



Universidade do Estado do Rio De Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

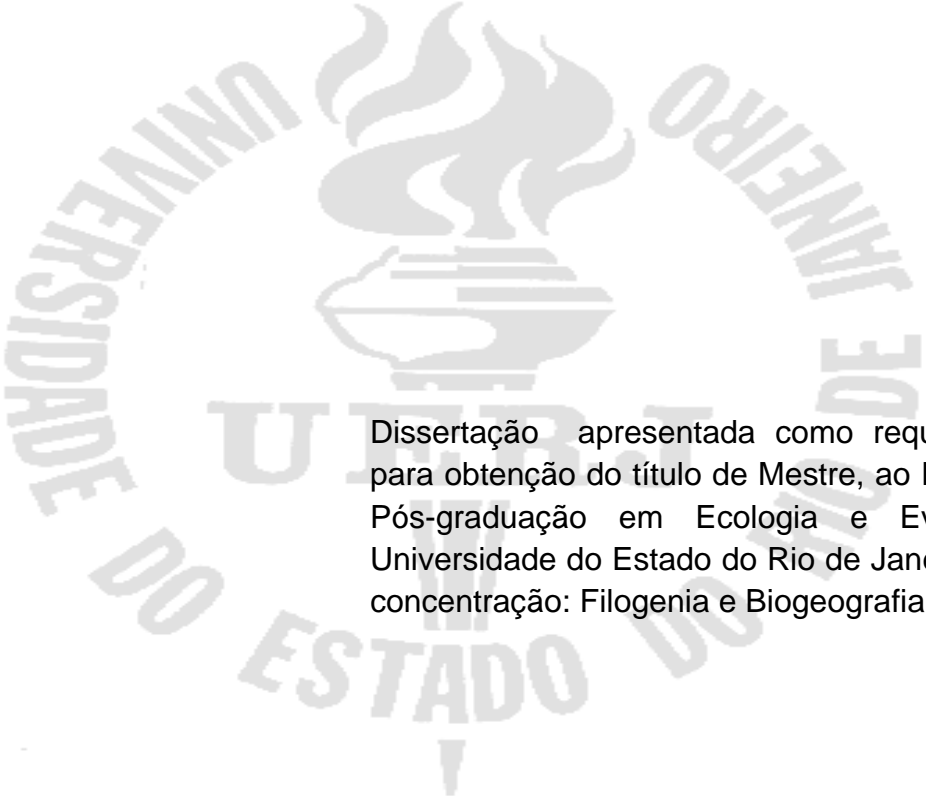
Thiago Silva de Paula

**O complexo *Cliona celata* Grant, 1826 (Porifera,
Demospongiae) na América do Sul: uma abordagem
molecular e morfológica**

Rio de Janeiro
2009

Thiago Silva de Paula

**O complexo *Cliona celata* Grant, 1826 (Porifera,
Demospongiae) na América do Sul: uma abordagem
molecular e morfológica**



Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Filogenia e Biogeografia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Gisele Lôbo Hadju

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

P324

Paula, Thiago Silva de

O complexo *Cliona celata* Grant, 1826 (Porífera, Demospongiae) na América do Sul: uma abordagem molecular e morfológica / Thiago Silva de Paula. - 2009. 117 f.

Orientadora: Gisele Lôbo Hajdu.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

Bibilografia: p.92-102.

1.. Esponja - América do Sul -Teses. 2. Esponja – Filogenia – América do Sul – Teses. 3. Invertebrado marinho - América do Sul -Teses. I. Hajdu, Gisele Lôbo, II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 593.4(8)

Autorizo para fins acadêmicos e científicos, a reprodução parcial ou total desta dissertação.

Assinatura

Data

Thiago Silva de Paula

**O complexo *Cliona celata* Grant, 1826 (Porifera,
Demospongiae) na América do Sul: uma abordagem
molecular e morfológica**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-
Graduação em Ecologia e Evolução, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de
Concentração: Filogenia e Biogeografia.

Aprovado em 18 de fevereiro de 2009.

Banca Examinadora:

Profa. Dr^a. Gisele Lôbo Hajdu, (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

Prof. Dr. Antônio Mateo Solé-Cava
Instituto de Genética da UFRJ

Prof. Dr. Eduardo Carlos Meduna Hajdu
Museu Nacional da UFRJ

Prof. Dr. Joel Christopher Creed
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

Rio de Janeiro

2009

DEDICATÓRIA

A Hugo Mota Monte Cardoso
(1979-2008)

In Memoriam

Porque a última coisa que ele faria questão seria a dedicatória de um trabalho científico
(até porque existem coisas bem mais interessantes para se dedicar a alguém...)

