

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL - MG

CÍNTIA BRUNO DE ABREU

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CLADOCERA (CRUSTACEA: BRANCHIOPODA)
DO SUL DE MINAS GERAIS, UTILIZANDO DNA *BARCODE* COMO MARCADOR
MOLECULAR**

Alfenas/MG

2016

CÍNTIA BRUNO DE ABREU

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CLADOCERA (CRUSTACEA: BRANCHIOPODA)
DO SUL DE MINAS GERAIS, UTILIZANDO DNA *BARCODE* COMO MARCADOR
MOLECULAR**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração: Diversidade Biológica e Conservação.
Orientador: Profa. Dra. Tereza Cristina Orlando.
Co-orientador: Prof. Dra. Maria José dos Santos Wisniewski.

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Abreu, Cíntia Bruno de.

Diversidade genética de cladocera (Crustacea: Branchiopoda) do Sul de Minas Gerais, utilizando DNA Barcode como marcador molecular / Cíntia Bruno de Abreu. – Alfenas - MG, 2016.

83 f.

Orientadora: Tereza Cristina Orlando.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Cladocera. 2. Código de Barras de DNA Taxonômico. 3. Variação Genética. I. Orlando, Tereza Cristina. II. Título.

CDD-578.012



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1379(Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



CÍNTHIA BRUNO DE ABREU

“Diversidade genética de Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) do Sul de Minas Gerais, utilizando DNA barcode como marcador molecular”

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Pesquisa: Ciências Ambientais.

Aprovado em: 26 de fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Tereza Cristina Orlando
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão
Instituição: UFSCar

Assinatura:

Prof. Dr. Fabio Antonio Colombo
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:

Dedico ao meu papito Irineu e à
minha mamãezinha Iracedis, pelo
amor, carinho, confiança e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Cris, pela orientação, pelo conhecimento compartilhado, paciência e confiança durante esses anos.

À Prof^a. Dra. Maria José dos Santos Wisniewski pela orientação e por sempre me fazer acreditar que as coisas são mais simples do que parecem que tudo se resolve com calma.

Aos professores da Biologia Unifal – MG pelos ensinamentos não somente de conteúdo ministrado, mas pelos ensinamentos e alegria com que vivem a vida, em especial aos queridos Flavio Nunes, Erica Hasui e Humberto Mendes.

Aos docentes do programa de Pós- Graduação em Ciências Ambientais, pelo incentivo e compartilhamento do conhecimento. Também às secretárias do Programa, Janaína e Denise, por sempre estarem dispostas a sanar dúvidas e ajudar.

À Universidade Federal de Alfenas, pela formação acadêmica, pela oportunidade de viver neste ambiente harmonioso e acolhedor. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa durante o mestrado.

Aos colegas de laboratório que tive durante graduação Bruna, Naty e Elias por deixarem o ambiente de experimento e trabalho mais feliz, pela convivência e amizade. Em especial ao meu amigo/ irmão Elias, pelos desabafos, amadurecimento, horas e horas de laboratório, momentos de descontração e é claro pelas risadas. À Bruna e Mari pela ajuda, conversas, conselhos e amizade. Aos estagiários pela troca de experiências.

Ao pessoal do Laboratório de Limnologia pela ajuda com os organismos, principalmente Erika, Karin e Karime.

Às meninas da república, pelo carinho, amizade, conversas, almoços e gordices! Em especial, Tati e Eli, amigas irmãs que ganhei em Alfenas.

À minha família e amigos por me apoiar e compreender os momentos que estive ausente.

Ao companheiro de uma década Lucas, pela parceria, conversas, apoio, carinho e amor incondicionais, também pelas revisões e ajuda com os textos e figuras.

Aos meus pais, por TUDO, por acreditar e incentivar a realizar meus sonhos!

RESUMO

Os cladóceros são popularmente conhecidos como pulgas d'água, habitam principalmente ambientes aquáticos de água doce e são considerados bons indicadores tróficos. Esses microcrustáceos são usados tanto em pesquisas básicas, quanto aplicadas, como estudos ecológicos, evolutivos e ecotoxicológicos. Apesar da dificuldade na análise de caracteres morfológicos, uma grande riqueza de espécies de cladóceros já foi detectada em Minas Gerais usando essas ferramentas. Devido a essa dificuldade, ferramentas moleculares são cada vez mais aplicadas para acessar essa biodiversidade. Atualmente, o marcador molecular conhecido como Código de Barras do DNA – DNA *barcode*, que tem como base um segmento do gene mitocondrial, o citocromo *c* oxidase subunidade 1 (COI) tem sido cada vez mais utilizado na taxonomia, identificação de espécies crípticas e estudos de diversidade. Neste contexto, nós avaliamos a diversidade genética de espécies de Cladocera de um ponto do Reservatório da Usina Hidrelétrica de Furnas e outro no município de Heliodora (ambos no Sul de Minas Gerais). Este é o primeiro inventário molecular de Cladocera no Brasil, cujo objetivo foi conhecer a diversidade de espécimes brasileiros e compará-los geneticamente com exemplares de outros países, verificando, assim, problemas taxonômicos e existência de espécies crípticas. Obtivemos sequências para 11 espécies de Cladocera, distribuídas nas famílias Sididae, Daphnidae, Bosminidae e Chydoridae. Os fragmentos amplificados variaram de 493 a 659 pares de base, das quais 90% foram maiores que 500pb. Algumas destas sequências de COI (*Bosmina freyi* e *Bosminopsis deitersi*) constituem as primeiras da espécie no mundo. Ainda verificamos que a maioria dos isolados brasileiros são molecularmente diferentes dos espécimes do México, Canadá e Guatemala. Para *Daphnia laevis* as divergências genéticas obtidas entre o isolado brasileiro e o argentino as classificam como integrantes da mesma entidade taxonômica, dados esses que dão força ao conceito de endemismo continental. Além da avaliação da diversidade, com a determinação do COI de *Ovalona kaingang* (Cladocera: Chydoridae) confirmamos as análises morfológicas recentes que realocaram espécies do grupo *pulchella* para *Ovalona*, já que as divergências genéticas entre *Ovalona* e as outras espécies do banco de dados são superiores a 19,1%. Portanto, o uso do DNA *barcode* foi eficiente como marcador molecular tanto na detecção da diversidade genética dos espécimes de Cladocera, quanto como ferramenta taxonômica. Futuramente nossos dados poderão ser aplicados em estudos de diversidade filogenética, distribuição geográfica, padrões biogeográficos e auxiliar em revisões taxonômicas.

Palavras chave: Cladocera. DNA *barcode*. Citocromo *c* oxidase subunidade I. Divergência genética.

ABSTRACT

Cladocerans are popularly known as water fleas, inhabit mainly freshwater aquatic environments and are considered good trophic indicators. These microcrustaceans have been used in basic and applied research, such as ecological, evolutionary and ecotoxicological studies. Morphological tools have been used to detect species richness of cladocerans from Minas Gerais, but given the difficulty of this morphological analysis, it is interesting to access this biodiversity by molecular tools as the DNA barcode. This molecular marker is based on a short segment of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit 1 (COI). It has been increasingly used in taxonomy, identification of cryptic species and diversity studies. In this context, we characterized the genetic diversity of Cladocera species from a point in the Furnas Hydroelectric Power Plant Reservoir and another in the Heliadora city (both in the south of Minas Gerais). This is the first molecular Cladocera inventory in Brazil, whose objective was to differentiate the Brazilian isolates of specimens from other countries, thus verifying taxonomic problems and cryptic species. We obtained sequences for 11 Cladocera species, distributed in Sididae, Daphnidae, Bosminidae and Chydoridae. The amplified fragments range from 493 to 659 base pairs, of which 90% were larger than 500 bp. Some of these COI sequences (for *Bosmina freyi* and *Bosminopsis deitersi*) represent the first molecular data in the world. We also found that the majority of Brazilian isolates are molecularly different from specimens from Mexico, Canada and Guatemala. For *Daphnia laevis* the genetic differences found between the Brazilian and Argentine isolates qualify them as members of the same taxonomic entity, reinforcing the concept of continental endemism. Besides the evaluation of diversity, with the determination of the COI for *Ovalona kaingang* (Cladocera: Chydoridae) we confirmed the morphological data, relocating the *pulchella*-group species to *Ovalona*, since the genetic differences between *Ovalona* and other species from the database were higher than 19.1%. Therefore, the use of DNA barcode was efficient to detect the genetic diversity of Cladocera specimens as a taxonomic tool. In the future our data can be applied to phylogenetic diversity studies, geographic distribution, biogeographic patterns and to assist in taxonomic revisions.

Keywords: Cladocera. DNA barcode. Cytochrome c oxidase subunit 1. Genetic divergence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Genoma mitocondrial e a região de DNA barcode (COI) de *Daphnia pulex*.....20
- Figura 2** - Número de sequências de DNA barcode para algumas famílias de Cladocera, já publicadas no GenBank.....22
- Figura 3** - Porcentagem de sequências de DNA barcode em relação ao total de sequências do Genbank para famílias de Cladocera.....23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 CLADOCERA: CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	15
2.2 DNA <i>BARCODE</i>	18
2.3 CORPOS D'ÁGUA DO SUL DE MG: RESERVATÓRIO DA USINA HIDRELÉTRICA DE FURNAS E HELIODORA.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
4. ARTIGOS.....	37
4.1 DISCOVERING HIDDEN CLADOCERA GENETIC DIVERSITY IN BRAZIL USING DNA <i>BARCODE</i>	37
4.2 DNA <i>BARCODE</i> CONFIRMS THE REALLOCATION OF ALONA KAINGANG SOUZA, ELMOOR-LOUREIRO & SANTOS, 2015 (CRUSTACEA, CLADOCERA, CHYDORIDAE) TO OVALONA KAINGANG AND GIVES CLUES TO THE PUZZLE INVOLVING THE PULCHELLA- GROUP.....	71
5. CONCLUSÕES.....	82
6. PERSPECTIVAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos maiores desafios da sociedade é a necessidade de manter a diversidade biológica (FREZAL; LEBLOIS, 2008). Para que haja um gerenciamento correto dos ecossistemas, é fundamental conhecer as espécies e ainda é importante compreender as tendências e padrões da biodiversidade (LARIGAUDERIE et al., 2012). Segundo Dayrat (2005,) “delinear e identificar corretamente as fronteiras entre as espécies são cruciais para a descoberta da diversidade da vida, porque, a partir disto, é possível determinar se diferentes organismos são membros da mesma entidade ou não”. Desta forma, a identificação de espécies é importante na criação de políticas conservacionistas e gerenciamento da biodiversidade (CARDINALE et al., 2012). Além de ser importante nas áreas de sistemática, aplicações forenses, biologia evolutiva e até mesmo espécies medicinais (ADAMOWICZ; SCOLES, 2015). Segundo Lefebure et al., (2006) muitas vezes não há como delimitar as espécies, por exemplo pela dificuldade de amostragem em locais de difícil acesso, plasticidade fenotípica, complexidade da identificação do estágio de vida e existência de espécies crípticas (JOLY et al., 2014; VALENTINI et al., 2009).

Há várias formas usadas no monitoramento da diversidade, porém grande parte delas não utiliza marcadores moleculares (SCHWARTZ et al., 2007). O uso de técnicas moleculares, como DNA *barcode*, mudou os estudos relacionados à biodiversidade (CRISTESCU, 2014). Um problema grave relacionado à falta de conhecimento das espécies é que muitas destas são extintas antes mesmo de sua catalogação taxonômica (PEČNIKAR; BUZAN, 2014). Para diversos grupos, como é o caso de organismos zooplancônicos, essa classificação taxonômica ainda é muito discutida, incerta e até mesmo incompleta (ELÍAS-GUTIÉRREZ et al., 2008). Os organismos que pertencem ao Subfilo Crustacea e à classe Branchiopoda, como o grupo Cladocera, se encaixam perfeitamente nesta situação, pois muitas espécies estão sendo revisadas e até realocadas em gêneros diferentes (SINEV, 2001; SINEV et al., 2005; SINEV, 2015; VAN DAMME; DUMONT, 2008; VAN DAMME et al., 2011).

Os cladóceros são popularmente conhecidos como pulgas d’água, habitam principalmente ambientes aquáticos de água doce e são considerados bons indicadores tróficos. Esses pequenos crustáceos nadam relativamente bem e esses movimentos natatórios

auxiliam na obtenção de alimentos e fuga de predadores. Eles constituem um grupo muito utilizado em pesquisas de base e aplicadas, tais como estudos evolutivos e ecológicos (FORRÓ et al., 2008). Segundo Aragão et al., (2004) e Rocha; Güntzel, (1999) esses organismos podem ser usados em estudos aplicados à alimentação de alevinos em virtude da facilidade de cultivo em laboratório, o que lhes confere uma importância econômica. Ainda são importantes para ciclagem de nutrientes em ecossistemas aquáticos (ATTAYDE; HANSSON, 1999; COLE et al., 2011). Esses organismos também têm sido utilizados em estudos toxicológicos (NADDY et al., 2011). Como o uso de *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia* em estudos sobre os efeitos de toxicidade de drogas anti-neoplásicas (PARRELLA et al., 2014).

Em Minas Gerais já foi detectada grande riqueza de espécies de cladóceros, por meio de ferramentas morfológicas. De todos os estudos de riqueza já realizados, a segunda maior riqueza do estado está na Bacia do Rio Grande, na qual está inserido o Reservatório da UHE de Furnas, o que pode estar relacionada à grande quantidade de estudos nesta área (SANTOS-WISNIEWSKI et al., 2011). Além das análises morfológicas, essa biodiversidade pode ser acessada por ferramentas moleculares, que podem auxiliar na identificação taxonômica. Dentre as técnicas existentes em Biologia Molecular, pode-se destacar o DNA *barcode*, que tem como base um segmento do gene mitocondrial, o citocromo *c* oxidase subunidade 1 (COI). Essa técnica auxilia na detecção da diversidade, já que a identificação puramente morfológica é muito complexa para determinadas espécies, podendo ocorrer uma subestimativa da biodiversidade (SILVA et al., 2011).

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão foi dividida em três tópicos, em que o primeiro deles evidência características gerais dos organismos (Cladocera) estudados aqui. O segundo tópico é sobre o uso do marcador molecular DNA *barcode* como ferramenta taxonômica e o terceiro corresponde a uma breve descrição dos pontos amostrados.

2.1 CLADOCERA: CARACTERÍSTICAS GERAIS

O grupo Cladocera foi inicialmente caracterizado como uma Ordem da Classe Crustacea, Subclasse Branchiopoda (ROCHA et al., 2011). Foi dividido por Sars em quatro grupos: Ctenopoda, Anomopoda, Haplopoda e Onycopoda (ELMOOR-LOUREIRO, 1997). Posteriormente a esta caracterização o grupo foi dividido em quatro ordens: Anomopoda, Ctenopoda, Onychopoda e Haplopoda (FRYER, 1987).

Segundo Kotov et al., 2011 os cladóceros incluem aproximadamente 700 espécies conhecidas no mundo e são organismos que possuem comprimento corpóreo que varia de 0,2 a 6,0mm (FORRÓ et al., 2008). Em relação à distribuição no corpo d'água, a maior parte das espécies é encontrada em meio à vegetação nas margens (ELMOOR-LOUREIRO, 1997). Visto que há maior heterogeneidade ambiental (SOUSA; ELMOOR-LOUREIRO, 2008). As famílias de Cladocera que normalmente ocorrem associadas às macrófitas são Chydoridae, Macrothricidae e Ilyocryptidae e as famílias de ocorrência comum na região limnética são Daphnidae, Bosminidae, Moinidae e Sididae (ROCHA, 2002). Estes organismos são encontrados em praticamente todas as águas do planeta e essa ampla distribuição geográfica pode ser explicada pela existência de ovos de resistência. Sendo assim, a grande maioria ocorre em águas continentais, tanto em águas salinas quanto água doce, como em lagos e reservatórios, habitando principalmente a região litorânea. Esses ovos podem influenciar a

densidade populacional, já que podem permanecer intactos no sedimento, formando “bancos de ovos”, viáveis por décadas ou séculos (CÁCERES, 1998; BRANDÃO et al., 2014).

As populações desses microcrustáceos são compostas principalmente por fêmeas partenogenéticas, que se reproduzem assexuadamente e produzem ovos diploides (DE MEESTER et al., 2006). Quando as condições ambientais são desfavoráveis, como mudança na temperatura da água, aumento da densidade populacional, alteração do fotoperíodo e disponibilidade de alimento, as fêmeas podem originar machos (ROSE et al., 2002). Desta forma, com indivíduos machos e fêmeas ocorre a fase sexuada do ciclo reprodutivo, com consequente produção de ovos fertilizados. Quando estes ovos eclodem dão origem a outras fêmeas partenogenéticas. Isso ocorre quando as condições do ambiente voltam a ser favoráveis re iniciando o ciclo (DE-MEESTER et al., 2006). Estes ovos resistem a diferentes condições ambientais, tais como baixas temperaturas, seca em lagoas temporárias e passagem pelo trato digestivo de animais (BATTAUZ et al., 2015; FORRÓ et al., 2008; GREEN et al., 2002; SEIDMAN; LARSEN, 1979; PIETRZAK; SLUSARCZYK, 2006).

Quanto à composição das comunidades zooplanctônicas, esta pode ser alterada pela disponibilidade e qualidade de alimento, temperatura (DANTAS et al., 2009; MARTINEZ-JERONIMO; VENTURA-LOPEZ, 2011). Ainda interações ecológicas, como predação e competição (SAMPAIO et al., 2002), entre outras. Com relação à distribuição geográfica, acreditava-se que esses microcrustáceos fossem cosmopolitas, no entanto esse conceito começou a ser questionado no final da década de 80 por Frey (1987), quando foi mostrada a presença de complexos de espécies e não cosmopolitismo em alguns casos (BELYAEVA; TAYLOR, 2009; PENTON et al., 2004). Posteriormente aos questionamentos iniciais, estudos morfológicos e moleculares verificaram a existência de complexos de espécies e não cosmopolitismo para *Chydorus sphaericus* (BELYAEVA; TAYLOR, 2009). Para a *Daphnia obtusa* também foi verificado, através de análises de DNA *barcode* a existência de espécies morfológicamente crípticas (PENTON et al., 2004). Essas espécies possuem diferenças morfológicas sutis, o que dificulta a diferenciação. Recentemente Sharma e Kotov (2013) detectaram para *Ceriodaphnia* (Daphnidae) a existência de complexo de espécies através de análises moleculares, também reforçando a ideia de endemismo continental (BELYAEVA; TAYLOR, 2009; TAYLOR et al., 1998) e não cosmopolitismo (FORRÓ et al., 2008; FREY, 1987). Para Adamowicz et al., (2004), a ideia da existência de espécies endêmicas mostra quão importante é o desenvolvimento de estudos regionais, visto que estimativas erradas implicam na subestimação da diversidade (ADAMOWICZ; PURVIS, 2005). O que consequentemente pode dificultar o gerenciamento da mesma.

A identificação das espécies demanda uma observação aprofundada dos caracteres morfológicos considerados na taxonomia convencional (SÁEZ; LOZANO, 2005; SOUSA; ELMOOR-LOUREIRO, 2008). Essa caracterização em nível de espécie se torna complexa, pois exige a identificação de estruturas corpóreas, como por exemplo, poros cefálicos e apêndices torácicos, que são muito semelhantes entre as espécies, sendo conhecidos principalmente pela grande plasticidade fenotípica (STOLLEWERK, 2010). Em relação aos estudos taxonômicos no Brasil, sabe-se que ainda são muito restritos e escassos, mesmo em locais onde há maior concentração de dados amostrais, como no estado de São Paulo (SOARES; ELMOOR-LOUREIRO, 2011). Atualmente, a detecção de espécies crípticas de Cladocera tem sido feita com maior precisão com o auxílio de ferramentas moleculares. Isso é possível a partir da verificação da divergência genética existente entre os espécimes, o que permite a comparação de sequências de DNA já descritas, como o DNA *barcode* (BELYAEVA; TAYLOR, 2009; ELIAS-GUTIERREZ; VALDEZ-MORENO, 2008).

