

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Aplicação de ferramentas de bioinformática e bancos de dados públicos no design de primers para identificação de *Limnoperna fortunei* e avaliação de seu histórico de invasões

Rafael Barrichello Baggi

São Carlos

2025

Baggi, Rafael Barrichello

Aplicação de ferramentas bioinformáticas e bancos de dados públicos no design de primers para identificação de *Limnoperna fortunei* e avaliação de seu histórico de invasões / Rafael Barrichello Baggi -- 2025.
63f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Pedro Manoel Galetti Junior

Banca Examinadora: Bruno Henrique Saranholi, Camila
Francisco Gonçalves, Pedro Manoel Galetti Junior

Bibliografia

1. Identificação de espécies invasoras. 2. DNA
barcoding. 3. Design de primers. I. Baggi, Rafael
Barrichello. II. Título.

Rafael Barrichello Baggi

Aplicação de ferramentas de bioinformática e bancos de dados públicos no design de primers para identificação de *Limnoperna fortunei* e avaliação de seu histórico de invasões

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior

São Carlos

2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à UFSCar e ao curso de Biotecnologia, à secretaria e a todo o corpo docente do curso, que contribuíram de forma fundamental para minha formação acadêmica e pessoal ao longo desses anos.

Expresso minha profunda gratidão ao meu professor Dr. Pedro Manoel Galetti Junior, pela orientação dedicada, pela paciência e por todas as oportunidades de aprendizado proporcionadas.

À pesquisadora M.^a Patricia Dammski Borges de Andrade pela generosidade e disposição em fornecer as amostras para minha pesquisa

À todas as pessoas do LabBMC, pelo acolhimento, conselhos e ajuda durante as etapas finais do desenvolvimento do projeto.

Agradeço também à minha namorada Beatriz, por ser meu pilar emocional, demonstrar apoio constante, compreensão e incentivo nos momentos mais difíceis.

À minha família, deixo meu reconhecimento e amor por todas as oportunidades e pela base indispensável para que eu chegasse até aqui.

Aos moradores do apartamento 34 e da República Faixa de Gaza, que estiveram presentes nos momentos de convivência, amizade e descontração, tornando essa jornada mais leve e inesquecível.

A todos vocês, o meu muito obrigado.

Resumo

O mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* é uma espécie exótica invasora que causa impactos ambientais, econômicos e operacionais significativos em ecossistemas aquáticos e infraestruturas hidrelétricas da América do Sul, tornando sua detecção precoce essencial para ações de monitoramento e manejo. Neste trabalho, foi realizado o desenvolvimento *in silico* de primers específicos para a identificação molecular de *L. fortunei*, utilizando ferramentas de bioinformática e bancos de dados genéticos públicos. Foram obtidas e analisadas 165 sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) da espécie, provenientes de diferentes regiões geográficas, além de sequências de outros representantes da família Mytilidae, com o objetivo de avaliar a diversidade genética, reconstruir relações filogenéticas e subsidiar o design de primers com alta especificidade.

As sequências foram alinhadas, filtradas quanto à qualidade e utilizadas para análises filogenéticas bayesianas, construção de redes de haplótipos e cálculo de parâmetros de diversidade genética. Os resultados confirmaram elevada diversidade haplotípica associada a baixa diversidade nucleotídica, padrão compatível com expansão populacional recente, além de congruência entre a filogenia baseada no gene COI e filogenias mitogenômicas previamente publicadas para Mytilidae. A partir das sequências consenso, foram desenhados dois pares de primers, um direcionado à região barcode completa e outro à região minibarcode do gene COI, ambos avaliados quanto a parâmetros físico-químicos e especificidade *in silico*.

Os primers desenvolvidos foram submetidos a testes *in vitro* por PCR convencional, utilizando diferentes concentrações de DNA e um amplo gradiente de temperaturas de anelamento. Entretanto, não foi observada amplificação específica em nenhuma das condições testadas, indicando possíveis limitações relacionadas à presença de inibidores, à qualidade do DNA extraído ou à necessidade de ajustes adicionais no design dos primers e nas condições de PCR.

Apesar da ausência de amplificação experimental, o estudo demonstra o potencial do uso integrado de bancos de dados públicos, análises filogenéticas e ferramentas bioinformáticas no desenvolvimento racional de primers específicos para espécies invasoras. Os resultados obtidos fornecem subsídios teóricos e metodológicos relevantes para futuros estudos de detecção molecular de *L. fortunei*, especialmente em abordagens baseadas em DNA ambiental (eDNA), contribuindo para o aprimoramento de estratégias de monitoramento e controle dessa espécie.

Palavras-chave: mexilhão-dourado, bivalve, espécies invasoras, barcoding, citocromo c oxidase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Exemplar adulto do mexilhão dourado.....	12
Figura 2 - Árvore filogenética proposta para Mytilidae.....	20
Figura 3 - Construção da árvore filogenética para a família Mytilidae baseada em Zhao et al (2022).....	28
Figura 4 - Rede haplotípica construída a partir das 165 sequências do <i>L. fortunei</i>	32
Figura 5 - Árvore das sequências do gene COI de <i>L. fortunei</i> construída por inferência bayesiana.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação taxonômica de <i>Limnoperna fortunei</i>	15
Tabela 2 - Comparação com Ghabooli et al (2013) em relação aos valores de diversidade genética.....	30
Tabela 3 - Medidas do biofotômetro para o DNA extraído das amostras de mexilhão-dourado.....	34
Tabela 4 - Primers definidos para identificação específica do mexilhão-dourado.....	36
Tabela 5 - Códigos de acesso da família Mytilidae.....	51
Tabela 6 - Códigos de acesso do <i>Limnoperna fortunei</i>	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. ESPÉCIES INVASORAS	9
1.1.1. ÁGUA DE LASTRO	9
1.1.2. BIOINCRUSTAÇÃO	10
1.2. LIMNOPERNA FORTUNEI NA AMÉRICA DO SUL	10
1.3. CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE	11
1.4. IMPACTOS CAUSADOS PELO LIMNOPERNA FORTUNEI	14
1.5. RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE LIMNOPERNA FORTUNEI	15
1.6. DNA BARCODING	16
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. OBTENÇÃO DE CONJUNTO DE DADOS E ALINHAMENTO	20
3.1.1. REFERÊNCIA DE ÁRVORE FILOGENÉTICA	21
3.1.2. CONSTRUÇÃO DAS ÁRVORES FILOGENÉTICAS	23
3.2. CONSTRUÇÃO DA REDE DE HAPLÓTIPOS E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	23
3.3. ELABORAÇÃO DOS PARES DE PRIMERS	24
3.3.1. DEFINIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CONSENSO	24
3.3.2. DESIGN DOS PRIMERS	24
3.4. TESTES IN VITRO	25
3.4.1. EXTRAÇÃO DE DNA	25
3.4.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. JUSTIFICATIVA DA ESCOLHA DO GENE COI	26
4.1.1. RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA DA FAMÍLIA MYTILIDAE A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO GENE COI	29
4.2. INFERÊNCIA SOBRE O HISTÓRICO DE INVASÕES	31
4.3. DEFINIÇÃO DOS PRIMERS E TESTES IN VITRO	36
4.3.1. RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DE DNA	36
4.3.2. ANÁLISE DOS PRIMERS SELECIONADOS	37
4.3.3. RESULTADO DA PCR	39
5. CONCLUSÃO	42
6. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESPÉCIES INVASORAS

De acordo com a Estratégia Nacional para Espécies Exóticas Invasoras (ENEEI), instituída pela Resolução CONABIO 07/2018, o aumento do comércio, das viagens e do turismo tem intensificado o transporte de espécies exóticas entre regiões, países e ecossistemas, seja de forma intencional ou acidental (IBAMA, 2019). Espécies exóticas são aquelas que ocorrem fora de sua área de distribuição natural devido à ação humana, mas nem sempre causam impactos ambientais. Segundo Richardson et al. (2000), nem toda espécie introduzida torna-se invasora, mas as que se estabelecem e se expandem apresentam maior potencial de impacto.

Uma espécie exótica pode ser considerada invasora quando a mesma, segundo Convenção Internacional sobre Diversidade Biológica (CDB, 1992) na 6ª Conferência das Partes (CDB COP-6, Decisão VI/23, 2002), é introduzida por intermédio de ações humanas em um novo habitat, e se torna capaz de expandir sua distribuição no novo local, resultando em um grande impacto socioeconômico, à biodiversidade e ecossistemas.

Os impactos à biodiversidade ocorrem por conta de um desbalanço nas relações ecológicas do local, uma vez que a ausência de predadores naturais da espécie invasora gera alterações nas teias tróficas (COX, 2004).

Segundo os dados obtidos em 2018 pela ENEEI, o Brasil possui cerca de 365 espécies exóticas potencialmente invasoras. Desse total, temos que 45 espécies foram introduzidas ao ambiente marinho e os principais meios de dispersão foram via bioincrustação e água de lastro.

1.1.1. ÁGUA DE LASTRO

Os tanques de lastro dos navios, preenchidos com água marítima ou fluvial em diferentes volumes, têm como principal função garantir a estabilidade e a segurança operacional das embarcações. Conhecida como água de lastro, essa prática é essencial tanto para a navegação quanto para ajustar o calado do navio durante as operações de carga, descarga e manobras portuárias (SERAFIN e HENKENS, 2013). Os tanques de lastro são carregados com a água do porto onde se encontram, após seguirem viagem ao porto seguinte, ao chegarem o navio é carregado com carga, a água de lastro é bombeada de volta ao mar ou ao corpo d'água próximo ao porto. Por esse motivo, os navios promovem uma ampla transferência de água ao redor do mundo enquanto se deslocam em busca de novas cargas. E com isso, espécies exóticas são transportadas de seus habitats naturais e são introduzidas em novos (COLLYER, 2007).

1.1.2. BIOINCRUSTAÇÃO

Segundo Railkin (2023), bioincrustação consiste de grandes concentrações de biomassa em substratos consolidados submersos. A bioincrustação (ou fouling) é o processo de adesão e crescimento de organismos em superfícies submersas, formando camadas biológicas que podem impactar significativamente estruturas artificiais e naturais. Esse fenômeno ocorre tanto em ambientes marinhos quanto dulcícolas, afetando embarcações, dutos, turbinas hidrelétricas, plataformas de petróleo, redes de pesca e sensores submarinos. A bioincrustação pode ser classificada em dois tipos principais: bioincrustação primária (microfouling), que envolve a formação de biofilmes por bactérias e microalgas, e bioincrustação secundária (macrofouling), que ocorre com a fixação e crescimento de organismos maiores, como moluscos, cracas e algas filamentosas.

1.2. LIMNOPERNA FORTUNEI NA AMÉRICA DO SUL

Um exemplo de espécie que vem causando danos à biodiversidade marinha brasileira é o molusco *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857), popularmente conhecido como “mexilhão-dourado”. Sendo nativo da China e do sudeste asiático, o mexilhão-dourado chegou à América do Sul por meio da água de lastro e bioincrustação, possivelmente, em 1991, quando foi detectado pela primeira vez na praia de Bagliardi, Rio da Prata, na Argentina. Em 1994, esse bivalve já ocupava toda costa argentina do rio da Prata, em 1995 sua presença foi detectada no Uruguai e em 1997 no Paraguai (Darrigran e Drago 2007).

A chegada do *L. fortunei* ao Brasil ocorreu por duas rotas distintas (DARRIGAN e MANSUR, 2009). A primeira foi registrada no rio Paraguai, próximo à cidade de Corumbá, no estado do Mato Grosso do Sul, no início de 1998 (Oliveira et al., 2006). Essa ocorrência inicial pode ter sido resultado da migração da população que chegou ao rio da Prata em 1991, impulsionada pelo intenso tráfego de navios no sistema hidroviário Paraná/Paraguai (ROSA e ASSIS, 2020) por conta da bioincrustação. De acordo com Costa et al (2012), a capacidade *Limnoperna fortunei* de formar densas colônias acumulativas incrustantes (macrofouling) foi um dos principais meios de chegada do bivalve na América do Sul. A segunda via ocorreu por meio da água de lastro, em 1999, quando o mexilhão foi identificado na praia de Itapuã, ao sul do lago Guaíba, no município de Viamão (RS), onde foram encontrados exemplares de *L. fortunei* (MANSUR et al., 1999). Nos anos subsequentes, a presença do molusco foi detectada em outros estados brasileiros. Em São Paulo, a espécie foi registrada pela primeira vez em novembro de 2002, no rio Paraná, próximo ao município de Rosana (AVELAR et al., 2004). Em 2004, foi encontrada nos reservatórios de Jupia e Ilha Solteira (VON RÜKERT et al., 2004) e, posteriormente, no rio Tietê, nos reservatórios de Barra Bonita (OLIVEIRA et al., 2004), Ibitinga e Bariri (PARESCHI et al., 2008). No rio Paranapanema, foram observados nos reservatórios de Canoas I, Canoas II e Capivara

(ROCHA et al., 2011). Avançando pelo sistema hidroviário Paraná-Tietê, o mexilhão-dourado alcançou Minas Gerais e Goiás. No Rio Paranaíba, foi detectado em 2004, abaixo do reservatório da UHE São Simão (CAMPOS et al., 2012), e em 2016 no reservatório de Emborcação, trecho médio do Rio Paranaíba (SILVA et al., 2016). No Rio Grande, foi registrado em 2011 no reservatório de Volta Grande (OLIVEIRA et al., 2015).

1.3. CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE

O mexilhão-dourado é uma espécie r-estrategista adaptada a diversas formas de ambiente aquático (PESSOTTO e NOGUEIRA, 2018) que possui diversas características intrínsecas a sua biologia e morfologia que o tornam uma espécie invasora tão eficiente. De acordo com Boltovskoy (2015), a fase larval livre-natante e a fase adulta sésil e bissada auxiliam respectivamente na dispersão do animal pelo plâncton e a se incrustar em embarcações, o que facilita a aderência do animal em embarcações, proporcionando seu deslocamento em grandes distâncias e posteriormente, com a liberação das de larvas de vida livre, aumentando a dispersão do molusco pela água. Além disso, a espécie também possui um curto ciclo de vida (2-3 anos), alta taxa de fecundidade, amadurecimento sexual precoce, crescimento rápido e uma ampla tolerância fisiológica a vários fatores abióticos como temperatura e poluição que limitam outros invertebrados aquáticos (OLIVEIRA et al., 2011).

O mexilhão-dourado é um molusco bivalve (Figura 1), por conta de sua concha única formada por duas valvas simétricas encaixadas dorsalmente (MARANGONI, ASSIS e PELLI, 2022). A concha do bivalve é composta por três camadas: a interna, de coloração branca e roxa, que fica em contato com as partes moles do animal (manto); a média, também denominada como camada prismática; e a externa, chamada orgânica ou perióstraco, esta camada possui características de ser fina, lisa e brilhante, com colorações que variam de castanho escuro a amarelo, sendo o motivo do nome popular do animal (MELO, 2019).

Figura 1. Exemplar adulto do mexilhão dourado



Fonte: MARANGONI, 2023

Em relação a sua reprodução, o molusco apresenta um rápido amadurecimento sexual, alcançando a maturidade com 3 a 4 meses de desenvolvimento, quando estão com comprimento próximos de 5 mm, além disso a fecundação ocorre de maneira externa, com a liberação dos gametas masculinos e femininos na coluna de água (BOLTOVSKOY e CATALDO, 1999). Apesar da espécie ser dióica, não há dimorfismo sexual aparente, todavia, existe uma alteração na textura e coloração do manto entre machos e fêmeas (PEREIRA, 2019). Em espécies da família Mytilidae, a temperatura é considerada um fator determinante na maturação e desova das gônadas, no caso do *L. fortunei* os gametas são liberados quando a temperatura da água alcança ou supera 16 °C. Em áreas de clima temperado, os moluscos apresentam um ciclo reprodutivo tipicamente sazonal com um período de descanso sexual imediatamente após a desova (MARANGONI et al, 2023). Segundo Boltovskoy (2015), Giglio (2016) e Maroñas (2009), ao longo do ano todo há uma produção contínua de gametas e numerosos eventos parciais de desova em regiões de clima tropical, com picos de atividade reprodutiva durante a primavera e no final do verão, por conta do aumento da temperatura. Outros fatores também influenciam a reprodução do mexilhão, como pH, salinidade, oxigênio dissolvido, sólidos em suspensão, clorofila a, e ciclos de inundação-seca.

Em relação a sua alimentação, o mexilhão-dourado é um organismo filtrador, que apresenta uma boa flexibilidade alimentar, uma característica importante para garantir o sucesso da espécie (PESSOTO, 2018). O molusco alimenta-se de material em suspensão, como organismos fitoplanctônicos, zooplanctônicos, bactérias e sólidos suspensos (PEREIRA, 2019). As brânquias do mexilhão possuem cílios, que direcionam a água pelo sifão inalante para a cavidade do manto. As partículas alimentares são direcionadas para a boca para

ingestão, enquanto as partículas não alimentícias são eliminadas via sifão exalante (DARRIGRAN e DAMBORENEA, 2009).

