

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Renato Brito de Oliveira Junior

**FERRAMENTAS MOLECULARES APLICADAS NA IDENTIFICAÇÃO DO
HIDROIDE INVASOR *Cordylophora caspia* (PALLAS, 1771)**

Belo Horizonte
2022

Renato Brito de Oliveira Junior

**FERRAMENTAS MOLECULARES APLICADAS NA IDENTIFICAÇÃO DO
HIDROIDE INVASOR *Cordylophora caspia* (PALLAS, 1771)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientação: Profa. Dra. Erika Cristina Jorge

Belo Horizonte

2022

043

Oliveira Junior, Renato Brito de.

Ferramentas moleculares aplicadas na identificação do hidroide invasor *Cordylophora caspia* (PALLAS, 1771) [manuscrito] / Renato Brito de Oliveira Junior. – 2022.

57 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Erika Cristina Jorge.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Espécies Introduzidas. 3. Hidrozoários. 4. DNA. 5. Ecossistema. 6. Centrais Hidrelétricas. I. Jorge, Erika Cristina. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE RENATO BRITO DE OLIVEIRA JUNIOR

356/2022 _ ENTRADA 2º/2020 _ 2020713041

Às **nove horas** do dia **31 de maio de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**FERRAMENTAS MOLECULARES APLICADAS NA IDENTIFICAÇÃO DO HIDRÓIDE INVASOR CORDYLOPHORA CASPIA (PALLAS, 1771)**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Erika Cristina Jorge**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	Aprovado
Dra. Lucília Souza Miranda	UFMG	Aprovado
Dra. Amanda Ferreira e Cunha	Universidade Federal de Viçosa	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 31 de maio de 2022.**

Dr^a. Erika Cristina Jorge (Orientadora)

Dr^a. Lucília Souza Miranda

Dr^a. Amanda Ferreira e Cunha

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Ferreira e Cunha, Usuário Externo**, em 31/05/2022, às 14:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 31/05/2022, às 14:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 31/05/2022, às 15:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucilia Souza Miranda, Professora do Magistério Superior**, em 01/06/2022, às 07:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1495237** e o código CRC **01650E8D**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos órgãos financiadores, à CEMIG/ANEEL pela realização dos P&Ds que impulsionam a pesquisa e a preciosa ciência brasileira. São essas iniciativas que de fato impulsionam o desenvolvimento do nosso país.

Agradeço à equipe do LABODE, em especial à professora Erika, por aguentar meus surtos e sempre trazer esperança e calma quando eu já não acreditava mais no meu próprio trabalho. Por topar entrar comigo nesse terreno pantanoso e desconhecido, e me ajudar a chegar até aqui. Agradeço ao Rayan, que desde quando nos conhecemos, durante minha iniciação científica, ainda na graduação, sempre foi um pai e um modelo de pesquisador a ser seguido. Obrigado por todo apoio de sempre e pelos ensinamentos. A Mariana (Queridona) que sempre esteve disponível e sempre foi uma referência quando eu me perdia em meio às sequências e ao que fazer com elas, que sempre me esperava para o café da manhã nos trabalhos de campo, mesmo eu tendo esquecido dela um dia. Aos demais “Labodeanos” que estiveram comigo no dia-a-dia dos experimentos, me ajudando a me sentir em casa, encontrar reagentes e usar equipamentos, meu muito obrigado. Às professoras Lucília e Amanda, muito obrigado por me introduzirem ao fantástico mundo dos cnidários. Sem a colaboração e cooperação de vocês eu jamais conseguiria sair do lugar com essa dívida que foi atribuída a mim chamada *Cordylophora*.

Ao CBEIH, esse grupo de grandes pesquisadores, que foram colegas de trabalho remoto durante os duros anos de pandemia. Em especial gostaria de agradecer à Kelly por todo o suporte de sempre, pelas tardes no Laboratório de Cultivo do mexilhão-dourado, pelos “momentos natureza” e, acima de tudo, por ser uma das pessoas mais leais que conheço. Esse mestrado jamais teria acontecido sem você. Agradeço também a Adriana e Gil, equipe de ouro da Fundação Gorceix. Obrigado por todos os abacaxis descascados, pepinos resolvidos, enfim, todo suporte. Vocês são demais.

Gostaria de agradecer aos periquitos pelos amigos que fiz, pelos ensinamentos que aprendi e por serem a companhia mais agradavelmente barulhenta durante incontáveis dias de isolamento social. Vocês chegaram despretensiosamente e hoje não consigo me imaginar sem vocês por perto. Obrigado, meus amigos de penas.

Aos meus pais por todo esforço em investir na minha educação, muitas vezes sacrificando o próprio tempo e os próprios sonhos. Muito obrigado pelo apoio e ajuda com os meninos, Bê e Sofs. Eles não poderiam ter melhores avós.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus filhos, que são a força que me motiva a seguir, que são a inspiração para que eu busque a cada dia ser uma pessoa melhor do que eu fui ontem. Bernardo e Sofia, vocês são meu norte e minha maior riqueza. É a vocês que eu dedico tudo que há de bom em mim, meus filhos. Obrigado. Papai ama vocês.

"A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos."

Marcel Proust

RESUMO

O estabelecimento de espécies invasoras é uma das principais ameaças à biodiversidade no planeta devido ao seu grande potencial em causar impactos, tanto econômicos como ecológicos. No caso de espécies aquáticas, um grupo especialmente problemático é o das incrustantes, já que elas podem formar biofilmes (microincrustação) ou colônias (macroincrustação) que rapidamente perturbam a composição das comunidades dos locais em que se instalam, competindo por substrato, liberando compostos tóxicos e/ou introduzindo doenças e patógenos associados, ainda não presentes naquele ecossistema. Estas espécies podem acometer usinas hidrelétricas, estações de tratamento e captação de água, causando diversos prejuízos econômicos relacionados à geração de energia e captação de água. *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771) é considerada uma espécie invasora, sendo um hidróide eurihalino, nativo dos mares Negro e Cáspio e que atualmente tem ampla distribuição global. No Brasil, é relativamente subnotificada e no estado de Minas Gerais foi registrada apenas nas usinas hidrelétricas de Funil e São Simão. Uma das formas de se evitar ou controlar invasões recentes é com a rápida detecção do organismo, antes que ele se estabeleça densamente em uma nova localidade. Uma vez que a identificação visual demanda de profissionais especializados, já que *Cordylophora* pode passar despercebida como uma alga ou macrófita para pessoas que não a conhecem, uma alternativa seria a utilização de técnicas de identificação molecular baseadas em DNA *barcoding*. Este trabalho teve como objetivo testar ferramentas moleculares já descritas na literatura que possam ser utilizadas na identificação de *Cordylophora caspia*. Nossos resultados indicaram que *primers* já descritos na literatura, desenhados com base em sequências de espécies filogeneticamente próximas, para a amplificação de fragmentos dos principais genes usados em DNA *barcoding* (COI, 16S e 28S), não foram consistentes em identificar sequências específicas quando usados em DNA isolado de hidrantes e gonóforos de exemplares de *C. caspia*. Além disso, este trabalho vem apresentar um novo registro da espécie na usina de Volta Grande, divisa de Minas Gerais e São Paulo.

Palavras-chave: Espécies invasoras; *Cordylophora*; DNA; ecossistemas; hidrelétrica.

ABSTRACT

The establishment of invasive species is one of the main threats to the planet's biodiversity due to their great potential to cause economic and ecological impacts. Considering aquatic species, a particularly problematic group is the one capable of fouling, as they can form biofilms (microfouling) or colonies (macrofouling) that quickly disrupt the communities composition where they settle, competing for substrate, releasing toxic compounds or even introducing associated diseases and pathogens alien in that ecosystem. These species can affect hydroelectric plants and water treatment plants, causing several economic losses related to energy generation and water capture. *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771) is considered an invasive species, as an euryhaline hydroid, native to the Ponto-Caspian region and nowadays has a wide global distribution. In Brazil, it is relatively underreported and in the Minas Gerais state, was only reported at the hydroelectric plant of Funil and São Simão. A way to avoid or control recent invasions is with the rapid detection of the alien species, before it becomes densely established in a new location. Since visual identification demands specialized professionals, once *Cordylophora* can be easily mistaken for an algae or macrophyte for people who do not know it, an alternative would be the use of molecular identification techniques based on DNA barcoding. This work aimed to test molecular tools already described in the literature to be used in the identification of *Cordylophora caspia*. Our results indicated that primers described in the literature, designed based on sequences from phylogenetic related species, to amplify fragments of the main genes used in DNA barcoding (COI, 16S and 18S) did not allow to consistently identify the specific sequences when used in DNA isolated from *C. caspia* hydrants and gonophores. Besides, this work presented a new record of the recently discovered population at the Volta Grande hydroelectric plant, in Grande river, on the border of Minas Gerais and São Paulo.

Keywords: Invasive species, *Cordylophora*, DNA, ecosystems, hydroelectric.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivos específicos.....	17
3	METODOLOGIA	18
3.1	Coleta e preparação das amostras.....	18
3.2	Extração de DNA.....	19
3.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	19
3.4	Purificação de amostras, sequenciamento e análise	22
4	RESULTADOS	23
4.1	Identificação de <i>C. caspia</i> na usina de Volta Grande.....	23
4.2	Amplificação do fragmento do gene que codifica para <i>COI</i> a partir de primers desenhados por Agostinis (2016) e Folmer (1994)	24
4.3	Amplificação do fragmento do gene que codifica para <i>16S</i> de <i>C. caspia</i>	29
4.4	Amplificação do fragmento do gene que codifica para <i>28S</i> de <i>C. caspia</i>	31
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÕES	40
6.1	Baixa confiabilidade nos primers existentes	41
6.2	Subnotificação do país	41
6.3	Pouco conhecimento do repertório genético do organismo e necessidade de genoma	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

Espécies que se encontram fora de seu ambiente natural são denominadas espécies exóticas invasoras (VITOUSEK *et al.*, 1997; PEJCHAR & MOONEY, 2009). As invasões biológicas por espécies não nativas provocam mudanças no ecossistema, afetando tanto o uso dos recursos naturais pelo homem, bem como as relações entre os seus diversos componentes (BOLTOVSKOY & CORREA, 2015).

O estabelecimento de espécies invasoras tem sido reconhecido na atualidade como uma das principais ameaças à biodiversidade no planeta. Em ambientes aquáticos, a água de lastro de navios se destaca como principal vetor de introdução de espécies não nativas (MACK *et al.*, 2000). Apesar de ser uma atividade constante, para que estas espécies se estabeleçam, é necessário que fatores atuem conjuntamente para que elas se fixem no novo ambiente. Variáveis como a ausência de predadores, alta plasticidade fenotípica e fisiológica e alta taxa de reprodução/crescimento são fundamentais para o bom estabelecimento de uma espécie não nativa (BOLTOVSKOY *et al.*, 2006).

Espécies invasoras podem causar tanto impactos econômicos como ecológicos e, no caso de espécies aquáticas, um grupo especialmente problemático é o das incrustantes. Elas podem formar biofilmes (microincrustação) ou colônias (macroincrustação) que rapidamente perturbam a composição das comunidades dos locais em que se instalam, competindo por substrato (DARRIGRAN & EZCURRA-DE-DRAGO, 2000), liberando compostos tóxicos e/ou introduzindo doenças e patógenos associados, ainda não presentes naquele ecossistema (NEVES & ROCHA, 2006). Quanto aos impactos econômicos, essas espécies são bastante conhecidas por sua ação em usinas hidrelétricas (UHE) e estações de tratamento e captação de água, sendo frequentemente relacionadas com o entupimento de tubulações, corrosão de estruturas de sustentação, oclusão de filtros, grades de contenção (PHILLIPS *et al.*, 2005) e trocadores de calor (REIS *et al.*, 2021). Além de gerar aumento no custo da manutenção e serviços associados ao monitoramento e controle biológico, a parada de máquinas, turbinas e isolamento

de determinadas tubulações, também leva a prejuízos econômicos relacionados à geração de energia e captação de água (REIS *et al.*, 2021).

