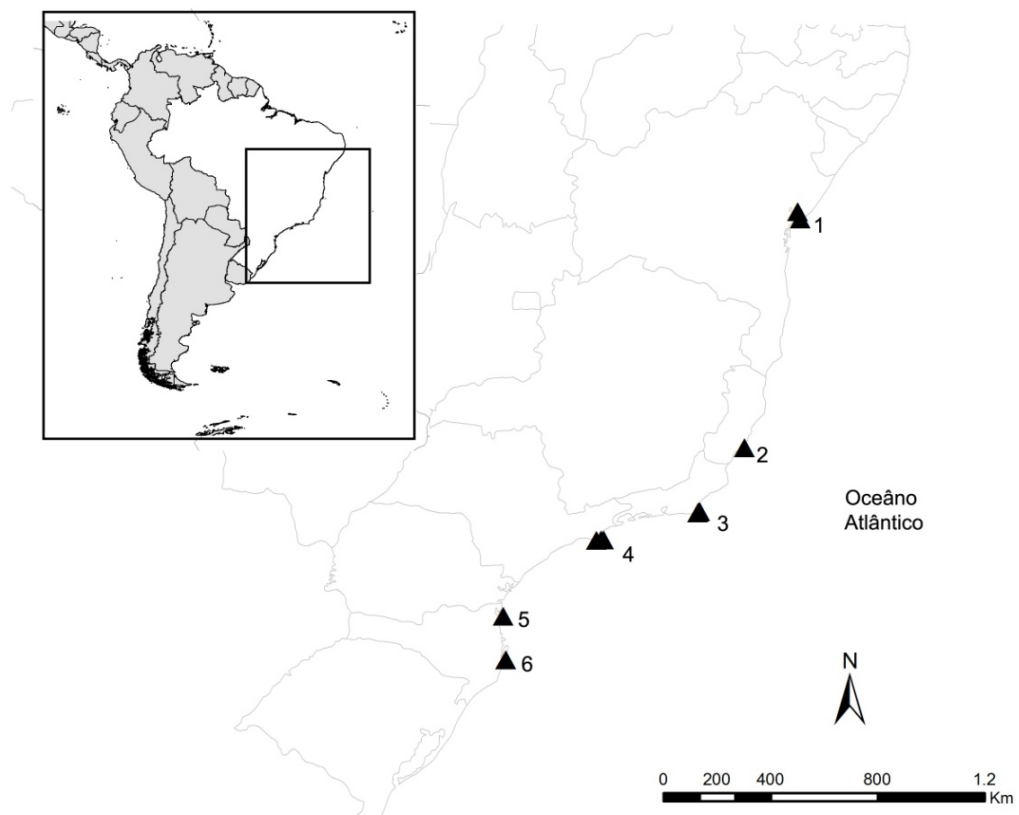


Figura 3: Localidades dos espécimes utilizados nas análises moleculares neste estudo.

Legenda: **Bahia:** 1- Baía de todos os Santos. **Espírito Santo:** 2- Guarapari. **Rio de Janeiro:** 3- Cabo Frio. **São Paulo:** 4- São Sebastião **Santa Catarina:** 5- Tamboretes e 6- Moleques do Sul

Tabela 01: Amostras de DNA utilizadas nesse trabalho

Código da Amostra	Ano de Coleta	Estado	Localidade
184, 214 E 342	2004	Bahia	Baía de Todos os Santos
GUA01, GUA 02 e GUA04	2011	Espírito Santo	Guarapari
CF107, CF125, CF126, CF131 e CF143	2014	Rio de Janeiro	Cabo Frio
AL39, SS04, SS16, SS20 e SS46	2008	São Paulo	São Sebastião
ML121, ML152, ML154, ML156, ML158, e TB65	2008	Santa Catarina	Moleques do Sul e Tamboretas

Após a obtenção dos zooides, a extração de DNA foi realizada utilizando Kit de extração *Pure Link*® para DNA total da marca Invitrogen. Após a obtenção de DNA, seguindo as instruções do fabricante, foi confirmada a presença do mesmo nas amostras utilizando espectrofotômetro *Nano Drop 2000* (Thermo Scientific), através do formato de curva característica ao DNA e a razão 260/280.

2.2.2. PCR (Reação em cadeia da Polimerase)

Para obtenção dos fragmentos de DNA mitocondrial de interesse foi realizada a Reação em cadeia da Polimerase seguindo protocolo de Pérez-Portela *et al.* 2013. Os primers utilizados foram *Tun Forward* e *Tun Reverse* (Tabela 02) para obtenção de fragmentos de DNA, com aproximadamente 530 pares de bases, da subunidade I da Citocromo Oxidase.

Tabela 02: Primers utilizados para amplificação do fragmento de interesse.

Tun_F	5'TCGACTAATCATAAAGATATTAG3
Tun_R	3'AACTTGTATTTAAATTACGATC5'

Para verificar se os fragmentos desejados foram amplificados foi realizada eletroforese em gel de agarose. A verificação da amplificação das bandas desejadas se deu pela compatibilidade das amostras com a banda do marcador molecular (Ladder), de aproximadamente 530pb, e a ausência de banda no controle negativo.

2.2.3. Purificação

Com a finalidade de remover outras moléculas (*e.g.* proteínas) que pudessem estar presentes nos tubos da reação de PCR além do DNA, procedeu-se a purificação com o polímero Polietilenoglicol (PEG8000).

Após a verificação do produto de PCR em gel de agarose, adicionou-se 25 µl de PEG (PEG 8000 20%, NaCl 2,5M) no produto de PCR, e foi homogeneizado com a micropipeta. O conteúdo foi transferido para um microtubo de 0,6ml e incubado à 37°C por 30 minutos. Foi centrifugado por 20 minutos à 13.000rpm e o sobrenadante descartado com o auxílio de micropipeta. Foi adicionado ao tubo 125 µl de Etanol 80% gelado, aguardou-se um minuto e prosseguiu-se com a centrifugação por 5 minutos à 13.000rpm, com a finalidade de remover o polímero. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado mais 125µl de Etanol 80% gelado e repetiu se a centrifugação e o descarte do sobrenadante. Os tubos foram deixados na estufa até secagem do Etanol residual. Posteriormente, o pellet de DNA foi ressuscitado em 15µl de ddH₂O, homogeneizado com a micropipeta diversas vezes e permaneceu em temperatura ambiente por, pelo menos, 2 horas.

