



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS CAMPUS BAURU  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



HENRIQUE QUINTANA ARANTES

**Análise de Seleção Mitogenômica dos Genes ATP6, COI e  
ND5 nos Hexacorallia e Ceriantharia (Cnidaria)**

Bauru - SP  
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS CAMPUS BAURU  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



HENRIQUE QUINTANA ARANTES

**Análise de Seleção Mitogenômica dos Genes ATP6, COI e  
ND5 nos Hexacorallia e Ceriantharia (Cnidaria)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Ciências Biológicas, na Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Bauru, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Maximiliano Manuel Maronna  
Supervisor: Prof. Dr. Sérgio Nascimento Stampar

Bauru - SP  
2023

A662a

Arantes, Henrique Quintana

Análise de Seleção Mitogenômica dos Genes ATP6, COI e ND5 nos Hexacorallia e Ceriantharia (Cnidaria) / Henrique Quintana

Arantes. -- Bauru, 2023

33 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Maximiliano Manuel Maronna

Coorientador: Sérgio Nascimento Stampar

1. Anthozoa. 2. Genoma Mitochondrial. 3. Adaptação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências, Bauru. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## RESUMO

Genes mitocondriais evoluem relativamente mais rápido do que genes nucleares, portanto, essa abordagem tem sido mais apropriada para traçar a evolução recente de diversos grupos de eucariotos. Porém, genes mitocondriais de certos antozoários (Cnidaria) geralmente evoluem 10-100x mais devagar do que os genes do núcleo. Considerando essa peculiaridade destes genes mitocondriais, têm-se aumentado a utilidade potencial destes genes para inferir relações filogenéticas mais profundas entre as famílias e ordens de Anthozoa, um grupo de organismos que compartilharam um último ancestral em comum no período pré-Cambriano. O presente trabalho analisou a presença de seleção mitogenômica e a potencial relação a eventos de adaptação dos genes ATP6, COI e ND5 nos grupos de Hexacorallia e Ceriantharia (Anthozoa:Cnidaria) com diferentes abordagens metodológicas. Os resultados reforçam um cenário complexo, como destacado em trabalhos recentes. Por exemplo, vários dos genes mitocondriais entendidos como fonte da maior variabilidade genética, como o gene COI, não resultaram como aqueles com maior diversidade genética. Os genes analisados apresentaram seleção positiva em quase todos os casos, com exceção da análise do gene ATP6 (método BUSTED). Genes avaliados descrevem padrões históricos diferentes, destacando uma história complexa ao considerar a mitocôndria como um genoma de grande relevância para os organismos em estudo. Nosso resultado destaca espécies e clados onde a seleção atuou de forma heterogênea, como nos Scleractinia. Estudos como o presente projeto, da literatura recente e do futuro próximo com abordagem comparativa serão de grande valor para aprimorar nosso conhecimento da macroevolução dos antozoários, com destaque para os Hexacorallia e Ceriantharia.

Palavras-Chave: Anthozoa; Genoma mitocondrial; Adaptação.

## ABSTRACT

Mitochondrial genes evolve relatively faster than nuclear genes, thus using this approach has been more useful for inferring recent evolution in several eukaryotic clades. However, anthozoan mitochondrial genes generally evolve 10-100x slower than nuclear genes. Considering this peculiarity in these mitochondrial genes, the potential usefulness of these genes to infer deeper phylogenetic relationships between families and orders of Anthozoa, a group of organisms that shared a last common ancestor in the Precambrian period, has increased. The present work analyzes the presence of mitogenomic selection and its potential relation to adaptation events of ATP6, COI and ND5 genes in groups of Hexacorallia and Ceriantharia (Anthozoa:Cnidaria) based on different methodological approaches. Our results reinforce a complex scenario, as highlighted in recent studies on Anthozoans. For example, several of the mitochondrial genes understood as a source of high genetic variability, such as the COI gene, did not turn out to be those with the greatest genetic diversity. The analyzed genes indicated positive selection in almost all cases, with the exception of the ATP6 gene analysis (BUSTED method). Analyzed genes describe different historical patterns, highlighting a complex history when considering mitochondria as a great relevant genome for the organisms under study. Our result highlights species and clades where selection acted heterogeneously, as in Scleractinia. Studies such as the present project, the recent literature and the near future with a comparative approach will be of great value to improve our knowledge of the macroevolution of anthozoans, with emphasis on Hexacorallia and Ceriantharia.

Keywords: Anthozoa; Mitochondrial genome; Adaptation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Filogenia simplificada de Anthozoa, destacando os grupos-irmãos Ceriantharia e Hexacorallia..	11
Figura 2 - Fotos de representantes de Ceriantharia e das ordens de Hexacorallia..	13
Figura 3 - Filogenia gerada na análise do gene ATP6 pelo método aBSREL.....	20
Figura 4 - Gráfico da relação de proporção de sítios e a taxa $\omega$ da espécie <i>Siderastrea radians</i> (Scleractinia) .....	20
Figura 5 - Gráfico da relação de proporção de sítios e a taxa $\omega$ da espécie <i>Savalia savaglia</i> (Zoantharia) .....	20
Figura 6 - Filogenia gerada na análise do gene COI pelo método aBSREL, destacando o nó 41 .....	23
Figura 7 - Gráfico da relação de proporção de sítios e a taxa $\omega$ do nó 41 .....	23
Figura 8 - Filogenia gerada na análise do gene ND5 pelo método aBSREL, destacando o nó 157 .....	25
Figura 9 - Gráfico da relação de proporção de sítios e a taxa $\omega$ da espécie <i>Sagartia ornata</i> (Actiniaria).....	25
Figura 10 - Gráfico da relação de proporção de sítios e a taxa $\omega$ da espécie <i>Microzoanthus occultus</i> (Zoantharia) .....	26
Figura 11 - Gráfico da relação de proporção de sítios e a taxa $\omega$ do nó 157.....	26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sistemática geral de Hexacorallia e Ceriantharia.....	16
Tabela 2 - Resultados das análises de seleção nos genes mitocondriais ATP6, COI e ND5, considerando método de análise com base na informação gênica (BUSTED), topologia filogenética (aBSREL) e sítios (MEME). ....	27
Tabela 3 - Espécies em comum de Scleractinia com presença de seleção diversificadora nos genes COI e ND5 pelo método aBSREL.....	27

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
1.1 Produção de energia.....	8
1.2 Origem e características gerais do genoma dos cloroplastos e mitocôndrias .....	9
1.3 Subunidades da mitocôndria.....	10
1.4 Características morfológicas gerais de Hexacorallia e Ceriantharia .....	11
1.5 Utilização do genoma mitocondrial para reconstrução filogenética .....	14
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
3.1 Dados de genoma mitocondrial .....	15
3.2 Levantamento de espécies e seleção de grau de genoma mitocondrial sequenciado .....	15
3.3 Isolamento e alinhamento de genes selecionados do genoma mitocondrial .....	16
3.4 Análise de evolução com foco nos processos de seleção .....	17
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>
4.1 Método MEME.....	17
4.2 Método BUSTED .....	17
4.3 Método aBSREL .....	18
4.4 Comparações dos resultados.....	27
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>30</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Produção de energia

A necessidade fundamental de gerar energia de maneira eficiente determinou uma influência profunda na história da vida sobre a Terra (ALBERTS *et al.*, 2017). Muito da estrutura, função e evolução das células dos organismos pode ser relacionado às suas necessidades de energia (ALBERTS *et al.*, 2017). No início da história da vida, surgiu um mecanismo muito mais eficiente para gerar energia e sintetizar ATP, o qual é baseado no transporte de elétrons ao longo das membranas (ALBERTS *et al.*, 2017).

Os mecanismos de transporte de elétrons associados às membranas são utilizados pelas células com o objetivo de extrair energia a partir de diferentes fontes (ALBERTS *et al.*, 2017). Dois exemplos fundamentais que utilizam tais mecanismos são a conversão de energia luminosa em energia química no processo de fotossíntese, e a formação de grandes quantidades de ATP durante a respiração celular (ALBERTS *et al.*, 2017).

O mecanismo baseado em membrana, utilizado pelas mitocôndrias, cloroplastos e muitos procaríotos para geração de energia é conhecido como acoplamento quimiosmótico, o qual envolve a utilização de um gradiente eletroquímico de prótons para promover a síntese de ATP (ALBERTS *et al.*, 2017). As mitocôndrias são responsáveis pela maior parte da produção de ATP em células animais, usando a energia derivada da oxidação de açúcares e ácidos graxos (ALBERTS *et al.*, 2017).

As mitocôndrias estão presentes em quase todas as células eucarióticas, e sem elas os eucariotos dependeriam de um processo relativamente ineficiente da glicólise para a produção de todo o ATP, isto é, a conversão da glicose em piruvato no citosol, cujo resultado líquido é de apenas duas moléculas de ATP produzidas por molécula de glicose (ALBERTS *et al.*, 2017). Isso representa menos de 10% do total de energia livre potencialmente disponível a partir da oxidação do açúcar, uma vez que, quando as mitocôndrias são utilizadas para completar a oxidação da glicose, cerca de 30 moléculas de ATP são produzidas (ALBERTS *et al.*, 2017). Portanto, se as células ancestrais não tivessem estabelecido relações simbióticas com as bactérias que originaram as mitocôndrias modernas, de acordo com a teoria endossimbiótica, seria improvável que os organismos multicelulares complexos pudessem ter evoluído (ALBERTS *et al.*, 2017).

## 1.2 Origem e características gerais do genoma dos cloroplastos e mitocôndrias

O mecanismo de transporte de elétrons associado à membrana surgiu primeiramente nas bactérias há mais de três bilhões de anos e depois em células eucarióticas, mantendo-se até hoje em uma diversidade de formas de vida (ALBERTS *et al.*, 2017). Isso é explicado pela teoria endossimbiótica, a qual defende que descendentes das células procarióticas pioneiras desse mecanismo foram fagocitadas por células eucariontes primitivas e viveram em simbiose, dando origem às organelas cloroplasto e mitocôndria, posteriormente (ALBERTS *et al.*, 2017).

