



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR-LABOMAR
CURSO DE OCEANOGRAFIA**

ANA LUZIA DE FIGUEIREDO LACERDA

**FILOGENIA MOLECULAR DE COPÉPODES ENCONTRADOS NA PRAIA
DO NÁUTICO (FORTALEZA, CE), COM ÊNFASE NA ESPÉCIE INVASORA
Temora turbinata (DANA, 1849).**

**FORTALEZA
2013**

ANA LUZIA DE FIGUEIREDO LACERDA

FILOGENIA MOLECULAR DE COPÉPODES ENCONTRADOS NA PRAIA
DO NÁUTICO (FORTALEZA, CE), COM ÊNFASE NA ESPÉCIE INVASORA
Temora turbinata (DANA, 1849).

Monografia apresentada ao curso de Oceanografia do Instituto de Ciências do Mar- LABOMAR, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni

FORTALEZA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Rui Simões de Menezes

L131f Lacerda, Ana Luzia de Figueiredo.

Filogenia molecular de Copépodes encontrados na praia do náutico (Fortaleza, CE), com ênfase na espécie invasora *Temora turbinata* (DANA, 1849) / Ana Luzia de Figueiredo Lacerda. – 2013.

48 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Curso de Oceanografia, Fortaleza, 2013.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

1. Calanoida. 2. Mesozooplâncton. Filogenia Molecular. I. Título.

CDD 595.3

ANA LUZIA DE FIGUEIREDO LACERDA

FILOGENIA MOLECULAR DE COPÉPODES ENCONTRADOS NA PRAIA
DO NÁUTICO (FORTALEZA, CE), COM ÊNFASE NA ESPÉCIE INVASORA
Temora turbinata (DANA, 1849).

Monografia apresentada ao curso de Oceanografia do Instituto de Ciências do Mar- LABOMAR, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Oceanografia. Área de concentração: Oceanografia Biológica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Dra. Tatiane Martins Garcia
Universidade Federal do Ceará

PhD. Vicente Vieira Faria
Universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gilardo e Ilda (*in memorian*), pelos ensinamentos e amor incondicional.

Aos meus irmãos Alessandro, Arthur e Abel e à minha cunhada Eliana pela amizade, companheirismo e incentivo.

Às minhas sobrinhas Eva e Elisa por proporcionarem muitos momentos de alegria à nossa família.

Ao Prof. Rodrigo pela disponibilidade de orientação e pelos ensinamentos profissionais e pessoais durante os últimos quatro anos, sendo um grande exemplo de ética e profissionalismo.

Aos membros do Laboratório CEDECAM pelos conhecimentos compartilhados, além dos bons momentos de conversa e descontração. Agradeço especialmente ao Felipe Braga, André Ribeiro e Max Dantas pelas contribuições nesse trabalho.

Às meninas do Laboratório de Plâncton do LABOMAR, Nívia Santos, Andréa Oliveira e Carolina Coelho pela ajuda durante as coletas e pela amizade.

À Tatiane Garcia pelos conhecimentos compartilhados e auxílio durante o desenvolvimento desse projeto.

Aos professores do curso de Oceanografia pela dedicação e ensinamentos prestados.

Aos colegas da turma de Oceanografia 2009.1 por tudo que vivenciamos juntos, dentro e fora da Universidade, cujas lembranças sempre estarão guardadas na memória com muito carinho.

Agradeço especialmente aos “Oceanfriends” 41 (Carlos Alberto), Ailton Viana e Vinicius Abreu pela amizade, incentivo e favores prestados.

Aos membros da banca pelas contribuições.

Aos membros do Núcleo de Genômica (NUGEN), da Universidade Estadual do Ceará, pela colaboração para realização desse trabalho.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desse projeto.

A todos que participaram de alguma forma dessa conquista, muito obrigada!

À minha família, com muito amor!

RESUMO

Os crustáceos da classe Copepoda formam um grupo muito diversificado e representam cerca de 90% do zooplâncton encontrado em ambiente marinho. O avanço das ferramentas moleculares vem transformando o estudo da biologia marinha e nos últimos anos os copépodes têm sido catalogados e identificados através da estratégia “barcoding”, baseada em sequências parciais do gene mitocondrial Citocromo *c* Oxidase I (COI). Bancos de dados disponíveis *online* permitem a comparação de sequências experimentais com sequências catalogadas. Esse estudo visou caracterizar espécies de copépodes da costa marinha cearense, inclusive a espécie invasora *Temora turbinata*, através de sequências parciais de COI e avaliar o status taxonômico de alguns grupos de copépodes disponíveis em bancos de dados mundiais. Foram obtidas 15 sequências de copépodes cearenses, compreendendo as espécies: *Temora turbinata*, *Acartia lilljeborgii*, *Parvocalanus crassirostris*, *Pseudodiaptomus acutus*, *Caligus* sp. e *Centropages furcatus*. Em adição a isso, foram analisadas 168 sequências de copépodes disponíveis *online* no GenBank. Ao todo, as análises foram feitas utilizando 35 espécies, pertencentes a 20 gêneros. O nível de variação intraespecífica foi de 0-18,7% e entre espécies congêneras variou de 0,4-19,5%. A maior frequência de variação intraespecífica foi de 0-5%, incluindo 25 espécies. Em geral, os valores estão dentro da faixa de variabilidade encontrada por outros autores, exceto para o gênero *Calanus* que apresentou variabilidade de 0,4%, muito abaixo do que tem sido encontrado em nível de gênero para copépodes. A análise das sequências parciais do gene COI mitocondrial de diferentes grupos de copépodes sugere que existem problemas taxonômicos a serem resolvidos. A partir dos dados disponíveis, a espécie *T. turbinata* apresentou uma variabilidade genética extremamente baixa, o que está de acordo com dados previamente publicados para o gênero. O seu status taxonômico, no entanto, é questionado.

Palavras-chave: Filogenia molecular, mesozooplâncton, Calanoida

ABSTRACT

The crustaceans belonging to Copepoda class form a very diverse group and represent about 90% of the zooplankton found in the marine environment. The advancement of molecular tools has transformed the study of marine biology and in recent years, the copepods have been cataloged and identified through a "barcoding" strategy, based on partial sequences of the mitochondrial gene Cytochrome c Oxidase I (COI). Databases available online allow comparison between experimental sequences and cataloged sequences. This study aimed to characterize species of copepods from the coast of Ceará State, including the invasive species *Temora turbinata*, through partial sequences of COI and evaluate the taxonomic status of some groups of copepods available in world databases. We obtained 15 sequences of copepods from Ceará, comprising the species: *Temora turbinata*, *Acartia lilljeborgii*, *Parvocalanus crassirostris*, *Pseudodiaptomus acutus*, *Caligus* sp. and *Centropages furcatus*. In addition, 168 sequences of copepods available *on line* in GenBank were analyzed. Analyzes were carried out using 35 species belonging to 20 genera. The level of intraspecific variation ranged from 0 to 18.7% and among congeneric species ranged from 0.4 to 19.5%. The higher frequency of intraspecific variation was 0-5%, including 25 species. In general, the values are within the range of variability found by other authors, except for the genus *Calanus*, which showed a variability of 0.4%, much lower than what is usually found within copepod genera. The analysis of the partial sequences of COI mitochondrial gene from different groups of copepods suggests that there are taxonomic problems to be solved. From the available data, the species *T. turbinata* presented an extremely low genetic variability, which is consistent with previously published data for the genus. However, its taxonomic status is questioned.

Keywords: Molecular phylogeny, mesozooplankton, Calanoida.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Mapa com localização da praia do Náutico, mostrando a estação de coleta 18
- Figura 2- Coleta dos organismos por meio de arrasto horizontal com rede planctônica 19
- Figura 3- Fixação *in situ* dos copépodes em álcool 70%, logo após coleta dos organismos 19
- Figura 4- Amplificação do gene COI, visualizado em gel de agarose a 1% sob o ultravioleta, dos copépodes *Parvocalanus crassirostris* (P.c); *Euterpina acutifrons* (E.a); *Pseudodiaptomus acutus* (P.a); *Acartia lilljeborgii* (A.l); *Temora turbinata* (T.t); *Centropages furcatus* (C.f) e *Corycaeus amazonicus* (C.a). O controle negativo está representado por (-) e o padrão 1kb Plus por (M). 24
- Figura 5- Árvore UPGMA, utilizando o modelo Kimura- 2 parâmetros e teste *bootstrap* com 1.000 réplicas, construída a partir de sequências de *Temora discaudata* e *T. stylifera*, obtidas no GenBank, e as sequências de *T. turbinata* coletadas na Praia do Náutico, Fortaleza, Ceará. Números de acesso das sequencias depositadas mostrados junto de cada amostra; NT identifica as amostras da Praia do Náutico, produzidas no presente estudo.....25
- Figura 6- Árvore de máxima verossimilhança incluindo as espécies da praia do Náutico, Fortaleza, Ceará, e sequências congênicas utilizadas como referência. Os indivíduos em destaque e identificados com código NT representam as espécies coletadas na praia do Náutico. Os demais indivíduos foram obtidos no GenBank (números de acesso apresentados) 26
- Figura 7- Árvore de máxima verossimilhança incluindo uma sequência de cada espécie, compreendendo todas as espécies. Os indivíduos destacados e identificados com o código NT representam os organismos coletados na praia do Náutico, Fortaleza, CE. As demais sequências representam os indivíduos catalogados e disponíveis no GenBank..... 28
- Figura 8- Árvore Neighbor-Joining, utilizando o modelo Kimura- 2 parâmetros e teste *bootstrap* com 1.000 réplicas, construída a partir de espécies dos gêneros *Pleuromamma* e *Temora*, mostrando que a sequência de *Pleuromamma abdominalis* disponível no Genbank (acesso HM045403.1) possivelmente não representa essa espécie, considerando que esta sequência mostrou-se muito distante das espécies congênicas e muito próxima do grupo de *Temora turbinata*.....29
- Tabela 1- Lista das ordens e espécies utilizadas na análise genético-molecular, com indicações das que obtiveram sucesso na amplificação do gene COI mitocondrial.....23

Tabela 2- Distância não corrigida intraespecífica, considerando as três posições do códon; n representa o número de sequências analisadas para cada espécie 30

Gráfico1-Frequência das médias das distâncias não corrigidas intraespecíficas, indicando que a maior frequência foi na faixa de 0-5%, representada por 25 espécies de copépodes..... 31

Gráfico 2- Frequência das médias das distâncias não corrigidas entre espécies congênicas, indicando que a maior frequência foi na faixa de 15-20%, representada por sete espécies de copépodes.....32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Justificativa	11
1.2 Revisão Bibliográfica	12
1.2.1 Região Nordeste do Brasil	12
1.2.2 Copépodes	13
1.2.3 <i>Temora turbinata</i>	13
1.2.4 Filogenia Molecular	14
1.2.5 “DNA <i>barcoding</i> ”	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Gerais	17
2.2 Específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Área de Estudo	18
3.2 Amostragem	18
3.3 Extração de DNA	20
3.4 Amplificação e Sequenciamento	20
3.5 Análises das Sequências	21
4. RESULTADOS	23
4.1 Espécies coletadas e amplificação do gene COI	23
4.2 Análises Filogenéticas	24
4.3 Diversidade Molecular	30
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS.....	39
APÊNDICE A.....	42
APÊNDICE B	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

A comunidade zooplanctônica ocupa uma posição-chave na cadeia trófica marinha, constituindo um elo na transferência da energia produzida por organismos fotossintetizantes até níveis tróficos superiores, incluindo crustáceos, peixes e moluscos de interesse comercial (HARRIS *et al.*, 2000; CAVALCANTI, LARRAZÁBAL, 2004). O zooplâncton também engloba estágios larvais de organismos não planctônicos, além de poderem ser utilizados como ferramentas de monitoramento ambiental (MELO *et al.*, 2008)

Apesar da diversidade de biomas na zona costeira brasileira, ainda existem poucos estudos no nível de espécies ou sobre as relações ecológicas entre algumas comunidades marinhas, incluindo os organismos planctônicos (LOPES, 2009). A maioria dos estudos taxonômicos realizados até hoje, em particular sobre copépodes, são essencialmente baseados em caracteres morfológicos, o que exige alto grau de treinamento.

