UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado

Trabalho de Conclusão de Curso

Identificação molecular de espécies do complexo *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca: Planorbidae)

Mariana Fabris Xavier

Pelotas, 2015

Mariana Fabris Xavier

Identificação molecular de espécies do complexo *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca: Planorbidae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de TCC III do Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à aprovação no curso.

Orientadora: Profa. Drª. Juliana Cordeiro

Co-Orientador: Dr. Demetrius da Silva Martins

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

X1i Xavier, Mariana Fabris

Identificação molecular de espécies do complexo Biomphalaria tenagophila (Mollusca: Planorbidae) / Mariana Fabris Xavier. – 46f. :il. - Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2015. – Orientadora Juliana Cordeiro ; coorientador Demetrius da Silva Martins.

1.Biologia. 2.Biomphalaria. 3.COI. 4.DNA Barcode. 5.Vetor. I.Cordeiro, Juliana. II.Martins, Demetrius da Silva. III.Título.

CDD: 639.31

Mariana Fabris Xavier

Identificação molecular de espécies do complexo *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca: Planorbidae)

Trabalho de Conclusão aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data de defesa: 20/11/2015

Banca Examinadora:

.....

Prof[a] Dr[a] Juliana Cordeiro (Orientadora) Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

.....

Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela Doutor em Ciências da Saúde – Doenças Parasitárias pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz.

.....

Dr[a] Marcia Raquel Pegaroro de Macedo Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

Aos meus pais, Cristina e José Anilton, por me darem toda liberdade do mundo e suporte total para fazer minhas próprias escolhas. Ao meu irmão, por me complementar sendo tão difrerente de mim. Á Tita e prima Raquel, por me quererem sempre bem. Obrigada pelo turbilhão de amor!

Á minha orientadora Juliana Cordeiro e meu orientador Demetrius Martins pelo apoio sentimental e burocrático. Juju, obrigada por toda paciência, disposição e parceria. Demis, obrigada por me ensinar que o jeito “lagarto” de ser funciona (se executado corretamente). Obrigada também a minha orientadora por tabela Patrícia Thyssen, por ter me inserido no mundo dos “chicletes” (junto com a Thams).

A todos professores e funcionários do Instituto de Biologia da UFPel, pelo conhecimento e pela disposição constante. Em especial, ao Prof. Cristiano Agra (Cristiene), por ensinar que um mestre também pode ser um baita amigo!

Á minha turma querida (ATCB 2015) que vou levar no coração seja onde estiver. Lulu, Bine, Tutu e Pri, obrigada por serem amigas tão fortes e malemolentes, vocês são demais!

Aos molusqueiros lagartos Caroline Duarte (Carólis) e André Lopes (Dé). “Aturar” vocês foi incrível. Moluscos power forever!

Aos meus colegas de laboratório: Thaís, Carol, João e Dani. Obrigada por dividirem todos aqueles potes de ponteiras.

Á Republique Lobobitombo (Vitin, Kauliko, Tiagui, Tati e Marlino), por terem sido minha família pelotense. Obrigada por toda bagunça, vivência e diversão!

Aos meus amigos de Porto Alegre que mesmo longe nunca se esquecem de mim. Jubilana, Thaíssinha, Felpes e todos os guris, obrigada por terem sido uma fonte de tranquilidade (ou loucura) a cada volta pra casa.

A Murillo Souza (Mus), meu correspondente biológo a distância. Obrigada por todas conversas filosóficas.

A Lucas Pinheiro (Pi) e Thaís Hopp, obrigada pelo companheirismo em tantas indiadas da vida. Agradecimento especial a família do Pi: á Tia Ângela, por ter sido a primeira a me receber em Pelotas; e ao Seu Zé e a Dona Leda, por terem me

adotado como neta. Obrigada por me receberem tão bem em sua casinha!

A Vitor (Albano) Alano por ter sido parte tão importante da minha graduação e do meu amadurecimento. Obrigada por ter me ensinado tantos sentimentos novos.

Á Universidade Federal de Pelotas, por proporcionar a oportunidade de uma formação de qualidade.

E a todas outras pessoinhas, que de uma maneira ou outra, me influenciaram e contribuiram durante esses cincos anos de graduação. Muito obrigada!

”You can do what you want
The oportunity is on
And if you find a new way
You can do it today
You can make it all true
And you can make it undo!”

(Cat Stevens)

Resumo

XAVIER, Mariana Fabris. **Identificação molecular de espécies do complexo *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca: Planorbidae).** 2015. 46 f. Trabalho de Conclusão, Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O gênero *Biomphalaria* constitui um grupo de caramujos que apresenta grande importância epidemiológica, uma vez que algumas espécies são reconhecidamente hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose mansônica. Dentre as espécies de *Biomphalaria,* o complexo *B. tenagophila* é relevante por apresentar duas populações, com ocorrência no Rio Grande do Sul, naturalmente resistentes ao *S. mansoni.* No entanto, a identificação morfológica desse complexo é considerada difícil. Ferramentas moleculares e a técnica de DNA Barcode tem sido utilizadas com sucesso para a identificação rápida e eficiente de diversos grupos de moluscos, incluindo *Biomphalaria*. Neste trabalho, a eficiência do marcador molecular COI foi testada para identificação de espécies do complexo *B. tenagophila.* Foram geradas 35 novas sequências de COI provenientes de Pelotas, Santa Vitória do Palmar (Taim), Esteio, Eldorado do Sul e Argentina. Os dados recuperados neste estudo refletem as relações vistas em trabalhos anteriores. Devido a isso, a técnica de DNA Barcode demonstrou ser uma boa ferramenta para identificação desse complexo. Porém, os valores de *barcode gap* gerados não foram ideais. Além disso, a rede de hapótipos demonstrou ser uma boa ferramenta de suporte para a técnica de DNA Barcode.

Palavras-chave: Planorbidae; hospedeiro intermediário; DNA Barcode; esquistossomose; COI

Abstract

XAVIER, Mariana Fabris. **Molecular identification of complex *Biomphalaria tenagophila* species (Mollusca: Planorbidae).** 2015. 46 f. Trabalho de Conclusão, Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

The Biomphalaria genus is a group of snails that has great epidemiological importance, since some species are known as intermediate hosts of *Schistoma mansoni*, the etiological schistosomiasis mansoni agent. Among the *Biomphalaria* species, the *B. tenagophila* complex is relevant because there are two populations in Rio Grande do Sul that are naturally resistant to *S. mansoni*. However, the morphological identification of this complex requires much effort. Molecular tools and DNA barcode technique has been successfully used for fast and efficient identification of several groups of mollusks, including *Biomphalaria*. In this study, the efficiency of COI molecular marker was tested for species identification of *B. tenagophila* complex. 35 new COI sequences were generated from Pelotas, Santa Vitória does Palmar (Taim), Esteio, Eldorado do Sul and Argentina. The recovered data in this study reflects the relations that have been shown on previous papers. Due to this, the DNA Barcode technique proved to be a good tool for identification of this complex. However, the data generated from the barcode gap were not ideal. Furthermore, haplotypes network proved to be a good support tool for DNA Barcode technique.

Keywords: Planorbidae; intermediate host; Dna Barcode; schistosomiasis; COI

Lista de Tabelas

Tabela 1 Lista de espécies de *Biomphalaria* com ocorrência no Brasil, incluindo informações sobre a ocorrência da espécie no Rio Grande do Sul e o seu status de suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* 12

Tabela 2 Número de amostras analisadas, geradas neste estudo e adquiridas *in silico*, indicando também a localidade de onde são provenientes .....……. 22

Tabela 3 Valores de divergência genética calculados a partir do modelo evolutivo K2P com 1000 réplicas de *bootstrap* 24

Lista de Figuras

Figura 1 Parede vaginal e complexo peniano de *B. t. tenagophila*, *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis* 13

Figura 2 Pontos de coleta de espécimes utilizados neste trabalho 18

Figura 3 Agrupamento de sequências baseado no método de construção NJ, modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (K2P), 1000 réplicas de *bootstrap* 22

Figura 4 Frequência dos valores de divergência genética intra e interespecíficos distribuídas em intervalo de valores..... 24

Figura 5 Rede de haplótipos gerado no programa Network a partir do agrupamento de sequências em haplótipos 25

Sumário

1	Introdução	11
1.1	Objetivo Geral	15
1.2	Objetivos Específicos	15
2	Revisão da Literatura	16
3	Materiais e Métodos	18
3.1	Origem das amostras	18
3.2	Procedimentos para as análises moleculares	18
3.3	Análises moleculares	19
4	Resultados	21
4.1	Avaliação da presença de NUMTS	21
4.2	Análise de monofilia de ramos e identificação de unidades taxonômicas opracionais (OUT's)	22
4.3	Divergência genética e identificação de *Barcode gap*	23
4.4	Rede de haplótipos para identificação de agrupamento de sequências	24
5	Discussão	26
6	Conclusão	28
	Referências	29
	Apêndices	35

1. Introdução

O gênero *Biomphalaria* abrange aproximadamente 37 espécies (CARVALHO et al, 2008) amplamente distribuídas pela América do Sul, América Central, sul dos Estados Unidos, África, sudoeste da Ásia (Arábia Saudita e Iêmen), além de relatos recentes de introdução no continente Europeu (REY, 2001; LOFTY et al, 2005; POINTIER et al, 2005; MAJOROS et al, 2008). Este gênero constitui um grupo de caramujos que apresenta grande importância epidemiológica, uma vez que algumas espécies são reconhecidamente hospedeiras intermediárias do trematódeo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, agente etiológico da esquistossomose. Além das espécies naturalmente suscetíveis ao parasito, outras três são consideradas hospedeiras potenciais, por serem suscetíveis em condições laboratoriais (CORRÊA; PARAENSE, 1971; TEODORO et al, 2010). Na tabela 1 estão listadas as espécies com ocorrência para o Brasil, incluindo informações sobre a ocorrência das mesmas no Rio Grande do Sul e o seu status de suscetibilidade ao *S. mansoni*.

Tabela 1 - Lista de espécies de *Biomphalaria* com ocorrência no Brasil, incluindo informações sobre a ocorrência da espécie no Rio Grande do Sul e o seu status de suscetibilidade ao *S. mansoni*.

Espécie	**Ocorrência (RS)**	**Suscetibilidade**
B. glabrata (Say, 1818)	Sim	Sim
B. tenagophila tenagophila (d'Orbigny, 1835)	Sim	Sim
B. tenagophila guaibensis (Paraense, 1984)	Sim	Não
B. straminea (Dunker, 1848)	Sim	Sim
B. peregrina (d'Orbigny, 1835)	Sim	Sim*
B. schrammi (Crosse, 1864)	Não	Não
B. kuhniana (Clessin, 1883)	Não	Não
B. intermedia (Paraense &Deslandes, 1962)	Não	Não
B. amazonica (Paraense, 1966)	Não	Sim*
B. oligoza (Paraense, 1975)	Sim	Não
B. occidentalis (Paraense, 1981)	Não	Não
B. cousini (Paraense, 1966)	Não	Sim*

*Espécies suscetíveis em condições laboratoriais. Fonte: Lima et al (1993, 1995); Paraense (1972, 1974, 1975, 1981, 1984, 1988); Paraense; Corrêa (1971); Paraense; Deslandes (1959); Pepe et al (2009); Cunha Neto (1972); Carvalho et al (1998); Teodoro (2010).

