

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Simulium rubrithorax* Lutz (DIPTERA: SIMULIIDAE) UTILIZANDO O GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I (COI)

Barbara Suelen Ferreira de CASTRO<sup>1</sup>  
Vanderly ANDRADE-SOUZA<sup>2</sup>  
Neusa HAMADA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Orientadora INPA/Bolsista DCR CNPQ/FAPEAM; <sup>3</sup>Coorientadora CBIO/INPA

### INTRODUÇÃO

Representantes da família Simuliidae de dípteros aquáticos, conhecidos como borrachudos, estão ausente apenas na Antártica, desertos e ilhas onde não há condições favoráveis para que as larvas se desenvolvam (Adler *et al.* 2004). Esta família possui aproximadamente 2.150 espécies, incluído 12 fósseis, sendo que na Região Neotropical ocorrem 320 espécies, destas, 92 são registradas no Brasil.

Devido a seu hábito hematófago algumas espécies dessa família são vetores de agentes etiológicos, como vírus, bactérias, protozoários e helmintos, dentre estes a *Manzonella ozzardi* Manson e a *Onchocerca volvulus* (Leuckart), causadores da mansonelose e oncocercose, respectivamente. Essa última doença ocorre apenas na África, América Central e América do Sul; no entanto, há poucos estudos, principalmente na região Neotropical (Shelley *et al.* 1997).

Entre as espécies hematófagas está *Simulium rubrithorax*, a qual tem registro de hábito zoofílico (Pepinelli 2008) e antropofílico (Benchimol *et al.* 2006); no entanto, ainda não há registro que esta espécie cause problemas à vida do homem, contudo pode causar desconforto em alguns lugares devido a sua picada, seguir-se forte irritação com prurido, dor e inchaço. Esta espécie ocorre na Argentina, Bolívia, Colômbia, Venezuela e no Brasil ocorre em Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Roraima e Santa Catarina (Adler e Crosskey 2014).

Essa família é mundialmente conhecida por apresentar diversos casos de espécies crípticas. Tem sido feitas análises moleculares utilizando sequências de DNA mitocondrial, principalmente com a subunidade I do gene Citocromo Oxidase (COI). Tais estudos com DNAm têm mostrando grande êxito para delimitação das espécies, revelar diversidade críptica e fazer inferências filogenéticas em simulídeos (Rivera e Currie 2009; Hamada *et al.* 2010; Hernandez *et al.* 2012).

O objetivo do presente estudo foi caracterizar através de análise molecular do gene mitocondrial COI populações de *S. rubrithorax* de São Paulo, Ceará, Minas Gerais e uma da Venezuela, a qual foi incluída para investigar se os espécimes correspondem a esta espécie ou a *S. paynei*, espécie muito similar morfológicamente.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados de 8 a 15 indivíduos (no estágio de larva ou pupa) de cada população dos estados de São Paulo (30SP), Ceará (17CE) e Minas Gerais (1MG, 8MG e 27) e uma da Venezuela para extração de DNA, usando o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). As extrações foram feitas pelos métodos destrutivo e não destrutivo e os respectivos voucher armazenados no laboratório como material testemunho. As sequências parciais da subunidade I do gene da Citocromo Oxidase I (COI) foram amplificadas via PCR seguindo orientações de Pramual *et al.* (2005), utilizando os *primers* específicos para esta região gênica (Folmer *et al.* 1994).

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com GelRed e as bandas de DNA, visualizadas e fotografadas em fotodocumentador de luz ultravioleta (UV). O marcador utilizado foi o ΦX174 DNA/BsuRI.

Em seguida, as amplificações foram purificadas com as enzimas EXO I e FastAP e enviadas para a empresa Myleus Biotechnology (UFMG), onde foram sequenciados utilizando a plataforma ABI3130 (Life Technologies).

As sequências foram alinhadas e editadas no programa BioEdit v. 5.0.6 (Hall, 1999). No programa *Arlequin* (Schneider *et al.*, 2000) foram calculados para cada população: composição de bases nucleotídicas; tipo de substituição de bases nucleotídicas mais frequentes; número de sítios polimórficos; número de sítios informativos para parcimônia; número médio de diferenças nucleotídicas, diversidades haplotípica e nucleotídica, frequências e compartilhamento de haplótipos e feito o teste de AMOVA. A matriz de distância genética foi construída no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011). Estas análises foram calculadas utilizando o modelo Kimura-2-Parâmetro ( $K_2P$ ) de substituição de bases nucleotídicas.