A principal fonte de alimentação do *L. fortunei* é o fitoplâncton, seguido do zooplâncton. Em uma pesquisa realizada por Rojas Molina et al. (2010) em vários ambientes de planície de inundação do médio rio Paraná, registraram um total de 156 táxons no conteúdo estomacal do mexilhão-dourado. Desses, 81 táxons eram referentes a algas (*Cyanobacteria*, *Chlorophyceae*, *Xanthophyta*, *Bacillariophyceae*, *Euglenophyta* e *Dinophyta*), enquanto os animais eram representados por 46 espécies de *Rotifera*, 17 de *Cladocera*, 4 de *Copepoda*, diversos tipos de *Protista*, *Ostracoda* e *Nematoda*, bem como larvas do próprio *L. fortunei*.

Sobre a sua predação, diversos estudos destacam predadores de *Limnoperna fortunei* e os locais onde ocorrem. Entre as fases larvais de peixes, *Prochilodus lineatus* alimenta-se intensamente das larvas veligeras do mexilhão, que devido ao seu alto conteúdo energético promovem maior crescimento das larvas deste peixe (PAOLUCCI et al., 2010). Na bacia do Rio da Prata, larvas de 18 espécies de peixes, como Characiformes e Siluriformes, alimentam-se de larvas veligeras (PAOLUCCI e THUESEN, 2015).

Em áreas como o Rio da Prata e no Rio Grande do Sul (Canal São Gonçalo e Lagoa Mirim), peixes como *Leporinus obtusidens*, *Crenicichla punctata*, *Astyanax fasciatus* e outros exibem alta frequência de consumo de *L. fortunei*, sendo este um componente significativo de suas dietas (PENCHASZADEH et al., 2000; LOPES e VIEIRA, 2012). No Alto Rio Paraná, *L. obtusidens*, *Leporinus friderici* e *Piaractus mesopotamicus* se destacam como grandes consumidores, triturando o mexilhão em seu trato digestivo (ROSA et al., 2015).

Predadores como *Rhinodoras dorbignyi* e *Brochiloricaria chauliodon* também incluem *L. fortunei* na dieta, mas há preocupações com a bioacumulação de metais pesados em humanos que consomem esses peixes (GARCIA et al, 2006). Entretanto, devido ao hábito filtrador do mexilhão-dourado e à sua elevada capacidade de bioacumular metais pesados como cádmio, chumbo e mercúrio, existe o risco de transferência desses contaminantes ao longo da cadeia alimentar, podendo afetar peixes consumidos por populações humanas e representar um potencial problema de saúde pública (BOLTOVSKOY et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). A revisão de Cataldo (2015) aponta que a lista de peixes predadores aumentou para 50 espécies em 2013, com alta pressão de predação modulando populações de *L. fortunei*, embora insuficiente para a erradicação. Além de peixes, estudos laboratoriais mostram que quelônios, como *Phrynops hilarii* e *Trachemys dorbigni*, consomem até 40% dos mexilhões oferecidos em experimentos (CARDOSO, 2014; BUJES e VERRASTRO, 2007).

1.4. IMPACTOS CAUSADOS PELO *LIMNOPERNA FORTUNEI*

A presença de *L. fortunei* provoca alterações significativas nos ecossistemas aquáticos devido ao seu comportamento alimentar seletivo e à sua capacidade de bioincrustação. No plâncton, o mexilhão reduz a abundância de organismos menores e favorece espécies maiores, como *Microcystis aeruginosa*, uma cianobactéria tóxica, devido à mudança na relação N:P e ao aumento da disponibilidade de nutrientes (VON RÜCKERT et al., 2004; GAZULHA et al., 2012a,b; SILVA e GIANI, 2018).

Nas comunidades bentônicas, o mexilhão modifica a composição e estrutura das espécies, favorecendo algumas, como gastrópodes e crustáceos, devido ao aumento da matéria orgânica acumulada em suas colônias (MANSUR et al., 2008). Entretanto, pode impactar negativamente outros organismos, como dípteros da família Chironomidae, ao substituir habitats anteriormente ocupados, como esponjas de água doce (FUSARI et al., 2008). Além disso, pode limitar a abundância de organismos bentônicos associados a substratos não consolidados, mas aumentar a complexidade dessas comunidades e fornecer novas vias energéticas (LINARES et al., 2017).

Outro impacto relevante associado à invasão de *Limnoperna fortunei* é sua elevada capacidade de bioacumulação de contaminantes, decorrente do hábito filtrador eficiente e da alta densidade populacional atingida em ambientes invadidos. Estudos realizados em reservatórios brasileiros demonstram que o mexilhão-dourado é capaz de acumular metais traço como Cu, Fe, Mn, Zn, Cd e Pb em seus tecidos, refletindo as condições de contaminação do ambiente e evidenciando seu potencial como bioacumulador e bioindicador de poluição aquática (MARENGONI et al., 2013). Além disso, sua atividade filtradora inclui o consumo de cianobactérias, o que pode favorecer a retenção de cianotoxinas e ampliar o risco de transferência desses contaminantes para níveis tróficos superiores, incluindo peixes bentívoros e, indiretamente, populações humanas por meio do consumo de pescado (VON RUCKERT, 2004). Evidências experimentais também indicam a capacidade de *L. fortunei* em bioacumular mercúrio, com efeitos citotóxicos e genotóxicos associados, reforçando a necessidade de considerar os impactos ecotoxicológicos dessa espécie invasora em avaliações ambientais integradas (AMARAL et al., 2019). Trabalhos de biomonitoramento mostram acúmulo de metais e sinais citotóxicos/genotóxicos em *L. fortunei* (AMARAL et al., 2019; BESEN, 2021), experimentos alimentares demonstram respostas bioquímicas após exposição a formulações contendo glifosato (IUMMATO et al., 2018) e estudos sobre cianobactérias indicam bioacumulação de microcistinas no mexilhão com efeitos enzimáticos detectáveis (OLIVEIRA et al., 2021), indicando risco ecológico e sanitário quando esses organismos entram na cadeia trófica.

Na indústria, a bioincrustação de *L. fortunei* gera altos custos de manutenção, especialmente em usinas hidrelétricas, onde se fixa em tubulações, filtros e sistemas de refrigeração, comprometendo a operação. Estima-se que 40% das UHEs no Brasil estejam infestadas, representando 55% da capacidade de geração de energia e gerando custos anuais de aproximadamente 8 milhões de dólares (REBELO et al., 2018). Além disso, o mexilhão pode obstruir sistemas de resfriamento de embarcações, causando superaquecimento e destruição de motores (OLIVEIRA et al., 2006).

1.5. RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE *LIMNOPERNA FORTUNEI*

O molusco *Limnoperna fortunei* segue a seguinte filogenia demonstrada na Tabela 1, de acordo com Morton (1973, 2015):

Tabela 1. Classificação taxonômica de *Limnoperna fortunei*

Categorias taxonômicas	Classificação
Reino	Animalia
Filo	Mollusca
Classe	Bivalvia (Linné, 1758)
Subclasse	Pteriomorphia (Beurlen, 1944)
Ordem	Mytiloida (Férrusac, 1822)
Superfamília	Mytiloidea (Rafinesque, 1815)
Família	Mytilidae (Rafinesque, 1815)
Gênero	Limnoperna (Rochebrune, 1882)
Espécie	Limnoperna fortunei (Dunker, 1857)

Fonte: Autoria própria

Até 2010, o gênero *Limnoperna* era composto por nove espécies, das quais *Limnoperna fortunei* era considerada a única adaptada a ambientes de água doce, apesar de possuir adaptações que permitem sua sobrevivência em águas marinhas e salobras (Pereira et al., 2019; Marangoni, Assis e Pelli, 2022). Uma revisão taxonômica posterior por Colgan e Da Costa (2013) indicou que outros exemplares atribuídos ao gênero deveriam ser realocados para o gênero *Xenostrobus* (Wilson, 1967), resultando atualmente em *L. fortunei* como a única espécie válida do gênero (Morton, 2015).

Análises filogenéticas recentes, baseadas em genomas mitocondriais completos e em genes codificadores, têm sido fundamentais para elucidar as relações evolutivas dentro da família Mytilidae. Lee et al. (2019), por exemplo, reconstruíram a filogenia mitocondrial da família, identificando dois grandes clados principais: um formado pelas subfamílias Bathymodiolinae, Modiolinae, Lithophaginae e Limnoperninae — onde se insere *L. fortunei* — e outro contendo subfamílias marinhas tradicionais como Mytilinae, Crenellinae e Brachidontinae. Essa organização filogenética indica que *L. fortunei* ocupa uma posição basal dentro de Mytilidae, o que corrobora sua ancestralidade e adaptação a ambientes de água doce, provavelmente oriunda de ancestrais salobros e marinhos (Lee et al., 2019; Morton, 2015). Complementando essa visão, Zhao et al. (2022) destacaram, por meio da análise dos 12 genes codificadores mitocondriais, que o gene ATP8, antes considerado ausente em *L. fortunei*, está presente e funcional, embora com alta divergência. Eles também identificaram evidências de seleção positiva no gene NAD4, sugerindo adaptações bioenergéticas específicas ao habitat dulcícola, caracterizado por baixa salinidade e disponibilidade reduzida de íons. Esses achados reforçam a singularidade molecular da espécie, que exibe rearranjos gênicos mitocondriais exclusivos dentro da família (Zhao et al., 2022; Baeza et al., 2019).

Além dos aspectos moleculares, diferenças morfofuncionais no sistema muscular e alimentar de *L. fortunei* destacam sua singularidade adaptativa em relação a outros Mytilidae (Morton, 2015). A coexistência de adaptações morfológicas, moleculares e ecológicas evidencia um processo de radiação adaptativa do gênero, reforçando a relevância do uso do gene COI como marcador molecular para estudos de identificação, diversidade genética e filogenia, ainda que o uso do genoma mitocondrial completo proporcione maior resolução e robustez filogenética.

1.6. DNA BARCODING

O conceito de DNA barcoding foi proposto por Hebert et al. (2003) com o objetivo de identificar espécies a partir da análise de uma curta região gênica padronizada, funcionando como um “código de barras” molecular capaz de discriminar táxons de forma rápida e reprodutível. Essa abordagem baseia-se na comparação de sequências obtidas com bases de dados de referência, como o Barcode of Life Data System (BOLD), que integra informações taxonômicas e genéticas validadas (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). O marcador mais utilizado para animais é o gene mitocondrial COI, devido à sua elevada variabilidade interespecífica associada à baixa divergência intraespecífica (HEBERT et al., 2003). Em plantas, não há um único marcador universal, sendo os genes plastidiais matK e rbcL amplamente empregados, muitas vezes de forma complementar, enquanto a região nuclear ITS é recomendada para fungos e grupos vegetais com maior necessidade de

resolução taxonômica (ANTIL et al., 2023; GUO et al., 2022). Estudos recentes reforçam que a escolha do marcador deve considerar o grupo taxonômico e o objetivo do estudo, uma vez que diferentes loci apresentam desempenho variável na discriminação de espécies (HO et al., 2021). Em moluscos, estudos aplicados demonstram que fragmentos mitocondriais reduzidos são úteis tanto para autenticação de produtos comerciais quanto para vigilância de invasões: protocolos de detecção molecular direcionados a regiões curtas de COI e ensaios de qPCR melhoraram a sensibilidade para identificação de larvas e eDNA em sistemas aquáticos. Especificamente para o mexilhão-dourado, o COI tem sido empregado em estudos de diversidade e estrutura populacional, evidenciando padrões compatíveis com introduções mediadas por vetores humanos, e protocolos moleculares (incluindo ensaios qPCR que visam fragmentos curtos de COI) demonstraram alta sensibilidade na detecção precoce de larvas e eDNA, reforçando a utilidade integrada de barcode completo e minibarcode em programas de monitoramento e controle dessa espécie invasora (GHABOOLI et al., 2013; PIE et al., 2017).

O DNA barcoding consolidou-se como ferramenta central para a biodiversidade e a taxonomia ao permitir a identificação confiável de espécies crípticas ou morfológicamente indistinguíveis (ANTIL et al., 2023). Essa abordagem é particularmente eficaz para amostras fragmentadas, degradadas ou provenientes de estágios de vida difíceis de caracterizar, como ovos e larvas, ampliando a capacidade de monitoramento biológico (TABERLET et al., 2018). Ademais, o uso de regiões gênicas padronizadas viabiliza comparações globais por meio de bases como BOLD e GenBank, promovendo consistência taxonômica e reprodutibilidade entre estudos independentes (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007; NILSSON et al., 2019). Assim, o barcoding reduz a dependência exclusiva da taxonomia morfológica em casos complexos, fortalecendo abordagens integrativas na delimitação e identificação de espécies (DE SALLE; GOLDSTEIN, 2019).

A eficiência da discriminação taxonômica está diretamente associada ao conceito de barcoding gap, definido como a separação entre a variabilidade genética intraespecífica e a divergência interespecífica de um marcador molecular (HEBERT et al., 2003; MEYER; PAULAY, 2005). Idealmente, a maior distância genética intraespecífica deve ser inferior à menor distância interespecífica, permitindo atribuições claras e confiáveis. A presença de um barcoding gap bem definido indica alto poder discriminatório do locus, ao passo que sua ausência pode gerar sobreposição genética entre espécies próximas, dificultando a delimitação taxonômica (DE SALLE; GOLDSTEIN, 2019). A magnitude desse gap varia conforme o grupo taxonômico, o histórico evolutivo e o marcador selecionado, tornando sua avaliação etapa fundamental na escolha de regiões-alvo e no desenho de primers para estudos de barcoding, metabarcoding e eDNA (ANTIL et al., 2023; PORTER; HAJIBABAEI, 2018).

Nas abordagens baseadas em DNA ambiental (eDNA) e DNA ingerido (iDNA), a identificação taxonômica depende da comparação das sequências obtidas com bibliotecas de referência confiáveis, construídas a partir de regiões-*barcode* previamente validadas (TABERLET et al., 2012; PORTER; HAJIBABAEI, 2018). Nesse contexto, o metabarcoding consiste na amplificação simultânea de um mesmo marcador genético padrão a partir de uma mistura complexa de DNA proveniente de múltiplos organismos presentes em uma única amostra ambiental, seguida de sequenciamento em larga escala e atribuição taxonômica bioinformática (DEINER et al., 2017). A precisão dessa abordagem depende diretamente da qualidade e abrangência dos registros disponíveis em bases como BOLD e GenBank, sendo essencial para evitar identificações ambíguas ou subestimativas da diversidade biológica (ALBERDI et al., 2019). Em biomas megadiversos, onde a diversidade genética regional é elevada, a ausência de bibliotecas locais robustas ainda representa uma limitação significativa, reforçando a necessidade de expandir e validar bancos de dados de referência para garantir maior confiabilidade nos estudos de monitoramento molecular (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

Entre as principais aplicações do DNA *barcoding* e do metabarcoding destacam-se a descoberta e a delimitação de espécies, especialmente em grupos com elevada diversidade críptica ou escassez de caracteres morfológicos diagnósticos (DE SALLE; GOLDSTEIN, 2019). Essas ferramentas também têm sido amplamente empregadas em estudos ecológicos, permitindo a reconstrução de interações tróficas e análises de dieta por meio da identificação molecular de presas a partir de conteúdos estomacais, fezes ou DNA ambiental (ALBERDI et al., 2019). A possibilidade de identificar organismos a partir de amostras não invasivas, como tecidos degradados, excretas ou DNA presente em insetos vetores, amplia significativamente o alcance de estudos de biodiversidade sem a necessidade de captura direta dos indivíduos (TABERLET et al., 2018). Além disso, essas abordagens têm se mostrado fundamentais no monitoramento da fauna, em programas de conservação e na detecção precoce de espécies exóticas e invasoras, contribuindo para a tomada de decisão em gestão ambiental e políticas de conservação (DEINER et al., 2017).

O conceito de *minibarcoding* refere-se ao uso de fragmentos mais curtos das regiões clássicas de DNA *barcoding*, geralmente entre 100 e 300 pares de bases, desenvolvidos para possibilitar a amplificação e identificação molecular a partir de DNA degradado ou presente em baixa concentração, como ocorre em amostras de eDNA, iDNA e material biológico antigo (MEUSNIER et al., 2008). Essa estratégia mantém a lógica do *barcoding* tradicional, porém prioriza regiões suficientemente informativas mesmo em sequências reduzidas, permitindo sua aplicação em contextos nos quais a recuperação de *barcodes* completos é inviável (HAJIBABAEI et al., 2006). Estudos recentes indicam que *minibarcodes* podem apresentar desempenho satisfatório na identificação de espécies quando associados

a bancos de referência bem estruturados, embora sua resolução taxonômica possa variar conforme o grupo analisado e o marcador selecionado (PORTER; HAJIBABAEI, 2018).