Mundialmente, cerca de 700 milhões de pessoas estão em risco de contrair esquistossomose, e aproximadamente 200 milhões estão infectadas (BRUUN;

AAGAARD-HANSEN, 2008). No Brasil, a esquistossomose mansônica infecta aproximadamente seis milhões de pessoas, estando 25 milhões sob o risco de contrair a parasitose (WHO, 2009). O primeiro registro autóctone da doença para o Rio Grande do Sul ocorreu em 1997, estando diretamente relacionado ao primeiro registro de *B. glabrata* para o Estado, na cidade de Esteio (GRAEFF-TEIXEIRA et al, 1999). Após esse registro, mais 11 casos autóctones foram reconhecidos (GRAEFF-TEIXEIRA et al, 2004), e entre 2001 e 2013, mais 95 casos foram registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, englobando nove cidades diferentes (MARTINS et al, 2015).

Dentre as espécies de *Biomphalaria* com occorência no Rio Grande do Sul (Tabela 1), as subespécies de *B. tenagophila* têm sido alvo de estudos pela existência de populações naturalmente resistentes (MARTINS-SOUZA et al, 2003; ROSA et al, 2005; NEGRÃO–CORRÊA et al, 2007). Duas populações apresentam tais características no Estado: uma população de *B. tenagophila tenagophila* da Estação Ecológica do Taim, Santa Vitória do Palmar e a população de *B. tenagophila guaibensis* (SANTOS et al, 1979; BRAGA, 2012). Inclusive, a população de *B. t. tenagophila* do Taim vem sendo utilizada em trabalhos com controle biológico da esquistosomose mansônica (BARBOSA et al, 2006; COELHO et al, 2004, 2008).

A identificação morfológica desses caramujos é baseada principalmente em características presentes no complexo peniano e na bolsa vaginal (Figura 1). Características moleculares agrupam essas duas subspécies junto a *Biomphalaria occidentalis* em um complexo de espécies chamado *B. tenagophila* (SPATZ et al, 1999). A diferença morfológica entre *B. t. tenagophila* e *B. t. guaibensis* está no complexo peniano. *B. t. tenagophila* apresenta bainha do pênis curta ou pouco mais longa do que o prepúcio, enquanto *B. t. guaibensis* apresenta prepúcio duas vezes maior que a bainha do pênis (Figura 1 – 1B e 2B) (PARAENSE, 1975, 1984). Essas subespécies diferenciam de *B. occidentalis* pois apresentam bolsa vaginal (Figura 1 – 1A, 2A e 3A). No entanto, a identificação específica baseada em dados morfológicos dentro do gênero *Biomphalaria* é considerada difícil devido ao tamanho dos moluscos (tamanho médio de 2cm), ao uso de processos inadequados de fixação, à escassez de taxonomistas especialistas e similaridade entre os caracteres diagnósticos, além da alta variabilidade intraespecífica dos caracteres morfológicos

(PARAENSE, 1975; VIDIGAL et al, 1998, 2000a, 2000b; CARVALHO et al, 2008).

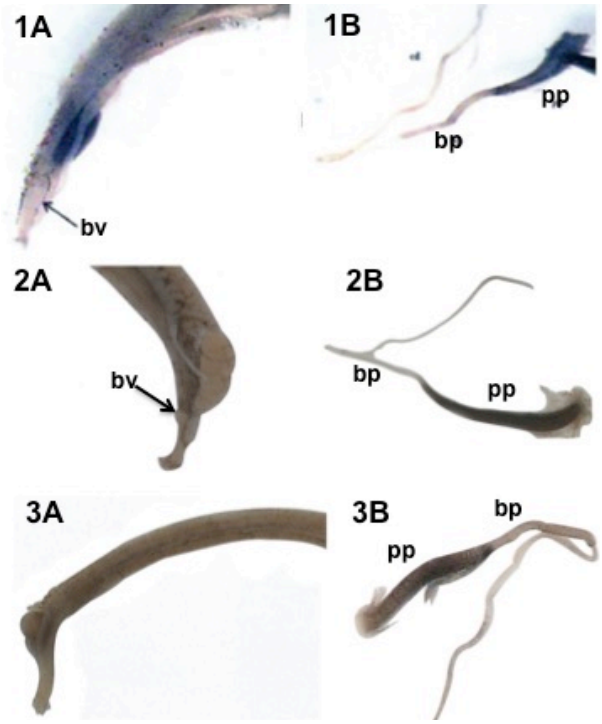


Figura 1 – Parede vaginal e complexo peniano de *B. t. tenagophila* (1), *B. t. guaibensis* (2) e *B. occidentalis* (3). 1A – parede com bolsa vaginal; 1B – complexo peniano; 2A – parede com bolsa vaginal; 2B – complexo peniano; 3A – parede sembolsa vaginal; 3B – complexo peniano. bp: bainha do pênis; pp: prepúcio; bv: bolsa vaginal. Fonte: Carvalho et al, 2014

A utilização de ferramentas moleculares demonstra ser um método efetivo para detecção de novas espécies, delimitação de espécies, identificação de espécies crípticas e de amostras depositadas em coleções científicas, bem como estudos envolvendo espécies invasoras (HEBERT et al, 2003a, 2004, 2013; CHAPPLE; RITCHIE, 2013; MARESCAUX; VAN DONINCK, 2013; MODICA et al, 2013). Analisando o complexo *B. tenagophila*, Tuan et al (2012) demonstraram que *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis* são espécies geneticamente relacionados com baixa divergência genética, e questionam se a morfologia é o método mais eficiente para diferenciação desse complexo.

O uso de *primers* universais, como os que amplificam parte do gene *citocromo oxidase c subunit I* (COI) utilizado pela técnica de *DNA bercode*, tem sido

utilizados com sucesso para a identificação rápida e eficiente de diversos grupos de moluscos (MIKKELSEN et al, 2007; FENG et al, 2011a, 2011b; CHEN et al, 2011; LIU et al, 2011; KULSANTIWONG et al, 2013; PRIÉ; PUILLANDRE, 2013; VAN DER BANK et al, 2013; WEIGAND et al, 2013), incluindo *Biomphalaria* (COLLADO et al, 2011; STANDLEY et al, 2011; TUAN et al, 2012; COLLADO; MENDEZ, 2013)

Tendo em vista a relevância das duas populações resistentes de *Biomphalaria tenagophila* presentes no Rio Grande do Sul, assim como a existência de um complexo de espécies morfologicamente similares e a importância epidemiológica do gênero *Biomphalaria*; neste estudo foram utilizadas metodologias moleculares para auxiliar a identificação taxonômica de espécies do complexo *B. tenagophila* presentes no Rio Grande do Sul.

1.1 Objetivo geral

Analisar a eficiência do marcador molecular COI para auxiliar a identificação taxonômica de indivíduos do complexo *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca: Planorbidae).

1.2. Objetivos específicos

- Testar a eficiência da técnica de *DNA Barcode* na delimitação do complexo de espécies *B. tenagophila*;
- Identificar o valor de *barcode gap* que auxilia na identificação das espécies;
- Testar a técnica de agrupamento de rede de haplótipos para auxiliar na identificação por *DNA barcode* e, consequentemente, à identificação taxonômica.

.

2. Revisão de Literatura

Vários estudos utilizam a técnica de *DNA Barcode* como ferramenta para identificação de diversos moluscos. Dentre os estudos encontrados, oito tratam sobre a identificação de espécies de gastrópodes utilizando *DNA Barcode,* sendo que quatro abordam o gênero *Biomphalaria.* Além destes, mais sete estudos foram encontrados sobre *Biomphalaria,* porém utilizando outra técnica molecular para identificação de espécies. Ademais, uma revisão de literatura sobre estudos moleculares abrangendo moluscos brasileiros foi encontrada. Os seguintes artigos são ressaltados:

Em Kulsantiwong et al (2013), a técnica de *DNA Barcode* foi testada para identificação de espécies da Família Bithnyiidae. Caramujos dessa família são hospedeiros intermediários do agente causador da opistorquíase, doença com ocorrência no sudeste asiático. A partir da análise de 217 espécimes, a técnica mostrou-se efetiva na identificação de 9 das 10 espécies utilizadas. Os resultados do trabalho indicaram que a técnica é efetiva na identificação de espécies dessa família.

No estudo de Kane et al (2008), os caramujos estudados pertencem ao gênero *Bulinus* (Família Planorbidae), que são hospedeiros intermediários de espécies de *Schistosoma*. Neste trabalho, o objetivo foi desenvolver um método simples e de baixo custo para identificação do gênero através de técnicas moleculares. A utilização do gene mitocondrial COI, como marcador molecular, se mostrou mais eficiente do que a utilização do gene ITS2. O estudo conclui que o método de *DNA Barcode* é o mais recomendado para caracterização de populações e espécies do gênero.

Collado et al (2011) sequenciaram o gene COI de 17 populações de *Biomphalaria* da Cordilheira dos Andes, pois nesta região a filogenia desse gênero é desconhecida. Os resultados gerados demonstraram que essas populações formam um grupo monofilético irmão da espécie *B. peregrina*. Dentro desse clado, foram

.

recuperadas quatro linhagens condizentes as suas distribuições geográficas. Outros dois grupos monofiléticos formados, restritos de dois sistemas aquáticos da área, são bons candidatos a novas espécies. Além disso, o padrão de diversificação desses moluscos sugere que eventos de vicariância predominaram sobre o fenômeno de dispersão.

Uma população de *Biomphalaria* foi encontrada no norte da Patagônia. A partir de caracteres morfológicos e moleculares, Standley et al (2011) identificaram essa população como *B. peregrina*. Os autores utilizaram os marcadores COI, 16S e ITS. Esse foi o primeiro registro da espécie na área, abrangendo assim sua área de distribuição. Os autores destacam a falta de dados moleculares disponíveis em bancos de livre acesso para consulta.

Tuan et al (2012) utilizaram sequências de COI e do gene ribossomal 16S para estimar as divergências de cada espécie do complexo *B. tenagophila*. Além disso, os autores procuraram testar o potencial dos marcadores moleculares COI e 16S para identificação de espécies próximas. Os resultados gerados demonstraram que *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis* estão mais próximas geneticamente do que *B. t. guaibensis* e *B. t. tenagophila*. Devido à baixa divergência genética entre espécies, encontrada com o COI e o 16S, os autores concluem que essa ferramenta molecular pode ser utilizada para diferenciação de espécies do complexo *tenagophila*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Origem das amostras

Os espécimes utilizados nesse estudo foram adquiridos através de coletas e doação. As coletas foram realizadas nos municípios de Pelotas, Santa Vitória do Palmar (Estação Ecológica do Taim), Eldorado do Sul e Esteio (Figura 2), por dois coletores utilizando conchas de captura de metal, sendo que em cada local, a concha foi passada por dez vezes, conforme recomendado pelo Ministério da Saúde (2007). Além das amostras obtidas através de coletas, foram utilizados espécimes da do Rio da Prata, Argentina, doados pelo Laboratório de Parasitologia da UNICAMP. Todos os indivíduos foram acondicionados em laboratório na UFPel.