2.2 DNA *BARCODE*

O aprimoramento das técnicas em Biologia Molecular tem transformado as abordagens dos problemas básicos e aplicados da área, já que até meados de 1980 estavam restritas a sensibilidade de alguns métodos, que tinham como base a marcação isotópica de sondas de DNA com capacidade de evidenciar pequenas quantidades de uma sequência alvo, ainda algumas análises de dados de proteínas, como análises de aloenzima, estavam entre os estudos moleculares desta época (ADAMOWICZ, 2015). No entanto, o desenvolvimento de uma metodologia desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), baseada em uma replicação *in vitro*, a PCR (reação em cadeia da polimerase), proporcionou grandes perspectivas e é considerada relativamente simples. Esse método já foi utilizado no Brasil para detecção de diferenças moleculares para diagnóstico e separação entre duas espécies de Cladocera, pertencentes à família Daphnidae, são elas a espécie nativa, *Ceriodaphnia silvestrii* e a exótica, *Ceriodaphnia dubia* (ABREU et al., 2010).

Dentre as inúmeras ferramentas existentes em Biologia Molecular, pode-se destacar o DNA *barcode*, comumente conhecido como Código de Barras do DNA. Segundo Adamowicz e Scoles (2015) o termo “código de barras do DNA” apareceu de forma independente na literatura, sendo a primeira vez em 1993 por Arnot et al., propondo o uso de sequências como código de barras na identificação de cepas de *Plasmodium falciparum*. Posteriormente foi o nome dado à região do DNA ribossomal (18S) utilizada na identificação de nematoides por Floyd et al. (2002) e só em 2003, com um conceito mais amplo, foi proposto por Hebert et al., (2003), sendo esta a definição de DNA *barcode* usada no desenvolvimento deste trabalho. Essa região do DNA é um segmento que compõe o gene mitocondrial, segmento este chamado de citocromo *c* oxidase subunidade 1 (COI) (Figura 1), que quando amplificado via PCR, possui um fragmento com tamanho correspondente a 650 pares de base para animais (HEBERT et al, 2003; VALENTINI et al., 2009). Segundo Hebert et al., (2003) o genoma mitocondrial é considerado melhor que o nuclear por não conter íntrons e também pela hereditariedade haplóide. Ainda o COI parece apresentar maior variação do sinal filogenético se comparado com outros genes mitocondriais (HEBERT et al., 2003). Além disso, as combinações possíveis dos quatro tipos de desoxirribonucleotídeos geraria uma quantidade gigantesca de possibilidades de código únicos (códigos de barras), que consequentemente

permite a identificação de táxons por uma sequência de DNA *barcode* (HEBERT et al., 2003).

O principal objetivo da determinação do Código de Barras do DNA é ajudar na avaliação da diversidade de espécies do mundo (HEBERT et al., 2003; KVIST, 2013). Para que este objetivo seja alcançado o fragmento de DNA deve ser extremamente semelhante em exemplares da mesma espécie, mas distintos entre espécies diferentes (PEČNIKAR; BUZAN, 2014). Ou seja, as diferenças existentes entre as sequências de indivíduos da mesma espécie não pode exceder aos 3% estabelecidos por Hebert et al., 2003, que foi determinado a partir de uma análise para diferenciar e testar o COI como ferramenta taxonômica. A taxa de sucesso na identificação foi de 100% para espécies de Lepidoptera, uma vez que é uma das ordens mais que engloba grande diversidade taxonômica, portanto espera-se que tais divergências possam ser aplicadas a outros grupos de animais (HEBERT et al., 2003).

Para que seja possível analisar a região de DNA *barcode*, é necessário a amplificação deste segmento do DNA mitocondrial via PCR. Geralmente são usados os *primers* chamados universais (HCO2198 e LCO1490), descritos por Folmer et al., (1994). O uso destes *primers* também ressalta a importância deste pequeno segmento na avaliação da diversidade, já que podem ser usados na amplificação do COI para vários grupos de animais (HEBERT et al., 2003). Embora estes *primers* sejam universais, foi verificada que há dificuldade na amplificação deste gene para zooplâncton quando são usados o HCO2198 e LCO1490 (PROSSER et al., 2013). Isso pode ser verificado na amplificação da região de COI para espécies de *Chydorus* (Família Chydoridae), em que foram desenvolvidos *primers* internos, denominados Chy-f e Chy-r, com base em regiões conservadas de outra espécie de Chydoridae (BELYAEVA; TAYLOR, 2009). Diante desta dificuldade, em 2013 Prosser et al., descreveram os *primers* específicos para Cladocera e Copepoda, denominados ZplankF e ZplankR, os quais são muito semelhantes aos *primers* universais, porém com maior eficácia na obtenção do COI. Os autores deste trabalho sugerem que esse aumento da eficiência da amplificação é em decorrência das bases degeneradas (R, Y, W) que foram adicionadas aos *primers*. (PROSSER et al., 2013). Por exemplo, a eficácia da amplificação via PCR usando o Zplank aumentou de 55% para 95% para a família Bosminidae, de 64,52% para 83,87% para a família Chydoridae e de 75,68% para 81,08% para a família Sididae (PROSSER et al., 2013).

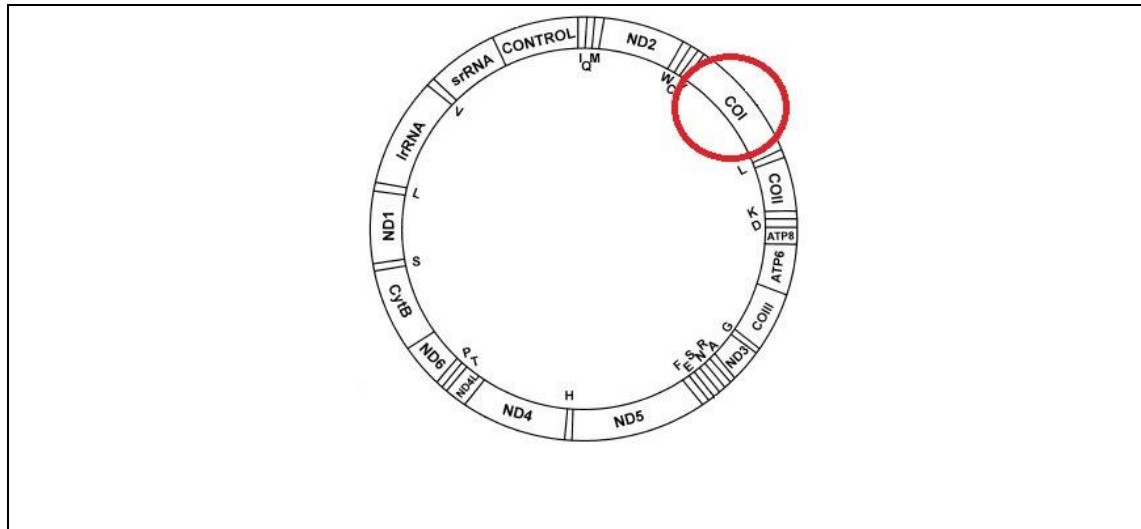


Figura 1 - Genoma mitocondrial e a região de DNA *barcode* (COI) de *Daphnia pulex*.
Fonte: Adaptado de CREASE, 1999.

Segundo Hebert e Gregory (2005), existem inúmeras vantagens do uso desta ferramenta molecular para taxonomia tradicional e para ciência como um todo, já que os dados uma vez obtidos serão arquivados e terão um legado com grande durabilidade, sendo acessível para diferenciação de espécies. Estes autores ainda reforçam que estes dados não são suficientes na descrição de novas espécies e sim na delimitação destas. Um ponto positivo da técnica é o custo não elevado e sua rapidez, além de não necessitar de taxonomistas especialistas para obtenção desta região do DNA (FREZAL; LEBLOIS, 2008). Embora seja necessária uma identificação morfológica feita previamente (GOLDING et al., 2009).

Além dessas vantagens, o COI tem se mostrado eficaz na identificação taxonômica, resolvendo aproximadamente 95% dos problemas taxonômicos de diversos grupos, como Cladocera (ELIAS-GUTIERREZ et al., 2008). Além do aspecto taxonômico e filogenético verificado por Adamowicz et al., (2004), os conhecimentos adquiridos com o DNA *barcode* também auxiliam na identificação espécies invasoras, no controle de tráfico de espécies, controle de pestes (PAZ et al., 2011; VALENTINI et al., 2009). Também pode ser usado na identificação dos organismos em fases diferentes do ciclo de vida de algumas espécies (CHAPPLE; RITCHIE, 2013). Além disso, a análise de sequências COI propicia a avaliação da biodiversidade de comunidades que ocupam e já ocuparam ecossistemas, por exemplo, por meio de análises de exemplares depositados em museus ou em locais de difícil acesso (VALENTINI et al., 2009).

Em 2004 foi criado o Consórcio para os “Códigos de Barras da Vida”, reunindo um número superior a 120 organizações distribuídas em 45 países ao redor do mundo, com o

objetivo de reunir informações de COI para todos os seres vivos eucarióticos (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). Para compilar todos os dados de COI foi criado em 2010 uma base de dados, em que pesquisadores depositam as sequências obtidas e qualquer pessoa pode acessar, analisar e publicar dados gratuitamente, sendo que para isso é necessário que as sequências passem por “testes” de qualidade. Os passos seguidos para que a sequência de COI seja classificada como tal, são sete: nome da espécie, catalogação e instituição que armazena os dados, nome da coleção correspondente, com o nome da pessoa que fez a coleta, coordenadas geográficas do local em que a coleta foi feita, nome de quem identificou os espécimes, sequência com fragmento de no mínimo 500 pares de base, condições da PCR para amplificar a região desejada e finalmente os eletroferogramas (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

A plataforma que reúne todos esses dados é denominada iBOL (*Internacional Barcode of Life*) e tinha o objetivo de reunir, até 2015, 5 milhões de sequências de DNA *barcode* (PAZ et al., 2011). Como esta base de dados é global, para agrupar as informações moleculares somente do Brasil foi criado o BrBOL (*Brazilian Barcode of Life*), que atualmente engloba 11 projetos com abrangência em áreas definidas pelo iBOL: vertebrados, plantas terrestres, fungos, polinizadores, entre outras. Alguns destes já possuem resultados relevantes, com centenas de sequências depositadas no banco de dados. Trabalhos com DNA *barcode* em países considerados ricos em biodiversidade podem ser muito úteis na detecção de espécies crípticas, contribuindo diretamente para o conhecimento desta diversidade. Um exemplo é o México, com a catalogação e depósito de 62.129 sequências de COI de vários grupos taxonômicos (ELIAS-GUTIERREZ; LEON-REGAGNON, 2013).

Em uma busca por sequências de DNA *barcode*, realizada no banco de dados mundial (GenBank), em Fevereiro de 2016, verificamos um número muito maior de sequências para a família Daphnidae do que para as outras, porém a região de DNA *barcode* não é tão estudada nesta família (Fig. 2 e 3). Para a família Sididae, de um total de 305 sequências depositadas, 69,51% são de *barcode* (Fig. 2 e 3) e para Bosminidae, os dados são ainda mais escassos já que, de um total de 1368 sequências depositadas, apenas 6,28% corresponde a região de COI (Fig. 2 e 3).

Para reunir trabalhos e pesquisadores da área ocorrem conferências de DNA *barcode*. A última foi no ano passado em Guelph, no Canadá, com grande representatividade de diversos países, inclusive do Brasil (ADAMOWICZ; SCOLES, 2015). Segundo busca feita no BOLD, no início de fevereiro de 2016, foram encontrados 31347 registros de *barcode* já

depositados pelo Brasil, distribuídos em 145 instituições brasileiras. Destes, apenas seis correspondiam a registros da classe Branchiopoda e nenhum ao grupo Cladocera. Com isso, fica clara a falta de estudos de DNA *barcode* de microcrustáceos no território brasileiro.

Os únicos trabalhos com sequências de DNA *barcode* no Brasil são com organismos provenientes de Minas Gerais. Sendo todos da família Chydoridae: *Alona iheringula*, caracterizado por Silva et al., (2014), *Oxyurella longicaudis* por Castilho et al., (2015) e *Ovalona kaingang* por Abreu et al., (em preparação). Todos estes trabalhos utilizaram os limites de divergências genéticas estabelecidos por Hebert *et al.*, (2003). Esses parâmetros também foram usados por Jeferry et al., (2011) para avaliar a diversidade de Branchiopoda no Canadá, para Cladocera (ELIAS-GUTIERREZ et al., 2008; HAJIBABAEI et al., 2007; SILVA et al., 2014; VERNOOY et al., 2010). E, até para os táxons do Subfilo Crustacea como um todo (SACHEROVA; HEBERT, 2003; COSTA et al., 2007) .

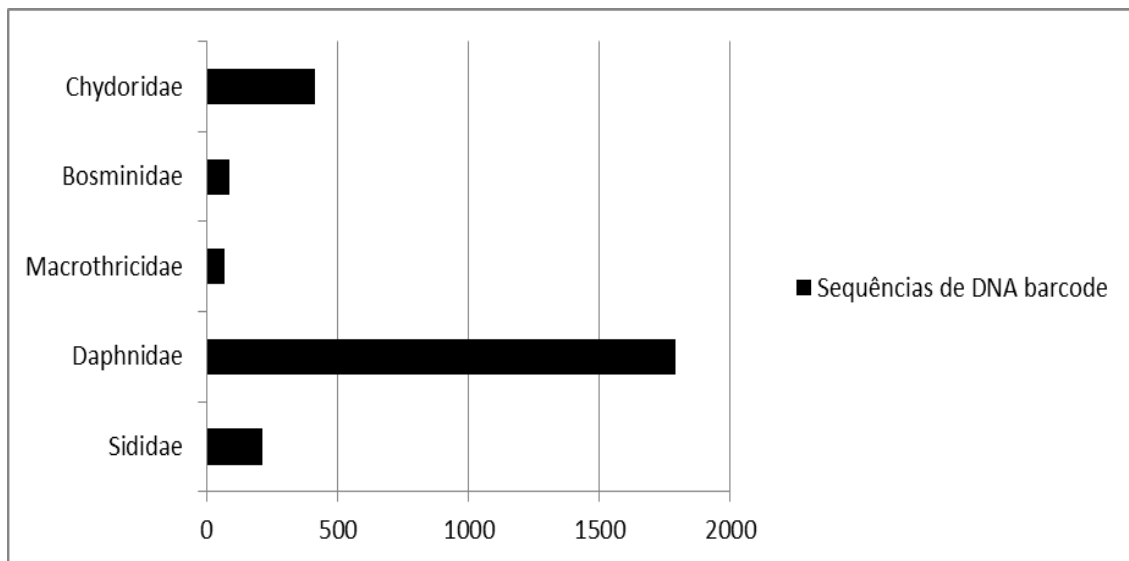


Figura 2 - Número de sequências de DNA *barcode* para algumas famílias de Cladocera, já publicadas no GenBank.

Fonte: Do autor.

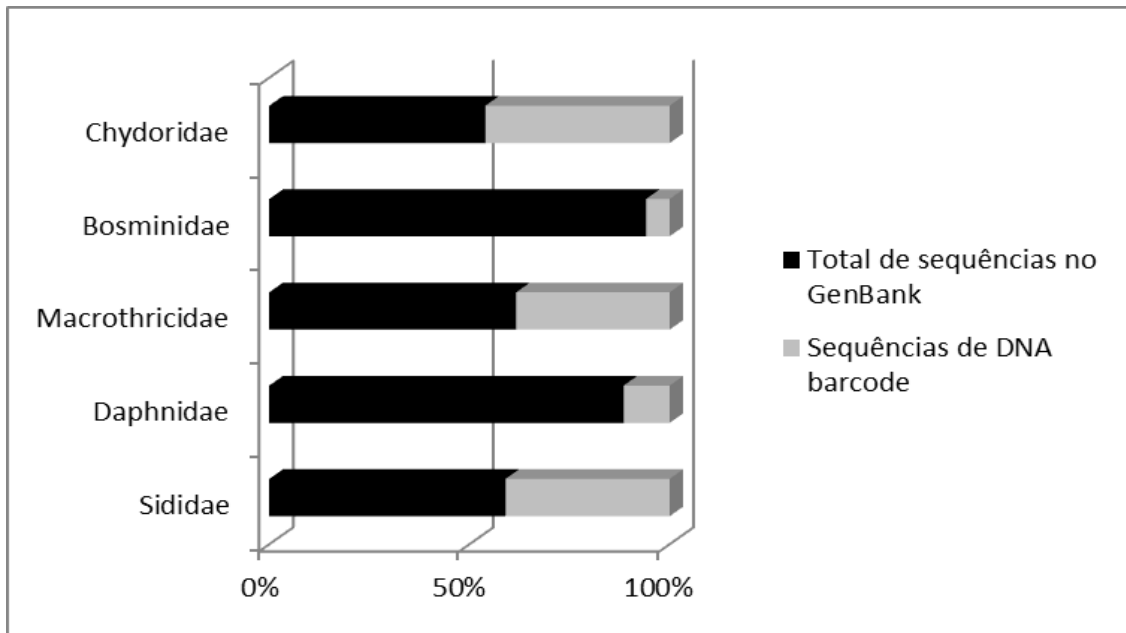


Figura 3 - Porcentagem de sequências de DNA *barcode* em relação ao total de sequências do GenBank para famílias de Cladocera.

Fonte: Do autor.

2.3 CORPOS D'ÁGUA DO SUL DE MINAS GERAIS: RESERVATÓRIO DAUSINA HIDRELÉTRICA DE FURNAS E HELIODORA

Os dois ambientes, ponto Náutico (21°S23'52" 45°W 59'06") no Reservatório da Usina Hidrelétrica de Furnas (UHEF) e em Heliadora (22°S 29' 12" 45°W 36'68"), foram selecionados durante o projeto de levantamento da biodiversidade de Minas Gerais (projeto BIOTA MINAS). Nesses corpos d'água, foi encontrada grande riqueza de organismos, verificada por estudos realizados previamente a esta avaliação molecular. Alguns destes trabalhos que usaram o Reservatório da UHEF como ponto de amostragem foram Viti (2013), que analisou a diversidade e biomassa da comunidade zooplancônica, Castilho (2013), com a análise da estrutura da comunidade zooplancônica em áreas de cultivo em tanques rede, Coelho (2015) com estudos de ovos de resistência presentes no sedimento, levantamento de espécies de Cladocera (SANTOS-WISNIEWSKI et al., 2011). Portanto, as coletas e a catalogação das amostras destes trabalhos preliminares possibilitaram a caracterização da região de DNA *barcode*, das espécies de Cladocera aqui analisadas.

Os reservatórios hidrelétricos brasileiros foram responsáveis por uma grande modificação em rios, lagos, pântanos nas regiões sul e sudeste (TUNDISI et al., 1993; TUNDISI, 2007). Entre os danos que normalmente ocorrem, estão a degradação da qualidade da água, redução dos recursos hídricos, entre outros (TUNDISI, 2005). Estes ecossistemas são bons indicadores dos impactos da ação antrópica, porque englobam as consequências do uso e ocupação ao redor da sua bacia de drenagem (TUNDISI, 1996). Já as consequências oriundas dos barramentos sobre a fauna aquática neotropical não são muito bem definidas e além desses impactos, existem as consequências sócio-culturais, provenientes do alagamento de terras indígenas e sítios arqueológicos (HENRY, 1999).

Segundo informações do site da Usina Hidrelétrica de Furnas (http://www.furnas.com.br/hotsites/sistemapurnas/usina_hidr_furnas.asp), o Reservatório da UHEF possui extensão máxima de 220 km e com uma área inundada de 1.440 km². A usina está localizada no Rio Grande, entre os municípios de São José da Barra e São João Batista do Glória em Minas Gerais. No geral, os reservatórios foram construídos com intuito de suprir a crescente necessidade de geração de energia no país, mas possuem diversos tipos de usos

além da geração de energia, como abastecimento público e lazer (AGOSTINHO; GOMES, 2005), navegação e controle de inundações (COOKE et al., 1993).