As relações entre os haplótipos foram inferidas por meio de *Median Joining* no programa *Network* (Bandlet *et al.* 1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisadas 71 sequências do fragmento da subunidade I do gene Citocromo Oxidase, contendo 668 pb, sendo 81 informativos para parcimônia. Quanto à composição nucleotídica, a maior proporção foi de T+A (66,7%), o que é esperado para DNA mitocondrial de insetos (Scarpassa e Cohn 2006).

As diversidades haplotípicas e nucleotídicas foram usadas como medida da diferenciação genética. Variando de 0.533 na população 1VE a 0.952 na população de 1MG e de 0.0015 na população 1VE a 0.0068 na população 27MG, respectivamente. As diversidades nucleotídicas de modo geral foram baixas, diferente dos dados obtidos em trabalho com simulídeo (Pramual *et al.* 2005).

A distância genética intrapopulacional variou de 0,22% à 0,68%, índices esperados neste tipo de análise. Quanto à distância interpopulacional variou de 0,45% entre as populações 8MG e 30SP a 10,58% entre a população 1VE e a população 1MG, com a média de 4,7%. A taxa de distância acima de 9% da população 1VE em relação às demais confirma que esta população corresponde à espécie *S. paynei*, a qual é morfologicamente similar à espécie *S. rubrithorax* (Hernández-Triana *et al.* 2012). Sem considerar a espécie *S. paynei* a maior de distância interpopulacional foi de 3,92% entre as populações 30SP e 17CE (Figura 1). De acordo com Rivera e Currie (2009) a distância de 4,8-6,5% indica a presença de diversidade críptica. No entanto, no trabalho de Hernandez *et al.* (2012) os valores que denotam distância genética em complexos de espécies, foi de 3,2-3,7%. Sendo assim se faz necessário a análise de mais populações de *S. rubrithorax* para avaliar se esta espécie faz parte de um complexo de espécie críptica.

O teste de AMOVA indicou que 90,15% da variação genética foi obtida entre as populações e 9,85%, dentro das populações. Por meio do índice de diferenciação genética (*F*<sub>st</sub>), foi verificado que a maioria das populações apresentou nível de diferenciação moderado exceto as populações 30SP, 27MG e 27MG e 1MG e 27MG que são similares geneticamente. Isso pode ser justificado devido essas populações estarem próximas geograficamente e pode estar ocorrendo fluxo gênico.

Figura 1. Divergência genética intrapopulacional (diagonal e em negrito) e interpopulacional (abaixo da diagonal), determinada usando o modelo K<sub>2</sub>P.

	30 SP	17 CE	27MG	1MG	8MG	1VE
São Paulo	<b>0,53%</b>					
Ceará	3,92%	<b>0,28%</b>				
Minas Gerais 27	0,61%	3,82%	<b>0,68%</b>			
Minas Gerais 1	0,60%	3,91%	0,63%	<b>0,56%</b>		
Minas Gerais 8	0,45%	3,57%	0,52%	0,49%	<b>0,22%</b>	
Venezuela	10,54%	9,48%	10,57%	10,58%	10,51%	<b>0,15%</b>

Na rede de haplótipos foram formados três haplogrupos: 1) as populações 1MG, 27MG e 30SP, as quais compartilham haplótipos; 2) a população 17CE e 3) a população 1VE (Figura 2). Dos indivíduos da população 17CE, oito representam único haplótipo e da população 1VE, sete. Em análise com *S. hirtipupa*, populações de São Paulo e Minas Gerais também formaram um haplogrupo, inclusive compartilhando haplótipos (dados não publicados). Estes dados e os obtidos com *S. rubithorax* estão relacionados com a proximidade geográfica destas populações, também são coerentes com a divergência genética baixa entre elas.