Figura 2 - Pontos de coleta dos espécimes utilizados neste trabalho. Fonte: Google Maps

3.2 Procedimentos para as análises moleculares

Os indivíduos previamente identificados como *Biomphalaria*, provenientes das localidades acima mencionadas, foram mortos utilizando choque térmico conforme recomendado pelo Ministério da Saúde (2007). Um fragmento do pé de cada caramujo foi coletado e fixado em álcool 90% para identificação molecular. O restante do corpo do animal foi fixado em Raillet-Henry (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). As conchas foram fotografadas e mantidas no laboratório.

Para extração de DNA foi utilizado kit DNeasyBlood&Tissue® (Qiagen). Após a extração, o gene citocromo oxidase I (COI) foi amplificado através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando os primers HCO2198 e LCO 1490 (FOLMER et al, 1994) e temperatura de anelamento de 53ºC. Amostras amplificadas foram purificadas utilizando ExoSAPIT® (USB) e enviadas para sequenciamento na empresa MACROGEN (www.macrogen.com).

3.3 Análises moleculares

As sequências foram editadas utilizando o programa PreGap e Gap4 do pacote de programas StagenPackage (STADEN, 1996).

Nas análises, foram utilizadas, além das sequências obtidas neste estudo, outras disponíveis em banco de dados. Para isso, foi realizada busca *in silico* de sequências do gene COI disponíveis no *Barcode of Life Database* (BOLD - http://www.boldsystems.org/) de espécies de *Biomphalaria* pertencentes ao complexo *B. tenagophila*. O BOLD é um banco de dados para sequências de COI utilizadas nas análises de *DNA barcode*. O alinhamento de todas as sequências foi realizado na ferramenta ClustalW inserida no programa MEGA6 (TAMURA et al, 2013).

3.3.1 Avaliação de presença de NUMTS

Para evitar utilizar nas análises cópias de genes mitocondriais presentes no genoma nuclear (NUMTS), ou seja, pseudogenes, todas as sequências foram inspecionadas à procura de *stop codons* no programa MEGA6. Em geral, NUMTS tendem a sofrer seleção neutra quando são copiados no genoma nuclear. Assim, foi realizado teste Z de seleção utilizando o método de Nei-Gojobori (NEI; GOJOBORI, 1986) no MEGA6 para avaliar a probabilidade de rejeição da hipótese nula de neutralidade (dN=dS) em favor da hipótese alternativa purificadora (dN<dS); onde: dN = número de substituições não sinônimas em sítios não sinônimos e dS = número de substituições sinônimas em sítios sinônimos.

3.3.2 Análise de monofilia de ramos e identificação de unidades taxonômicas operacionais (OUT´s)

A análise de identificação de OTU´s foi realizada no programa MEGA6 por meio do método de reconstrução filogenética Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987),

usando o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980). A sequência do planorbideo *Gyraulus chinensis,* disponível no BOLD, foi utilizada como grupo externo*,* pois essa sequência já foi utilizada em trabalhos anteriores (ex. CAMPBELL et al, 2000). Os valores de confidência para cada clado foram calculados através do teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 replicações. Todos os parâmetros utilizados nas análises foram seguidos conforme recomendado pela técnica de *DNA Barcode.*

3.3.3 Divergência genética e identificação de *Barcode gap*

As divergências genéticas intraespecíficas e interespecíficas entre as sequências foram calculadas por meio do modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros no programa MEGA6. Após, esses dados foram plotados em gráfico no Excel para detectar a presença ou ausência de lacuna (*Barcode gap*) entre os valores de divergência intra e interespecíficos. Além disso, o método *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) (PUILLANDRE et al, 2012) também foi aplicado com a mesma finalidade. A identificação de *barcode gap* significa que nos dados analisados existem diferenças estatísticas reais entre a divergência genética de indivíduos da mesma espécie e entre indivíduos de espécies diferentes. Desta forma, a presença de um *barcode gap* auxilia na identificação de indivíduos cuja distância genética esteja abaixo deste valor de *gap*, podendo ser considerados indivíduos de mesma espécie.

3.3.4 Rede de haplótipos para identificação de agrupamento de sequências

Todas as sequências foram agrupadas em haplótipos no programa DnaSP (LIBRADO; ROZAS, 2009). Após, esses dados foram utilizados para construção de uma rede de haplótipos usando o programa Network v4.6 (BANDELT et al, 1999). Com isto, baseado em uma análise de haplótipos, analisa-se o padrão de agrupamento haplotípico entre as sequências.

4. Resultados

O total de sequências geradas por este trabalho e as encontradas através de busca em banco de dados, foi de 138 sequências, sendo 34 geradas neste estudo e 104 adquiridas *in silico* no BOLD (Tabela 2). Após alinhamento e edição, a matriz de dados apresentou 547pb e 52 sítios polimórficos. A listagem das sequências encontradas no BOLD com seu código e localidade está disponível no apêndice A.

Tabela 2 – Número de amostras analisadas, geradas neste estudo e adquiridas *in silico*, indicando também a localidade de onde são provenientes.

Amostras	**Nº de sequências**	**Modo de obtenção**
Pelotas	10	Coleta
Taim	9	Coleta
Esteio	10	Coleta
Eldorado do Sul	3	Coleta
Argentina	2	UNICAMP
B. t. tenagophila	81*	BOLD
B. t. guaibensis	2**	BOLD
B. occidentalis	21*	BOLD

Nota: Sequências obtidas de indivíduos provenientes do Estado de São Paulo (*) e Rio Grande do Sul (**). Ver apêndice A.

4.1 Avaliação de presença de NUMTS

Nenhuma sequência apresentou *stop codons* em qualquer das três matrizes de leitura possíveis. No teste Z de seleção, todas sequências rejeitaram a hipótese nula de neutralidade a favor da hipótese alternativa purificadora, demonstrando que essas amostras não estão sob seleção neutra. Assim, comprova-se que essas sequências são mitocondriais e não cópias nucleares, podendo ser utilizadas nas demais análises.

4.2 Análise de monofilia de ramos e identificação de unidades taxonômicas operacionais (OUT´s)

A análise de agrupamento monofilético apresentando todas as sequências analisadas gerada neste estudo apresenta-se no apêndice B. Para melhor entendimento, este cladrograma está resumido na figura 3.

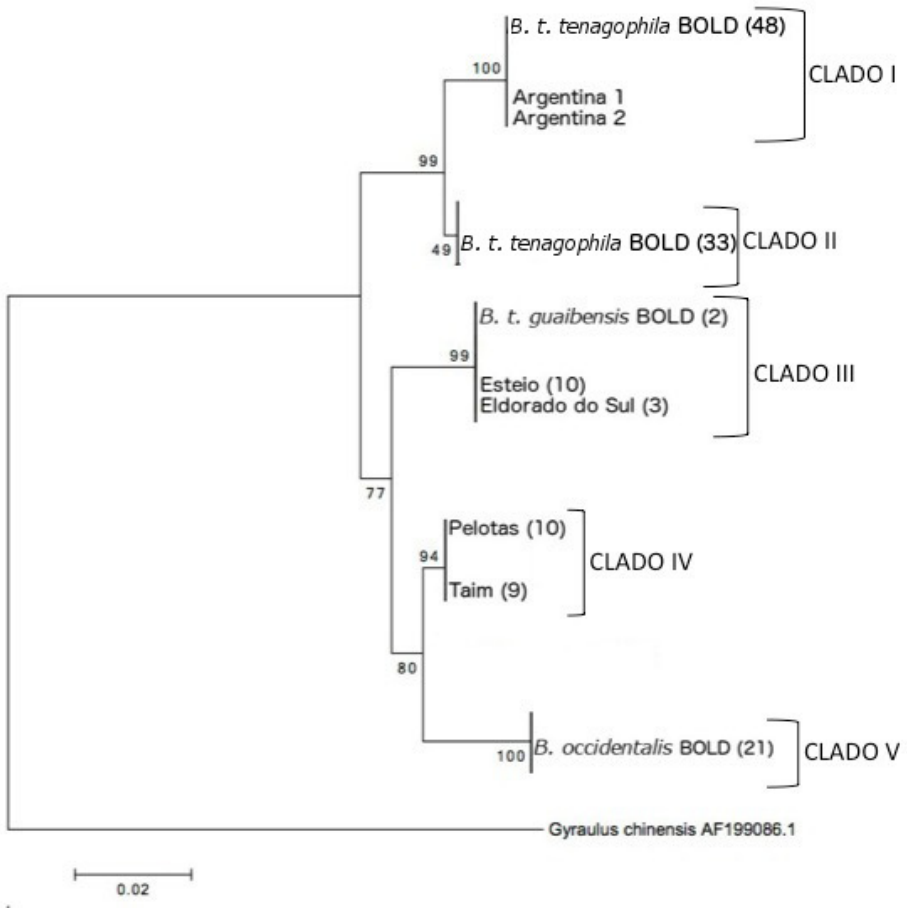


Figura 3 – Agrupamento de sequências baseado no método de construção NJ, modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (K2P), 1000 réplicas de bootstrap. Clados: (I) *B. t. tenagophila*, Argentina; (II) *B. t. tenagophila*; (III) *B. t. guaibensis*, Esteio, Eldorado do Sul; (IV) Pelotas, Taim; (V) *B. occidentalis*.

Como pode ser visto na figura 3, houve a formação de cinco clados monofiléticos. As sequências de *B. t. tenagophila* do BOLD formaram dois clados (clado I e clado II) com 100% e 49% de valor de confidência, respectivamente. As duas sequências de Argentina agruparam junto ao clado I de *B. t. tenagophila*. O clado III agrupou as sequências de Esteio e Eldorado do Sul com as de *B. t. guaibensis* do BOLD. Já as sequências de Pelotas e Taim agruparam no clado IV

com 94% de valor de *bootstrap*. E as sequências de *B. occidentalis* do BOLD agruparam no clado V com 100% de confidência.

4.3 Divergência genética e identificação de *Barcode gap*

Os valores de divergencia genética intraespecíficos e interespecíficos gerados a partir da comparação entre as sequências agrupadas, conforme a monofilia de ramos da reconstrução filogenética, pode ser visto na tabela 3.

Tabela 3: Valores de divergência genética calculados a partir do modelo evolutivo K2P com 1000 réplicas de *bootstrap*. Os valores estão em ordem crescente.