Duas das principais evidências que sustentam esta teoria de origem das mitocôndrias e cloroplastos é a presença de um genoma próprio; e os seus processos de divisão celular similares à divisão celular bacteriana (ALBERTS *et al.*, 2017). Ou seja, diferentemente das outras organelas, elas possuem genes próprios e codificam proteínas independentes do núcleo celular (ALBERTS *et al.*, 2017).

Embora o núcleo contenha a maior parte dos genes de um organismo eucariótico, um subconjunto distinto e especializado do genoma é encontrado nas mitocôndrias e, em organismos fotossintetizantes, também nos cloroplastos (GRIFFITHS *et al.*, 2022). Esses subconjuntos são herdados de forma independente do genoma nuclear e, portanto, constituem um caso especial de herança independente, também chamada de herança extranuclear (GRIFFITHS *et al.*, 2022).

As mitocôndrias e os cloroplastos contêm pequenos cromossomos circulares que carregam um subconjunto definido do genoma celular total (GRIFFITHS *et al.*, 2022). A maior parte dos genes está relacionada às reações químicas que ocorrem dentro da própria organela: a fotossíntese em cloroplastos e a fosforilação oxidativa em mitocôndrias (GRIFFITHS *et al.*, 2022).

Além disso, os genes de organelas demonstram seu próprio modo particular de herança, denominado herança uniparental, isto é, a prole herda os genes de organelas apenas de um dos genitores, mas não do outro, sendo que na maioria dos casos, o genitor é a mãe, um padrão denominado herança materna (GRIFFITHS *et al.*, 2022). A explicação para este fenômeno encontra-se no fato de que os cromossomos de organelas estão localizados no citoplasma e os gametas masculino e feminino não contribuem igualmente com citoplasma para o zigoto, enquanto nos genes nucleares, ambos os genitores contribuem igualmente para o zigoto (GRIFFITHS *et al.*, 2022). O óvulo contribui com a maior parte do citoplasma,

enquanto o espermatozoide quase não contribui, e tendo em vista que as organelas estão localizadas no citoplasma, logo, a genitora contribui com as organelas e também com o citoplasma, e praticamente nenhum DNA de organela no zigoto é do genitor (GRIFFITHS *et al.*, 2022). Sendo assim, os fenótipos variantes causados por mutações no DNA de organelas citoplasmáticas em geral são herdados de modo materno e independente dos padrões mendelianos demonstrados pelos genes nucleares (GRIFFITHS *et al.*, 2022).

### 1.3 Subunidades da mitocôndria

Considerando a mitocôndria, as subunidades mitocondriais dos complexos da cadeia respiratória codificadas por 13 genes mitocondriais na maioria dos metazoários, estão envolvidas em vários processos evolutivos chave dos eucariotos, tendo um papel importante na produção de energia (ALMEIDA *et al.*, 2015). As subunidades mitocondriais – subunidades 1–3 citocromo c oxidase (COI, COII, COIII), citocromo b (CYTB), subunidades 1–6 NADH desidrogenase (ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6), subunidade NADH desidrogenase 4L (ND4L), subunidade 6 ATPase F<sub>0</sub> (ATP6) e subunidade 8 ATPase F<sub>0</sub> (ATP8).

As subunidades interagem com proteínas codificadas no núcleo estabelecendo quatro (Complexos I, III, IV e V) dos cinco complexos enzimáticos envolvidos na cadeia respiratória de células aeróbicas. Os complexos enzimáticos são divididos em: Complexo I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6), Complexo III (CYTB), Complexo IV (COI, COII e COIII) e Complexo V (ATP6 e ATP8). O Complexo II consiste inteiramente em proteínas codificadas no núcleo. Globalmente, os Complexos I, II, III e IV são responsáveis pela via de fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS) e o Complexo V utiliza o gradiente de energia gerado para sintetizar trifosfato de adenosina (ATP) (ALMEIDA *et al.*, 2015).

## 1.4 Características morfológicas gerais de Hexacorallia e Ceriantharia

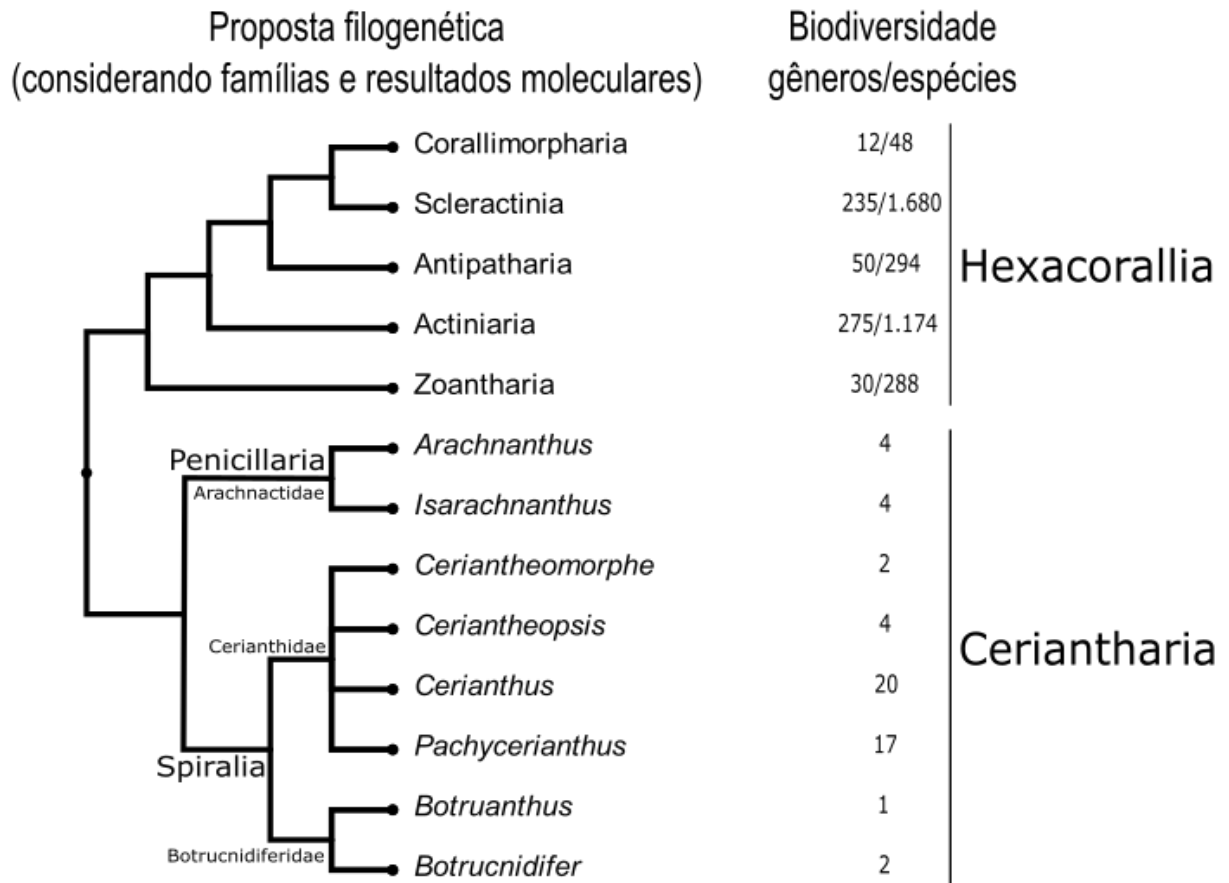


Figura 1- Filogenia simplificada de Anthozoa, destacando os grupos-irmãos Ceriantharia e Hexacorallia. No ramo de Hexacorallia destaca-se as cinco ordens (Corallimorpharia; Scleractinia; Antipatharia; Actiniaria; e Zoantharia) e o ramo de Ceriantharia destaca-se os principais grupos (ordens, famílias e gêneros). Sistemática construída a partir dos resultados dos trabalhos: MCFADDEN *et al.*, 2021 (Hexacorallia) e STAMPAR *et al.*, 2016 (Ceriantharia).

Actiniaria e Corallimorpharia são ordens de organismos exclusivamente solitários. Embora eles possam se reproduzir clonalmente, nenhuma conexão fisiológica é mantida entre pólipos-filhos geneticamente idênticos (MCFADDEN *et al.*, 2021). A falta de colonialidade também está relacionada à falta de um esqueleto nessas ordens (GREBELNY'I, 1982 *apud* MCFADDEN *et al.*, 2021). Contudo, evoluíram formas alternativas para aumentar o tamanho do corpo ao invés de esqueletogênese ou colonialidade (GREBELNY'I, 1982 *apud* MCFADDEN *et al.*, 2021). Em contrapartida, Antipatharia e Zoantharia são quase exclusivamente coloniais (com pequenos pólipos), e cada grupo obteve esta característica de forma única e independente (STAMPAR *et al.*, 2016).

Todos os ceriantários, zoantários, antipatários, e um clado divergente inicial de Actiniaria mantiveram simetria bilateral ancestral (SCRUTTON, 1997 *apud* MCFADDEN *et*

*al.*, 2021). Embora Scleractinia, Corallimorpharia e Actiniaria passem por fases bilateralmente simétricas durante o desenvolvimento, a maioria dos pólipos adultos nessas linhagens são caracterizados por simetria interna birradial (GONÇALVES, 2016 *apud* MCFADDEN *et al.*, 2021). Os antozoários que mantiveram simetria bilateral internamente, evoluíram para exibir simetria radial externamente (ou seja, um pólipo cilíndrico com um ciclo de 360° de tentáculos), que pode ser seletivamente vantajosa em filtradores sésseis cujas fontes de alimento podem vir de qualquer direção (SHICK 1991 *apud* MCFADDEN *et al.*, 2021).

Corallimorpharia inclui 12 gêneros válidos, distribuídos em 4 famílias, compostas por 48 espécies. Ocorrem em mares rasos e profundos, sendo as formas do mar profundo solitárias; e a maioria das formas de águas rasas clonal, passando por reprodução assexuada por fissão longitudinal ou laceração pedal (FAUTIN, 2011). Possuem coluna lisa e base achatada, esta geralmente aderente em formas de águas rasas, mas pode estar solta em águas profundas (FAUTIN, 2011). Os tentáculos deste grupo são organizados em linhas radiais e que podem ser ramificados ou tentáculos únicos com protuberâncias (“knobs”; STAMPAR *et al.*, 2016).