Depois de séculos de aquisição de conhecimentos, a taxonomia começou a perder popularidade para outros campos, resultando em uma escassez mundial de pessoal treinado e, paradoxalmente, cada estudo biológico requer algum conhecimento taxonômico (RADULOVICI; ARCHAMBAULT; DUFRESNE, 2010). A fim de conseguir uma identificação rápida e inequívoca de espécies marinhas, ferramentas moleculares vêm sendo cada vez mais utilizadas durante os últimos anos. Em combinação com métodos tradicionais de classificação taxonômica, a genética pode responder a muitos questionamentos como, por exemplo, solucionar problemas de espécies crípticas ou estimar a distância evolutiva entre os grupos. Análises do gene COI mitocondrial vem se tornando um padrão para o exame e caracterização de espécies marinhas (HEBERT *et al.* 2003).

A bioinvasão marinha e suas consequências ecológicas são assuntos que tem despertado grande interesse na comunidade científica nas últimas décadas. Além de alterações ecológicas, a bioinvasão pode causar também prejuízos sociais e econômicos, inclusive no setor pesqueiro. Com o aumento da quantidade de navegações transoceânicas, houve um consequente

aumento da troca de água de lastro entre ambientes distintos e isso se tornou um meio facilitador para dispersão de espécies (TEIXEIRA *et al.*, 2010; CARLTON, 1985). Embora diversas espécies sejam muito sensíveis e não resistam ao transporte ou às condições físico-químicas do novo ambiente, existem algumas espécies que conseguem completar seu ciclo de vida e atingir abundância elevada, podendo causar interferências imprevisíveis no ecossistema (CUNHA, 2008).

Neste cenário, é importante melhorar a eficiência na descrição de comunidades zooplancônicas e na detecção de novas espécies. Esse estudo é pioneiro para a costa cearense, onde sequências parciais do gene COI mitocondrial podem auxiliar na caracterização de organismos marinhos planctônicos e, dessa forma, inserir o Ceará no contexto mundial da identificação de espécies da fauna marinha através de ferramentas moleculares.

1.2 Revisão Bibliográfica

1.2.1 Região Nordeste do Brasil

Na costa nordeste brasileira, os ambientes costeiro e oceânico podem ser considerados oligotróficos. A maioria dos nutrientes necessários à produção primária depende de processos regenerativos em zonas rasas e do aporte de nutrientes oriundos da drenagem continental (BRANDINI 1997; PEREIRA, SOARES-GOMES, 2002).

De acordo com resultados obtidos através da segunda expedição oceanográfica do REVIZEE/NE II (1997) com área de estudo situada entre os paralelos 7°28'56"S–34°32'45"W e 3°21'08"S–38°40'29"W e profundidades de 0-200m, pode-se afirmar que na região Nordeste o grupo dos copépodes é o mais representativo entre os organismos holoplanctônicos da região.

Na referida expedição do REVIZEE/NE II (1997), a oligotrofia foi comprovada por espécies de Copepoda indicadoras de tais condições, como *Undinula vulgaris*, *Nannocalanus minor*, *Corycaeus speciosus*, *Temora stylifera* e *Oithona plumifera*, além da baixa densidade de organismos. Apesar da baixa densidade, confirmou-se uma comunidade extensamente biodiversa,

característica de águas tropicais (CAVALCANTI E LARRAZÁBAL, 2004). De maneira geral para a costa brasileira, as espécies de copepodes encontradas representam as ordens, Calanoida, Cyclopoida, Harparcticoida e Poecilostomastoida (BRANDINI, 1997; BONECKER, 2006).

1.2.2 Copépodes

Os copépodes, integrantes do mesozooplâncton (0,2 - 2 mm), formam um grupo de crustáceos muito diversificado e importante na composição da fauna de invertebrados aquáticos e representam cerca de 90% da composição do zooplâncton marinho. No ecossistema marinho, a ocorrência e distribuição de copépodes estão diretamente relacionadas aos processos físicos e biológicos como salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido, competição por espaço e disponibilidade de alimento (VEGA-PÉREZ, HERMANDEZ, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 2009).

A identificação desses organismos através dos métodos tradicionais, principalmente com base em características morfológicas, é exigente em relação ao grau de especialização, treinamento e também ao tempo de análise, além de poder apresentar equívocos devido às diferenças morfológicas de um indivíduo de acordo com seu estágio de desenvolvimento (RAJTHILAK *et al.*, 2010).

1.2.3 *Temora turbinata*

O Calanoida *Temora turbinata* (DANA, 1849) é uma espécie nerítica de água quente, comumente encontrada com mais frequência e abundância no Hemisfério Norte, em relação ao hemisfério sul (ALI-KHAN, 2006). Esta é uma espécie considerada exótica no Brasil, onde o primeiro registro de *T. turbinata* para a costa brasileira foi feito por ARAÚJO E MONTÚ, em 1993, no estuário do rio Vasa-Barris, estado de Sergipe. Esta espécie já foi registrada na plataforma continental brasileira desde o Rio Grande do Sul (MUXAGATA; GLOEDEN, 1995) até os estados de Pernambuco e Ceará (NEUMANN-LEITÃO *et al.*, 1998), no nordeste do Brasil.

A introdução de espécies exóticas pode resultar em mudanças das comunidades nativas e causar prejuízos sociais e econômicos. Entretanto, de acordo com a classificação para espécies exóticas feita por LOPES *et al.* (2009), *Temora tubinata* foi considerada como espécie estabelecida, ou seja, uma espécie introduzida, que é detectada de forma recorrente, apresenta ciclo de vida completo no ambiente natural e com aumento populacional ao longo do tempo, porém sem apresentar impactos ecológicos ou socioeconômicos aparentes.

Todavia, é importante salientar que no Brasil ainda existem poucos estudos envolvendo os impactos que espécies zooplanctônicas exóticas podem causar nas espécies nativas, onde a maioria dos esforços tem sido apenas na ocorrência e descrição das espécies exóticas, sem focar na interação com as espécies locais (CUNHA, 2008).

Em um estudo feito na Nova Zelândia, BRADFORD (1977) observou que temperaturas menores que 16.5°C não representam boas condições para o crescimento e sucesso reprodutivo de *T. turbinata*. Apesar disso, a autora sugere que *T. turbinata* é tolerante a variações ambientais, significando que pode ser transportada por grandes distâncias em mar aberto através das correntes marítimas.

Em relação ao movimento das massas d'água, a natureza da circulação de corrente influencia não apenas a distribuição da espécie, mas também a manutenção das grandes populações de *T. turbinata* em determinados locais (BRADFORD, 1977). De acordo com ZHANG *et al.* (2010), o aumento de massas d'água aquecidas decorrentes do aquecimento global pode resultar em dominância inesperada de *T. turbinata*.

É possível que no sistema estuarino lagunar de Cananéias-Iguape, estado de São Paulo, Brasil, *Temora turbinata* tenha substituído a espécie nativa *Temora stylifera*, onde esta tinha sido anteriormente relatada como um dos componentes principais da fauna zooplanctônica local (ARA, 2002).

1.2.4 Filogenia Molecular

O termo filogenia molecular refere-se às relações, inferidas a partir de estudos moleculares, que buscam determinar a história evolutiva de genes,

funções ou espécies, estimar o tempo de divergência entre dois organismos desde o último ancestral compartilhado e caracterizar ancestrais. As conexões evolutivas entre organismos são representadas graficamente através de árvores filogenéticas e muitos métodos têm sido descritos para fazer isso, o que levanta a questão de como abordar essa infinidade de possibilidades.

Algumas propriedades são comumente sugeridas para a construção de uma árvore filogenética: 1) Eficiência, ou seja, quão rápido é o método; 2) Força, referindo-se à quantidade de dados que o método precisa para produzir um resultado razoável; 3) Consistência, isto é, se vai convergir para a resposta certa fornecendo dados suficientes; 4) Falseabilidade, ou seja, a capacidade do método detectar quando seus pressupostos são violados (PAGE; HOLMES, 1998).

O conhecimento sobre os tipos de métodos utilizados para a construção de árvores filogenéticas é fundamental para a correta interpretação das árvores construídas. As metodologias filogenéticas são essencialmente estatísticas e podem ser calculadas ou a partir de matrizes de distância, inferindo basicamente as diferenças entre as sequências de nucleotídeos, onde os algoritmos mais comuns são o UPGMA e Neighbor-Joining, ou utilizando métodos probabilísticos, como acontece para máxima verossimilhança, que busca a maior probabilidade de explicar um conjunto de dados de forma que reflita a história evolutiva. Existem outros métodos de reconstrução filogenética e cada um pode ser mais vantajoso de acordo com as necessidades de cada tipo de análise.

1.2.5 “DNA barcoding”

Com o intuito de criar um sistema taxonômico mais confiável para o reino animal, pesquisas recentes tem sugerido a criação de um sistema *barcoding* baseado na análise de fragmentos de DNA.

De acordo com HEBERT *et al.* (2003), esse sistema “barcode” poderia ser baseado no gene Citocromo c Oxidase subunidade 1 (COI) devido à alta diversidade desse gene mitocondrial entre espécies diferentes e pelo bom grau de conservação do COI dentro de uma mesma espécie. Resultados obtidos através do COI apoiam a conclusão de que diagnósticos em nível de espécie

podem ser rotineiramente alcançados (HEBERT; RATNASINGHAM; WAARD, 2003). A reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica comumente utilizada devido à sua alta especificidade e aplicabilidade para amplificação dos genes. Esse tipo de abordagem já foi usada, com sucesso, para a caracterização de espécies de copépodes (CHEN; HARE, 2008).

O BOLD (Barcode of Life Data System) é um banco de dados *online* que auxilia na aquisição, armazenamento, análise e publicação de registros de sequências DNA e está disponível gratuitamente na internet (www.barcodinglife.org), se tornando, portanto, uma ferramenta útil para apoiar projetos de pesquisa (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar espécies do mesozooplâncton marinho da praia do Náutico através de ferramentas moleculares, com foco especial em *Temora turbinata*, e dessa forma contribuir para a criação de um sistema de identificação que permita detectar rapidamente as mudanças nas comunidades zooplanctônicas.

2.2 Específicos

- Obter amplificação do gene mitocondrial COI para espécies de copépodes de diferentes ordens.
- Avaliar o status taxonômico das espécies identificadas
- Sumarizar os dados genéticos disponíveis em bancos de dados públicos, através da construção de árvores filogenéticas para a subclasse Copepoda.
- Estimar a variabilidade genética da espécie invasora *Temora turbinata*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

A praia do Náutico, localizada em $3^{\circ}43' 28.75''\text{S}$ e $38^{\circ}29'27.75''\text{W}$, está inserida na zona urbana da cidade de Fortaleza e próxima ao Porto do Mucuripe (Figura 1). O clima na área pode ser considerado como tropical e a praia apresenta-se essencialmente arenosa.