Divergência genética	Clados*	Valores
Intraespecífica	Clado I	0%
	Clado IV	0%
	Clado V	0%
	Clado III	0,1%
	Clado II	0,8%
	Clado I x Clado II	2,0%
Interespecífica	Clado IV x Clado V	2,3%
	Clado III x Clado IV	2,7%
	Clado II x Clado IV	3,6%
	Clado III x Clado V	3,7%
	Clado I x Clado IV	4,2%
	Clado II x Clado III	4,4%
	Clado I x Clado III	4,6%
	Clado II x Clado V	5,0%
	Clado I x Clado V	5,8%

*Clados: (I) *B. t. tenagophila*, Argentina; (II) *B. t. tenagophila*; (III) *B. t. guaibensis*, Esteio, Eldorado do Sul; (IV) Pelotas, Taim; (V) *B. occidentalis*.

Os valores intraesepecíficos variaram de 0% a 0,8%, e foram menores que os interespecíficos, que variaram de 2,0% a 5,8%. Em relação à divergência intraespecífica, os clados I, IV e V apresentaram 0,0% de divergência e os clados III e II apresentaram, respectivamente, 0,1% e 0,8%.

Em relação aos valores interespecíficos, o menor valor foi 2,0%, e não houve sobreposição com os valores máximos calculados nas análises intraespecíficas.

Quando analisamos os dados plotados em um gráfico (figura 4), podemos ver que há formação de uma lacuna (*gap*) entre os valores de 0,8% e 1,6%.

Os valores de gap testados no programa ABGD foram de 1,2% e 3%. O valor de 1,2% é o valor intermediário do intervalo de gap aqui gerado; e o valor de 3% é o valor de barcode gap proposto pela técnica de *DNA Barcode* (HEBERT et al, 2003b). Como pode ser visto no apêndice D e E, com valor de gap de 1,2% foram sugeridos cinco agrupamentos diferentes de potenciais espécies, e com o valor de 3% foram gerados quatro agrupamentos, sendo sugerido que as sequências de *B. t. tenagophila* provenientes de São Paulo pertencem à mesma espécie em potencial.

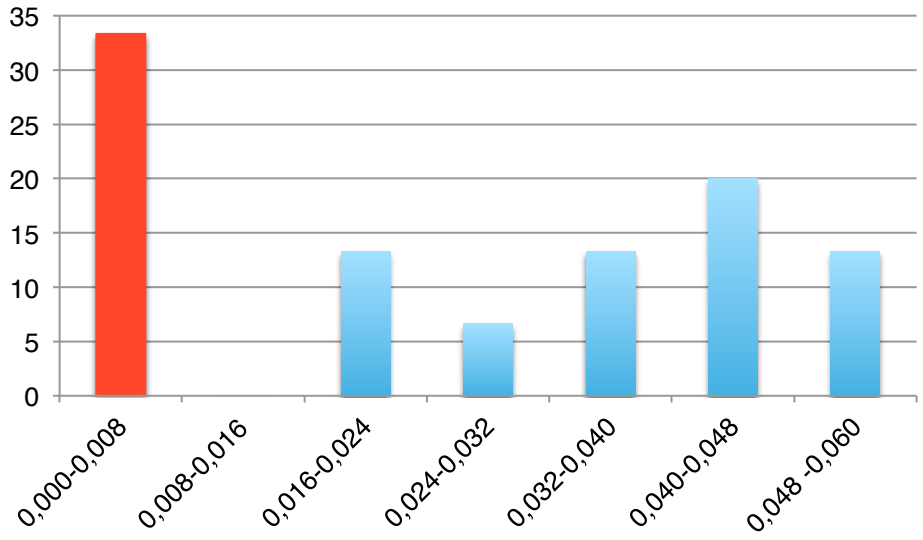


Figura 4 – Frequência dos valores de divergência genética intra e interespecíficos distribuídas em intervalo de valores. Eixo *x*: Valores de divergência genética agrupados em intervalos. Vermelho: divergência intraespecífica. Azul: divergência interespecífica. Eixo y: Frequência (%) das sequências dos valores na análise.

4.4 Rede de haplótipos para identificação de agrupamento de sequências

No apêndice C estão listadas os haplótipos formados no programa DnaSP e utilizados na rede de haplótipos. Na rede de haplótipos gerada (figura 5) observamos que as sequências de *B. t. tenagophila* (clado I e II) do BOLD, incluindo as sequências da Argentina, foram agrupadas. Esses dois clados se distanciaram dos demais (*B.* occidentalis - clado V; *B. t. guaibensis*, Eldorado do Sul, Esteio - clado III; Pelotas e Taim - clado IV) por 13 passos mutacionais.

Entre os agrupamentos de *B. t. tenagophila*, há um haplótipo que é compartilhado por 50 indivíduos. Próximo a esse, há diversos haplótipos menos comuns com poucos passos mutacionais de distância. De qualquer maneira, esses haplótipos estão bem separados dos haplótipos das demais espécies analisadas.

As sequências de *B. occidentalis* apresentaram um haplótipo mais comum e dois haplótipos menos frequentes e muito próximos. As sequências do clado III apresentaram um haplótipo mais comum e apenas um indivíduo agrupou fora desse grupo. Os indivíduos de Taim e Pelotas agruparam em um haplótipo único.

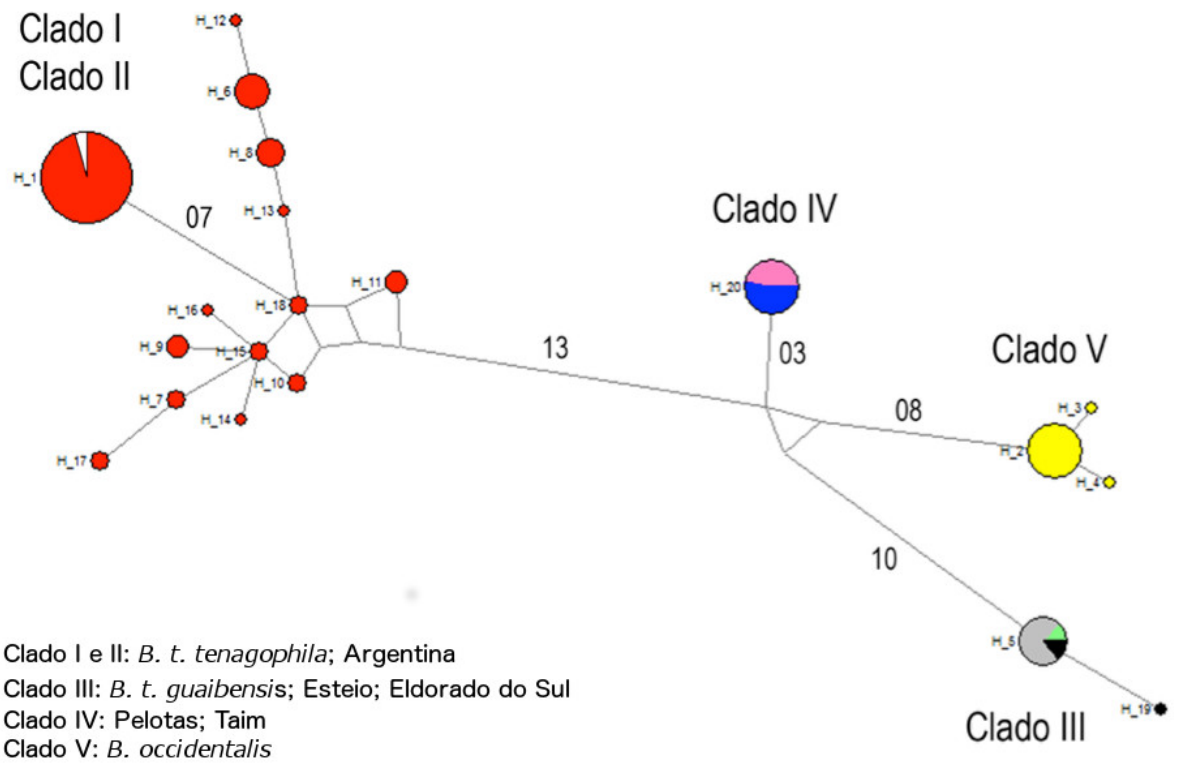


Figura 5: Rede de haplótipos gerado no programa Network a partir do agrupamento de sequências em haplótipos realizado no programa DNAsp. Vermelho: *B. tenagophila* provenientes de São Paulo (ver apêndice C para identificar as localidades em São Paulo). Branco: sequências de indivíduos recebidos da UNICAMP provenientes da Argentina. Rosa: sequências de indivíduos coletados em Taim. Azul: sequências de indivíduos coletados em Pelotas. Amarelo: *B. occidentalis* provenientes de São Paulo (ver apêndice C para identificar as localidades em São Paulo). Cinza: sequências de indivíduos coletados em Esteio. Preto: sequências de indivíduos coletados em Eldorado do Sul. Verde: *B. tenagophila guaibensis* provenientes do Rio Grande do Sul (ver apêndice C para identificar as localidades no RS). Os números representam os passos mutacionais existentes entre os clados.

5. Discussão

Uma premissa da técnica de *DNA Barcode* é que a divergência genética intraespecífica deve ser sempre menor do que a divergência interespecífica e esta diferença deve ser tão clara que gera uma lacuna (*Barcode gap*) entre esses valores (BIRKY et al, 2010; HEBERT et al, 2003b; PUILLANDRE et al, 2012). Smith et al (2005) e Hebert et al (2003b) sugerem que o valor limite entre a divergência intra e interespecífica pode ser padronizado em 3%. Após plotados em gráfico (Figura 4), os dados de divergência genética desse trabalho apresentaram uma lacuna nos valores de 0,8% a 1,6%. Além disso, três comparações entre grupos apresentaram menos do que 3% de divergência: clado I e clado II, clado IV e clado V e clado III e clado IV (Tabela 3). Duas hipóteses podem explicar esse padrão de distribuição dos valores. Primeiramente, diversos trabalhos demonstram que o valor limite entre a divergência intra e interespecífica não pode ser generalizado para todos os organismos (FERGUSSON, 2002; BICHAIN et al, 2007; GOMEZ et al, 2007; MEIER et al, 2008). Segundo, é provável que esses clados sejam de mesma espécie ou de espécies muito próximas. Ao analisar cada clado separadamente, alguns aspectos podem ser elucidados:

(1) As sequências de *B. t. tenagophila* do BOLD, junto com as sequências de Argentina, agruparam em dois clados monofiléticos (Figura 3). O valor de divergência genética entre esses clados é muito baixo: 2% (Tabela 3). A análise de ABGD mostra que esses dos clados podem ser separados (com o valor de 1,2% de barcode gap) ou agrupados (com o valor de 3%), dependendo do valor de barocde gap utilizado. Quando é analisado o posicionamento desses clados na rede de haplótipos, vê-se claramente uma proximidade muito grande entre eles. Tudo indica que o clado I e o clado II são compostos por indivíduos da espécie *B. t. tenagophila.*

(2) Já as sequências de *B. t. guaibensis* do BOLD agruparam com maior proximidade com as sequências de *B. occidentalis* do que de *B. t. tenagophila* (Figura 3). Os valores de divergência genética também refletem essa proximidade. As comparações entre o clado III e o clado I+II geraram valores de 4,4% e 4,6%, respectivamente. Enquanto o valor da comparação entre o clado III e o clado IV foi

de 3,7% (Tabela 3). O posicionamento desse clados na rede de haplótipos corrobora essa relação (Figura 5). O haplótipo de *B. t. guaibensis* está mais próximo de *B. occidentalis* (com 18 passos mutacionais) do que de *B. t. tenagophila* (com 23 passos mutacionais). As sequências de Esteio e Eldorado agruparam junto a *B. t. guaibensis* no clado III e apresentam o mesmo haplótipo dessa subespécie. Assim, presumimos que esses indivíduos são *B. t. guaibensis*.