Actiniaria é composta por 275 gêneros, divididas em 51 famílias, abrangendo 1.174 espécies. Em Actiniaria, os tentáculos estão sempre organizados em ciclos (tipicamente 1–8), mas sempre em apenas uma região na margem do disco oral ou dispersos na parte mais interna do disco (MANUEL, 1981; BENETI *et al.*, 2015 *apud* STAMPAR *et al.*, 2016).

Scleractinia possui 235 gêneros válidos, atribuídos a 33 famílias, divididas em 1.680 espécies. Os tentáculos dos representantes de Scleractinia são dispostos em uma fileira, geralmente na região marginal do disco oral e frequentemente exibem uma protuberância no final do tentáculo (STAMPAR *et al.*, 2016).

Antipatharia abrange 50 gêneros, distribuídos em 7 famílias, contendo 294 espécies no total. Representantes de Antipatharia normalmente exibem de 6 a 12 tentáculos organizados em uma ou duas filas numa única região (MANUEL, 1981 *apud* STAMPAR *et al.*, 2016).

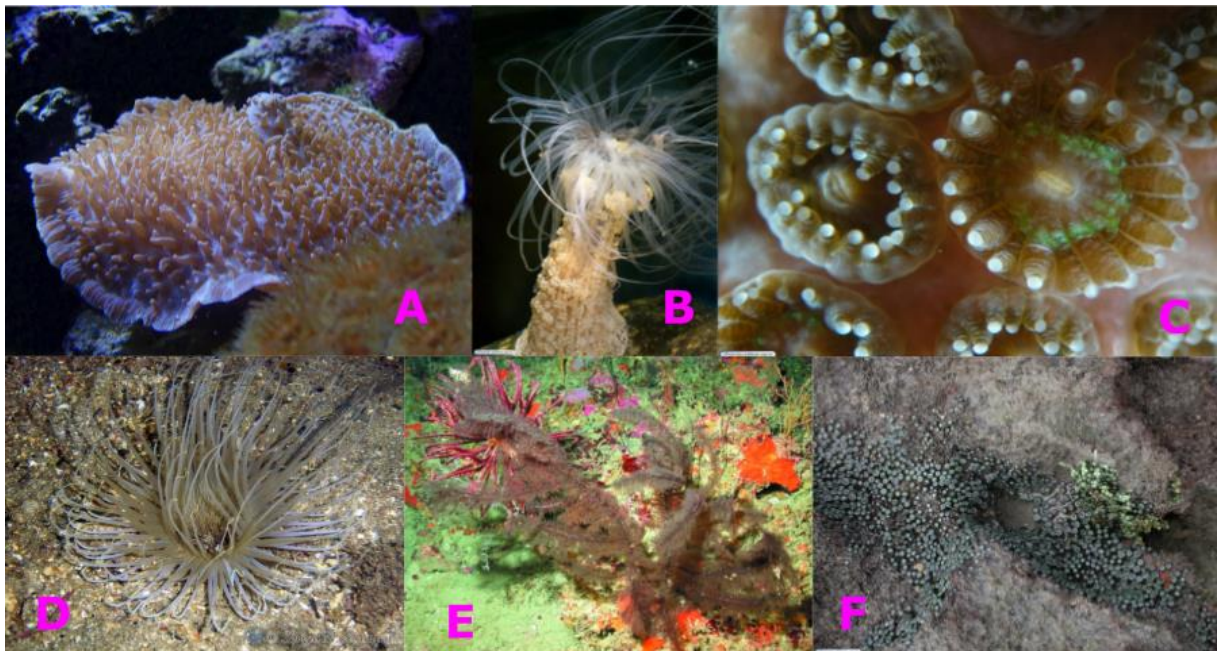


Figura 2 - Fotos de representantes de Ceriantharia e das ordens de Hexacorallia. **A:** *Rhodactis indosinensis* (Corallimorpharia); **B:** *Alicia mirabilis* (Actiniaria); **C:** *Madracis decactis* (Scleractinia); **D:** *Ceriantheomorpha brasiliensis* (Ceriantharia); **E:** *Tanacetipathes* cf. *thamnaea* (Antipatharia); **F:** *Zoanthus sociatus* (Zoantharia). Fotos por: **A:** wikidata-Treball propi.; **B:** Anêmona-do-mar. Banco de imagens Cifonauta.; **C:** Alvaro E. Migotto. Coral. Banco de imagens Cifonauta.; **D:** Stampar, Sérgio. WoRMS database.; **E:** NOAA-FGBNMS/UNCW-UVP. WoRMS database; **F:** Alvaro E. Migotto. Zoantídeo. Banco de imagens Cifonauta.

Zoantharia inclui 27 gêneros válidos, atribuídos em 9 famílias, divididas em 2 subordens (REIMER; SINNIGER, 2019 *apud* POLISENO *et al.*, 2020), contendo no total 288 espécies. Representantes de Zoantharia têm tentáculos dispostos em duas fileiras na margem do disco oral (FUJII; REIMER, 2013 *apud* STAMPAR *et al.*, 2016). As duas subordens de Zoantharia, tradicionalmente, têm sido delimitadas se baseando na característica do quinto septo da diretiva dorsal, podendo ser completo (macrocnêmico; subordem Macrocnemina) ou incompleto (braquicnêmico; subordem Brachycnemina) (HADDON; SHACKLETON, 1891 *apud* POLISENO *et al.*, 2020). No entanto, análises filogenéticas moleculares redescobriram Macrocnemina como um grupo parafilético, e a disposição do quinto par de septos dentro dos membros macrocnêmicos é considerado um traço simplesiomórfico (SINNIGER *et al.*, 2005; SWAIN, 2010; SWAIN, 2018 *apud* POLISENO *et al.*, 2020). Portanto, a classificação de Zoantharia em nível de subordem necessita de revisão (POLISENO *et al.*, 2020).

Ceriantharia inclui 139 espécies divididas em 3 famílias e 40 gêneros, sendo uma subclasse de animais cnidários antozoários conhecidos popularmente como anêmonas-de-tubo ou ceriantos (STAMPAR, 2012). Os ceriantários possuem um corpo de formato cilíndrico que geralmente é semelhante a um verme (TIFFON, 1987 *apud* STAMPAR *et al.*, 2016). O lado

aboral do pólipó é oco e opaco, aberto por um poro (STAMPAR *et al.*, 2016). A coluna, disco oral e os tentáculos são lisos e seus tecidos são simples (STAMPAR *et al.*, 2016). Os tentáculos são divididos em tentáculos marginais na borda do disco oral, e em tentáculos labiais, os quais estão ao redor da boca (VAN BENEDEN, 1924; TIFFON, 1987 *apud* STAMPAR *et al.*, 2016). Além disso, Ceriantharia possui um tipo altamente “notável” e divergente de cnida (STAMPAR *et al.*, 2016). Este tipo diferenciado de cnidócito, o ptticocisto, é considerado como caráter definitivo do grupo (MARISCAL *et al.*, 1977 *apud* STAMPAR *et al.*, 2016).

### 1.5 Utilização do genoma mitocondrial para reconstrução filogenética

As diferenças e semelhanças das sequências de DNA mitocondrial (DNAmít) homólogas entre as espécies foram utilizadas extensivamente para construir árvores evolutivas (GRIFFITHS *et al.*, 2022). Geralmente, o DNAmít evolui relativamente rápido. Logo, essa abordagem tem sido mais útil para traçar a evolução recente, tal como a evolução de humanos e outros primatas (GRIFFITHS *et al.*, 2022). Porém, a propriedade incomum de genomas mitocondriais de antozoários que mais impactou a sua utilização em reconstrução filogenética é justamente a taxa que eles evoluem (QUATTRINI *et al.* Preprint. 2022). No caso de Bilateria, que são metazoários com simetria bilateral no estágio adulto ou em que a simetria bilateral se transformou em simetria radial no estágio larval (e.g. equinodermos); triploblásticos, isto é, a presença de uma terceira camada intermediária ou mesoderma, a partir da qual a maioria dos órgãos se forma; e a maioria dos representantes com estruturas sensoriais e células nervosas concentradas na parte anterior do corpo (e.g. cefalização) (BAGUÑÀ *et al.*, 2008), os genomas mitocondriais deste grupo tendem a evoluir 5-10x mais rápido do que o genoma nuclear (BROWN *et al.*, 1982; VAWTER; BROWN, 1986 *apud* QUATTRINI *et al.* Preprint. 2022). Em contrapartida, genes mitocondriais de antozoários geralmente evoluem 10-100x mais devagar do que os genes nucleares (HELLBERG, 2006 *apud* QUATTRINI *et al.* Preprint. 2022). Como resultado, genes mitocondriais, que têm sido amplamente utilizados em Bilateria, para análises filogenéticas em nível de espécie e filogeografia são frequentemente invariantes tanto dentro quanto entre os gêneros de antozoários (SHEARER; COFFROTH, 2008; HUANG *et al.*, 2008 *apud* QUATTRINI *et al.* Preprint. 2022). No entanto, essas baixas taxas de evolução de genes mitocondriais têm aumentado a utilidade potencial destes genes para reconstruir relações filogenéticas mais profundas entre as famílias e ordens de Anthozoa, um grupo de organismos que

compartilharam um último ancestral em comum no período pré-Cambriano (QUATTRINI *et al.*, 2020; MCFADDEN *et al.*, 2021 *apud* QUATTRINI *et al.* Preprint. 2022).