O segundo ponto está localizado na região de Heliódora-MG, que é uma cidade turística, que esta está localizada na Serra da Mantiqueira. Esta região é considerada como prioridade na conservação, pela Fundação Biodiversitas (DRUMMOND et al., 2005). Além disso, já existem estudos prévios com a comunidade zooplanctônica na Serra da Mantiqueira que foram realizados previamente. Por exemplo, Santos-Wisniewski et al (2001) registraram a primeira ocorrência de *Alona setigera* no Brasil. Santos-Wisniewski et al (2002) analisaram a diversidade de espécies de Chydoridae (Cladocera). Especificamente no município de Heliódora foram feitos trabalhos da comunidade zooplanctônica, com diversidade filogenética e comunidade ativa e passiva (REIS, 2015).

3. OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram divididos em gerais e específicos e estão listados em tópicos separados.

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a diversidade genética de organismos do grupo Cladocera presentes no Sul de Minas Gerais utilizando o DNA *barcode* como ferramenta molecular, além de verificar possíveis complexos de espécies e detecção de problemas taxonômicos dentro do grupo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentre os objetivos específicos estão:

- a) Caracterizar a divergência genética das espécies de Cladocera e utilizar os dados para auxílio na determinação da classificação taxonômica morfológica das espécies, com intuito de identificar a biodiversidade de Cladocera de dois pontos do Sul de Minas Gerais.
- b) Verificar a ocorrência de espécies crípticas e complexos de espécies dos espécimes encontrados no reservatório da UHE de Furnas ou Heliadora;
- c) Contribuir para o aumento de sequências de DNA de Cladocera disponíveis nos bancos mundiais, como GenBank e BOLD.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. J. et al. The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea Cladocera). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 1, p. 121-124, Feb. 2010.

ADAMOWICZ, S. J.; HEBERT, P. D. N.; MARINONE, M. C. Species diversity and endemism in the *Daphnia* of Argentina: a genetic investigation. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 140, n. 2, p. 171-205, Feb. 2004.

ADAMOWICZ, S. J.; PURVIS, A. How many branchiopod crustacean species are there? Quantifying the components of underestimation. **Global Ecology and Biogeography**, v. 14, n. 5, p. 455-468, Sep. 2005.

ADAMOWICZ, S. J.; SCOLES, G. J. International Barcode of Life: Evolution of a global research community. **Genome**, v. 58, n. 5, p. 151-162, 2015.

AGOSTINHO, A.; GOMES, L. Biocenoses em Reservatórios: padrões espaciais e temporais. São Carlos, Rima, 2005.

ARAGÃO, C. et al. Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. **Aquaculture**, v. 234, p. 429 - 445, 2004.

ARNOT, D. E.; ROPER, C.; BAYOUMI, R. A. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 61, n. 1, p. 15-24, 1993.

ATTAYDE, J. L.; HANSSON, L. A. Effects of nutrient recycling by zooplankton and fish on phytoplankton communities. **Oecologia**, v. 121, p. 47-54, 1999.

BATTAUZ, Y. S.; JOSE DE PAGGI, S. B.; PAGGI, J. C. Endozoochory by an ilyophagous fish in the Parana River floodplain: a window for zooplankton dispersal. **Hydrobiologia**, v. 755, n. 1, p. 161-171, Aug. 2015.

BELYAEVA, M.; TAYLOR, D. J. Cryptic species within the *Chydorus sphaericus* species complex (Crustacea: Cladocera) revealed by molecular markers and sexual stage morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 50, n. 3, p. 534-546, Mar. 2009.

BRANDAO, L. P. M.; PUJONI, D. G. F.; MAIA-BARBOSA, P. M. Seasonal dynamics of *Daphnia laevis* Birge, 1878 ephippia in a tropical lake with a description of a new methodology for in situ evaluation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3, p. 642-648, Aug. 2014.

BROOKS, J. L.; DODSON, S. I. Predation, Body Size, and Composition of Plankton. **Science**, v. 150, n. 3692, p. 28-35, Oct. 1 1965.

CÁCERES, C. E. Interspecific variation in the abundance, production, and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. **Ecology**, v. 79, n. 5, p. 1699-1710, 1998.

CARDINALE, B. J. et al. Biodiversity loss and its impact on humanity. **Nature**, v. 486, n. 7401, p. 59-67, 2012.

CASTILHO, M. C. A. **Estrutura da comunidade zooplanctônica em áreas de cultivo em tanques rede no reservatório da UHE de Furnas-MG, compartimento Rio Sapucaí.** 2013. 124f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental), Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2013.

CASTILHO, M. C. D. et al. Life history and DNA barcode of *Oxyurella longicaudis* (Birgei, 1910) (Cladocera, Anomopoda, Chydoridae). **Zoological Studies**, v. 54, Jan. 2015.

CHAPPLE, D. G.; RITCHIE, P. A. A Retrospective Approach to Testing the DNA Barcoding Method. **Plos One**, v. 8, n. 11, Nov. 11 2013.

CLARIDGE, M.; DAWAH, H.; WILSON, M. *The Units of Biodiversity*: London: Chapman and Hall 1997.

COELHO, P. N. **Comparação da diversidade da comunidade zooplanctônica ativa e dos ovos de resistência presentes no sedimento do Reservatório da UHE DE Furnas-MG.** 2015. 135f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental), Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2015.

- COLE, J. J.; CARPENTER, S. R.; KITCHELL, J.; PACE, M. L.; SOLOMON, C. T.; WEIDLE, B. Strong evidence for terrestrial support of zooplankton in small lakes based on stable isotopes of carbon, nitrogen, and hydrogen. **PNAS**, v. 108, n. 5, p. 1975–1980, 2011.
- COOKE, G. D.; WELCH, E. B.; PETERSON, S. A.; NEWROTH, P. Restoration and management of lakes and reservoirs. 2. ed. . Boca Raton: Lewis Publishers, 548 p. 1993.
- COSTA, F. O. et al. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 64, n. 2, p. 272-295, Feb. 2007.
- CREASE, T. J. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). **Gene**, v. 233, n. 1, p. 89-99, 1999.
- CRISTESCU, M. E. From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. **Trends in ecology & evolution**, v. 29, n. 10, p. 566-571, 2014.
- DANTAS, E. W. et al. Abiotic variables and phytoplankton effects on zooplanktonic community from a reservoir in northeast Brazil. **Iheringia Serie Zoologia**, v. 99, n. 2, p. 132-141, Jun. 2009.
- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 3, p. 407-415, 2005.
- DE MEESTER, L. et al. Genetic structure of cyclic parthenogenetic zooplankton populations - a conceptual framework. **Archiv Fur Hydrobiologie**, v. 167, n. 1-4, p. 217-244, Sep. 2006.
- DRUMMOND, G. M.; MARTINS, C. S.; MACHADO, A. B. M.; SEBAIO, F. A.; ANTONINI, Y. Biodiversidade em Minas Gerais. 2. ed. Belo Horizonte: Fund. Biodiversitas/MG, 222 p. 2005.
- ELIAS-GUTIERREZ, M. et al. DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. **Zootaxa**, n. 1839, p. 1-42, Aug. 1 2008.
- ELIAS-GUTIERREZ, M.; LEON-REGAGNON, V. DNA barcoding in Mexico: an introduction. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 6, p. 1093-1096, Nov. 2013.

ELIAS-GUTIERREZ, M.; VALDEZ-MORENO, M. A now cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding. **Hydrobiologia**, v. 18, n. 1, p. 63-74, Mar. 2008.

ELMOOR-LOUREIRO, L. M. A. Manual de identificação de cladóceros límnicos do Brasil. Universa, 1997.

FLOYD, R. et al. Molecular barcodes for soil nematode identification. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 4, p. 839-850, 2002.

FOLMER, O et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular marine biology and biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.

FORRO, L. et al. Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 177-184, Jan. 2008.

FREY, D. G. The Taxonomy and Biogeography of the Cladocera. **Hydrobiologia**, v. 145, p. 5-17, Feb. 20 1987.

FRYER, G. Morphology and the classification of the so-called Cladocera. **Hydrobiologia**, v. 145, n. 1, p. 19-28, 1987.

FREZAL, L.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. **Infection Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727-736, Sep. 2008.

GOLDING, G.; HANNER, R.; HEBERT, P. Preface to special issue on barcoding life. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. iv-vi, 2009.

GREEN, A. J.; FIGUEROLA, J.; SANCHEZ, M. I. Implications of waterbird ecology for the dispersal of aquatic organisms. **Acta Oecologica-International Journal of Ecology**, v. 23, n. 3, p. 177-189, Jun. 2002.

HAJIBABAEI, M. et al. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 959-964, Dec. 2006.

HAJIBABAEI, M. et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 4, p. 167-172, Apr. 2007.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, Feb. 7 2003.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p. 852-859, Oct. 2005.

JEFFERY, N. W.; ELIAS-GUTIERREZ, M.; ADAMOWICZ, S. J. Species Diversity and Phylogeographical Affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba, Canada. **Plos One**, v. 6, n. 5, May. 17 2011.

JOLY, S. et al. Ecology in the age of DNA barcoding: the resource, the promise and the challenges ahead. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 2, p. 221-232, Mar. 2014.

KOTOV, A. A. et al. Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) from the Zeya River Basin (Amur Region, Russian Federation). 3. Systematic-faunistical and zoogeographical analyses. **Zoologicheskyy Zhurnal**, v. 90, n. 4, p. 402-411, Apr. 2011.

KVIST, S. Barcoding in the dark?: a critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 1, p. 39-45, 2013.

LARIGAUDERIE, A. et al. Biodiversity and ecosystem services science for a sustainable planet: the DIVERSITAS vision for 2012–20. Current opinion in environmental sustainability, v. 4, n. 1, p. 101-105, 2012.

LEFEBURE, T. et al. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 2, p. 435-447, Aug 2006.

MARTINEZ-JERONIMO, F.; VENTURA-LOPEZ, C. Population dynamics of the tropical cladoceran *Ceriodaphnia rigaudi* Richard, 1894 (Crustacea: Anomopoda). Effect of food type and temperature. **Journal of Environmental Biology**, v. 32, n. 4, p. 513-521, Jul. 2011.

- MITTMANN, B. et al. Development and staging of the water flea *Daphnia magna* (Straus, 1820; Cladocera, Daphniidae) based on morphological landmarks. **Evodevo**, v. 5, p. 19, Mar. 2014.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: (Ed.). **Methods in Enzymology: Academic Press**, v. Volume 155, p.335-350. 1987.
- NADDY, R. B. et al. The effect of food on the acute toxicity of silver nitrate to four freshwater test species and acute-to-chronic ratios. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 8, p. 2019-2029, Nov. 2011.
- PARRELLA, A. et al. Toxicity of exposure to binary mixtures of four anti-neoplastic drugs in *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. **Aquat Toxicol**, v. 157, p. 41-6, Dec. 2014.
- PAZ, A.; GONZALEZ, M.; CRAWFORD, A. J. Códigos de Barras de la vida: introducción y perspectiva. **Acta Biológica Colombiana**, v. 16, n. 3, p. 161-176, 12 2011.
- PEČNIKAR, Ž. F.; BUZAN, E. V. 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application. **Journal of applied genetics**, v. 55, n. 1, p. 43-52, 2014.
- PENTON, E.; HEBERT, P.; CREASE, T. Mitochondrial DNA variation in North American populations of *Daphnia obtusa*: continentalism or cryptic endemism? **Molecular Ecology**, v. 13, n. 1, p. 97-107, 2004.
- PIETRZAK, B.; SLUSARCZYK, M. The fate of the ehippia-*Daphnia* dispersal in time and space. **Polish Journal of Ecology**, v. 54, n. 4, p. 709-714, 2006.
- PROSSER, S.; MARTINEZ-ARCE, A.; ELIAS-GUTIERREZ, M. A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 6, p. 1151-1155, Nov. 2013.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular ecology notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.
- REIS, K. P. Estrutura da comunidade zooplanctônica de lagos de grande altitude com ênfase nas alterações das populações de *Bosmina freyi* (Cladocera, Bosminidae)

(**ocorrência de macho e ovos de resistência**). 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais), Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2015.

ROCHA, O. and GÜNTZEL, AM. 1999. Crustáceos branquiópodos. In: ISMAEL, D., VALENTI, WC., MATSUMURA-TUNDISI, T. and ROCHA, O. Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil: invertebrados de água doce. vol. 4. São Paulo: FAPESP. p.110-144.

ROCHA, O.; SANTOS-WISNIEWSKI, M. J.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Checklist de Cladocera de água doce do Estado de São Paulo. *Biota neotrop.*(Online, Ed. port.), v. 11, n. supl. 1, p. 571-592, 2011.

ROSE, R. M.; WARNE, M. S.; LIM, R. P. Some life history responses of the cladoceran *Ceriodaphnia cf. dubia* to variations in population density at two different food concentrations. **Hydrobiologia**, v. 481, n. 1-3, p. 157-164, Aug. 2002.

SACHEROVA, V.; HEBERT, P. D. N. The evolutionary history of the Chydoridae (Crustacea : Cladocera). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 79, n. 4, p. 629-643, Aug. 2003.

SACHEROVA, V.; HEBERT, P. D. N. The evolutionary history of the Chydoridae (Crustacea : Cladocera). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 79, n. 4, p. 629-643, Aug. 2003.

SÁEZ, A. G.; LOZANO, E. Body doubles. **Nature**, v. 433, n. 7022, p. 111-111, 2005.

SAMPAIO, E. V. et al. Composition and abundance of zooplankton in the limnetic zone of seven reservoirs of the Paranapanema River, Brazil. **Braz J Biol**, v. 62, n. 3, p. 525-45, Aug. 2002.

SANTOS-WISNIEWSKI, M. J. et al. Diversity of Cladocera Chydoridae in lakes and reservoirs from the high portion of Tiete River, SP, Brazil. **International Association of Theoretical and Applied Limnology**, Vol 28, Pt 2, Proceedings, v. 28, p. 881-886, 2002.

SANTOS-WISNIEWSKI, M. J. et al. Present knowledge on Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) diversity of freshwaters in Minas Gerais State. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 3, p. 287-301, Jul-Sep. 2011.

SANTOS-WISNIEWSKI, M. J.; ROCHA, O.; MATSUMURA-TUNDISI, T. First Record of *Alona setigera* Brehm, (Cladocera, Chydoridae) in the Neotropical Region. **Braz J Biol**, v. 61, n. 4, p. 701-702, 2001.

SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; WAPLES, R. S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 1, p. 25-33, 2007.

SEIDMAN, L. A.; LARSEN JR, J. H. Ultrastructure of the envelopes of resistant and nonresistant *Daphnia* eggs. **Canadian Journal of Zoology**, v. 57, n. 9, p. 1773-1777, 1979.

SHARMA, P.; KOTOV, A. A. Molecular approach to identify sibling species of the *Ceriodaphnia cornuta* complex (Cladocera: Daphniidae) from Australia with notes on the continental endemism of this group. **Zootaxa**, v. 3702, n. 1, p. 79-89, Aug. 23 2013.

SILVA, E. D. et al. *Alona iheringula* Sinev & Kotov, 2004 (Crustacea, Anomopoda, Chydoridae, Aloninae): Life Cycle and DNA Barcode with Implications for the Taxonomy of the Aloninae Subfamily. **Plos One**, v. 9, n. 5, May. 30 2014.

SILVA, J. M. et al. Systematic and Evolutionary Insights Derived from mtDNA COI Barcode Diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). **Plos One**, v. 6, n. 5, p. 15, May. 2011.

SINEV, A. Y. Revision of the *pulchella*-group of *Alona* s. lato leads to its translocation to *Ovalona* Van Damme et Dumont, 2008 (Branchiopoda: Anomopoda: Chydoridae). **Zootaxa**, v. 4044, n. 4, p. 451-492, 2015.

SINEV, A. Y. Redescription of *Alona iheringi* Sars, 1901 (Chydoridae, Anomopoda, Branchiopoda), a South American species related to *A. rustica* Scott, 1895. **Hydrobiologia**, v. 464, n. 1-3, p. 113-119, 2001.

SINEV, A. Y; VAN DAMME, K; KOTOV, A. A. Redescription of tropical-temperate cladocerans *Alona diaphana* King, 1853 and *Alona davidi* Richard, 1895 and their translocation to *Leberis* Smirnov, 1989 (Branchiopoda: Anomopoda: Chydoridae). **Arthropoda Selecta**, v. 14, n. 3, p. 183-205, 2005.

- SOARES, C. E. A.; ELMOOR-LOUREIRO, L. M. A. An updated checklist of Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) from Pernambuco State, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 2, p. 409-414, Apr-Jun. 2011.
- SOUSA, F. D. R.; ELMOOR-LOUREIRO, L. M. A. Cladóceros fitófilos (Crustacea, Branchiopoda) do Parque Nacional das Emas, estado de Goiás. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 1, p. 159-166, 2008-03 2008.
- STOLLEWERK, A. The water flea *Daphnia*--a 'new' model system for ecology and evolution? **J Biol**, v. 9, n. 2, p. 21, 2010.
- TAYLOR, D. J.; FINSTON, T. L.; HEBERT, P. D. N. Biogeography of a widespread freshwater crustacean: Pseudocongruence and cryptic endemism in the North American *Daphnia laevis* complex. **Evolution**, v. 52, n. 6, p. 1648-1670, Dec. 1998.
- TUNDISI, J. G. Água no século XXI: enfrentando a escassez. 2 ed. São Carlos: RiMa, IEE. p. 248, 2005.
- TUNDISI, J. G. Exploração do potencial hidrelétrico da Amazônia. *Estudos Avançados*, v. 21, n. 59, p. 109-117. 2007.
- TUNDISI, J. G. Reservoir as complex systems. *Ciência e Cultura*, v.48, n.5/6, p.383-387. 1996.
- TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; CALIJURI, M. C. Limnology and management of reservoir in Brazil. In: STRASKRABA, M.; TUNDISI, J. G.; DUNCAN, A. (Eds.). Comparative reservoir limnology and water quality management. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, p. 25-55 1993.
- VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. DNA barcoding for ecologists. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 2, p. 110-117, Feb. 2009.
- VAN DAMME, K.; SINEV, A. Y.; DUMONT, H. J. Separation of Anthalona gen. n. from Alona Baird, 1843 (Branchiopoda: Cladocera: Anomopoda): morphology and evolution of scraping stenothermic alonines. **Zootaxa**, v. 2875, p. 1-64, 2011.

VERNOOY, R. et al. Barcoding Life to Conserve Biological Diversity: Beyond the Taxonomic Imperative. **Plos Biology**, v. 8, n. 7, Jul. 2010.

VITI, T. **Diversidade e biomassa da comunidade zooplanctônica e produção secundária (cladocera e rotifera) em pontos com influência do esgoto sanitário no reservatório da UHE de Furnas- MG, município de Alfenas e caracterização biológica de uma espécie de Cladocera.** 2013. 148f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental), Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2013.

Revelando a diversidade genética de Cladocera no Brasil usando DNA *barcode*

Título em inglês: Discovering hidden Cladocera diversity in Brazil using DNA barcode

Cíntia Bruno de Abreu, Maria José dos Santos Wisniewski e Tereza Cristina Orlando

Instituto de Ciências da Natureza. Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Gabriel Monteiro da Silva, 700, CEP 37130-000, Alfenas MG, Brasil.

RESUMO

O uso de técnicas moleculares, como DNA *barcode*, tem mudado os estudos relacionados à biodiversidade. Este marcador molecular com base em um curto fragmento (COI) do gene mitocondrial é uma ferramenta eficaz na identificação de espécies e avaliação da diversidade de diversos grupos de animais. Dentre esses grupos de animais, para os quais a técnica pode ser útil estão os cladóceros. Estes organismos, popularmente conhecidos como pulgas d'água, habitam principalmente ambientes aquáticos de água doce. No estado de Minas Gerais, foi verificada grande riqueza de espécies de cladóceros, através de ferramentas morfológicas. Neste contexto, nós avaliamos a diversidade genética de espécies de Cladocera de um ponto do Reservatório da Usina Hidrelétrica de Furnas e outro no município de Heliódora (ambos no Sul de Minas Gerais). Este é o primeiro inventário molecular de Cladocera no Brasil, cujo objetivo foi diferenciar os isolados brasileiros de exemplares de outros países, verificando assim problemas taxonômicos e existência de espécies crípticas. Obtivemos sequências para 10 espécies de Cladocera, distribuídas nas famílias Sididae, Daphnidae, Bosminidae e Chydoridae. Dos fragmentos amplificados 90% foram maiores que 500pb. Algumas destas sequências de COI (*Bosmina freyi* e *Bosminopsis deitersi*), além de serem as primeiras para o gênero no Brasil são as primeiras do mundo. Ainda verificamos que a maioria dos isolados brasileiros são molecularmente diferentes dos espécimes do México, Canadá e Guatemala. No entanto, para *Daphnia laevis* as baixas divergências genéticas obtidas entre o isolado brasileiro e o argentino as classificam como integrantes da mesma entidade taxonômica, reforçando o conceito de endemismo continental. Em relação ao

complexo *cornuta* sugerimos que o espécime brasileiro faça parte deste complexo como outra espécie. Também conseguimos diferenciar a espécie nativa *Ceriodaphnia silvestrii* da exótica *Ceriodaphnia dubia*, com divergência genética de 17,1% entre elas. Portanto, o uso do DNA *barcode* como marcador molecular foi eficaz tanto na detecção da diversidade genética dos espécimes de Cladocera, quanto ferramenta taxonômica. Futuramente nossos dados poderão ser aplicados em estudos de diversidade filogenética, distribuição geográfica, padrões biogeográficos e auxiliar em revisões taxonômicas.