(3) No cladograma (Figura 3) as sequências de Pelotas e Taim agruparam sozinhas no clado IV mais próximo ao clado de *B. occidentalis* do que *B. t. guaibensis*. A divergência genética entre o clado IV e o clado V foi de 2,3% e entre o clado IV e o clado III foi de 2,7% (Tabela 3). A diferença entre esses valores de divergência genética é muito baixa, porém o agrupamento na árvore (Figura 3) e o posicionamento na rede de haplótipos (Figura 5) demonstram que esses indivíduos são próximos a *B. occidentalis.* Porém, segundo informação verbal[1], os indivíduos de Pelotas e Taim aqui analisados apresentam bolsa vaginal e foram identificados morfologicamente como *B. t. guaibensis.* Assim, são necessários mais estudos para investigar essas duas populações e compreender a sua relação com as espécies do complexo *B. tenagophila*.

Os padrões da reconstrução filogenética e dos valores de distância genética aqui recuperados para as espécies do complexo *B. tenagophila* são semelhantes aos encontrados em Tuan et al (2012). É importante ressaltar que a rede de haplótipos aqui gerada corrobora com a relações encontradas utilizando outros métodos. Devido a isso, esse método demonstra atribuir maior credibilidade à identificação pelo método de *DNA Barcode*.

[1] Informação fornecida por Demetrius S. Martins, que realizou a identificação morfológica dos espécimes, em setembro de 2015.

6. Conclusão

A técnica de *DNA Barcode* é eficiente na delimitação de espécies do complexo *B. tenagophila*, pois as relações encontradas aqui são as mesmas encontradas em trabalhos anteriores.

O valor de *barcode gap* encontrado neste estudo não é ideal, pois separa os clados (I e II) de *B. t. tenagophila*, que pertencem a mesma espécie.

A técnica de rede de haplótipos auxiliou na identificação por *DNA Barcode*, pois ajudou a elucidar a relação do clado I e II, que não pôde ser esclarecida baseada apenas na análise de monofilia de ramos e divergência genética.

É possível que as populações de Taim e Pelotas sejam de uma espécie diferente de *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis*. Já que agrupam na análise molecular com *B. occidentalis*, mas morfologicamente são identificadas como *B. t. guaibensis*. Para entender melhor a relação dos indivíduos de Pelotas e Taim com o complexo *B. tenagohila*, é necessário aumentar o número de coletas para obtermos toda a diversidade dessas populações.

Além disso, ressalta-se a importância de revisar a análise morfológica do complexo *B. tenagophila*. Procurando elucidar se a presença e ausência da bolsa vaginal é um caracter diagnóstico, visto que a análise molecular está agrupando indivíduos com e sem bolsa vaginal.

Referências

BANDELT, H.J.; FOSTER, P.; RÖHL, A. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies**. Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n.1, p. 37-48, 1999.

BARBOSA, L. et al. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantion of APO *Biomphalaria tenagophila*. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 209-212, 2006.

BICHAIN, J. M. et al. Delimiting species in the genus *Bythinella* (Mollsuca: Caenogastropoda: Rissooidea): molecular and morphometric aproasses. **Malacologia**, n. 49, p. 291-311, 2007.

BIRKY, C. W. et al. Using population genetic theory and DNA sequences for species detection and identification in asexual organisms. **Plos One,** v. 5, n.5, 2010.

BRAGA, Lidiane Bento. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* (MOLUSCA: PLANORBIDAE): avaliação da suscetibilidade a *Schistosoma mansoni* e do *status* de subespécie. 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2012.

BRUUN, B.; AAGAARD-HANSEN, J. The social context of schistosomiasis and its control: introduction and annotated bibliography. Geneva: **World Health Organization**, 2008.

CAMPBELL, G. et al. Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastrop, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for Schistosoma mansoni. **Proceedings of the Royal Society of London B-Biological Sciences**, Londres, v. 267, n. 1460, p. 2351-2358, 2000.

CARVALHO, O. S. et al. First report of *Biompharia glabrata* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 93, n. 1, p. 39-40, 1989.

CARVALHO O. S. et al (ed.). ***Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1123 p., 2008.

CARVALHO, O. S. et al**. Moluscos brasileiros de importância médica** (2a ed.). Belo Horizonte: Fiocruz/Centro de Pesquisas René Rachou, 92 p., 2014.

CHAPPLE, D. G.; RITCHIE, P. A. A restropective approach to testing the DNA barcoding method. **Plos One**, v. 8*,* n. 11, 2013.

CHEN, J. et al. How DNA barcodes complement taxonomy and explore species diversity: The case study of a poorly understood marine fauna. **Plos One**, v. 6, n.6, 2011.

COELHO, P. M. Z. et al. *Biomphalaria tenagophila/Schistosoma mansoni* interaction: Current Knowledge and Perspectives for its Application on the Control of Schistosomiasis mansoni**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 109-111, 2004.

COELHO, P. M. Z. et al. Trasmission control of schistosomiasis mansoni by introduction of resistant strain of *Biomphalaria tenagophila* in areas where transmission is maintained by the species. **Acta Tropica**, v. 108, p. 245-248, 2008.

COLLADO, G. A.; MÉNDEZ, M. A. Microgeographic differentiation among closely related species of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) from the Andean Altiplano. **Zoological Journal of Linnean Society**, v. 169, n. 3, p. 640-652, 2013.

COLLADO, G. A. et al. Monophyly, candidate species and vicariance in *Biomphalaria* snails (Mollusca: Planorbidae) from the Southern Andean Altiplano. **Zoologica Scripta**, v. 40, n.6, p. 613-622, 2011.

CORRÊA, L. R; PARAENSE, W. L. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni.* **Revista do Instituto de Medicinal Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 13, n. 6, p. 387-390, 1971.

CUNHA NETO, A. G. *Biomphalaria straminea* em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 151, 1972.

FERGUSSON, J. W. H. On the use of genetic divergence for identifying species. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 75, n. 4 p. 509-516, 2002.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, n. 4, p. 783-791, 1985

FENG, Y. et al. COI-based DNA barcoding of Arcoida species (Bivalvia: Pteriomorphia) along the coast of China. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 3, p. 435-441, 2011a.

FENG, Y. et al. DNA barcoding and phylogenetic analysis of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial COI and 16S rRNA genes. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n.1, p. 291-299, 2011b.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochonfrial cytochrome c oxidades subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p, 294-299, 1994.

GRAEFF-TEIXEIRA et al. Identification of transmission focus of *Schistossoma mansoni* in the Southernmost Brazilian State, Rio Grande do Sul. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 9-10, 1999.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. et al. The initial epidemiological studies in the Low Endemicity Schistosomiais area in Esteio, Rio Grande do Sul, the Southernmost Brazilian State, 1997 to 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. Suppl 1,. 73-78, 2004.

GÓMEZ, A. et al. Mating trial validate the use of DNA barcoding to reveal cryptic speciation of a marine bryozoan taxon. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, Londes, v. 274, n. 1607, p. 199-207, 2007.

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

HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S., DE WAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase sbunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London B- Biological Sciences**, Londres, v. 270, n. Suppl 1, 2003b.

HEBERT, P. D. N. et al. Ten species in one: DNA Barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator.* **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004.

HEBERT, P. D. N. et al. A DNA 'Barcode Blitz'. Rapid Digitization and Sequencing of a Natural History Collection. **Plos One**, v. 8, n. 7, 2013.

KIMURA, M. Simple method for estimating evolutionary rates of bases substituitions trought comparative studies nucleotide sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KANE, R. A. et al. Molecular characterization of freshwater snails in the genus *Bulinus*: a role for barcodes? **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 1, p. 15, 2008.

KULSANTIWONG, J. et al. DNA Barcode identification of freshwater snails in the family Bithyniidae from Thailand. **Plos One**, v.8, n. 11, 2013.

LIBRADO, P; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for choprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 12, p. 1451-1452, 2009.

LIMA, L. C. et al. *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 2, p. 289-292, 1993.

LIMA, L. C. Família Planorbidae. In: BARBOSA, F. S. (Org.). **Tópicos em malacologica médica**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 90-112, 1995.

LIU, J. et al. Identifying the true oysters (Bivalvia: Ostreidae) with mitochondrial phylogeny and distance-based DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 5, p. 820-830, 2011.

LOTFY, W.M.; DE JONG, R.J.; ABDEL-KADER, A.; LOKER, E.S.A molecular survey of *Biomphalaria* in Egypt. Is *B. glabrata* present? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n.1, p. 131-139, 2005.

MAJOROS, G. et al. Establishment of *Biomphalaria tenagophila* snails in Europe. **Emerging Infectious Diseases,** v. 14, n. 11, p. 1812-1814, 2008.

MARESCAUX, J.; VAN DONINCK, K. Using DNA barcoding to differentiate invasive *Dreissena* species (Mollusca, Bivalvia). **ZooKeys**, n. 365, p. 235-244, 2013.

MARTINS, D. S. et al. Schistsomiasis in Southern Brazil 17 years after the confirmation of the first autochtonous case. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 354-357, 2015.

MARTINS-SOUZA, R. L. et al. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* but does not alter the natural resistance of the Taim strain. **Parasitology Research**, v. 91, n. 6, p. 500-507, 2003.

MEIER, R. et al. The use of mean instead of smallest interespecific distances exaggerates the size of the “barcoding gap”and leads to misidentification. **Systematic Biology**, v. 57, n. 5, p. 809-813, 2008.

MIKKELSEN, N. T. et al. Local scale DNA barcoding of bivalves (Mollusca): a case study. **Zoologica Scripta,** v. 36, n.5, p. 455-463, 2007.

Ministério da Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica**: diretrizes técnicas: Programa Vigilância e controle de Esquistossomose (PCE) (2ª ed.). Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

MODICA, M. V. et al. DNA-Barcoding of sympatric species of ectoparasitic gastropods of the genus *Cerithiopsis* (Mollusca: Gastropoda: Cerithiopsidae) from Croatia. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom***,* v. 93, n. 4, p. 1059-1065, 2013.