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho de conclusão de curso teve como objetivo analisar a presença de seleção mitogenômica dos genes ATP6, COI e ND5 nos grupos de Hexacorallia e Ceriantharia (Cnidaria), a partir de métodos com diferentes abordagens analíticas. Procura-se detectar espécies e clados com presença de seleção diversificadora, potencialmente associada a eventos de adaptação com base molecular mitocondrial.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Dados de genoma mitocondrial

Os dados genômicos mitocondriais dos grupos principais de Hexacorallia foram reunidos utilizando o programa Geneious Prime Version 2022.2.2 (<https://www.geneious.com>) a partir do banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica/National Center for Biotechnology Information (NCBI). As informações consideradas foram do banco de dados Nucleotide, componente principal do atual GenBank, o qual abrange sequências completas e parciais dos genes (sub-unidades e também genomas mitocondriais completos e parciais). Apesar de haver o banco de dados “Genome”, não há sequências registradas de nenhum dos grupos presentes. A filtragem de dados foi realizada considerando o código de identificação das famílias de cada grupo da plataforma e a palavra-chave “mitochondrion”, uma vez que ao pesquisar apenas o nome do grupo na barra de pesquisa ao invés do número de identificação, o banco de dados trouxe também dados referentes às espécies de outros grupos.

### 3.2 Levantamento de espécies e seleção de grau de genoma mitocondrial sequenciado

Para a quantificação de grupos, foram selecionadas até uma espécie por gênero; no caso de apresentar mais de uma espécie, ou mais de um espécime por espécie, foi selecionada aquela amostra que apresentasse anotação mais completa com verificação do próprio pipeline de qualidade do NCBI: protocolo de verificação REFSEQ (O’LEARY *et al.*, 2016). Por

último, foram adicionados os genomas mitocondriais (DNAmít) de espécies do grupo Ceriantharia: *Isarachnanthus nocturnus* (Arachnactidae) - dados pessoais do Prof. Dr. Sérgio N. Stampar, a partir da publicação (STAMPAR *et al.*, 2019), *Botruanthus mexicanus* e *Ceriantheopsis americana* (famílias Botrucnidiferidae e Cerianthidae, respectivamente) - resultados do projeto de TCC do biólogo Lucas D. Martinez – UNESP/Assis).

Tabela 1- Sistemática geral de Hexacorallia e Ceriantharia. Destacam-se valores de famílias, gêneros e espécies válidas contemporâneas e aquelas representadas no presente estudo para cada caso (total/representado nas análises). Sistemática geral dos grupos construída a partir do banco de dados do World Register of Marine Species (WoRMS) em janeiro 2023.

Taxa	Famílias	Gêneros	spp
Corallimorpharia	4/3	12/8	48/8
Scleractinia	33/17	235/47	1680/47
Antipatharia	7/5	50/17	294/17
Actinaria	51/16	275/25	1174/25
Zoantharia	9/8	27/10	288/10
Ceriantharia	3/3	40/3	139/3
TOTAL	107/52	642/110	3623/110

### 3.3 Isolamento e alinhamento de genes selecionados do genoma mitocondrial

Utilizando o programa Geneious foram isoladas as regiões codificantes de três genes representando as principais etapas metabólicas da fosforilação oxidativa na mitocôndria: produção de ATP, “ATP synthase membrane subunit 6” ATP6, “Cytochrome c oxidase I” cadeia transportadora de elétrons COI e “NADH dehydrogenase subunit 5” cadeia transportadora de prótons NAD5. No total, 110 DNAmít foram base para os dados analisados.

Após o isolamento das subunidades, cada matriz inicial de dados foi alinhada de forma independente com o algoritmo “translation aware” do pacote MAFFT Version 7 (KATO; STANDLEY, 2013) implementado como add-on no Geneious; sendo assim, evita-se a potencial geração de regiões que afetem a codificação original de códons (geralmente chamados de erros artificiais do marco de leitura). A tabela de tradução dos códons utilizada foi a “Invertebrate Mitochondrial” (transl\_table 5), pois é a tabela aceita no servidor de análise DataMonkey (WEAVER *et al.*, 2018). Regiões homólogas que apresentaram eventos de inserção e deleção nos alinhamentos (regiões com gaps) foram removidas manualmente dos alinhamentos, para finalmente estabelecer as matrizes de dados para análise no servidor de análise DataMonkey (WEAVER *et al.*, 2018). O total de espécies (terminais) e posições no alinhamento (espécies:códons) foram ATP6=104:195, COI=103:498 e NAD=103:457.

### 3.4 Análise de evolução com foco nos processos de seleção

Para definir uma visão integral dos diferentes tipos de cenários de seleção “gene, sítio, ramo filogenético” foram aplicados os algoritmos BUSTED (Branch-site Unrestricted Statistical Test for Episodic Diversification; MURRELL *et al.*, 2015) para verificar a presença de seleção diversificadora a partir do ponto de vista do gene em si, e aqueles com abordagem episódica, MEME (Mixed Effects Model of Evolution; (MURRELL *et al.*, 2012), verificando a presença de seleção a partir do ponto de vista dos sítios, e aBSREL (adaptive Branch-Site Random Effects Likelihood; (SMITH *et al.*, 2015), a fim de verificar a presença de seleção a partir do ponto de vista dos ramos da filogenia. Para cada caso foram mantidas as condições padrão (default) de análise, sendo o clado Ceriantharia (3 espécies) estabelecido como grupo irmão das demais linhagens dos Hexacorallia, clado incluindo terminais de Antipatharia (17 espécies), Corallimorpharia (8 espécies), Actiniaria (25 espécies), Scleractinia (47 espécies) e Zoantharia (10 espécies) (Tabela 1).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Método MEME

O terceiro método utilizado no trabalho, Mixed Effects Model of Evolution, encontrou evidências para seleção positiva/diversificadora episódica nos três genes, com todos com o limite de valor  $p=0.1$ .

Para o gene ATP6, MEME encontrou evidências para seleção positiva/diversificadora episódica em 5 sítios, sendo eles os códons 61, 142, 57, 55 e 136. O segundo gene, COI, encontrou-se evidências para seleção positiva/diversificadora episódica em 12 sítios, nos códons 131, 336, 496, 337, 476, 489, 166, 498, 195, 126, 466 e 495. E o último gene, ND5, houve evidências para seleção positiva/diversificadora episódica em 19 sítios, nos códons 335, 341, 318, 338, 344, 359, 15, 268, 438, 347, 50, 93, 418, 7, 339, 401, 30, 32 e 446.

### 4.2 Método BUSTED

Utilizando a metodologia Branch-site Unrestricted Statistical Test for Episodic Diversification (BUSTED), houve evidências de seleção diversificadora episódica nos genes COI ( $p=0.0001434$ ) e ND5 ( $p=0.0006292$ ), porém não houve no gene ATP6 ( $p=0.05126$ ).

Para o primeiro gene, o ATP6, no alinhamento havia 104 sequências, contendo 195 códons no total, porém com 0 sítios com taxa de evidências  $\geq 10$  para seleção positiva. O segundo, o gene COI, o alinhamento havia 103 sequências, contendo 498 códons no total; e com 8 sítios com taxa de evidências  $\geq 10$  para seleção positiva, sendo eles os códons 131, 488, 498, 482, 495, 489, 484 e 337. E por último, o gene ND5, o alinhamento tinha 103 sequências, contendo 457 códons no total; e com 3 sítios com taxa de evidências  $\geq 10$  para seleção positiva, sendo eles os códons 341, 335 e 338.

#### 4.3 Método aBSREL

Após a análise utilizando o método Adaptive Branch Site REL, houve evidências de seleção diversificadora episódica em todos os genes analisados. A significância foi verificada utilizando o Likelihood Ratio Test com o limite de  $p \leq 0.05$ , depois de correção para testagem múltipla. Nesta análise, há resultados para outros tipos de seleção, além da diversificadora. Por esse motivo, há resultados que apresentam mais de uma classe de taxa  $\omega$ . Isto acontece, pois pode haver diferentes tipos e tendências de seleções dependendo da região do gene (e.g. 90% da proporção dos sítios de um gene pode estar sob seleção purificadora enquanto os outros 10% podem estar sob seleção diversificadora).

Na análise do primeiro gene, ATP6, no alinhamento havia 104 sequências, contendo 195 códons no total e houve um total de 202 ramos formalmente testados para seleção diversificadora (Figura 3). Do total de ramos, 180 (89% do total de ramos) apresentaram apenas 1 classe de taxa de substituições não-sinônimas sobre substituições sinônimas ( $dN/dS = \omega$ ) com o equivalente a 6,6% do total da variabilidade genética da árvore, enquanto os outros 22 (11% do total de ramos) apresentaram 2 classes de taxa  $\omega$  com o equivalente a 93% da variabilidade genética da árvore. Dentre os 22 ramos, 2 destes apresentaram evidências para presença de seleção, sendo eles ramos terminais e referentes às espécies *Siderastrea radians* (Scleractinia), com  $\omega_1 = 0.217$  ( $\omega < 1$  = seleção purificadora), distribuída em 94% dos sítios e  $\omega_2 = 9090$  ( $\omega > 1$  = seleção positiva), distribuída em 6,4% dos sítios (Figura 4); e *Savalia savaglia* (Zoantharia), com  $\omega_1 = 0.0541$  ( $\omega < 1$  = seleção purificadora), distribuída em 98% dos sítios e  $\omega_2 = 110$  ( $\omega > 1$  = seleção positiva), distribuída em 2% dos sítios (Figura 5).

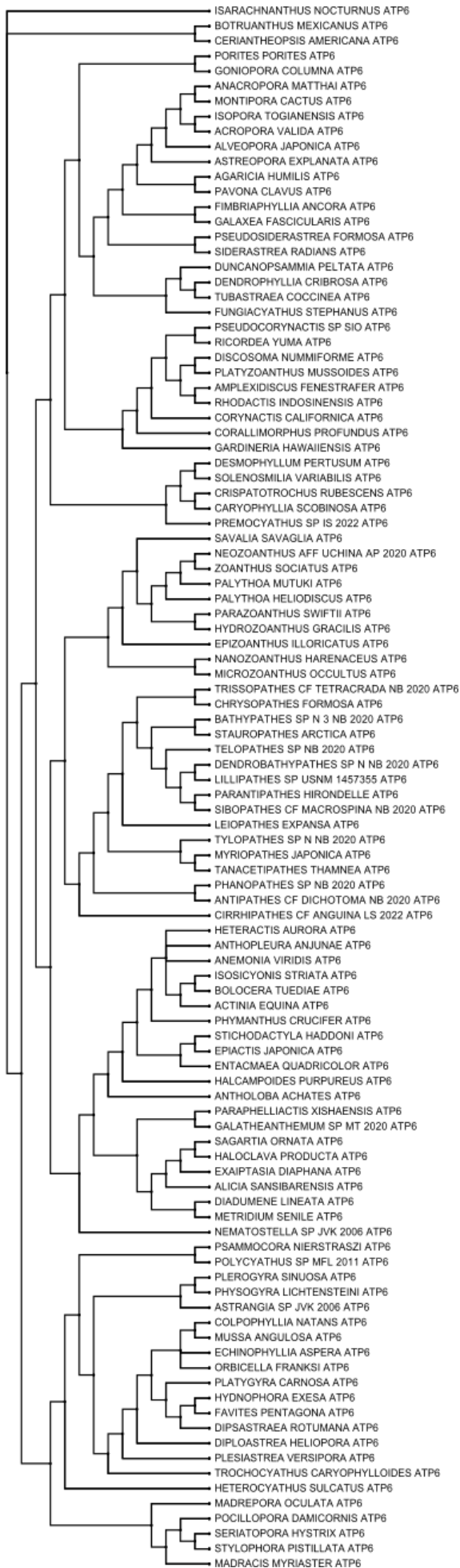


Figura 3 - Filogenia gerada na análise do gene ATP6 pelo método aBSREL.