2.2.4. Sequenciamento

O Sequenciamento das amostras de DNA obtidas foi realizado pelo laboratório de Análise Genética e Molecular do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) através do método de Sanger, utilizando sequenciador *ABI 3500xL (Life Technologies)* a sequência de

nucleotídeos é reconhecida através de uma câmera acoplada ao aparelho, que gera um cromatograma de acordo com a sequência de cores emitidas.

Após o sequenciamento, o cromatograma gerado foi analisado através da comparação das sequências *forward* e *reverse* de cada amostra no *software* BioEdit (Hall, 1999) para geração de uma sequência consenso para cada amostra de DNA. O alinhamento de todas as sequências obtidas foi realizado no *software* MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), utilizando o ClustalW.

2.2.5. Análises filogenéticas

As análises filogenéticas utilizando as sequências de DNA obtidas nesse trabalho e também as sequências obtidas por Pérez-Portela *et al.*, 2013 disponibilizadas no GenBank foram analisadas em conjunto pelos métodos de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana nos softwares MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013), RAxML HPC2 em XSEDE (8.0.24) (Stamatakis, 2014) e Mr. Bayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), respectivamente, visando esclarecer as relações filogenéticas dos exemplares.

A interpretação dos resultados obtidos levou em consideração os valores de suporte de *Bootstrap* (Máxima Parcimônia e Máxima verossimilhança) maiores que 50 e de probabilidade posterior (Inferência Bayesiana) maiores que 0.5 obtidos nas análises.

3. Resultados

3.1. Análises Morfológicas

Os espécimes analisados de *Diplosoma listerianum* possuem colônias de túnica translúcida e gelatinosa que permite a visualização dos zooides, a pigmentação variável dos zooides confere às colônias pequenas diferenças de coloração (Figura 4). Os zooides estão organizados em sistemas aproximadamente circulares compostos por 10 à 12 zooides, há um vaso estolônico para cada zooide. Cavidade cloacal ampla que compreende o tórax e o abdome dos zooides.

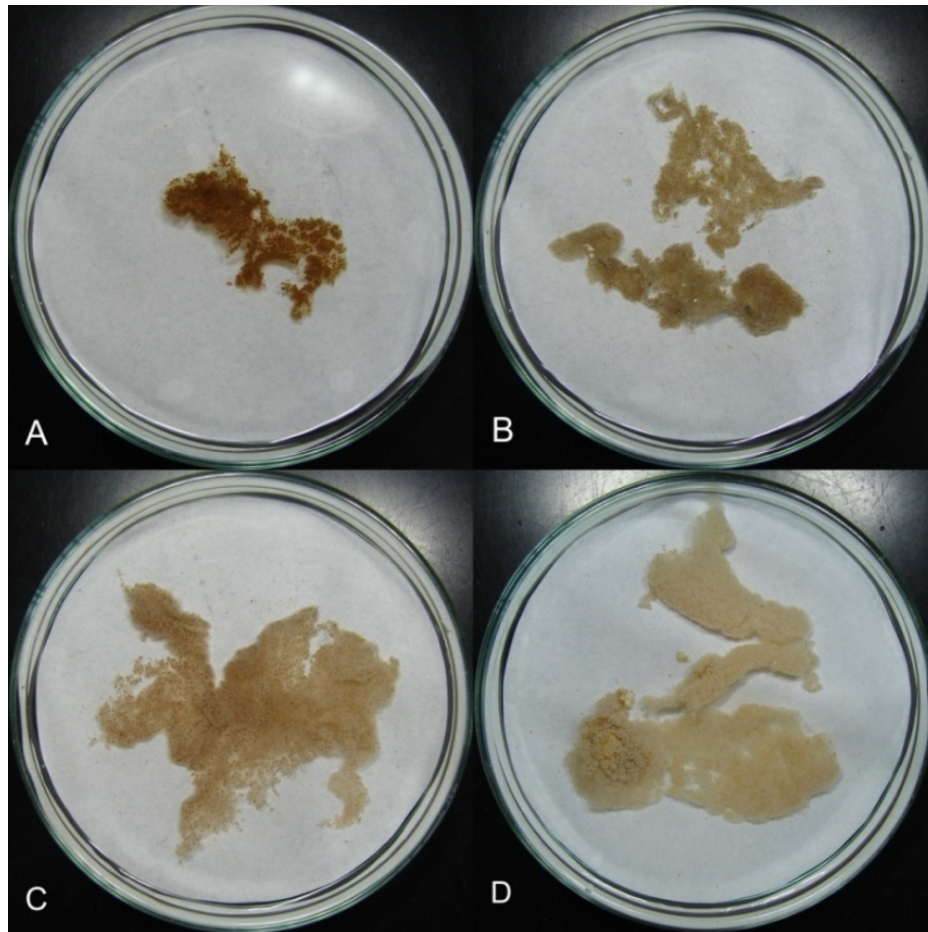


Figura 4: Diferentes colorações das colônias ocasionadas pelos diferentes graus de pigmentação dos zooides. Legenda: A: DID-01. B: DIPL-058. C: DID-142. D: DIPL-059.

Os zooides apresentam tamanhos variáveis dependendo do grau de anestesia do animal quando fixado, cuja média é 1 mm de comprimento, chegando a 1,5 mm, quando bem relaxados. O tórax mede duas vezes o comprimento do abdome, quando não está contraído. O sifão oral mede em média 0,10 mm, contendo 6 lobos triangulares bem distintos entre si. A fenda é atrial ampla e expõe a segunda e a terceira fileiras de fendas. Quatro fileiras de fendas com 9, 9, 8 e 7 fendas por fileira na maioria dos zooides, alguns zooides apresentam uma fenda a menos em cada fileira.

O pedúnculo esofágico-retal é curvo e estreito, medindo menos da metade do comprimento do abdome. Na maioria das colônias foi possível observar brotamento por reprodução assexuada ocorrendo nessa região. O processo muscular é longo em relação ao abdome e se insere na altura do início do pedúnculo esofágico-retal, logo abaixo do endóstilo.