NEGRÃO-CORRÊA, D. et al. Molluscan response to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma* interaction, **International Scientific Journal**, v. 4., p. 101-111, 2007.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple Metidos for Estimating the Numbers of Synonymous and NonSynonymous Nucleotide Substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 3, n. 5, p, 418-426, 1986.

PARAENSE, W. L.; DESLANDES, N. The renal ridge as a reliable character for separating *Taphius glabratus* from *Taphius tenagophilus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, n. 4, p. 456-472, 1959.

PARAENSE, W. L. Fauna planorbídica do Brasil. In: LACAZ, C. S. et al (eds.). **Introdução a geografia médica do Brasil**. São Paulo: Edgard Blucher & Editora Universidade de São Paulo, p. 213-239, 1972.

PARAENSE, W. L. *Biomphalaria oligoza* n. n. for *Tropicorbis philippianus* (Dunker) sensu Lucena. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 34, p. 379-386, 1974.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 105-111, 1975.

PARAENSE, W. L. *Biomphalaria occidentalis* sp. n. from South America (Mollusca Bassommatophora Pulmonata). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 76, n. 2, p. 199-211, 1981.

PARAENSE, W. L. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* ssp. n. from Southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae) I. Morphology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 4, p. 465-469, 1984.

PARAENSE, W. L. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 83, n. 1, p. 1-12, 1988.

PEPE, M. S. et al. *Biomphalaria* molluscs (Gastropoda: Planorbidae) in Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 5, p. 783-786, 2009.

POINTIER, J.P.; JARNE, D. P. Biological invasions: the case of planorbid snails. **Journal of Helminthology**, v. 79, n. 03, p. 249-256, 2005.

PRIÉ, V.; PUILLANDRE, N. Molecular phylogeny, taxonomy, and distribution of French *Unio* species (Bivalvia, Unionidae). **Hydrobiologia,** v. 735, n. 1, p. 95-110, 2014.

PUILLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 1864–1877, 2012.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África** (3ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA., 2001.

ROSA, F. M. et al. *Biomphalaria tenagophila:* dominant character of the resistance to *Schistosoma mansoni* and descendants of cross-breeding between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville, SC) strains**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 19-23, 2005.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new reconstructing phylogenetics trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n.4, p. 406-425, 1987.

SANTOS, M. B. L. et al. Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* de híbridos de *Biomphalaria tenagophila* do Taim, RS, Cabo Frio, RJ e Belo Horizonte, MG. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 21, p. 281-286, 1979.

SMITH, M. A. et al. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madasgacar. **Philosophical Transactions**

of the Royal Society of London B: Biological Sciences, v. 360, n. 1462 p. 1825-1834, 2005.

SPATZ, L. et al. Study of *Biomphalaria tenagophila tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA intergenic spacer regions. **Journal of Molluscan Studies**, v. 65, n. 2, p. 143-149, 1999.

STADEN, R. The Staden Sequence Analysis Package. **Molecular Biotechnology,** v. 5, n. 3, p. 233-241, 1996.

STANDLEY, C. J. et al. Identification and characterization of *Biomphalaria peregrine* (Orbignyi, 1835) from Agua Escondida in northern Patagonia, Argentina. **Journal of Natural Histoty**, v. 45, n. 5-6, p. 347-356, 2011.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TEODORO, T. M. et al. Occurence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyelminths: Trematoda). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, n. 1, p. 144-151, 2010.

VAN DER BANK, H. et al. Revisiting species delimitation within the genus *Oxystele*using DNA barcoding approach. **ZooKeys,** n. 365, p. 337-354, 2013

VIDIGAL, T. H. D. A. et al. Genetic variability and identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni.* **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 103-110, 1998.

VIDIGAL, T. H. D. A. et al. Further estudies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, p. 57-66, 2000a.

VIDIGAL, T. H. D. A. et al. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. **Parasitology,** v. 121, n. 6, p. 611-620, 2000b.

WEIGAND, A. M. et al. Evolution of microgastropods (Ellobioidea, Carychiidae): integrating taxonomic, phylogenetic and evolutionary hypotheses. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 18, 2013.

World Health Organization. Elimination of schistosomiasis in low transmission areas. Geneva: **World Health Organization**; 2009.

Apêndices

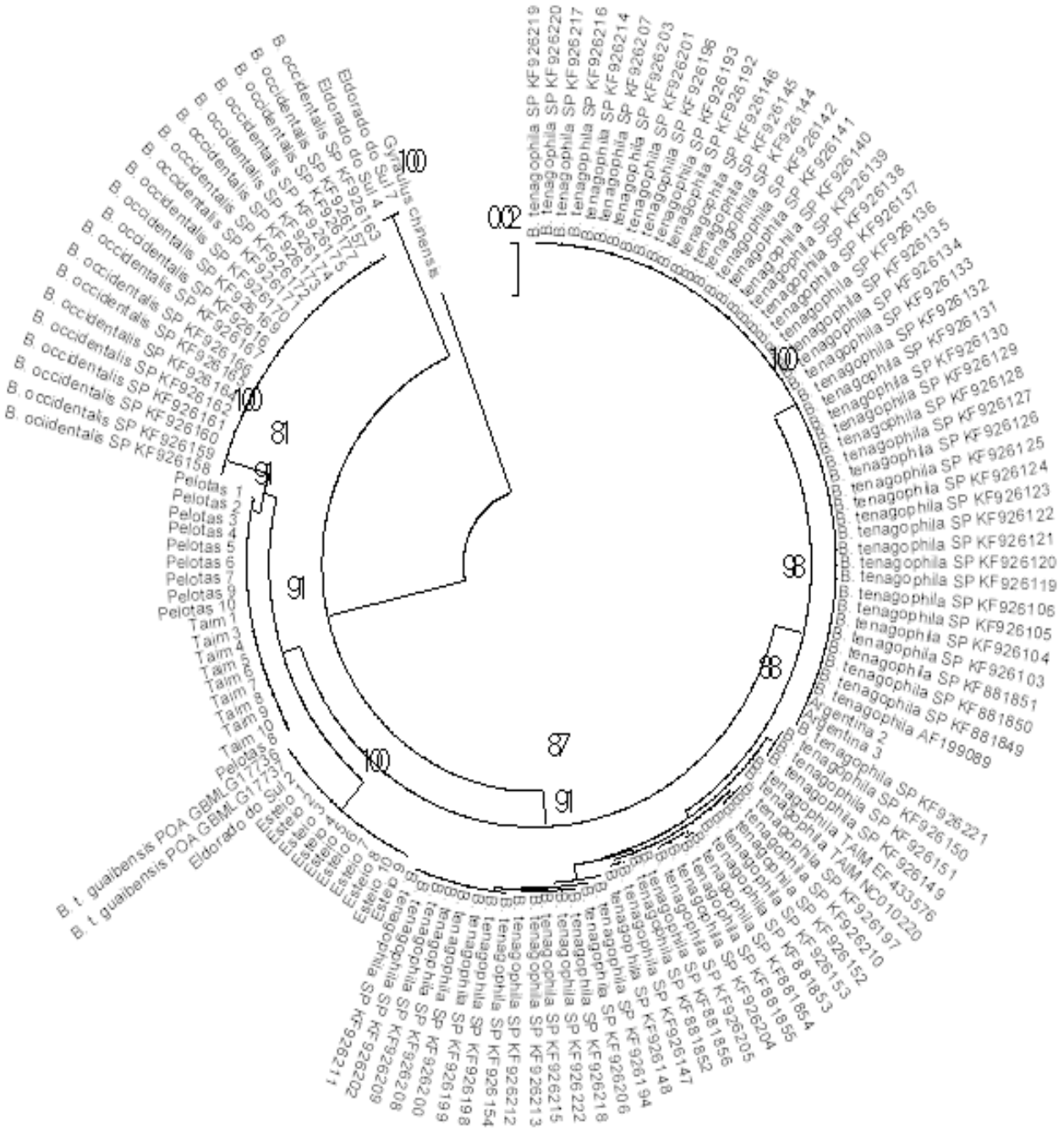
Apêndice A – Sequências utilizadas neste trabalho obtidas no sistema BOLD

Espécie	Localidade	Código BOLD
B. t. tenagophila	Brasil	BMLG0225-06
B. t. tenagophila	Aparecida - SP	GBMLG17750-14
B. t. tenagophila	Biritiba Mirim - SP	GBMLG17759-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17763-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17764-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17765-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17766-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17767-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17768-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17769-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17770-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17771-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17772-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17774-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17775-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17777-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17778-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17779-14
B. t. tenagophila	Ipaussu - SP	GBMLG17787-14
B. t. tenagophila	Ipaussu - SP	GBMLG17788-14
B. t. tenagophila	Ipaussu - SP	GBMLG17789-14
B. t. tenagophila	Ipaussu - SP	GBMLG17790-14
B. t. tenagophila	Ipaussu - SP	GBMLG17791-14
B. t. tenagophila	Ipaussu - SP	GBMLG17792-14
B. t. tenagophila	Ipaussu - SP	GBMLG17793-14
B. t. tenagophila	Ipaussu - SP	GBMLG17794-14
B. t. tenagophila	Ipaussu - SP	GBMLG17795-14
B. t. tenagophila	Ipaussu - SP	GBMLG17796-14
B. t. tenagophila	Iapuçá - SP	GBMLG17797-14
B. t. tenagophila	Itariri - SP	GBMLG17802-14
B. t. tenagophila	Ourinhos - SP	GBMLG17818-14
B. t. tenagophila	Ourinhos - SP	GBMLG17819-14
B. t. tenagophila	Ourinhos - SP	GBMLG17820-14
B. t. tenagophila	Ourinhos - SP	GBMLG17823-14
B. t. tenagophila	Ourinhos - SP	GBMLG17824-14
B. t. tenagophila	Ourinhos - SP	GBMLG17825-14
B. t. tenagophila	Ourinhos - SP	GBMLG17835-14
B. t. tenagophila	Ourinhos - SP	GBMLG17836-14
B. t. tenagophila	Pindamonhangaba - SP	GBMLG17841-14
B. t. tenagophila	Pindaminhongaba - SP	GBMLG17842-14
B. t. tenagophila	São Lourenço da Serra - SP	GBMLG17858-14
B. t. tenagophila	Taubaté - SP	GBMLG17864-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17865-14