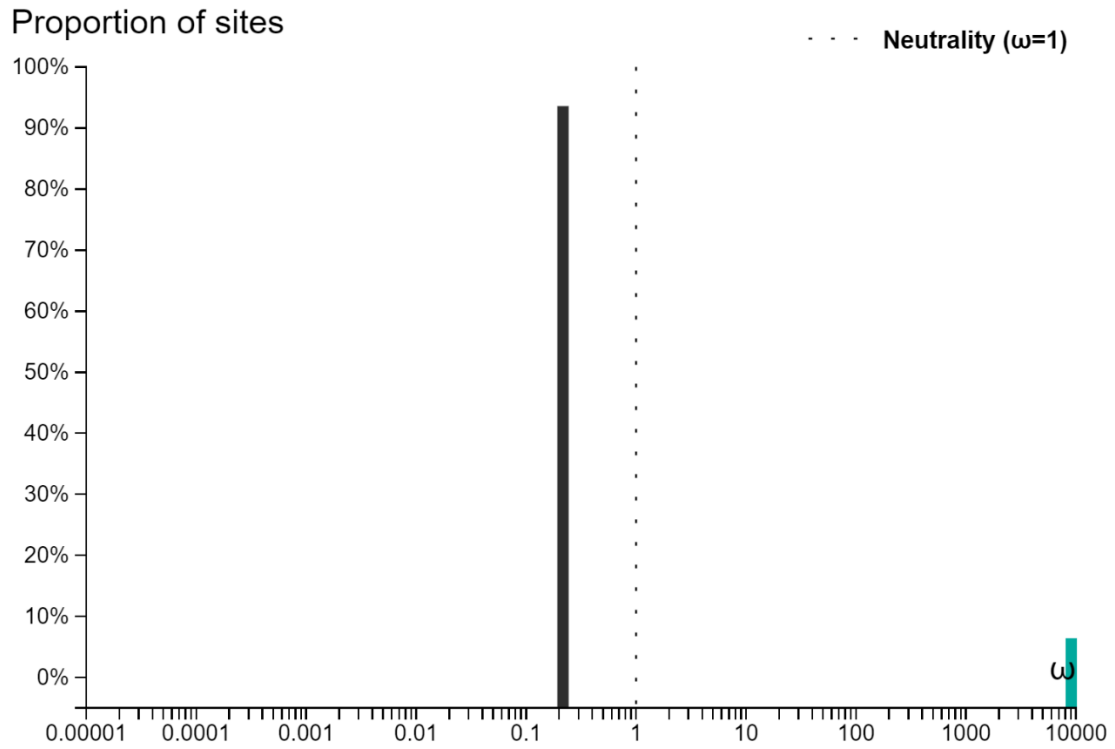


Figura 4 - Gráfico da relação de proporção de sítios e a taxa  $\omega$  da espécie *Siderastrea radians* (Scleractinia).

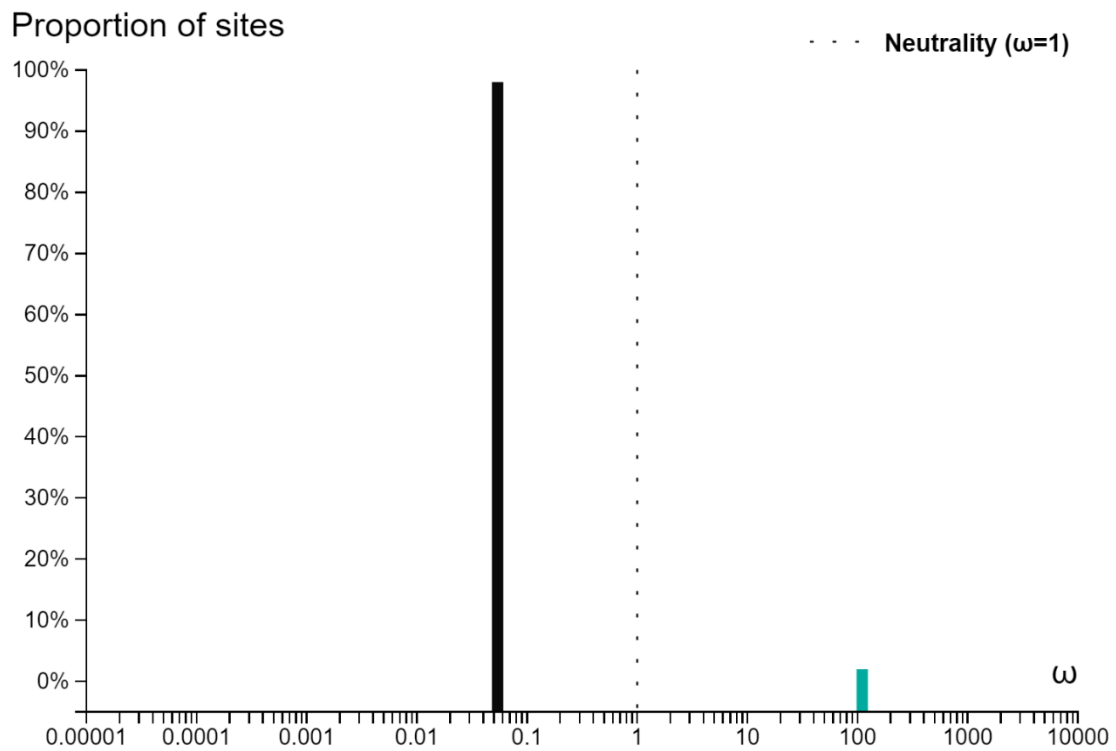


Figura 5 - Gráfico da relação de proporção de sítios e a taxa  $\omega$  da espécie *Savalia savaglia* (Zoantharia).

Na segunda análise, do gene COI, o alinhamento tinha 103 sequências, contendo 498 códonos no total, e houve um total de 202 ramos formalmente testados para a presença de seleção (Figura 6). Do total de ramos, 169 (84% do total de ramos) apresentaram apenas 1 classe de taxa  $\omega$  com o equivalente a 15% da variabilidade genética da árvore; 30 (15% do total de ramos) apresentaram 2 classes de taxa  $\omega$  com o equivalente a 66% da variabilidade genética da árvore; e 3 (1,5% do total de ramos) apresentaram 3 classes de taxa  $\omega$  com o equivalente a 19% da variabilidade genética da árvore. Destes ramos, apenas 1 teve evidências de seleção: o nó 41, o qual teve 3 classes de taxa  $\omega$ , sendo eles:  $\omega_1 = 1.00$  ( $\omega = 1 =$  neutralidade), distribuídas em 89% dos sítios;  $\omega_2 = 1.00$  ( $\omega_1 \approx \omega_2 \approx 1$ ), distribuídas em 10% dos sítios; e  $\omega_3 = 1960$  ( $\omega > 1 =$  seleção positiva), distribuídas em 0.71% dos sítios (Figura 7). O nó 41 abrange 10 espécies de Scleractinia.

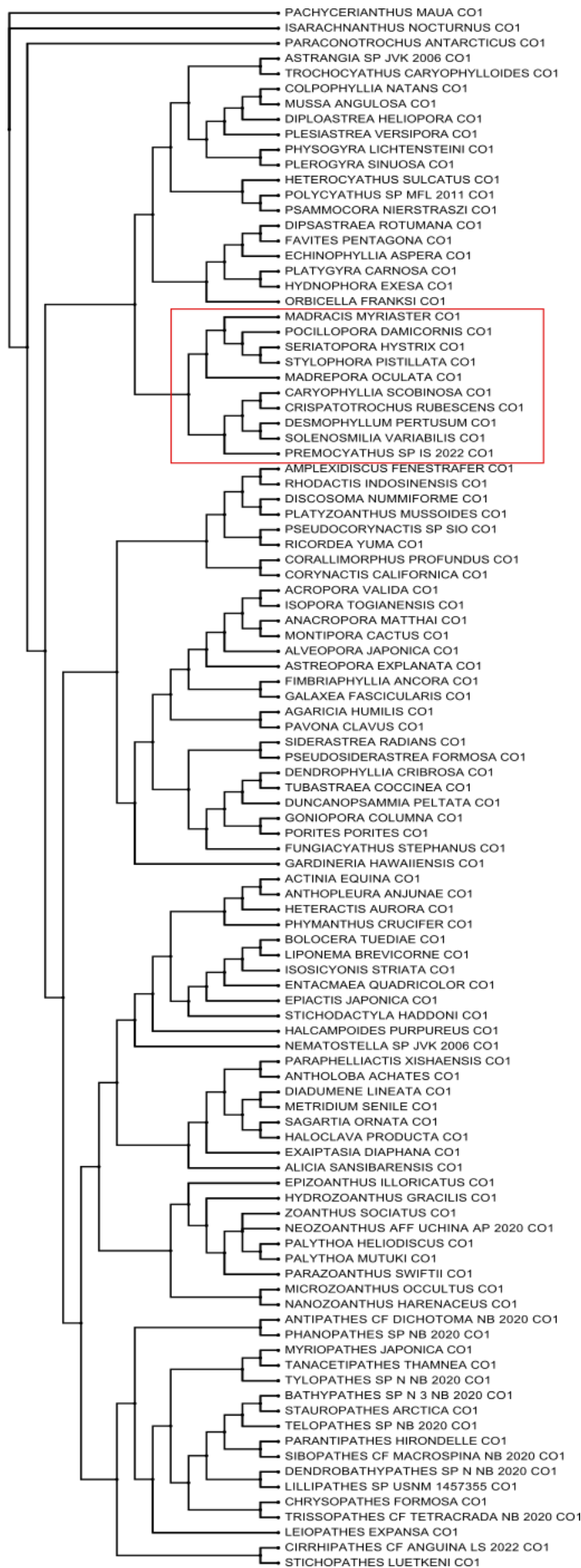


Figura 6 - Filogenia gerada na análise do gene COI pelo método aBSREL, destacando o nó 41.