Apesar dos avanços proporcionados pelo barcoding e pelo uso de minibarcodes, persistem desafios importantes, como a inexistência de um marcador genético universal capaz de discriminar todos os grupos taxonômicos de forma consistente (ANTIL et al., 2023). A incompletude ou a presença de erros nas bibliotecas de referência representa outra limitação crítica, podendo resultar em identificações equivocadas ou ambíguas quando a diversidade genética não está adequadamente representada (PORTER; HAJIBABAEI, 2018). Além disso, processos evolutivos como hibridização, introgressão e a baixa variabilidade genética em determinados táxons podem reduzir a capacidade de distinção entre espécies próximas (DE SALLE; GOLDSTEIN, 2019). Nesse contexto, torna-se indispensável a curadoria taxonômica rigorosa, integrando dados moleculares, morfológicos e ecológicos para garantir a confiabilidade das inferências taxonômicas (NILSSON et al., 2019).

Avanços recentes nas abordagens de identificação molecular têm ampliado significativamente o escopo do DNA barcoding, destacando-se o mitobarcoding, o barcoding multilocus e o uso de tecnologias de sequenciamento long-read, que permitem maior resolução taxonômica e melhor discriminação entre espécies próximas (DEINER et al., 2017; PORTER; HAJIBABAEI, 2018). O mitobarcoding, baseado na amplificação de múltiplas regiões do genoma mitocondrial, tem se mostrado especialmente promissor em estudos de eDNA e metabarcoding ao aumentar a robustez das atribuições taxonômicas (TABERLET et al., 2018). Paralelamente, projetos globais como o International Barcode of Life (iBOL) e sua iniciativa BIOSCAN visam expandir e padronizar bibliotecas de referência em escala planetária, integrando dados genômicos, taxonômicos e ecológicos (HEBERT et al., 2018; HEBERT et al., 2023). Esses esforços têm sido potencializados pela integração com pipelines modernos de análise bioinformática e ferramentas baseadas em inteligência artificial, que automatizam a curadoria, aumentam a precisão das identificações e permitem lidar com grandes volumes de dados gerados por sequenciamento de nova geração (PORTER; HAJIBABAEI, 2018; NILSSON et al., 2019).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem como objetivo desenvolver um par de primers específicos para *L. fortunei*, utilizando informações provenientes de bancos de dados genéticos e ferramentas bioinformáticas de acesso livre. Esses primers serão empregados na amplificação, via PCR convencional, para avaliar a sua capacidade de amplificação a partir de testes iniciais com o DNA extraído do mexilhão-dourado.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar um gene-alvo adequado para a detecção de *L. fortunei*, com base na literatura e em sequências disponíveis em bancos de dados públicos, como o BOLD systems e GenBank (NCBI);
- Realizar análises comparativas filogenéticas e de diversidade genética para avaliar a confiabilidade das informações obtidas dos principais bancos de dados sobre o mexilhão-dourado;
- Desenvolver um par de primers para barcode e um para minibarcode utilizando ferramentas de bioinformática;
- Realizar testes *in vitro* para definir a capacidade de amplificação dos primers

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DE CONJUNTO DE DADOS E ALINHAMENTO

Inicialmente, foi conduzida uma revisão bibliográfica sistematizada em bases científicas internacionais (Web of Science, PubMed e Google Scholar), com o objetivo de identificar estudos moleculares aplicados à família Mytilidae, com ênfase em *Limnoperna fortunei*. As buscas foram realizadas utilizando combinações de descritores controlados e termos livres, por meio de operadores booleanos, conforme a sintaxe específica de cada base. As principais estratégias de busca incluíram as combinações: ("*Limnoperna fortunei*" AND (phylogeny OR phylogenetics)), ("*Limnoperna fortunei*" AND (mitogenome OR "mitochondrial genome")), ("Mytilidae" AND ("DNA barcoding" OR COI)), e ("Mytilidae" AND (mitochondrial OR mitogenomic)). No Google Scholar, as buscas foram adaptadas para maior abrangência, mantendo os mesmos descritores principais entre aspas e combinados por operadores AND e OR.

Não foi aplicado limite inferior para o ano de publicação; entretanto, foram priorizados estudos publicados entre 2000 e 2025, período correspondente à consolidação das abordagens de DNA barcoding e filogenia molecular em moluscos. Foram considerados elegíveis artigos que apresentassem dados empíricos envolvendo marcadores mitocondriais

(como COI, CytB, 16S rRNA ou genomas mitocondriais completos), análises filogenéticas ou discussões metodológicas relevantes para a identificação molecular de *L. fortunei* ou de espécies filogeneticamente relacionadas dentro de Mytilidae.

Em paralelo à revisão, foi realizada uma busca sistemática no GenBank e no BOLD System utilizando os mesmos descritores. Foram recuperadas mais de 170 sequências do gene COI de *L. fortunei* e mais de 150 sequências para os outros membros da família Mytilidae, sendo no mínimo 3 sequências para cada espécie.

As sequências foram submetidas a triagem de qualidade a partir do alinhamento pelo MEGA v12.0.5 (Kumar et al., 2024) utilizando o algoritmo ClustalW, com penalidade de abertura de gap igual a 15 e extensão igual a 6,66. Foi verificada a integridade da leitura aberta (ORF), removendo sequências com elevado número de bases ambíguas (“N”), gaps ou que apresentassem um tamanho muito pequeno.

Após a triagem das sequências do gene COI para os Mytilidae, foram obtidos 165 sequências de para *L. fortunei* provenientes de diferentes regiões geográficas (Ásia e América do Sul) e 130 (em triplicata para cada espécie) sequências dos outros membros da família Mytilidae da árvore filogenética de Zhao et al (2022), totalizando 295 amostras. As sequências da família Mytilidae podem ser visualizadas no Apêndice A, enquanto que as sequências do *L. fortunei* estão no Apêndice B. As 165 sequências incluíram haplótipos previamente descritos por Ghabooli et al. (2013), permitindo a comparação direta com padrões genéticos já documentados.

Foram feitos dois alinhamentos múltiplos, o primeiro entre todas as 296 sequências obtidas para a família Mytilidae (alinhamento A) e outro entre as 165 sequências para o *L. fortunei* (alinhamento B). Das 165 sequências obtidas para o mexilhão-dourado, 162 apresentavam o tamanho igual ou menor que os 650pb padrão de DNA barcode, enquanto que 3 delas apresentavam o tamanho completo do gene citocromo c oxidase subunidade I ou todo o mitogenoma do *L. fortunei*.

3.1.1. REFERÊNCIA DE ÁRVORE FILOGENÉTICA

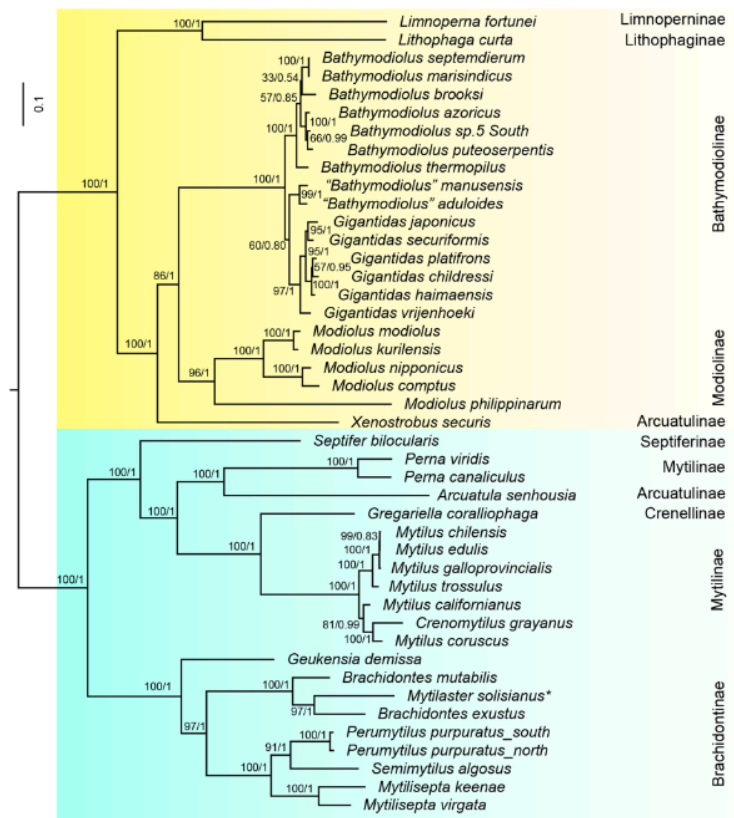
Para a definição das espécies filogeneticamente mais próximas de *L. fortunei*, foi utilizada como referência a árvore (Figura 2) apresentada por Zhao et al. (2022), que representa um dos estudos mais abrangentes sobre as relações evolutivas da família Mytilidae.

No referido estudo, os autores sequenciaram e anotaram genomas mitocondriais de diversas espécies representativas de Mytilidae, abrangendo as principais subfamílias (Limnoperinae, Modiolinae, Bathymodiolinae, Perninae e Mytilinae). Além dos novos genomas obtidos, também foram incorporadas ao conjunto de dados sequências mitocondriais já disponíveis em bancos públicos.

Para a análise filogenética, alinharam os 12 genes codificadores de proteínas mitocondriais (PCGs) utilizando o algoritmo MAFFT. Em seguida, foram aplicadas duas abordagens complementares: Máxima Verossimilhança (ML), conduzida com o software IQ-TREE, e Inferência Bayesiana (BI), realizada com MrBayes. Para cada gene, foram selecionados modelos evolutivos adequados por meio de testes de seleção automática, assegurando a robustez das análises.

O suporte estatístico das árvores foi avaliado por meio de valores de bootstrap ultrarrápido (UFBoot) na análise de máxima verossimilhança e probabilidades posteriores (posterior probabilities) na inferência bayesiana. Essas métricas forneceram altos níveis de confiança para os principais clados obtidos, permitindo resolver pontos historicamente controversos na classificação da família Mytilidae.

Figura 2. Árvore filogenética proposta para Mytilidae



Fonte: Retirado de Zhao et al. (2022)

Dessa forma, a árvore filogenética proposta foi adotada neste trabalho como referência taxonômica para a seleção das espécies a serem incluídas no alinhamento de sequências do gene COI. Essa escolha garante que a amostragem filogenética aqui conduzida esteja fundamentada em evidências genômicas robustas e em uma topologia já consolidada na literatura recente.

3.1.2. CONSTRUÇÃO DAS ÁRVORES FILOGENÉTICAS

Duas principais árvores filogenéticas foram construídas a partir dos alinhamentos A (Mytilidae) e B (*L. fortunei*).

A reconstrução filogenética foi realizada por inferência Bayesiana no software BEAST v10.5 (Drummond & Rambaut, 2007), utilizando o modelo de substituição GTR+ Γ , relógio molecular estrito e prior de especiação do tipo Yule. As cadeias MCMC foram executadas por 15 milhões de gerações, com amostragem a cada 5.000 iterações, e a árvore consenso foi obtida pelo critério de máxima credibilidade de clado.

Ambas as árvores foram obtidas no TreeAnnotator v10.5 e visualizadas no FigTree v1.4.4, com suporte avaliado por probabilidades posteriores (PP). A inclusão de *Lithophaga curta* como outgroup da árvore de *L. fortunei*, e *Magallana gigas* e *Anadara kagoshimensis* como outgroup da árvore de Mytilidae permitiu o enraizamento adequado de ambas as árvores. Posteriormente, com o andamento da pesquisa, também.

3.2. CONSTRUÇÃO DA REDE DE HAPLÓTIPOS E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

O arquivo FASTA contendo as sequências alinhadas do mexilhão-dourado foi posteriormente importado no DnaSP v6.12.03 (Librado & Rozas, 2016) para a identificação dos haplótipos e a definição das populações geográficas. As análises foram conduzidas no DnaSP, calculando os seguintes parâmetros:

S — número de sítios segregantes;

η — número total de mutações;

H — número de haplótipos;

Hd — diversidade haplotípica;

π — diversidade nucleotídica;

k — número médio de diferenças nucleotídicas.

Cada sequência foi atribuída a uma região de origem (Argentina, Brasil, Ásia) por meio da ferramenta *Define Sequence Sets*. Após a atribuição, o arquivo foi aberto no software PopART v1.7 (LEIGH; BRYANT, 2015), no qual foi construída uma rede de haplótipos do tipo Minimum-Joining (MJ). Este método é amplamente utilizado em estudos de filogeografia por representar relações evolutivas entre haplótipos com base no número de mutações diferenciais. Cada haplótipo foi representado por um círculo, cujo tamanho é proporcional à sua frequência amostral, e as conexões entre haplótipos indicam o número mínimo de mutações.

As populações foram diferenciadas por cores, conforme o bloco de traits exportado pelo DnaSP. Assim, cada cor representou uma região geográfica (vermelho para Ásia, azul para

Argentina e verde para Brasil). O layout final da rede foi ajustado manualmente no PopART, visando melhor visualização das conexões e agrupamentos regionais.

Os haplótipos obtidos foram comparados com os descritos por Ghabooli et al. (2013), considerando: Identidade de sequência $\geq 99\%$; Correspondência de clados filogenéticos; Distribuição geográfica dos haplótipos; Comparação de índices de diversidade (H_d e π). Essa análise permitiu avaliar a consistência temporal e geográfica da diversidade genética de *L. fortunei*.

3.3. ELABORAÇÃO DOS PARES DE PRIMERS

Para o desenvolvimento dos primers, foram utilizadas as 165 sequências do *Limnoperna fortunei*. Todas foram padronizadas em um tamanho de 509pb usando como referência o tamanho das sequências de Ghabooli et al (2013). As sequências padronizadas em 509pb foram utilizadas para a criação das sequências consenso.

3.3.1. DEFINIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CONSENSO

As 165 sequências do gene COI foram alinhadas no software Unipro UGENE v52.1 (OKONECHNIKOV et al., 2012). A sequência consenso foi construída no módulo Alignment Editor, que determina, para cada posição do alinhamento, a base mais frequente entre as sequências. Foi adotado um limiar de 80% para definição do consenso; assim, um nucleotídeo foi considerado consenso apenas quando presente em, no mínimo, 80% das sequências naquela posição. Com esse critério, foi obtida uma sequência consenso de 509 pb para definir os primers para a região minibarcode.

Para os primers da região barcode completa, utilizaram-se as três sequências de maior comprimento disponíveis: a sequência completa do gene COI depositada no BOLD Systems (ID: GBMNA9361-19), com aproximadamente 1500 pb, e duas sequências de genomas mitocondriais completos de *L. fortunei*, incluindo a sequência de referência do NCBI (código de acesso: NC_028706.1). A partir dessas sequências, foi gerada uma sequência consenso adicional, com cerca de 1500 pb, que incorpora integralmente a região consenso previamente definida para a região minibarcode.

3.3.2. DESIGN DOS PRIMERS

Os primers foram desenhados no software Primer3Plus v3.3.0 (Untergasser et al., 2012), definindo-se como parâmetros alvo uma temperatura de melting (T_m) entre 57 °C e 62 °C, diferença máxima de 5 °C entre os primers do par, comprimento entre 18 e 25 pb e conteúdo GC entre 40% e 60%.

Entre os primers sugeridos pelo algoritmo, foram priorizados aqueles com menores valores de *penalty*, T_m próximas a 60 °C, baixos valores de *Any* (tendência de ligação cruzada ou

dímeros) e baixos valores de HP (formação de estruturas secundárias), além de conteúdo GC ideal em torno de 55%.

Esse procedimento foi aplicado à ambas sequências consenso. A partir da filtragem, foram selecionados dois primers candidatos, um para cada região. Cada primer foi posteriormente submetido ao BLAST (NCBI) para verificar sua especificidade para *L. fortunei*.

3.4. TESTES *IN VITRO*

Para a realização dos testes de eficiência dos primers, as amostras do *L. fortunei* foram gentilmente fornecidas pela pesquisadora M.^a Patricia Dammski Borges de Andrade. As amostras foram armazenadas em em -2°C, fixadas em etanol 96% até o momento da extração do DNA.

3.4.1. EXTRAÇÃO DE DNA

Segundo um estudo de Murari et al (2018), no qual 4 protocolos de extração de DNA para o mexilhão-dourado utilizando o tecido do músculo adutor foram comparados, a metodologia com tampão salino foi a considerada a mais eficiente. Com isso, foram definidos dois protocolos de extração com tampão salino, o de Lopera-Barrero et al (2018) e o de Aljanabi & Martinez (1997), utilizando o tecido mole do mexilhão-dourado.

O protocolo de Aljanabi & Martinez (1997) iniciou com a homogeneização do tecido em 400 µl de tampão salino (NaCl 0,4 M; Tris HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA pH 8,0 a 0,2 mM). Em seguida, foram adicionados 40 µl de SDS 20% e 15,0 µl de Proteinase K (20 mg/ml), e as amostras foram incubadas à 50°C *overnight*. Posteriormente, foram adicionados 300 µl de NaCl (5M) e as amostras foram vortexadas por 30 segundos na velocidade máxima e centrifugadas por 30 minutos a 13000 rpm, em temperatura ambiente. Feito isso, 700 µl de sobrenadante foram transferidos para outro tubo de 1,5 mL e a mesma quantidade de isopropanol foi adicionada, então as amostras foram incubadas à -20°C por 2h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 13000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e foi feita a lavagem com 300 µl de etanol 70% e foi feita uma centrifugação por 5 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e 300 µl de etanol absoluto foram adicionados, seguido de mais uma centrifugação por 5 minutos. Por fim, as amostras foram deixadas para secar em uma estufa e depois foram ressuspensas em 80 µl de água destilada.