*Árvores são poemas que a terra escreve para o céu.
Nós as derrubamos e as transformamos em papel para
registrar todo o nosso vazio.*

Khalil Gibran, poeta libanês.

*Continuamos sob o domínio da crença fútil e destrutiva
de que o homem é o ápice da criação, e não apenas uma parte
dela, e que, sendo assim, tudo lhe é permitido... Somos
incapazes de perceber que o único sustentáculo genuíno de
nossas ações – se elas forem morais – é a responsabilidade. A
responsabilidade para com algo maior que a família, o país, a
empresa ou o sucesso. A responsabilidade para com a própria
essência do Ser, onde todas nossas ações estão indelevelmente
gravadas e serão, apenas ali, corretamente julgadas.*

Václav Havel, poeta, dramaturgo e estadista tcheco.

RESUMO

PAULA, Thiago Silva de. **O complexo *Cliona celata* Grant, 1826. (Porifera, Demospogiae) na América do Sul: uma abordagem molecular e morfológica.** 2009. 117f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2009.

Este trabalho visou a averiguação do status taxonômico das esponjas bioerosivas do complexo *Cliona celata* da América do Sul por meio de técnicas moleculares, utilizando como marcadores a subunidade I da Citocromo c oxidase (*cox1*) e os Espaçadores Internos. Transcritos do RNAr nuclear (ITS1 e ITS2), além de testar outros marcadores. Igualmente, avaliou o grau de variabilidade morfológica encontrado nessas espécies, principalmente por meio da morfometria dos tilóstilos, a fim de estabelecer uma diagnose para elas. Ainda, tentou determinar as relações filogenéticas dessas espécies com as demais esponjas bioerosivas utilizando o gene 28S do RNAr nuclear. Foi possível determinar a existência de cinco clados de esponjas bioerosivas do complexo *Cliona celata* para a América do Sul, e dois outros clados não-sulamericanos, por meio dos marcadores moleculares utilizados. Embora seja discutida a validade desses clados como espécies distintas, continua impossível, por meio de caracteres morfológicos, distingui-los, e dessa forma, a proposição formal de novas espécies é evitada. Através da reconstrução filogenética do grupo, é possível verificar que as esponjas bioerosivas analisadas se apresentaram como um grupo monofilético, e se separa em três principais clados: *Pione*, Spirastrellidae, e Clionidae. Por meio desta, é sugerida a alocação das espécies do complexo *C. viridis* e *C. schimidti* dentro de *Spirastrella*, além de ser necessária a criação de um novo gênero para alocar as espécies do novo complexo identificado aqui, o complexo *C. delitrix*.

Palavras-chaves: Biogeografia. Espécies crípticas. Filogenia. Porifera. Esponjas bioerosivas.

ABSTRACT

This work intended the validation of the taxonomic status of boring sponges from the *Cliona celata* complex of South America by molecular techniques, using Cytochrome oxidase, subunit I (*cox1*), and Internal Transcribed Spacers (ITS) of rRNA nuclear genes as molecular markers. Additionally, the degree of morphological variation necessary to establish a correct diagnosis for the studied species was evaluated, and additional markers were tested. Finally, a phylogenetic analysis comparing this species with other boring sponges, using the 28S rRNA nuclear gene was carried out. It was possible to point out the existence of Five clades of boring sponges from the *C. celata* complex in South America, and two more from Mexico and Australia. Although these clades can comprise new valide species, no morphological evidence was found to separate them, and thus, no formal species descriptions were presented. Through out phylogenetic analyses it was possible to conclude that boring sponges form a monophyletic group, which can be separated in three clades: *Pione*, Spirastrellidae, and Clionidae. This work suggests to allocate *C. viridis* and *C. schmidtii* species complexes inside *Spirastrella*, and to create a new genus for the new *C. delitrix* species complex.