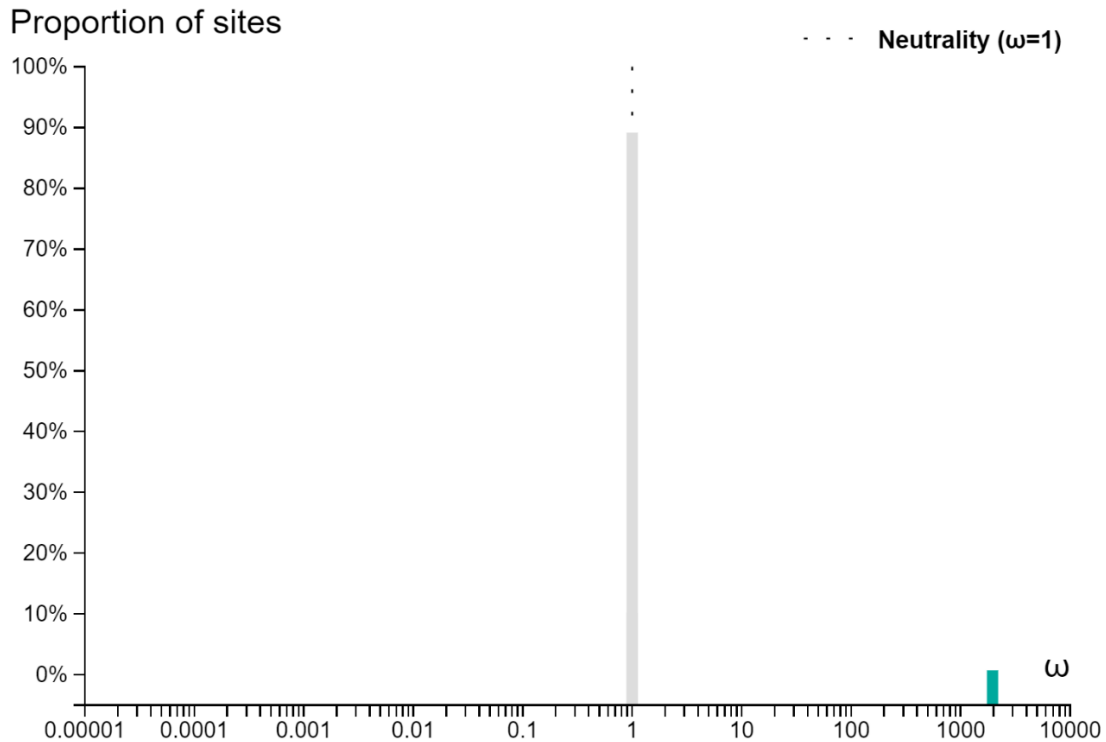


Figura 7 - Gráfico da relação de proporção de sítios e a taxa  $\omega$  do nó 41.

A terceira análise considera o gene ND5: o alinhamento tinha 103 seqüências, contendo 457 códons no total, e houve um total de 203 ramos formalmente testados para a presença de seleção diversificadora (Figura 8). Do total de ramos, 167 (82% do total de ramos) do ramos apresentaram 1 classe de taxa  $\omega$  com o equivalente 13% do total da variabilidade genética da árvore, enquanto que os outros 36 (18% do total de ramos) apresentaram 2 classes de taxa  $\omega$  com o equivalente a 87% da variabilidade genética da árvore. Dentre os 36 ramos, 3 destes apresentaram evidências para seleção, sendo 2 deles ramos terminais e referentes às espécies *Sagartia ornata* (Actiniaria), com  $\omega_1 = 0.00$  ( $\omega \approx 0$  = praticamente ausência de substituições não sinônimas), distribuída em 96% dos sítios e  $\omega_2 = 132$  ( $\omega > 1$  = seleção positiva), distribuída em 3,9% dos sítios (Figura 9); e *Microzoanthus occultus* (Zoantharia), com  $\omega_1 = 0.0365$  ( $\omega < 1$  = seleção purificadora), distribuída em 95% dos sítios e  $\omega_2 = 26.1$  ( $\omega > 1$  = seleção positiva), distribuída em 5,2% dos sítios (Figura 10). O terceiro ramo é o nó 157, com  $\omega_1 = 0.0913$  ( $\omega < 1$  = seleção purificadora), distribuída em 89% dos sítios e  $\omega_2 = 119$  ( $\omega > 1$  = seleção positiva), distribuída em 11% dos sítios (Figura 11), sendo que este nó abrange 24 espécies de Scleractinia.

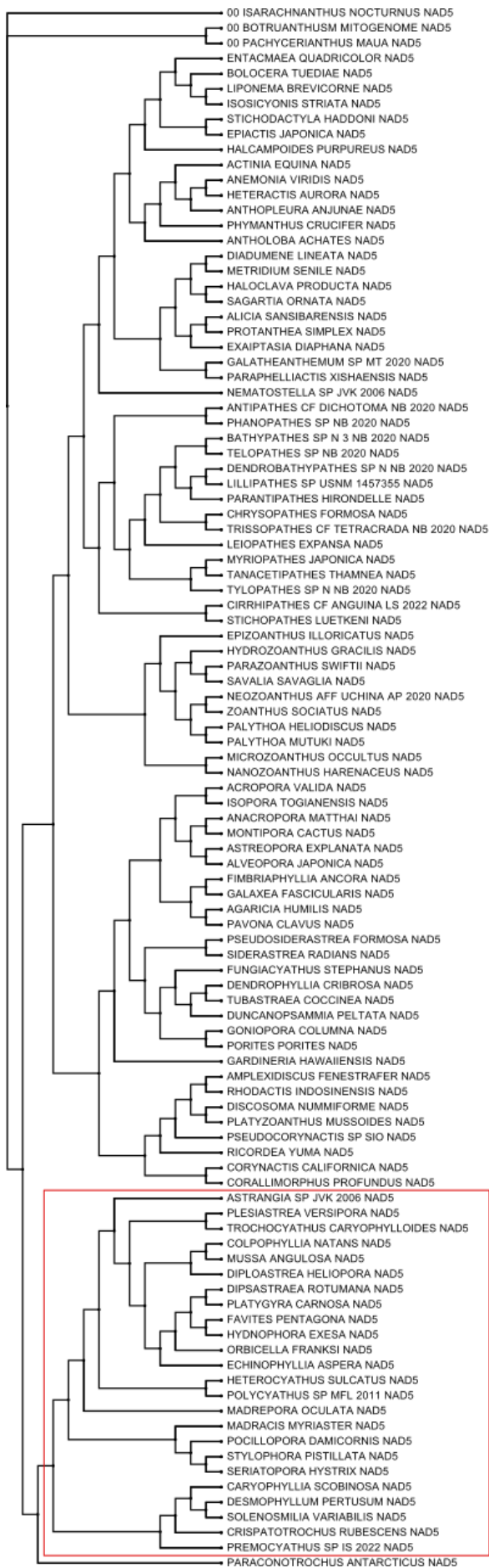


Figura 8 - Filogenia gerada na análise do gene ND5 pelo método aBSREL, destacando o nó 157.

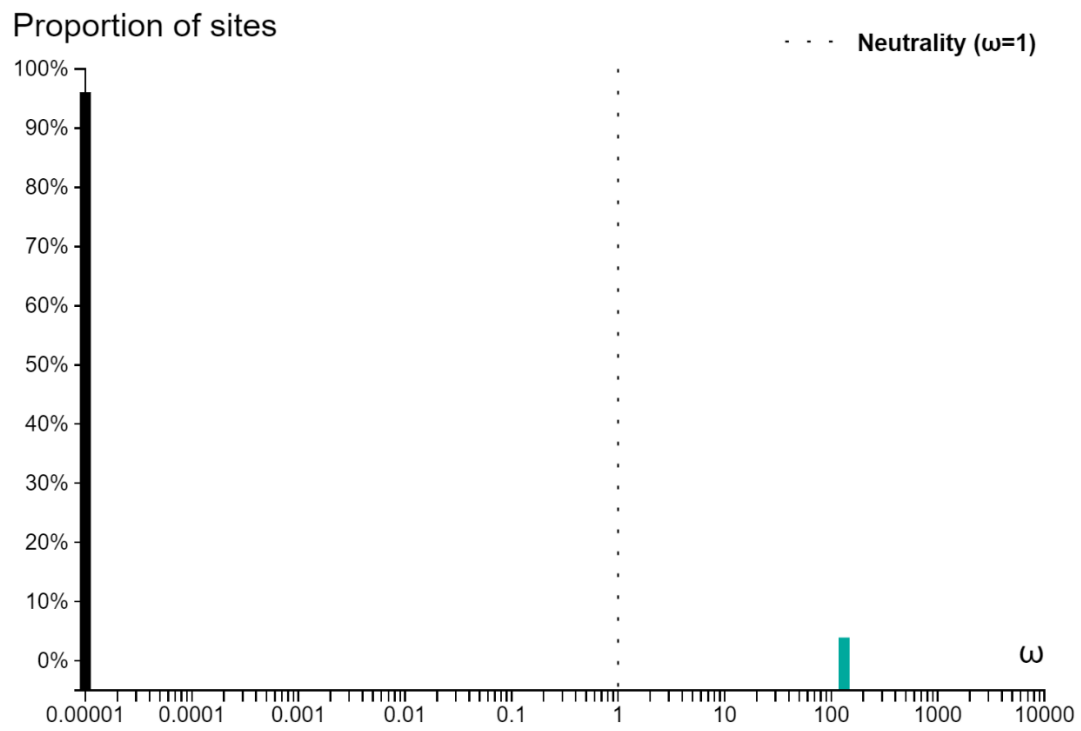


Figura 9 - Gráfico da relação de proporção de sítios e a taxa  $\omega$  da espécie *Sagartia ornata* (Actiniaria).