Para o protocolo de Lopera-Barrero et al (2018), as amostras de tecido foram homogeneizados em 400 µL de tampão salino composto por NaCl 0,4 M, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) e EDTA 0,2 mM (pH 8,0). Após a homogeneização, adicionaram-se 40 µL de SDS a 20% e 15 µL de Proteinase K (20 mg/mL). Os tubos foram invertidos algumas vezes para completa integração dos reagentes e incubados em banho-maria a 50 °C por 17 horas.

No dia seguinte, foram adicionados 300 μL de NaCl (5M) às amostras, que foram então vortexadas por 30 segundos em velocidade máxima. Posteriormente, realizou-se a centrifugação por 30 minutos a 13.000 rpm, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo de 1,5 mL, recuperando-se até 700 μL . A este volume, adicionou-se um volume equivalente de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se por inversão. As amostras foram incubadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas para precipitação do DNA. Em seguida, procedeu-se à centrifugação por 20 minutos a 13.000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante foi descartado, invertendo-se o tubo sobre um béquer limpo. O pellet resultante foi deixado para secar à temperatura ambiente por 30 minutos. Para a etapa final, o pellet foi ressuscitado em 80 μl de água destilada.

Ao final de cada protocolo, as amostras foram quantificadas no biofotômetro, verificando a concentração e os índices 260/280 e 260/230, e então, diluídas em alíquotas para uma concentração de 20 ng/ μL para o protocolo de Aljanabi & Martinez (1997) e 5 ng/ μL para o de Lopera-Barrero et al (2018).

3.4.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para o teste definitivo de cada par de primers, foram feitas múltiplas PCRs com gradiente de temperatura de anelamento. As temperaturas de anelamento consideradas foram de 40°C - 60°C , variando de 2 em 2 graus. As reações de PCR foram preparadas em volume final de 12,5 μL , contendo 2,5 mM de MgCl_2 , dNTPs 0,2mM, 0,5 mM de cada primer, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e DNA template para as duas amostras obtidas na extração com concentrações de 20 ng/ μL e 5 ng/ μL , o volume foi completado com água ultrapura.

O programa térmico consistiu em uma desnaturação inicial a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, seguida de 35 ciclos compostos por: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 s (desnaturação), temperatura de anelamento variável por 45 s e $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 s (extensão). Ao final, foi realizada uma etapa de extensão final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos para garantir o completo alongamento dos produtos amplificados. Após cada PCR, as amostras foram visualizadas em gel de agarose 1,5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. JUSTIFICATIVA DA ESCOLHA DO GENE COI

A escolha do gene COI (citocromo c oxidase subunidade I) como marcador molecular para a identificação específica de *L. fortunei* baseia-se em sua ampla utilização como região barcode padrão para metazoários, de acordo com os critérios estabelecidos por Hebert et al. (2003). Além disso, estudos recentes com análises da família Mytilidae reforçam sua utilidade não apenas para filogenia, mas também para fins diagnósticos e taxonômicos.

Em Lee et al. (2019), o gene COI foi um dos 12 genes mitocondriais codificadores de proteínas utilizados na reconstrução da filogenia de 28 espécies de Mytilidae. Nesse estudo, o COI demonstrou estabilidade evolutiva e bom poder discriminatório, inclusive para espécies morfologicamente semelhantes. A espécie *L. fortunei* foi agrupada dentro da subfamília Limnoperninae, formando um clado com suporte estatístico robusto ao lado de outras subfamílias como Bathymodiolinae, Modiolinae e Lithophaginae, evidenciando a capacidade do COI em refletir relações evolutivas reais entre os táxons.

No estudo de Zhao et al. (2022), os autores analisaram 46 genomas mitocondriais de Mytilidae e confirmaram que o gene COI, juntamente com outros como NAD4, NAD5, ATP6 e CytB, apresenta bom desempenho filogenético. No entanto, embora genes como NAD4 tenham mostrado sinais de seleção positiva em *L. fortunei*, sua variação entre espécies próximas é relativamente baixa em comparação ao COI, o que limita seu uso como marcador barcode.

Os genes mitocondriais comumente utilizados em estudos de taxonomia molecular e filogenia apresentam diferentes níveis de variabilidade e conservação, refletindo suas funções e taxas evolutivas. O gene COI, que codifica a subunidade I da citocromo c oxidase, é amplamente empregado em DNA barcoding devido à sua alta variabilidade interespecífica associada a regiões flangeadoras conservadas, característica que o tornou o marcador padrão do sistema BOLD (Hebert et al., 2003; Folmer et al., 1994). Já o gene 16S rRNA, pertencente à região ribossomal mitocondrial, apresenta menor variabilidade entre espécies, porém elevada conservação estrutural, o que o torna particularmente útil para inferências filogenéticas em níveis mais amplos, embora seu uso como barcode seja limitado (Simon et al., 1994). Os genes NAD4 e NAD5, que codificam subunidades da NADH desidrogenase, exibem variabilidade moderada, sendo pouco utilizados em barcoding, mas amplamente explorados em reconstruções filogenéticas devido à estabilidade do genoma mitocondrial e ao padrão consistente de evolução observado nesses loci (Boore, 1999). De forma semelhante, o gene ATP6, responsável pela codificação de uma subunidade da ATP sintase, apresenta taxa evolutiva intermediária e elevado grau de conservação, contribuindo para estudos filogenéticos, embora seja raramente empregado como marcador de identificação (Gissi et al., 2008). Por fim, o gene CytB (citocromo b) possui variabilidade moderada e alto valor filogenético, sendo utilizado em análises evolutivas desde as primeiras aplicações de PCR em mitogenomas animais, embora seu uso em barcoding seja apenas moderado quando comparado ao COI (Kocher et al., 1989). Esse conjunto de características reforça que diferentes genes mitocondriais apresentam potencial distinto para barcoding e filogenia, e a escolha do marcador depende diretamente dos objetivos taxonômicos e do nível de resolução desejado. Assim, o COI se apresenta como o marcador mais indicado para sua

detecção molecular por PCR, especialmente em contextos de monitoramento ambiental ou estudos de biodiversidade em bacias hidrográficas.

Alguns estudos têm demonstrado a eficácia do gene mitocondrial COI como ferramenta molecular para identificação precisa de espécies, inclusive em contextos com elevada diversidade genética e presença de espécies crípticas.

Por exemplo, Matias (2015) avaliou 79 espécies de peixes marinhos da Província Tropical Brasileira e demonstrou que em 78 espécies as distâncias intraespecíficas foram <2% e as interespecíficas >2% (4,7% a 39,9%), o que indica alto poder discriminatório do COI. Esse padrão é essencial para barcoding confiável e reflete a existência de um "barcoding gap" bem definido.

Outro estudo compilado por Tresbach et al. (2015) também conclui que o gene COI é a melhor alternativa entre os genes mitocondriais e ribossomais para identificação molecular de espécies de peixes, destacando-se por: elevada taxa de evolução; existência de primers universais bem estabelecidos; alta eficácia na recuperação de sequências mesmo em amostras degradadas

Estudos adicionais como os de Uliano-Silva et al. (2016) e Barbosa et al. (2016) utilizaram a sequência completa do COI (GenBank: HQ843796.1) para comparar populações invasoras sul-americanas com haplótipos asiáticos, confirmando alta conservação intraespecífica (>98%) e divergência clara em relação às espécies próximas, o que o torna ideal para identificação via PCR e desenvolvimento de primers específicos.

Em estudo comparativo entre populações de *L. fortunei* da Ásia e da América do Sul, utilizando o gene COI, foram identificados mais de 30 haplótipos distintos, demonstrando que este gene é altamente informativo para estudos de diversidade populacional e rastreamento de rotas de dispersão (ULIANO-SILVA et al., 2016; ZHAN et al., 2012).

Adicionalmente, o gene COI apresenta outras vantagens práticas: extensa base de dados disponível no GenBank para *L. fortunei* e espécies próximas; alta variabilidade interespecífica e baixa variabilidade intraespecífica, ideal para o desenvolvimento de primers específicos; região barcode de tamanho adequado (cerca de 650 pb), compatível com protocolos de PCR convencionall.

Portanto, em comparação com outros genes mitocondriais, o COI apresenta o melhor equilíbrio entre variabilidade informativa, conservação estrutural e aplicabilidade prática, sendo a escolha mais apropriada para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico molecular específicas para *L. fortunei*.

reforçando a robustez da separação entre os principais clados da família. Assim como observado pelos autores, a presente análise também identificou dois clados principais. O primeiro clado reuniu espécies das subfamílias Bathymodiolinae, Modiolinae, Lithophaginae e Limnoperninae, destacando-se o posicionamento de *L. fortunei*, que se agrupou de maneira consistente com espécies de *Bathymodiolus* e *Gigantidas*. Esse padrão filogenético já havia sido relatado em análises mitogenômicas envolvendo Bathymodiolinae, e também é coerente com a hipótese de uma origem marinha ancestral para *L. fortunei* seguida de adaptação secundária a ambientes dulcícolas (Morton, 2015; Ricciardi, 1998).

Dentro desse mesmo clado, *Lithophaga curta* posicionou-se próxima a *L. fortunei*, formando um ramo bem definido, o que reforça a proximidade entre as subfamílias *Limnoperninae* e *Lithophaginae*, já sugerida em análises multigênicas e filogenômicas como em Combosch & Giribet (2016).

O segundo grande clado englobou espécies das subfamílias Mytilinae e Brachidontinae, incluindo os gêneros *Mytilus*, *Perumytilus*, *Brachidontes*, *Mytilaster* e *Geukensia*. Esse agrupamento manteve coerência taxonômica, com *Mytilus trossulus*, *M. coruscus*, *M. edulis* e *M. galloprovincialis* formando um grupo monofilético bem suportado e distinto dos representantes de *Brachidontes* e *Perumytilus*, padrão também encontrado em análises mitogenômicas de *Mytilus* (Hilbish et al., 2000). O gênero *Perna* também se inseriu nesse conjunto, com *Perna perna* e *P. viridis* agrupando-se internamente, embora *P. perna* tenha apresentado leve deslocamento filogenético, possivelmente devido à alta taxa de substituição observada no gene COI (Nabholz et al., 2009).

O agrupamento de *L. fortunei* com espécies de *Bathymodiolus* e *Gigantidas* foi idêntico ao padrão encontrado por Zhao et al. (2022), confirmando a proximidade evolutiva entre as linhagens dulcícolas e as de águas profundas, e sustentando a hipótese de uma diversificação adaptativa mitocondrial dentro desse grupo. Da mesma forma, a relação entre *L. curta* e *L. fortunei* observada na árvore COI deste estudo reproduz a tendência encontrada por Zhao et al. (2022), que indicaram essas espécies como pertencentes ao mesmo clado basal do grupo 1.

As poucas divergências observadas entre as duas análises concentraram-se nas relações internas entre os gêneros *Perna*, *Brachidontes* e *Mytilaster*. Enquanto Zhao et al. (2022) observaram um agrupamento mais próximo entre *Perna* e *Mytilaster*, a árvore COI do presente estudo apresentou *Perna perna* mais relacionada ao clado de *Brachidontes*. Essa variação é plausível, considerando a menor quantidade de informação filogenética do marcador COI e a ocorrência de possíveis polimorfismos populacionais ou substituições saturadas nesse gene (Pentinsaari et al., 2016).

No conjunto geral, a congruência entre ambas as análises indica que o gene COI conserva sinal filogenético suficiente para recuperar os principais agrupamentos evolutivos da família

Mytilidae, ainda que apresente pequenas variações nos ramos basais, como discutido em múltiplas revisões sobre o desempenho e as limitações do gene COI (Folmer et al., 1994; Hebert et al., 2003). Portanto, a árvore obtida neste trabalho valida, em grande parte, a estrutura filogenética proposta por Zhao et al. (2022), confirmando a robustez das relações observadas para as linhagens de interesse.

O agrupamento monofilético e bem sustentado de *L. fortunei*, aliado à sua posição congruente com a filogenia mitogenômica de Zhao et al. (2022), confirma a autenticidade e representatividade das sequências COI selecionadas neste trabalho. Todas as 165 amostras atribuídas a *L. fortunei* formaram um único clado, sem intercalação de sequências de outros táxons, o que indica confiabilidade para o uso dessas sequências como referência para o delineamento de primers específicos, voltados à detecção de *L. fortunei*. As regiões conservadas identificadas no alinhamento COI, associadas à clara separação filogenética em relação a espécies morfologicamente semelhantes como *L. curta*, garantem especificidade molecular.

Dessa forma, os resultados obtidos indicam que o conjunto de sequências COI de *L. fortunei* utilizado neste estudo é filogeneticamente consistente, taxonomicamente validado e tecnicamente apropriado para o desenho de primers, corroborando tanto a acurácia das identificações quanto a coerência com estudos genômicos recentes sobre a evolução de Mytilidae (Combosch & Giribet, 2016; Zhao et al., 2022).

4.2. INFERÊNCIA SOBRE O HISTÓRICO DE INVASÕES

A análise das 165 sequências do gene COI (citocromo c oxidase subunidade I) de *L. fortunei* resultou na identificação de 61 haplótipos distintos distribuídos em um fragmento de 509 pares de bases. Foram detectados 113 sítios polimórficos e 130 mutações, refletindo um nível moderado a elevado de variabilidade dentro da espécie, padrão já descrito para populações invasoras deste bivalve. A diversidade haplotípica ($H_d = 0,953 \pm 0,010$) e a diversidade nucleotídica ($\pi = 0,04964$), bem como o número médio de diferenças nucleotídicas entre pares de sequências ($k = 25,268$), foram extremamente semelhantes aos valores reportados por Ghabooli et al. (2013), que analisaram 164 amostras de COI provenientes da Ásia e da América do Sul e encontraram $H_d = 0,952$ e $\pi = 0,048$. A concordância entre os estudos demonstra que, mesmo com a ampliação da base de dados, incluindo sequências mais recentes depositadas no GenBank, o padrão genético global de *L. fortunei* permanece estável ao longo do tempo. Zhan et al. (2012), analisando populações sul-americanas, demonstraram que o mexilhão-dourado apresenta elevada conectividade genética mesmo em grandes distâncias, resultado de dispersão natural pelos cursos d'água e também de transporte humano, favorecendo a rápida homogeneização genética após a chegada de novos haplótipos.

A combinação de alta diversidade haplotípica com diversidade nucleotídica relativamente baixa indica um modelo evolutivo característico de expansão recente, no qual múltiplos haplótipos fundadores introduzidos em uma nova área acumulam mutações adicionais em torno de variantes ancestrais comuns, formando estruturas filogenéticas e redes haplotípicas em formato estelar (“star-like”). Esse padrão, observado com clareza na rede de haplótipos deste estudo (Figura 4), também foi destacado por Ghabooli et al. (2013) ao analisar a estrutura genética das populações nativas e invasoras do mexilhão-dourado. Em Aung et al. (2010), utilizando microssatélites, mostraram um padrão semelhante no DNA nuclear: mesmo marcadores mais informativos revelam baixa estruturação populacional e mistura intensa de linhagens, confirmando que as populações invasoras constituem um mosaico de variantes oriundas de distintas regiões asiáticas.

Estudos posteriores realizados no Brasil complementam essa perspectiva. No estudo de Furlan-Murari et al. (2019) demonstraram que populações de diferentes reservatórios brasileiros apresentam alta conectividade e baixa diferenciação, sugerindo dispersão secundária rápida dentro do continente. Resultados semelhantes foram obtidos por Ludwig et al. (2020), que identificaram fluxo gênico intenso entre bacias, reforçando que a estrutura genética do mexilhão-dourado na América do Sul é amplamente moldada pela mobilidade de embarcações e pela conectividade hidrológica. Esses estudos explicam por que, mesmo após mais de 25 anos da chegada de *L. fortunei* ao Rio da Prata, não há sinais de isolamento geográfico ou divergência continental entre os haplótipos do gene COI.

Embora os valores de diversidade sejam muito semelhantes entre os dois estudos (Tabela 2), a principal diferença observada foi o número absoluto de haplótipos, que quase dobrou (61 no presente estudo contra 32). Tal diferença pode ser explicada pela inclusão de novas sequências depositadas após 2013. Apesar disso, o padrão macroevolutivo permanece essencialmente o mesmo: uma elevada diversidade haplotípica com baixa diversidade nucleotídica, típica de invasões recentes sustentadas por múltiplas introduções independentes.