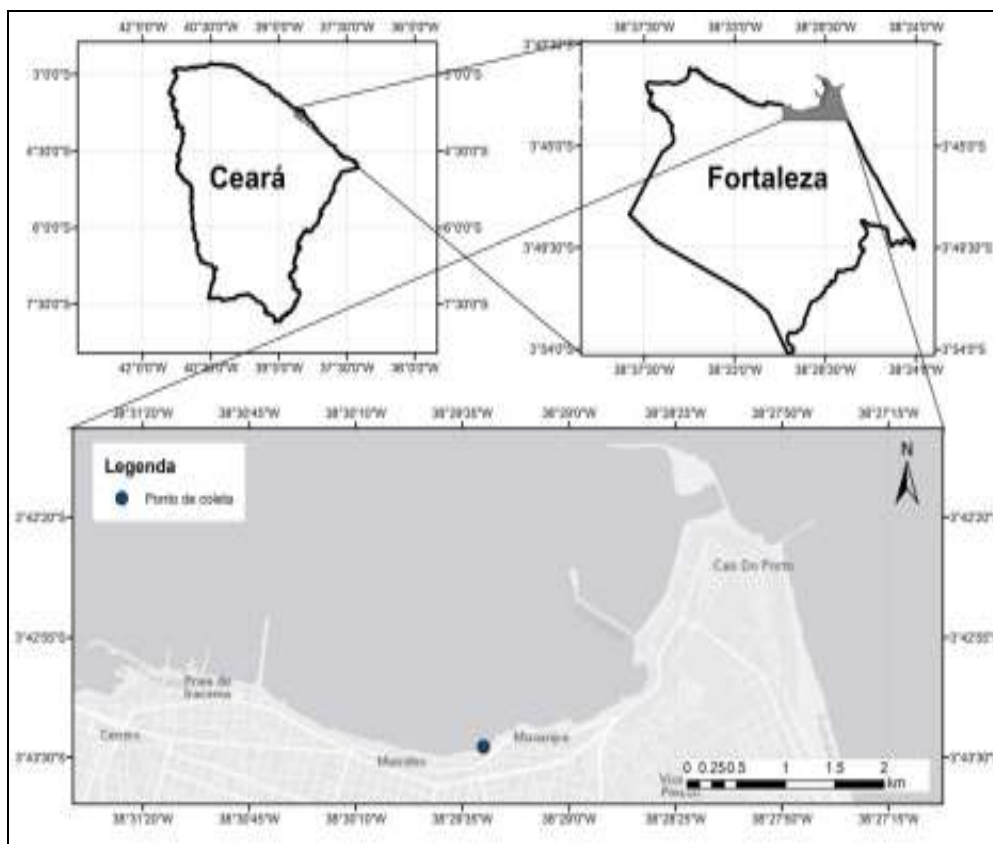


Figura 1. Mapa com localização da praia do Náutico, mostrando a estação de coleta.

3.2 Amostragem

As amostras foram coletadas utilizando rede planctônica cônica padrão, com 1m de comprimento, 30 cm de diâmetro de boca e abertura de malha de $300\ \mu\text{m}$, durante o período de três minutos, por meio de arrastos horizontais de subsuperfície manualmente operados. (Figura 2).



Figura 2. Coleta dos organismos por meio de arrasto horizontal com rede planctônica.

Foram realizadas quatro amostragens, sendo um arrasto feito no ano de 2010, um no ano de 2011 e dois arrastos no ano de 2012. Após as coletas, os organismos foram inicialmente fixados, *in situ*, em álcool 95% (Figura 3). Em seguida, as amostras foram levadas para o laboratório e foi feita a triagem do material, onde os indivíduos foram separados com base nas características morfológicas, utilizando-se chaves dicotômicas e bibliografia especializada (LAVERACK E TODD, 1991). Alguns indivíduos foram separados para captura de fotografia sob microscópio óptico.



Figura 3. Fixação *in situ* dos copépodos em álcool 95%, logo após coleta dos organismos.

3.3 Extração de DNA

Para caracterização genético-molecular, os organismos foram separados individualmente, com o uso de lupa e auxílio de ponteiras esterilizadas, e transferidos para etanol 95%. Em seguida, o DNA foi extraído através do KIT comercial de extração de DNA genômico (Wizard SV Genomic DNA Purification System, Promega). Primeiramente, cada tubo de 1,5 mL continha um indivíduo inteiro onde foi adicionada uma solução de digestão (0,5M EDTA, pH 8,0; Proteinase K, 20mg/mL; Solução de RNase, 4mg/mL e Solução de lise nuclear). Em seguida, as amostras foram incubadas a 55° C durante três horas em banho-maria termostatizado. Após uma hora e meia, os tubos foram agitados manualmente por inversão e colocados novamente em banho-maria até completar o período de três horas. Em cada amostra foi adicionado um tampão de lise contido no KIT de extração. O material foi então transferido do tubo de 1,5ml para um conjunto de minicoluna acoplada em tubo coletor, utilizando uma pipeta. O DNA foi purificado com adição de solução de lavagem (95% de etanol) utilizando uma minicentrífuga em 13.000g durante um minuto, sendo o mesmo procedimento repetido por quatro vezes, conforme instruções do fabricante. O DNA purificado foi estocado em 50µL de solução TE 1x, pH 8.0, numa temperatura de -20°C.

3.4 Amplificação e Sequenciamento

A amplificação do DNA foi feita em um termociclador (TECHNE, TC- 512), onde o programa de ciclagem utilizado consistiu inicialmente de um passo inicial de desnaturação de 94°C/4min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 92°C/ 15s, anelamento em 50°C/ 30s, extensão em 72°C/1min e extensão final em 72°C/10min. PCRs (Polymerase Chain Reaction) foram conduzidas em um volume de 10 µL contendo 1x de tampão de reação (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3), 200 µM de cada dNTP, uma unidade de Taq DNA Polimerase, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM de cada primer, 1 µL de DNA e completado o volume de 10µL com água ultrapura. Os primers utilizados foram LCO 1490 (5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3') e HCO 2198 (5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'), descritos por FOLMER *et al.* (1994). A análise

qualitativa da reação de PCR foi observada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™. Em seguida, foi feita a fotodocumentação do gel sob transluminador UV, através do sistema EDAS 290, Kodak. Os *amplicons* foram sequenciados diretamente através do BigDye^R Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1(Life Technologies) em reações de 10µl, preparadas conforme as instruções do fabricante. O processo de purificação foi feito com adição inicial de 40µl de isopropanol (65%) em cada tubo e repouso em temperatura ambiente durante 25 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas com velocidade de 10.000g durante 25 minutos. O isopropanol foi removido e então foram adicionados 250µl de etanol (60%). As amostras foram centrifugadas em 10.000g/5min. Para finalizar o processo de purificação, o etanol foi eliminado por inversão e secado ao ar. Os sequenciamentos foram lidos em sequenciador automático do tipo ABI 3100 do Núcleo de Genômica e Bioinformática da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

3.5 Análises das Sequências

Todas as sequências foram editadas e analisadas no programa MEGA (disponível em <http://www.megasoftware.net/>), versão 5.0 (TAMURA *et al.* 2011) e o alinhamento foi feito utilizando-se o algoritmo Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994), incluso no programa. Para o diagnóstico das espécies foram utilizados o banco de dados e as ferramentas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do GenBank, do National Center for Biotechnology Information, (ALTSCHULI *et al.* 1990, disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e do Barcode of Life Project (RATNASINGHAM e HEBERT 2007, disponível em www.boldsystems.org).

Para comparação e análise filogenética das sequências obtidas nesse estudo, foram utilizadas 168 sequências de copépodes disponíveis no GenBank (Apêndice A). O primeiro passo foi obter sequências do gene COI das mesmas espécies encontradas na praia do Náutico. Em seguida, foram obtidas também sequências de espécies diferentes, porém congênicas com as espécies da praia do Náutico. Por último, foram obtidas sequências de outras espécies, incluindo representante das principais ordens de copépodes: *Calanoida*, *Harparcticoida*, *Siphonostomatoida*, *Poecilostomatoida* e *Ciclopoida*.

Um número mínimo de cinco indivíduos para cada espécie foi buscado, porém algumas espécies apresentaram menos de cinco sequências do gene COI. Nesses casos, todas as sequências disponíveis foram obtidas. Ao todo, foram analisadas 35 espécies, pertencentes a 20 gêneros.

Uma dendrograma UPGMA, utilizando o modelo Kimura- 2 parâmetros e teste *bootstrap* com 1.000 réplicas, foi gerado para as espécies de *Temora*. Foram geradas também árvores de máxima verossimilhança, unindo todas as sequências das espécies da praia do Náutico com as do GenBank e alternando parâmetros como o tipo do modelo a ser utilizado (Kimura- 2 parâmetros; Tamura 3- parâmetros; Tamura-Nei ou General Time Reversible, GTR), distribuição das taxas de mutação entre os sítios (Uniforme ou Gama) e o número de posições do códon, levando em consideração, ou não, a terceira posição.

Primeiramente, a árvore de máxima verossimilhança escolhida para interpretação filogenética foi a que apresentou o menor valor de *log likelihood*, construída a partir do modelo GTR, distribuição Gama e considerando as três posições do códon. A partir da definição do modelo de evolução molecular, foi então construída uma árvore de máxima verossimilhança, utilizando o modelo GTR e distribuição gama para as espécies da praia do Náutico, juntamente com as sequências obtidas no *GenBank* de organismos da mesma espécie ou, pelo menos, do mesmo gênero das espécies que foram encontradas na praia do Náutico. Em seguida, foi gerada outra árvore de máxima verossimilhança, utilizando os mesmo parâmetros, agora incluindo todas as espécies, tanto da praia do Náutico quanto do *Genbank*, utilizando apenas uma sequência de cada espécie.

Observações feitas a partir desta árvore construída utilizando uma sequência de cada espécie, incluindo todas as espécies, deram grande suporte para a necessidade de analisar separadamente as sequências de duas espécies de Calanoida. Para a construção desta árvore filogenética foi utilizado o algoritmo “Neighbor-Joining”, com o modelo Kimura- 2 parâmetros e teste *bootstrap* com 1.000 réplicas.

4 RESULTADOS

4.1 Espécies coletadas e amplificação do gene COI

Dentre os copépodes coletados foram identificadas oito espécies. Foi identificada também a presença de *Caligus* sp., um Sifonostomatoide conhecido pelo impacto sobre a piscicultura marinha. A Tabela 1 lista as espécies identificadas e separadas para sequenciamento do gene COI.

Tabela 1- Lista das ordens e espécies utilizadas na análise genético-molecular, com indicações das que obtiveram sucesso na amplificação do gene COI mitocondrial.

Ordem / Espécie	Praia do Náutico				COI
	16.09.10	25.09.11	22.03.12	21.04.12	
Calanoida					
<i>Acartia lilljeborgii</i>	x	x	x		x
<i>Centropages furcatus</i>		x			x
<i>Parvocalanus crassirostris</i>			x		x
<i>Pseudodiaptomus acutus</i>			x	x	x
<i>Temora turbinata</i>	x	x	x	x	x
Poecilostomatoida					
<i>Corycaeus amazonicus</i>		x		x	
Harpacticoida					
<i>Euterpina acutifrons</i>		x	x		
Siphonostomatoida					
<i>Caligus</i> sp.	x				x

Dentre os indivíduos capturados, sete espécies de copépodos foram fotografadas, como é mostrado no Apêndice B, com exceção do *Caligus* sp., devido ao fato de ter sido coletado apenas um indivíduo dessa espécie que foi destinado à análise molecular. O resultado das amplificações do gene COI por PCR são mostrados na Figura 4.