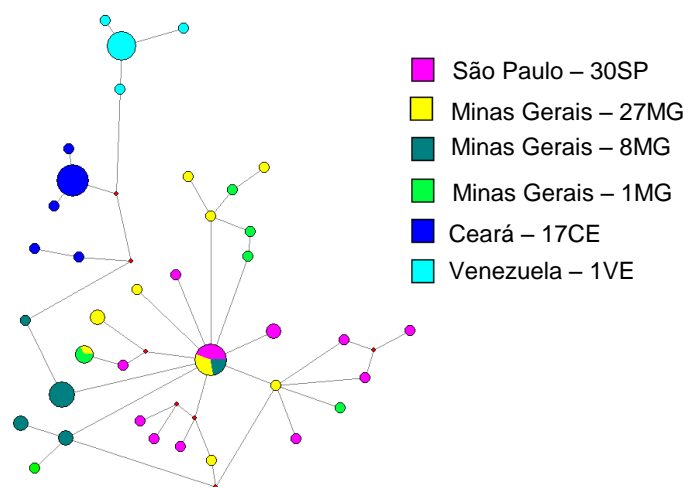


Figura 2. Rede de haplótipos obtida no programa Network. Tamanho dos círculos é proporcional ao número de haplótipos compartilhados. Círculos vermelhos são vetores medianos, que indicam os haplótipos intermediários que não foram amostrados ou extintos.

## CONCLUSÃO

Os dados obtidos ainda são incipientes para indicar que *S. rubrithorax* faz parte de um complexo de espécies crípticas, para isso será necessário a inclusão de outras populações, bem como outras análises de parâmetros populacionais, inclusive para verificar se há fluxo gênico. Os resultados também confirmaram a eficiência da região do DNA *barcode* para análise de divergência intra e interespecífica.

## REFERÊNCIAS

- Adler, P.H.; Crosskey, R.H. 2014. World Blackflies (Diptera: Simuliidae): A *Comprehensive Revision Of The Taxonomic And Geographical Inventory*. Clemson University Press, South Carolina, USA.
- Adler, P.H.; Currie, D.C.; Wood, D.M. 2004. *The Black Flies (Diptera: Simuliidae) of North America*. Cornell University Press, United States of America. 941p.
- Benchimol, J.L.; SÁ, MR., eds. and orgs. Adolpho Lutz : Entomologia = *Entomology* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006. 1056 p. Adolpho Lutz Obra Completa, v.2, book 4. ISBN: 85-7541-097-0. Available from SciELO Books < <http://books.scielo.org> >.
- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hamada, N.; Adler P.H. 1999. Cytotaxonomy of four species in the *Simulium perflavum* Species-group (Diptera: Simuliidae) from Brazilian Amazonia. *Systematic Entomology*, 24: 273-88.
- Hamada, N.; Silva, J.O.; Pepinelli, M.; Trindade, L.R.R. 2014. Ordem Diptera - Família Simuliidae. In: Hamada, N. Nessimian. J.L; Querino, R.B. (ED.). *Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia* Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, Amazonas. p.683-710.
- Hernandez-Triana, L.M.; CRAINEY, J.L.; Hall, A., Fatih, F.; Mackenzie-Dodds, J.; Shelley, A.; Zhou, X.; Post, R.J.; Gregory, T.R.; Hebert, P.D.N. 2012. DNA barcodes reveal cryptic genetic diversity within the blackfly subgenus *Trichodagmia* Enderlein (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) and related taxa in the New World. *Zootaxa*, 3514: 43-69.
- Pepinelli, M. 2008. *Simuliidae (Diptera, Nematocera) do Estado de São Paulo*. Tese de doutorado, Universidade de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 144p.
- Pramual, P.; Kuvangkadilok, C.; Baimai, V.; Walton. C. 2005. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Molecular Ecology*, 14: 3989-4001.
- Rivera, J.; Currie, D.C. 2009. Identification of Nearctic Black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology*, 9 (Suppl. 1): 224-236.

- Rothfels, K.H. 1988. Cytological approaches to Black fly taxonomy. In: Kim, K.C.; Merritt, R.W. (Eds.). *Black flies- Ecology, Population, management and Annotated world list*. Pennsylvania State University, University Park and London, p. 39-52.
- Scarpassa, V.M.; Conn, J.E. 2006. Molecular differentiation in natural populations of *Anopheles oswaldoi* sensu lato (Diptera:Culicidae) from the Brazilian Amazon, using sequences of the COI gene from mitochondrial DNA. *Genetic Molecular Research*, 5(3): 493-502.
- Schneider, S.; Roessli, S.; Excoffier, L. *Arlequin: A software for population genetic data analysis, version 2.000*. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland. 2000.
- Shelley, A.J.; Lowry, C.A.; Maia-Herzog, M.; Luna Dias, A.P.A.; Moraes, M.A.P. 1997. Biosystematic studies on the Simuliidae (Diptera) of the Amazonia onchocerciasis focus of Brazil. *Bulletin of the Natural History Museum of London (Entomol)*, 66: 1-18.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.