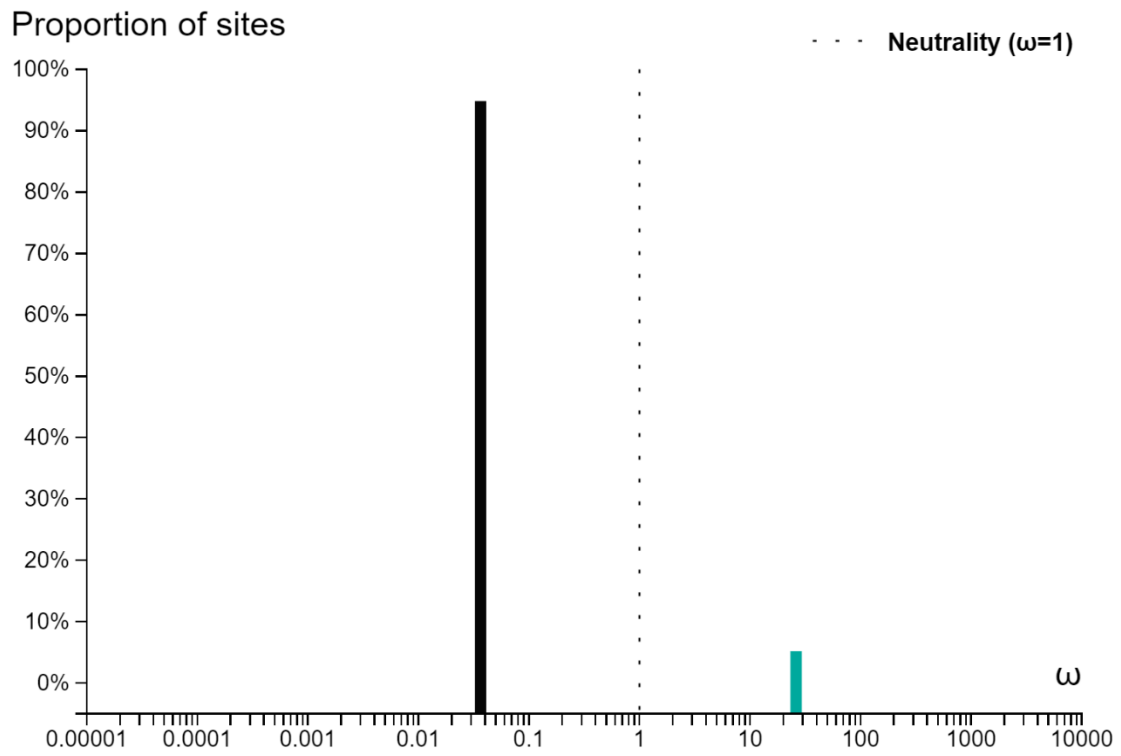


Figura 10 - Gráfico da relação de proporção de sítios e a taxa  $\omega$  da espécie *Microzoanthus occultus* (Zoantharia).

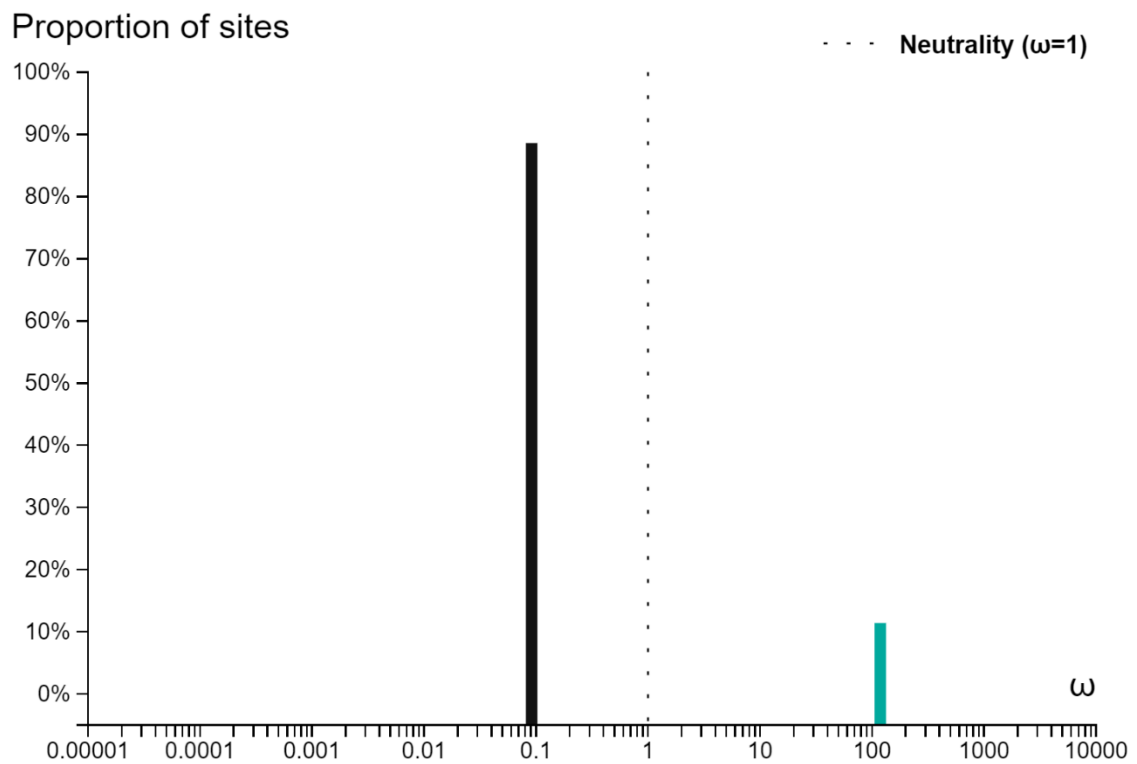


Figura 11 - Gráfico da relação de proporção de sítios e a taxa  $\omega$  do nó 157.

#### 4.4 Comparações dos resultados

Tabela 2 - Resultados das análises de seleção nos genes mitocondriais ATP6, COI e ND5, considerando método de análise com base na informação gênica (BUSTED), topologia filogenética (aBSREL) e sítios (MEME).

Gene	ramos:sequências:códons	MEME	BUSTED	aBSREL
ATP6	202:104:195	sim: 5 códons	não	sim: 2 ramos, 2 spp
COI	202:103:498	sim: 12 códons	sim: 8 códons	sim: 1 ramo, 10 spp
ND5	203:103:457	sim: 19 códons	sim: 3 códons	sim: 3 ramos, 26 spp

Um resultado interessante nas análises dos genes COI e ND5 no método dos ramos (aBSREL), é que as 10 espécies de Scleractinia do nó 41 (análise do gene COI) apresentando sinal de seleção positiva também estão presentes entre as 24 espécies de Scleractinia do nó 157 (análise do gene ND5), também com evidências para tal seleção. As espécies em questão estão dispostas na Tabela 3, agrupadas em suas respectivas famílias.

Tabela 3 - Espécies em comum de Scleractinia com presença de seleção diversificadora nos genes COI e ND5 pelo método aBSREL

Famílias	Espécies
Caryophylliidae	<i>Caryophyllia scobinosa</i>
	<i>Crispatotrochus rubescens</i>
	<i>Desmophyllum pertusum</i>
	<i>Premocyathus</i> sp
	<i>Solenosmilia variabilis</i>
Pocilloporidae	<i>Madracis myriaster</i>
	<i>Pocillopora damicornis</i>
	<i>Seriatopora hystrix</i>
	<i>Stylophora pistillata</i>

Oculinidae	<i>Madrepora oculata</i>
------------	--------------------------

Outra observação destas espécies de Scleractinia é que todas elas estão incluídas no clado “Robust”, dentro de Scleractinia, sendo uma das características deste clado a taxa mais rápida de evolução do genoma mitocondrial, em comparação aos outros antozoários (KITAHARA *et al.*, 2014). Sugere-se que este fato pode estar relacionado à diminuição da eficiência do processo de reparo do genoma mitocondrial neste clado (KITAHARA *et al.*, 2014), e os resultados positivos para a presença de seleção em dois dos três genes analisados deste trabalho (COI e ND5) condiz com essa hipótese.

## 5 DISCUSSÃO

Os estudos de seleção molecular permitem avaliar de forma direta a diversidade genética em termos de processos evolutivos. As distintas formas que estes processos podem acontecer encontram-se relacionados com dois fenômenos de difícil tratamento direto em organismos como os cnidários (taxa mutacional e dinâmica populacional). Pela sua parte, a mitocôndria é uma importante fonte metabólica do organismo eucarioto, assim como referência para estudos de sistemática e taxonomia. Nossos resultados reforçam um cenário complexo, como destacado nos recentes trabalhos focados em Zoantharia (POLISENO *et al.*, 2020), Scleractinia (SEIBLITZ *et al.*, 2020) e nos Anthozoa em geral (QUATTRINI *et al.* Preprint. 2022). Por exemplo, o gene COI, que é um dos vários genes mitocondriais entendidos como fonte de alta variabilidade genética, não estava entre a maior diversidade genética nos resultados obtidos (clado Zoantharia; POLISENO *et al.*, 2020). Se considerarmos a seleção em termos filogenéticos (resultados aBSREL) observamos presença de ramos sob seleção diversificadora em 1, 2 e 3 ramos (COI, ATP6 e ND5, respectivamente). De forma integrada, casos de seleção positiva encontram-se em relativamente poucos sítios e ramos filogenéticos; entretanto, isto pode ser um contexto para avaliar casos de adaptação associada a eventos raros e heterogêneos. Por exemplo, na análise do gene COI no método aBSREL, as 10 espécies de Scleractinia do nó 41 apresentando sinal de seleção positiva estão presentes entre as 24 espécies de Scleractinia do nó 157, também com evidências para tal seleção, na análise do gene ND5.