Cordylophora caspia ((Pallas, 1771); Cordylophoridae, Anthoathecata) é considerada uma espécie invasora, sendo um hidróide eurihalino, nativo dos mares Negro e Cáspio. Atualmente existem registros desta espécie nos Estados Unidos, diversos rios e estuários europeus, Mar Báltico (FOLINO, 2000), Mar Mediterrâneo (MORRI, 1980), Ásia, Egito e Nova Zelândia (ZAMPONI, 1991). Na América Latina temos registros no México (HURLBERT & VILLALOBOS-FIGUEROA, 1982), Cuba (ZAMPONI, 1991), Uruguai (CORDERO, 1941) e Argentina (ZAMPONI, 1991). No Brasil acredita-se que *Cordylophora* tenha chegado pela bacia do Prata, sendo seu primeiro registro em 1991 no Rio Paraná (HADDAD & NAKATAMI, 1996). Existem também registros na bacia do Rio Iguaçu (LACTEC, 2008) e nos estados de São Paulo (SILVEIRA & BOSCOLO, 1996) e Rio de Janeiro (GROHMANN & BRUM, 2007). Em Minas Gerais, até o presente momento, são conhecidas duas populações que foram registradas em usinas hidrelétricas com considerável distância entre elas: Funil, no município de Lavras, e São Simão, na divisa de Minas Gerais com Goiás (dados ainda não publicados). Além destas populações, um novo registro foi identificado na UHE Volta Grande, divisa de Minas Gerais com São Paulo, como resultado do desenvolvimento deste trabalho.

Os indivíduos desta espécie se organizam em colônias estolonais ou arborescentes, que podem alcançar até 10 cm de altura (FOLINO, 2000). A espécie não apresenta forma medusóide, sendo o estágio de larva plânula sua única fase livre-natante e que aparece durante a reprodução sexuada (MORRI, 1981). É um predador passivo que se alimenta principalmente de zooplâncton, microcrustáceos, copépodos e náuplios que são aprisionados pelos gastrozoóides (GILI & HUGHES, 1995).

Cordylophora caspia cresce bem em temperaturas entre 8°C e 30°C, sendo a faixa ideal entre 18°C e 26°C (FULTON, 1962; FOLINO & INDELICATO, 2005). Variações de luz e pH não se mostram fatores que dificultam o estabelecimento e crescimento da espécie (FULTON, 1960), porém os níveis de O₂ são extremamente relevantes para sua boa manutenção (FULTON, 1962). O ciclo de vida acontece por meio de

regeneração-regressão e são bem demarcados pelo início do crescimento na primavera, a reprodução no verão e regressão no inverno (JORMALAINEN, 1994; DAMMSKI, 2008). No entanto, essa dinâmica pode ser afetada por fatores ecológicos adversos e esperados, como predação e competição (JORMALAINEN, 1994; TARDENT, 1963). Smith e colaboradores (2002) demonstraram que a espécie apresenta alterações morfológicas em habitats de baixa salinidade, como diferenças nos pólipos e formato das células e que, nessas condições, a taxa de crescimento e de reprodução diminui. Após o período de regressão, no inverno, vem uma grande onda de reprodução sexuada, precedido de um período de crescimento de hidrantes para a alimentação (JORMALAINEN, 1994). Nestes períodos de temperaturas baixas, a espécie sobrevive através de formas latentes de resistência chamadas menontes, que são fragmentos de tecido com propriedades regenerativas (FOLINO-ROREM & INDELICATO, 2005). Esses fragmentos também podem ficar suspensos na coluna d'água, fator que contribui para sua manutenção no meio e maior dificuldade no controle da espécie.

Um estudo realizado por Portella e Joukoski (2009) analisou se a bioincrustação conjunta causada por *Limnoperna fortunei*, o mexilhão-dourado, e *C. caspia* poderia causar deterioração e/ou perda de resistência mecânica em estruturas de concreto utilizados na construção do barramento e de usinas hidrelétricas. Após a remoção mecânica manual, somente a retirada de *C. caspia* demonstrou alterar a estrutura, uma vez que o cimento foi arrancado juntamente aos filamentos dos hidrozoários. Os autores sugeriram que o comprometimento do cimento se deu pela ação de ácidos orgânicos, produtos do metabolismo desta espécie; ou pelo uso de cálcio e silício presentes na composição do cimento, para a proliferação das colônias. Outro ponto interessante é que o estudo mostra que a colonização pelo hidróide se deu previamente à invasão por mexilhão-dourado, o que sugere que *Cordylophora caspia* possa atuar como um facilitador à instalação de *L. fortunei* em locais ainda não colonizados. Em 2021, da Silva Bertão e colaboradores publicaram um estudo em que avaliaram a incrustação de diversos grupos taxonômicos em uma usina no sul do Brasil. Neste trabalho foi observado que *Cordylophora* e *L. fortunei* possuem

uma interação complexa e que varia de acordo com o estágio de vida dos organismos. As larvas de mexilhão-dourado tem preferência por regiões com menor turbulência na coluna d'água (CATALDO & BOLTOVOSKOY, 1999; SYLVESTER *et al.*, 2007), e *Cordylophora* cria um micro hábitat tridimensional entre seus filamentos, favorecendo a fixação de larvas do molusco invasor. No entanto, As larvas de mexilhão-dourado recém chegadas por vezes podem acabar enredadas pelos hidrantes de *Cordylophora* se transformando em presas (OLENIN & LEPPÄKOSKI, 1999; FOLINO-ROREM *et al.*, 2006), ao passo que aquelas que conseguem se fixar começam a se desenvolver e disputar pelo substrato rígido (da SILVA BERTÃO *et al.*, 2021).

A capacidade de *Cordylophora* de habitar tanto água doce como salobra contribuiu de forma significativa para as inconsistências que encontramos no que tange sua taxonomia e incertezas acerca da sistemática do gênero (FOLINO, 2000; SCHUCHERT, 2004). A atual classificação taxonômica do gênero inclui duas espécies: *C. caspia* e *C. solangiae* (SCHUCHERT, 2022), porém, até pouco tempo atrás, pelo menos oito espécies eram consideradas válidas (*C. albicola*, *C. annulata*, *C. caspia*, *C. dubia*, *C. inkermanica*, *C. lacustris*, *C. pusilla* e *C. whiteleggi*). Alguns autores, por exemplo, se referiam a *C. caspia* e *C. lacustris* como sinônimos, enquanto outros acreditam que, embora parecidas morfológicamente, trata-se na verdade, de espécies distintas, com preferências de habitat diferentes, sendo *C. caspia* uma espécie de água salobra e *C. lacustris* de água doce (FOLINO, 2000; SCHUCHERT, 2004).

Em 2008, Folino-Rorem e Darling conduziram um estudo filogenético que comparou diferentes populações do gênero *Cordylophora* a fim de elucidar a taxonomia do grupo. Estes estudos revelaram um grande número de espécies crípticas e os autores sugeriram que os caracteres morfológicos utilizados para distinguir estas populações são importantes, mas não são suficientes para classificar uma espécie, dada sua grande variabilidade genômica (FOLINO, 2000; SMITH *et al.*, 2002; FOLINO-ROREM & DARLING, 2008). Eles também ressaltaram que o conhecimento sobre o repertório genético destas espécies é fundamental para

entender sua importante habilidade adaptativa nos mais diversos ambientes, o que garantiu seu sucesso como organismo invasor (FOLINO-ROREM & DARLING, 2008). Também em 2008, SCHABLE e colaboradores tentaram amplificar onze microssatélites para serem usados como DNA *barcoding* para *C. caspia*. O experimento contou com amostras da Califórnia (Lago Petaluma e Rio Napa), New Hampshire (Exeter), Alemanha (Rio Ryck) e Hungria (Lago Balaton). Os resultados apontaram que as sondas utilizadas não eram consistentes para amplificar todos os espécimes que, até então, eram classificados como *C. caspia*, reiterando a necessidade de uma reavaliação taxonômica e um maior entendimento do repertório genético da espécie.

É bem estabelecido que umas das principais formas de se evitar ou controlar invasões recém estabelecidas é com a rápida detecção do organismo naquele meio (PARA & DO SUL, 2007; VANDER ZANDEN & OLDEN, 2008). Por serem inespecíficas, medidas de controle populacional costumam se mostrar ineficientes após a instalação do agente invasor (FOLINO-ROREM, 2005; MANT *et al.*, 2012) e não terem efetiva aplicabilidade em ambientes abertos. Outro ponto importante é que populações distintas demonstram diferentes respostas a tratamentos idênticos (FOLINO-ROREM & INDELICATO, 2005); uma das possíveis consequências da incerteza taxonômica associada a complexos populacionais geneticamente distintos (FOLINO-ROREM & DARLING, 2009). Tomando por base estas premissas, faz-se necessário a padronização de formas de detecção rápida e específica de invasores como *C. caspia*.

DNA barcoding é uma abordagem molecular baseada na amplificação (Reação em Cadeia da Polimerase; PCR) e sequenciamento de fragmentos de DNA que possam ser utilizados na identificação de espécies. O gene da *Subunidade Citocromo C Oxidase I (COI)* foi o mais utilizado por muito tempo (HEBERT *et al.*, 2003) e, apesar de ser um marcador molecular amplamente usado para metazoários, este não se aplica a todos os organismos. A recorrência do uso desse marcador é devido sua alta representatividade e confiabilidade, uma vez que se trata de regiões de evolução rápida, permitindo assim, diferenciar espécies mesmo que tenham

divergido entre si recentemente (FREELAND, 2011). O gene do *RNA Ribossomal 16S* também é bastante utilizado com finalidade taxonômica e filogenética (BECKER *et al.*, 2004). Mesmo sendo considerado um método de referência para metagenômica em bactérias (NOLTE & CALIENDO, 2003), também pode ser aplicado a metazoários por ser um marcador mitocondrial bastante informativo na delimitação de linhagens, o que suporta o seu uso como *DNA barcoding* (LAAKMANN & HOLST, 2014; HE *et al.*, 2015). Tratando-se de hidrozoários, o gene 16S é largamente referenciado na literatura como um marcador útil para inferir relações entre as linhagens em níveis menos inclusivos (MOURA *et al.*, 2008; PEÑA CANTERO *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2013; CALDER *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2015). Alguns problemas na utilização do 16S como referência na montagem de árvores filogenéticas já foram reportados anteriormente na literatura, gerando árvores inconsistentes e divergentes de relações bem estabelecidas entre grupos consolidados, sugerindo diversas espécies crípticas dentro de uma população (CUNHA *et al.*, 2017). Essa situação geralmente é resolvida cruzando-se os dados com outro marcador de evolução mais lenta, como por exemplo o gene nuclear do RNA ribossomal 28S, que é um gene estrutural da subunidade grande dos ribossomos citoplasmáticos presente nos eucariotos (SCHUCHERT, 2014). Marcadores nucleares como o 28S são mais informativos em nível de família e gênero (GOVINDARAJAN *et al.*, 2006), além de aumentar a resolução e suporte de análises geradas por genes de evolução mais rápida.

Atualmente, os *primers* utilizados na detecção ambiental de *Cordylophora* são generalistas e passíveis de resultados pouco confiáveis e inconclusivos com relação à presença ou não deste organismo em amostras ambientais. Em 2016, Agostinis utilizou 34 sequências do gene mitocondrial *COI* disponíveis no *GenBank* para *C. caspia* e de espécies taxonomicamente próximas, dentro da família Oceanidae, a fim de obter uma região consenso conservada dentro da espécie. Testes *in silico* mostraram grande eficiência dos *primers* desenhados, porém não foram realizados testes em bancada para comprovar seu funcionamento na prática. Hoje, o conjunto de *primers* mais utilizado para amplificar o gene *COI* de *Cordylophora* é o que foi

proposto por Folmer e colaboradores (1994). Estes primers foram elaborados para amplificar um fragmento de 710 pares de base (pb) de, até então, onze diferentes filos de invertebrados: equinodermos, moluscos, anelídeos, pogonóforos, artrópodes, nemertinas, equiúros, sipúnculos, platelmintos, tardígrados e celenterados. Desde a realização deste trabalho, vários desses grupos foram desmembrados e realocados, ganhando diferentes status taxonômicos (ROUSE, 2001; HADDOCK, 2004; STRUCK et al., 2007). Em 2018, Mioduchowska e colaboradores desenvolveram um estudo baseado na aplicabilidade dos *primers* “universais” propostos por Folmer (1994). No estudo, os autores mostram que algumas sequências depositadas como invertebrados coincidem com sequências de procariotos previamente depositadas no *GenBank* e inclusive duas sequências, uma de um molusco (*Patelloida striata*) e outra de um gastrotricha (*Tetranchyroderma* sp.), foram recuperadas dentro da árvore de procariotos.

Baseado na ampla distribuição de *Cordylophora caspia* como invasor em nível global, na sua provável subnotificação de ocorrência no Brasil, adicionado às dificuldades apresentadas com a taxonomia do grupo, faz-se necessário testar ferramentas moleculares que possam ser utilizadas na identificação da espécie, como o proposto por esse trabalho, bem como apresentar um novo registro de *Cordylophora caspia* recém descoberta na usina hidrelétrica de Volta Grande, no Rio Grande, divisa de Minas Gerais e São Paulo.