O esôfago é mais longo que o estômago. O estômago é globular, de paredes lisas, seguindo por duodeno mais curto que o mesmo e terminando em uma

forte constrição, seguida por outra no intestino. O ânus é liso com abertura na altura da quarta fileira de fendas. As gônadas estão localizadas na alça intestinal, sob a porção horizontal do intestino. O testículo apresenta dois folículos e espermiduto reto (Figura 4).

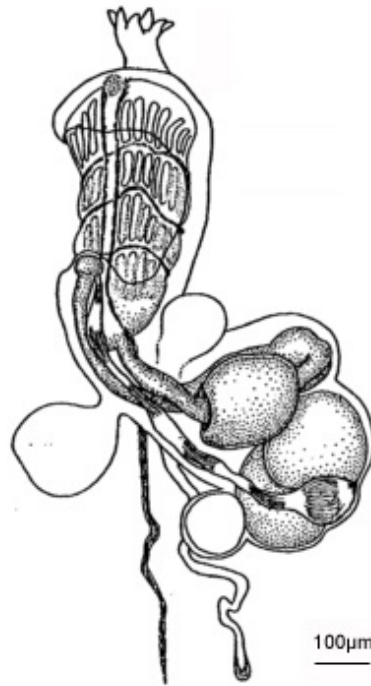


Figura 4: Zooide de *D. Listerianum*, segundo Kott (2001).

As larvas são gemíparas, encubadas na base da colônia medindo em média 0,5 mm de tronco e 1,5 mm de comprimento total, medido da extremidade da papila adesiva central até a ponta da cauda. Há três papilas adesivas relativamente distantes entre si com pedúnculos finos e longos, que apresentam uma leve dobra, dois pares de ampolas curtas e delgadas. A cauda descreve metade da circunferência da larva, pelo lado esquerdo das papilas. A vesícula sensorial, contendo o ocelo e o otólito, está localizada na região medial da larva. (Figura 5).



Figura 5: Larva de *Diplosoma listerianum* (DIPL-061).

Uma característica que difere entre os espécimes é a coloração das colônias em vida e das colônias fixadas em formol (Figura 6), bem como a consistência da túnica em algumas colônias.



Figura 6: Diferença na coloração das colônias vivas. A- Colônia de Moleques do Sul (SC) de coloração azulada. B, C e D- Colônias de Cabo Frio (RJ) de coloração esbranquiçada em alguns pontos da superfície (B: DIPL-52 e C: DIPL-51) e coloração amarelada (D: DIPL-50).

3.2. Análises Moleculares

3.2.1. Sequências obtidas

Foram obtidas 15 sequências de DNA a partir das 22 amostras selecionadas previamente. Os três exemplares provenientes do Estado da Bahia e uma amostra do Espírito Santo (GUA04) não tiveram o DNA amplificado na reação de PCR, dado constatado através da ausência das bandas em gel de agarose que correspondessem ao fragmento desejado. Duas amostras provenientes de Santa Catarina não sequenciaram (ML154 e ML156). Uma amostra de São Paulo (SS46) foi retirada das análises porque constatou-se, através dos alinhamentos, que era uma sequência muito diferente das demais, o que foi confirmado através da ferramenta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) do *GenBank*.

As sequências obtidas possuem 543pb, 347 sítios conservados, 186 variáveis dos quais 126 são sítios informativos baseados no critério de parcimônia. Essas sequências constituem 13 novos haplótipos para *Diplosoma listerianum*.

3.2.2. Máxima Parcimônia

Foi obtida uma árvore para as amostras brasileiras, com índice de retenção: 0.89 e índice de consistência: 0,75. Os clados foram formados por amostras da mesma região, com exceção de um agrupamento das amostras de São Paulo (SS) e do Espírito Santo (GUA). Todos os clados apresentam alto suporte de *Bootstrap*, porém com um baixo valor de suporte para o relacionamento entre os mesmos. Uma amostra de São Paulo (AL39) não foi agrupada com as demais. Ramos com valor de suporte menor que 50 foram colapsados (Figura 7).

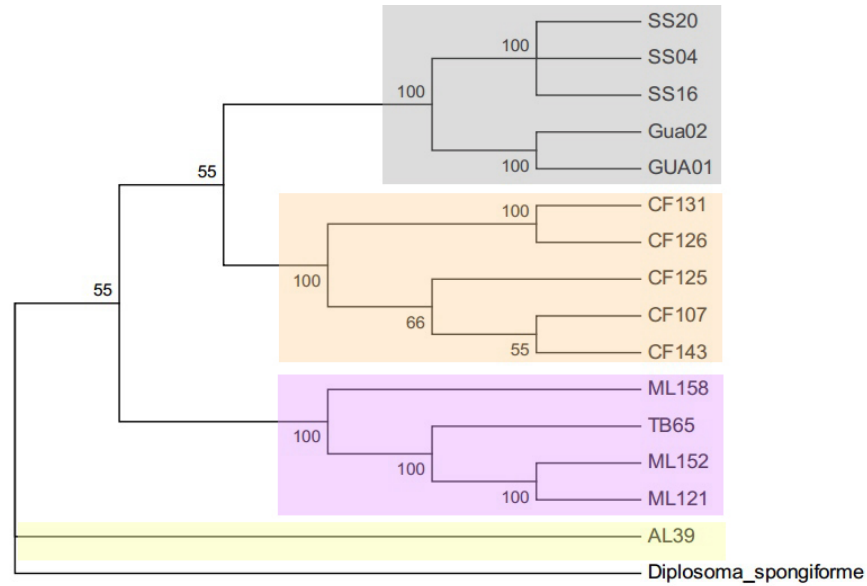


Figura 7: Árvore mais curta (372 passos) obtida por Análise de Máxima Parcimônia com valores de *Bootstrap* para as amostras brasileiras (Índice de Retenção 0,89 e Índice de consistência : 0,75). Ver tabela 1 para legenda dos táxons terminais.