Comparando os resultados dos métodos BUSTED e MEME, observou-se uma discrepância considerável. No método BUSTED, encontrou-se 0, 8 e 3 sítios com taxa de

evidência para seleção positiva para os genes ATP6, COI e ND5, respectivamente. Enquanto no método MEME, encontrou-se 5, 12 e 19 sítios com evidências de seleção positiva/diversificadora episódica para os genes ATP6, COI e ND5, respectivamente. Contudo, houve códons sob seleção positiva/diversificadora em comum entre os métodos BUSTED, sendo eles os sítios: 131, 498, 495, 489 e 337, para o gene COI; e 341, 335 e 338, para o gene ND5.

Logo depois do início do presente projeto, foi liberado um texto em fase de revisão (QUATTRINI *et al.* Preprint. 2022). Nele os autores realizam um estudo geral de seleção gênica nos DNAmít nos Anthozoa, mas não encontram-se detalhados quais clados/espécies, genes ou sítios estariam sob seleção, especialmente sobre aquela associada a eventos de adaptação (seleção diversificadora). Além disso, utilizam apenas um método analítico, enquanto neste presente trabalho utilizou-se três métodos analíticos diferentes, cada um com um ponto de vista comparativo diferente (sítios, genes e ramos), dando um caráter mais detalhado em relação ao trabalho em fase de revisão.

## 6 CONCLUSÃO

Os genes analisados apresentam seleção positiva em quase todos os casos, com exceção da análise do gene ATP6 (método BUSTED), a qual não houve taxa de evidências suficiente para a presença de seleção. Genes avaliados descrevem padrões históricos diferentes, destacando uma história complexa e heterogênea ao considerar a mitocôndria como um genoma de grande relevância para os organismos em estudo. A presença de seleção em espécies (ramos recentes) assim como nos ancestrais demonstra que as linhagens se encontraram em processos que potencialmente poderiam ser base de fenômenos adaptativos. Acreditamos que estudos como o próprio do presente projeto, literatura recente e no futuro próximo no contexto comparativo serão de grande valor para ampliar e aprimorar os estudos neste sentido. Partindo de uma melhor compreensão de outras características genotípicas (i.e., de como os genomas lineares e fragmentados nos Ceriantharia impactam na taxa mutacional), fenotípicas (i.e., ciclos de vida, cnidae) e ecológicas (i.e., batimetria), podem ser base fértil de hipóteses para descrever e explicar de forma mais acurada e detalhada a macroevolução dos antozoários, com destaque para Hexacorallia e Ceriantharia.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALBERTS, Bruce *et al.* **Fundamentos da Biologia Celular**. 4. ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed, 2017.
- ALMEIDA, D. *et al.* Adaptation of the Mitochondrial Genome in Cephalopods: Enhancing Proton Translocation Channels and the Subunit Interactions. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135405, 18 ago. 2015.
- BAGUÑÀ, J. *et al.* Back in time: a new systematic proposal for the Bilateria. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 363, n. 1496, p. 1481–1491, 2008.
- BENETI, JULIA S. *et al.* A new species of *Diadumene* (Actiniaria: Diadumenidae) from the subtropical coast of Brazil. **Zootaxa**, v. 4021, n. 1, p. 156-168, 2015.
- BROWN, W. M. *et al.* Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v. 18, n. 4, p. 225–239, 1982.
- FAUTIN, D. *Corallimorphus niwa* new species (Cnidaria: Anthozoa), New Zealand members of Corallimorphus, and redefinition of Corallimorphidae and its members. **Zootaxa**, v. 2775, 24 fev. 2011.
- FUJII, T.; REIMER, J. D. A new family of diminutive zooxanthellate zoanthids (Hexacorallia: Zoantharia). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 3, p. 509–522, 2013.
- GREBELNY’I S.D. Symmetry of actinians and its significance for the classification of Anthozoa. In: Biology of coral reefs. **Academy of Sciences of the USSR**. Far Eastern Scientific Center, Institute of Marine Biology, Vladivostok. p. 101-123, 1982. (traduzido por M. Perekrestenko).
- GRIFFITHS, Anthony J F.; DOEBLEY, John; PEICHEL, Catherine; *et al.* **Introdução à Genética**. 12. ed. São Paulo, Brasil: Grupo GEN, 2022.
- GONÇALVES, J. F. On the origin of bilaterality : insights from the study of black corals (Cnidaria : Antipatharia). phdthesis—[s.l.] Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 28 set. 2016.
- HADDON, Alfred C. (Alfred Cort); SHACKLETON, A. M.; SOCIETY., R. D. **A revision of the British actiniæ part II the zoantheæ**. [s.l.] Dublin, Royal Dublin Society, 1891, [s.d.].
- HELLBERG, M. E. No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, n. 1, p. 24, 16 mar. 2006.
- HUANG, D. *et al.* Slow Mitochondrial COI Sequence Evolution at the Base of the Metazoan Tree and Its Implications for DNA Barcoding. **Journal of Molecular Evolution**, v. 66, n. 2, p. 167–174, 1 fev. 2008.

- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.
- KITAHARA, M. V. *et al.* The “naked coral” hypothesis revisited--evidence for and against scleractinian monophyly. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94774, 2014.
- MANUEL, R. L. **British Anthozoa: Keys and Notes for the Identification of the Species (Synopses of the British Fauna - New Series.** London: Academic Press, 1981.
- MARISCAL, R. N.; CONKLIN, E. J.; BIGGER, C. H. The Ptychocyst, a Major New Category of Cnida Used in Tube Construction by a Cerianthid Anemone. **The Biological Bulletin**, v. 152, n. 3, p. 392–405, jun. 1977.
- MCFADDEN, C. S. *et al.* Phylogenomics, Origin, and Diversification of Anthozoans (Phylum Cnidaria). **Systematic Biology**, v. 70, n. 4, p. 635–647, 1 jul. 2021.
- MURRELL, B. *et al.* Detecting Individual Sites Subject to Episodic Diversifying Selection. **PLOS Genetics**, v. 8, n. 7, p. e1002764, 12 jul. 2012.
- MURRELL, B. *et al.* Gene-wide identification of episodic selection. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n. 5, p. 1365–1371, 2015.
- O’LEARY, N. A. *et al.* Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D733–D745, 4 jan. 2016.
- POLISENO, A. *et al.* Evolutionary implications of analyses of complete mitochondrial genomes across order Zoantharia (Cnidaria: Hexacorallia). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 58, n. 4, p. 858–868, 2020.
- QUATTRINI, A. M. *et al.* Extreme mito-nuclear discordance within Anthozoa, with notes on unique properties of their mitochondrial genomes. **bioRxiv**, , 21 out. 2022.
- QUATTRINI, A. M. *et al.* Palaeoclimate ocean conditions shaped the evolution of corals and their skeletons through deep time. **Nature Ecology & Evolution**, v. 4, n. 11, p. 1531–1538, 2020.
- REIMER, J.; SINNIGER, F. **World List of Zoantharia. Zoantharia.** Disponível em: <<https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=607338> on 2023-02-01>. Acesso em: 2023.
- SCRUTTON, C. T. The Palaeozoic corals, I: origins and relationships. **Proceedings of the Yorkshire Geological Society**, v. 51, n. 3, p. 177–208, maio 1997.
- SEIBLITZ, I. G. L. *et al.* The earliest diverging extant scleractinian corals recovered by mitochondrial genomes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 20714, 26 nov. 2020.
- SHEARER, T. L.; COFFROTH, M. A. DNA BARCODING: Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 247–255, 2008.

- SHICK, J. M. **A functional biology of sea anemones**. 1 ed. London: Chapman & Hall, 1991.
- SINNIGER, F. *et al.* Phylogeny of the order Zoantharia (Anthozoa, Hexacorallia) based on the mitochondrial ribosomal genes. **Marine Biology**, v. 147, p. 1121–1128, 1 set. 2005.
- SMITH, M. D. *et al.* Less Is More: An Adaptive Branch-Site Random Effects Model for Efficient Detection of Episodic Diversifying Selection. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 5, p. 1342–1353, 1 maio 2015.
- STAMPAR, S. N. **Ceriantharia: a retomada de um clado esquecido**. Doutorado em Zoologia—São Paulo: Universidade de São Paulo, 12 abr. 2012.
- STAMPAR, S. N. *et al.* Linear Mitochondrial Genome in Anthozoa (Cnidaria): A Case Study in Ceriantharia. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6094, 15 abr. 2019.
- STAMPAR, S. N. *et al.* Ceriantharia in current systematics: Life cycles, morphology and genetics. Em: **The Cnidaria, Past, Present and Future**. Cham: Springer International Publishing, p. 61–72, 2016.
- SWAIN, T. D. Evolutionary transitions in symbioses: dramatic reductions in bathymetric and geographic ranges of Zoanthidea coincide with loss of symbioses with invertebrates. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 2587–2598, 9 jun. 2010.
- SWAIN, T. D. Revisiting the phylogeny of Zoanthidea (Cnidaria: Anthozoa): Staggered alignment of hypervariable sequences improves species tree inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 118, p. 1–12, 1 jan. 2018.
- TIFFON, Y. Ordre des Cérianthaires. Em: GRASSE, P. (Ed.). **Traité de Zoologie: Anatomie, Systematique, Biologie – Cnidaires/Anthozoaires, Tome III**. Paris: Masson, p. 210–256, 1987.
- VAN BENEDEN E. Travaux posthumes d' Edouard van Beneden sur les cérianthaires collationnés par Paul Cerfontaine. **Archives de Biologie, hors serie**, p. 1–242, 1924.
- VAWTER, L.; BROWN, W. M. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. **Science (New York, N.Y.)**, v. 234, n. 4773, p. 194–196, 1986.
- WEAVER, S. *et al.* Datamonkey 2.0: A Modern Web Application for Characterizing Selective and Other Evolutionary Processes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 3, p. 773–777, 1 mar. 2018.