2 OBJETIVOS

Desenvolver ferramentas moleculares aplicáveis para identificação molecular de *Cordylophora caspia* e contribuir com estudos moleculares acerca da espécie.

2.1 Objetivos específicos

- Testar a especificidade e aplicabilidade dos *primers* desenhados por Agostinis (2016), com alvo no gene *COI*, em amostras de DNA de *Cordylophora caspia* encontradas no Brasil;
- Testar a aplicabilidade e funcionalidade de três outros conjuntos de *primers* já utilizados na literatura (publicados por Folmer *et al.*, 1994; Cunningham and Buss, 1993; e Sogin and Edman, 1990) em amostras de DNA de *Cordylophora caspia* encontradas no Brasil;
- Discutir, a partir do sequenciamento dos *amplicons*, a confiabilidade dos dados obtidos e sua aplicabilidade.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta e preparação das amostras

As amostras de *C. caspia*, previamente identificadas por nosso grupo e depositadas no Centro de Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (# UFMG-INV 2000001, 2000002, 2000004, 2000005), advindas das UHE Funil e São Simão foram enviadas pela equipe das usinas. As amostras da UHE Volta Grande foram coletadas no dia 18 de outubro de 2021, como resultado deste trabalho. A coleta foi realizada manualmente (SISBIO 72222/19). As colônias foram acondicionadas em tubos de 50 mL com álcool 100% e posteriormente acondicionadas em caixa de isopor refrigerada, para que fossem transportadas até o Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Lá as amostras foram lavadas e o álcool substituído por um fresco na mesma concentração e acondicionadas a -18 °C.

Com auxílio de um microscópio estereoscópico, uma tesoura oftalmológica e uma pinça, foram separados os hidrantes e gonóforos do hidrozóário (Figura 1), que foram macerados para a extração de DNA total.

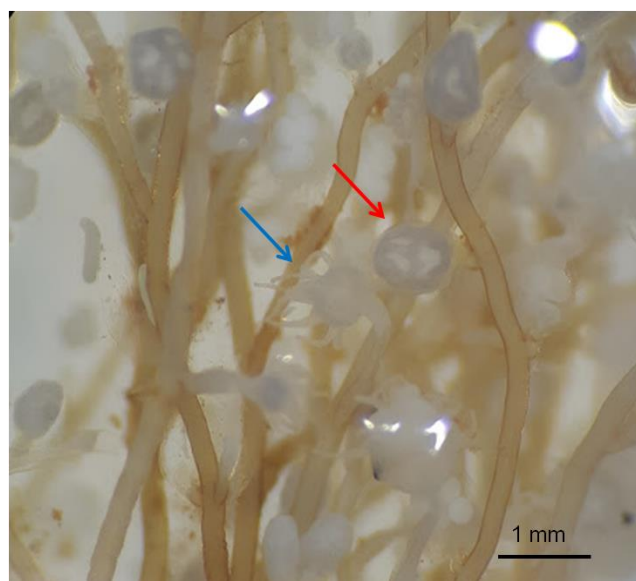


Figura 1. Na imagem podemos observar os gonóforos (seta vermelha), em que já se formam algumas larvas plânula, e hidrante com tentáculos (seta azul).

3.2 Extração de DNA

O protocolo utilizado na extração de DNA foi otimizado para Hydrozoa a partir do Kit de Extração DNAdvance (Agencourt). Resumidamente, cada amostra macerada foi digerida em 80 μ L tampão de lise (sendo composto de 73 μ L de Lysis Buffer, 3 μ L de DTT 1M e 4 μ L de Proteinase K), em banho seco, à 55 °C por 3 horas, com mistura em vórtex algumas vezes ao longo da digestão. As amostras foram então centrifugadas (*spin*) e a cada amostra foi adicionado 50 μ L do tampão BIND 1. Após mistura em vórtex, foi adicionado 80 μ L do tampão BIND 2 a cada amostra. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente (TA) por 1 minuto, seguida de uma incubação por 5 minutos em placa magnética. Após incubação, 150 μ L do sobrenadante de cada amostra foram descartados com o auxílio de uma pipeta. A amostra foi lavada com etanol 70% por três vezes, para a remoção do ferro contido na solução magnética (BIND 2). O álcool foi descartado e as amostras secas em TA por 15 a 20 minutos. As amostras foram então ressuspensas em 50 a 80 μ L do *ELUTION buffer*, e incubadas por mais 5 minutos na placa magnética. O DNA resultante foi transferido para um tubo novo, com cuidado para não misturá-lo ao ferro. O DNA total foi quantificado em Nanodrop Thermo 2000 a 260 nm.

3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Neste trabalho, nós utilizamos *primers* específicos obtidos *in silico* e *primers* generalistas já descritos na literatura para permitir a amplificação dos genes COI (publicado por Agostinis *et al.*, 2016 e Folmer *et al.*, 1994, respectivamente), 16S (Cunningham & Buss, 1993) e 28S (Sogin & Edman, 1990). As sequências dos *primers* e demais especificações encontram-se na Tabela 1.

Para cada reação de PCR foram adicionados de 0,5 μ M de cada *primer*, 10 μ L de PCR SUPERMIX (Thermo Fisher Scientific), 8 μ L de água para PCR e 1 μ L de DNA com aproximadamente 4 ng/ μ L de DNA, em um volume final de 20 μ L. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%.

Tabela 1. *Primers* específicos e generalistas usados para a amplificação do DNA de *C. caspia*. **primers F e R:** *forward* e *reverse*; **PCR:** reação em cadeia da polimerase; **pb:** pares de base.

Gene e Referência	Sequências dos <i>primers</i> F e R	[final] em 20 μ L	Programa da PCR	Amplicon (pb)
COI (Agostinis <i>et al.</i> , 2016)	GGTGAACAGTTTATCCACCAC GCTCCCATAATTGAAGAAGCTC	0,5 μ M	94°C 5 min; 30x (94°C 30 seg, 50°C 30 seg, 72°C 60 seg); 72°C 5 min; 4°C hold.	109
COI (Folmer <i>et al.</i> , 1994)	TCWACNAAYCAYAARGAYATTGG ACYTCNGGRTGNCCRAARARYCA	0,5 μ M	95°C 10 min; 40x (95°C 60 seg, 40°C 60 seg, 72°C 90 seg); 72°C 10 min, 4°C hold.	710

Gene e Referência	Sequências dos <i>primers</i> F e R	[final] em 20 µL	Programa da PCR	Amplicon (pb)
16S (Cunningham and Buss, 1993)	TCGACTGTTTACCAAAAACATAGC ACGGAATGAACTCAAATCATGTAAG	0,25 µM	94°C 5 min; 35x (94°C 20 seg, 55°C 20 seg, 72°C 60 seg); 72° 10 min, 4°C hold.	641
28S (Sogin and Edman, 1990)	ACCCGCTGAATTTAAGCATA AACCAGCTACTAGRYGGTTCGAT	0,25 µM	94°C 5 min; 35x (94°C 30 seg, 55°C 20 seg, 72°C 90 seg); 72°C 15 min, 4°C hold.	785

3.4 Purificação de amostras, sequenciamento e análise

Após confirmação da amplificação por eletroforese, os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit QIAquick PCR purification (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, inicialmente 5 volumes de PB buffer (~200 µL) foram adicionados em cada amostra de PCR. Após a mistura em vórtex, o volume total foi adicionado à coluna fornecida pelo kit e centrifugado a 13.400 r.p.m. por 60 seg. A coluna foi então lavada com 750 µL de buffer PE e novamente centrifugada por mais 60 seg. A coluna foi transferida para um tubo limpo de 1,5 mL e foi adicionado a ela 30 µL de água. Após incubação por 60 seg a TA, a coluna foi novamente centrifugada por 60 seg. A qualidade e concentração de cada amostra foi determinada em Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) e novamente em eletroforese em gel de agarose 1%.

As amostras foram então encaminhadas para o sequenciamento que foi realizado no Laboratório de Melhoramento de Plantas, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e no Instituto René Rachou (Fiocruz/MG), pelo método Sanger. Resumidamente, 10 ng de produto de PCR foram misturados à 2 µL de BigDye Terminator, 0,4 µL de BigDye Terminator buffer 5x, 0,5 µL do *primer* a 5 µM, com o volume completado para 10 µL com água. A reação de sequenciamento ocorreu a 95°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 20 seg, 50°C por 20 seg e 60°C por 4 min. Após purificação, o sequenciamento ocorreu em um equipamento Applied Biosystems ABI 3500 Genetic Analyzer.

As sequências resultantes do sequenciamento com os primers R foram convertidas no reverso-complemento, utilizando-se o programa Geneious (<https://www.geneious.com>). As sequências FASTA foram alinhadas utilizando-se os critérios padrão do programa para o alinhamento.

Todas as sequências (individuais e consenso resultantes dos alinhamentos) foram posteriormente comparadas com as sequências depositadas no *GenBank* utilizando-se a ferramenta Blastn do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) contra o banco de sequências de nucleotídeos não-redundante.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação de *C. caspia* na usina de Volta Grande

Em coletas anteriores realizadas na UHE Volta Grande, com o intuito de conseguir amostras de mexilhão-dourado, foram gerados registros fotográficos que posteriormente analisados, nos levou a crer na possibilidade de ocorrência de *Cordylophora caspia* naquela região (Figura 2A). Em outubro de 2021, foi organizada uma expedição para coletar amostras do que acreditávamos ser *C. caspia*, sendo assim confirmada a sua ocorrência nessa hidrelétrica (Figura 2B). No local da coleta foi possível observar colônias de *Cordylophora caspia* submersas, em meio a incrustação do mexilhão-dourado, no barramento de quebra de velocidade de água da captação para piscicultura da UHE de Volta Grande. Amostras foram coletadas para permitir a observação morfológica dos indivíduos no Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento (ICB-UFMG) (Figura 1).

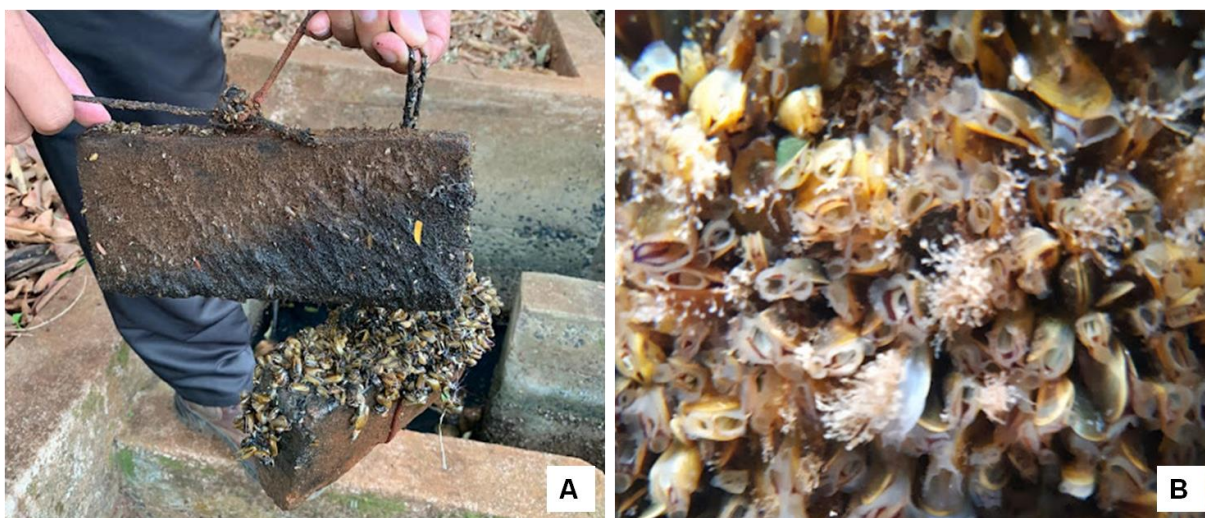
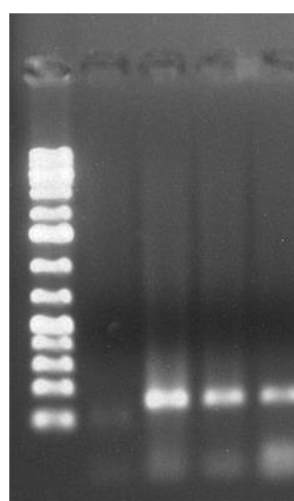


Figura 2. Colônias de *Cordylophora caspia* em meio a incrustação de *Limnoperna fortunei*. Em (A), armadilhas para incrustação com colonização de *Cordylophora* (placa superior em madeira) e mexilhão-dourado (placa inferior de tijolo sólido) (outubro/2020); em (B), colônias de *Cordylophora caspia* em meio a incrustação do *Limnoperna fortunei* identificada durante a realização deste trabalho no barramento de quebra de velocidade de água da captação para piscicultura da UHE de Volta Grande (outubro/2021).