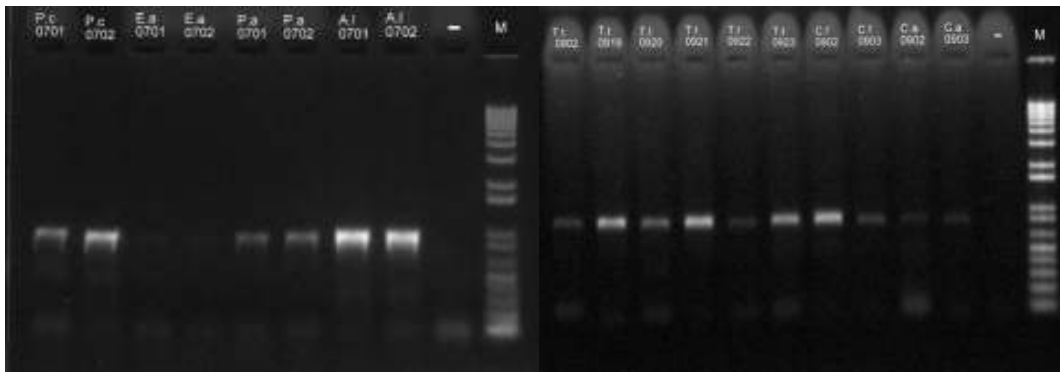


Figura 4. Amplificação do gene COI, visualizado em gel de agarose a 1% sob o ultravioleta, dos copépodes *Parvocalanus crassirostris* (P.c); *Euterpina acutifrons* (E.a); *Pseudodiaptomus acutus* (P.a); *Acartia lilljeborgii* (A.l); *Temora turbinata* (T.t); *Centropages furcatus* (C.f) e *Corycaeus amazonicus* (C.a). O controle negativo está representado por (-) e o padrão 1kb Plus (Invitrogen) por (M).

Foram obtidos fragmentos com cerca de 500 pb do gene mitocondrial COI. As espécies *Temora turbinata*, *Acartia lilljeborgii*, *Parvocalanus crassirostris*, *Pseudodiaptomus acutus*, *Caligus* sp. e *Centropages furcatus* apresentaram sequências parciais do gene COI de boa qualidade, perfazendo um total de 15 sequências a serem exploradas. O número de acesso no banco de dados das 168 sequências de copépodes catalogadas no GenBank, utilizadas para análise comparativa com as sequências de nucleotídeos do copépodes encontrados no presente estudo, estão disponíveis no Apêndice A. O Apêndice A também mostra a Ordem de cada um desses indivíduos.

4.2 Análises Filogenéticas

A árvore UPGMA (Figura 5), baseada em um total de 947 pb do gene COI, evidencia uma diversidade de 16% entre as espécies de *Temora turbinata*, coletadas na Praia do Náutico, e as sequências de *T. discaudata* e *T. stylifera*, obtidas no GenBank. O tamanho dos ramos representa o número de mudanças ocorridas entre os indivíduos e pode ser inferido a partir da escala existente na própria figura.

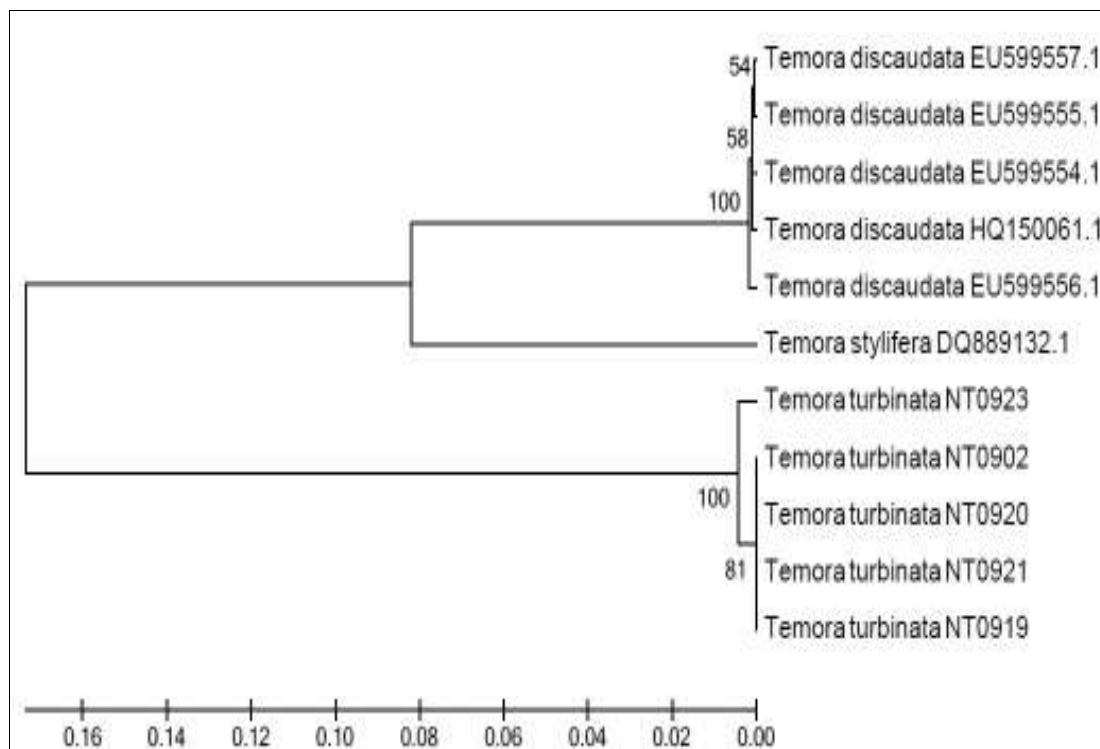


Figura 5. Árvore UPGMA, utilizando o modelo Kimura- 2 parâmetros e teste *bootstrap* com 1.000 réplicas, construída a partir de sequências de *Temora discaudata* e *T. stylifera*, obtidas no GenBank, e as sequências de *T. turbinata*, coletadas na Praia do Náutico, Fortaleza, Ceará. Números de acesso das sequencias depositadas mostrados junto de cada amostra; NT identifica as amostras da Praia do Náutico, produzidas no presente estudo.

Analisando as distâncias na árvore de máxima verossimilhança, incluindo as espécies da praia do Náutico juntamente com suas espécies congênicas obtidas no GenBank (Figura 6), foi observado que *Acartia lilljeborgii* está mais próxima de *Acartia bifilosa* do que de *A. tonsa* ou *A. discaudata*. Para o grupo de *Temora*, foi possível perceber uma grande distância entre *T. turbinata* e as outras espécies congênicas, *T. stylifera* e *T. discaudata*. Isso apoia o que foi mostrado no dendograma UPGMA anterior. Uma grande distância também foi observada para as espécies *Pseudodiaptomus acutus* e *P. koreanus*. A espécie *Caligus* sp., apesar de não ocorrer tão distante dos grupos congênicos, como aconteceu para *Pseudodiaptomus* e *Temora*, também mostrou-se distante de outros *Caligus*. As amostras de *Centropages furcatus* e *Parvocalanus crassirostris*, coletadas na praia no Náutico, estão próximas dos indivíduos de mesma espécie usados como referência a partir do *GenBank*.

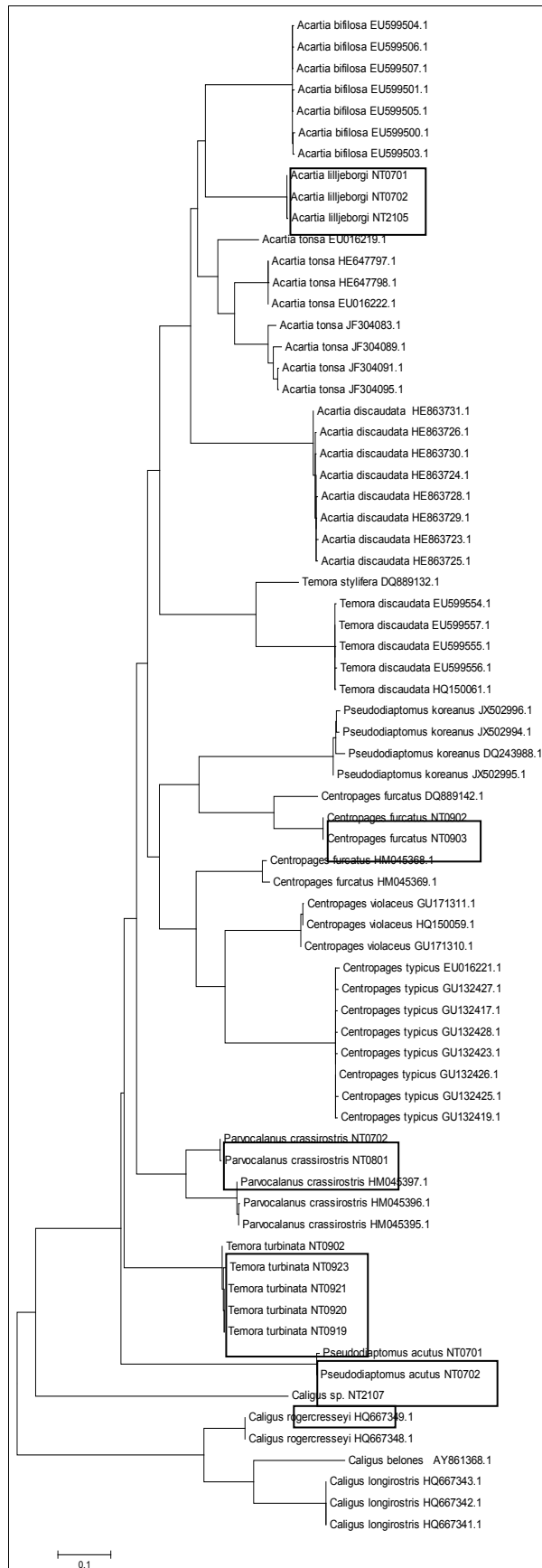


Figura 6- Árvore de máxima verossimilhança incluindo as espécies da praia do Náutico, Fortaleza, Ceará, e sequências congêneras utilizadas como referência. Os indivíduos em destaque e identificados com código NT representam as espécies coletadas na praia do Náutico. Os demais indivíduos foram obtidos no GenBank (números de acesso apresentados).

A árvore de máxima verossimilhança, construída para cada espécie, incluindo todas as espécies tanto do Náutico quanto do

GenBank (Figura 7), mostra que as espécies de *Acartia* se apresentaram no padrão de distância esperado para espécies congênicas. Os gêneros *Parvocalanus*, *Clausocalanus*, *Calanus*, *Sapphirina* e *Euaugaptilus* também mostraram que suas espécies estão filogeneticamente próximas, dentro de cada gênero.

Para as espécies de *Temora*, as relações filogenéticas apresentadas na figura 7 reforçam os resultados apresentados na árvore da figura 6. Em adição a isso, acrescenta-se a problemática da grande proximidade da sequência de *Pleuromamma abdominalis* (acesso HM045403.1, GenBank) com as sequências de *Temora turbinata*, encontradas na praia do Náutico.

As duas espécies analisadas pertencentes ao gênero *Oithona*, *O. similis* e *O. dissimilis*, apresentaram a maior distância entre as sequências de espécies congênicas. O *Caligus* sp. também mostrou-se distante de *C. belones*, *C. longirostris* e *C. rogercresseyi*.