A árvore geral, considerando as sequências obtidas neste trabalho e as de Pérez-Portela *et al.* (2013), foi obtida através do consenso de 9 árvores mais parcimoniosas obtidas nas análises com Índice de consistência de 0,47 e índice de retenção de 0,84. As amostras brasileiras foram agrupadas por região (Clados E, F e G) e a amostra AL39 foi incorporada no clado B, mas com baixo valor de suporte (Figura 8).

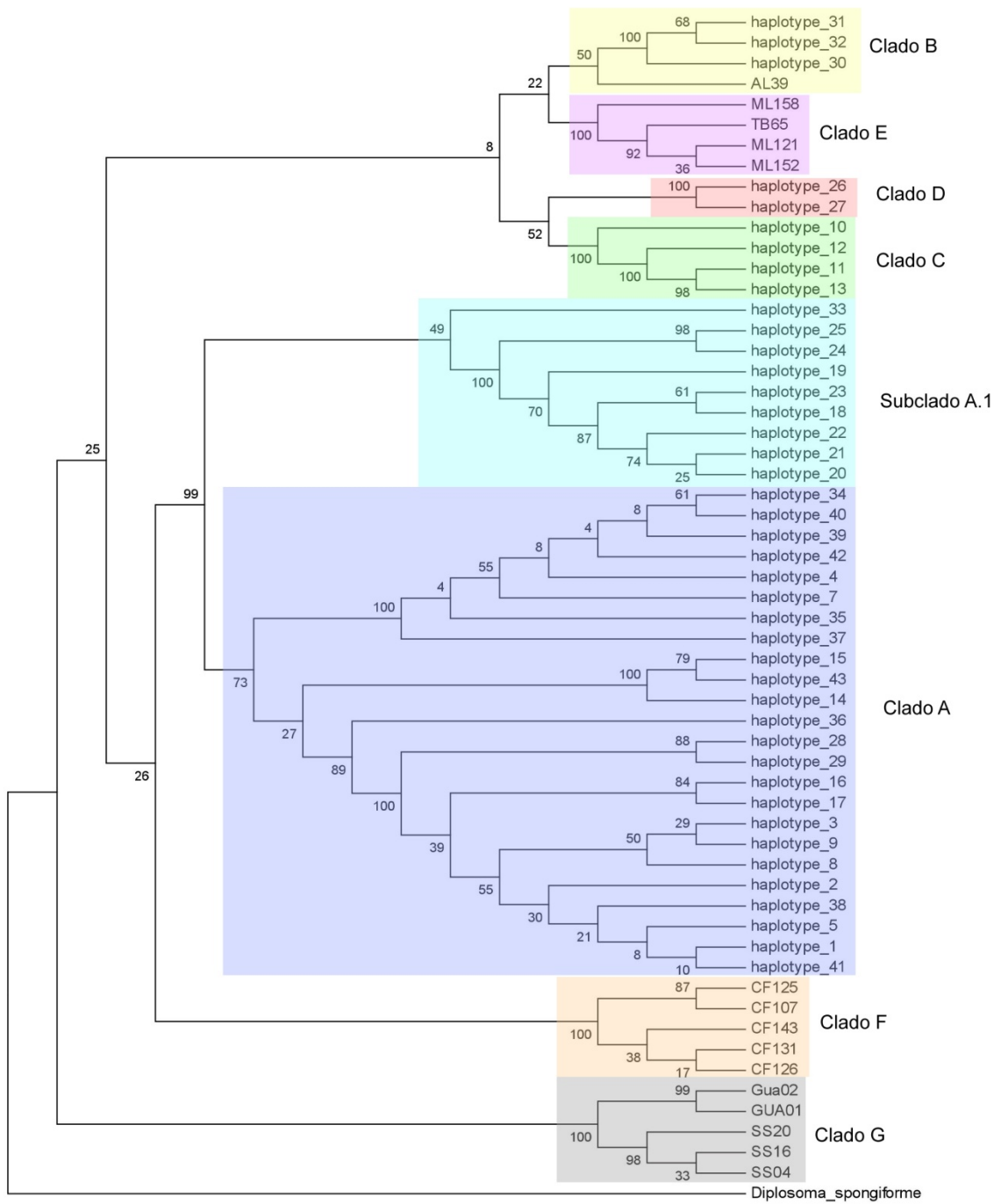


Figura 8: Árvore consenso obtida através do Método de Máxima Parcimônia com valores de *Bootstrap*. Legenda: hp= Haplotype (obtidos de Pérez-Portela *et al.* (2013)).

3.2.3. Máxima Verossimilhança

A árvore obtida por meio dessa análise apresenta topologia semelhante à árvore gerada através do método de Parcimônia, com valores de suporte alto para os clados exclusivamente brasileiros e 77 para o Clado B (Figura 9).