4.2 Amplificação do fragmento do gene que codifica para *COI* a partir de primers desenhados por Agostinis (2016) e Folmer (1994)

Após obtenção e identificação morfológica de amostras de *C. caspia* presente nas UHE de Funil, São Simão e Volta Grande, seguimos para a tentativa da caracterização da espécie por *DNA barcoding*. O DNA de cada uma das amostras foi isolado para permitir a amplificação por PCR de fragmentos dos genes *COI*, *16S* e *28S* desta espécie.

O primeiro conjunto de *primers* a ser testado foi o proposto por Agostinis (2016) para permitir a amplificação de um fragmento de 109 pb (pares de base) do gene que codifica para o gene da subunidade do *COI* exclusivo para *C. caspia*. Um fragmento único de tamanho correspondente ao proposto pelo autor foi amplificado utilizando-se as amostras de DNA de *C. caspia* provenientes das UHE de Funil, São Simão e Volta Grande (Figura 3).



1 2 3 4 5

1. GeneRuler 1Kb Plus DNA ladder
2. Controle negativo*
3. DNA de *Cordylophora* de Volta Grande
4. DNA de *Cordylophora* de São Simão
5. DNA de *Cordylophora* de Funil

Figura 3. Eletroforese do produto amplificado a partir dos *primers* desenvolvidos por Agostinis (2016) para a amplificação do gene *COI* nas amostras de DNA de *Cordylophora* de Volta Grande, São Simão e Funil. Foi possível amplificar um fragmento de ~110 pb para todas as amostras contendo DNA. * O controle negativo foi obtido da reação sem DNA.

Foi possível obter quatro sequências destas amostras por sequenciamento, sendo apenas uma a partir do *primer* F (F1) e três a partir do *primer* R (R1-3). Não foi possível alinhar as quatro sequências em um único consenso, utilizando-se os critérios padrão do Geneious (Figura 4A). Mesmo assim, o BLASTN das sequências individuais foi realizado contra o banco de sequências não-redundantes do *GenBank*. Os resultados revelaram similaridade das sequências F1 e R1 geradas neste trabalho com a sequência do gene *COI* de *Halecium halecinum* (Hydrozoa, Leptothecata) (Figura 4B e C), enquanto as sequências R2 e R3 apresentaram similaridade com o gene *COI* de *Bougainvillia triestina* (Hydrozoa, Anthoathecata) (Figura 5A). A maioria dos *hits* encontraram similaridade com espécies de cnidários, com exceção de um hit com similaridade com a sequência *COI* de *Plakina nathaliae* (Porifera, Homoscleromorpha) (Figura 6).



Figura 4. Resultado do alinhamento e BLASTN das quatro sequências obtidas a partir do sequenciamento dos fragmentos de *COI* amplificados por PCR a partir de amostras de DNA de *Cordylophora*. Em (A), tentativa de alinhamento das quatro sequências pelo Geneious; em (B) e (C) resultados dos BLASTN contra o *Genbank*, mostrando similaridade com a sequência F1 (B) e R1 (C) com o gene *COI* de *Halecium halecinum*.

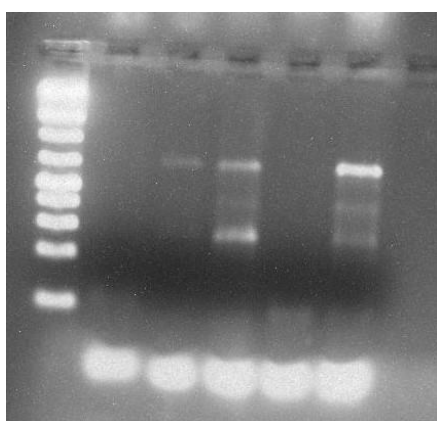
Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download		Select columns	Show	100				
<input checked="" type="checkbox"/> select all 14 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer 								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Bougainvillia triestina isolate btri-v cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Bougainvillia triestina	99.0	99.0	15%	6e-16	89.61%	562	KJ660343.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bougainvillia triestina isolate btri-m2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Bougainvillia triestina	99.0	99.0	15%	6e-16	89.61%	624	KJ660340.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. IM1 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Cordylophora sp.	95.3	95.3	15%	7e-15	88.46%	591	EF540787.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clytia gracilis voucher Brazil 5 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Clytia gracilis	89.8	89.8	14%	3e-13	88.00%	670	DQ068055.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clytia gracilis voucher 73NC cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Clytia gracilis	89.8	89.8	14%	3e-13	88.00%	658	AY789901.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pelagia sp. Plg_P6 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pelagia sp. Plg_P6	87.9	87.9	11%	1e-12	93.22%	629	KY655791.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hydractinia sp. HG JRH-2014 voucher XMHS1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Hydractinia sp. HG JRH-2014	84.2	84.2	11%	2e-11	91.67%	692	KF962140.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aglaoophenia rhynchocarpa voucher STR1 CJM82 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Aglaoophenia rhynchocarpa	76.8	76.8	11%	3e-09	89.83%	402	MH282628.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aglaoophenia rhynchocarpa voucher STR1 CJM7 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Aglaoophenia rhynchocarpa	76.8	76.8	11%	3e-09	89.83%	630	MH282627.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aglaoophenia rhynchocarpa voucher STR1 CJM26 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Aglaoophenia rhynchocarpa	76.8	76.8	11%	3e-09	89.83%	573	MH282626.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aglaoophenia rhynchocarpa voucher STR1 CJM8 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Aglaoophenia rhynchocarpa	76.8	76.8	11%	3e-09	89.83%	418	MH282625.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aglaoophenia rhynchocarpa voucher STR1 CJM18 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Aglaoophenia rhynchocarpa	76.8	76.8	11%	3e-09	89.83%	645	MH282624.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizophysa filiformis cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Rhizophysa filiformis	76.8	76.8	11%	3e-09	91.07%	658	AY937377.1
<input checked="" type="checkbox"/> Plakina nathaliae voucher 110611MT4TP2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Plakina nathaliae	65.8	65.8	11%	6e-06	86.44%	584	KU674377.1

Figura 5. Resultado do BLASTN da comparação das sequências R2 e R3 contra o banco não-redundante do *GenBank*. Tanto a sequência R2 quanto a R3 apresentaram similaridade com as mesmas espécies, sendo o primeiro *hit* para *Bougainvillia triestina*.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy
Reports				
Lineage		Organism	Taxonomy	
14 sequences selected				
Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Metazoa	animals		25	
• Cnidaria	cnidarians		22	
• Hydroidolina	hydrozoans		21	
• Filifera	hydrozoans		13	
• Bougainvillia triestina	hydrozoans	99.0	2	Bougainvillia triestina hits
• Cordylophora sp. IM1	hydrozoans	95.3	1	Cordylophora sp. IM1 hits
• Hydractinia sp. HG JRH-2014	hydrozoans	82.4	10	Hydractinia sp. HG JRH-2014 hits
• Clytia gracilis	hydrozoans	89.8	2	Clytia gracilis hits
• Aglaoophenia rhynchocarpa	hydrozoans	76.8	5	Aglaoophenia rhynchocarpa hits
• Rhizophysa filiformis	hydrozoans	76.8	1	Rhizophysa filiformis hits
• Pelagia sp. Plg_P6	jellyfishes	87.9	1	Pelagia sp. Plg_P6 hits
• Plakina nathaliae	sponges	67.6	3	Plakina nathaliae hits

Figura 6. Tabela contendo a taxonomia de todas as espécies com similaridade com as sequências R2 e R3 de *Cordylophora* obtidas neste trabalho, resultante do BLAST.

Folmer (1994) propôs um conjunto de *primers* “universais” para a amplificação do gene *COI* para invertebrados aquáticos de 11 filas taxonômicos válidos à época. Estes *primers* também foram testados neste trabalho. Ao fazer a extração de DNA, utilizamos triplicatas técnicas (três amostras da mesma colônia proveniente de Volta Grande, em três extrações de DNA independentes). Foi possível amplificar um fragmento de ~700 pb nas amostras 1 e 3 de Volta Grande (Figura 5, poços 4 e 6), embora elas não tenham gerado um único fragmento específico, como foi obtido na PCR realizada utilizando a amostra controle (Figura 5, poço 3). Não foi possível amplificar nenhum fragmento a partir da amostra 2 (Figura 5, poço 5).



1 2 3 4 5 6

1. GeneRuler 1Kb Plus DNA ladder
2. Controle negativo
3. DNA de *Cordylophora* de Volta grande (amostra 1)
4. DNA de *Cordylophora* de Volta Grande (amostra 1 diluída em 1:20)
5. DNA de *Cordylophora* de Volta Grande (amostra 2)
6. DNA de *Cordylophora* de Volta Grande (amostra 2 diluída em 1:20)

Figura 5. Eletroforese do produto amplificado a partir dos *primers* desenvolvidos por Folmer (1994) para a amplificação do gene *COI* nas amostras de DNA de *Cordylophora* de Volta Grande. O controle negativo foi obtido da reação sem DNA. Neste passo também foi testado a diluição do DNA total a fim de conseguir melhores resultados na amplificação.

Para sequenciar enviamos cada um dos produtos de PCR gerados pelas diferentes extrações de Volta Grande. Além disso, também utilizamos sequências oriundas de populações de São Simão e Funil, que recuperamos de extrações feitas previamente. Para nossa surpresa, as sequências que retornaram eram significativamente diferentes entre si, exigindo que fossem testados diversas combinações de sequências F e R para que fosse possível gerar um consenso (Figura 6). Diferente do fragmento amplificado pelos *primers* de Agostinis (2016), as sequências amplificadas pelos *primers* de Folmer, apesar de mostrarem bandas inespecíficas no gel de agarose, retornaram resultados de similaridade com outras sequências de *Cordylophora* já depositadas anteriormente no banco de dados do *GenBank*, apesar de em todos os casos, outros cnidários aparecerem com maior grau de similaridade (Figura 7).

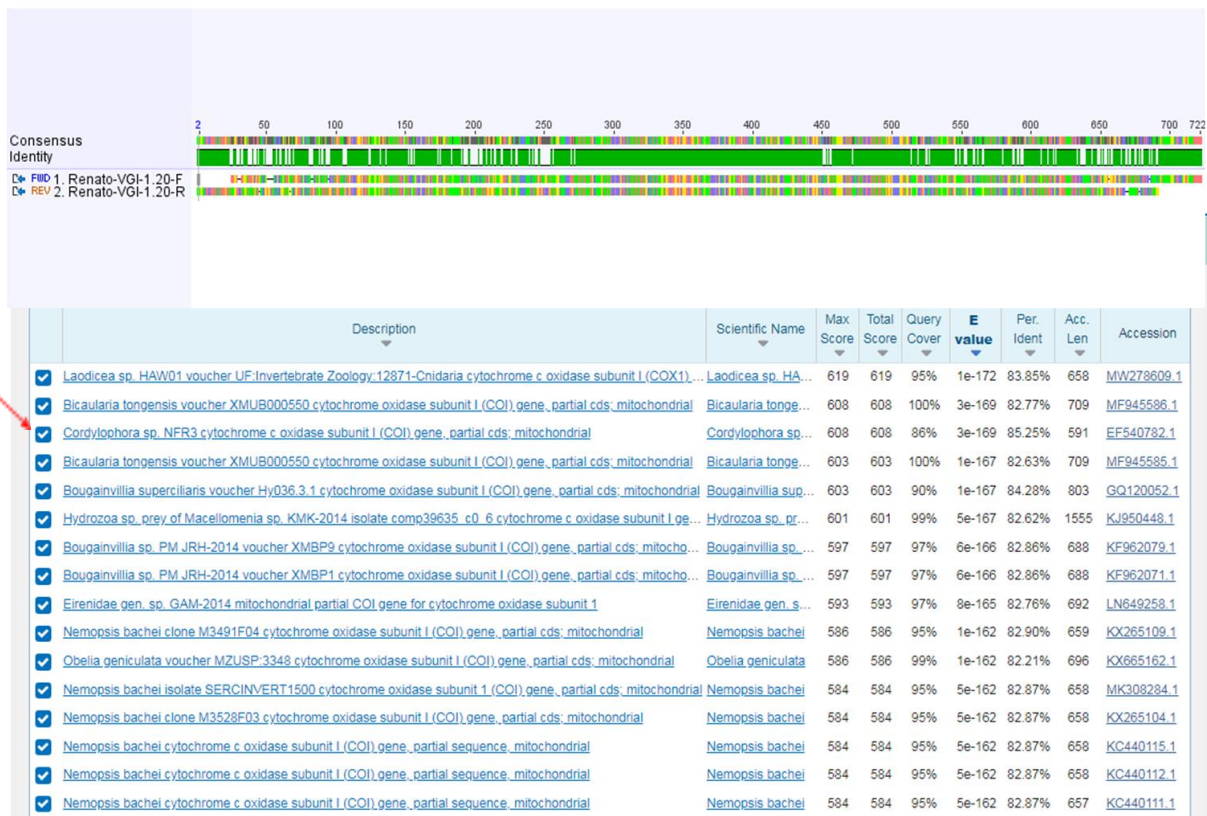


Figura 7. Resultado do BLASTN da comparação das sequências obtidas a partir do sequenciamento do produto amplificado com os *primers* do Folmer (1994) contra o banco não-redundante do *GenBank*.