Para os gêneros *Schizopera*, *Aetideus*, *Undinula*, *Paracalanus*, *Hemidiaptomus*, *Corycaeus* e *Paracartia* só tinham sequências de apenas uma espécie disponível no GenBank e, portanto, não puderam ser comparados em nível de espécies congênicas. Entretanto, foi observado que *Paracartia* está bem próxima das outras espécies da mesma família Acartidae. Para os demais grupos, não existem espécies de mesma família, porém todos estão agrupados próximos a outros integrantes da mesma ordem, como, por exemplo, os calanoides *Aetideus*, *Undinula*, *Paracalanus* e *Hemidiaptomus*, localizados próximos a *Centropages* e *Parvocalanus*. A distância entre *Corycaeus* e outras espécies de Poecilostomatoida, como *Sapphirina metallina* e *S. opalina*, também está dentro dos padrões esperados. Apenas *Schizopera* apresentou-se um pouco mais distante das espécies de *Tigriopus*, ambos pertencentes à ordem Harpacticoida.

As três espécies de *Centropages* analisadas, *C. violaceus*, *C. furcatus* e *C. typicus* estão próximas entre si. Apenas o *Centropages furcatus*, coletado na praia do Náutico, mostrou-se um pouco mais distante dos indivíduos de mesma espécie, obtidos no Genbank.

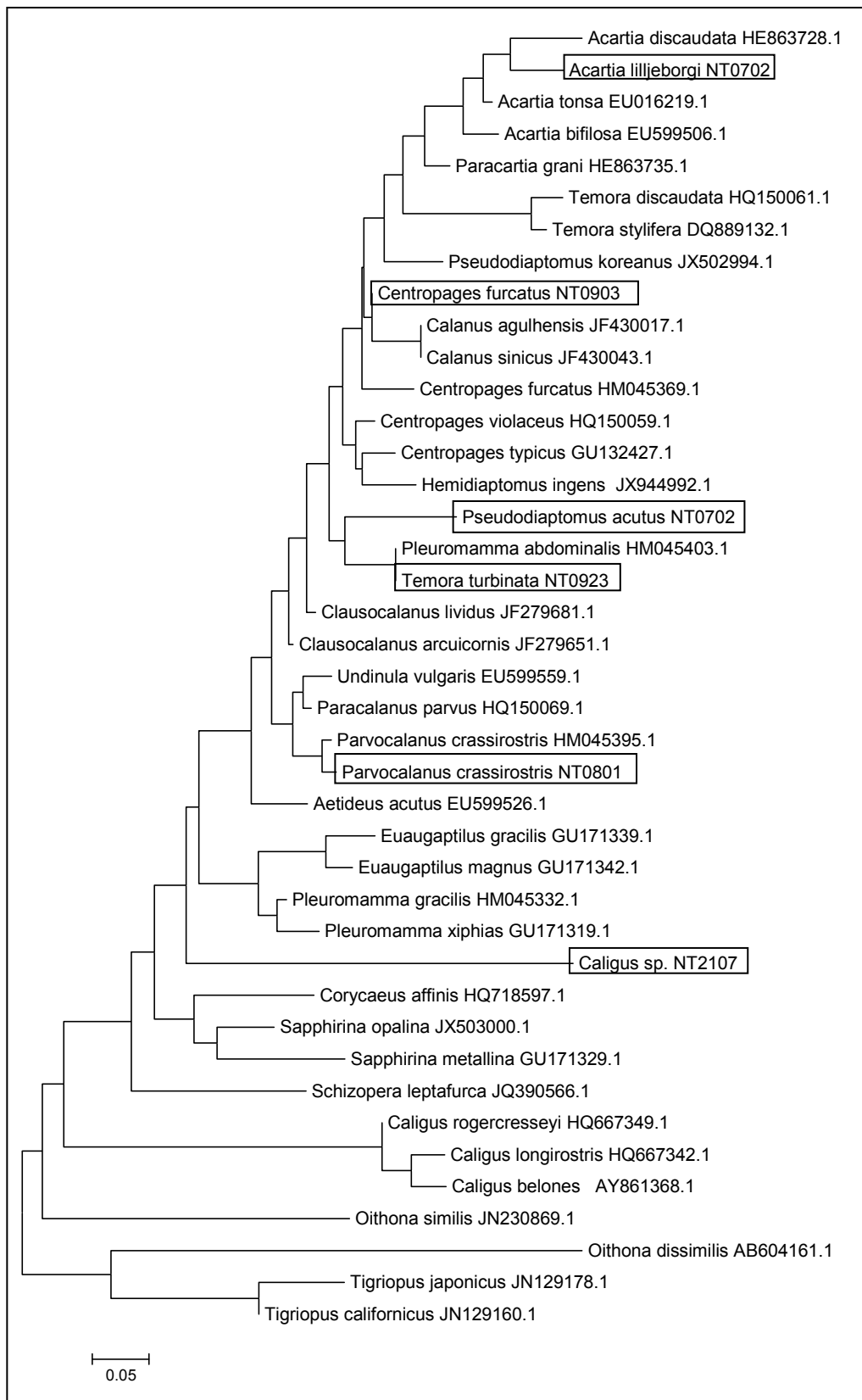


Figura 7- Árvore de máxima verossimilhança incluindo uma sequência de cada espécie, compreendendo todas as espécies. Os indivíduos destacados e identificados com o código NT representam os organismos coletados no presente estudo. As demais sequências representam os indivíduos catalogados e disponíveis no GenBank (números de acesso mostrados).

A figura 8 mostra que a sequência de *Pleuromamma abdominalis* (acesso HM045403.1, catalogada no GenBank) está filogeneticamente fora do padrão esperado, pois aparece muito distante das outras sequências de *Pleuromamma abdominalis*, além de estar inserida com 100% de suporte no mesmo grupo de *Temora turbinata*, baseando-se no teste *bootstrap*, além de ter apresentado baixíssima variabilidade com as sequências de *T. turbinata*.

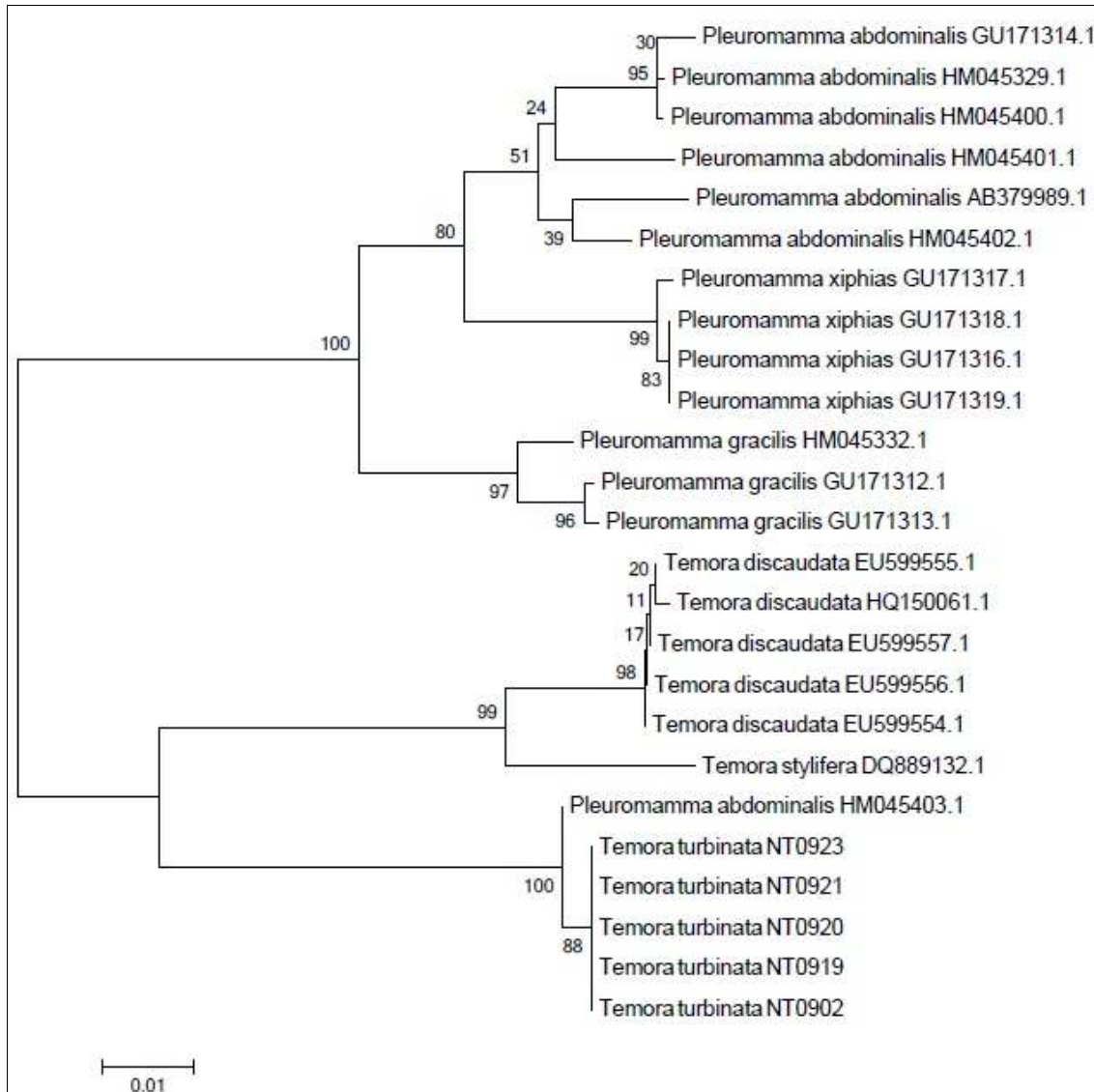


Figura 8- Árvore Neighbor-Joining, utilizando o modelo Kimura- 2 parâmetros e teste *bootstrap* com 1.000 réplicas, construída a partir de espécies dos gêneros *Pleuromamma* e *Temora*, mostrando que a sequência de *Pleuromamma abdominalis* disponível no Genbank (acesso HM045403.1) possivelmente não representa essa espécie, considerando que esta sequência mostrou-se muito distante das espécies congênicas e muito próxima do grupo de *Temora turbinata*.

4.3 Diversidade Molecular

As médias das distâncias intraespecíficas das 183 sequências analisadas estão apresentadas na tabela 2. As espécies *C. longirostris* e *C. rogercresseyi*, obtidas no Genbank, e *Centropages furcatus*, coletada na Praia do Náutico, não apresentaram variabilidade genética significativa. O harparcticóide *Tigriopus californicus* mostrou a maior variação nucleotídica intraespecífica, no valor de 18,7%, e a média da distância interespecífica de todas as sequências foi de 32,7%. O cálculo da distância não corrigida não foi feito para *Caligus belones*, *Caligus* sp. e *Temora stylifera*, pois só um indivíduo de cada espécie estava disponível.

Tabela 2- Distância não corrigida intraespecífica, considerando as três posições do códon; n representa o número de sequências analisadas para cada espécie.