Tabela 2. Comparação com Ghabooli et al (2013) em relação aos valores de diversidade genética

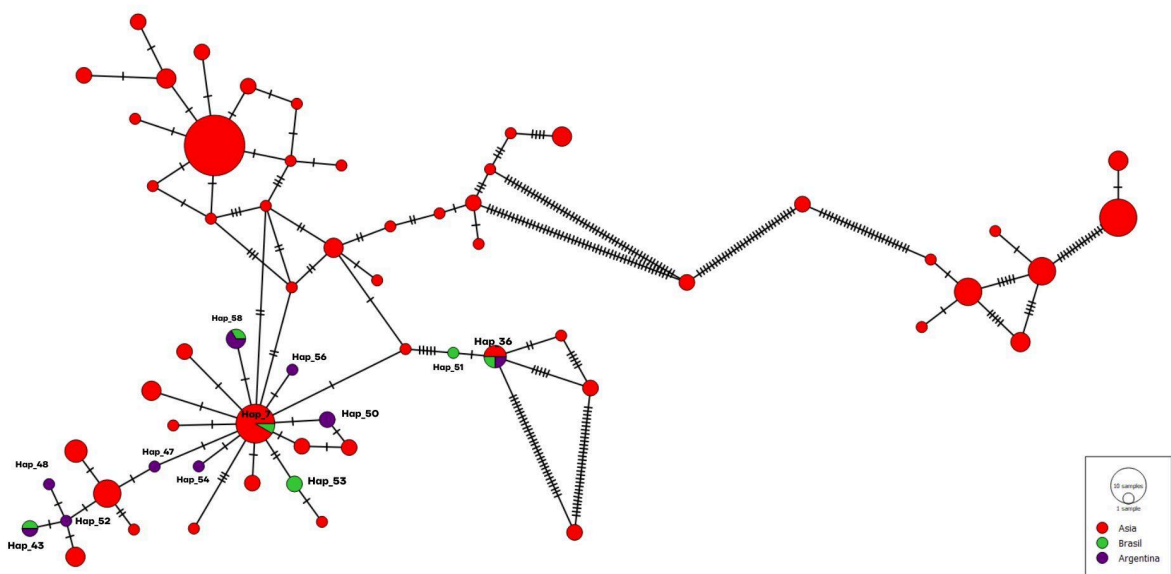
Parâmetro	Presente estudo	<i>Ghabooli et al., 2013</i>
n (sequências)	165	164
Tamanho do fragmento (pb)	509	510
H (Nº de haplótipos)	61	32

Hd (diversidade haplotípica)	0,953 ± 0,010	0,952
π (diversidade nucleotídica)	0,048	0,048
S (número de sítios segregantes)	113	110

Fonte: Autoria própria

A rede de haplótipos (Figura 4) revelou que as amostras sul-americanas analisadas foram alocadas predominantemente dentro de linhagens presentes no Leste Asiático, reproduzindo fielmente o padrão relatado por Ghabooli et al. (2013) e confirmando que as populações invasoras derivam principalmente de regiões como o norte da China e a Coreia. Dois haplótipos centrais (Hap_7 e Hap_36) surgiram como variantes ancestrais compartilhadas entre indivíduos asiáticos, brasileiros e argentinos. Esses haplótipos desempenham um papel equivalente aos haplótipos centrais descritos por Ghabooli (Lfm02, Lfm07 e Lfm36), dos quais derivam a maior parte dos demais haplótipos encontrados na América do Sul. O fato de ambos aparecerem em indivíduos de diferentes continentes evidencia que a colonização sul-americana não foi causada por um único evento fundador, mas sim por pelo menos duas introduções distintas de linhagens asiáticas, possivelmente associadas a diferentes episódios de transporte marítimo e descarga de água de lastro, uma conclusão idêntica à de Ghabooli et al. (2013).

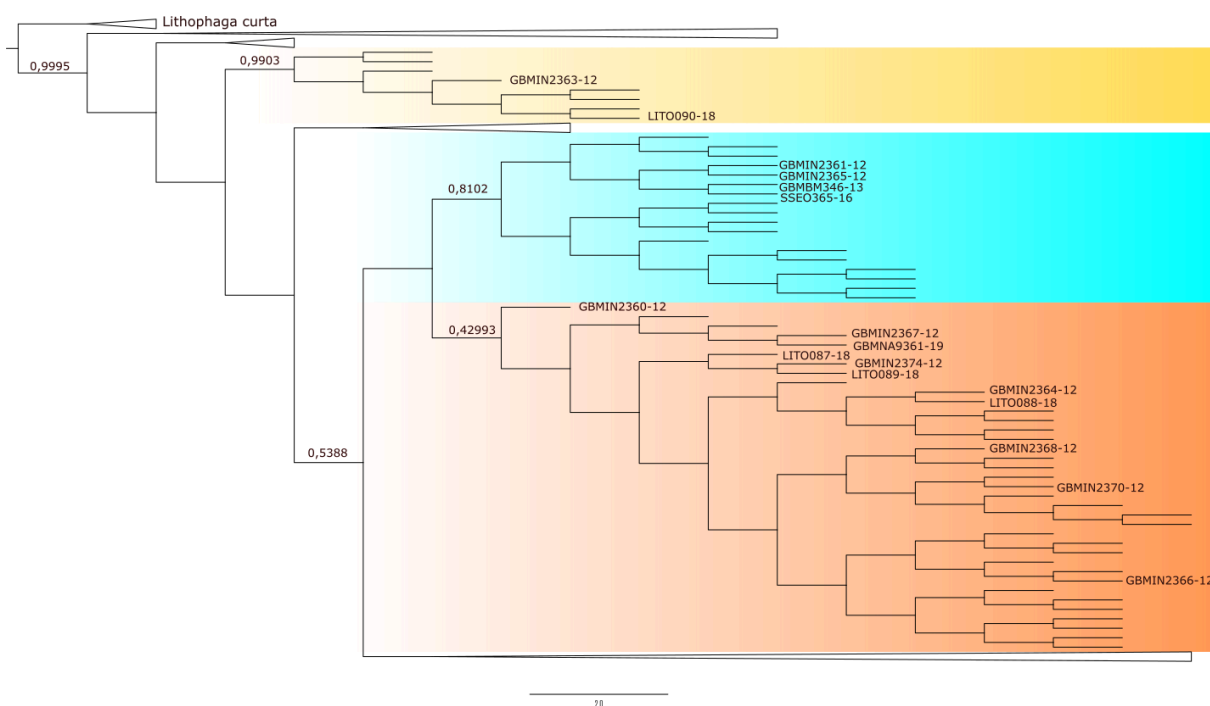
Figura 4. Rede haplotípica construída a partir das 165 sequências do *L. fortunei*



Fonte: Autoria própria

A árvore completa com todas as sequências (Figura 5) apresenta três agrupamentos visuais representados pelos clados em amarelo, azul e laranja. Nesses agrupamentos, apenas os códigos das sequências sul-americanas estão identificados, enquanto os ramos não identificados representam as sequências de continente asiático. À primeira vista, os clados coloridos poderiam sugerir a existência de três linhagens evolutivamente distintas. Contudo, somente o clado amarelo apresenta suporte estatístico robusto ($PP > 0,95$). Os clados azul e laranja exibem valores de posterioridade muito baixos, o que inviabiliza qualquer interpretação biogeográfica sólida baseada neles. Portanto, o aparente agrupamento não reflete três invasões independentes, mas sim limitações inerentes à resolução filogenética do gene COI para eventos de divergência recentes.

Figura 5. Árvore das sequências do gene COI de *L. fortunei* construída por inferência bayesiana



Fonte: Autoria própria

Apesar da presença de três agrupamentos visuais na árvore (representados pelas cores amarelo, azul e laranja), nenhum desses grupos corresponde a um clado composto exclusivamente por haplótipos sul-americanos. Em todos os casos, as sequências da América do Sul aparecem intercaladas entre haplótipos asiáticos, o que impede a identificação de linhagens continentais distintas. Mesmo o agrupamento com maior suporte ($PP > 0,99$) inclui haplótipos de origem asiática, mostrando que esse suporte elevado não reflete um processo de diversificação local, mas sim relações curtas entre haplótipos com

baixa divergência geral. Esse resultado é idêntico ao reportado por Ghabooli et al. (2013), que também não recuperaram clados exclusivos da América do Sul ao analisar COI. A ausência de agrupamentos exclusivos reforça que as populações sul-americanas derivam de múltiplas introduções asiáticas recentes e permanecem geneticamente misturadas com seus haplótipos de origem, sem tempo evolutivo suficiente para formar linhagens diferenciadas detectáveis pelo marcador COI. A interpretação correta dos clados indica que o clado amarelo representa haplótipos sul-americanos derivados, resultado de diversificação pós-introdução; o clado azul corresponde a uma mistura instável de haplótipos asiáticos e sul-americanos com suporte insuficiente para representar uma linhagem evolutiva distinta; e o clado laranja reúne haplótipos asiáticos profundamente divergentes, refletindo apenas a alta diversidade nativa do Leste Asiático, também descrita por Ghabooli et al. (2013). Assim, apesar da aparência visual, não há suporte estatístico ou filogenético consistente para a hipótese de uma terceira invasão.

Um fator adicional que limita a capacidade de inferir o histórico invasivo com maior precisão é o forte desequilíbrio amostral presente no conjunto analisado: apenas 17 das 165 sequências (cerca de 10%) correspondem a amostras da América do Sul, enquanto o restante provém de coletas asiáticas. Esse viés reduz drasticamente a densidade de representação dos haplótipos sul-americanos nas análises, podendo tanto obscurecer relações internas quanto criar artefatos filogenéticos decorrentes da baixa diversidade amostral continental. A elevada divergência observada entre alguns haplótipos exclusivos da América do Sul pode ser consequência tanto de diversificação local quanto de uma amostragem insuficiente que impede a identificação das variantes intermediárias. Assim, embora os padrões gerais indiquem múltiplas introduções, a força da evidência em favor dessa hipótese é mais limitada neste estudo do que no original, devido à discrepância na representatividade geográfica das sequências disponíveis.

Ao integrar os resultados deste estudo com o histórico documentado da invasão, é possível observar uma correspondência direta entre os padrões moleculares e a trajetória geográfica de expansão do mexilhão-dourado nas últimas décadas. O primeiro registro confirmado na América do Sul ocorreu entre 1991 e 1998 na Argentina, e a espécie avançou rapidamente pelos sistemas Paraguai–Paraná–Uruguai até atingir o Brasil. A presença de haplótipos argentinos e brasileiros misturados tanto na rede quanto na filogenia, especialmente aqueles relacionados a Hap_7 e Hap_36, confirma que ambos os países compartilham as mesmas linhagens fundadoras. A elevada conectividade haplotípica entre amostras dos dois países é consistente com a dispersão ascendente rio acima e com a ausência de barreiras genéticas significativas após a introdução inicial. Esse padrão reforça o cenário de múltiplas introduções asiáticas seguido de rápida expansão demográfica e geográfica.

Em síntese, os resultados obtidos neste estudo reforçam e ampliam as conclusões de Ghabooli et al. (2013): a invasão sul-americana de *L. fortunei* foi sustentada por múltiplas introduções independentes originadas na Ásia, resultando em uma diversidade genética elevada e em uma rede haplotípica de padrão estelar. A filogenia completa não fornece suporte para a hipótese de uma terceira introdução e confirma que o conjunto atual de haplótipos sul-americanos deriva de duas principais linhagens fundadoras asiáticas, representadas aqui por Hap_7 e Hap_36.

4.3. DEFINIÇÃO DOS PRIMERS E TESTES *IN VITRO*

4.3.1. RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DE DNA

Os métodos de extração de DNA avaliados — Aljanabi & Martinez (1997) (Protocolo A) e Lopera-Barrero et al. (2018) (Protocolo B) — apresentaram diferenças expressivas tanto no rendimento quanto nos parâmetros de pureza, conforme mostrado na Tabela 3. No Protocolo A, as amostras obtiveram concentrações de 304 ng/μL (A.1) e 170 ng/μL (A.2), com razões 260/280 de 1,99 a 2,18 e razões 260/230 de 1,66 a 1,82. Esses valores situam-se próximos ao intervalo considerado ideal para DNA genômico, indicando baixa presença de proteínas, fenóis, polissacarídeos ou sais residuais. No Protocolo B, as concentrações atingiram 417 ng/μL (B.1) e 137 ng/μL (B.2); entretanto, as razões 260/280 (1,54–1,73) e, principalmente, 260/230 (0,54–0,66) foram inferiores ao recomendado, sugerindo maior contaminação por compostos orgânicos e inibidores comuns em tecidos de moluscos filtradores.

Tabela 3. Medidas do biofotômetro para o DNA extraído das amostras de mexilhão-dourado

Protocolos	ng/uL	260/280	260/230
Protocolo A.1	304	1,99	1,66
Protocolo A.2	170	2,18	1,82
Protocolo B.1	417	1,54	0,66
Protocolo B.2	137	1,73	0,54

Fonte: Autoria própria

Embora o Protocolo B tenha produzido a maior concentração individual, a pureza inferior é um indicativo relevante, uma vez que contaminantes como polissacarídeos, proteínas e resíduos de tampão podem interferir diretamente na eficiência de etapas subsequentes, especialmente na amplificação por PCR. Isso é particularmente crítico para organismos como o mexilhão-dourado, cujo tecido frequentemente incorpora substâncias que dificultam a remoção completa de impurezas. Já o Protocolo A, apresentou melhor equilíbrio entre

rendimento e pureza, o que é consistente com descrições da literatura apontando sua eficiência na remoção de proteínas e compostos interferentes em organismos com alto teor de biomoléculas complexas. Apesar da variação de concentração entre as amostras, todos os valores obtidos pelo Protocolo A indicam ser suficientes para análises moleculares, uma vez que a PCR requer quantidades relativamente pequenas de DNA.

4.3.2. ANÁLISE DOS PRIMERS SELECIONADOS

A análise dos primers desenhados para amplificação do gene COI de *Limnoperna fortunei* gerou dois pares distintos que podem ser visualizados na Tabela 4: um par de minibarcode e um par de barcode padrão, cuja eficiência potencial foi avaliada com base nos parâmetros termodinâmicos e estruturais fornecidos pelo Primer3Plus. Esses parâmetros são amplamente utilizados na literatura como indicadores de especificidade, estabilidade estrutural e eficiência da amplificação (Untergasser et al., 2012; Koressaar; Remm, 2007).

Tabela 4. Primers definidos para identificação específica do mexilhão-dourado

Primer para Minibarcode					
Nome	Primer	Tamanho	Tm	Gene	Amplicon
LF_COI_F1	ACCCAGCAGTTGACATAGC	20bp	60	COI	125
LF_COI_R1	AAACGCTCACCACGCATTTC	20bp	60	COI	125
Primer para Barcode					
Nome	Primer	Tamanho	Tm	Gene	Amplicon
LF_COI_F2	TAACTGGGTTTTGGGCTGGG	20bp	60,2	COI	675
LF_COI_R2	ACACGTACACCTCTGGATGC	20bp	59,8	COI	675

Fonte: Autoria própria

Ambos os pares apresentaram valores de Tm muito próximos de 60 °C. Esse intervalo é considerado ideal para reações de PCR padrão, pois favorece o pareamento específico entre primers e molde (Dieffenbach; Lowe; Dveksler, 1995). Segundo Untergasser et al. (2012), Tm semelhantes entre os primers forward e reverse reduzem a formação de dímeros e minimizam o risco de anelamento assimétrico. Assim, todos os primers atenderam ao critério recomendado, reforçando a adequação dos pares para amplificação consistente.

O conteúdo GC situou-se entre 50–55%, faixa amplamente recomendada para garantir estabilidade moderada da dupla-hélice sem comprometer a eficiência da desnaturação (Dieffenbach; Lowe; Dveksler, 1995). Regiões com GC acima de 60% tendem a formar estruturas secundárias estáveis, enquanto valores muito baixos (>30%) prejudicam a hibridização. Logo, os valores aqui obtidos são altamente satisfatórios para PCR.

Todos os primers apresentaram Any = 0,0 e HP = 0,0, indicando ausência de complementaridade interna e inexistência de estruturas secundárias previstas. De acordo com Koressaar e Remm (2007), valores baixos ou nulos reduzem o risco de formação de dímeros e hairpins, os quais comprometem a eficiência e a especificidade da reação. Esses resultados mostram que os primers possuem excelente conformação linear, favorecendo a amplificação.

A estabilidade térmica na extremidade 3' é considerada um dos parâmetros mais críticos na avaliação de primers, pois o 3' é o ponto de extensão da DNA polimerase. Valores excessivamente altos (>6 kcal/mol) favorecem a formação de dímeros 3'-3' e annealing inespecífico, enquanto valores muito baixos podem prejudicar a estabilidade do pareamento (SantaLucia, 1998).

Os valores obtidos foram: Minibarcodes: 3,0 (F) e 2,2 (R); Barcode: 4,5 (F) e 3,9 (R).

Todos se mantiveram na faixa recomendada (2–5 kcal/mol), indicando estabilidade adequada. Contudo, observa-se que os primers do barcode apresentam 3'-stab ligeiramente superiores, sugerindo maior tendência a formar pares estáveis, o que pode aumentar levemente o risco de dímeros quando comparados ao minibarcodes. Mesmo assim, permanecem dentro do limite aceitável.