4.3 Amplificação do fragmento do gene que codifica para 16S de *C. caspia*

Em 1993, Cunningham e Buss desenharam um conjunto de *primers* utilizando sequências de *Hydra vulgaris*, para amplificar o gene 16S. Estes *primers* também foram usados neste trabalho e permitiram a amplificação de fragmentos de DNA, com ~640 pb, de nossas amostras de *Cordylophora*, porém gerando bandas inespecíficas (Figura 8).

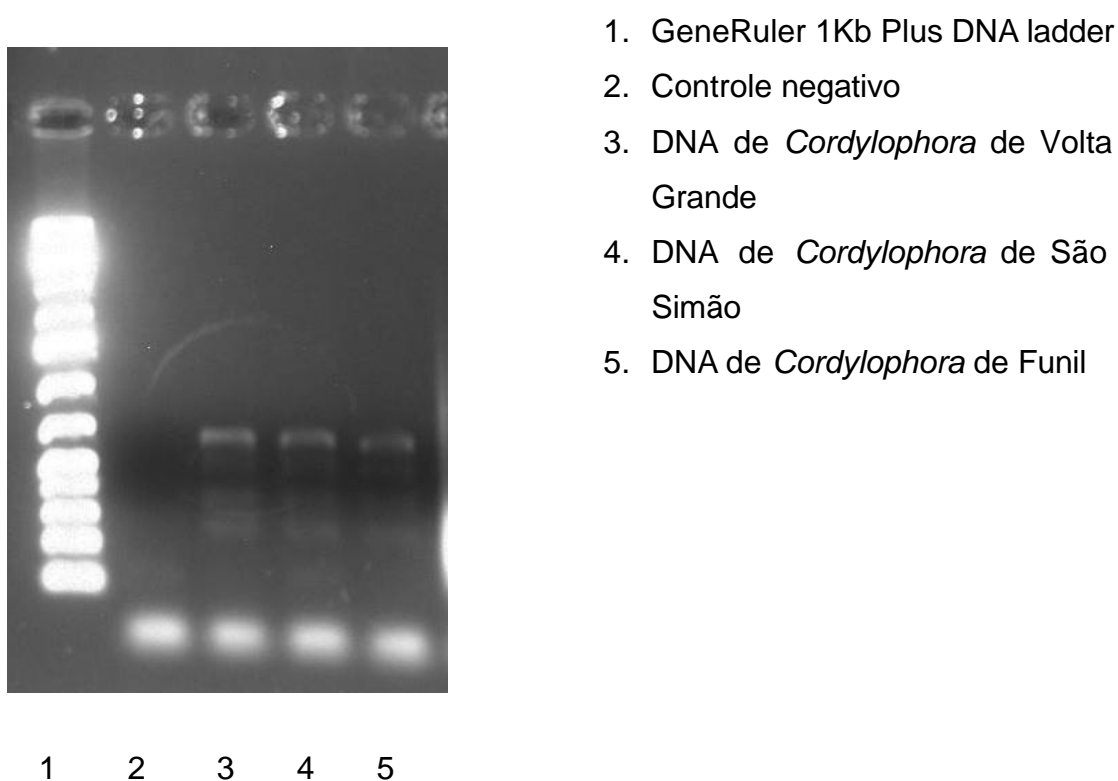
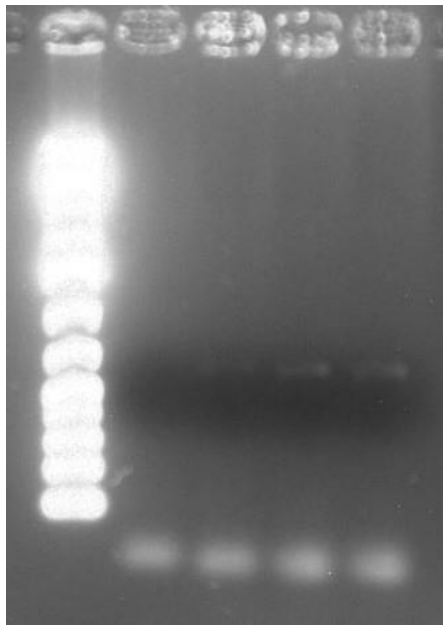


Figura 8. Resultado da amplificação do gene 16S de *Cordylophora caspia* pelos *primers* desenhados por Cunningham e Buss (1993). Uma banda de ~700 pb pode ser amplificada a partir das amostras de DNA de Volta Grande, São Simão e Funil. Porém, outras bandas menores puderam ser observadas no gel.

Para contornar a inespecificidade das bandas que apareciam no gel, foi preciso alterar o programa de ciclos da PCR até chegarmos nos parâmetros da tabela 1, que é diferente do que foi proposto anteriormente na literatura. Foi possível amplificar uma banda única de ~700 pb e desaparecer com as bandas inespecíficas, porém claramente havia menos material amplificado ao final da reação (Figura 9).



1 2 3 4 5

1. GeneRuler 1Kb Plus DNA ladder
2. Controle negativo
3. DNA de *Cordylophora* de Volta Grande
4. DNA de *Cordylophora* de São Simão
5. DNA de *Cordylophora* de Funil

Figura 9. Eletroforese do produto da PCR para o gene 16S utilizando-se os *primers* desenvolvidos por Cunningham e Buss (1993) nas amostras de DNA de *Cordylophora* obtidas neste trabalho.

Apenas os fragmentos obtidos a partir de amostras de DNA de São Simão e Funil retornaram sequências. Não foi possível obter sequências dos fragmentos amplificados nas amostras de Volta Grande. As sequências de São Simão e Funil comparadas ao *Genbank* apresentaram *hit* com *Cordylophora* (Figura 10) e formaram um consenso entre as sequências *forward* e *reverse* (Figura 11).

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download		Select columns	Show	100				
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer 								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora caspia 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Cordylophora ca...	375	375	97%	1e-99	91.27%	644	EU305472.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora caspia 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Cordylophora ca...	370	370	97%	6e-98	90.91%	622	KC489508.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. JC1 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Cordylophora sp...	368	368	91%	2e-97	92.28%	561	EF540813.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. IM1 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Cordylophora sp...	368	368	91%	2e-97	92.28%	564	EF540804.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. NFR5 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Cordylophora sp...	363	363	91%	9e-96	91.89%	559	EF540803.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. NFR9 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Cordylophora sp...	363	363	91%	9e-96	91.89%	560	EF540808.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. WH1 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Cordylophora sp...	363	363	91%	9e-96	91.89%	562	EF540796.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bimeria vestita mitochondrial partial 16S rRNA gene	Bimeria vestita	355	355	97%	2e-93	89.89%	599	AM183130.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. NFR3 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Cordylophora sp...	351	351	91%	2e-92	91.12%	559	EF540799.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizorhagium roseum isolate DNA690 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Rhizorhagium ro...	348	348	97%	3e-91	89.45%	596	MK073046.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. HG1 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Cordylophora sp...	346	346	91%	1e-90	90.73%	559	EF540802.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. NFR2 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Cordylophora sp...	346	346	91%	1e-90	90.73%	560	EF540798.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. NFR1 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Cordylophora sp...	346	346	91%	1e-90	90.73%	559	EF540797.1
<input checked="" type="checkbox"/> Garveia nutans isolate 860 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Garveia nutans	342	342	97%	1e-89	89.09%	597	KP776768.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizorhagium roseum isolate 955 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Rhizorhagium ro...	337	337	97%	6e-88	88.73%	597	KP776794.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hydractinia hooperi complex sp. 2 isolate 197 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Hydractinia hoop...	337	337	97%	6e-88	88.73%	586	FJ214499.1

Figura 10. Resultado do BLASTN da comparação da sequência consenso obtida a partir do sequenciamento do produto amplificado da população de *Cordylophora* de Funil com os *primers* do Cunningham e Buss (1993), contra o banco não-redundante do *GenBank*.

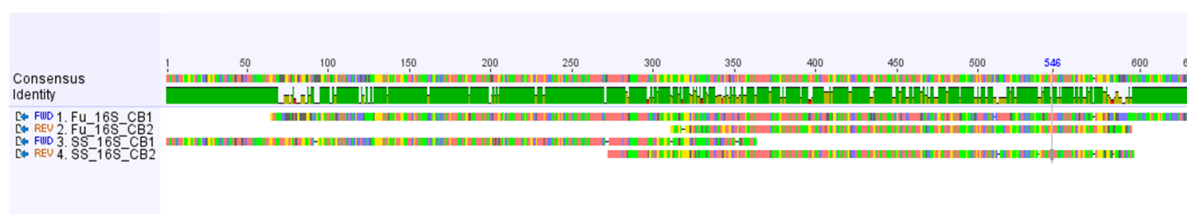
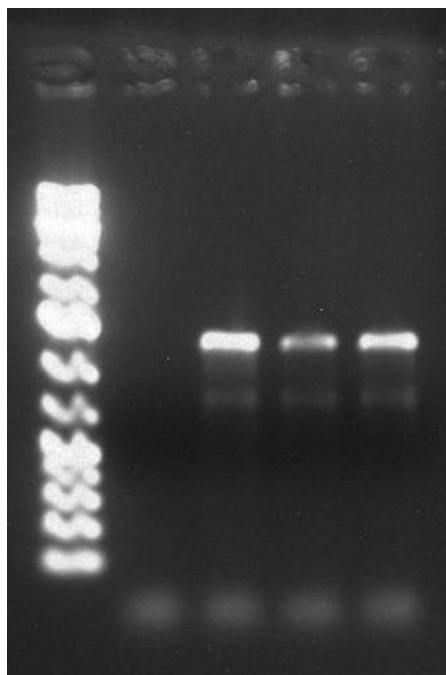


Figura 11. Consenso obtido a partir do alinhamento das sequências obtidas utilizando-se o par de *primers* desenhados por Cunningham e Buss (1993).

4.4 Amplificação do fragmento do gene que codifica para 28S de *C. caspia*

Os *primers* propostos por Sogin & Edman (1990) para a amplificação da subunidade grande do rRNA 28S já haviam sido utilizados anteriormente na literatura para amplificar *C. caspia* (FOLINO-ROREM, 2008). Apesar de tratar-se de um gene de evolução lenta e que dificilmente seria um bom *DNA barcoding* a nível específico,

o 28S poderia ser utilizado em análises posteriores entre as populações recém encontradas nos rios de Minas Gerais. As amplificações do 28S para *Cordylophora* geraram bandas consistentes, porém traziam consigo uma banda inespecífica de peso molecular pouco menor, que não foi possível remover alterando-se a reação para aumentar a especificidade dos *primers* (Figura 12).



1. GeneRuler 1Kb Plus DNA ladder
2. Controle negativo
3. DNA de *Cordylophora* de Volta Grande
4. DNA de *Cordylophora* São Simão
5. DNA de *Cordylophora* de Funil

1 2 3 4 5

Figura 12. Eletroforese do produto da PCR para o gene 28S utilizando-se os *primers* desenvolvidos por Sogin & Edman (1990) nas amostras de DNA de *Cordylophora* obtidas neste trabalho.

Mesmo com bandas consistentes e com a purificação das amostras, foi possível obter sequências apenas dos produtos amplificados a partir das amostras de DNA de Volta Grande e Funil, que geraram consenso a partir do alinhamento das sequências *forward* de Volta Grande e *reverse* de Funil (Figura 13). Todas foram analisadas individualmente contra o GenBank apresentando *hits* com *Cordylophora* (Figura 14), exceto a sequência *reverse* de Volta Grande.