Introdução

A necessidade da manutenção da biodiversidade tem sido um dos principais desafios da sociedade [1]. Além disso, o estabelecimento da riqueza biológica é uma forma de avaliar o impacto da nossa espécie sobre o meio ambiente [2]. Desta forma, a identificação de espécies é fundamental na criação de políticas conservacionistas e gerenciamento da biodiversidade [3]. Para Claridge *et al.*, [4], a unidade fundamental da biodiversidade é o nível de espécie e, muitas vezes, pode haver dificuldade na determinação de qual conceito de espécie a ser utilizado, em decorrência da grande quantidade de definições [5]. Ainda, essa dificuldade de determinação/delimitação pode ser, por exemplo, pela dificuldade de amostragem em locais de difícil acesso [6], existência de espécies crípticas e complexidade da identificação do estágio de vida [7].

Há diversas estratégias utilizadas para monitorar a diversidade, porém grande parte delas não usa marcadores moleculares [8]. O uso dessas ferramentas, incluindo o DNA *barcode*, transformou os estudos de biodiversidade [2], podendo inclusive ser útil no gerenciamento de recursos biológicos [9]. Um problema grave relacionado à falta de conhecimento das espécies é que muitas destas são extintas antes mesmo de sua catalogação taxonômica [10]. Essa classificação para diversos grupos, como é o caso de organismos zooplanctônicos, ainda é muito discutida, incompleta e até mesmo incerta [11]. Os organismos que pertencem ao Subfilo Crustacea e à classe Branchiopoda, como o grupo Cladocera, se encaixa perfeitamente nesta situação, pois muitas espécies estão sendo revisadas e até realocadas em gêneros diferentes [12, 13, 14, 15, 16].

A Super Ordem Cladocera inclui diversas Ordens, dentre elas a Ctenopoda Sars, 1865 e Anomopoda Sars, 1865, as quais possuem espécies representantes neste estudo. De acordo com Kotov [17], aproximadamente 700 espécies de Cladocera são conhecidas no mundo, mas esse levantamento e identificação da diversidade foi verificada através de análises morfológicas. Para a maioria destes organismos, como já foi mencionado, as relações taxonômicas ainda são incertas, já que são externamente semelhantes e de difícil classificação, pois exige a observação aprofundada de caracteres morfológicos, como apêndices torácicos. Apesar disso, houve um aumento na avaliação da riqueza de Cladocera

em várias regiões, incluindo a Neotropical, em decorrência da capacitação taxonômica e sistemática [18].

Mesmo com a complexidade da taxonomia morfológica, a maioria dos trabalhos de diversidade de Cladocera no mundo e no Brasil não inclui análises moleculares [17, 19, 20, 21], mas sim exploraram distribuição temporal e espacial [16, 22, 23, 24]. As análises usando a biologia molecular poderiam auxiliar com maior precisão e eficácia no estabelecimento desta biodiversidade. Por exemplo, Elías-Gutiérrez *et al.* [11] foram os primeiros a determinar a região de DNA *barcode* para várias espécies de Cladocera tanto do México quanto da Guatemala. Isso contribuiu grandemente para o conhecimento desses microcrustáceos, já que muitas das sequências de COI para Cladocera existentes no GenBank são deste trabalho. Apesar da grande quantidade de dados existentes, estes estão concentrados em localidades específicas do mundo (como México, Guatemala, Canadá e Austrália). Além da distribuição das sequências não serem geograficamente homogêneas, o número dessas também é variável de acordo com a família. Por exemplo, a família Daphnidae engloba uma quantidade extensa de sequências de COI no banco de dados, com 1.855 (Acesso ao GenBank em 03 de Fevereiro de 2016). Uma das possíveis razões seria porque os organismos desta família são usados mundialmente em estudos ecotoxicológicos [25], englobando maior conhecimento da ciência. Essa discrepância na distribuição dos dados de DNA *barcode* mostra a necessidade de estudar mais todas as famílias, para que as sequências de COI forneçam maior subsídio para revisões taxonômicas futuras, estabelecimento da diversidade, entre outras aplicações.

No Brasil, os estudos taxonômicos são escassos, mesmo em locais com maior quantidade de dados amostrais [26]. Até o momento os únicos trabalhos com sequências de COI são com organismos provenientes de Minas Gerais e são todos de espécies da família Chydoridae: *Alona iheringula* [27], *Oxyurella longicaudis* [28] e *Ovalona kaingang* (ABREU *et al.*, em preparação). Diante disso, fica evidente a escassez de dados moleculares para Cladocera, se compararmos com a quantidade de estudos, por exemplo, de distribuição. O DNA *barcode* tem se mostrado eficiente na detecção da diversidade críptica [29,30], taxonomia [29] e até mesmo auxiliando no entendimento da distribuição geográfica, que engloba o conceito de endemismo continental em Cladocera [30, 31]. Este conceito é o oposto da distribuição global (cosmopolitismo), que começou a ser questionada no final da década de 80 [32]. Atualmente, o endemismo continental, e não cosmopolitismo, está cada vez mais aceito [31, 33, 34] e a técnica do DNA *barcode* é usada para comprová-lo, como nos trabalhos

para *Chydorus sphaericus* (Chydoridae) [35], para *Ceriodaphnia* (Daphniidae) Sharma Kotov [31] e para *Simocephalus* da China [36].

Em relação à detecção da grande riqueza de espécies de Cladocera no Brasil, incluindo a Bacia do Rio Grande, a qual se insere o Reservatório da Usina Hidrelétrica de Furnas – Minas Gerais, esta poderia ser explicada por concentrar a maior parte de estudos, que deveriam ser ampliados, abrangendo outras localidades [37]. Apesar de um bom conhecimento desta diversidade, como a maioria destes não aborda análises moleculares, isso poderia implicar uma subestimação da diversidade [33, 37], já que é comum a ocorrência de espécies crípticas e complexos de espécies em microcrustáceos [30]. Mas, para que haja a determinação da diversidade críptica através da biologia molecular é necessário delimitar parâmetros de divergência genética na identificação dos espécimes.

Esses limites de divergências genéticas foram inicialmente estabelecidos por Hebert *et al.*, [38] e, posteriormente, outros pesquisadores utilizaram os valores previamente estabelecidos em estudos de diversidade, por exemplo: Jeffery *et al.*, [30], em uma análise da diversidade de Branchiopoda no Canadá; Costa *et al.*, [39], em uma análise da diversidade de Crustacea e Elias-Gutierrez *et al.*, [11], para Cladocera, no México e Guatemala. Todos estes autores consideraram que divergências genéticas acima de 5%, quando se tem informações da morfologia, ecologia e outros marcadores, determinam espécies distintas; divergências entre 5% e 3% apontam para espécies provisionais e menores que 3% são considerados como organismos da mesma espécie. Neste estudo caracterizamos a região de DNA *barcode* para espécimes de várias famílias de Cladocera existentes em dois corpos d'água no Sul de Minas Gerais, no qual foi possível identificar a diversidade genética e possíveis espécies crípticas e realizar o levantamento de problemas taxonômicos com essa ferramenta molecular.

Metodologia

Os espécimes foram isolados de dois pontos: Náutico, no Reservatório da Usina Hidrelétrica de Furnas e Heliadora, ambos no Sul de Minas Gerais, Brasil (Tabela 1). Os animais foram fixados em etanol 100%. Anteriormente à extração de DNA os espécimes foram deixados em água Milli-Q por 3h. O DNA genômico foi extraído utilizando *InstaGene* (Bio-Rad), seguindo o protocolo do fabricante. Para amplificar a região de COI usamos os *primers* desenvolvidos por Prosser *et al.* [40] - ZplankF1 5'-

tgtaaacgacggccagtTCTASWAATCATAARGATATTGG-3' and ZplankR1 5'-caggaaacagctatgacTTCAGGRTGRCCRAARAATCA-3' – e desenvolvidos por Folmer et al. [41] – LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' e HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'. As condições da reação de PCR reactions tinha um volume total de 25µl e foram realizadas de acordo com Ivanova [42] usando Platinum *Taq* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) como enzima. As condições da PCR foram 95°C por 3 min seguido por 40 ciclos de 95°C por 15s, 52°C por 45s e 72°C por 60s seguido de 72°C por 10min. Os produtos de PCR foram sequenciados nas duas direções após tratamento com as enzimas Exo-SAP (Fermentas) e aplicados em sequenciador *3130xl Genetic Analyzer* (Life Technologies, Carlsbad/CA/USA) de acordo com as instruções do fabricante.

As seqüências de COI de Cladocera foram alinhadas no MEGA 6 [43] com todas as outras seqüências de COI previamente publicadas que exibiram grande semelhança de seqüências quando comparadas com as seqüências de COI obtidas do GenBank. Para verificar se há *stopcodons* as seqüências foram traduzidos para proteína, usando MEGA 6 [43]. Usando o alinhamento final, o modelo de distância a Kimura 2-Parâmetros (K2P) foi usado para calcular as divergências genéticas e a análise foi realizada utilizando MEGA 6 [43] com neighbor joining (NJ) e *bootstrapping* não paramétrico com 1000 réplicas.

Resultados e Discussão

Obtivemos seqüências de COI para 10 espécies, distribuídas em 4 das 7 famílias de Cladocera: Sididae (*Diaphanosoma cf birgei*), Daphnidae (*Ceriodaphnia silvestrii*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia cf rigaudii*, *Scapholeberis armata freyi*, *Daphnia laevis*, *Simocephalus* sp), Bosminidae (*Bosmina freyi* e *Bosminopsis deitersi*) e Chydoridae (*Chydorus pubescens*). Os fragmentos variaram de 493 a 659 pares de base, das quais 90% foi maior que 500pb (Tabela 1), essa porcentagem é importante, porque um dos requisitos para que uma seqüência de DNA *barcode* seja considerada de boa qualidade é possuir um tamanho maior que 500pb [44, 45]

O DNA *barcode* dos espécimes analisados foi amplificados com diferentes *primers* (Tabela 1), já que a obtenção da região de COI para algumas famílias são mais difíceis do que para outras [40]. Por exemplo, para a família Bosminidae a taxa de sucesso de PCR de 55%

com os *primers* desenvolvidos por Folmer *et al.*, [41] aumentou para 95%, quando usados os *primers* desenvolvidos por Prosser *et al.*, [40]. Os dados obtidos confirmam a eficácia da amplificação de DNA *barcode* com os *primers* específicos para zooplâncton, pois aqui o DNA dos dois espécimes da família Bosminidae (*Bosminopsis deitersi* e *Bosmina freyi*) também foi amplificado com estes *primers*, após inúmeras tentativas com os *primers* universais [41]. Além da dificuldade, o uso de *primers* universais pode aumentar a probabilidade de amplificar pseudogenes, restringindo o uso do DNA *barcode* para fins taxonômicos [46]. Diante disso, cada sequência obtida foi alinhada com outras sequências de COI existentes no GenBank e estas realmente correspondem à região de DNA *barcode*. Não foram encontrados *stopcodons* nestas sequências. A composição de AT encontrada em torno de 60% (Tabela 1) é condizente com o já descrito para Cladocera [27, 35, 47].

Ordem Ctenopoda Sars, 1865

Família Sididae, Baird, 1850

Diaphanosoma cf birgei

A árvore de identificação (Figura 1) mostra que o espécime brasileiro encontra-se no mesmo ramo que todos os espécimes de *D. cf heberti* analisados, com um suporte estatístico alto (99% *bootstrap*). Todos os outros espécimes de *D. birgei* (EU702144, EU702143 e EU702142, do Canadá) estão em outro ramo (localidade tipo), portanto separados do isolado brasileiro. Sugerimos que o isolado brasileiro faça parte do conjunto de espécies de *D. cf heberti*, mas para a confirmação seria ideal utilizar outro marcador molecular, além de análises morfológicas aprofundadas de isolados brasileiros e de outras localidades do Canadá, já que o espécime tipo (usado na descrição da espécie) é canadense [50].

Divergências genéticas entre 2,9 e 4,4% foram encontradas entre *Diaphanosoma cf birgei* (este estudo, GenBank KU315486) e a espécie *D. cf heberti* (todos do México) e a máxima divergência foi de 32,6% entre *D. cf birgei* (este estudo) e a espécie *D. brevireme* (KC617615, do México) (Tabela 1 – material suplementar). Considerando apenas caracteres morfológicos Korovchinsky [48, 49] já havia identificado um complexo de espécies em *D. birgei*, no continente Norte Americano. Em 2008, Elías Gutiérrez *et al.*, [11], através da análise da região de DNA *barcode*, identificaram várias linhagens geneticamente diferentes dentro do gênero *Diaphanosoma*. Na árvore de NJ (Figura 1), ele é o único gênero cujas espécies foram separadas na parte mais basal da árvore como dois ramos distintos e com alto

valor de *bootstrap* (99 e 96%), o que pode indicar a presença de mais de um gênero dentro desse agrupamento.

Quando se analisa o valor calculado para a divergência genética dentro de gêneros de Cladocera, incluindo exemplares brasileiros (Tabela 2), o valor máximo encontrado é referente ao gênero *Diaphanosoma* e é igual ao maior valor encontrado dentro das famílias de Cladocera (20,63%). Isso reforça a ideia de que deve existir mais de um gênero nas espécies analisadas de *Diaphanosoma*, já que os valores máximos dentro gêneros e famílias são referentes às espécies desse gênero.

Para o gênero *Diaphanosoma*, oriundos do Japão existem dados de COI publicados, que confirmam a eficácia desta região do DNA mitocondrial na diferenciação de espécies [50]. Assim, este é o primeiro dado molecular para espécie em toda a América do Sul. Desta forma, o estabelecimento desta região pode auxiliar na identificação de espécies que compõem este grupo de espécies e então aperfeiçoamento da classificação taxonômica e consequentemente maior conhecimento sobre a diversidade do gênero e distribuição do gênero no mundo.

Ordem Anomopoda Sars, 1865

- **Família Daphnidae Straus, 1820**

Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia

Entre os espécimes de *C. dubia* (KU315488 deste estudo) e *C. dubia* (México, Canadá e Guatemala), as divergências genéticas variaram entre 11,3 e 11,9% (Tabela 2 - material suplementar). Já entre o espécime brasileiro de *C. silvestrii* e todos os outros espécimes de *C. cf. laticaudata* (do Canadá e México), *C. dubia* (do México, Guatemala e Canadá) e *C. cf. reticulata*, consideradas na análise, foi encontrada variação entre 15,4 a 17,5% de divergência. Entre os espécimes de *C. dubia* (México, Canadá e Guatemala) as divergências variaram de 0 a 2,7% (Tabela 2 - material suplementar). Entre *C. dubia* (KU315488 - deste estudo) e *C. cf. acanthina* (espécimes do México) obtivemos uma divergência de 4,7%.

Na árvore de identificação (Figura 1), o espécime de *C. dubia* (KU315488 deste estudo) está no mesmo ramo que os espécimes de *C. cf. laticaudata* e o espécime brasileiro de *C. silvestrii* não agrupa com os espécimes de *Ceriodaphnia dubia*, estes últimos poderiam ser confundidos em uma análise mais preliminar, devido a grande semelhança morfológica. Com

isso verificamos que a análise da região de COI distinguiu os espécimes da espécie nativa (*Ceriodaphnia silvestrii*) da espécie exótica (*Ceriodaphnia dubia* – KU315488 deste estudo), já que as divergências entre eles foram muito maiores (17,1%, Tabela 2 - material suplementar) que o parâmetro de 3%, considerado para a mesma espécie. A diferenciação molecular para esses espécimes já havia sido realizada por Abreu *et al.*, [51], através de RFLP usando a região ITS dos genes de RNA ribossomal. Portanto, verificamos que uma das aplicações propostas pela análise de COI corroborou a diferenciação de espécies invasoras e espécies nativas de Cladocera, já analisados anteriormente.

A variação de divergências genéticas de 0,6 a 2,2% obtidas entre *C. dubia* (deste estudo) e todos os espécimes de *C. cf laticaudata* (GenBank) indicam que estas podem constituir a mesma espécie, pois os valores encontrados são inferiores a 3% e as divergências entre os espécimes de *C. cf laticaudata* não ultrapassam 2,7%. Para tal confirmação, seria necessário analisar morfologicamente os espécimes de *C. cf laticaudata* do México e Canadá juntamente com *C. dubia* deste estudo.

Ceriodaphnia cf rigaudii

O conhecimento sobre a taxonomia molecular desta espécie ainda é recente, porque este é o terceiro trabalho envolvendo DNA *barcode* para *Ceriodaphnia cornuta rigaudii*. O primeiro foi desenvolvido por Elias Gutierrez *et al.*, [11], com espécimes do México e da Guatemala e o segundo foi feito por Sharma e Kotov [31], com espécimes da Austrália. Todos os exemplares obtidos por estes estudos foram incorporados nesta análise, pois informações de regiões e até mesmo continentes distintos nos fornecem um melhor entendimento da diversidade desses organismos [30]. O complexo *Ceriodaphnia cornuta* parece englobar várias espécies [52, 53] e o uso de ferramentas moleculares pode ajudar a esclarecer tal questionamento [11]. Recentemente, foi confirmado o complexo *cornuta*, em que foi possível identificar três espécies australianas, através de análises moleculares, incluindo DNA *barcode* [31].

As divergências genéticas encontradas entre *Ceriodaphnia cf rigaudii* (deste estudo) e os espécimes de *Ceriodaphnia cornuta rigaudii* (todos da Austrália), variaram de 16,1% a 19,5%. Quando o nosso espécime foi comparado com *Ceriodaphnia cf rigaudii* (exemplares do México e Guatemala) obtivemos uma divergência genética que variou de 17,2 a 18,6%

(Tabela 3 - material suplementar). Também o valor máximo calculado para a divergência genética dentro de espécies de Cladocera (12,74%, Tabela 2) é referente a espécies de *C. cornuta rigaudii* (exceto *C. cf rigaudi*), o que consiste em mais um indício da possibilidade do complexo de espécies para esses organismos. Essas porcentagens são bem acima do limite de divergência para delimitar espécies [30, 31]. Portanto, os dados do espécime brasileiro deste estudo corroboram o complexo *cornuta*, agregando dados de divergência genética de espécimes do continente sul americano e reforçando a hipótese de endemismo continental para essas espécies.

A árvore de identificação (Figura 1) evidencia um ramo com os espécimes de *C. cornuta rigaudii*, todos da Austrália, em que as divergências entre os espécimes KC020647, KC020646 e KC020629 variaram de 1,4 a 2,6% e ainda os espécimes KC020640 e KC020634, que apresentaram uma divergência genética de 1,6%. De acordo com esses valores (menores que 3%) e a árvore de identificação, há duas espécies agrupadas neste ramo. Em outro ramo estão *C. cornuta rigaudii* (KC20635 e KC020631, da Austrália) e *C. cf rigaudii* (EU702057, da Guatemala, EU702049 e EU702045, ambas do México). A árvore de identificação, juntamente com as porcentagens máxima e mínima de divergência genética da região de COI do isolado brasileiro dá indícios que este espécime é molecularmente diferente tanto dos espécimes da Austrália, quanto do México e Guatemala. Portanto, pode se tratar de uma nova espécie sul americana integrante do grupo *cornuta*.