O valor de *Penalty* sintetiza todos os parâmetros acima, indicando quão próximo o primer está das condições ideais definidas no algoritmo (Untergasser et al., 2012). Valores mais baixos representam maior qualidade. Os valores encontrados foram: Minibarcodes: 0.035 (F) e 0.040 (R); Barcode: 0.179 (F) e 0.247 (R).

Os primers minibarcodes apresentaram valores substancialmente menores, refletindo maior conformidade com as condições ótimas. Isso sugere que esse par possui maior eficiência potencial e maior confiabilidade termodinâmica quando comparado ao par barcode padrão.

Diversos estudos atestam a robustez do Primer3 e suas ferramentas derivadas, como o Primer3Plus. O software é amplamente utilizado em estudos de biologia molecular, apresentando elevada taxa de acerto na predição de primers funcionais (Untergasser et al., 2012; Koressaar; Remm, 2007; Davis et al., 2013). Esses trabalhos demonstram que os parâmetros utilizados incluindo T_m, conteúdo GC, complementaridade interna e estabilidade do 3' correlacionam-se diretamente com o desempenho experimental. Assim, os resultados obtidos aqui podem ser considerados confiáveis e indicativos de que ambos os pares possuem alto potencial de eficiência em PCR.

A análise integrada dos parâmetros demonstra que ambos os pares de primers possuem características adequadas para uso em PCR, porém o par minibarcodes apresenta qualidade superior devido ao menor score de *Penalty*, menor estabilidade 3' e maior conformidade com a configuração ideal do algoritmo. Em aplicações que demandam elevada especificidade, quantidades reduzidas de DNA ou amostras degradadas, comuns em DNA ambiental. O

minibarcodes tendem a ser mais eficientes, como já discutido em estudos que mostram melhor desempenho de regiões curtas de COI em amostras de baixa qualidade (Hajibabaei et al., 2006).

Em complemento às análises dos parâmetros obtidos no Primer3Plus, os primers foram comparados tanto com as sequências originais de *L. fortunei* quanto com sequências de *L. curta*, espécie mais filogeneticamente próxima. No alinhamento com as 165 sequências de *L. fortunei*, o primer forward do minibarcodes apresentou compatibilidade total com 118 sequências, enquanto as demais exibiram até três nucleotídeos divergentes. Dessas diferenças de nucleotídeo, uma delas ocorreu próxima à extremidade 3', envolvendo uma variação A/G; entretanto, a base adotada no primer (A) representa 141 das sequências avaliadas, reduzindo a probabilidade de um mismatch crítico nessa região. Essa característica é relevante, uma vez que mismatches próximos ao 3' são reconhecidamente os mais prejudiciais à eficiência de amplificação, podendo até impedir a extensão da DNA polimerase (KWOK et al., 1990; STADHOUDERS et al., 2010). Para o primer reverse do minibarcodes, observou-se compatibilidade total com 123 sequências e divergências de no máximo dois nucleotídeos, nenhuma delas na extremidade 3'. Para os primers do barcode, ambos apresentaram compatibilidade total com todas as sequências utilizadas para gerar o consenso.

Nos alinhamentos com *L. curta*, verificou-se um número de diferenciações esperadas. Para o minibarcodes, os primers forward e reverse apresentaram diferenças de 11 pb e 4 pb, respectivamente; para o barcode, observaram-se 10 pb e 2 pb de diferença. Em ambos os primers forward, múltiplas divergências localizaram-se próximas à região 3', reforçando a especificidade dos oligos para *L. fortunei* e a baixa probabilidade de amplificação cruzada, uma vez que mais de um mismatch na extremidade 3' reduz drasticamente a formação do produto. Esses resultados indicam que os primers projetados apresentam alta compatibilidade intraespecífica e boa capacidade discriminatória em relação à espécie mais próxima. Por fim, um BLAST realizado no NCBI indicou que os primers identificavam 100% para *L. fortunei* e nenhum outro Mytilidae foi identificado.

4.3.3. RESULTADO DA PCR

A tentativa de amplificação utilizando o protocolo clássico de Folmer et al. (1994) não resultou em produto específico para nenhuma das amostras testadas com nenhum dos dois pares de primers desenvolvidos neste estudo, mesmo após realização de gradiente de temperatura de anelamento. A amplificação do gene mitocondrial COI por PCR convencional, utilizando os primers desenvolvidos neste estudo, não apresentou sucesso em nenhuma das condições testadas, até o momento. Foram avaliadas duas concentrações

distintas de DNA template (20 ng/uL e 5 ng/uL) e um gradiente amplo de temperaturas de anelamento (40–60 °C), porém nenhum dos ensaios resultou em produto amplificado detectável. O insucesso sistemático, mesmo em condições permissivas, sugere que a falha não está relacionada apenas ao ajuste de parâmetros da reação, mas a limitações mais fundamentais associadas ao desenho dos primers, à qualidade e integridade do DNA alvo e à própria variabilidade genética da espécie.

A literatura sobre *L. fortunei* demonstra que a amplificação bem-sucedida do COI depende fortemente de primers desenhados e validados empiricamente em diferentes populações. Pie et al. (2006) desenvolveram primers específicos capazes de detectar até mesmo uma única larva em amostras de plâncton, evidenciando alta sensibilidade e especificidade. De modo semelhante, Endo, Yokoyama e Kobayashi (2009) criaram um protocolo de qPCR para quantificação de larvas utilizando também o gene COI, obtendo amplificação consistente e ausência de produtos inespecíficos. Esses trabalhos indicam que a eficiência depende de sequências de referência abrangentes e representativas da diversidade genética do invasor.

No presente estudo, apesar de os primers apresentarem características físico-químicas adequadas segundo análises computacionais (T_m equilibrado, proporção GC moderada e ausência de estruturas secundárias severas), é provável que a ausência de amplificação esteja relacionada à incompatibilidade entre os primers desenvolvidos e variantes reais do gene COI presentes nas populações analisadas. Embora os primers tenham sido desenhados a partir de sequências depositadas em bancos de dados públicos, essas sequências nem sempre representam adequadamente a diversidade genética intraespecífica da espécie, especialmente em populações invasoras submetidas a múltiplos eventos de introdução e expansão. Polimorfismos nucleotídicos nas regiões de anelamento dos primers, particularmente próximos à extremidade 3', podem comprometer o pareamento primer–molde e reduzir significativamente a eficiência da PCR, mesmo quando o alvo molecular está presente no DNA extraído. Assim, a variabilidade genética intraespecífica do gene COI pode ter contribuído para a falha de amplificação observada, reforçando a necessidade de considerar múltiplos haplótipos e sequências representativas no desenho de primers para estudos de detecção molecular. Estudos posteriores reforçam essa variabilidade: Endo, Yokoyama e Kobayashi (2009), ao desenvolverem primers para qPCR, destacaram a necessidade de alinhar múltiplas sequências de COI para evitar precisamente esse tipo de incompatibilidade. De forma mais recente, Ito e Shibaike (2021), trabalhando com eDNA, demonstraram que pequenas diferenças nucleotídicas entre haplótipos podem afetar de modo significativo a eficiência de detecção, especialmente quando os primers não são validados em populações locais. Assim, a ausência completa de amplificação em todas as condições experimentais observada neste estudo é compatível com o cenário de

mismatches críticos, especialmente na extremidade 3', que impedem a extensão pela Taq polimerase.

Outro fator importante, em relação aos primers da região barcode diz respeito ao comprimento do fragmento selecionado (~675 pb), sensivelmente maior que os fragmentos utilizados em protocolos bem-sucedidos para a espécie, que geralmente variam entre 100–300 pb (PIE et al., 2006; ENDO; YOKOYAMA; KOBAYASHI, 2009). Fragmentos longos são mais sensíveis à degradação natural do DNA, especialmente em amostras ambientais ou de plâncton. Caso o DNA esteja fragmentado, a probabilidade de moléculas intactas suficientemente longas para suportar a amplificação completa diminui substancialmente.

Além disso, as amostras podem conter inibidores da PCR, como polissacarídeos, compostos fenólicos, mucinas ou resíduos de reagentes de extração, frequentemente encontrados em tecidos de bivalves e em plâncton. Mesmo concentrações aparentemente adequadas de DNA total podem mascarar uma baixa proporção de DNA mitocondrial efetivamente amplificável. Protocolos como os de Pie et al. (2006) e Endo, Yokoyama e Kobayashi (2009), em contraste, foram otimizados especificamente para DNA de alta integridade extraído de larvas ou tecidos, o que reduz significativamente esse tipo de interferência.

No contexto deste estudo, é relevante considerar que a maioria das sequências disponíveis em bancos de dados públicos para *L. fortunei* é de origem asiática, enquanto as amostras analisadas nesta pesquisa são provenientes do Brasil. Essa discrepância geográfica pode ter influenciado a seleção da região-alvo durante o desenho dos primers, uma vez que populações introduzidas frequentemente apresentam padrões próprios de variação genética em comparação às populações nativas. Diversos estudos apontam que populações invasoras podem sofrer gargalos genéticos, efeitos de fundador e processos de seleção local, resultando em diferenças nas frequências haplotípicas e até mesmo em mutações específicas de determinadas regiões invadidas (FICETOLA et al., 2008). No caso de *L. fortunei*, análises filogeográficas demonstram clara diferenciação entre haplótipos asiáticos e aqueles que se estabeleceram na América do Sul, sugerindo que a diversidade genética presente nas populações brasileiras representa apenas um subconjunto da variabilidade encontrada nas regiões de origem (GHABOOLI et al., 2013).

Dessa forma, ao utilizar majoritariamente sequências asiáticas para o alinhamento inicial e seleção de regiões conservadas, existe o risco de que os primers projetados apresentem menor compatibilidade com haplótipos brasileiros, especialmente se mutações específicas tiverem se fixado após o processo de invasão, e como pode ser visualizado na figura 4 e nos estudos de Ghabooli et al (2013), a existência de haplótipos exclusivos da América do Sul já está estabelecido. Portanto, a predominância de sequências asiáticas no banco de dados pode ter direcionado o algoritmo de design a regiões conservadas que não correspondem perfeitamente às variantes brasileiras, trazendo potenciais implicações para o desempenho

dos primers. Isso reforça a importância de incorporar sequências locais ou regionais sempre que possível, a fim de garantir a representatividade da diversidade genética da população alvo.

A comparação com estudos recentes reforça essa interpretação. Ito e Shibaïke (2021), ao utilizarem eDNA para detectar *L. fortunei* em ambientes naturais, observaram que apenas primers já validados em populações reais foram capazes de produzir resultados consistentes. A necessidade de abranger a diversidade genética do invasor, incluindo diferentes haplótipos e linhagens geográficas, é destacada por múltiplos autores e se aplica diretamente ao caso analisado.

Dessa forma, os resultados demonstram que a ausência de amplificação observada neste estudo pode decorrer principalmente de:

- (i) incompatibilidade entre os primers e a diversidade genética real do COI;
- (ii) escolha de um fragmento longo, pouco tolerante à degradação;
- (iii) possível presença de inibidores ou baixa proporção de DNA-alvo;
- (iv) falta de validação empírica dos primers antes da aplicação em amostras ambientais.

Essas limitações indicam que futuras etapas devem priorizar regiões conservadas, fragmentos curtos (minibarcodes), inclusão de maior diversidade de sequências no alinhamento referência e testes preliminares com DNA de populações locais. Essa abordagem está alinhada às práticas recomendadas por Pie et al. (2006), Endo, Yokoyama e Kobayashi (2009) e Ito e Shibaïke (2021), que obtiveram resultados positivos utilizando primers validados e alvos curtos e robustos, compatíveis com a realidade biológica e genética do mexilhão-dourado.

5. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de primers eficientes para a amplificação do gene mitocondrial COI de *L. fortunei* depende de maneira direta da qualidade e abrangência das informações genéticas utilizadas como base. A disponibilidade crescente de sequências em bancos públicos, como GenBank e BOLD, possibilita que pesquisadores explorem a diversidade intraespecífica e identifiquem regiões mais conservadas e adequadas ao desenho de primers. Esses bancos de dados são essenciais para espécies invasoras como *L. fortunei*, cuja estrutura genética pode variar significativamente entre populações nativas asiáticas e populações introduzidas na América do Sul. A representatividade das sequências depositadas influencia a robustez do alinhamento inicial e, conseqüentemente, a precisão na escolha da região-alvo, o que reforça a necessidade de atenção ao contexto geográfico das sequências utilizadas.

Nesse sentido, as ferramentas de bioinformática gratuitas e amplamente validadas desempenham papel fundamental. Softwares como Primer3Plus, MEGA, Ugene e outros auxiliam no processamento de grandes volumes de dados, identificando regiões conservadas, avaliando parâmetros termoquímicos e prevendo estruturas secundárias que poderiam comprometer a amplificação. O uso dessas ferramentas democratiza o acesso à análise molecular, permite a reprodutibilidade dos métodos e garante que o desenho inicial dos primers siga critérios objetivos de qualidade, como equilíbrio de Tm, ausência de complementaridade interna e tamanho adequado do fragmento amplificado. Para estudos envolvendo eDNA, organismos invasores ou amostras ambientalmente degradadas, esses recursos se tornam ainda mais valiosos ao possibilitar a criação de minibarcodes ou fragmentos curtos, mais tolerantes à fragmentação natural do material genético.

Apesar dessas vantagens, o presente estudo evidencia de forma clara que nenhuma abordagem exclusivamente *in silico* é suficiente para garantir o sucesso da amplificação. O desempenho real dos primers depende, em última instância, de sua interação com o DNA alvo nas condições experimentais específicas do laboratório. Mismatches em regiões críticas, degradação do DNA, presença de inibidores e particularidades genéticas das populações analisadas são fatores que não podem ser plenamente antecipados apenas por predições computacionais. Assim, os testes *in vitro* continuam sendo a etapa decisiva para validar ou descartar primers projetados, confirmando se eles são de fato compatíveis com o material biológico e com o contexto ecológico das amostras estudadas.

Portanto, conclui-se que o uso integrado de bancos de dados genéticos abrangentes e ferramentas de bioinformática confiáveis constitui a base necessária para o desenho racional de primers para o gene COI de *L. fortunei*, especialmente em estudos que visam a detecção molecular da espécie em ambientes naturais. No entanto, a etapa experimental permanece indispensável para confirmar a adequação dos primers às populações-alvo e às condições reais de análise. O equilíbrio entre rigor computacional e validação empírica representa, assim, a estratégia mais eficaz para garantir sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade em estudos de diagnóstico molecular envolvendo o mexilhão-dourado.

Como perspectivas para estudos futuros, recomenda-se a realização de novas testagens experimentais dos primers desenvolvidos, incorporando ajustes metodológicos que possam aumentar a eficiência de amplificação, como a utilização preferencial de DNA extraído do músculo adutor, a aplicação de etapas adicionais de purificação e a avaliação de diferentes concentrações de DNA template e aditivos neutralizadores de inibidores. Adicionalmente, o redesenho dos primers pode ser considerado, e se for o caso, deve priorizar o uso de sequências do gene COI provenientes de populações sul-americanas de *Limnoperna fortunei*, uma vez que estas refletem de forma mais adequada a variabilidade genética das populações atualmente estabelecidas na região de interesse. Paralelamente, a inclusão

deliberada de sequências de espécies filogeneticamente próximas da família Mytilidae nos alinhamentos iniciais pode contribuir para a identificação de regiões diagnósticas exclusivas do mexilhão-dourado, aumentando a especificidade dos primers e reduzindo o risco de amplificação cruzada com táxons relacionados. A adoção de estratégias complementares, como o desenvolvimento de primers degenerados ou o direcionamento para regiões alternativas do genoma mitocondrial, também se apresenta como uma abordagem promissora para aprimorar a sensibilidade e a robustez da detecção molecular dessa espécie invasora. Dessa forma, a continuidade do trabalho poderá contribuir para o fortalecimento de ferramentas moleculares aplicadas ao monitoramento e ao controle de *L. fortunei* em ambientes aquáticos.

6. REFERÊNCIAS

- ALBERDI, A. et al. Promises and pitfalls of using high-throughput sequencing for diet analysis. *Molecular Ecology Resources*, v. 19, n. 2, p. 327–348, 2019.
- ALJANABI, Salah M.; MARTINEZ, Iciar. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- AMARAL, Q. D. F. et al. Golden mussel (*Limnoperna fortunei*) as a bioindicator in aquatic environments contaminated with mercury: cytotoxic and genotoxic aspects. *Science of the Total Environment*, v. 675, p. 343–353, 2019.
- ANDRADE, Patricia Dammski Borges de; RAZZOLINI, Emanuel; BAGGIO, Rafael Antunes. I See Golden Mussel! They are Everywhere! Environmental DNA Supports Widespread Dissemination of *Limnoperna fortunei* in Hydrographic Basins in the Paraná State, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 64, p. e21210149, 2021.
- ANTIL, S. et al. DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review. *Molecular Biology Reports*, v. 50, n. 1, p. 761–775, 2023
- AUNG, O. et al. Microsatellite DNA markers for the golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Molecular Ecology Resources*, 2010.
- AVELAR, W. E. P.; MARTIM, S. L.; VIANNA, M. P. A new occurrence of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1856) (Bivalvia, Mytilidae) in the State of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology (Impresso)*, v. 64, n. 4, p.739-742, 2004.
- BAEZA, J. A. et al. Mitochondrial genome rearrangements in Mytilidae (Bivalvia: Mytilida). *Gene*, v. 694, p. 123–134, 2019. DOI: 10.1016/j.gene.2019.01.034.
- BESSEN, M. A. Bioaccumulation of metals and evaluation of golden mussels encrusted on different screens of net cages. *Boletim do Instituto de Pesca / BIP*, 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima. 6. Relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica: Brasil. Brasília, DF, 2023.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Estratégia Nacional para Espécies Exóticas Invasoras: Folder Institucional. Brasília: MMA, 2021. Disponível em: <https://proespecies.eco.br/wp-content/uploads/2021/04/Folder-Institucional-ENEEL.pdf>. Acesso em: 04 dez. 2024.