B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17866-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17867-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17868-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17869-14
B. t. tenagophila	Tremembé - SP	GBMLG17870-14
B. t. tenagophila	Araraquara - SP	GBMLG17753-14
B. t. tenagophila	Araraquara - SP	GBMLG17754-14
B. t. tenagophila	Araraquara - SP	GBMLG17758-14
B. t. tenagophila	Embu das artes - SP	GBMLG17781-14
B. t. tenagophila	Itariri - SP	GBMLG17799-14
B. t. tenagophila	Itariri - SP	GBMLG17800-14
B. t. tenagophila	Itariri - SP	GBMLG17803-14
B. t. tenagophila	Itariri - SP	GBMLG17805-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17773-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17776-14
B. t. tenagophila	Caraguatatuba - SP	GBMLG17780-14
B. t. tenagophila	Ilha Bela - SP	GBMLG17785-14
B. t. tenagophila	Ilha Bela - SP	GBMLG17786-14
B. t. tenagophila	Embu das Artes - SP	GBMLG17782-14
B. t. tenagophila	Itariri - SP	GBMLG17801-14
B. t. tenagophila	Registro - SP	GBMLG17851-14
B. t. tenagophila	Juquia - SP	GBMLG17806-14
B. t. tenagophila	Juquia - SP	GBMLG17810-14
B. t. tenagophila	Juquia - SP	GBMLG17807-14
B. t. tenagophila	Juquia - SP	GBMLG17808-14
B. t. tenagophila	Juquia - SP	GBMLG17809-14
B. t. tenagophila	Mogi das Cruzes - SP	GBMLG17814-14
B. t. tenagophila	Ourinhos - SP	GBMLG17822-14
B. t. tenagophila	Registro - SP	GBMLG17852-14
B. t. tenagophila	Sorocaba - SP	GBMLG17859-14
B. t. tenagophila	Sorocaba - SP	GBMLG17863-14
B. t. tenagophila	Sorocaba - SP	GBMLG17860-14
B. t. tenagophila	Sorocaba - SP	GBMLG17861-14
B. t. tenagophila	Sorocaba - SP	GBMLG17862-14
B. t. tenagophila	Não informado	GBMLG5622-08
B. t. tenagophila	Não informado	GBMLG5670-08
B. t. tenagophila	Biritiba Mirim - SP	GBMLG17760-14
B. t. tenagophila	Biritiba Mirim - SP	GBMLG17761-14
B. t. guaibensis	Porto Alegre - RS	GBMLG17736-14
B. t. guaibensis	Porto Alegre - RS	GBMLG17737-14
B. occidentalis	Brazil	GBMLG0226-06
B. occidentalis	Araraquara - SP	GBMLG17751-14
B. occidentalis	Araraquara - SP	GBMLG17755-14
B. occidentalis	Araraquara - SP	GBMLG17756-14
B. occidentalis	Araraquara - SP	GBMLG17757-14
B. occidentalis	Martinópolis - SP	GBMLG17811-14

B. occidentalis	Martinópolis - SP	GBMLG17812-14
B. occidentalis	Novais - SP	GBMLG17816-14
B. occidentalis	Novais - SP	GBMLG17817-14
B. occidentalis	Ourinhos - SP	GBMLG17821-14
B. occidentalis	Ourinhos - SP	GBMLG17832-14
B. occidentalis	Ourinhos - SP	GBMLG17833-14
B. occidentalis	Ourinhos - SP	GBMLG17834-14
B. occidentalis	Ourinhos - SP	GBMLG17838-14
B. occidentalis	Ourinhos - SP	GBMLG17839-14
B. occidentalis	Ourinhos - SP	GBMLG17840-14
B. occidentalis	Presidente Prudente - SP	GBMLG17843-14
B. occidentalis	Santa Isabel - SP	GBMLG17853-14
B. occidentalis	Santa Isabel - SP	GBMLG17854-14
B. occidentalis	Cândido Mota - SP	GBMLG17762-14
B. occidentalis	Ourinhos - SP	GBMLG17831-14
Gyraulus chinensis	Lake Victoria, Kenya	GBMLG0222-06

Apêndice B – Agrupamento de sequências baseada no método de construção NJ, modelo evolutivo K2P e 1000 réplicas de *bootstrap.*



Apêndice C – Lista dos haplótipos gerados através do programa DNAsp

Haplótipo 1:
Argentina 2
Argentina 3
B. t. tenagophila GBMLG0225-06 - Brazil
B. t. tenagophila GBMLG17750-14 - Aparecida - SP
B. t. tenagophila GBMLG17759-14 - Biritiba Mirim - SP
B. t. tenagophila GBMLG17763-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17764-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17765-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17766-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17767-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17768-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17769-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17770-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17771-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17772-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17774-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17775-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17777-14| - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17778-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17779-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17787-14 - Ipaussu - SP
B. t. tenagophila GBMLG17788-14 - Ipaussu - SP
B. t. tenagophila GBMLG17790-14 - Ipaussu - SP
B. t. tenagophila GBMLG17791-14 - Ipaussu - SP
B. t. tenagophila GBMLG17792-14 - Ipaussu - SP
B. t. tenagophila GBMLG17793-14 - Ipaussu - SP
B. t. tenagophila GBMLG17794-14 - Ipaussu - SP
B. t. tenagophila GBMLG17795-14 - Ipaussu - SP
B. t. tenagophila GBMLG17796-14 - Ipaussu - SP
B. t. tenagophila GBMLG17802-14 - Itariri - SP
B. t. tenagophila GBMLG17818-14 - Ourinhos - SP
B. t. tenagophila GBMLG17819-14 - Ourinhos - SP
B. t. tenagophila GBMLG17820-14 - Ourinhos - SP
B. t. tenagophila GBMLG17823-14 - Ourinhos - SP
B. t. tenagophila GBMLG17824-14 - Ourinhos - SP
B. t. tenagophila GBMLG17825-14 - Ourinhos - SP
B. t. tenagophila GBMLG17835-14 - Ourinhos - SP
B. t. tenagophila GBMLG17836-14 - Ourinhos - SP
B. t. tenagophila GBMLG17841-14 - Pindamonhangaba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17842-14 - Pindamonhangaba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17858-14 - São Lourenço da Serra - SP
B. t. tenagophila GBMLG17864-14 - Taubaté - SP
B. t. tenagophila GBMLG17865-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17866-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17867-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17868-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17869-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17870-14 – Tremembé - SP

Haplótipo 2:
B. occidentalis GBMLG0226-06 - Brazil
B. occidentalis GBMLG17751-14 - Araraquara - SP
B. occidentalis GBMLG17755-14 - Araraquara - SP

B. occidentalis GBMLG17756-14 - Araraquara - SP
B. occidentalis GBMLG17757-14 - Araraquara - SP
B. occidentalis GBMLG17811-14 - Martinópolis - SP
B. occidentalis GBMLG17812-14 – Martinópolis - SP
B. occidentalis GBMLG17816-14 - Novais - SP
B. occidentalis GBMLG17817-14 - Novais - SP
B. occidentalis GBMLG17821-14 - Ourinhos - SP
B. occidentalis GBMLG17832-14 - Ourinhos - SP
B. occidentalis GBMLG17833-14 - Ourinhos - SP
B. occidentalis GBMLG17834-14 - Ourinhos - SP
B. occidentalis GBMLG17838-14 - Ourinhos - SP
B. occidentalis GBMLG17839-14 - Ourinhos - SP
B. occidentalis GBMLG17840-14 - Ourinhos - SP
B. occidentalis GBMLG17843-14 - Presidente Prudente - SP
B. occidentalis GBMLG17853-14 - Santa Isabel - SP
B. occidentalis GBMLG17854-14- Santa Isabel - SP

Haplótipo 3:
B. occidentalis GBMLG17762-14 - Candido Mota - SP

Haplótipo 4:
B. occidentalis GBMLG17831-14 - Ourinhos - SP

Haplótipo 5:
B. t. guaibensis GBMLG17736-14 - Porto Alegre
B. t. guaibensis GBMLG17736-14 - Porto Alegre
Eldorado do Sul 2
Eldorado do Sul 8
Esteio 01
Esteio 02
Esteio 03
Esteio 04
Esteio 05
Esteio 06
Esteio 07
Esteio 08
Esteio 09
Esteio 10

Haplótipo 6:
B. t. tenagophila GBMLG17753-14 - Araraquara - SP
B. t. tenagophila GBMLG17754-14 - Araraquara - SP
B. t. tenagophila GBMLG17758-14 - Araraquara - SP
B. t. tenagophila GBMLG17781-14 - Embu das artes - SP
B. t. tenagophila GBMLG17799-14 - Itariri - SP
B. t. tenagophila GBMLG17800-14 - Itariri - SP
B. t. tenagophila GBMLG17803-14 - Itariri - SP
B. t. tenagophila GBMLG17805-14- Itariri - SP

Haplótipo 7:
B. t. tenagophila GBMLG17760-14 - Biritiba Mirim - SP
B. t. tenagophila GBMLG17761-14 - Biritiba Mirim - SP

Haplótipo 8:
B. t. tenagophila GBMLG17773-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17776-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17780-14 - Caraguatatuba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17785-14 - Ilha Bela - SP
B. t. tenagophila GBMLG17786-14 - Ilha Bela - SP

Haplótipo 9:
B. t. tenagophila GBMLG17782-14 - Embu das Artes - SP
B. t. tenagophila GBMLG17801-14 - Itariri - SP
B. t. tenagophila GBMLG17851-14- Registro - SP

Haplótipo 10:
B. t. tenagophila GBMLG17806-14 - Juquia - SP
B. t. tenagophila GBMLG17810-14- Juquia - SP

Haplótipo 11:
B. t. tenagophila GBMLG17807-14 - Juquia - SP
B. t. tenagophila GBMLG17808-14 - Juquia - SP
B. t. tenagophila GBMLG17809-14 - - Juquia - SP

Haplótipo 12:
B. t. tenagophila GBMLG17814-14 - Mogi das cruzes - SP

Haplótipo 13:
B. t. tenagophila GBMLG17822-14 - Ourinhos - SP

Haplótipo 14:
B. t. tenagophila GBMLG17852-14 - Registro - SP

Haplótipo 15:
B. t. tenagophila GBMLG17859-14 - Sorocaba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17863-14 - Sorocacaba - SP

Haplótipo 16:
B. t. tenagophila GBMLG17860-14 - Sorocaba - SP

Haplótipo 17:
B. t. tenagophila GBMLG17861-14 –Sorocaba - SP
B. t. tenagophila GBMLG17862-14 – Sorocaba - SP

Haplótipo 18:
B. t. tenagophila GBMLG5622-08 – Não informado
B. t. tenagophila GBMLG5670-08 – Não informado

Haplótipo 19: Eldorado 5

Haplótipo 20:
Pelotas 1
Pelotas 10
Pelotas 2
Pelotas 3
Pelotas 4
Pelotas 5
Pelotas 6
Pelotas 7
Pelotas 8
Pelotas 9
Taim 1
Taim 10
Taim 3
Taim 4
Taim 5
Taim 6
Taim 7
Taim 8
Taim9

Apêndice D – Agrupamentos gerados no programa ABGD para o valor de gap 1,2%.