Scapholeberis armata freyi

A espécie *Scapholeberis armata freyi* teve sua ocorrência confirmada no Brasil em 2000, mais precisamente no estado de São Paulo [54]. Essa confirmação se fez necessária, pois sua forma típica é Norte Americana e a subespécie é Canadense [54]. Exemplares do Sul de Minas Gerais foram usados para o estabelecimento do ciclo de vida [55], mas ainda não há dados moleculares de isolados brasileiros publicados, que possam ser usados para o conhecimento da diversidade genética. Todos os outros dados disponíveis de DNA *barcode* de *S. armata freyi* são do México [11, 56.] Considerando a ausência de informações para espécimes do Brasil e sabendo que o registro da espécie no país tem apenas 15 anos, é interessante a caracterização da sequência de COI de um espécime brasileiro.

As divergências genéticas entre *S. armata freyi* (este estudo) com todos os outros espécimes de *Scapholeberis armata freyi* variaram de 15,9% a 16,7%. Quando este exemplar

foi comparado com *Scapholeberis* sp houve uma variação de 17,4% a 18,1% (Tabela 4 - material suplementar). As menores divergências genéticas obtidas em nossas análises com os dados que já estavam depositados no GenBank variaram de 0,3% a 0,6% entre os espécimes de *S.armata freyi* (EU702274, EU702275 e KC617410, do México) e de 0,5 a 1,4% entre os espécimes de *Scapholeberis* sp (KC617148, EU702277, EU702278 e KC617151, do México). Entre esses espécimes de *S.armata freyi* (EU702274, EU702275 e KC617410, do México) e *Scapholeberis* sp (KC617148, EU702277, EU702278 e KC617151, do México), as divergências tiveram uma variação de 11,3 a 12,1%.

Quando comparamos as divergências genéticas entre os espécimes de *Scapholeberis armata freyi* do banco de dados verificamos que são menores que a porcentagem considerada limite para diferenciar espécies (3%). Já o isolado brasileiro de *S. armata freyi* deve constituir uma nova espécie, pois as divergências genéticas são acima do limítrofe para espécies iguais (15,9 % a 18,1%). Dentre todos os exemplares da análise poderiam ser considerados como três entidades taxonômicas distintas. Desta forma, dados morfológicos juntamente com outros dados moleculares são necessários para confirmação desta informação.

Daphnia laevis

Dentre os gêneros de Cladocera, o gênero *Daphnia* como um todo engloba o maior conhecimento, tanto sobre ecologia e biologia molecular como da toxicologia [57], já que são usados internacionalmente como organismos padrão em estudos ecotoxicológicos, por serem sensíveis a substâncias tóxicas [25, 58]. Esses organismos possuem plasticidade fenotípica tanto comportamental, com alterações em padrões migratórios, quanto mudanças morfológicas na presença de predador [58, 59, 60]. Tal plasticidade fenotípica ressalta a importância de marcadores moleculares capazes de identificar espécies, ou seja, marcadores usados na taxonomia molecular, como o DNA *barcode*.

O uso de ferramentas moleculares na identificação da diversidade também se aplica ao gênero *Daphnia*, pois o número de espécies inclusas nos grupos *pulex*, *pulicaria* e *tenebrosa* aumentaram após análises de DNA, havendo assim um número maior de espécies do que previamente determinado pela morfologia [57]. Também o DNA *barcode* já foi utilizado como marcador molecular na detecção da espécie invasora *Daphnia lumholtzi* na Argentina [61].

As divergências genéticas encontradas entre o espécime de Minas Gerais (KU315491) e os espécimes de *Daphnia laevis* do México foram de 24,4% (Tabela 5 - material suplementar). Entre os isolados do México as divergências foram de 0 a 0,6%, muito inferiores quando comparadas com as divergências encontradas entre o isolado brasileiro e os mexicanos. Já quando comparamos o espécime brasileiro de *D. laevis* com os isolados da Argentina (AY323073 e AY323072) encontramos as divergências genéticas de 1,9% e 2,3%, respectivamente. Essas porcentagens menores que 3%, classificam os isolados sul americanos como integrantes da mesma entidade taxonômica, que por sua vez são molecularmente diferentes dos isolados mexicanos. Uma possível explicação para tal classificação seria que tanto o isolado brasileiro quanto o isolado argentino pertencem à mesma região biogeográfica (neotropical), em que os países são geograficamente próximos se comparamos com a distância Brasil- México e Argentina-México. Isso ainda reforça o conceito de endemismo continental, classificando esses isolados sul americanos como a mesma espécie e diferentes dos isolados norte americanos.

De todos os dados existentes no GenBank até o momento não há informações moleculares para espécimes brasileiros de *Daphnia*, mesmo sendo o gênero de Cladocera mais conhecido. A grande divergência genética indica que a *Daphnia laevis* deste estudo deve ser diferente dos espécimes mexicanos, podendo consistir uma nova espécie. Através de análise de dois genes mitocondriais foi verificada a existência de um complexo de espécies norte americano, denominado complexo *Daphnia laevis* [62]. Portanto, o dado de COI obtido dessa espécie reforça esse artigo que aponta o complexo e permite sua aplicação em estudos biogeográficos, endemismo continental, como foi feito por Taylor *et al.*, [62] e lança a proposta de necessidade de uma revisão taxonômica também para as espécies possivelmente pertencentes a esse complexo.

***Simocephalus* sp**

Semelhante ao gênero *Daphnia*, o gênero *Simocephalus* também é usado como indicador ambiental e em estudos toxicológicos [36]. Muitos pesquisadores chineses têm identificado espécies de *Simocephalus*, mas as informações moleculares iniciais para o gênero foram obtidas por Elías Gutierrez *et al.*, [11], que verificaram a provável existência de espécies crípticas. Posteriormente, por meio da análise de COI do gênero na China também foi revelada a existência de espécies crípticas [36]. As análises moleculares com COI nem

sempre aumentam o número de espécies, no caso de *Simocephalus* em Taiwan o número de espécies foi reduzido a três [63].

A menor divergência genética encontrada entre o isolado brasileiro foi com os espécimes de *S. cf mixtus* do México (EU702281 e KC617156) foi de 10,8% e a maior divergência do isolado brasileiro com os espécimes de *S. cf punctatus* (HQ966472), do Canadá foi de 19% (Tabela 6 - material suplementar). Todas as divergências genéticas encontradas entre o nosso isolado com os espécimes do GenBank, utilizados na análise, são da mesma ordem do que foi encontrado por Elías-Gutiérrez *et al.*, [11], que considerou como alta para *Simocephalus*. Portanto, o espécime brasileiro deve ser diferente das espécies de *Simocephalus* já descritas para o México e Canadá.

Família Bosminidae Baird, 1854

Bosmina freyi

Este estudo é um dos primeiros que englobam análise molecular para o gênero *Bosmina*, que ainda é considerado com muitas incertezas taxonômicas [11, 64]. O DNA *barcode* de espécies do gênero *Bosmina* foi analisado por Elías Gutiérrez *et al.*, [11], porém não inclui a espécie *B. freyi*. Análises de genes nucleares ou até mesmo mitocondriais, com implicações na filogenia molecular sem englobar COI foram publicadas por Taylor *et al.*, [62]. Mas, nenhum destes trabalhos analisou a região de DNA *barcode* para *B. freyi*, portanto, a nossa sequência é a primeira sequência do mundo para a espécie.

Em nossas análises comparamos as sequências de COI do isolado brasileiro com sequências de *Bosmina* de outras espécies, já que não existem sequências de COI de *B. freyi*. Seria ideal um dado de COI correspondente à localidade tipo (Canadá) [64], para que as comparações fossem feitas com espécimes da mesma espécie de regiões geográficas diferentes. Desta forma, saberíamos o quanto são distintas molecularmente os espécimes de cada localidade e fazer inferências mais precisas da diversidade genética de *B. freyi*.

As menores divergências entre o espécime brasileiro e os espécimes do GenBank de *B. cf. liederi* (KC616781, KC616782 e KC616785, todos do México), variaram de 7 a 7,69% (Tabela 7 – material suplementar). Já as maiores divergências obtidas entre *B. freyi* (deste estudo) foram com espécimes de *B. liederi* (HQ966469 e HQ966470, todos do Canadá) e corresponde a 23,63%. A árvore de identificação (Figura 1) evidencia o espécime deste estudo

está agrupado com os espécimes *Bosmina cf liederi* (KC616781, KC616782 e KC616785, todos do México), com um alto suporte estatístico (99% de *bootstrap*). No entanto, os espécimes de *Bosmina liederi* (HQ966470, HQ966469, todos do Canadá) estão agrupados em um ramo diferente dos espécimes de *B.cf liederi* (KC616781, KC616782 e KC616785). Diante disso, os espécimes de *B. cf liederi* do México são molecularmente diferentes da espécie *B. liederi*, isolados no Canadá, fato que poderá ser melhor analisado quando outras sequências de DNA *barcode* estiverem disponíveis e dados morfológicos puderem ser revistos desses espécimes..

Bosminopsis deitersi

A sequência de DNA *barcode* de *Bosminopsis deitersi* deste estudo é a primeira para o gênero e o segundo dado molecular, sendo que o primeiro corresponde a uma região do RNA ribossomal Taylor *et al.*, [65] . Sendo assim, não estabelecemos as divergências genéticas pela inexistência de sequências de COI do gênero *Bosminopsis* no banco de dados.

Família Chydoridae

Chydorus pubescens

Embora o gênero *Daphnia* (família Daphnidae) seja o mais estudado e o que possui maior conhecimento científico, a família com maior riqueza de espécies é a Chydoridae [33], com aproximadamente 65 espécies válidas no Brasil [69], sendo também uma das mais representativas em Minas Gerais [18]. No entanto, em relação às informações moleculares estas são inferiores às do gênero *Daphnia*. No GenBank, em Fevereiro de 2016, havia apenas 482 sequências de DNA para esta família e dessas 411 correspondiam à região de DNA *barcode*. Este marcador molecular tem se mostrado eficiente na detecção da diversidade críptica e identificação para espécies da família Chydoridae, como o estudo para *Chydorus sphaericus* [35] e *Leberis* [29], já que esta família possui grande complexidade taxonômica e filogenética [29].

No Brasil, a grande maioria dos estudos com Chydoridae geralmente são levantamentos morfológicos, caracterização do ciclo de vida, entre outros [19, 20, 37, 66, 67, 68]. Os únicos dois trabalhos envolvendo análises com DNA *barcode* são com espécimes de Chydoridae do sul de Minas Gerais, em que foram estudados somente espécimes da subfamília Aloninae (*Alona iheringula*, *Oxyurella longicaudis* e *Ovalona kaingang* – em

preparação), não havendo nenhum representante da subfamília Chydorinae. Logo, a sequência de COI obtida para *Chydorus pubescens* é a primeira do Brasil para esta subfamília.

A menor divergência genética (Tabela 8 - material suplementar) do nosso isolado foi de 12,2% com o espécime de *Chydorus* sp, do México (KC617531) e a maior foi de 25,8% com o espécime de *Chydorus* sp, do México (KC617532). Entre os espécimes de *Chydorus* sp (KC617531, KC617532, KC617533, KC617534 e KC617535, todos do México) a divergência genética variou de 0,9 a 29,4%. Essa divergência mínima (0,9%) entre *Chydorus* sp (KC617532, do México) e *Chydorus* sp (KC617535, do México) colocam estes dois espécimes como integrantes da mesma entidade taxonômica, levando em consideração a divergência máxima de 3% para espécies iguais. Por outro lado, os outros espécimes de *Chydorus* sp (KC617531, KC617533 e KC617534) são considerados espécimes diferentes, pois a divergência genética entre eles é superior a 3%. Essa grande amplitude de valores para as divergências entre organismos do mesmo gênero, incluindo o nosso espécime brasileiro, mostra a possibilidade de várias espécies entre isolados e a possível existência de complexo de espécies, como já discutido por Belyaeva e Taylor [35].

Considerações finais

Considerando as sequências de DNA *barcode* existentes no GenBank agregadas às novas sequências caracterizadas neste inventário com espécies de Cladocera brasileiras o valor de divergência genética média calculada dentro de espécies foi de 2,7%. Já dentro de gênero há um valor médio de 13,74% e dentro das quatro famílias analisadas o valor médio foi de 18,22% (Tabela 2). Esses dados estão condizentes com as divergências genéticas obtidas por Costa *et al.*, [39], para Crustacea, por Elías- Gutierrez *et al.*, [11], para Cladocera do México e Guatemala e Jeffery *et al.*, [30], para Branchiopoda do Canadá. Foram detectados problemas taxonômicos tanto nestes trabalhos, como no nosso, já que incluem unidades taxonômicas ainda não bem resolvidas. Após essas resoluções, muito provavelmente esses limites encontrados dentro dos agrupamentos de Cladocera serão alterados. Essas são as primeiras informações moleculares para esses isolados brasileiros e os dados aqui obtidos podem ser aplicados não somente em revisões taxonômicas, mas em padrões biogeográficos, diversidade filogenética, teias alimentares. Essa aplicabilidade dos dados de COI só é possível com o aumento do número de sequências disponíveis nos bancos de dados, já que para muitos grupos tais informações são inexistentes [69]. É válido destacar que não propusemos análises filogenéticas, visto que para isso seria indicado incorporar outros marcadores moleculares.

Os valores elevados de divergências genéticas que encontramos entre os espécimes brasileiros de *Diaphanosoma* cf *birgei*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Ceriodaphnia* cf *rigaudi*, *Scapholeberis armata freyi*, *Simocephalus* sp, *Bosmina freyi* e *Chydorus pubescens* e os isolados dos outros países fornecem indícios que os microcrustáceos são molecularmente diferentes, morfologicamente classificados como a mesma espécie. No entanto, o exemplar brasileiro de *Daphnia laevis* é molecularmente igual aos isolados argentinos. Esses dados reforçam o conceito de endemismo continental e subsidiam novos estudos nesta área.

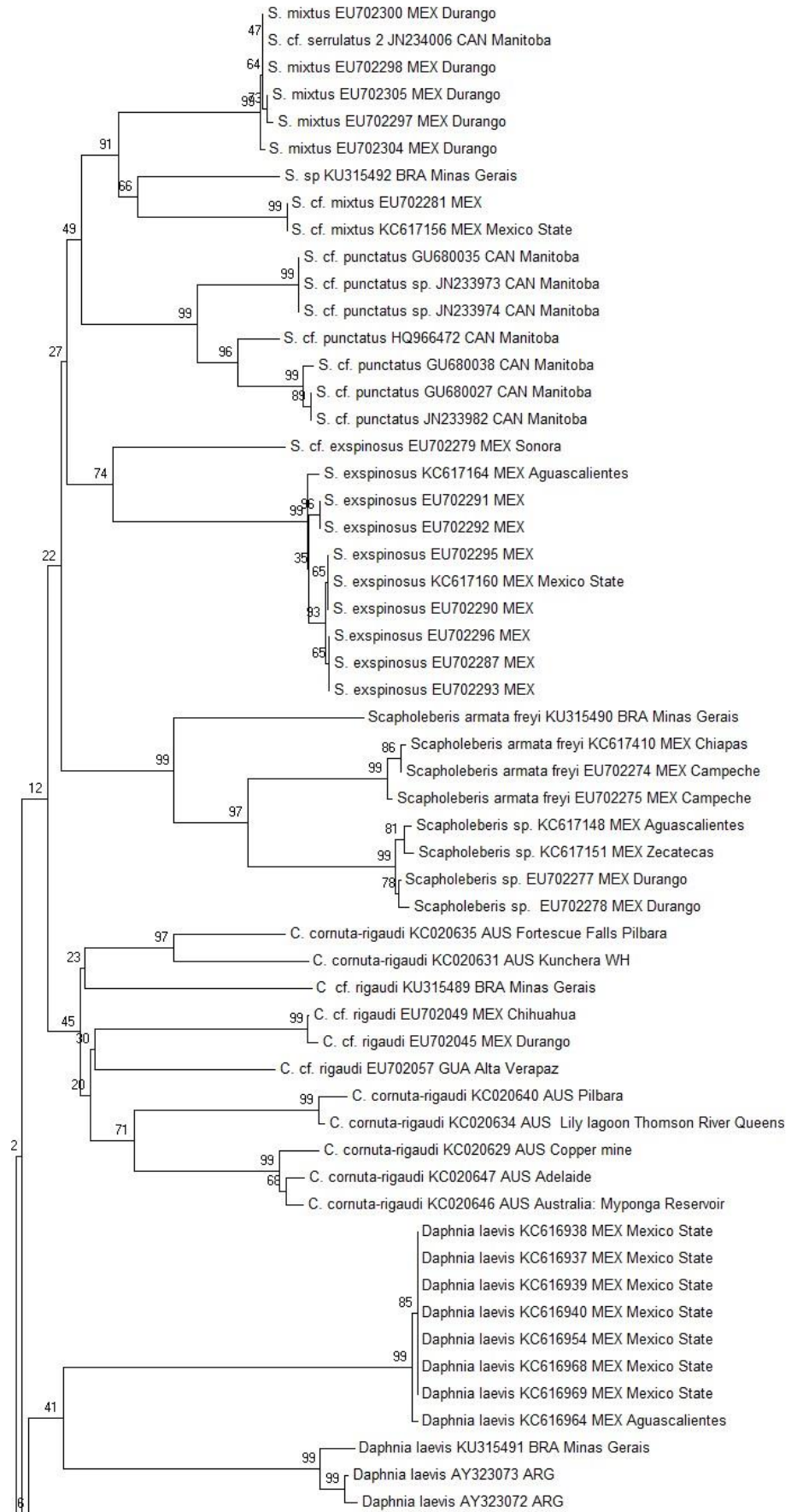
Assim, os dados apresentados constituem o primeiro inventário de espécies de Cladocera brasileiros que consideram a biologia molecular. No entanto, este trabalho é somente o início das investigações moleculares para Cladocera no Brasil e seria interessante ampliar o conhecimento incluindo espécimes coletados em vários pontos do reservatório da UHE Furnas e em outros corpos d'água do estado e do país. Dada a imensidão geográfica do Brasil, apenas um grande e ambicioso projeto de levantamento da diversidade genética de Cladocera consiga caracterizar e determinar a região de DNA *barcode* para estes microcrustáceos brasileiros. Dessa forma, a maioria dos questionamentos de diversidade e taxonomia dos Cladocera poderia começar a ser sanada. Futuramente, quando outros dados forem obtidos, alguns pontos obscuros na taxonomia e distribuição destes organismos poderiam ser resolvidos, como os padrões de colonização, envolvendo o conceito de endemismo continental, além de lançar luz sobre questões taxonômicas e finalmente conhecer a real diversidade brasileira e seu contexto mundial, incluindo a diversidade filogenética e sua importância na análise da conservação dos habitats onde esses organismos têm importante papel.