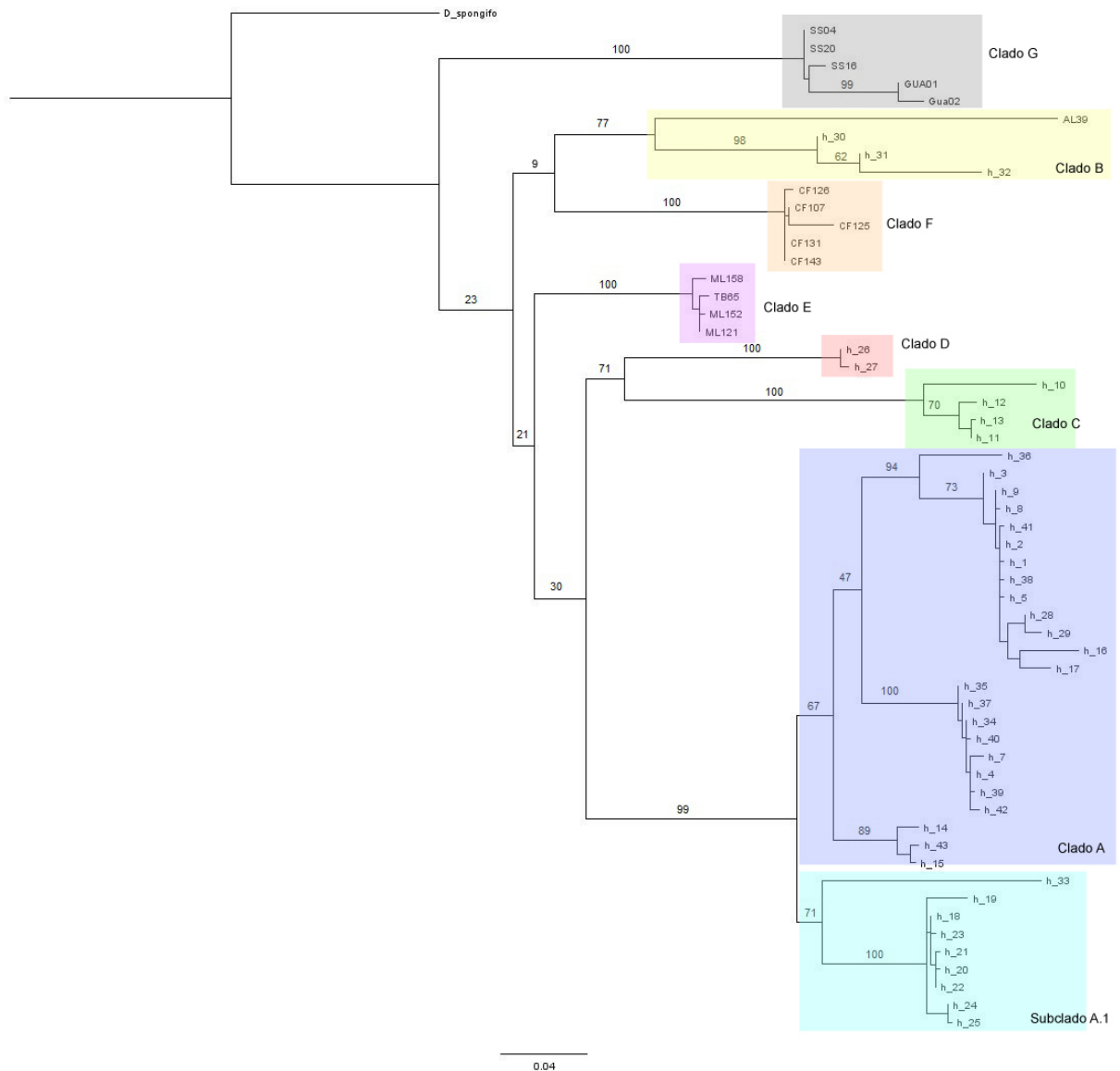


Figura 9: Árvore obtida através do Método de Máxima Verossimilhança com valores de *Bootstrap*.
 Legenda: hp= Haplotype (obtidos de Pérez-Portela *et al.* (2013)).

3.2.4. Inferência Bayesiana

Os resultados da análise de Inferência Bayesiana apresentam um alto valor de probabilidade posterior para os clados ($> 0,95$), porém ainda não há um bom valor de suporte para o relacionamento entre esses clados. Também há um valor alto para a base da árvore (Figura 10).

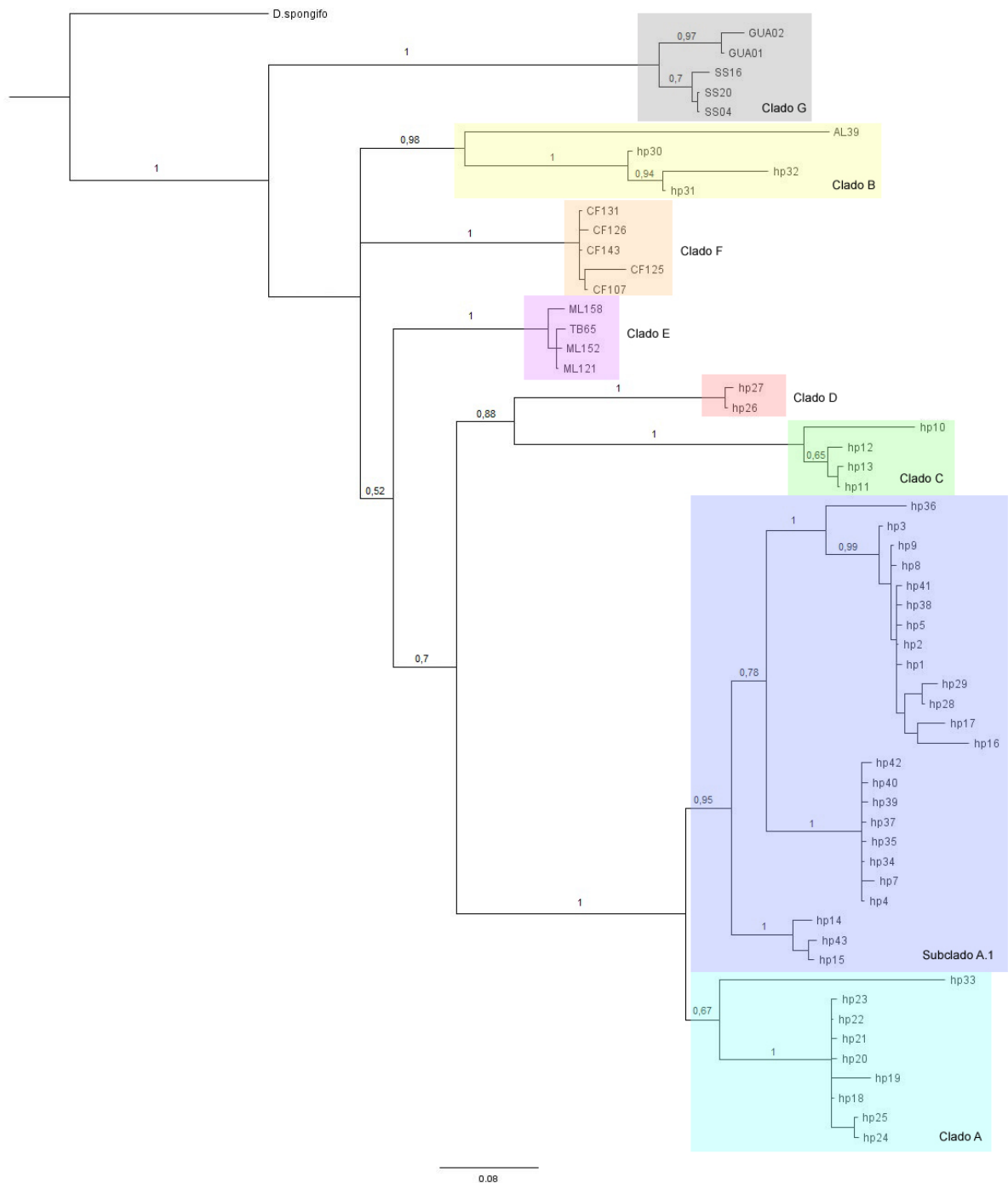


Figura 10: Árvore gerada através da Inferência Bayesiana, com valores de suporte de Probabilidade posterior. Legenda: hp= Haplotype (obtidos de Pérez-Portela *et al.* (2013)).