Initial Partition with prior maximal distance P=1.29e-02

Distance K80 Kimura MinSlope=1.200000

Download (left click and save) or see below the tree file corresponding to this partition: click **here**

Group[1] n: 50 ;id: Argentina_2 Argentina_3 B._tenagophila_GBMLG0225-06 B._tenagophila_GBMLG17750-14 B._tenagophila_GBMLG17759-14 B._tenagophila_GBMLG17763-14 B._tenagophila_GBMLG17764-14 B._tenagophila_GBMLG17765-14 B._tenagophila_GBMLG17766-14 B._tenagophila_GBMLG17767-14 B._tenagophila_GBMLG17768-14 B._tenagophila_GBMLG17769-14 B._tenagophila_GBMLG17770-14 B._tenagophila_GBMLG17771-14 B._tenagophila_GBMLG17772-14 B._tenagophila_GBMLG17774-14 B._tenagophila_GBMLG17775-14 B._tenagophila_GBMLG17777-14| B._tenagophila_GBMLG17778-14 B._tenagophila_GBMLG17779-14 B._tenagophila_GBMLG17787-14 B._tenagophila_GBMLG17788-14 B._tenagophila_GBMLG17789-14 B._tenagophila_GBMLG17790-14 B._tenagophila_GBMLG17791-14 B._tenagophila_GBMLG17792-14 B._tenagophila_GBMLG17793-14 B._tenagophila_GBMLG17794-14 B._tenagophila_GBMLG17795-14 B._tenagophila_GBMLG17796-14 B._tenagophila_GBMLG17797-14 B._tenagophila_GBMLG17802-14 B._tenagophila_GBMLG17818-14 B._tenagophila_GBMLG17819-14 B._tenagophila_GBMLG17820-14 B._tenagophila_GBMLG17823-14 B._tenagophila_GBMLG17824-14 B._tenagophila_GBMLG17825-14 B._tenagophila_GBMLG17835-14 B._tenagophila_GBMLG17836-14 B._tenagophila_GBMLG17841-14 B._tenagophila_GBMLG17842-14 B._tenagophila_GBMLG17858-14 B._tenagophila_GBMLG17864-14 B._tenagophila_GBMLG17865-14 B._tenagophila_GBMLG17866-14 B._tenagophila_GBMLG17867-14 B._tenagophila_GBMLG17868-14 B._tenagophila_GBMLG17869-14 B._tenagophila_GBMLG17870-14

Group[2] n: 21 ;id: B._occidentalis_GBMLG0226-06 B._occidentalis_GBMLG17751-14 B._occidentalis_GBMLG17755-14 B._occidentalis_GBMLG17756-14 B._occidentalis_GBMLG17757-14 B._occidentalis_GBMLG17762-14 B._occidentalis_GBMLG17811-14 B._occidentalis_GBMLG17812-14 B._occidentalis_GBMLG17816-14 B._occidentalis_GBMLG17817-14 B._occidentalis_GBMLG17821-14 B._occidentalis_GBMLG17831-14 B._occidentalis_GBMLG17832-14 B._occidentalis_GBMLG17833-14 B._occidentalis_GBMLG17834-14 B._occidentalis_GBMLG17838-14 B._occidentalis_GBMLG17839-14 B._occidentalis_GBMLG17840-14 B._occidentalis_GBMLG17843-14 B._occidentalis_GBMLG17853-14 B._occidentalis_GBMLG17854-14

Group[3] n: 15 ;id: B._t._guaibensis_GBMLG17736-14 B._t._guaibensis_GBMLG17737-14 Eldorado_do_Sul_2 Eldorado_do_Sul_5 Eldorado_do_Sul_8 Esteio_01 Esteio_02 Esteio_03 Esteio_04 Esteio_05 Esteio_06 Esteio_07 Esteio_08 Esteio_09 Esteio_10

Group[4] n: 33 ;id: B._tenagophila_GBMLG17753-14 B._tenagophila_GBMLG17754-14 B._tenagophila_GBMLG17758-14| B._tenagophila_GBMLG17760-14 B._tenagophila_GBMLG17761-14 B._tenagophila_GBMLG17773-14 B._tenagophila_GBMLG17776-14 B._tenagophila_GBMLG17780-14 B._tenagophila_GBMLG17781-14 B._tenagophila_GBMLG17782-14 B._tenagophila_GBMLG17785-14 B._tenagophila_GBMLG17786-14 B._tenagophila_GBMLG17799-14 B._tenagophila_GBMLG17800-14 B._tenagophila_GBMLG17801-14 B._tenagophila_GBMLG17803-14 B._tenagophila_GBMLG17805-14 B._tenagophila_GBMLG17806-14 B._tenagophila_GBMLG17807-14 B._tenagophila_GBMLG17808-14

B._tenagophila_GBMLG17809-14 B._tenagophila_GBMLG17810-14 B._tenagophila_GBMLG17814-14 B._tenagophila_GBMLG17822-14 B._tenagophila_GBMLG17851-14 B._tenagophila_GBMLG17852-14 B._tenagophila_GBMLG17859-14 B._tenagophila_GBMLG17860-14 B._tenagophila_GBMLG17861-14 B._tenagophila_GBMLG17862-14 B._tenagophila_GBMLG17863-14 B._tenagophila_GBMLG5622-08 B._tenagophila_GBMLG5670-08

Group[5] n: 19 ;id: Pelotas_1 Pelotas_10 Pelotas_2 Pelotas_3 Pelotas_4 Pelotas_5 Pelotas_6 Pelotas_7 Pelotas_8 Pelotas_9 Taim_1 Taim_10 Taim_3 Taim_4 Taim_5 Taim_6 Taim_7 Taim_8 Taim_9

Apêndice E – Agrupamentos gerados no programa ABGD para o valore de gap 3,0%.

Initial Partition with prior maximal distance P=7.74e-03

Distance K80 Kimura MinSlope=3.000000

Download (left click and save) or see below the tree file corresponding to this partition: click **here**

Group[1] n: 83 ;id: Argentina_2 Argentina_3 B._tenagophila_GBMLG0225-06
B._tenagophila_GBMLG17750-14 B._tenagophila_GBMLG17753-14 B._tenagophila_GBMLG17754-14
B._tenagophila_GBMLG17758-14| B._tenagophila_GBMLG17759-14 B._tenagophila_GBMLG17760-14
B._tenagophila_GBMLG17761-14 B._tenagophila_GBMLG17763-14 B._tenagophila_GBMLG17764-14
B._tenagophila_GBMLG17765-14 B._tenagophila_GBMLG17766-14 B._tenagophila_GBMLG17767-14
B._tenagophila_GBMLG17768-14 B._tenagophila_GBMLG17769-14 B._tenagophila_GBMLG17770-14
B._tenagophila_GBMLG17771-14 B._tenagophila_GBMLG17772-14 B._tenagophila_GBMLG17773-14
B._tenagophila_GBMLG17774-14 B._tenagophila_GBMLG17775-14 B._tenagophila_GBMLG17776-14
B._tenagophila_GBMLG17777-14| B._tenagophila_GBMLG17778-14 B._tenagophila_GBMLG17779-14
B._tenagophila_GBMLG17780-14 B._tenagophila_GBMLG17781-14 B._tenagophila_GBMLG17782-14
B._tenagophila_GBMLG17785-14 B._tenagophila_GBMLG17786-14 B._tenagophila_GBMLG17787-14
B._tenagophila_GBMLG17788-14 B._tenagophila_GBMLG17789-14 B._tenagophila_GBMLG17790-14
B._tenagophila_GBMLG17791-14 B._tenagophila_GBMLG17792-14 B._tenagophila_GBMLG17793-14
B._tenagophila_GBMLG17794-14 B._tenagophila_GBMLG17795-14 B._tenagophila_GBMLG17796-14
B._tenagophila_GBMLG17797-14 B._tenagophila_GBMLG17799-14 B._tenagophila_GBMLG17800-14
B._tenagophila_GBMLG17801-14 B._tenagophila_GBMLG17802-14 B._tenagophila_GBMLG17803-14
B._tenagophila_GBMLG17805-14 B._tenagophila_GBMLG17806-14 B._tenagophila_GBMLG17807-14
B._tenagophila_GBMLG17808-14 B._tenagophila_GBMLG17809-14 B._tenagophila_GBMLG17810-14
B._tenagophila_GBMLG17814-14 B._tenagophila_GBMLG17818-14 B._tenagophila_GBMLG17819-14
B._tenagophila_GBMLG17820-14 B._tenagophila_GBMLG17822-14 B._tenagophila_GBMLG17823-14
B._tenagophila_GBMLG17824-14 B._tenagophila_GBMLG17825-14 B._tenagophila_GBMLG17835-14
B._tenagophila_GBMLG17836-14 B._tenagophila_GBMLG17841-14 B._tenagophila_GBMLG17842-14
B._tenagophila_GBMLG17851-14 B._tenagophila_GBMLG17852-14 B._tenagophila_GBMLG17858-14
B._tenagophila_GBMLG17859-14 B._tenagophila_GBMLG17860-14 B._tenagophila_GBMLG17861-14
B._tenagophila_GBMLG17862-14 B._tenagophila_GBMLG17863-14 B._tenagophila_GBMLG17864-14
B._tenagophila_GBMLG17865-14 B._tenagophila_GBMLG17866-14 B._tenagophila_GBMLG17867-14
B._tenagophila_GBMLG17868-14 B._tenagophila_GBMLG17869-14 B._tenagophila_GBMLG17870-14
B._tenagophila_GBMLG5622-08 B._tenagophila_GBMLG5670-08

Group[2] n: 21 ;id: B._occidentalis_GBMLG0226-06 B._occidentalis_GBMLG17751-14
B._occidentalis_GBMLG17755-14 B._occidentalis_GBMLG17756-14 B._occidentalis_GBMLG17757-14
B._occidentalis_GBMLG17762-14 B._occidentalis_GBMLG17811-14 B._occidentalis_GBMLG17812-14
B._occidentalis_GBMLG17816-14 B._occidentalis_GBMLG17817-14 B._occidentalis_GBMLG17821-14
B._occidentalis_GBMLG17831-14 B._occidentalis_GBMLG17832-14 B._occidentalis_GBMLG17833-14
B._occidentalis_GBMLG17834-14 B._occidentalis_GBMLG17838-14 B._occidentalis_GBMLG17839-14
B._occidentalis_GBMLG17840-14 B._occidentalis_GBMLG17843-14 B._occidentalis_GBMLG17853-14

B._occidentalis_GBMLG17854-14

Group[3] n: 15 ;id: B._t._guaibensis_GBMLG17736-14 B._t._guaibensis_GBMLG17737-14 Eldorado_do_Sul_2 Eldorado_do_Sul_5 Eldorado_do_Sul_8 Esteio_01 Esteio_02 Esteio_03 Esteio_04 Esteio_05 Esteio_06 Esteio_07 Esteio_08 Esteio_09 Esteio_10

Group[4] n: 19 ;id: Pelotas_1 Pelotas_10 Pelotas_2 Pelotas_3 Pelotas_4 Pelotas_5 Pelotas_6 Pelotas_7 Pelotas_8 Pelotas_9 Taim_1 Taim_10 Taim_3 Taim_4 Taim_5 Taim_6 Taim_7 Taim_8 Taim_9