Keywords: Biogeography. Cryptic species. Phylogeny. Porifera. Boring sponges.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Posicionamento filogenético das esponjas entre Urmetazoa (animal ancestral) e Urbilateria (bilatério ancestral)	21
Figura 2 Plano corporal básico de uma esponja	23
Figura 3 Cicatrizes resultantes da bioerosão	25
Figura 4 Estágios sucessionais de crescimento em esponjas bioerosivas	26
Figura 5 Principais tipos espiculares encontrado nas esponjas bioerosivas	27
Figura 6 Variação morfológica encontrada nos tilóstilos das espécies do complexo <i>Cliona celata</i> Grant, 1826	31
Figura 7 Distribuição de frequências de identidade genética de Nei (1972)	35
Figura 8 Quantificação do DNA genômico total de amostras de clonádeos em gel de 0,8% de agarose após procedimento de extração segundo protocolo com fenol:clorofórmio	46
Figura 9 Visualização da amplificação da região ITS em gel de 1,5% de agarose	47
Figura 10 Programa SeqMan DNASTAR para edição de sequência	48
Figura 11 Alinhamento de sequências por meio do programa ClustalX2	48
Figura 12 Árvore de consenso de MP para <i>cox1</i> Folmer	60
Figura 13 Árvore de NJ para <i>cox1</i> Folmer	61
Figura 14 Árvore de MP para ITS	62
Figura 15 Árvore de NJ para ITS	63
Figura 16 Árvores de RIM	65
Figura 17 Árvore de 28S	66
Figura 18 Árvore linearizada de 28S assumindo o pressuposto do relógio molecular	68
Figura 19 Padrões de RFLP para esponjas bioerosivas da América do Sul	69

Figura 20 Preparações de lâminas de espículas dissociadas de indivíduos do complexo <i>Cliona celata</i> Grant, 1826	70
Figura 21 Preparações de lâminas de corte espesso de indivíduos do complexo <i>Cliona celata</i> Grant, 1826	70
Figura 22 Microscopia Eletrônica de Varredura dos tilóstilos	71
Figura 23 Gráfico de dispersão entre os parâmetros morfométricos L e W dos tilóstilos de indivíduos do complexo <i>Cliona celata</i> Grant, 1826	73
Figura 24 Gráfico de dispersão entre os parâmetros morfométricos L e W dos tilóstilos de indivíduos do complexo <i>Cliona celata</i> Grant, 1826, apenas para dados deste trabalho, mostrando correlação e grau de confiança	74
Figura 25 Gráfico de dispersão entre os parâmetros morfométricos W e T dos tilóstilos de indivíduos do complexo <i>Cliona celata</i> Grant, 1826, apenas para dados deste trabalho, mostrando correlação e grau de confiança	74
Figura 26 Gráfico de dispersão entre os valores canônicos de cada caso separados por grupo	76
Figura 27 Esquema representativo da distribuição de cada possível espécie críptica detectada neste trabalho	91
Figura 28 Cladograma retratando as sugestões taxonômicas sugeridas pela reconstrução filogenética obtida neste trabalho (árvore de MP do gene 28S, sem valores de <i>Bootstrap</i>)	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Material examinado neste trabalho	38
Tabela 2 Oligonucleotídeos específicos utilizados neste trabalho	45
Tabela 3 Espécimes do complexo <i>Cliona celata</i> Grant, 1826, em números de indivíduos de cada grupo para os dados marcadores moleculares	55
Tabela 4 Distâncias genéticas entre os grupos do complexo <i>Cliona celata</i> Grant, 1826	56
Tabela 5 Distâncias genéticas interna dos grupos do complexo <i>Cliona celata</i> Grant, 1826.	57
Tabela 6 Modelos de substituição escolhidos com base nos resultados do ModelTest para cada marcador molecular utilizado neste trabalho, e seus respectivos parâmetros	58
Tabela 7 Resultados da hipótese de relógio molecular	67
Tabela 8 Estimativa do tempo de divergência para cada nó da árvore linearizada de 28S	67
Tabela 9 Média e erros-padrão dos parâmetros morfométrico para cada grupo .	71
Tabela 10 Morfometria do tilóstilo para espécies de esponjas bioerosivas do complexo <i>Cliona celata</i> , valores médios retirados da literatura	72
Tabela 11 Valores de correlação entre os parâmetros morfométricos e sua significância	73
Tabela 12 Resultados estatísticos da análise discriminante	75
Tabela 13 Valores canônicos para o centróide dos grupos	75
Tabela 14 Matrix de classificação dos casos em cada grupo	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

28S	gene 28S do RNAr nuclear, no âmbito deste trabalho região D2
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> , polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados
Atl	Atlântico, no âmbito deste trabalho haplótipo de <i>Cliona celata</i> do Atlântico, abrangendo Sudeste do Brasil, Venezuela e Irlanda.
<i>atp6</i>	subunidade 6 da ATP sintase
ca.	cerca de
CI	índice de consistência
CNI	<i>Close Neighbor Interchange</i>
<i>cox1</i>	subunidade I da Citocromo <i>c</i> oxidase
<i>cox2</i>	subunidade II da Citocromo <i>c</i> oxidase
<i>cytb</i>	Citocromo <i>b</i>
D2	região divergente 2 do gene 28S do RNAr nuclear
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	eoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
e.g.	por exemplo, <i>exempli gracia</i>
et al.	e colaboradores
EtBr	brometo de etídeo
FedEx	<i>Federal Express</i>
Hapl1	Haplótipo 1 de <i>Cliona chilensis</i>