4. Discussão

As colônias analisadas não possuem padrões contrastantes em diferenças morfológicas do zooide e das larvas, como também observado por Pérez-Portela *et al.* (2013) para as diversas colônias analisadas ao redor do planeta. Nas colônias brasileiras a diferença estabelecida foi a coloração das colônias e a pigmentação do epitélio do zooide, variações já observadas por Kott (2001). A característica mais evidente diferenciando um clado foi a coloração azul das colônias de Moleques do Sul e Tamboretas (Santa Catarina), mas essa coloração é perdida na fixação das colônias em formol e a morfologia dos zooides não mostrou diferenças suficientes para separação dos clados, pois não há grande diferença na medida de estruturas, ao contrário do que foi observado em outros complexos de espécies de ascídias (Pennati *et al.* 2015).

O trabalho de Pérez-Portela *et al.* 2013 revelou 43 haplótipos de *Diplosoma listerianum* ao redor do mundo enquanto este estudo revelou a existência de mais 13 haplótipos, caracterizando três novos clados para a espécie. Em outras espécies de ascídias são conhecidos números diversos de haplótipos utilizando o mesmo marcador utilizado neste trabalho. Para outra espécie da família Didemnidae, *Didemnum vexillum* Kott, 2002, são conhecidos 10 haplótipos provenientes de sequências obtidas de várias regiões do mundo (Stefaniak *et al.* 2009). Em uma outra espécie da Ordem Aplousobranchia, *Pseudodistoma crucigaster* Gaill, 1972 são conhecidos 11 haplótipos definidos a partir de 57 sequências obtidas apenas do oeste do Mar Mediterrâneo (Tarjuelo *et al.* 2004). *Ciona intestinalis* (Linnaeus, 1767), pertencente a ordem Phlebobranchia tem 46 haplótipos conhecidos provenientes de amostras dos Estados Unidos e Canadá (Zhan *et al.* 2012). Para algumas espécies da Ordem Stolidobranchia são conhecidos números maiores de haplótipos: 60 para *Botryllus schlosseri* (Pallas, 1776) para a costa leste dos Estados Unidos e Europa (Bock *et al.* 2012), 52 para sequências de *Microcosmus squamiger* (Michaelsen, 1927) de diversas regiões do mundo (Rius *et al.* 2008) e 171 para *Pyura chilensis* Molina 1782 obtidos de oito populações da costa chilena (Haye & Muñoz-Herrera 2013). Dessa forma, é possível que hajam mais haplótipos de *D. listerianum* ainda não conhecidos.

A inclusão das sequências brasileiras nas análises alterou a relação entre os clados obtidos por Pérez-Portela *et al.* (2013), distanciando o Clado A e o Clado B, porém os valores de suporte para o relacionamento entre os clados permaneceu

baixo nos três métodos para obtenção de árvores utilizados. Os valores baixos já haviam sido obtidos no trabalho de Pérez-Portela *et al.* (2013), no qual os valores de suporte de Bootstrap nas análises de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança para o relacionamento entre clados foram menores que 50, mas não foram apresentados na árvore final e desta forma não puderam ser comparados com os obtidos nesse trabalho.

Pérez-Portela *et al.* (2013) aponta a região da Inglaterra como mais provável origem para o Clado A e nenhuma das amostras brasileiras analisadas até o momento correspondem à este clado. Os clados foram formados por sequências geograficamente próximas, excetuando-se o relacionamento entre uma amostra brasileira (AL39) e os haplótipos japoneses (Clado B) obtidos por Pérez-Portela *et al.* (2013), o que pode indicar uma introdução mediada por meios humanos, como embarcações (Lambert, 2001).

O clado G (São Paulo + Espírito Santo) também reuniu amostras geograficamente isoladas, já que os haplótipos destas regiões não foram encontrados em Cabo Frio, localidade geograficamente intermediária. Essa descontinuidade é também uma característica de introdução (Lawson Handley *et al.* 2011), indicando que o clado foi introduzido independentemente nas duas regiões. No entanto, essa interpretação deve ser avaliada com cautela por causa do pequeno número de amostras estudadas em cada localidade.

5. Conclusão

Mesmo não havendo diferenças morfológicas significativas entre os espécimes dessa espécie, as análises moleculares revelam uma grande variação genética entre eles. Foram utilizados espécimes provenientes de quatro estados brasileiros (Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina), mas o número de indivíduos estudados em cada estado foi pequeno. Para resultados mais abrangentes seria necessário um maior número de amostras das localidades já estudadas e amostras provenientes de outros estados brasileiros onde essa espécie ocorre (Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas e Paraná), além de mais amostras provenientes da Bahia.

O uso de apenas uma região de DNA mitocondrial explicou pouco o relacionamento entre esses clados (baixos valores de suporte), por isso o uso de mais de um marcador e da junção de um marcador nuclear e um mitocondrial poderia ser mais explicativo.

Este trabalho ressalta a importância de serem utilizados métodos moleculares para esclarecer questões que os métodos morfológicos sozinhos não são capazes de explicar, pois a análise morfológica poderia indicar baixa diversidade e sugerir uma homogeneização entre as populações encontradas na costa brasileira.