Espécie	Genbank	Praia Náutico	n	d
<i>Acartia bifilosa</i>	x		7	0,005
<i>Acartia discaudata</i>	x		8	0,005
<i>Acartia tonsa</i>	x		8	0,090
<i>Acartia lillgeborgi</i>		x	3	0,001
<i>Aetideus acutus</i>	x		3	0,016
<i>Calanus agulhensis</i>	x		5	0,004
<i>Calanus sinicus</i>	x		5	0,004
<i>Caligus longirostris</i>	x		3	0,000
<i>Caligus belones</i>	x		1	-
<i>Caligus</i> sp.		x	1	-
<i>Caligus rogercresseyi</i>	x		2	0,000
<i>Centropages furcatus</i>	x		3	0,138
<i>Centropages furcatus</i>		x	2	0,000
<i>Centropages typicus</i>	x		8	0,008
<i>Centropages violaceus</i>	x		3	0,004
<i>Clausocalanus arcuicornis</i>	x		5	0,012
<i>Clausocalanus lividus</i>	x		5	0,039
<i>Corycaeus affinis</i>	x		3	0,002
<i>Euaugaptilus gracilis</i>	x		3	0,001
<i>Euaugaptilus magnus</i>	x		3	0,018
<i>Hemidiaptomus ingens</i>	x		6	0,105
<i>Oithona dissimilis</i>	x		6	0,129
<i>Oithona similis</i>	x		7	0,003
<i>Paracalanus parvus</i>	x		7	0,088
<i>Paracartia grani</i>	x		7	0,012
<i>Parvocalanus crassirostris</i>	x		3	0,004

<i>Parvocalanus crassirostris</i>		x	2	0,002
<i>Pleuromamma abdominalis</i>	x		7	0,154
<i>Pleuromamma gracilis</i>	x		3	0,068
<i>Pleuromamma xiphias</i>	x		4	0,001
<i>Pseudodiaptomus koreanus</i>	x		4	0,018
<i>Pseudodiaptomus acutus</i>		x	2	0,005
<i>Sapphirina metallina</i>	x		3	0,052
<i>Sapphirina opalina</i>	x		3	0,031
<i>Schizopera leptafurca</i>	x		6	0,012
<i>Tigriopus californicus</i>	x		8	0,187
<i>Tigriopus japonicus</i>	x		5	0,002
<i>Temora stylifera</i>	x		1	-
<i>Temora discaudata</i>	x		5	0,003
<i>Temora turbinata</i>		x	5	0,004
<i>Undinula vulgaris</i>	x		8	0,057

O gráfico 1 ilustra as frequências das médias da distância não corrigida intraespecífica, mostrada detalhadamente na tabela anterior. A maior frequência foi na faixa entre 0 e 5%, representada por 25 espécies. Apenas duas espécies, *Pleuromamma abdominalis* e *Tigriopus californicus*, apresentaram distâncias maiores que 15%.

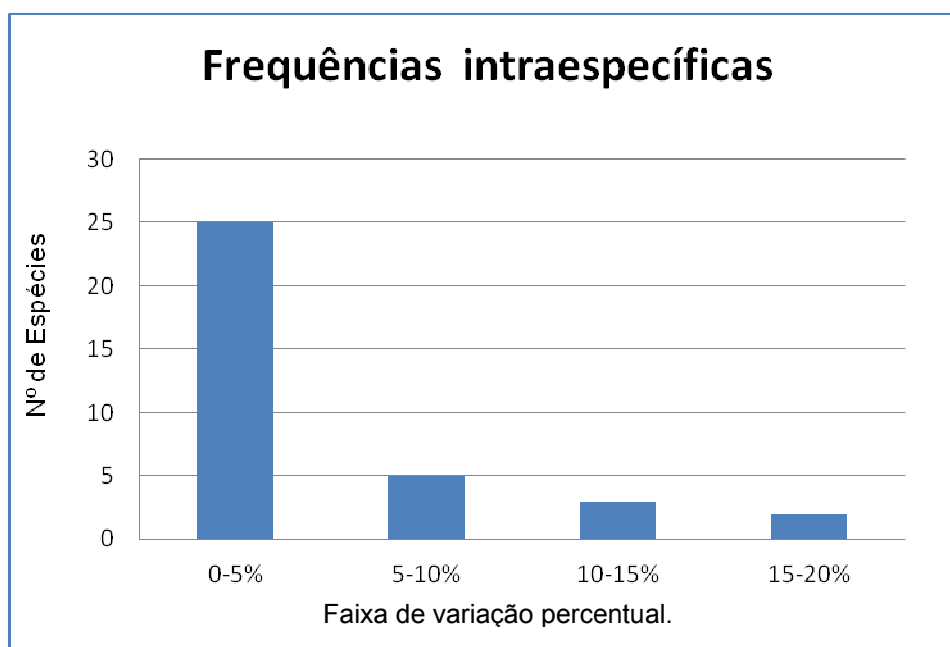


Gráfico 1- Frequência das médias das distâncias não corrigidas intraespecíficas, indicando que a maior frequência foi na faixa de 0-5%, representada por 25 espécies de copépodes.

Dentre os 20 gêneros analisados no presente estudo foi calculada a média da distância não corrigida entre espécies congênicas apenas para doze gêneros: *Acartia*, *Calanus*, *Caligus*, *Centropages*, *Clausocalanus*, *Oithona*, *Pleuromamma*, *Sapphirina*, *Tigriopus*, *Temora*, *Euaugaptilus* e *Pseudodiaptomus*. Isso se deu porque para oito gêneros só havia sequências nucleotídicas de uma única espécie, não sendo possível, portanto, calcular a distância entre diferentes espécies congênicas. O gráfico 2 mostra que a maior frequência da média da distância não corrigida dentro de cada gênero apresentou-se na faixa de 15 a 20%, compreendendo sete gêneros: *Acartia*, *Caligus*, *Centropages*, *Oithona*, *Pleuromamma*, *Sapphirina* e *Tigriopus*. O gênero *Clausocalanus* apresentou variação de 9,8% e os gêneros *Temora*, *Euaugaptilus* e *Pseudodiaptomus* apresentaram em torno de 14% de variabilidade. Através da comparação dessas distâncias, foi possível observar que o gênero *Oithona* apresentou maior variabilidade, equivalendo a 19,5%. A menor distância foi observada entre espécies do gênero *Calanus*, no valor de 0,4%, o que está muito abaixo da média entre os gêneros analisados, cujo valor foi 14,7%.

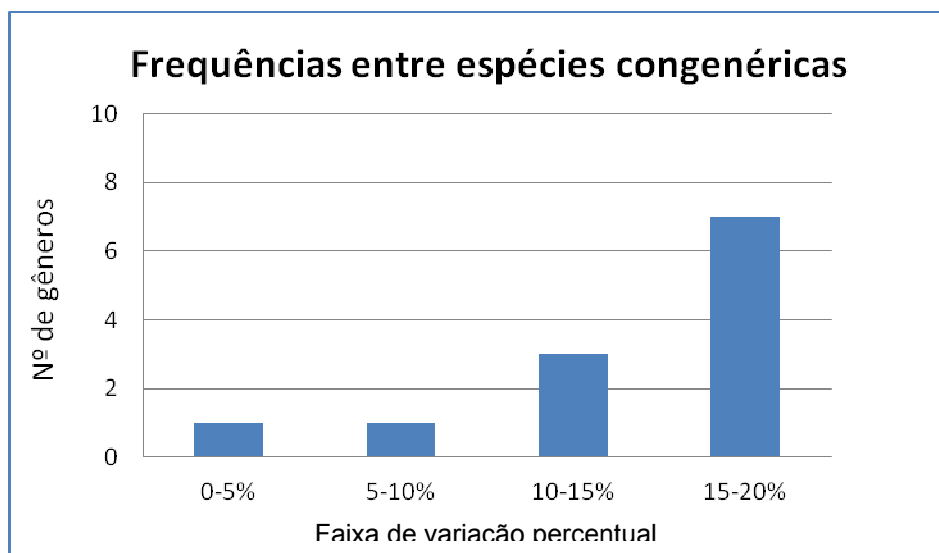


Gráfico 2- Frequência das médias das distâncias não corrigidas entre espécies congênicas, indicando que a maior frequência foi na faixa de 15-20%, representada por sete espécies de copépodes.

5 DISCUSSÃO

Uma vantagem de ter sido construído um dendograma UPGMA para as espécies de *Temora* foi a fácil observação da grande distância, equivalente a 16% de variabilidade, entre *Temora turbinata* e as sequências de *T. discaudata* e *T. stylifera*. Porém, não podemos fazer afirmações sobre o status taxonômico de *T. turbinata* com base em apenas análises parciais do gene COI. É necessário que sejam feitas análises de outros genes para essas espécies como, por exemplo, os genes nucleares rRNA 18S e 28S ou o gene Citocromo *b* mitocondrial, comumente usados em análises de filogenia molecular de copépodes (BLANCO-BERCIAL, BRADFORD-GRIEVE, BUCKLIN, 2011; KOZOL, BLANCO-BERCIAL, BUCKLIN, 2012; LAAKMANN, HOLGER, KOCHZIUS, 2012).

Em relação às análises moleculares, ainda existe uma carência de informações para a espécie *T. turbinata*, onde não estão disponíveis sequências de nucleotídeos em bancos de dados mundiais. Em adição a isso, até o momento, também não existem trabalhos publicados sobre filogenia molecular dessa espécie.

A introdução de *T. turbinata* no Brasil foi possivelmente causada pelas águas de lastro de navios oriundos do Indo-Pacífico e sua distribuição pelas águas brasileiras se dá através das correntes marítimas (CUNHA, 2008). A proximidade da praia do Náutico com o porto do Mucuripe pode explicar o fato dessa espécie ter sido abundantemente encontrada em todas as datas de amostragem.

Em relação às espécies *Acartia lilljeborgii*, *Temora turbinata* e *Pseudodiaptomus acutus*, encontradas na praia do Náutico, é importante salientar que sequências do gene COI para essas espécies são inéditas em bancos de dados mundiais. Através dos resultados obtidos nesse estudo foi possível perceber que, dentre as quatro espécies de *Acartia* analisadas, *Acartia lilljeborgii* apresentou-se intimamente inserida no grupo de suas espécies congênicas. *Pseudodiaptomus acutus*, assim como *T. turbinata*, mostrou-se muito distante de sua espécie congênica, *P. koreanus*, fazendo com que seu status taxonômico seja questionado.

Um estudo feito entre famílias de Calanoida mostrou que as relações filogenéticas entre a família Centropagidae são bem resolvidas (BLANCO-BERCIAL, BRADFORD-GRIEVE, BUCKLIN, 2011). Os autores fizeram a análise de quatro genes diferentes, inclusive COI mitocondrial. Isso dá suporte ao resultado obtido no presente trabalho, onde foram analisadas três espécies diferentes de *Centropages*, mostrando também pequenas distâncias entre o gênero. Entretanto, para a espécie *Centropages furcatus*, comparando-se as sequências dos organismos obtidos no presente estudo com sequências de referência do GenBank, foi observada uma distância maior do que para as outras espécies de *Centropages*. As diferenças observadas entre essas amostras poderiam ser atribuídas ao fato de serem populações distintas.

O fato de *Pleuromamma* ter sido um dos dois gêneros que apresentou maior variabilidade genética, juntamente com *Tigriopus*, pode ser devido à sequência de *Pleuromamma abdominalis* (nº de acesso HM045403.1, GenBank) provavelmente não representar esta espécie. Tanto na árvore de máxima verossimilhança (Figura 7) quanto na árvore Neighbor-Joining (Figura 8), a referida sequência mostrou-se mais próxima das espécies de *Temora turbinata* e muito distante das demais sequências de *Pleuromamma*, inclusive sequências de *Pleuromamma abdominalis*. Apesar disso, a porcentagem de divergência no valor de 18,4% para esse grupo está dentro da faixa de divergência entre espécies congêneras de copépodes, que varia de 9-24%, com base no gene COI mitocondrial, encontrada por BUCKLIN *et. al* (2003). Os valores das distâncias encontradas para os outros gêneros analisados nesse estudo também estão dentro dessa faixa de 9-24%, exceto para o gênero *Calanus*, cujas sequências foram obtidas no GenBank, que apresentou divergência de 0,4%.