Hapl2	Haplótipo 2 de <i>Cliona chilensis</i>
hLRT	<i>Hierarchical Likelihood Ratio Test</i> , teste de razão de verossimilhança hierárquico
I	identidade genética para isoenzimas
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
ICNZ	<i>International Code of Nomenclature Zoological</i> , Código Internacional de Nomenclatura Zoológica
Irl	Irlanda, no âmbito deste trabalho haplótipo de <i>Cliona celata</i> da Irlanda, exclusivamente.
ITS	<i>Internal Transcribed Spacers</i> , espaçadores internos transcritos
JC	Jukes-Cantor
L	comprimento total do tilóstilo
LABMEL	Laboratório de Microscopia Eletrônica da UERJ
LGMar	Laboratório de Genética Marinha
LRT	<i>Likelihood Ratio Test</i> , teste de razão de verossimilhança
L/W	razão do comprimento total pela largura máxima do tilóstilo
M.a.	Milhões de anos
Mc	coleção pessoal de esponjas da Dra. Grace McCormack
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
ML	<i>Maximum Likelihood</i> , Máxima Verossimilhança
MNRJ	Museu Nacional do Rio de Janeiro, no âmbito deste trabalho referência de tombo do Laboratório de Porifera do Museu Nacional Rio de Janeiro
MP	Máxima Parcimônia
n.c.	não calculável
n.d.	não disponível para cálculo
NE	Nordeste do Brasil, no âmbito deste trabalho haplótipo do Nordeste do Brasil de <i>Cliona celata</i>

NJ	<i>Neighbor-Joining</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reação em cadeia da polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> , polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
RI	índice de retenção
RIM	região intergênica mitocondrial
RNAr	ácido ribonucléico ribossomal
SBD	<i>Sponge Barcode Database</i>
SSCP	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i> , polimorfismo de conformação de fita simples
T	largura máxima do tilo
T	tempo de divergência
TBE	Tris-borato-EDTA
Tris	(hidroximetil) aminometano
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
T/W	razão da largura máxima do tilo pela largura máxima do tilóstilo
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UV	ultravioleta
W	largura máxima do tilóstilo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
1 MATERIAL E MÉTODOS	37
1.1 Material Examinado	37
1.2 Métodos Moleculares	44
1.2.1 <u>Extração de DNA</u>	44
1.2.2 <u>Amplificação in vitro de DNA</u>	44
1.2.3 <u>Sequenciamento, edição de sequências e alinhamento</u>	46
1.2.4 <u>Distâncias genéticas</u>	47
1.2.5 <u>Modelos de substituição</u>	49
1.2.6 <u>Análises filogenéticas</u>	49
1.2.7 <u>Estimativa de tempo de divergência</u>	50
1.2.8 <u>Haplotipagem por RFLP</u>	51
1.3 Métodos Morfológicos	51
1.3.1 <u>Preparação de lâminas de espículas dissociadas</u>	51
1.3.2 <u>Preparação de lâminas de corte espesso</u>	52
1.3.3 <u>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u>	52
1.3.4 <u>Morfometria de espículas</u>	53
2 RESULTADOS	54
2.1 Análises Moleculares	54
2.1.1 <u>Extração de DNA</u>	54

2.1.2 <u>Amplificação in vitro de DNA</u>	54
2.1.3 <u>Sequenciamento, edição de sequências e alinhamento</u>	54
2.1.4 <u>Distâncias genéticas</u>	55
2.1.5 <u>Modelos de substituição</u>	57
2.1.6 <u>Análises filogenéticas</u>	57
2.1.7 <u>Estimativa de tempo de divergência</u>	67
2.1.8 <u>Haplotipagem por RFLP</u>	68
2.2 Análises Morfológicas	69
2.2.1 <u>Preparação de lâminas de espículas dissociadas</u>	69
2.2.2 <u>Preparação de lâminas de corte espesso</u>	69
2.2.3 <u>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u>	70
2.2.4 <u>Morfometria de espículas</u>	71
3 DISCUSSÃO	77
3.1 Limites de espécies	77
3.2 Detecção de espécies crípticas	79
3.3 Filogeografia do complexo <i>Cliona celata</i>	81
3.4 Filogenia das esponjas bioerosivas	84
3.5 Implicações taxonômicas	86
3.6 Considerações gerais	88
4 CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE A - Protocolos de extração de NA	103
APÊNDICE B - Protocolos de PCR	107
APÊNDICE C - Distâncias genéticas pareadas entre amostras	109
APÊNDICE D - Valores dos casos da Análise Discriminante117