6. Referências Bibliográficas

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *Journal of Molecular Biology* 215:403-410
- Bishop, J.D.D. & Ryland, J. S. (1991) Storage of exogenous sperm by the compound ascidian *Diplosoma listerianum*, *Marine Biology* 108, 111-118.
- Bishop, J.D.D. & Sommerfeldt, a. D. (1996) Autoradiographic investigation of uptake and storage of exogenous sperm by the ovary of the compound ascidian *Diplosoma listerianum*. *Marine Biology* 125, 663–670.
- Bock, D.G., Masclsaac, H.J. & Cristescu, M.E. (2012) Multilocus genetic analyses differentiate between widespread and spatially restricted cryptic species in a model ascidian. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 2377-2385.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. Ser. 41:95-98.
- Haye, P. A., & Muñoz-Herrera, N. C. (2013). Isolation with differentiation followed by expansion with admixture in the tunicate *Pyura chilensis*. *BMC evolutionary biology*, 13(1), 252.
- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Kott, P. (2001) *The Australian Ascidiacea. Part 4. Aplousobranchia (3), Didemnidae. Memoirs of the Queensland Museum*, 410pp.

- Kott, P., Bradford-grieve, J., Esnal, G. & Murdoch, R. (2010). Phylum Tunicata: sea squirts, salps, appendicularians. *In: Gordon, D. P. (Ed) New Zealand Inventory of Biodiversity*. Canterbury University Press. 586 pp. 411-432.
- Lambert, G. (2001) A global overview of ascidians introductions on their possible impact of the endemic fauna. *In: Sawada, H, Yokosawa, H, Lambert, C C (Eds), The Biology of Ascidians*. Springer Verlag, Tokyo 470pp. 249-257.
- Lambert, G. (2002) Nonindigenous ascidians in tropical waters. *Pacific Science* 56, 291–298.
- Lambert, G. (2007) Invasive sea squirts: A growing global problem. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342, 3–4.
- Lane, D.J.W. (1973) Attachment of the larva of the ascidian *Diplosoma listerianum*. *Marine Biology* 21, 47–58.
- Lawson Handley, L.J., Estoup, A., Evans, D.M., Thomas, C.E., Lombaert, E., Facon, B., Aebi, A., & Roy, H.E. (2011) Ecological genetics of invasive alien species. *Biocontrol* 56, 409-428.
- Lotufo, T.M.C. (2002) Ascidiacea (Chordata: Tunicata) do litoral tropical brasileiro. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 183pp..
- Milne-Edwards, H. (1841) *Observations sur les Ascidies composées des cotes de La Manche*. Chez Fortin-Masson et Cie, Paris, 110 pp.
- Monniot, C. & Monniot, F. (1972) Clé mondiale des genres d'Ascidies. *Archives de zoologie expérimentale & générale* 113, 311–367.
- Monniot, C. Monniot, F. & Laboute, P. (1991) Coral Reef Ascidians of New Caledonia. *Orstom, Paris*, 248 pp.
- Moreno, T.R. & Rocha, R.M. (2008) Phylogeny of the Aplousobranchia (Tunicata: Ascidiacea). *Revista Brasileira de Zoologia* 25, 269-298.
- Pennati, R., Ficetola G, F., Brunetti, R., Cicci, F., Gasparini, F., Griggio, F., Sato, A., Stach, T., Kaul-Strehlow, S., Gissi, C. & Manni, L. (2015) Morphological Differences between Larvae of the *Ciona intestinalis* Species Complex: Hints for a Valid Taxonomic Definition of Distinct Species. *Plos One* 10, e0122879.
- Pérez-Portela, R., Arranz, V., Rius, M. & Turon, M. (2013) Cryptic speciation or global spread? The case of a cosmopolitan marine invertebrate with limited dispersal capabilities. *Scientific Reports* 3, 3197.
- Pérez-Portela, R., Bishop, J.D.D., Davis, A. R. & Turon, X. (2009) Phylogeny of the families Pyuridae and Styelidae (Stolidobranchiata, Ascidiacea) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50, 560–570.

- Pérez-Portela, R., Duran, S., Palacín, C. & Turon, X. (2007) The genus *Pycnoclavella* (Ascidiacea) in the Atlanto-Mediterranean region: A combined molecular and morphological approach. *Invertebrate Systematics* 21, 187–205.
- Rius, M., Pascual, M., & Turon, X. (2008). Phylogeography of the widespread marine invader *Microcosmus squamiger* (Ascidiacea) reveals high genetic diversity of introduced populations and non-independent colonizations. *Diversity and Distributions*, 14(5), 818-828.
- Rocha, R.M. (1991) Replacement of the compound ascidian species in a southeastern Brazilian fouling community. *Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo* 39, 141–153.
- Rocha, R.M. & Faria, S.B. (2005) Ascidiaceans at Currais islands, Paraná, Brazil: taxonomy and distribution. *Biota Neotropica* 5, 1–20.
- Rocha, R.M. & Kremer, L.P. (2005) Introduced ascidiaceans in Paranaguá Bay, Paraná, southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22, 1170–1184.
- Rocha, R.M., Dias, G.M. & Lotufo, T.M.C. (2011) Checklist das ascídias (Tunicata, Ascidiacea) do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* 11, 749–759.
- Rocha, R.M., Kremer, L.P., Baptista, M.S. & Metri, R. (2009) Bivalve cultures provide habitat for exotic tunicates in Southern Brazil. *Aquatic Invasions* 4, 195–205.
- Rocha, R.M., Neves, I.M. & Gamba, G.A. (2015) New species of Didemnidae (Tunicata: Ascidiacea) from the tropical coast of Brazil. *Zootaxa* 3905, 381–396.
- Rocha, R.M., Zanata, T.B. & Moreno, T.R. (2012) Keys for the identification of families and genera of Atlantic shallow water ascidiaceans. *Biota Neotropica* 12, 269–303.
- Shenkar, N., Gittenberger, A., Lambert, G., Rius, M., Rocha, R.M., Swalla, B.J., Turon, X. (2015) Ascidiacea World Database. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/ascidiacea>> (13/07/2015).
- Shenkar, N. & Swalla, B.J. (2011) Global diversity of Ascidiacea. *Plos One* 6.
- Sommerfeldt, A.D., Bishop, J.D.D. & Wood, C.A. (2003) Chimerism following fusion in a clonal ascidian (Urochordata). *Biological Journal of the Linnean Society* 79, 69–84.
- Stefaniak, L., Lambert, G., Gittenberger, A., Zhang, H., Lin, S. & Whitlatch, R.B. (2009) Genetic conspecificity of the worldwide populations of *Didemnum vexillum* Kott, 2002. *Aquatic Invasions* 4, 29–44.
- Stamatakis, A. (2014) "RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies". In *Bioinformatics* 30(9), 1312-1313.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*: 30, 2725-2729.
- Tarjuelo, I., Posada, D., Crandall, K. a., Pascual, M. & Turon, X. (2001) Cryptic species of *Clavelina* (Ascidiacea) in two different habitats: Harbours and rocky littoral zones in the northwestern Mediterranean. *Marine Biology* 139, 455–462.
- Tarjuelo, I., Posada, D., Crandall, K. A., Pascual, M. & Turón, X. (2004) Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*. *Molecular Ecology* 13, 3125-3136.
- Turon, X. & López-Legentil, S. (2004) Ascidian molecular phylogeny inferred from mtDNA data with emphasis on the Aplousobranchia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33, 309-320.
- Zhan, A. Darling, J.A., Bock, D.G., Lacoursière-Rouseel, A. Maclasaac, H.J. & Cristescu, M.E. (2012) Complex genetic patterns in closely related colonizing invasive species. *Ecology and Evolution* 2, 1331-1346.
- Zhan, A., Maclsaac, H.J. & Cristescu, M.E. (2010) Invasion genetics of the *Ciona intestinalis* species complex: From regional endemism to global homogeneity. *Molecular Ecology* 19, 4678–4694.
- Zeng, L. & Swalla, B.J., (2005) Molecular phylogeny of the protochordates: chordate evolution. *Canadian Journal of Zoology* 83, 24-33.