De acordo com KOZOL *et al.* (2012) existem mais diferenças genéticas entre populações isoladas geograficamente do que entre as espécies *Calanus agulhensis* e *C. sinicus*. Isso vai de acordo com o resultado encontrado nesse trabalho, onde a variabilidade genética encontrada entre essas duas espécies de *Calanus*, no valor de 0,4%, está muito abaixo da média, em comparação com os resultados obtidos para os demais gêneros.

Algumas espécies de *Caligus* parasitam brânquias de peixes, podendo causar grandes impactos no setor pesqueiro. Entretanto, seguindo o padrão

para a maioria dos grupos de copépodes, a carência de publicações filogenéticas dificulta muitos tipos de estudos. Na árvore de verossimilhança apresentada através da figura 6, *Caligus* sp. ficou próximo de outras espécies do mesmo gênero. Entretanto, quando analisado numa visão mais ampla, como foi observado na árvore da Figura 7, onde foram inclusos mais exemplares de espécies diferentes, foi observado que o *Caligus* sp, encontrado na praia do Náutico, está muito distante das outras espécies de *Caligus*. Anteriormente à construção das árvores filogenéticas tinha sido observado, através do uso das ferramentas blast do GenBank, que essa sequência de *Caligus* sp. da praia do Náutico não apresentou semelhanças confiáveis com nenhuma sequência disponível no GenBank. A busca feita no site do BOLD também não teve sucesso, onde nenhuma sequência de nucleotídeo semelhante foi encontrada.

Apesar disso, mesmo que essa sequência seja muito diferente, em comparação com outras sequências parciais do gene COI de espécies de *Caligus*, ou de Copépodes em geral, não podemos afirmar que esta sequência não representa uma espécie do gênero *Caligus*. A separação dos organismos para identificação genético-molecular foi feita por meio da taxonomia tradicional, com base em características morfológicas do grupo, não podendo ser facilmente descartada devido às diferenças moleculares encontradas para o gene COI. É importante considerar que ainda não existe nenhum estudo a nível molecular para espécies de *Caligus* encontradas na costa cearense. Muitos questionamentos surgem a partir desses resultados, porém é necessário que seja feito um estudo mais abrangente, avaliando uma maior quantidade de sequências e nucleotídeos dessa espécie, inclusive para diferentes genes.

Oithona tem sido descrito como o copépode mais abundante no mundo, ocorrendo em todos os oceanos, onde o número de publicações relacionadas a esse grupo levantam a questão de esse ser o grupo de copépodes mais importante no ambiente marinho (GALLIENNE; ROBINS, 2001), porém ainda existem muitas ambiguidades dentro desse gênero. As sequências de *Oithona similis* e *O. dissimilis*, analisadas neste estudo, foram submetidas diretamente ao GenBank, não tendo seus resultados expostos e discutidos em nenhum

artigo, o que dificultou um estudo mais detalhado sobre as sequências do gene COI para essas espécies.

Em geral, para os gêneros em que apenas uma espécie foi analisada, as comparações filogenéticas feitas em nível de família foram bem suportadas, estando de acordo com os resultados obtidos por BLANCO-BERCIAL, BRADFORD-GRIEVE e BUCKLIN (2011).

5 CONCLUSÕES

O sucesso na amplificação do gene COI mitocondrial de seis espécies de copépodes encontrados na praia do Náutico permitiu identificar o status taxonômico atual das espécies *Acartia lilljeborgii*, *Parvocalanus crassirostris* e *Centropages furcatus*, em comparação com outras sequências de nucleotídeos dessas espécies, que estão disponíveis em bancos de dados mundiais.

As espécies *Pseudodiaptomus acutus* e *Caligus* sp, entretanto, ainda tem seu status taxonômico questionado, considerando que mostraram-se muito distantes das sequências congênicas, disponíveis no GenBank, utilizadas como referência. A variabilidade genética intraespecífica da espécie invasora *Temora turbinata* foi baixa e está dentro da média para as espécies de Calanoida. Entretanto, o seu status taxonômico também é questionado.

A análise das sequências parciais do gene COI de diferentes grupos de copépodes permitiu diagnosticar que existem problemas atuais em relação ao status taxonômico de algumas espécies catalogadas e disponíveis em bancos de dados genéticos mundiais. Este estudo pode servir como base para estudos futuros, considerando que é pioneiro em filogenia molecular de copépodes para a região do Ceará.

6 REFERÊNCIAS

ALI-KHAN, S. 2006. **Adults and Copepodite Stages of *Temora turbinata* (Copepoda: Calanoida) from the Indian Ocean.** *Pakistan J. Zool.*, vol. 38(3), pp. 201-205.

ARA, K. 2002. **Temporal variability and production of *Temora turbinata* (Copepoda: Calanoida) in the Cananéia Lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil.** *Scientia Marina*, 66 (4): 399-406.

BLANCO-BERCIAL, L.; BRADFORD-GRIEVE, J.; BUCKLIN, A. 2011. **Molecular phylogeny of the Calanoida (Crustacea: Copepoda).** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 59, 103–113.

BONECKER, S.L.C (Ed.). 2006. **Atlas de zooplâncton da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira.** Rio de Janeiro, Museu Nacional, Série Livros 21.

BRANDINI, F. P., *et al.* 1997. **Planctonologia na plataforma continental do Brasil: diagnose e revisão bibliográfica .** MMA : CIRM : FEMAR. 196 p

BRADFORD, J. M. (1977): **Distribution of the pelagic copepod *temora turbinata* in New Zealand coastal waters, and possible trans-tasman population continuity.**

New Zealand. *Journal of Marine and Freshwater Research*, 11:1, 131-144.

BUCKLIN *et. al.* 2003. **Molecular systematic and phylogenetic assessment of 34 calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae.** *Marine Biology*, 142: 333-343. DOI 10,1007/s00227-002-0943-1.

CAVALCANTI, E. A. H; LARRAZÁBAL, M. E. L. 2004 **Macrozooplâncton da Zona Econômica Exclusiva do Nordeste do Brasil (segunda expedição oceanográfica – REVIZEE/NE II) com ênfase em Copepoda (Crustacea).** *Revista Brasileira de Zoologia* 21 (3): 467–475.

CARLTON, J. T. 1985. **Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organisms: the biology of ballast water.** *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 23: 313-371.

CHEN, G.; HARE, M. P. 2008. **Cryptic ecological diversification of a planktonic estuarine copepod, *Acartia tonsa***. *Molecular Ecology* 17: 1451–1468.

CUNHA, D. R. 2008. **Estudo comparativo dos copépodes *Temora stylifera* e *T. turbinata* na plataforma continental sudeste do Brasil no verão e inverno de 2002**. Dissertação. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.

FERNANDES-MATIOLI, F.M. de C. 2001. **Noções de Filogenética Molecular**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo-USP. *Biológico*, São Paulo, v.63, n.1, p.37-38, jan./dez.

GALLIENNE, C. P; ROBINS, D. B. 2001. **Is *Oithona* the most importante copepod in the world's oceans?**. *Journal of Plankton Research*. Volume 23, número 12, 1421-1432.

HAJTHILAK *et al.* 2010. **Study on the Molecular Variations among Marine Copepods (*Acrocalanus gracilis* and *Euterpina acutifrons*) Isolated from Vellar Estuary-South East Coast of India**. *Global Journal of Molecular Sciences*. 5 (1): 7-11.

HARRIS, R. P.; WIEBE, P.H.; LENZ, J.; SKJODAL, H.R. and HUNTLEY, M. (eds.) (2000) ICES. **Zooplankton Methodology Manual**. New York: Academic Press.

HEBERT, P. D. N., CYWINSKA, A.; BALL S.L; WAARD, J. R. 2003. **Biological identification through DNA barcodes**. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 313-321.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; WAARD, J.R. 2003. **Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species**. *Proc. R. Soc. Lond. B* 2003 270: S96-S99.

KOZOL, R.; BLANCO-BERCIAL, L.; BUCKLIN, A. 2012. **Multi-Gene Analysis Reveals a Lack of Genetic Divergence between *Calanus agulhensis* and *C. sinicus* (Copepoda; Calanoida)**. *PLoS ONE* 7(10): e45710. doi:10.1371/journal.pone.0045710

LAACKMANN, S.; HOLGER, A.; KOCHZIUS, M. 2012 **Evolution in the deep sea: Biological traits, ecology and phylogenetics of pelagic copepods**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 65, 535–546.

LAVERACK, M.S; TODD, C. D. **Coastal Marine zooplankton, a practical manual for students**. Cambridge, 1991.

LOPES, R. M. /IO-USP... [et al.], Editor. 2009. **Informe sobre as espécies exóticas invasoras marinhas no Brasil / Ministério do Meio Ambiente**. Brasília: MMA/SBF. 440 p.; il. color. (Série Biodiversidade, 33)

MAGALHÃES *et al.*, 2009. **Seasonal variation in the copepod community structure from a tropical Amazon estuary, Northern Brazil**. Anais da Academia Brasileira de Ciências (2009) 81(2): 187-197 (Annals of the Brazilian Academy of Sciences) ISSN 0001-3765 www.scielo.br/aabc.

MELO *et al.* 2008. **Variação nictemeral do macrozooplâncton na Barra Orange-canal de Santa Cruz, estado de Pernambuco (Brasil)**. Rev. Bras. Enga. Pesca 3(2).

MUXAGATA, E; GLOEDEN, I. M. 1995. **Ocorrência de *Temora turbinata* DANA, 1849 (Crustácea: Copépoda) no Estuário da Lagoa dos Patos,RS, Brasil**. NAUPLIUS, Rio Grande, 3: 163-164.

NEUMANN-LEITÃO *et al.* 1998. **Biodiversidade do Mesozooplâncton no Nordeste do Brasil**. Trab. Oceanog. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 26 (1): 27-34.

PAFFENHOFER, G. A.; MAZZOCCHI, M. G. **Vertical distribution of subtropical epiplanktonic copepods** . Journal of Plankton Research. Volume 25, Issue 9 Pp. 1139-1156.

PAGE & HOLMES, 1998. **Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach**. Blackwell Science Ltd. ISBN-0-86542-889-1.

PEREIRA, R. C; SOARES-GOMES, A. 2002. **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Interciência. 382 p. ISBN 8571930678.

RADULOVICI, A. E; ARCHAMBAULT, P; DUFRESNE, F. (2010). **DNA Barcodes for Marine Biodiversity: Moving Fast Forward?**. Diversity, 2, 450-472; doi:10.3390/d2040450. ISSN 1424-2818.

RATNASINGHAM , S. and HEBERT, P. D. N. 2007. **BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org)**. Molecular Ecology Notes. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678

TAMURA *et al.* 2011. **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** *Mol. Biol. Evol.* 28(10):2731–2739.

TEIXEIRA *et al.* 2010. **Bioinvasão Marinha: Os bivalves exóticos de substrato consolidado e suas interações com a comunidade receptora.** *Oecologia Australis.* 14(2): 381- 402.

THOPSON *et al.* 1997. **The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** *Nucleic Acids Research, Vol. 25, No. 24*

VEGA-PÉREZ & HEMANDEZ. 1997. **Composição e Distribuição da Família Paracalanidae (Copepoda: Calanoida) ao Largo de São Sebastião, Estado de São Paulo- Brasil, com Ênfase em Três Espécies de *Paracalanus*.** *Revista Brasileira de Oceanografia*, 45(1/2): 61-75. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

ZHANG *et al.* 2010. **Unexpected Dominance of the Subtropical Copepod *Temora turbinata* in the Temperate Changjiang River Estuary and Its Possible Causes.** *Zoological Studies* 49(4): 492-503.