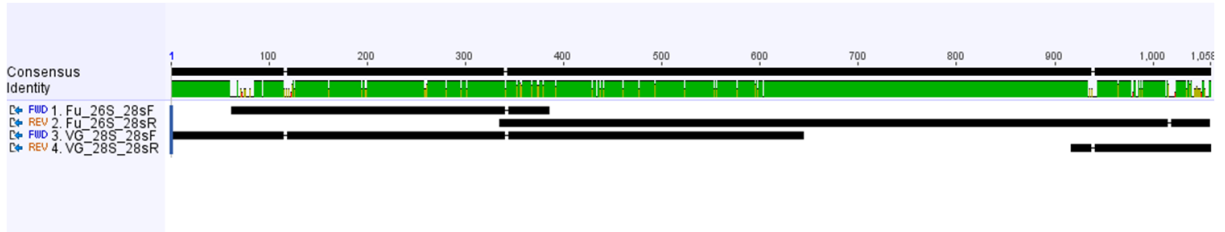


Figura 13. Consenso obtido a partir do alinhamento das sequências obtidas utilizando-se o par de *primers* desenhados por Sogin & Edman (1990).

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download		Select columns	Show	100				
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora caspia 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora ca...	484	484	100%	2e-132	95.65%	879	KC489507.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. NFR4 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	484	484	100%	2e-132	95.65%	1001	EF547147.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. NFR1 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	484	484	100%	2e-132	95.65%	1000	EF547139.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. NFR6 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	484	484	100%	2e-132	95.65%	1001	EF547137.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. NFR7 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	484	484	100%	2e-132	95.65%	1000	EF547135.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. JC1 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	473	473	100%	4e-129	94.98%	1011	EF547148.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. IM1 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	473	473	100%	4e-129	94.98%	1001	EF547146.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. WH1 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	473	473	100%	4e-129	94.98%	1001	EF547134.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora caspia voucher personal P. Schuchert Sch485 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequ...	Cordylophora ca...	460	460	100%	3e-125	94.08%	3205	EU272556.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. NFR11 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	460	460	100%	3e-125	94.08%	1017	EF547149.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. NFR8 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	460	460	100%	3e-125	94.08%	1007	EF547145.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. HG2 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	460	460	100%	3e-125	94.08%	1006	EF547144.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. HG1 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	460	460	100%	3e-125	94.08%	1007	EF547143.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. NFR3 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	460	460	100%	3e-125	94.08%	1007	EF547142.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chara tomentosa voucher Blomster JB705 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chara tomentosa	460	460	100%	3e-125	94.08%	1243	DQ026521.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cordylophora sp. JC2 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cordylophora sp...	448	448	100%	3e-121	93.16%	1005	EF547150.1

Figura 14. Resultado do BLASTN da comparação das sequências obtidas a partir do sequenciamento do produto amplificado com os *primers* do Sogin & Edman (1990), contra o banco não-redundante do *GenBank*.

5 DISCUSSÃO

Cordylophora caspia (PALLAS, 1771) é um hidróide invasor, nativo dos mares Negro e Cáspio, que pode vir a causar grandes impactos econômicos e ecológicos ao país por sua ação como espécie incrustante, sendo frequentemente relacionadas com o entupimento de tubulações, corrosão de estruturas de sustentação, oclusão de filtros, grades de contenção e trocadores de calor de UHE e estações de tratamento e captação de água (PHILLIPS et al., 2005; REIS et al., 2021). O primeiro registro de *Cordylophora* no Brasil ocorreu no Rio Paraná, sugerindo que sua chegada ao país tenha sido pela bacia do Prata (HADDAD & NAKATAMI, 1996). Atualmente são conhecidas populações da bacia do Rio Iguaçu (LACTEC, 2008), nos estados de São Paulo (SILVEIRA & BOSCOLO, 1996) e Rio de Janeiro (GROHMANN & BRUM, 2007). Em Minas Gerais, até o presente momento, são conhecidas duas populações que foram registradas nas UHE Funil, no município de Lavras, e São Simão, na divisa com Goiás (dados ainda não publicados). Além destas populações, foi apresentado um novo registro, desta vez na UHE Volta Grande, na bacia do Rio Grande, divisa de Minas Gerais com São Paulo, como resultado do desenvolvimento deste trabalho.

Quanto a este último ponto, é importante ressaltar que na UHE de Volta Grande existiu um complexo centro de pesquisa em piscicultura e limnologia que funcionou durante anos, enquanto a planta ainda era de propriedade da CEMIG. Neste complexo, existem tanques, instalações e laboratórios com infraestrutura invejável, mas que foram abandonados após a privatização (Figura 15). Trabalhos com espécies nativas e exóticas foram executados por muito tempo com a utilização desta estrutura e, somente agora, está acontecendo a notificação do primeiro contato com uma população invasora de *Cordylophora caspia* para este local.



Figura 15. Visão parcial dos laboratórios e tanques do complexo de pesquisa em Piscicultura e Limnologia da UHE de Volta Grande. Foto de outubro/2020, já após a desativação do complexo.

A população mais recentemente descoberta, na UHE Volta Grande, encontra-se geograficamente entre os dois outros pontos previamente conhecidos, o que pode sugerir uma possível rota de invasão vinda da bacia do Paraná, adentrando à bacia do Rio Grande, passando pela divisa com São Paulo e seguindo para o interior do estado de Minas Gerais e também pela bacia do Paranaíba na divisa com Goiás (Figura 16).

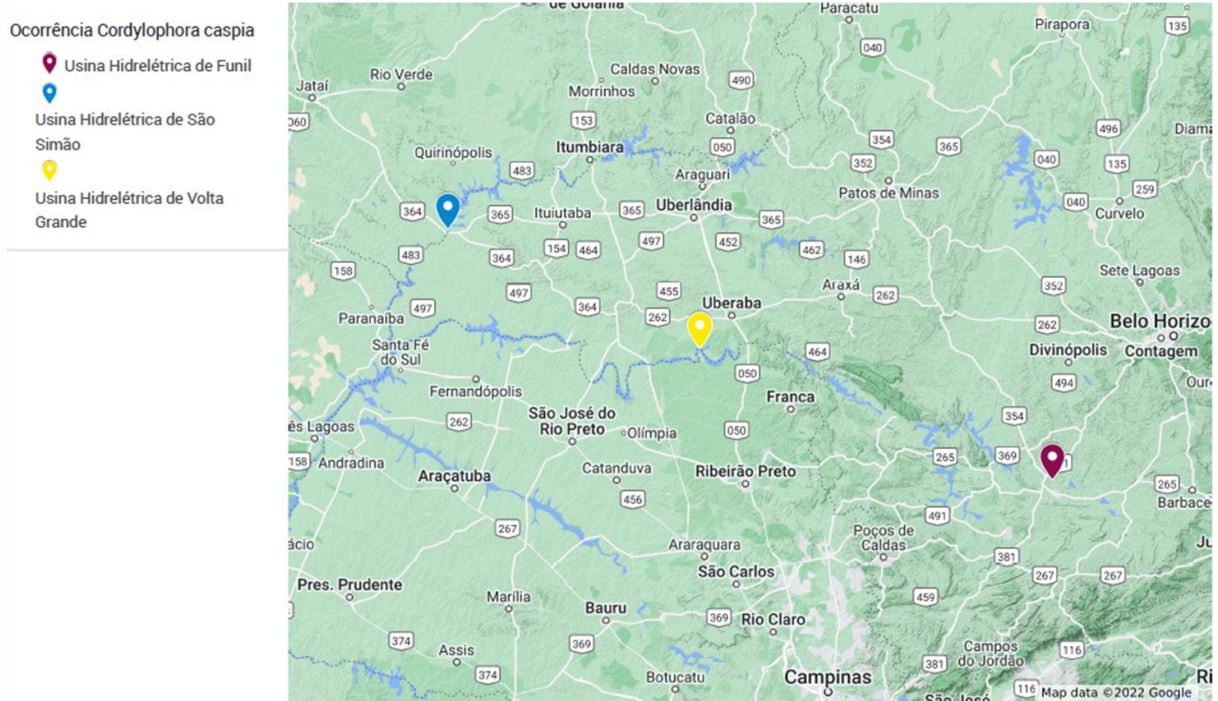


Figura 16. Localização das três populações de *Cordylophora caspia* atualmente conhecidas em Minas Gerais.

A identificação precoce de espécies invasoras de forma rápida é essencial para que ações de manejo sejam imediatas, a fim de controlar o crescimento das subpopulações não nativas no início do processo de invasão, bem como de impedir que aquele ambiente sirva como doador de propágulos para novas invasões (PARA & Do SUL, 2007; VANDER ZANDEN & OLDEN, 2008). Por isso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver ferramentas moleculares que permitissem identificar *Cordylophora caspia* no Brasil por *DNA barcoding*.

É bem estabelecido que o gene do *Citocromo C Oxidase I*, o COI, é amplamente utilizado em metazoários como *DNA barcoding* e em análises filogenéticas de grupos mais específicos. Para este trabalho selecionamos 2 conjuntos de *primers* para amplificar o COI de *Cordylophora*. O primeiro deles foi desenhado *in silico* por Agostinis (2016) a partir de sequências já depositadas no *GenBank* e visava amplificar um fragmento de 109 pb. Inicialmente acreditamos que o *primer* funcionaria bem, pois as revelações em gel de agarose apresentavam uma banda única de peso molecular condizente com o esperado. Porém, ao sequenciar as amostras, os amplicons não eram consistentes com as sequências previamente depositadas no *GenBank*. *Cordylophora* raramente aparecia como organismo

de maior similaridade, mas os *hits* eram sempre em espécies taxonomicamente relacionadas. Esses resultados sugerem uma região conservada dentro de grupos evolutivamente próximos, o que invalida a utilização dos *primers* como um *barcoding* para a espécie *C. caspia*, ou até mesmo para o gênero *Cordylophora*. Alguns *amplicons* mostraram-se mais similares à sequências de *Hydra* sp., por exemplo, e isso é preocupante, uma vez que *Hydra* e *Cordylophora* podem coexistir em um mesmo ambiente, como mostra o trabalho de da Silva Bertrão e colaboradores (2021). Ainda assim, as sequências apresentaram baixa cobertura mesmo quando eram recuperadas mais próximas de *Hydra* sp. Resultados como estes sugerem que é possível que nossas populações de *C. caspia* possuam informação genética divergente o bastante de outras populações do gênero a ponto de ser recuperada mais proximamente a outros organismos dentro da mesma ordem. Obviamente, tais afirmações necessitam de mais estudos e análises filogenéticas para que, de fato, possam ser testadas. Outro ponto negativo com relação a utilização deste conjunto de *primers* é que, apesar dos *amplicons* individualmente apresentarem resultados, não foi possível a formação de sequências consenso a partir do material amplificado. Os alinhamentos sugerem que os *primers* alinham-se em diferentes pontos da fita, não gerando sobreposição entre as sequências *forward* e *reverse*.

O segundo conjunto de *primers* foi proposto por Folmer (1994) para amplificar o COI de 11 diferentes filos de forma “universal”. Esses *primers* foram utilizados desde então, em diversos trabalhos, fazendo com que o autor tivesse mais de 17.000 citações até o momento da realização deste trabalho. No entanto, em 2018, Mioduchowska e colaboradores concluíram durante um estudo que parte das sequências geradas a partir destes *primers* podem não representar o organismo alvo do estudo. Isso é um risco quando trabalhamos com alvos muito amplos e que não representam um grupo específico de indivíduos. No nosso caso, os marcadores COI de Folmer (1994) amplificaram as sequências de populações oriundas de todas as três localidades utilizadas neste trabalho. Os amplicons quando revelados em gel mostraram bandas inespecíficas fracas, problema este que foi resolvido com a purificação dos produtos de PCR gerados. Ao analisar as sequências, foi observado que tanto o segmento *forward* como o *reverse* geram consenso entre si, além de apresentarem boa cobertura quando comparadas com o banco de dados não-

redundante do *GenBank*. Neste trabalho nós utilizamos fragmentos de tecidos retirados diretamente de indivíduos visualmente identificados como *Cordylophora*, logo, o que poderia gerar dúvidas quanto ao material amplificado seria algum organismo predado, presente dentro de um hidrante, e que ainda tivesse material genético viável a amplificação. Apesar de pouco provável, o risco de contaminação existe, uma vez que *C. caspia* é um predador e se alimenta de diversas presas que pertencem a grupos relacionados ao amplo espectro de organismos passíveis de serem amplificados pelos primers de Folmer (da SILVA BERTRÃO *et al.*, 2021).

Para tentar contornar este problema, utilizamos tecidos de diferentes grupamentos de *Cordylophora* tanto para a extração de DNA, como para a PCR e sequenciamento. Ao trabalhar com várias sequências, tivemos a oportunidade de avaliar quais amplicons se encontravam em melhor estado e quais formavam o melhor alinhamento. Os resultados coincidem com sequências já depositadas no *GenBank* e abrem caminho para a delimitação futura de um possível marcador que seja satisfatório para ensaios de DNA *barcoding* de *Cordylophora*. No entanto, mais experimentos ainda devem ser feitos para testar a especificidade dos *primers*. É bem provável que ao utilizá-lo em amostras ambientais, as amplificações sejam completamente aleatórias, uma vez que a abrangência de possibilidades de amplificação desses *primers* também é muito grande. Um bom alvo para DNA *barcoding* deve se mostrar específico até mesmo na presença de ácidos nucleicos de outros organismos, tendo maior afinidade pelo grupo de interesse. Um alvo como o proposto por Folmer (1994), ainda que útil para alguns tipos de análises, em que se tenha previamente a identificação do indivíduo, necessita de refinamentos para que possa ser usado de fato como um DNA *barcoding* para *Cordylophora*.