Anexo 1

Espécimes pertencentes a coleção de Ascidiacea do Departamento de Zoologia - UFPR analisados neste estudo.

Código da Coleção	Data de coleta	Estado	Município	Latitude	Longitude	Coletor
DIPL-31	8/12/2011	Bahia	Salvador	27°11'17"S	48°24'36"W	Rocha, R. M.
DIPL-34	2/3/2012	Bahia	Salvador	26°46'48"S	48°36'44"W	Neves, I. M.
DIPL-35	3/3/2012	Bahia	Salvador	27°44'08"S	48°33'52"W	Neves, I. M.
DIPL-36	3/3/2012	Bahia	Salvador	26°46'48"S	48°36'44"W	Neves, I. M.
DIPL-059	26/1/2012	Espírito Santo	Guarapari	20°41'58"S	40°24'27"W	Gamba, G.
DIPL-061	12/02/2011	Espírito Santo	Guarapari	20°42'00"S	40°24'30"W	Rocha, R. M.
DIPL-43	1/9/2014	Rio de Janeiro	Angra dos Reis	23°2'25"S	44°12'13.29"W	Skinner, L. F.
DIPL-48	2/9/2014	Rio de Janeiro	Parati	23°2'47"S	44°35'42"W	Skinner, L. F.
DID-142	28/7/2000	Rio de Janeiro	Arraial do Cabo	27°17'46"S	48°21'37"W	L.V.G. Costa
DIPL-49	02/9/2014	Rio de Janeiro	Angra dos Reis	22°56'59"S	44°23'43"W	Skinner, L. F.
DIPL-052	05/06/2014	Rio de Janeiro	Cabo Frio	22°51'41"S	41°56'12"W	Skinner, L. F.
DIPL-051	05/06/2014	Rio de Janeiro	Cabo Frio	22°52'19"S	41°57'12"W	Skinner, L. F.
DIPL-050	05/06/2014	Rio de Janeiro	Cabo Frio	22°52'19"S	41°57'12"W	Skinner, L. F.
DIPL-053	05/07/2014	Rio de Janeiro	Cabo Frio	22°46'04"S	41°47'30"W	Skinner, L. F.
DIPL-054	05/07/2014	Rio de Janeiro	Cabo Frio	22°51'10"S	41°54'22"W	Skinner, L. F.
DIPL-055	05/09/2014	Rio de Janeiro	Cabo Frio	22°51'24"S	41°54'30"W	Skinner, L. F.
DIPL-056	05/09/2014	Rio de Janeiro	Cabo Frio	22°53'55"S	41°58'42"W	Skinner, L. F.
DIPL-057	05/09/2014	Rio de Janeiro	Cabo Frio	22°53'38"S	41°59'12"W	Skinner, L. F.
DID-92	9/1/1900	São Paulo	São Sebastião	23°48'07"S	45°23'27"W	Rocha, R. M.

DID-01	8/2/1986	São Paulo	Ilha de Alcatrazes	24°7'00"S	45°42'1"W	Rocha, R. M.
DID-84	13/12/1997	São Paulo	São Sebastião	23°48'00"S	45°26'00"W	Rocha, R. M.
DIPL-11	11/3/2004	Paraná	Ilha da Galheta	25°35'06"S	48°19'26"W	Kremer, L.P.
DID-162	4/10/2002	Paraná	Ilha de Currais	25°44'12"S	48°21'58"W	Faria, S.B.
DIPL-32	14/11/2005	Paraná	Ilha do Mel	25°34'18"S	48°19'12"W	Rocha, R. M.
DID-83	11/4/1997	Paraná	Ilha de Currais	25°44'12"S	48°21'58"W	Faria, S.B.
DIPL-060	2015	Paraná	Ilha do Mel	25°34'18"S	48°19'12"W	Felippe, C.
DID-128	19/4/1997	Santa Catarina	Arq. Arvoredo	27°11'17"S	48°24'36"W	Rocha, R. M.
DIPL-17	16/12/2006	Santa Catarina	Penha	26°46'48"S	48°36'44"W	Kremer, L.P.
DIPL-14	4/9/2006	Santa Catarina	Florianópolis	27°44'08"S	48°33'52"W	Baptista, S. M
DIPL-058	16/4/2008	Santa Catarina	Moleques do Sul	27°50'49"S	48°26'04"W	Rocha, R. M.