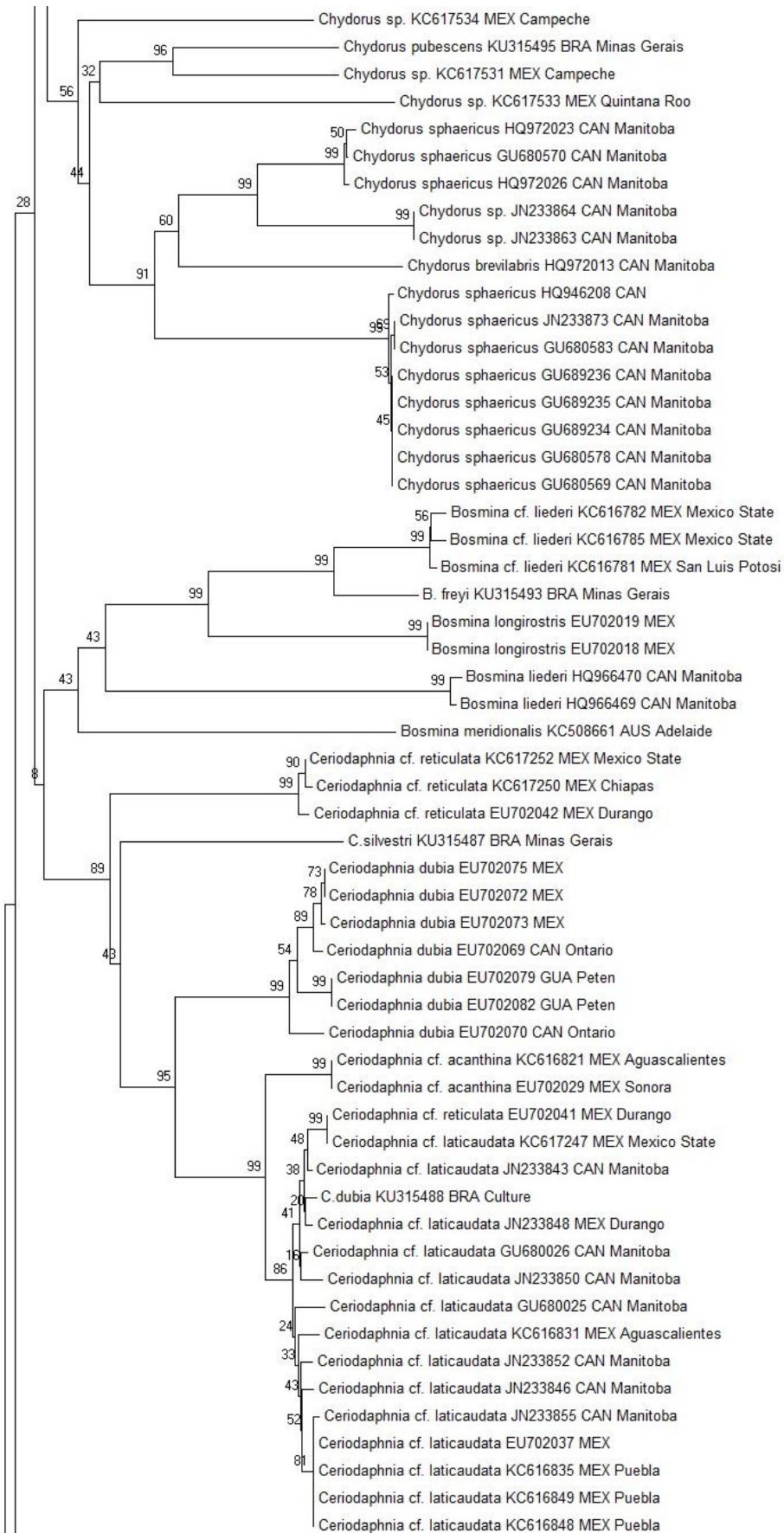
Tabela 1: Espécimes usados neste estudo, com seus respectivos números de acesso do GenBank, tipo de *primer* para amplificação da região de DNA *barcode*, tamanho do fragmento amplificado via PCR, composição de AT (%) e coordenadas geográficas dos pontos de coleta.

Número GenBank	Espécimes	Fragmento (bp)	%AT	<i>primer</i>	Coordenadas Geográficas
KU315486	<i>D. cf birgei</i>	523	61.7	Folmer <i>et al.</i> , 1994	21°S23'52" 45°W 59'06"
KU315487	<i>C. silvestrii</i>	659	62.4	Folmer <i>et al.</i> , 1994	21°S23'52" 45°W 59'06"
KU315488	<i>C. dubia</i>	659	62.8	Folmer <i>et al.</i> , 1994	Cultivo UFSCar
KU315489	<i>C. cf rigaudi</i>	512	63.8	Prosser <i>et al.</i> , 2013	21°S23'52" 45°W 59'06"
KU315490	<i>S. armata freyi</i>	658	59.0	Prosser <i>et al.</i> , 2013	22°S 29' 12" 45°W 36'68"
KU315491	<i>D. laevis</i>	659	60.8	Prosser <i>et al.</i> , 2013	21°S23'52" 45°W 59'06"
KU315492	<i>S. sp</i>	658	62.8	Prosser <i>et al.</i> , 2013	21°S23'52" 45°W 59'06"
KU315493	<i>B. freyi</i>	655	62.6	Prosser <i>et al.</i> , 2013	21°S23'52" 45°W 59'06"
KU315494	<i>B. deitersi</i>	493	63.1	Prosser <i>et al.</i> , 2013	21°S23'52" 45°W 59'06"
KU315495	<i>C. pubescens</i>	659	62.3	Prosser <i>et al.</i> , 2013	21°S23'52" 45°W 59'06"

Tabela 2: Divergências genéticas (K2P) entre sequências de COI, incluindo espécies do presente estudo e do GenBank. *Valor médio dentro de *Ceriodaphnia cornuta rigaudi* (exceto *C. cf rigaudi*). **Valor médio para o gênero *Diaphanosoma*. ***Valor médio para família Sididae, que neste estudo é representada apenas pelo *Diaphanosoma*.

Comparações dentro	Minimo (%)	Distância média	Maximo (%)
Espécies	0	2,71	12,74*
Gêneros	4,94	13,74	20,63**
Famílias	14,8	18,22	20,63***





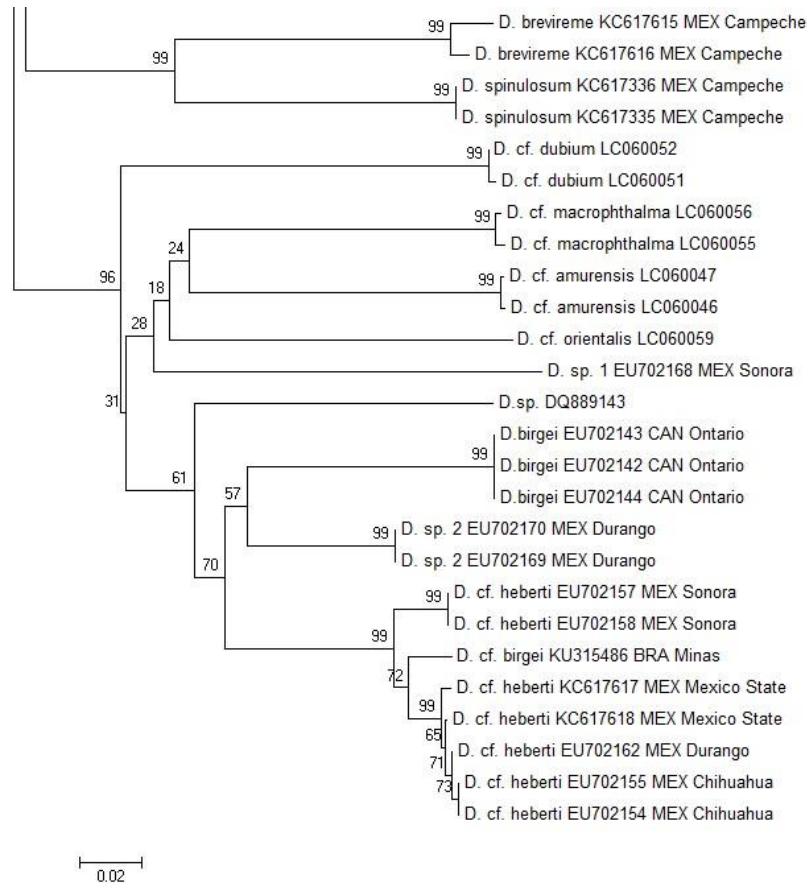


Figura 1: Árvore de identificação com as sequências de COI dos espécimes deste estudo juntamente com as sequências de COI já depositadas no GenBank. Usando um fragmento de 491pb inferido por NJ. Os números em cada nó correspondem às porcentagens do suporte de bootstrapping (1000 réplicas). A barra indica o número de substituições por sítio. O número de acesso do GenBank e a localidades estão após o nome de cada espécie.

Referências

1. Frezal L, Leblois R (2008) Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection Genetics and Evolution* 8: 727-736.
2. Cristescu ME (2014) From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in ecology & evolution* 29: 566-571.
3. Cardinale BJ, Duffy JE, Gonzalez A, Hooper DU, Perrings C, et al. (2012) Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* 486: 59-67.
4. Claridge M, Dawah H, Wilson M (1997) *The Units of Biodiversity*. London: Chapman and Hall.
5. Lefebure T, Douady CJ, Gouy M, Gibert J (2006) Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 435-447.
6. Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 110-117.
7. Joly S, Davies TJ, Archambault A, Bruneau A, Derry A, et al. (2014) Ecology in the age of DNA barcoding: the resource, the promise and the challenges ahead. *Molecular Ecology Resources* 14: 221-232.
8. Schwartz MK, Luikart G, Waples RS (2007) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in ecology & evolution* 22: 25-33.
9. Adamowicz SJ, Scoles GJ (2015) International Barcode of Life: Evolution of a global research community. *Genome* 58: 151-162.
10. Pečnikar ŽF, Buzan EV (2014) 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application. *Journal of applied genetics* 55: 43-52.
11. Elias-Gutierrez M, Jeronimo FM, Ivanova NV, Valdez-Moreno M, Hebert PDN (2008) DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa*: 1-42.
12. Sinev AY (2001) Redescription of *Alona iheringi* Sars, 1901 (Chydoridae, Anomopoda, Branchiopoda), a South American species related to *A. rustica* Scott, 1895. *Hydrobiologia* 464: 113-119.
13. Sinev AY, Van Damme K, Kotov AA (2005) Redescription of tropical-temperate cladocerans *Alona diaphana* King, 1853 and *Alona davidi* Richard, 1895 and their translocation to *Leberis* Smirnov, 1989 (Branchiopoda : Anomopoda : Chydoridae). *Arthropoda Selecta* 14: 183-205.

14. Van Damme K, Dumont HJ (2008) The 'true' genus *Alona* Baird, 1843 (Crustacea: Cladocera: Anomopoda): position of the *A. quadrangularis*-group and description of a new species from the Democratic Republic of Congo. *Zootaxa*: 1-25
15. Van Damme K, Sinev AY, Dumont HJ (2011) Separation of *Anthalona* gen. n. from *Alona* Baird, 1843 (Branchiopoda: Cladocera: Anomopoda): morphology and evolution of scraping stenothermic alonines. *Zootaxa* 2875: 1-64.
16. Sinev AY, Gu Y, Han B-P (2015) Cladocera of Hainan Island, China. *Zootaxa* 4006: 569-585.
17. Kotov AA, Korovchinsky NM, Sinev AY, Smirnov NN (2011) Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) from the Zeya River Basin (Amur Region, Russian Federation). 3. Systematic-Faunistical and Zoogeographical Analyses. *Zoologicheskyy Zhurnal* 90: 402-411.
18. Santos-Wisniewski MJ, Matsumura-Tundisi T, Negreiros NF, da Silva LC, dos Santos RM, et al. (2011) Present knowledge on Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) diversity of freshwaters in Minas Gerais State. *Biota Neotropica* 11: 287-301.
19. Santos-Wisniewski MJ, Rocha O, Guntzel AM, Matsumura-Tundisi T (2002) Diversity of Cladocera Chydoridae in lakes and reservoirs from the high portion of Tiete River, SP, Brazil. *International Association of Theoretical and Applied Limnology, Vol 28, Pt 2, Proceedings* 28: 881-886.
20. Santos-Wisniewski MJ, Rocha O, Guntzel AM, Matsumura-Tundisi T (2002) Cladocera Chydoridae of high altitude water bodies (Serra da Mantiqueira), in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 62: 681-687.
21. Kotov AA, Van Damme K, Bekker EI, Siboulipha S, Silva-Briano M, et al. (2013) Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) of Vientiane province and municipality, Laos. *Journal of Limnology* 72: 81-108.
22. Santos-Wisniewski M, Rocha O (2007) Spatial distribution and secondary production of Copepoda in a tropical reservoir: Barra Bonita, SP, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 67: 223-233.
23. Sendacz S, Kubo E (2007) Zooplâncton de reservatórios do alto Tietê, Estado de São Paulo. In: Henry R. (Ed) *Ecologia de Reservatórios: Estrutura, Função e Aspectos Sociais*. Botucatu: FAPESP/FUNDBIO 511-529.
24. Sousa FD, Elmoor-Loureiro LM, Quadra A, Senna AR (2014) First record of Cladocera (Crustacea: Chydoridae) from Parque Nacional do Itatiaia, Southeastern Brazil. *Check List* 10: 665-668.
25. Parrella A, Kundi M, Lavorgna M, Criscuolo E, Russo C, et al. (2014) Toxicity of exposure to binary mixtures of four anti-neoplastic drugs in *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Aquatic Toxicology* 157: 41-46.

26. Soares CEA, Elmoor-Loureiro LMA (2011) Uma atualização da lista de Cladocera Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) do Estado de Pernambuco, Brasil. *Biota Neotropica* 11: 1-6.
27. Silva ED, de Abreu CB, Orlando TC, Wisniewski C, dos Santos-Wisniewski MJ (2014) *Alona iheringula* Sinev & Kotov, 2004 (Crustacea, Anomopoda, Chydoridae, Aloninae): Life Cycle and DNA Barcode with Implications for the Taxonomy of the Aloninae Subfamily. *Plos One* 9.
28. Castilho MCD, Wisniewski MJD, de Abreu CB, Orlando TC (2015) Life history and DNA barcode of *Oxyurella longicaudis* (Birgei, 1910) (Cladocera, Anomopoda, Chydoridae). *Zoological Studies* 54.
29. Elias-Gutierrez M, Valdez-Moreno M (2008) A now cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding. *Hidrobiologica* 18: 63-74.
30. Jeffery NW, Elias-Gutierrez M, Adamowicz SJ (2011) Species Diversity and Phylogeographical Affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba, Canada. *Plos One* 6.
31. Sharma P, Kotov AA (2013) Molecular approach to identify sibling species of the *Ceriodaphnia cornuta* complex (Cladocera: Daphniidae) from Australia with notes on the continental endemism of this group. *Zootaxa* 3702: 79-89.
32. Frey DG (1987) The taxonomy and biogeography of the Cladocera. *Cladocera*: Springer. pp. 5-17.
33. Forro L, Korovchinsky NM, Kotov AA, Petrussek A (2008) Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 177-184.
34. Xu S, Hebert P, Kotov A, Cristescu M (2009) The noncosmopolitanism paradigm of freshwater zooplankton: insights from the global phylogeography of the predatory cladoceran *Polyphemus pediculus* (Linnaeus, 1761) (Crustacea, Onychopoda). *Molecular Ecology* 18: 5161-5179.
35. Belyaeva M, Taylor DJ (2009) Cryptic species within the *Chydorus sphaericus* species complex (Crustacea: Cladocera) revealed by molecular markers and sexual stage morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 534-546.
36. Huang X, Shi X, Kotov AA, Gu F (2014) Confirmation through Genetic Analysis of the Existence of Many Local Phyloclades of the Genus *Simocephalus* (Crustacea, Cladocera) in China. *Plos One* 9.
37. Silva JM, Creer S, dos Santos A, Costa AC, Cunha MR, et al. (2011) Systematic and Evolutionary Insights Derived from mtDNA COI Barcode Diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). *Plos One* 6.

38. Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270: S96-S99.
39. Costa FO, deWaard JR, Boutillier J, Ratnasingham S, Dooh RT, et al. (2007) Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64: 272-295.
40. Prosser S, Martinez-Arce A, Elias-Gutierrez M (2013) A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular Ecology Resources* 13: 1151-1155.
41. Folmer O, M . Black, W . Hoeh, R . Lutz, R . Vrijenhoek (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294–299.
42. Ivanova NV, Dewaard JR, Hebert PD (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6:998-1002.
43. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30: 2725-2729.
44. Ratnasingham S, Hebert PD (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes* 7: 355-364.
45. Collins R, Cruickshank R (2013) The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular ecology resources* 13: 969-975.
46. Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA (2008) Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 13486-13491.
47. Sacherova V, Hebert PDN (2003) The evolutionary history of the Chydoridae (Crustacea : Cladocera). *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 629-643.
48. Korovchinsky NM (2002) Description of two new species of *Diaphanosoma* Fischer, 1850 (Crustacea, Branchiopoda, Sididae) from the United States and Canada and species richness of the genus in North America. *Hydrobiologia* 489: 45-54.
49. Korovchinsky NM (2005) Two new species of *Diaphanosoma* FISCHER, 1850 (Crustacea : Branchiopoda : Cladocera) from the United States. *International Review of Hydrobiology* 90: 201-208.
50. Lakatos C, Urabe J, Makino W (2015) Cryptic diversity of Japanese *Diaphanosoma* (Crustacea: Cladocera) revealed by morphological and molecular assessments. *Inland Waters* 5: 253-262.

51. Abreu MJ, Santos-Wisniewski MJ, Rocha O, Orlando TC (2010) The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea Cladocera). *Brazilian Journal of Biology* 70: 121-124.
52. Berner D (1985) Morphological differentiation among species in the *Ceriodaphnia cornuta* complex (Crustacea, Cladocera). *Verh Int Verein Limnol* 22: 3099-3103.
53. Berner DB (1987) Significance of head and carapace pores in *Ceriodaphnia* (Crustacea, Cladocera). *Cladocera: Springer*. pp. 75-84. *Elmoor Loureiro* 1998
54. Elmoor-Loureiro LMA (2000) Occurrence of *Scapholeberis armata freyi* Dumont and Pensaert (Crustacea, Anomopoda, Daphniidae) in Sao Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 17: 301-302.
55. Castilho MCD, Wisniewski C, dos Santos-Wisniewski MJ (2012) Life cycle of *Scapholeberis armata freyi* Dumont & Pensaert, 1983 (Cladocera, Daphniidae). *Biota Neotropica* 12: 56-60.
56. Quiroz-Vazquez P, Elias-Gutierrez M (2009) A New Species of the Freshwater Cladoceran Genus *Scapholeberis* Schoedler, 1858 (Cladocera: Anomopoda) from the Semidesert Northern Mexico, Highlighted by DNA Barcoding. *Zootaxa*: 50-64.
57. Crease TJ, Omilian AR, Costanzo KS, Taylor DJ (2012) Transcontinental Phylogeography of the *Daphnia pulex* Species Complex. *Plos One* 7.
58. Colbourne JK, Pfrender ME, Gilbert D, Thomas WK, Tucker A, et al. (2011) The Ecoresponsive Genome of *Daphnia pulex*. *Science* 331: 555-561.
59. Oda S, Hanazato T, Fujii K (2007) Change in phenotypic plasticity of a morphological defence in *Daphnia galeata* (Crustacea : Cladocera) in a selection experiment. *Journal of Limnology* 66: 142-152.
60. Otte KA, Froehlich T, Arnold GJ, Laforsch C (2014) Proteomic analysis of *Daphnia magna* hints at molecular pathways involved in defensive plastic responses. *Bmc Genomics* 15.
61. Kotov AA, Taylor DJ (2014) *Daphnia lumholtzi* Sars, 1885 (Cladocera: Daphniidae) invades Argentina. *Journal of Limnology* 73: 369-374.
62. Taylor DJ, Finston TL, Hebert PDN (1998) Biogeography of a widespread freshwater crustacean: Pseudocongruence and cryptic endemism in the North American *Daphnia laevis* complex. *Evolution* 52: 1648-1670.
63. Young S-S, Ni M-H, Liu M-Y (2012) Systematic Study of the *Simocephalus* Sensu Stricto Species Group (Cladocera: Daphniidae) from Taiwan by Morphometric and Molecular Analyses. *Zoological Studies* 51: 222-231.

64. Melo RD, Hebert PD (1994) A taxonomic reevaluation of North American Bosminidae. *Canadian Journal of Zoology* 72: 1808-1825.
65. Taylor DJ, Ishikane CR, Haney RA (2002) The systematics of Holarctic bosminids and a revision that reconciles molecular and morphological evolution. *Limnology and Oceanography* 47: 1486-1495.
66. Sousa FDR, Santos S, Güntzel AM, Diniz LP, Júnior MDM, et al. (2015) Description of a new species of the *costata*-group (Cladocera, Chydoridae, Aloninae) from Brazil. *Zootaxa* 4040: 445-457.
67. Van Damme K, Dumont HJ (2010) Cladocera of the Lencois Maranhenses (NE - Brazil): faunal composition and a reappraisal of Sars' Method. *Brazilian Journal of Biology* 70: 755-779.
68. Viti T, Wisniewski C, Orlando TC, dos Santos-Wisniewski MJ (2013) Life history, biomass and production of *Coronatella rectangula* (Branchiopoda, Anomopoda, Chydoridae) from Minas Gerais. *Iheringia Serie Zoologia* 103: 110-117.
69. Kvist S (2013) Barcoding in the dark?: a critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 39-45.