Devido ao déficit de informações relacionadas ao repertório genético de *C. caspia*, três dos quatro conjuntos de *primers* utilizados neste trabalho são correlatos a espécies taxonomicamente próximas ou que já foram utilizados anteriormente na literatura para nosso organismo de interesse. Devido a essa proximidade taxonômica, o conjunto de *primers* para 16S desenhados por Cunningham e Buss (1993) para *H. vulgaris*, foi escolhido para ser testado como um suporte ou alternativa aos resultados gerados pelo *COI*. Assim como *Cordylophora*, *H. vulgaris* também se trata de um Anthoathecata, mesma ordem do nosso hidróide de interesse. É importante lembrar que alguns amplicons, ao serem comparados contra

o banco de dados do *GenBank*, também retornaram *Hydra* sp. como resultado, o que corrobora ainda mais para o fato de ainda existirem fragmentos conservados dentro do gene que recuperam partes similares entre espécies próximas. Os amplicons de 16S retornaram consistentemente como *Cordylophora* e, apesar de individualmente se comportarem muito bem para todas as localidades, ao tentar alinhar os amplicons gerados, apenas as sequências de Funil formaram consenso para o gene 16S.

É esperado que marcadores moleculares como *COI* e 16S sejam bons alvos para *barcoding*, delimitando populações em níveis específicos (LAAKMANN & HOLST, 2014, HE *et al.*, 2015). Dois dos marcadores escolhidos para este trabalho (16S e *COI*), se tornaram candidatos aos testes como *barcoding* para nossas populações de *Cordylophora* por já terem sido usados anteriormente por Folino-Rorem e colaboradores em 2008, em um trabalho que revelou várias espécies crípticas dentro do gênero. Os resultados obtidos sugerem a existência de várias espécies crípticas dentro do que hoje chamamos de *C. caspia* o que também é suportado pela observação de diferenças significantes entre os tipos de habitats que populações distintas preferem. Todavia, e muito provavelmente em virtude do pouco material molecular de *C. caspia* depositado, os dois principais alvos para confecção de *barcoding* ainda estão aquém do que esperamos em termos de resposta. O sequenciamento do genoma de *Cordylophora* é ferramenta crucial na busca de definir e delimitar bons alvos para entender o repertório genético, bem como estudar o histórico de invasão e as possíveis espécies que compõem o gênero, através de análises moleculares.

O marcador 28S foi pensado para este trabalho para resolver possíveis resultados dúbios dos genes mitocondriais. Por se tratar de um marcador de evolução lenta, seu papel durante a identificação molecular de *Cordylophora* é servir como base, uma vez que, ainda que os marcadores de evolução rápida apresentassem resultados adversos, o 28S servirá como âncora para análises. Um *hit* distante no gene 28S indicaria a possibilidade de uma contaminação durante o processo de extração, amplificação, sequenciamento ou até mesmo um falso positivo na identificação visual. Análises utilizando marcadores de rápida evolução podem, por vezes, retornar informações que nos induzem a crer em numerosas espécies crípticas mesmo dentro de grupos taxonomicamente bem resolvidos. O uso de

regiões mais conservadas do DNA, como o 28S, por exemplo, podem resolver este problema trazendo análises filogenéticas de volta a um resultado mais verossímil (Cunha *et al.*, 2017).

Análises genéticas podem ajudar a elucidar a evolução destas populações, buscando pela origem de invasão e ajudando a predizer, em forma de modelos, novos possíveis pontos de estabelecimento de *C. caspia*. Como pudemos observar na Figura 5, nossa revelação em gel de agarose retornou um fragmento de peso molecular condizente com o esperado, porém com bandas inespecíficas de tamanho um pouco menor. Este problema foi contornado com a purificação da amostra amplificada. O sequenciamento do 28S retornou resultados apenas para as populações de Volta Grande e Funil. Os *amplicons* das duas localidades não formaram sequência consenso entre si, exceto quando alinhamos a sequência *forward* de Volta Grande com a *reverse* de Funil. Nesse caso, conseguimos *hits* com 100% de similaridade com outras sequências do gene 28S de *Cordylophora* no *GenBank*. As sequências de ambas localidades apresentaram também *hits* fora de *Cordylophora* quando analisadas individualmente: *Koellikerina fasciculata* (Hydrozoa, Anthoathecata) e *Bimeria vestita* (Hydrozoa, Anthoathecata) em Funil e *Chara tomentosa* (Charophyta, Charales) em Volta Grande. As espécies que apareceram nos dados de Funil são dois outros cnidários da família Bougainvilliidae, grupo esse que já apareceu anteriormente em nossas análises para o *COI*. O segmento *forward* de Volta Grande também recuperou uma macrófita, *Chara tomentosa*, o que a princípio foi considerado uma contaminação de nossas amostras. Ao analisar melhor os resultados, observamos que mesmo com este *hit*, a similaridade das nossas amostras com outras sequências do gene 28S de *Cordylophora* no *GenBank*, era consideravelmente alta para não considerarmos o material amplificado como *Cordylophora*. Além disso, *Chara tomentosa* foi recuperada também junto a sequência consenso formada entre o segmento *forward* de Volta Grande e *reverse* de Funil, curiosamente o mesmo *voucher* que recuperamos na análise anterior com a sequência de Volta Grande, o que nos leva a crer na possibilidade de este segmento *Chara tomentosa* não representar de fato uma sequência desta macrófita, e sim ter sido contaminado por *Cordylophora* durante a execução do trabalho que a gerou.

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste trabalho nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

6.1 Baixa confiabilidade nos primers existentes

A ideia que motivou este trabalho foi a determinação de um alvo específico e que fosse satisfatório para determinar um DNA *barcoding* para *Cordylophora caspia*. Ao passo que estudos sobre espécies invasoras avançam com o decorrer do tempo, utilizar formas moleculares que tornam o processo de detecção de novas espécies ainda em processo de fixação, é uma das principais formas de adotar medidas para prevenir a derradeira instalação destes organismos em um novo habitat, evitando assim todas as consequências ambientais e econômicas que este fenômeno pode acarretar. *Cordylophora caspia* ainda é pouco conhecida e pouco estudada, principalmente quando comparamos com espécies como o mexilhão-dourado. Os poucos estudos acerca de seu repertório genético a que temos acesso são, em sua maioria, pouco conclusivos e sugerem que este campo ainda é um vasto oceano de informações a ser desbravado. Este estudo reitera essa premissa, uma vez que, mesmo os alvos mais utilizados para trabalhos moleculares com *C. caspia*, ainda trazem resultados dúbios e por vezes de baixa confiabilidade. É importante também ressaltar que resultados negativos não devem recair unicamente sobre os primers, e sim que seja analisado todo o processo de amplificação e extração do DNA. A PCR é uma reação complexa que envolve diversos reagentes e etapas que podem funcionar de forma mais ou menos satisfatória dependendo do gene alvo, da espécie alvo, do local e condições em que está sendo realizada. Quanto mais estudos moleculares forem realizados com *Cordylophora*, mais conhecimento teremos acerca das melhores condições e equipamentos para se trabalhar com o DNA deste hidróide.

6.2 Subnotificação do país

Cordylophora é um organismo que aos olhos de pessoas leigas jamais seria considerado um animal. Seu aspecto filamentososo lembra muito mais uma alga ou uma macrófita, o que dificulta sua identificação prévia e, por consequência, sua notificação enquanto espécie invasora de um determinado habitat. Os estudos moleculares podem servir como uma base de triagem em que, a partir de análises

de DNA ambiental, por exemplo, podemos levantar um sinal de atenção a determinada região e assim, com a atuação de especialistas, efetuar buscas ativas a fim de encontrar colônias do invasor. Medidas como estas podem resultar em um cenário em que medidas sejam tomadas antes que populações mais densas cheguem até UHE, estações de captação de água e afins. Para que ações como estas sejam implementadas, é necessário que antes tenhamos um bom alvo, específico e claro, que nos permita afirmar que o material genético que temos em mãos é de fato *Cordylophora caspia*.

6.3 Pouco conhecimento do repertório genético do organismo e necessidade de genoma

Outro ponto que torna *Cordylophora caspia* potencialmente complicada de se trabalhar molecularmente é sua pouca clareza taxonômica. É estabelecido que hoje apenas duas espécies compõem o gênero, ao invés das oito que eram aceitas até o início da década passada. O fato é que populações diferentes se comportam de formas distintas quando colocadas em prova contra os mesmos alvos moleculares, o que nos faz pensar em espécies crípticas, ou populações que entram em um processo de especiação de forma relativamente rápida, mudando seu repertório genético de forma tão intensa que nem mesmo marcadores de evolução rápida como o *COI* e o *16S* utilizados aqui conseguem apresentar resultados satisfatórios em um nível específico. Para abrir o leque de alvos possíveis e que atenda toda a diversidade genética que *C. caspia* apresenta ter, faz-se necessário o sequenciamento completo do genoma desta espécie. O acesso a esse tipo de informação não só se mostraria útil para delimitar alvos de detecção precoce em amostras ambientais, como também permitiria que tivéssemos acesso a genes de adaptação a diferentes níveis de salinidade entre outros que codificam atributos importantes na alta capacidade adaptativa mostrada por *Cordylophora*. Essas informações podem ajudar a criar medidas de contenção e controle específicas em áreas invadidas, minimizando os impactos causados tanto ambientais como econômicos.

Nova ocorrência em Volta Grande

A UHE de Volta Grande já contou, enquanto ainda era propriedade da CEMIG (Companhia Energética de Minas Gerais), com uma grande estrutura de pesquisa voltada para a piscicultura. Neste espaço foram desenvolvidos trabalhos acadêmicos por anos, e essa é primeira vez que *Cordylophora caspia* está sendo reportada para essa localidade. As interações ecológicas entre *Cordylophora* e outras espécies invasoras, especialmente o mexilhão-dourado, começam a chamar mais atenção de ecologistas e demais pesquisadores nos últimos tempos. Temos trabalhos recentes, como o de da Silva Bertrão (2021), que mostram a complexa relação que estes organismos criam com espécies nativas e não nativas. Ainda existe muita informação a ser descoberta acerca de *Cordylophora* e, ao passo que trabalhos como este surgem na comunidade científica, esperamos que mais atenção seja dada para esse invasor silencioso e que frequentemente passa despercebido.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINIS, A. O. (2016). Desenvolvimento de marcador molecular na detecção da espécie invasora *Cordylophora caspia* (Cnidaria) utilizando DNA ambiental. TCC Graduação em Biologia) - Universidade Federal do Paraná.
- BECKER K., HARMSSEN D., MELLMANN A., MEIER C., SCHUMANN P., PETERS G. & VON EIFF C. (2004). Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 42(11):4988-4995.
- BOLTOVSKOY, D., CORREA, N., CATALDO, D., SYLVESTER, F. (2006). Dispersion and Ecological Impact of the Invasive Freshwater Bivalve *Limnoperna fortunei* in the Río de la Plata Watershed and Beyond. *Biological Invasions* 8:947-963
- BOLTOVSKOY, D & CORREA, N (2015). Ecosystem impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (golden mussel) in South America. *Hydrobiologia* 746(1)
- CALDER, D.R.; CHOONG, H.H.C & MCDANIEL, N. (2015). *Similiclava nivea* (Cnidaria: Hydrozoa: Similiclavidae): a new family, genus and species of athecate hydroid from the Pacific coast of North America. *J. Nat. Hist.*, 49 (13–14), pp. 735-753, 10.1080/00222933.2014.979261
- CATALDO, D. & BOLTOVOSKOY, D. (1999). Population dynamics of *Corbicula flumínea* (Bivalvia) in the Paraná River Delta. *Hydrobiologia* 153–163.
- CORDERO, E.H. (1941). Observaciones Sobre Algunas Especies Sudamericanas del Genero *Hydra*. *Hydra Y Cordylophora em el Uruguay*. *An. Acad. Brás. Ciências*, 11: 335-400.
- CUNHA, A.F.; GENZANO, G.N. & MARQUES, A.C. (2015). Reassessment of morphological diagnostic characters and species boundaries requires taxonomical

changes for the genus *Orthopyxis* L. Agassiz, 1862 (Campanulariidae, Hydrozoa) and some related campanulariids. PLoS ONE, 10 (2), p. e0117553, 10.1371/journal.pone.0117553

CUNHA A.F., COLLINS A.G. & MARQUES A.C. (2017) Phylogenetic relationships of Proboscoida Broch, 1910 (Cnidaria, Hydrozoa): Are traditional morphological diagnostic characters relevant for the delimitation of lineages at the species, genus, and family levels? Molecular Phylogenetics and Evolution 106: 118–135, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.09.012>

CUNNINGHAM C.W., BUSS L.W. (1993) Molecular evidence for multiple episodes of paedomorphosis in the family Hydractiniidae. Biochem Syst Ecol 21:57–69. doi:10.1016/0305-1978(93)90009-G

DAMMSKI, P.B. (2008). ASPECTOS DO CICLO DE VIDA DA ESPÉCIE INVASORA *Cordylophora caspia* (CNIDARIA) NO RESERVATÓRIO DA USINA HIDRELÉTRICA GOVERNADOR JOSÉ RICHA, RIO IGUAÇU, PARANÁ. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2008.