BOLTOVSKOY, Demetrio. Distribution and colonization of *Limnoperna fortunei*: special traits of an odd mussel. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*, p. 301-311, 2015.

BOLTOVSKOY, Demetrio et al. Reproductive output and seasonality of *Limnoperna fortunei*. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*, p. 77-103, 2015.

BOLTOVSKOY, Demetrio; CATALDO, Daniel H. Population dynamics of *Limnoperna fortunei*, an invasive fouling mollusc, in the lower Paraná River (Argentina). *Biofouling*, v. 14, n. 3, p. 255-263, 1999.

BOLTOVSKOY, D.; KARATAYEV, A. Y.; BURLAKOVA, L. E.; CATALDO, D. H.; KARATAYEV, V. A. Significant ecosystem-wide effects of the swiftly spreading invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei*. *Hydrobiologia*, Dordrecht, v. 636, n. 1, p. 271–284, 2009.

BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 27, n. 8, p. 1767-1780, 1999.

BUJES, C. S.; ELY, I.; VERRASTRO, L. *Trachemys dorbigni* (Brazilian Slider) diet. *Herpetological Review*, v. 38, n. 3, p. 335, 2007.

CAMPOS, M. C. S.; LANZER, R.; CASTRO, P. T. Hydrological stress as a limiting factor of the invasion of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) in the Upper Paraná River (Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*. v. 24, n. 1, p. 64-82, 2012.

CDB. Convenção da diversidade biológica, 1992

CARDOSO, Cibele da Costa. Predadores ou dispersores? A relação do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Bivalvia, Mytilidae) com quatro espécies de quelônios (Reptília, Testudines) da planície costeira do Brasil subtropical. 2014.

CATALDO, Daniel. Trophic relationships of *Limnoperna fortunei* with adult fishes. *Limnoperna fortunei: The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*, p. 231-248, 2015.

- COLLYER, Wesley. Água de lastro, bioinvasão e resposta internacional. *Revista Jurídica da Presidência*, v. 9, n. 84, p. 145-160, 2007.
- COLGAN, D. J.; DA COSTA, P. Invasive and non-invasive lineages in *Xenostrobus* (Bivalvia: Mytilidae). *Molluscan Research*, v. 33, n. 4, p. 272-280, 2013.
- COMBOSCH, David J.; GIRIBET, Gonzalo. Clarifying phylogenetic relationships and the evolutionary history of the bivalve order Arcida (Mollusca: Bivalvia: Pteriomorphia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 94, p. 298-312, 2016.
- COSTA, Juliana Mara et al. Incrustação de mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* em tanques-rede. *Revista Cultivando o Saber*, v. 5, n. 2, p. 37-46, 2012.
- COX, G. W. Alien Species and Evolution: The Evolutionary Ecology of Exotic Plants, Animals, Microbes, and Interacting Native Species. COX, G. (Ed.). Washington DC: Island press, 2004. 377p. Illustrated edition.
- DARRIGAN, G. & DRAGO, I. E. 2000. "Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in South America". *The Nautilus* 114(2):69–73. 2007
- DARRIGRAN, Gustavo; DAMBORENEA, Cristina. Introdução a biologia das invasões. DARRIGRAN GA; DAMBORENEA, O. Mexilhão dourado na América do Sul: biologia, dispersão, impacto, prevenção e controle. São Carlos: Editora Cubo. 245p, 2009.
- DE SALLE, R.; GOLDSTEIN, P. DNA barcoding and taxonomy: from identification to discovery. *Molecular Ecology Resources*, v. 19, n. 1, p. 1–4, 2019.
- DEINER, K. et al. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, v. 26, n. 21, p. 5872–5895, 2017.
- DIEFFENBACH, C. W.; LOWE, T. M. J.; DVEKSLER, G. S. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*, v. 3, p. S30–S37, 1995.
- DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, v. 7, p. 214, 2007.
- ENDO, N.; YOKOYAMA, Y.; KOBAYASHI, T. A molecular based method for the detection and quantification of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Plankton & Benthos Research*, v. 4, n. 3, p. 125–128, 2009.
- FICETOLA, G. F. et al. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, v. 4, n. 4, p. 423–425, 2008.

FOLMER O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994 Oct;3(5):294-9. PMID: 7881515.

FURLAN-MURARI, P. J. et al. Structure and genetic variability of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) populations from Brazilian reservoirs. *Ecology and Evolution*, 2019.

FUSARI, Lívia M.; ROQUE, Fábio O.; HAMADA, Neusa. Sponge-dwelling Chironomids in the upper Paraná River (Brazil): Little known but potentially threatened species. *Neotropical Entomology*, 2008, 37: 522-527.

GARCÍA, Mirta Lidia et al. Los peces depredadores de *Limnoperna fortunei* en los ambientes colonizados. 2006.

GAZULHA, V., et al. Feeding behavior of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) under exposure to toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Brazilian Journal of Biology*, 2012, 72: 41-49.

Gazulha, V., Mansur, M. C. D., Cybis, L. F., & Azevedo, S. M. F. O. (2012). Grazing impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) on single-celled, colonial and filamentous cyanobacteria. *Brazilian Journal of Biology*, 72, 33-39.

GELLER, J.; MEYER, C.; PARKER, M.; HAWK, H. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources*, v. 13, p. 851–861, 2013

GHABOOLI S, Zhan A, Sardiña P, Paolucci E, Sylvester F, Perepelizin PV, et al. (2013) Genetic Diversity in Introduced Golden Mussel Populations Corresponds to Vector Activity. *PLoS ONE* 8(3): e59328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059328>

GIGLIO, M. L.; MANSUR, M. C. D.; DAMBORENEA, C.; PENCHASZADEH, P. E.; DARRIGRAN, G. Reproductive pattern of the aggressive invader *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) in South America. *Invertebrate reproduction and Development*, v. 60, p. 175-184, 2016.

GISSI, C.; IANNELLI, F.; PESOLE, G. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, v. 101, n. 4, p. 301–320, 2008.

GUO, M. et al. Life barcoded by DNA barcodes. *Conservation Genetics Resources*, v. 14, n. 4, p. 351–365, 2022.

HAJIBABAEI, M. et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 4, p. 968–971, 2006.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; deWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HEBERT, Paul DN; RATNASINGHAM, Sujeevan; DE WAARD, Jeremy R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2003, 270.suppl_1: S96-S99.

HEBERT, P. D. N. et al. A Sequel to Sanger: amplicon sequencing that scales. *BMC Genomics*, v. 19, art. 219, 2018.

HILBISH, Thomas J. et al. Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of transequatorial migration. *Marine Biology*, v. 136, n. 1, p. 69-77, 2000.

HO, V. T. et al. Comparison of matK and rbcL DNA barcodes for genetic classification of jewel orchid accessions in Vietnam. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 19, art. 93, 2021.

ITO, K.; SHIBAIKE, H. Use of environmental DNA to survey the distribution of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* in farm ponds. *Plankton & Benthos Research*, v. 16, n. 2, p. 72-78, 2021.

IUMMATO, M. M. et al. Biochemical responses of the golden mussel *Limnoperna fortunei* under dietary glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 163, p. 69-75, 2018.

KOCHER, T. D. et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, n. 16, p. 6196-6200, 1989.

KORESSAAR, T.; REMM, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, v. 23, n. 10, p. 1289-1291, 2007.

KUMAR S, STECHER G, SULESKI M, SANDERFORD M, SHARMA S, and TAMURA K (2024) Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution* 41:1-9.

KWOK, S. et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 4, p. 999-1005, 1990.

- LEE, Y. S. et al. A mitochondrial genome phylogeny of Mytilidae (Bivalvia: Mytilida). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 139, p. 106526, 2019. DOI: 10.1016/j.ympev.2019.106526.
- LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 2016.
- LINARES, Marden Seabra; CALLISTO, Marcos; MARQUES, João Carlos. Invasive bivalves increase benthic communities complexity in neotropical reservoirs. *Ecological Indicators*, 2017, 75: 279-285.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; SILVA LOPES, T. 2008 Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sódio. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1): 77-86.
- LOPES, Michelle; VIEIRA, João. Predadores potenciais para o controle do mexilhão-dourado. CP SANTOS; D. PEREIRA; ICP PAZ, p. 357-363, 2012.
- LUDWIG, S. et al. High connectivity and migration potentiate the invasion of *Limnoperna fortunei*. *Hydrobiologia*, 2020.
- MANSUR, M. C. D.; Richinitti, L. M. Z. & Santos, C. P. “*Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), molusco bivalve invasor, na Bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul”, Brasil. *Biociências* 7(2):147–150. 1999
- MANSUR, Maria Cristina Dreher, et al. Ocorrência de moluscos límnicos e crustáceo em macroaglomerados do mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) sobre sarandi no lago Guaíba (RS, Brasil). *Biotemas*, 2008, 21.4: 179-182.
- MARANGONI, Danilo Henrique Monteiro; ASSIS, Paulo Santos; PELLI, Afonso. Características gerais do bioinvasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857). *Acta Biologica Brasiliensia*, v. 5, n. 2, p. 23-31, 2022.
- MARANGONI, Danilo Henrique Monteiro et al. *Biologia, impactos, características e dispersão geográfica do mexilhão dourado (Limnoperna fortunei) no Brasil*. 2023.
- MARENGONI, N. G.; KLOSOWSKI, E. S.; DE OLIVEIRA, K. P.; CHAMBO, A. P. S.; GONÇALVES, A. C. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*) no reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu Binacional. *Química Nova*, v. 36, n. 3, p. 359–363, 2013.

- MAROÑAS, M. E. et al. Introdução a Biologia das Invasões. O Mexilhão Dourado na América do Sul: Biologia, Dispersão, Impacto, Prevenção e Controle. 2009.
- MATIAS, G. D. A. Identificação molecular (DNA barcode) da ictiofauna marinha da Província Brasileira Tropical. 2015. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos) – Universidade Federal de Alagoas.
- MELO, Taissa Juliana de. Relação entre densidade de larvas de *Limnoperna fortunei* na coluna d'água e sua colonização em tanques-rede. 2019.
- MEUSNIER, I. et al. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, v. 9, art. 214, 2008.
- MILLER, Scott E. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104.12: 4775-4776.
- MIYAZAKI, Jun-Ichi et al. Evolutionary process of deep-sea *Bathymodiolus* mussels. *PLoS one*, v. 5, n. 4, p. e10363, 2010.
- MORTON, B. S. J. M. Some aspects of the biology and functional morphology of the organs of feeding and digestion of *Limnoperna fortunei* (Dunker)(*Bivalvia*: *Mytilacea*). *Malacologia*, v. 12, n. 2, p. 265-281, 1973.
- MORTON, Brian. The biology and anatomy of *Limnoperna fortunei*, a significant freshwater bioinvader: blueprints for success. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*, p. 3-41, 2015.
- MORTON, Brian. Evolution and adaptive radiation in the *Mytiloidea* (*Bivalvia*): clues from the pericardial–posterior byssal retractor musculature complex. *Molluscan Research*, v. 35, n. 4, p. 227-245, 2015.
- MOLINA, Florencia Rojas; JOSÉ DE PAGGI, Susana B.; CÉSAR PAGGI, Juan. Impacts of *Limnoperna fortunei* on Zooplankton. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*, p. 177-190, 2015.
- MURARI, Pâmela Juliana Furlan; SOUZA, Felipe Pinheiro de; OLIVEIRA, Marcos Vinicius de; OLIVEIRA, Sheila Nogueira de; POVH, Jayme Aparecido; LOPERA-BARRELO, Nelson Mauricio. A comparative study of four DNA extraction protocols from adductor muscle in golden mussel (*Limnoperna fortunei*). *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 44, n. 4, p. 365, 2018. DOI: 10.20950/1678-2305.2018.44.4.365.
- NABHOLZ, Benoit; GLÉMIN, Sylvain; GALTIER, Nicolas. The erratic mitochondrial clock: variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals. *BMC evolutionary biology*, v. 9, n. 1, p. 54, 2009.

NILSSON, R. H. et al. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, v. 47, D1, p. D259–D264, 2019.

OLIVEIRA, Marcia Divina, et al. Invasion by *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Bivalvia, Mytilidae) of the Pantanal wetland, Brazil. *Biological Invasions*, 2006, 8: 97-104.

OLIVEIRA, M. D.; PELLEGRIN, L. A.; BARRETO, R. R.; XAVIER, I. G. Área de ocorrência do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) na Bacia do Alto Paraguai entre os anos de 1998 e 2004. Corumbá: EMBRAPA. n. 64, 19 p. 2004.

OLIVEIRA, M. M. et al. Microcystin bioaccumulation in *Limnoperna fortunei* following *Microcystis aeruginosa* exposure: analysis of in vivo enzymatic phosphatase, acetylcholinesterase and carboxylesterase effects and in vitro experiments. *Ecotoxicol. Environ. Contam.*, v. 16, n. 1, p. 35–43, 2021.

OLIVEIRA, Marcia; CAMPOS, Mônica; PAOLUCCI, Esteban; MANSUR, Maria; HAMILTON, Stephen. Colonization and spread of *Limnoperna fortunei* in South America. In: BOLTOVSKOY, Demetrio. (Org.). *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Cham (Switzerland): Springer International Publishing, 2015. p. 333–355.

OLIVEIRA, Márcia D. et al. Abiotic factors controlling the establishment and abundance of the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Biological invasions*, v. 13, p. 717-729, 2011.

OKONECHNIKOV K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit . *Bioinformatics* 2012 28: 1166-1167.

PARESCHI, D. C.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; et al. First occurrence of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) in the Rio Tietê watershed (São Paulo State, Brazil). *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, p. 1107-1114, 2008.

PAOLUCCI, Esteban M. et al. Veligers of an introduced bivalve, *Limnoperna fortunei*, are a new food resource that enhances growth of larval fish in the Paraná River (South America). *Freshwater Biology*, v. 55, n. 9, p. 1831-1844, 2010.

PAOLUCCI, Esteban M.; THUESEN, Erik V. Trophic relationships of *Limnoperna fortunei* with larval fishes. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*, p. 211-229, 2015.

PENCHASZADEH, Pablo E. et al. Predation of the invasive freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Mytilidae) by the fish *Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1846

(Anostomidae) in the Rio de la Plata, Argentina. *Journal of Shellfish Research*, v. 19, n. 1, p. 229-232, 2000.

PENTINSAARI, Mikko et al. Molecular evolution of a widely-adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life. *Scientific reports*, v. 6, n. 1, p. 35275, 2016.

PEREIRA, D. et al. Plano nacional de prevenção, controle e monitoramento do mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*) no Brasil. *Força Tarefa Nacional, Ministério do Meio Ambiente (Brazil)*, p. 1-147, 2019.

PESSOTTO, M. A.; NOGUEIRA, M. G. More than two decades after the introduction of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) in La Plata Basin. *Brazilian Journal of Biology*, v. 78, n. 04, p. 773-784, 2018.

PIE, M. R.; BOEGER, W. A.; PATELLA, L.; FALLEIROS, R. M. A fast and accurate molecular method for the detection of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Mytilidae) in plankton samples. *Journal of Molluscan Studies*, v. 72, n. 2, p. 218–219, 2006.

PIE, M. R.; STRÖHER, P. R.; AGOSTINIS, A. O.; BELMONTE-LOPES, R.; TADRA-SFEIR, M. Z.; OSTRENSKY, A. Development of a real-time PCR assay for the detection of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*, Mytilidae) in environmental samples. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 2, p. 1041–1045, 2017.

PORTER, T. M.; HAJIBABAEI, M. Scaling up: a guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular Ecology*, v. 27, n. 2, p. 313–338, 2018.

RAILKIN, Alexander I. *Marine biofouling: colonization processes and defenses*. CRC press, 2003.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*, v. 7, n. 3, p. 355–364, 2007.

REBELO, Mauro F., et al. A sustainable synthetic biology approach for the control of the invasive golden mussel (*Limnoperna fortunei*). *PeerJ Preprints*, 2018.