Material Suplementar

Tabela 1: Divergência genética K2P entre sequências de COI de *Diaphanosoma cf birgei* (KU315486) e outras espécies *Diaphanosoma*. Número de acesso do GenBank está após o nome de cada espécie.

1. <i>D.cf birgei</i> KU315486	1	2	3	4	5	6	7	8	9	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
2. <i>D.birgei</i> EU702144	15.8	15.8																								
3. <i>D.birgei</i> EU702143	15.8	15.8	0.0																							
4. <i>D.birgei</i> EU702142	15.8	15.8	0.0	0.0																						
5. <i>D. cf heberti</i> KC617618	2.9	2.9	16.3	16.3	16.3																					
6. <i>D. cf heberti</i> KC617617	3.6	3.6	16.1	16.1	16.1	0.6																				
7. <i>D. cf heberti</i> EU702162	3.2	3.2	16.6	16.6	16.6	0.2	0.8																			
8. <i>D. cf heberti</i> EU702157	4.4	4.4	15.6	15.6	15.6	3.4	3.8	3.6																		
9. <i>D. cf heberti</i> EU702158	4.4	4.4	15.6	15.6	15.6	3.4	3.8	3.6	0.0																	
10. <i>D. cf heberti</i> EU702155	3.4	3.4	16.8	16.8	16.8	0.4	1.0	0.2	3.8	3.8																
11. <i>D. cf heberti</i> EU702154	3.4	3.4	16.8	16.8	16.8	0.4	1.0	0.2	3.8	3.8	0.0															
12. <i>D.sp</i> DQ889143	18.8	18.8	20.7	20.7	20.7	18.5	18.7	18.8	18.2	18.2	18.5	18.5														
13. <i>D. cf orientalis</i> LC060059	26.9	26.9	28.4	28.4	28.4	25.8	25.7	26.0	24.7	24.7	26.0	26.0	26.1													
14. <i>D. cf macrophthalma</i> LC060056	20.5	20.5	24.9	24.9	24.9	21.9	22.1	22.2	22.7	22.7	22.4	22.4	23.9	23.5												
15. <i>D. cf macrophthalma</i> LC060055	20.5	20.5	24.9	24.9	24.9	21.9	22.1	22.2	22.7	22.7	22.4	22.4	23.9	23.5	0.4											
16. <i>D. cf Dubium</i> LC060052	22.3	22.3	24.5	24.5	24.5	21.2	21.7	21.5	20.4	20.4	21.8	21.8	23.7	27.9	25.9	25.9										
17. <i>D. cf Dubium</i> LC060051	22.0	22.0	24.3	24.3	24.3	21.5	22.0	21.8	20.7	20.7	22.0	22.0	23.4	28.2	25.6	25.6	0.2									
18. <i>D. cf amurensis</i> LC060047	20.6	20.6	22.8	22.8	22.8	19.1	19.3	19.4	18.8	18.8	19.6	19.6	20.2	21.2	21.0	21.0	24.2	24.5								
19. <i>D. cf amurensis</i> LC060046	20.7	20.7	22.8	22.8	22.8	19.1	19.4	19.4	18.8	18.8	19.7	19.7	20.3	21.3	21.3	21.3	24.2	24.4	0.2							
20. <i>D. brevireme</i> KC617615	32.6	32.6	30.7	30.7	30.7	32.6	32.6	32.2	32.2	32.2	31.9	31.9	32.1	30.1	29.4	29.4	30.4	30.7	29.1	29.4						
21. <i>D. brevireme</i> KC617616	31.6	31.6	30.1	30.1	30.1	31.6	31.7	31.3	30.7	30.7	31.0	31.0	29.6	30.1	29.1	28.5	28.9	29.2	29.4	29.7	1.8					
22. <i>D. spinulosum</i> KC617336	31.5	31.5	27.9	27.9	27.9	31.5	31.8	31.2	30.3	30.3	31.5	31.5	30.1	30.3	30.1	30.1	30.2	30.5	30.6	30.9	18.5	17.8				
23. <i>D. spinulosum</i> KC617335	31.5	31.5	27.9	27.9	27.9	31.5	31.8	31.2	30.3	30.3	31.5	31.5	30.1	30.3	30.1	30.1	30.2	30.5	30.6	30.9	18.5	17.8	0.0			
24. <i>D. sp 2</i> EU702170	16.0	16.0	13.8	13.8	13.8	14.5	14.5	14.7	14.5	14.5	15.0	15.0	17.7	25.0	23.6	23.6	22.2	22.5	19.5	19.5	28.9	28.4	27.3	27.3		
25. <i>D. sp 2</i> EU702169	16.0	16.0	13.8	13.8	13.8	14.5	14.5	14.7	14.5	14.5	15.0	15.0	17.7	25.0	23.6	23.6	22.2	22.5	19.5	19.5	28.9	28.4	27.3	27.3	0.0	
26. <i>D. sp 1</i> EU702168	23.9	23.9	26.8	26.8	26.8	24.5	24.7	24.7	23.1	23.1	24.5	24.5	25.0	24.1	22.8	22.8	25.0	24.7	25.4	25.4	28.2	28.5	28.9	28.9	23.8	23.8

Tabela 2: Divergência genética K2P entre sequências de COI de *Ceriodaphnia dubia* (KU315488) e *Ceriodaphnia silvestrii* (KU315487) do Brasil e outras espécies de *Ceriodaphnia*. Número de acesso do GenBank está após o nome de cada espécie.

1. <i>C.dubia</i> KU315488	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
2. <i>C.silvestrii</i> K315487	17.1																												
3. <i>C. cf laticaudata</i> JN233848	0.6	17.3																											
4. <i>C. cf laticaudata</i> JN233843	0.6	17.5	0.3																										
5. <i>C. cf laticaudata</i> GU680026	0.8	17.3	0.5	0.5																									
6. <i>C. cf laticaudata</i> JN233850	1.1	17.3	1.1	1.1	0.9																								
7. <i>C. cf reticulata</i> EU702041	1.4	17.3	1.1	0.8	1.2	1.9																							
8. <i>C. cf laticaudata</i> JN233852	1.6	16.9	1.6	1.6	1.4	1.7	2.0																						
9. <i>C. cf laticaudata</i> KC616831	1.7	17.1	1.4	1.4	1.2	1.9	2.2	1.1																					
10. <i>C. cf laticaudata</i> KC617247	1.7	17.3	1.4	1.1	1.6	2.2	0.3	2.4	2.5																				
11. <i>C. cf laticaudata</i> GU680025	1.9	17.3	1.6	1.6	1.4	2.0	2.0	1.6	1.7	2.4																			
12. <i>C. cf laticaudata</i> EU702037	1.9	17.1	1.6	1.6	1.4	2.0	2.0	1.2	1.4	2.4	1.9																		
13. <i>C. cf laticaudata</i> KC616835	1.9	17.1	1.6	1.6	1.4	2.0	2.0	1.2	1.4	2.4	1.9	0.0																	
14. <i>C. cf laticaudata</i> JN233846	2.0	16.3	1.7	1.7	1.6	2.2	2.2	0.8	1.2	2.5	1.7	1.1	1.1																
15. <i>C. cf laticaudata</i> KC616849	2.0	17.3	1.7	1.7	1.6	2.2	2.2	1.4	1.6	2.5	2.0	0.2	0.2	1.2															
16. <i>C. cf laticaudata</i> KC616848	2.0	17.3	1.7	1.7	1.6	2.2	2.2	1.4	1.6	2.5	2.0	0.2	0.2	1.2	0.0														
17. <i>C. cf laticaudata</i> JN233855	2.2	16.7	1.9	1.9	1.7	2.4	2.4	1.2	1.4	2.7	1.9	0.3	0.3	1.1	0.5	0.5													
18. <i>C. cf acanthina</i> KC616821	4.7	17.7	4.3	4.3	4.2	4.5	4.5	4.0	4.2	4.8	4.3	4.7	4.7	4.5	4.8	4.8	4.3												
19. <i>C. cf acanthina</i> EU702029	4.7	17.7	4.3	4.3	4.2	4.5	4.5	4.0	4.2	4.8	4.3	4.7	4.7	4.5	4.8	4.8	4.3	0.0											
20. <i>C. dubia</i> EU702075	11.3	15.8	11.7	11.3	11.9	11.9	11.1	11.7	11.7	11.1	11.9	11.9	11.9	11.9	12.1	12.1	11.5	12.3	12.3										
21. <i>C. dubia</i> EU702072	11.3	15.8	11.7	11.3	11.9	11.9	11.1	11.7	11.7	11.1	11.9	11.9	11.9	11.9	12.1	12.1	11.5	12.3	12.3	0.0									
22. <i>C. dubia</i> EU702069	11.3	15.6	11.7	11.3	11.9	11.9	11.1	12.1	12.1	11.1	12.2	11.9	11.9	12.3	12.0	12.0	11.9	12.6	12.6	1.2	1.2								
23. <i>C. dubia</i> EU702073	11.5	15.6	11.9	11.5	12.1	12.1	11.3	11.9	11.9	11.3	12.1	12.1	12.1	12.1	12.3	12.3	11.7	12.5	12.5	0.2	0.2	1.1							
24. <i>C. dubia</i> EU702070	11.5	15.4	11.9	11.5	12.1	12.1	11.7	11.9	11.9	11.7	12.1	12.1	12.1	12.1	12.3	12.3	11.7	12.5	12.5	2.7	2.7	2.7	2.5						
25. <i>C. dubia</i> EU702079	11.7	15.8	12.1	11.7	12.3	12.3	11.5	12.1	12.1	11.5	12.3	12.3	12.3	12.3	12.5	12.5	11.9	12.7	12.7	1.7	1.7	2.0	1.9	2.2					
26. <i>C. dubia</i> EU702082	11.9	16.0	12.3	11.9	12.5	12.5	11.7	12.3	12.3	11.7	12.4	12.5	12.5	12.5	12.6	12.6	12.1	12.8	12.8	1.9	1.9	2.2	2.0	2.4	0.2				
27. <i>C. cf reticulata</i> KC617252	14.1	16.4	14.3	14.1	14.5	14.9	14.3	14.9	14.7	14.7	14.1	15.7	15.7	15.1	15.9	15.9	15.3	15.5	15.5	15.4	15.4	15.8	15.2	15.2	15.6	15.6			
28. <i>C. cf reticulata</i> KC617250	14.3	16.6	14.5	14.3	14.7	15.1	14.5	15.1	14.9	14.9	14.3	15.9	15.9	15.3	16.1	16.1	15.5	15.7	15.7	15.6	15.6	16.0	15.4	15.4	15.8	15.8	0.2		
29. <i>C. cf reticulata</i> EU702042	14.5	16.8	14.7	14.5	14.9	15.3	14.7	15.3	15.1	15.1	14.5	16.1	16.1	15.5	16.3	16.3	15.7	16.3	16.3	16.2	16.2	16.6	16.0	16.0	16.4	16.4	0.6	0.8	

Tabela 3: Divergência genética K2P entre sequências de COI de *Ceriodaphnia cf rigaudi* (KU315489) e outras espécies de *Ceriodaphnia*. Número de acesso do GenBank está após o nome de cada espécie.

10. <i>Chydorus sphaericus</i> HQ972023 CAN Manitoba	19.9	15.7	27.3	22.2	22.5	28.1	19.9	15.3	0.5										
11. <i>Chydorus brevilabris</i> HQ972013 CAN Manitoba	18.5	16.7	26.8	21.2	21.6	27.6	19.1	17.1	14.2	14.2									
12. <i>Chydorus sphaericus</i> GU689236 CAN Manitoba	22.4	0.2	29.4	21.7	24.9	29.6	21.8	0.2	15.5	15.5	16.9								
13. <i>Chydorus sphaericus</i> GU689235 CAN Manitoba	22.4	0.3	29.3	21.7	25.1	29.6	22.0	0.3	15.7	15.7	16.8	0.2							
14. <i>Chydorus sphaericus</i> GU689234 CAN Manitoba	22.4	0.2	29.4	21.7	24.9	29.6	21.8	0.2	15.5	15.5	16.9	0.0	0.2						
15. <i>Chydorus sphaericus</i> GU680583 CAN Manitoba	22.2	0.3	29.6	21.9	25.2	29.9	22.0	0.0	15.3	15.3	17.1	0.2	0.3	0.2					
16. <i>Chydorus sphaericus</i> GU680578 CAN Manitoba	22.4	0.2	29.4	21.7	24.9	29.6	21.8	0.2	15.5	15.5	16.9	0.0	0.2	0.0	0.2				
17. <i>Chydorus sphaericus</i> GU680570 CAN Manitoba	19.8	16.1	27.3	22.2	22.9	28.0	19.9	15.7	0.5	0.6	14.6	15.9	16.1	15.9	15.7	15.9			
18. <i>Chydorus sphaericus</i> GU680569 CAN Manitoba	22.6	0.3	29.6	21.9	25.2	29.9	21.5	0.3	15.7	15.7	17.1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	16.1		
19. <i>Chydorus</i> sp JN233864 CAN Manitoba	22.1	18.0	31.1	25.9	25.6	31.3	22.3	17.6	9.6	9.3	18.4	17.8	18.0	17.8	17.6	17.8	10.0	18.0	
20. <i>Chydorus</i> sp JN233863 CAN Manitoba	22.1	18.0	31.1	25.9	25.6	31.3	22.3	17.6	9.6	9.3	18.4	17.8	18.0	17.8	17.6	17.8	10.0	18.0	0.0

DNA barcode confirms the reallocation of *Alona kainkang* Sousa, Elmoor-Loureiro & Santos, 2015 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) to *Ovalona kaingang* and gives clues to the puzzle involving the *pulchella*-group

CÍNTIA BRUNO DE ABREU^{1*}, MARIA JOSÉ DOS SANTOS-WISNIEWSKI² & TEREZA CRISTINA ORLANDO¹

1 *Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Biodiversidade, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas, Minas Gerais, Brazil. Email: cinthiaabreu123@gmail.com; tecrisorlando@gmail.com.*

2 *Laboratório de Limnologia, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas, Minas Gerais, Brazil. Email: czw@uol.com.br*

*corresponding author: cinthiaabreu123@gmail.com

Abstract

Embraced within the *pulchella*-group, which covers 14 species of the genus *Alona*, *Ovalona kaingang* can be confused with *Coronatella rectangula*, when external general characters were considered. But, in 2015 *Alona kaingang* and other species of the *pulchella*-group were relocated to the genus *Ovalona*. In order to better understand *O. kaingang* relationship within the *pulchella*-group and verify its molecular identity, we sequenced the DNA barcode region (COI), as efficient tool for this type of analysis. Our results indicate genetic divergence ranging from 4.1% to 23.1% among *O. kaingang* and *Alona* and *Leberis* species analyzed, and corroborate *Alona* species from the *pulchella*-group reallocation to the new *Ovalona* genus placement. In addition, the DNA barcoding can be applied not only in future taxonomic revisions as well as phylogenetic analyzes for the *pulchella*-group and in the resolution of troubles for the puzzle involving the Aloninae species taxonomy.

Key words: COI, molecular taxonomy, Aloninae, zooplankton, genetic divergence.

Introduction

Cladocera covers approximately 700 species (Kotov *et al.*, 2011) of which the family Chydoridae is the most diverse. Within its subfamilies, Aloninae is the most speciose and recently is target of taxonomic studies as it includes cryptic speciation and species complexes previously defined (Elias-Gutierrez & Valdez-Moreno, 2008; Belyaeva & Taylor 2009; Castilho *et al.*, 2015). Among them, the *pulchella*-group is composed of at least 17 species (Sinev, 2015), all of them named as *Alona* and considered as one of the most complex groups (Sacherova & Hebert, 2003; Van Damme & Dumont, 2008a). Sinev (2015) re-described and relocated all species of *Alona sensu lato* belonging to the *pulchella*-group for the genus *Ovalona*. This new description was based on several significant morphological similarities between *pulchella*- group and *Ovalona*. Recently described from Brazil occurring in Minas Gerais and Rio Grande do Sul states (Souza *et al.*, 2015a), *Alona kaingang* Sousa, Elmoor-Loureiro & Santos, 2015 can be morphologically confused with *Coronatella rectangula*, when external general characters are considered. In the last years, Aloninae diversity has been identified using morphology (Van Damme & Dumont, 2008; Sinev & Elmoor-Loureiro, 2010; Van Damme *et al.*, 2010; Sinev & Silva-Briano, 2012; Van Damme *et al.*, 2013; Souza *et al.*,

2015) and there is any molecular information for *Ovalona*. Thus molecular techniques such as the DNA barcode, a mitochondrial segment of the citocromo c oxidase I gene (Hebert, 2003), showed its usefulness in taxonomic resolution for the determination of species (Elias-Gutierrez *et al.*, 2008; Elias-Gutierrez & Valdez-Moreno, 2008 ; Silva *et al.*, 2014) and identification diversity (Jeffery *et al.*, 2011). Here we characterized the first COI barcode region of a *Ovalona* species, *O. kaingang* (Sousa, Elmoor-Loureiro & Santos, 2015) comb. nov. and verified genetic divergence with taxonomic implications for the *pulchella*-group.

Methods

Specimens were isolated from the same cultures of Viti *et al.* (2013) (in the southern of Minas Gerais state, 21°56'34"S, 45°18'56"W, Brazil) and preserved in 100% EtOH. Prior to DNA extraction specimens were placed into Milli-Q water for 3h for cleaning. Genomic DNA was extracted using *InstaGene* (Bio-Rad) following manufacture's protocol. To amplify the mitochondrial COI gene, the primers developed by Prosser *et al.* (2013) - ZplankF1 5'-tgtaaacgacggccagtTCTASWAATCATAARGATATTGG-3' and ZplankR1 5'-caggaaacagctatgacTTCAGGRTGRCCRAARAATCA-3' - were used. PCR reactions had a total volume of 25µl and were performed according to Ivanova *et al.*, 2006 using Platinum *Taq* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as the enzyme. The PCR conditions were 95°C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 15s, 52°C for 45s and 72°C for 60s followed by 72°C for 10min. DNA sequencing on both directions was done using purified Exo-SAP (Fermentas) PCR products, carried out in a *3130xl Genetic Analyzer* (Life Technologies, Carlsbad/CA/USA) automated DNA sequencer, following the manufacturer's instructions (GenBank access number KT963045).

The *Ovalona kaingang* COI sequence was aligned in MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) to all other previously published *Alona* (now all considered *Ovalona*) (Sinev, 2015) COI sequences that exhibited high sequence similarity when compared to the COI sequences obtained from GenBank species representatives of the *pulchella*-group and also with sequences from the genus *Leberis* (*elegans* group), as the other Aloninae sequences generated many gaps in the alignment. For species with more than one sequence available, only one sequence of each locality was chosen. The protein coding sequences were translated using MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), to check for stop codons. Using the final alignment, the Kimura 2-Parameter (K2P) distance model was used to calculate sequence divergences and

the analysis was performed using MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) for Neighbor Joining (NJ) with nonparametric bootstrapping with 1000 replicates.

Results and Discussion

COI barcode region from *Ovalona kaingang* totals 658 bp (GenBank accession number KT963045), and have AT proportion of 62.9%, which is similar to that found for the Chydoridae (Sacherová & Hebert 2003; Belyaeva & Taylor 2009; Silva *et al.*, 2014). The final alignment totals 608 bp long and included 25 sequences.

The identification tree (Figure 1) retrieved *Ovalona kaingang* in the same clade as *Alona* cf. *glabra* from Mexico (EU701967, EU701966), *Alona glabra* from Mexico (EU701995, EU701994, EU701988) and Guatemala (EU350588) with high statistical support. Within the sequences analyzed, *O. kaingang* exhibits the lowest genetic divergence (4.1% to 5.3%, Table 1) with species from the clade *A. glabra*/*A. cf. glabra* (*Cambouei*-group).