DARRIGRAN, G., EZCURRA-DE-DRAGO, I. (2000). Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) in South America. Nautilus. 114: 69-73.

FOLINO, N.C. (2000). The freshwater expansion and classification of the colonial hydroid *Cordylophora* (Phylum Cnidaria, Class Hydrozoa). In Pederson, Judith (ed.) Marine Bioinvasions: Proceedings of the First National Conference, January 24-27, 1999. Massachusetts Institute of Technology Sea Grant College Program, Cambridge MA. p. 139-144

FOLINO-ROREM, N.C.; INDELICATO, J. (2005). Controlling biofouling caused by the colonial hydroid *Cordylophora caspia*. Water Research. 39:2731-2737.

FOLINO-ROREM, N. C.; STOECKEL, J.; THORN, E. & PAGE, L. (2006). Effects of artificial filamentous substrate on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) settlement.

Biological invasions 8(1):89-96.

FOLINO-ROREM, N., DARLING, J., & D'AUSILIO, C. (2008). Genetic analysis reveals multiple cryptic invasive species of the hydrozoan genus *Cordylophora*. *Biological Invasions*, 11(8), 1869-1882. doi: 10.1007/s10530-008-9365-4

FOLMER O., BLACK M., HOEH W., LUTZ R., VRIJENHOEK R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3(5):294–299

FREELAND, J.R., PETERSEN, S.D., KIRK, H. (2011). *Molecular Ecology*. 2nd ed. Wiley Blackwell.

FULTON, C. (1960). Culture of a Colonial Hydroid under Controlled Conditions. *Science*.132(3425): 473-474.

FULTON, C., 1961. The development of *Cordylophora*. In *The biology of Hydra and some other coelenterates* (ed. H.M. Lenhoff & W.F. Loomis), pp. 287-295. Miami Florida: University of Miami Press.

FULTON, C., 1962. Environmental factors influencing the growth of *Cordylophora*. *Journal of Experimental Zoology*, 151, 61-78.

GILI, J-M.; HUGHES, R.G. (1995). The ecology of marine benthic hydroids. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*. 33: 351-426.

GOVINDARAJAN, A.F.; BOERO, F. and HALANYCH, K.M. (2006). Phylogenetic analysis with multiple markers indicates repeated loss of the adult medusa stage in *Campanulariidae* (Hydrozoa, Cnidaria). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 38, pp. 820-834.

GROHMANN, P.A.; BRUM, P.R, (2007). *Cordylophora cáspia* (HYDROZOA, ANTHOMEDUSAE, CLAVIDAE) em corpos d'água doce no Brasil: um caso de bioincrustação no sistema de resfriamento das turbinas da usina de Funil, Itatiaia, RJ. XII congresso latino-

americano de ciências do mar - XII colacmar

HADDAD, M.A.; NAKATANI, K., (1996). Primeiro registro de *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771) (Cnidaria, Hydroida) em águas continentais brasileiras. In XIV Congresso Brasileiro de Zoologia., SBZ, Porto Alegre, p.10.

HADDOCK, S.H.D. (2004). A golden age of gelata: past and future research on planktonic ctenophores and cnidarians. *Hydrobiologia* 530/531: 549–556

HE, J.; ZHENG, L.; ZHANG, W.; LIN, Y., CAO, W. Morphology and molecular analyses of a new *Clytia* species (Cnidaria: Hydrozoa: Campanulariidae) from the East China Sea. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 95 (2) (2015), pp. 289-300, 10.1017/S0025315414000836

HEBERT, P.B., CYWINSKA, A., BALL, S.L., DEWAARD, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270(1512):313-21.

HURLBERT, S.H.; VILLALOBOS-FIGUEROA, A. (1982). Aquatic biota of México, Central America and West Indies. Aquatic Biotic SDSU Fondation, San Diego. 529: 62-63

JORMALAINEN, V; HONKANEN, T; VUORISALO, T; LAIHONEN, P. (1994) Growth and reproduction of an estuarine population of the colonial hydroid *Cordylophora caspia* (Pallas) in the northern Baltic Sea. *Helgoländer Meeresunters.* 48, 407-418.

LACTEC, 2008. Instituto de tecnologia para o desenvolvimento. Espécies Invasoras da Bacia do Rio Iguaçu. Projeto COPEL; ANEEL. Relatório Final.

LAACKMANN, S.; HOLST, S. Emphasizing the diversity of North Sea hydromedusae by combined morphological and molecular methods. *J. Plankton Res.*, 36 (1) (2014), pp. 64-76

MACK, R.; SIMBERLOFF, D.; LONSDALE, M.W; EVANS, H.; CLOUT, M., BAZZAZ, F.A. (2000). Biotic invasions: causes, epidemiological, global consequences, and control. *Ecological Applications*. 10(3): 689-710.

MANT, R.C., MOGGRIDGE, G.D., ALDRIDGE, D.C. (2012). Control of biofouling by *Cordylophora caspia* in freshwater using one-off, pulsed and intermittent dosing of chlorine: laboratory evaluation. *Biofouling*. 28(5), 433-40.

MIODUCHOWSKA, M; CZYZ, MJ; GOLDYN, B; KUR, J; SELL, J (2018). Instances of erroneous DNA barcoding of metazoan invertebrates: Are universal *cox1* gene primers too "universal"? *PLoS One*.;13(6):e0199609. doi: 10.1371/journal.pone.0199609. PMID: 29933389; PMCID: PMC6014667.

MORRI, C. (1981). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque lagunari e costiere italiane. Consiglio Nazionale Delle Ricerche. AQ/1/94 – 6.

MOURA, C.J.; HARRIS, D.J.; CUNHA, M.R. and ROGERS, A.D. (2008). DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments. *Zool. Scr.*, 37, pp. 93-108.

NEVES, C.S.; ROCHA, R.M. (2006). Bioinvasão mediada por embarcações de recreio na Baía de Paranaguá, PR e suas implicações para a conservação. 74p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná.

NOLTE F.S. & CALIENDO A.M. (2003). Molecular detection and identification of microorganisms, p.234-256. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. & Tenover F.C. (Eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. ASM Press, Washington.

NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N., & HASE, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), e63-e63.

OLENIN, S. & LEPPA KOSKI, E. (1999). Non-native animals in the Baltic Sea: alteration of benthic habitats in coastal inlets and lagoons. *Hydrobiologia* 393:233-243.

PARA, P.D.E.E.I., & DO SUL, A.A. (2007). Modelo para o desenvolvimento de uma estratégia nacional para espécies exóticas invasoras.

PARIDA, M.; HORIOKE, K.; ISHIDA, H.; DASH, P. K.; SAXENA, P.; JANA, A. M.; ... & MORITA, K. (2005). Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of clinical microbiology*, 43(6), 2895-2903.

PEJCHAR, L., and H. MOONEY (2009). Invasive species, ecosystem services and human well-being. *Trends in Ecology & Evolution*. *Trends in Ecology & Evolution* 24(9):497-504

PEÑA CANTERO, A.L.; SENTANDREU, V. & LATORRE, A. (2010). Phylogenetic relationships of the endemic Antarctic benthic hydroids (Cnidaria, Hydrozoa): what does the mitochondrial 16S rRNA tell us about it? *Polar Biol.*, 33, pp. 41-57

PHILLIPS, S.; DARLAND, T.; SYTSMA, M. (2005). Potential Economic Impacts of Zebra Mussels on the Hydropower Facilities in the Columbia River Basin. Prepared for the Bonneville Power Administration by Pacific States Marine Fisheries Commission.

PORTELLA, K., JOUKOSKI, A., SILVA, A., BRASSAC, N., & BELZ, C. (2009). Biofouling e biodeterioração química de argamassa de cimento portland em reservatório de usina hidroelétrica. *Química Nova*, 32(4), 1047-1051. doi: 10.1590/s0100-40422009000400037

REIS, M. de P.; de PAULA, R. S.; REIS, A. L. M.; SOUZA, C. C. e; de OLIVEIRA-JUNIOR, R. B.; FERREIRA, J. A.; MOTA, H. R.; de CARVALHO, M. D.; JORGE, E. C.; CARDOSO, A. V. & NASCIMENTO, A. M. A. (2021). Microbial composition of a hydropower cooling water system reveals thermophilic bacteria with a possible role in primary biofilm formation. *Biofouling*, 37(2), 246–256. <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1897790>

ROUSE, Greg W. (2001). «A cladistic analysis of Siboglinidae Caullery, 1914 (Polychaeta, Annelida): formerly the phyla Pogonophora and Vestimentifera. *Zoological Journal of the Linnean Society* (em inglês). 132: 55-80

SCHABLE, N. A., KUENZI, A. M., DRAKE, C. A., FOLINO-ROREM, N. C., & DARLINGS, J. A. (2008). "Microsatellite loci for the invasive colonial hydrozoan *Cordylophora caspia*". U.S. Environmental Protection Agency Papers. 151.

SCHUCHERT, P. (2004). Revision of the European athecate hydroids and their medusae (Hydrozoa, Cnidaria): Families Oceanidae and Pachycordylidae. *Rev Suisse Zool* 111(2):315–369

SCHUCHERT, P. (2014). High genetic diversity in the hydroid *Plumularia setacea*: a multitude of cryptic species or extensive population subdivision?. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 76, pp. 1-9

SCHUCHERT, P. (2022). World Hydrozoa Database. *Cordylophora* Allman, 1844. Accessed through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=117051> on 2022-05-04

da SILVA BERTÃO, A. P.; LEITE, R. V. V.; HORODESKY, A.; PIE, M. R., ZANIN, T. L.; NETTO, O. S. M. & OSTRENSKY, A. (2021). Ecological interactions between invasive and native fouling species in the reservoir of a hydroelectric plant. *Hydrobiologia*, 848(21), 5169-5185.

SILVEIRA, F.L.; BOSCOLO, H. K. (1996). Primeira Ocorrência de *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771) (Hydrozoa, Clavidae) para o estado de São Paulo.

SMITH, D.G., WERLE, S.F., KLEKOWSKI, E. (2002) The rapid colonization and emerging biology of *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771) (Cnidaria: Clavidae) in the Connecticut River. *J Freshwat Ecol* 17(3):423–430

SOGIN M.L., EDMAN J.C. (1990) Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. In: Innes MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp 307–314

STRUCK, T.H.; SCHULT, N; KUSEN, T., *et al.* (2007). Annelid phylogeny and the status of Sipuncula and Echiura. *BMC Evol Biol* 7, 57.

SYLVESTER, F.; Boltovskoy, D. & Cataldo, D. (2007). The invasive bivalve *Limnoperna fortunei* enhances benthic invertebrate densities in South American floodplain rivers. Springer.

TARDENT, P. (1963). Regeneration in the Hydrozoa. *Biological Reviews*. 38(3): 293-333.

VANDER ZANDEN, M.J., & OLDEN, J.D. (2008). A management framework for preventing the secondary spread of aquatic invasive species. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65(7), 1512-1522.

VITOUSEK, P.M.; *et al.* (1997.) Introduced species: a significant component of human-caused global change. *N. Z. J. Ecol.*, 21, pp. 1-16

ZAMPONI, M. O. (1991). Los Cnidaria de la republica Argentina. Castellanos, Z.A (eds.) Fauna de Agua Dulce de la Republica Argentina, V.7:20-21

ZHOU, K.; ZHENG, L.; HE, J.; LIN, Y.; CAO, W. & ZHANG, W. (2013). Detection of a new *Clytia* species (Cnidaria: Hydrozoa: Campanulariidae) with DNA barcoding and life cycle analyses. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 93 (8) (2013), pp. 2075-2088