RICCIARDI, Anthony. Global range expansion of the Asian mussel *Limnoperna fortunei* (Mytilidae): another fouling threat to freshwater systems. *Biofouling*, v. 13, n. 2, p. 97-106, 1998.

RICHARDSON, D. M. et al. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions*, v. 6, n. 2, p. 93–107, 2000.

ROCHA, O.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; et al. Animal invaders in São Paulo state reservoirs. *Oecologia Australis*, v. 15, n. 3, p. 631-642, 2011.

- ROJAS MOLINA, Florencia Mercedes. Efectos del molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker) sobre el zooplancton del paraná medio. 2010. Tese de Doutorado. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- ROSA, Daniel de Melo; ASSIS, Paulo Santos. *Limnoperna Fortunei* no Brasil: Histórico de Dispersão, Biologia Populacional, Impactos e Controle. *Cincias Ambientais: Recursos Hídricos*, v. 1, p. 219-235, 2020.
- ROSA, D. M. et al. Short Communication Occurrence of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) in the fish diet from a south-eastern Brazilian reservoir. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 31, n. 1, p. 1-4, 2014.
- SEEBENS, Hanno et al. Projecting the continental accumulation of alien species through to 2050. *Global Change Biology*, v. 27, n. 5, p. 970-982, 2021.
- SERAFIN, Ieda Terezinha; HENKES, Jairo Afonso. gua de lastro: um problema ambiental. *Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental*, v. 2, n. 1, p. 92-112, 2013.
- SILVA, F. A.; BARBOSA, N. P. U.; CARVALHO, V. A.; CARDOSO, A. V. CBEIH, 2016. Boletim de Alerta 4: Confirmada a presença do mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*) no reservatório de Emborao (trecho médio do rio Paranaíba). Technical Report. doi: 10.13140/RG.2.2.12941.74729
- SILVA, Fabiano Alcsio; GIANI, Alessandra. Population dynamic of bloom-forming *Microcystis aeruginosa* in the presence of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei*. *Harmful Algae*, 2018, 73: 148-156.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.
- STADHOUDERS, R. et al. Effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *Nucleic Acids Research*, v. 38, n. 1, e26, 2010.
- SOUZA, Rosa Cristina Corrêa Luz de; CALAZANS, Slvio Henrique; SILVA, Edson Pereira. Impacto das espécies invasoras no ambiente aquático. *Ciência e cultura*, v. 61, n. 1, p. 35-41, 2009.
- TABERLET, P. et al. *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*. Oxford: Oxford University Press, 2018.

TRESBACH, R. H. et al. DNA barcoding: uma ferramenta de apoio molecular para identificação de espécies de peixes. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 14, n. 2, p. 77–81, 2015. DOI: 10.18188/1983-1471/sap.v14n2p77-81.

ULIANO-SILVA, M. et al. The complete mitochondrial genome of the golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Mitochondrial DNA Part B*, v. 1, n. 1, p. 473–475, 2016. DOI: 10.1080/23802359.2016.1181992.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. 15, p. e115, 2012.

VON RUCKERT, G.; CAMPOS, M. C. S.; ROLLA, M. E. Alimentação de *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857): taxas de filtração com ênfase ao uso de Cyanobacteria. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 26, n. 4, p. 421-429, 2004.

XING, R.-R.; HU, R.-R.; HAN, J.-X.; DENG, T.-T.; CHEN, Y. DNA barcoding and mini-barcoding in authenticating processed animal-derived food: a case study involving the Chinese market. *Food Chemistry*, v. 309, p. 125653, 2020.

YANG, X. et al. Development of mini-barcode based on chloroplast genome and its application in metabarcoding molecular identification of *Radix Paeoniae Rubra* (Chishao). *Frontiers in Plant Science*, v. 13, art. 819822, 2022.

ZHAN, A. et al. High genetic diversity and connectivity in the invasive species *Limnoperna fortunei* revealed by mitochondrial DNA data. *PLoS ONE*, v. 7, n. 3, e33993, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0033993.

ZHAN, A. et al. Scale-dependent post-establishment spread and genetic diversity of an invasive mussel in South America. *Molecular Ecology*, 2012.

ZHAO, Baojun, et al. Mitochondrial genomic analyses provide new insights into the “missing” *atp8* and adaptive evolution of Mytilidae. *BMC genomics*, 2022, 23.1: 738.

APÊNDICE A

Tabela 5. Códigos de acesso da família *Mytilidae*

Espécie	Código: Genbank	Código: BOLD system
<i>Anadara kagoshimensis</i>	KF417435	
<i>Anadara kagoshimensis</i>	KJ490940	
<i>Anadara kagoshimensis</i>	ON640736	
<i>Arcuatula senhousia</i>	GQ480311.1	
<i>Arcuatula senhousia</i>	KY081302.1	
<i>Arcuatula senhousia</i>	PP887802.1	
<i>Bathymodiolus aduloides</i>	AB597557.1	
<i>Bathymodiolus aduloides</i>	HF545118.1	
<i>Bathymodiolus aduloides</i>		SSEO416-16
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	MK591263.1	
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	AY649795.1	
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	MK591272.1	
<i>Bathymodiolus brooksi</i>	HF545110.1	
<i>Bathymodiolus brooksi</i>	AY649798.1	
<i>Bathymodiolus brooksi</i>	KX159834.1	
<i>Bathymodiolus childressi</i>		OKEX070-20
<i>Bathymodiolus childressi</i>	OX406677.1	
<i>Bathymodiolus childressi</i>	OX406664.1	
<i>Bathymodiolus japonicus</i>		SSEO428-16
<i>Bathymodiolus japonicus</i>	KU975035.1	
<i>Bathymodiolus japonicus</i>	HF545108.1	
<i>Bathymodiolus manusensis</i>	MN106257.1	
<i>Bathymodiolus manusensis</i>	KU597590.1	
<i>Bathymodiolus manusensis</i>	GU966637.1	
<i>Bathymodiolus marisindicus</i>	MW959740.1	
<i>Bathymodiolus marisindicus</i>	MW959742.1	
<i>Bathymodiolus marisindicus</i>	AB170043.1	
<i>Bathymodiolus platifrons</i>	KJ174328.1	
<i>Bathymodiolus platifrons</i>	KR003177.1	
<i>Bathymodiolus platifrons</i>	AB250695.1	
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	AY649796.1	
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	HF545102.1	
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	JQ844834.1	

<i>Bathymodiolus securiformis</i>	AB170051.1	
<i>Bathymodiolus securiformis</i>	AB170049.1	
<i>Bathymodiolus securiformis</i>	HF545109.1	
<i>Bathymodiolus septemdierum</i>	MW959746.1	
<i>Bathymodiolus septemdierum</i>	OP879819.1	
<i>Bathymodiolus septemdierum</i>	KP879540.1	
<i>Bathymodiolus sp. 5 South</i>	JQ844815.1	
<i>Bathymodiolus sp. 5 South</i>	JQ844788.1	
<i>Bathymodiolus sp. 5 South</i>	LT674165.1	
<i>Bathymodiolus thermophilus</i>	AF456282.1	
<i>Bathymodiolus thermophilus</i>	MN986847.1	
<i>Bathymodiolus thermophilus</i>	JN978610.1	
<i>Brachidontes exustus</i>	MH012212.1	
<i>Brachidontes exustus</i>	KY454044.1	
<i>Brachidontes exustus</i>	KY454042.1	
<i>Brachidontes mutabilis</i>	KY081292.1	
<i>Brachidontes mutabilis</i>	KY081293.1	
<i>Brachidontes mutabilis</i>	GQ480306.1	
<i>Crenomytilus grayanus</i>	MN119672.1	
<i>Crenomytilus grayanus</i>	MN119655.1	
<i>Crenomytilus grayanus</i>	KM197988.1	
<i>Geukensia demissa</i>	KU906097.1	
<i>Geukensia demissa</i>	MT192779.1	
<i>Geukensia demissa</i>	MH012213.1	
<i>Gigantidas haimaensis</i>	MW408175.1	
<i>Gigantidas haimaensis</i>	MW408176.1	
<i>Gigantidas haimaensis</i>	MW408176.1	
<i>Gigantidas vrijenhoeki</i>	MN136491.1	
<i>Gigantidas vrijenhoeki</i>	MN136500.1	
<i>Gigantidas vrijenhoeki</i>	MN136501.1	
<i>Lithophaga curta</i>	MK721546.1	
<i>Lithophaga curta</i>	AB076944.1	
<i>Magallana gigas</i>	KT317438	
<i>Magallana gigas</i>	KX436127	
<i>Magallana gigas</i>	KF643604	
<i>Modiolus brasiliensis</i>	JQ685161.1	

<i>Modiolus brasiliensis</i>	EU917198.1	
<i>Modiolus brasiliensis</i>	JQ685160.1	
<i>Modiolus comptus</i>	GQ480313.1	
<i>Modiolus comptus</i>		GBAAZ19342-24
<i>Modiolus comptus</i>		QWEAS063-15
<i>Modiolus kurilensis</i>		QWEAS1372-15
<i>Modiolus kurilensis</i>	KP243074.1	
<i>Modiolus kurilensis</i>		QWEAS1369-15
<i>Modiolus modiolus</i>	MZ580928.1	
<i>Modiolus modiolus</i>	HM884246.1	
<i>Modiolus modiolus</i>		CAISN335-12
<i>Modiolus nipponicus</i>	AB076912.1	
<i>Modiolus nipponicus</i>		SSE0461-16
<i>Modiolus nipponicus</i>	NC_044130.1	
<i>Modiolus philippinarum</i>	MN608230.1	
<i>Mytilaster solisianus</i>	KT318253.1	
<i>Mytilaster solisianus</i>	KT318256.1	
<i>Mytilaster solisianus</i>	KT318258.1	
<i>Mytilisepta keenae</i>	MN728367.1	
<i>Mytilisepta keenae</i>	MN728368.1	
<i>Mytilisepta keenae</i>	MN728366.1	
<i>Mytilisepta virgata</i>	MG203951.1	
<i>Mytilisepta virgata</i>	MN728370.1	
<i>Mytilisepta virgata</i>	AB076941.1	
<i>Mytilus californianus</i>	MG431257.1	
<i>Mytilus californianus</i>	KF931718.1	
<i>Mytilus californianus</i>	GQ902184.1	
<i>Mytilus chilensis</i>	KR066654.1	
<i>Mytilus chilensis</i>	KR066657.1	
<i>Mytilus chilensis</i>	MZ152219.1	
<i>Mytilus coruscus</i>	GQ480288.1	
<i>Mytilus coruscus</i>	KM197996.1	
<i>Mytilus coruscus</i>	KC139309.1	
<i>Mytilus edulis</i>	KF643396.1	
<i>Mytilus edulis</i>		DESS018-20
<i>Mytilus edulis</i>		DESS017-20

<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MT920150.1	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	KC819197.1	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	KU201434.1	
<i>Mytilus trossulus</i>	OR590512.1	
<i>Mytilus trossulus</i>	MT736683.1	
<i>Mytilus trossulus</i>	MF544912.1	
<i>Perna canaliculus</i>	HG005373.1	
<i>Perna canaliculus</i>	GU324171.1	
<i>Perna canaliculus</i>	DQ917607.1	
<i>Perna perna</i>	KU743163.1	
<i>Perna perna</i>	KC692004.1	
<i>Perna perna</i>	OK559744.1	
<i>Perna viridis</i>	PP702447.1	
<i>Perna viridis</i>	DQ343590.1	
<i>Perna viridis</i>		GBAAZ29442-24
<i>Perumytilus purpuratus</i>	KC844421.1	
<i>Perumytilus purpuratus</i>	KC844415.1	
<i>Perumytilus purpuratus</i>	KC844421.1	
<i>Semimytilus algosus</i>	JF301890.1	
<i>Semimytilus algosus</i>	JF301896.1	
<i>Semimytilus algosus</i>	JF301889.1	
<i>Xenostrobus securis</i>	KC509725.1	
<i>Xenostrobus securis</i>	MW293749.1	
<i>Xenostrobus securis</i>	KX859952.1	

APÊNDICE B

Tabela 6. Códigos de acesso do *Limnoperna fortunei*

Espécie	Código: Genbank	Código: BOLD system
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592436	GBCIN6230-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592433	GBCIN6231-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592426	GBCIN6232-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592411	GBCIN6233-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592421	GBCIN6234-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592432	GBCIN6235-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592443	GBCIN6236-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592425	GBCIN6237-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592413	GBCIN6238-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592412	GBCIN6239-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592451	GBCIN6240-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592468	GBCIN6241-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592454	GBCIN6242-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592445	GBCIN6243-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592470	GBCIN6244-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592458	GBCIN6245-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592437	GBCIN6246-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592462	GBCIN6247-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592427	GBCIN6248-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592423	GBCIN6249-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592455	GBCIN6250-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592463	GBCIN6251-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592452	GBCIN6252-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592456	GBCIN6253-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592453	GBCIN6254-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592460	GBCIN6255-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592471	GBCIN6256-23

<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592415	GBCIN6257-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592464	GBCIN6258-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592406	GBCIN6259-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592440	GBCIN6260-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592430	GBCIN6261-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592424	GBCIN6262-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592431	GBCIN6263-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592469	GBCIN6264-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592400	GBCIN6265-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592409	GBCIN6266-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592446	GBCIN6267-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592473	GBCIN6268-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592417	GBCIN6269-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592428	GBCIN6270-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592416	GBCIN6271-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592429	GBCIN6272-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592475	GBCIN6273-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592474	GBCIN6274-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592402	GBCIN6275-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592465	GBCIN6276-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592457	GBCIN6277-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592448	GBCIN6278-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592459	GBCIN6279-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592405	GBCIN6280-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592438	GBCIN6281-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592447	GBCIN6282-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592449	GBCIN6283-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592407	GBCIN6284-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592442	GBCIN6285-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592401	GBCIN6286-23

<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592472	GBCIN6287-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592461	GBCIN6288-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592444	GBCIN6289-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592419	GBCIN6290-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592408	GBCIN6291-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592435	GBCIN6292-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592420	GBCIN6293-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592418	GBCIN6294-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592414	GBCIN6295-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592422	GBCIN6296-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592441	GBCIN6297-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592410	GBCIN6298-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592467	GBCIN6299-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592403	GBCIN6300-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592434	GBCIN6301-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592466	GBCIN6302-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592404	GBCIN6303-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592439	GBCIN6304-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	OQ592450	GBCIN6305-23
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177102	GBMBM1187-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177101	GBMBM1188-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177100	GBMBM1189-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177099	GBMBM1190-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177098	GBMBM1191-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177097	GBMBM1192-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177096	GBMBM1193-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177095	GBMBM1194-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177094	GBMBM1195-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177093	GBMBM1196-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177092	GBMBM1197-13

<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177091	GBMBM1198-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177090	GBMBM1199-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177089	GBMBM1200-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177088	GBMBM1201-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177087	GBMBM1202-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	JX177086	GBMBM1203-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB828682	GBMBM1528-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB828681	GBMBM1529-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB828680	GBMBM1530-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB828679	GBMBM1531-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520627	GBMBM338-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520626	GBMBM339-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520625	GBMBM340-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520624	GBMBM341-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520623	GBMBM342-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520622	GBMBM343-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520621	GBMBM344-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520620	GBMBM345-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520619	GBMBM346-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520618	GBMBM347-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520617	GBMBM348-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520616	GBMBM349-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520615	GBMBM350-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520614	GBMBM351-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520613	GBMBM352-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520612	GBMBM353-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	AB520611	GBMBM354-13
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843810	GBMIN2359-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843808	GBMIN2360-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843806	GBMIN2361-12

<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843804	GBMIN2362-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843802	GBMIN2363-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843800	GBMIN2364-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843798	GBMIN2365-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843796	GBMIN2366-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843794	GBMIN2367-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843809	GBMIN2368-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843807	GBMIN2369-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843805	GBMIN2370-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843803	GBMIN2371-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843801	GBMIN2372-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843799	GBMIN2373-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843797	GBMIN2374-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	HQ843795	GBMIN2375-12
<i>Limnoperna fortunei</i>	KP756905	GBMNA9361-19
<i>Limnoperna fortunei</i>	MT408044	GBMNE8128-21
<i>Limnoperna fortunei</i>	MT408045	GBMNE8129-21
<i>Limnoperna fortunei</i>	MT408046	GBMNE8130-21
<i>Limnoperna fortunei</i>	MT408047	GBMNE8131-21
<i>Limnoperna fortunei</i>	MT299943	GBMNE8132-21
<i>Limnoperna fortunei</i>	MT299944	GBMNE8133-21
<i>Limnoperna fortunei</i>		LITO087-18
<i>Limnoperna fortunei</i>		LITO088-18
<i>Limnoperna fortunei</i>		LITO089-18
<i>Limnoperna fortunei</i>		LITO090-18
<i>Limnoperna fortunei</i>		OZIMP022-15
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0346-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0347-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0348-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0356-16

<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0357-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0358-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0359-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0360-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0361-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0362-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0363-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0364-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0365-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0368-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0369-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0370-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0371-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0372-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0373-16
<i>Limnoperna fortunei</i>		SSE0374-16