**APÊNDICE A- TABELA INDICANDO A ORDEM E NÚMERO DE ACESSO
DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS COPÉPODES DISPONÍVEIS
NO GENBANK E ANALISADOS NO PRESENTE ESTUDO.**

Ordem/ Espécie	Número de acesso no GenBank
Calanoida	
<i>Acartia bifilosa</i>	EU599500.1
<i>Acartia bifilosa</i>	EU599501.1
<i>Acartia bifilosa</i>	EU599503.1
<i>Acartia bifilosa</i>	EU599504.1
<i>Acartia bifilosa</i>	EU599505.1
<i>Acartia bifilosa</i>	EU599506.1
<i>Acartia bifilosa</i>	EU599507.1
<i>Acartia discaudata</i>	HE863723.1
<i>Acartia discaudata</i>	HE863724.1
<i>Acartia discaudata</i>	HE863729.1
<i>Acartia discaudata</i>	HE863730.1
<i>Acartia discaudata</i>	HE863731.1
<i>Acartia discaudata</i>	HE863725.1
<i>Acartia discaudata</i>	HE863728.1
<i>Acartia discaudata</i>	HE863726.1
<i>Acartia tonsa</i>	EU016222.1
<i>Acartia tonsa</i>	EU016219.1
<i>Acartia tonsa</i>	HE647797.1
<i>Acartia tonsa</i>	HE647798.1
<i>Acartia tonsa</i>	JF304083.1
<i>Acartia tonsa</i>	JF304089.1
<i>Acartia tonsa</i>	JF304091.1
<i>Acartia tonsa</i>	JF304095.1
<i>Aetideus acutus</i>	EU599528.1
<i>Aetideus acutus</i>	EU599524.1

<i>Aetideus acutus</i>	EU599526.1
<i>Calanus agulhensis</i>	JF430014.1
<i>Calanus agulhensis</i>	JF430015.1
<i>Calanus agulhensis</i>	JF430012.1
<i>Calanus agulhensis</i>	JF430017.1
<i>Calanus agulhensis</i>	JF430019.1
<i>Calanus sinicus</i>	JF430039.1
<i>Calanus sinicus</i>	JF430040.1
<i>Calanus sinicus</i>	JF430041.1
<i>Calanus sinicus</i>	JF430043.1
<i>Calanus sinicus</i>	JF430044.1
<i>Centropages furcatus</i>	DQ889142.1
<i>Centropages furcatus</i>	HM045368.1
<i>Centropages furcatus</i>	HM045369.1
<i>Centropages typicus</i>	EU016221.1
<i>Centropages typicus</i>	GU132428.1
<i>Centropages typicus</i>	GU132423.1
<i>Centropages typicus</i>	GU132426.1
<i>Centropages typicus</i>	GU132417.1
<i>Centropages typicus</i>	GU132425.1
<i>Centropages typicus</i>	GU132419.1
<i>Centropages typicus</i>	GU132427.1
<i>Centropages violaceus</i>	GU171310.1
<i>Centropages violaceus</i>	GU171311.1
<i>Centropages violaceus</i>	HQ150059.1
<i>Clausocalanus arcuicornis</i>	GU171291.1
<i>Clausocalanus arcuicornis</i>	GU171292.1
<i>Clausocalanus arcuicornis</i>	JF279647.1
<i>Clausocalanus arcuicornis</i>	JF279649.1
<i>Clausocalanus arcuicornis</i>	JF279651.1
<i>Clausocalanus lividus</i>	GU171293.1
<i>Clausocalanus lividus</i>	GU171294.1
<i>Clausocalanus lividus</i>	GU171295.1

<i>Clausocalanus lividus</i>	JF279681.1
<i>Clausocalanus lividus</i>	JF279685.1
<i>Euaugaptilus gracilis</i>	GU171338.1
<i>Euaugaptilus gracilis</i>	GU171339.1
<i>Euaugaptilus gracilis</i>	GU171340.1
<i>Euaugaptilus magnus</i>	GU171342.1
<i>Euaugaptilus Magnus</i>	GU171343.1
<i>Euaugaptilus magnus</i>	GU171344.1
<i>Hemidiaptomus ingens</i>	JX945000.1
<i>Hemidiaptomus ingens</i>	JX945002.1
<i>Hemidiaptomus ingens</i>	JX944992.1
<i>Hemidiaptomus ingens</i>	JX944994.1
<i>Hemidiaptomus ingens</i>	JX944996.1
<i>Hemidiaptomus ingens</i>	JX944998.1
<i>Undinula vulgaris</i>	GU171332.1
<i>Undinula vulgaris</i>	GU171333.1
<i>Undinula vulgaris</i>	GU171334.1
<i>Undinula vulgaris</i>	GU171335.1
<i>Undinula vulgaris</i>	EU599559.1
<i>Undinula vulgaris</i>	EU599561.1
<i>Undinula vulgaris</i>	EU599562.1
<i>Undinula vulgaris</i>	EU599563.1
<i>Temora discaudata</i>	EU599554.1
<i>Temora discaudata</i>	EU599555.1
<i>Temora discaudata</i>	EU599556.1
<i>Temora discaudata</i>	EU599557.1
<i>Temora discaudata</i>	HQ150061.1
<i>Temora stylifera</i>	DQ889132.1
<i>Paracalanus parvus</i>	AF474111.1
<i>Paracalanus parvus</i>	EU856801.1
<i>Paracalanus parvus</i>	EU856802.1
<i>Paracalanus parvus</i>	EU856803.1
<i>Paracalanus parvus</i>	EU856804.1

<i>Paracalanus parvus</i>	HM045398.1
<i>Paracalanus parvus</i>	HQ150069.1
<i>Paracartia grani</i>	HE863733.1
<i>Paracartia grani</i>	HE863735.1
<i>Paracartia grani</i>	HE863737.1
<i>Paracartia grani</i>	HE863738.1
<i>Paracartia grani</i>	HE863739.1
<i>Paracartia grani</i>	HE863740.1
<i>Paracartia grani</i>	HE863741.1
<i>Parvocalanus crassirostris</i>	HM045395.1
<i>Parvocalanus crassirostris</i>	HM045396.1
<i>Parvocalanus crassirostris</i>	HM045397.1
<i>Pleuromamma abdominalis</i>	AB379989.1
<i>Pleuromamma abdominalis</i>	GU177314.1
<i>Pleuromamma abdominalis</i>	HM045400.1
<i>Pleuromamma abdominalis</i>	HM045400.1
<i>Pleuromamma abdominalis</i>	HM045401.1
<i>Pleuromamma abdominalis</i>	HM045402.1
<i>Pleuromamma abdominalis</i>	HM045403.1
<i>Pleuromamma abdominalis</i>	HM045429.1
<i>Pleuromamma gracilis</i>	GU171312.1
<i>Pleuromamma gracilis</i>	GU171313.1
<i>Pleuromamma gracilis</i>	HM045332.1
<i>Pleuromamma xiphias</i>	GU171316.1
<i>Pleuromamma xiphias</i>	GU171317.1
<i>Pleuromamma xiphias</i>	GU171318.1
<i>Pleuromamma xiphias</i>	GU171319.1
<i>Pseudodiaptomus koreanus</i>	DQ243988.1
<i>Pseudodiaptomus koreanus</i>	JX502994.1
<i>Pseudodiaptomus koreanus</i>	JX502995.1
<i>Pseudodiaptomus koreanus</i>	JX502996.1
Siphonostomatoida	
<i>Caligus belones</i>	AY861368.1

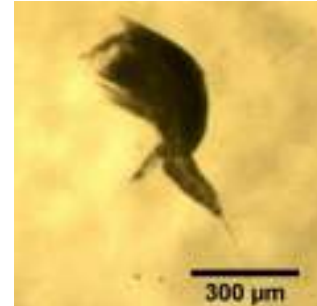
<i>Caligus longirostris</i>	HQ667341.1
<i>Caligus longirostris</i>	HQ667342.1
<i>Caligus longirostris</i>	HQ667343.1
<i>Caligus rogercresseyi</i>	HQ667348.1
<i>Caligus rogercresseyi</i>	HQ667349.1
Poecilostomatoida	
<i>Corycaeus affinis</i>	HQ718595.1
<i>Corycaeus affinis</i>	HQ718596.1
<i>Corycaeus affinis</i>	HQ718597.1
<i>Sapphirina metallina</i>	HM045344.1
<i>Sapphirina metallina</i>	GU171329.1
<i>Sapphirina metallina</i>	GU171330.1
<i>Sapphirina opalina</i>	JX503000.1
<i>Sapphirina opalina</i>	JX503001.1
<i>Sapphirina opalina</i>	JX503002.1
Harpacticoida	
<i>Tigriopus japonicus</i>	JN129177.1
<i>Tigriopus japonicus</i>	JN129178.1
<i>Tigriopus japonicus</i>	JN129179.1
<i>Tigriopus japonicus</i>	JN129180.1
<i>Tigriopus japonicus</i>	JN129181.1
<i>Tigriopus californicus</i>	JN129160.1
<i>Tigriopus californicus</i>	JN129164.1
<i>Tigriopus californicus</i>	JN129166.1
<i>Tigriopus californicus</i>	JN129168.1
<i>Tigriopus californicus</i>	JN129170.1
<i>Tigriopus californicus</i>	JN129172.1
<i>Tigriopus californicus</i>	JN129174.1
<i>Tigriopus californicus</i>	JN129176.1
<i>Schizopera leptafurca</i>	JQ390566.1
<i>Schizopera leptafurca</i>	JQ390568.1
<i>Schizopera leptafurca</i>	JQ390570.1
<i>Schizopera leptafurca</i>	JQ390574.1

<i>Schizopera leptafurca</i>	JQ390578.1
<i>Schizopera leptafurca</i>	JQ390582.1
Ciclopoida	
<i>Oithona dissimilis</i>	AB604158.1
<i>Oithona dissimilis</i>	AB604159.1
<i>Oithona dissimilis</i>	AB604160.1
<i>Oithona dissimilis</i>	AB604161.1
<i>Oithona dissimilis</i>	AB604162.1
<i>Oithona dissimilis</i>	AB604163.1
<i>Oithona similis</i>	JN230860.1
<i>Oithona similis</i>	JN230862.1
<i>Oithona similis</i>	JN230864.1
<i>Oithona similis</i>	JN230866.1
<i>Oithona similis</i>	JN230867.1
<i>Oithona similis</i>	JN230868.1
<i>Oithona similis</i>	JN230869.1

**APÊNDICE B- FOTODOCUMENTAÇÃO DOS COPÉPODES DA COSTA
MARINHA CEARENSE**



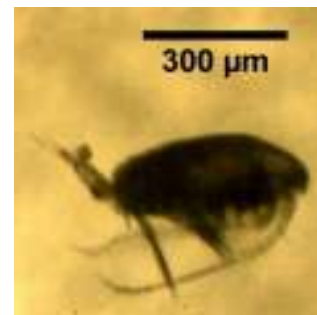
1. *Temora turbinata I*



5. *Euterpina acutifrons*



2. *Temora turbinata II*



6. *Parvocalanus crassirostris*



3. *Acartia lilljeborgii*



7. *Corycaeus amazonicus*



4. *Pseudodiaptomus acutus*



8. *Centropages furcatus*