This divergence is considerable even lower if compared to that observed between *O. kaingang* and *A. cf. setulosa* (17.1%); *A. cf. affinis* (19.5%); *A. pectinata* (19.1% and 19.5%); *Alona* sp from different localities (15.8 to 23.1%); *A. setulosa* - EU701997 (20.2%) and *Leberis* representatives (20.4 and 21.9%) (Figure 1). According to Jeffery *et al.* (2011), within Branchiopoda, a COI genetic divergence below 3% asserts organisms from the same species; between 3 and 5%, indicate species that need taxonomic revision using other data; and above 5% are considered distinct species (Adamowicz & Purvis, 2005; Adamowicz *et al.*, 2009).

Therefore, *O. kaingang* showed low genetic divergence if compared to other *Alona* species (now considered *Ovalona*) from the same retrieved clade, but not so low to classify it as an existing species. So our data support *Ovalona kaingang* to be a distinct species from the *Alona* species analyzed, confirming the status of *O. kaingang* within the *pulchella*-group, already described using morphological analysis, by Souza *et al.* (2015a) and now by Sinev (2015).

According to Souza *et al.* (2015a), *A. kaingang* is confused to *Coronatella rectangula* (Sars, 1861) taking into account external morphological aspects. *C. rectangula* was described as *Alona rectangula* with restricted Western Europe distribution (Van Damme & Dumont, 2008b). Nevertheless, there are records of *C. rectangula* in Southern Brazil (Rocha *et al.*, 2011; Viti *et al.*, 2013), but, its status in the Neotropics were uncertain (Van Damme & Dumont, 2008b). So, it is necessary to review the occurrence of this species after the

morphological description of *A. kaingang* (now *Ovalona kaingang* - Sousa, Elmoor-Loureiro & Santos, 2015 - comb. nov.). The isolate from the present work corresponds to the specimens initially identified as *Coronatella rectangula* (Viti *et al.*, 2013), but specimens identification using the new characters and the genetic divergence found here show that it is indeed *A. kaingang*. Furthermore, the revision of the genus *Coronatella* in Brazil, made by Souza *et al.* (2015b) confirms that *Coronatella rectangula* does not occur in this country. In addition to the inclusion of *Ovalona kaingang* within the *pulchella*-group, our analysis, including GenBank data, recovered main branches in the tree reconstruction (Figure 1).

One branch includes *Alona* sp (KC616764 and KC617435), *Alona setulosa* (EU701997) and three *Alona cf setulosa* (range from 15.4 to 23.3% in genetic divergence if compared to all other species in the analysis). The four other *Alona* sp were recovered as four separated branches (genetic divergence above 15.3% with all other sequences). The other three different branches include *A. pectinata*, *A. cf dentifera* and *A. cf affinis*. Recently *A. pectinata* has been reallocated as genus *Anthalona* (Van Damme *et al.*, 2011) and in the same study the authors suggest that *A. affinis* and *A. dentifera* groups could be new genus. Here we checked genetic divergences are 19.1 and 19.5% with *O. kaingang* and *A. pectinata* (KC617467 and KC617196), now classified *Anthalona*. So the genetic divergences and the identification tree (graphical representation) also present evidence for the need of taxonomic revision for these taxa.

Also, other clues to help elucidating the puzzle of the *pulchella*-group include the detection of American taxa (as this analysis) in this group, and eventually, if data of species from other continents is available, there will be a better resolution for the complex as a whole. Our analyses show *Alona cf setulosa* (KC617440, KC617457 and KC616773) and *A. setulosa* (EU701997) exhibit the 21.8% divergence among them, that is much greater than that the 3% expected for the same species (Jeffery *et al.*, 2011). Probably these species do not belong to the same taxonomic entity. When we compare *A. cf glabra* and *A. glabra* the genetic divergence vary from 4.1 to 5.1%, which are also larger than expected limit for the same species, but are considered doubtful. These two cases reinforce the need for phylogenetic analysis and taxonomic implications to solve relationships for this complex group.

These findings are in accordance to the hypothesis that *Ovalona* is considered a non-artificial group (Sinev, 2015), with difficulties in identifying and/or ancient origin to explain the group complexity and that molecular analysis could be very useful to understand the group.

Other molecular markers and the access to Aloninae species from different continents as South America (proposed earlier by Elias-Gutierrez & Valdez-Moreno, 2008), could elucidate the diversity and biogeography of the group as sequences only from Canada, Mexico and Guatemala where already deposited in the GenBank.

Conclusions

In the present work we determined the first DNA barcode for the genus *Ovalona*, for the recently described species *Ovalona kaingang*, as an important tool to correctly assign the organism as a new species inside the *Ovalona* genus, corroborating the morphological data and assisting in the knowledge of the *pulchella*-group. Therefore our results combined with data from other locations could be applied in phylogenetic analysis and ecological interactions to better understand its habitat function.

Acknowledgements

We thank FAPEMIG (Biota Minas APQ-03549-09 and Universal APQ 01518-09 grants), technicians of Limnology and Molecular Biology Applied to Biodiversity laboratories of UNIFAL-MG and a graduate fellowship to C.B.A. (CAPES Program).

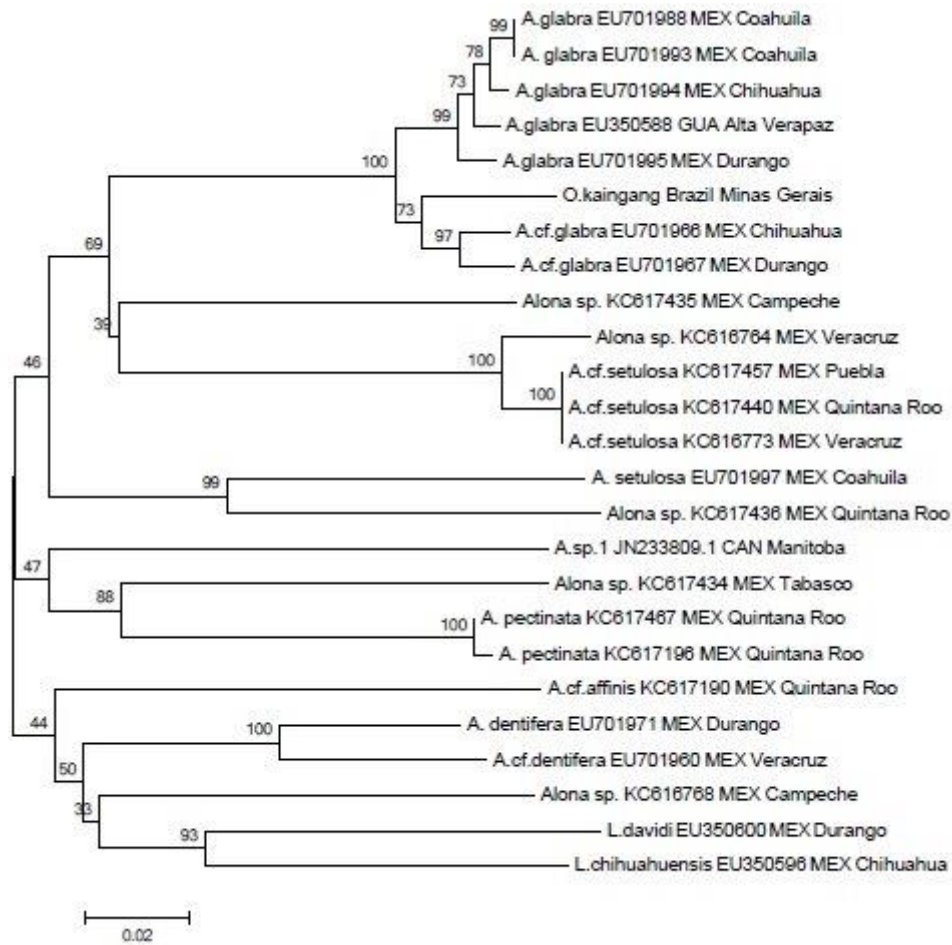


Figure 1: Identification COI tree of *Ovalona kaingang* and other *Alona* and *Leberis* species using a 608 bp-COI fragment inferred by NJ. Numbers on nodes indicate the percentage of bootstrap support (1000 replicates).

Table 1: K2P Genetic divergence among DNA barcode sequence of *Ovalona kaingang* and other *Alona* and *Leberis* species. Bold numbers represent genetic divergence pointed in the manuscript.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1. <i>O. kaingang</i> KT963045																								
2. <i>A. setulosa</i> EU701997	20.2																							
3. <i>A. cf setulosa</i> KC617457	17.1	21,8																						
4. <i>A. cf setulosa</i> KC617440	17.1	21,8	0,0																					
5. <i>A. cf setulosa</i> KC616773	17.1	21,8	0.0	0.0																				
6. <i>A. glabra</i> EU701994	4.8	19.8	16.9	16.9	16.9																			
7. <i>A. glabra</i> EU701988	5.3	19.3	16.7	16.7	16.7	0.8																		
8. <i>A. glabra</i> EU701995	5.2	18.9	16.7	16.7	16.7	1.7	2.3																	
9. <i>A. glabra</i> EU350588	4.8	19.5	16.5	16.5	16.5	1.0	1.5	1.3																
10. <i>A. glabra</i> EU701993	5.3	19.3	16.7	16.7	16.7	0.8	0.0	2.3	1.5															
11. <i>A. cf. glabra</i> EU701966	4.1	20.0	16.5	16.5	16.5	4.1	4.6	4.5	4.1	4.6														
12. <i>A. cf. glabra</i> EU701967	4.6	20.2	15.9	15.9	15.9	4.3	5.1	4.6	4.3	5.1	2.0													
13. <i>Alona</i> sp KC617436	21.3	14.2	20.4	20.4	20.4	19.8	19.3	19.5	19.5	19.3	19.7	20.6												
13. <i>Alona</i> sp KC617435	15.8	18.7	16.2	16.2	16.2	16.2	16.4	15.4	16.0	16.4	15.8	16.0	19.1											
15. <i>Alona</i> sp KC617434	23.1	19.8	22.4	22.4	22.4	21.7	20.8	21.7	21.2	20.8	21.9	21.5	19.2	20.2										
16. <i>Alona</i> sp KC616768	21.3	22.8	20.0	20.0	20.0	19.1	19.1	18.6	18.9	19.1	19.9	19.7	23.8	19.3	20.5									
17. <i>Alona</i> sp KC616764	17.4	22.0	2.9	2.9	2.9	18.0	17.8	17.6	17.6	17.8	16.7	16.7	20.4	17.0	23.0	21.3								
18. <i>A. sp</i> 1 JN233809 CAN	21.0	21.7	20.0	20.0	20.0	20.2	19.7	19.7	19.8	19.7	19.1	20.2	21.7	19.1	19.3	20.0	19.8							
19. <i>A. pectinata</i> KC617467	19.1	21.9	22.1	22.1	22.1	19.3	19.0	18.8	18.8	19.0	19.3	19.9	20.8	19.5	15.3	19.5	22.8	18.3						
20. <i>A. pectinata</i> KC617196	19.5	21.9	22.6	22.6	22.6	19.7	19.5	19.3	19.3	19.5	19.7	20.4	21.2	19.5	15.3	19.9	23.3	18.3	0.3					
21. <i>A. cf affinis</i> KC617190	19.5	20.9	20.4	20.4	20.4	18.7	18.7	18.3	18.5	18.7	18.7	18.0	22.5	21.2	20.1	18.3	20.9	21.6	18.7	19.2				
22. <i>A. dentifera</i> EU701971	20.3	18.4	20.7	20.7	20.7	19.9	19.5	19.3	19.7	19.5	19.0	18.8	21.5	20.8	17.8	16.2	20.5	19.1	18.1	18.5	17.1			
23. <i>A. cf dentifera</i> EU701960	21.2	20.0	20.4	20.4	20.4	20.5	20.5	19.9	20.3	20.5	20.3	20.3	20.8	20.4	18.4	16.6	20.4	19.3	15.5	15.9	18.1	7.5		
24. <i>L. davidi</i> EU350600	21.9	21.0	22.7	22.7	22.7	19.7	19.9	19.3	20.0	19.9	20.8	20.4	21.5	20.8	21.5	19.1	22.7	20.7	21.9	22.3	20.6	17.0	18.5	
25. <i>L. chihuahuisensis</i> EU350596	20.4	19.9	20.0	20.0	20.0	19.8	19.8	19.3	19.5	19.8	20.0	19.5	21.1	19.1	22.5	16.6	20.4	22.4	21.7	22.2	19.6	16.5	17.0	14.7

References

- Adamowicz, S.J. & Purvis, A. (2005) How many branchiopod crustacean species are there? Quantifying the components of underestimation. *Global Ecology and Biogeography*, 14, 455-468.
- Adamowicz, S.J., Petrusek, A., Colbourne, J.K., Hebert, P.D.N. & Witt, J.D.S. (2009) The scale of divergence: A phylogenetic appraisal of intercontinental allopatric speciation in a passively dispersed freshwater zooplankton genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50, 423-436.
- Belyaeva, M. & Taylor, D.J. (2009) Cryptic species within the *Chydorus sphaericus* species complex (Crustacea: Cladocera) revealed by molecular markers and sexual stage morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50, 534-546.
- Castilho, M.C.D., Wisniewski, M.J.D., de Abreu, C.B. & Orlando, T.C. (2015) Life history and DNA barcode of *Oxyurella longicaudis* (Birgei, 1910) (Cladocera, Anomopoda, Chydoridae). *Zoological Studies*, 54.
- Costa, F.O., deWaard, J.R., Boutillier, J., Ratnasingham, S., Dooh, R.T., Hajibabaei, M. & Hebert, P.D.N. (2007) Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64, 272-295.
- Elias-Gutierrez, M. & Valdez-Moreno, M. (2008) A now cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding. *Hidrobiologica*, 18, 63-74.
- Elias-Gutierrez, M., Jeronimo, F.M., Ivanova, N.V., Valdez-Moreno, M. & Hebert, P.D.N. (2008) DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa*, 1-42.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & deWaard, J.R. (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 270, S96-S99.

- Jeffery, N.W., Elias-Gutierrez, M. & Adamowicz, S.J. (2011) Species Diversity and Phylogeographical Affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba, Canada. *Plos One*, 6,
- Kotov, A.A., Korovchinsky, N.M., Sinev, A.Y. & Smirnov, N.N. (2011) Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) from the Zeya River Basin (Amur Region, Russian Federation). 3. Systematic-Faunistical and Zoogeographical Analyses. *Zoologicheskyy Zhurnal*, 90, 402-411.
- Prosser, S., Martinez-Arce, A. & Elias-Gutierrez, M. (2013) A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular Ecology Resources*, 13, 1151-1155.
- Rocha, O., Santos-Wisniewski, M.J. & Matsumura-Tundisi, T. (2011) Checklist de Cladocera de água doce do Estado de São Paulo. *Biota neotrop.(Online, Ed. port.)*, 11, 571-592.
- Sacherova, V. & Hebert, P.D.N. (2003) The evolutionary history of the Chydoridae (Crustacea : Cladocera). *Biological Journal of the Linnean Society*, 79, 629-643.
- Silva, E.D., de Abreu, C.B., Orlando, T.C., Wisniewski, C. & dos Santos-Wisniewski, M.J. (2014) *Alona iheringula* Sinev & Kotov, 2004 (Crustacea, Anomopoda, Chydoridae, Aloninae): Life Cycle and DNA Barcode with Implications for the Taxonomy of the Aloninae Subfamily. *Plos One*, 9,
- Sinev, A.Y. & Elmoor-Loureiro, L.M.A. (2010) Three new species of chydorid cladocerans of subfamily Aloninae (Branchiopoda: Anomopoda: Chydoridae) from Brazil. *Zootaxa*, 1-25.
- Sinev, A.Y. & Silva-Briano, M. (2012) Cladocerans of genus *Alona* Baird, 1843 (Cladocera: Anomopoda: Chydoridae) and related genera from Aguascalientes State, Mexico. *Zootaxa*, 1-24.
- Sinev, A.Y. (2015) Revision of the *pulchella*-group of *Alona* s. lato leads to its translocation to *Ovalona* Van Damme et Dumont, 2008 (Branchiopoda: Anomopoda: Chydoridae). *Zootaxa*, 4044, 451-492.
- Sousa, F.D.R., Elmoor-Loureiro, L.M.A. & Santos, S. (2015) *Alona kaingang* (Crustacea, Cladocera, Aloninae): a new species of the *pulchella*-group, with identification key to Neotropical species. *Zoological Studies*, 54.
- Sousa, F.D.R., Elmoor-Loureiro, L.M.A. & Santos, S. (2015) Redescription of *Coronatella poppei* (Richard, 1897) (Crustacea, Branchiopoda, Chydoridae) and a revision of the genus in Brazil, with descriptions of new taxa. *Zootaxa*, 3955, 211-244.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution*, 30, 2725–2729.
- Van Damme, K. & Dumont, H.J. (2008) Further division of *Alona* Baird, 1843: separation and position of *Coronatella* Dybowski & Grochowski and *Ovalona* gen.n. (Crustacea: Cladocera). *Zootaxa*, 1-44.

Van Damme, K. & Dumont, H.J. (2008) The 'true' genus *Alona* Baird, 1843 (Crustacea: Cladocera: Anomopoda): position of the *A. quadrangularis*-group and description of a new species from the Democratic Republic of Congo. *Zootaxa*, 1-25.

Van Damme, K., Bekker, E.I. & Kotov, A.A. (2013) Endemism in the Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) of Southern Africa. *Journal of Limnology*, 72, 440-463.

Van Damme, K., Kotov, A.A. & Dumont, H.J. (2010) A checklist of names in *Alona* Baird 1843 (Crustacea: Cladocera: Chydoridae) and their current status: an analysis of the taxonomy of a lump genus Introduction. *Zootaxa*, 1-63.

Van Damme, K., Sinev, A.Y. & Dumont, H.J. (2011) Separation of *Anthalona* gen. n. from *Alona* Baird, 1843 (Branchiopoda: Cladocera: Anomopoda): morphology and evolution of scraping stenothermic alonines. *Zootaxa*, 2875, 1-64.

Viti, T., Wisniewski, C., Orlando, T.C. & dos Santos-Wisniewski, M.J. (2013) Life history, biomass and production of *Coronatella rectangula* (Branchiopoda, Anomopoda, Chydoridae) from Minas Gerais. *Iheringia Serie Zoologia*, 103, 110-117.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os valores elevados de divergências genéticas que encontramos entre os espécimes brasileiros de *D. cf birgei*, *C. silvestrii*, *C. cf rigaudi*, *S. armata freyi*, *Simocephalus* sp, *Bosmina freyi*, *Chydorus pubescens* com os isolados dos outros países fornecem indícios que esses microcrustáceos são molecularmente diferentes, mas morfologicamente classificados como a mesma espécie. No entanto, o exemplar brasileiro de *Daphnia laevis* é molecularmente igual aos isolados argentinos. Esses dados reforçam o conceito de endemismo continental e subsidiam novos estudos nesta área. A avaliação do DNA *barcode* de *Ovalona kaingang* confirmou a revisão morfológica que justifica a realocação de todos os integrantes do grupo *pulchella* para o novo gênero *Ovalona*.

Assim, os dados apresentados constituem o primeiro inventário de espécies de Cladocera brasileiros que consideram a biologia molecular. Somando os dois trabalhos resultam em 11 espécies com a região de DNA *barcode* caracterizadas.

6 PERSPECTIVAS

Estetrabalho é somente o início das investigações moleculares para Cladocera no Brasil e seria interessante ampliar o conhecimento incluindo espécimes coletados em vários pontos do reservatório da UHE Furnas e em outros corpos d'água do estado e país. Dada a imensidão geográfica, apenas um grande e ambicioso projeto de levantamento da diversidade genética de Cladocera consiga caracterizar e determinar a região de DNA *barcode* para estes microcrustáceos brasileiros. Dessa forma, a maioria dos questionamentos de diversidade e taxonomia dos Cladocera poderia começar a ser sanada. Futuramente, quando outros dados forem obtidos, alguns pontos obscuros na taxonomia e distribuição destes organismos poderiam ser resolvidos, como os padrões de colonização, envolvendo o conceito de endemismo continental, além de lançar luz sobre questões taxonômicas e finalmente conhecer a real diversidade brasileira e seu contexto mundial, incluindo a diversidade filogenética e sua importância na análise da conservação dos habitats onde esses organismos têm importante papel.