

## CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE COI PARA ESTUDOS TAXONÔMICOS E FILOGENÉTICOS NO GÊNERO *Camelobaetidius* (EPHEMEROPTERA: BAETIDAE)

Cláudia Nayara da Silva ALVES<sup>1</sup>; Ana Maria de Oliveira PES<sup>2</sup>; Carlos Gustavo NUNES<sup>3</sup>; Rafael BOLDRINI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PAIC/FAPEAM-INPA; <sup>2</sup>Orientadora INPA; <sup>3</sup>Co-orientador UFAM; <sup>4</sup>Colaborador INPA

### 1. Introdução

A Ordem Ephemeroptera é um dos mais importantes grupos de insetos aquáticos, junto com Plecoptera e Trichoptera. Os Ephemeroptera são encontrados em todos os continentes, exceto na Antártida, no extremo Ártico e em algumas ilhas oceânicas (Edmunds *et al.* 1976). A taxonomia dos efemerópteros no Brasil ainda é pouco estudada. Um bom exemplo disto é a quantidade de novas espécies e associações entre ninfas e imagos que vêm sendo descritas. A filogenia da ordem também ainda é um “campo aberto” para estudos futuros, pois ainda existem divergências em relação às atuais propostas de classificação do grupo (Ogden e Whiting 2005; Sun *et al.* 2006). Técnicas laboratoriais que corroborem com os estudos morfológicos mensurando o polimorfismo genético em nível molecular, têm ajudado em muito no entendimento da ecologia e evolução de outros insetos.

Espécies com variedade têm sido discriminadas usando fragmentos do gene mitocondrial citocromo oxidase 1 (COI). O COI é considerado um dos genes codificadores de proteínas mais conservadores no genoma mitocondrial de animais, propício para estudos evolutivos (Brown 1985)

Sendo assim, nessa proposta de trabalho busca-se amplificar e sequenciar algumas espécies do gênero *Camelobaetidius* de algumas espécies utilizando o marcador molecular mitocondrial COI, a fim de comparar essas sequências e analisar as informações que podem contribuir para o avanço no entendimento taxonômico e filogenético da ordem Ephemeroptera.

### 2. Material e Métodos

As amostras coletadas nos estados do Amazonas, Espírito Santo e Santa Catarina. A extração de DNA foi realizada com DNeasy Blood & Tissue Kit da Quiagen, utilizando um indivíduo das seguintes espécies do gênero *Camelobaetidius*: *C. cayumba*, *C. billi* (Amazonas), *C. francischetti*, *C. anubis*, *C. janae*, *C. yacutinga*, *C. tuberosus*, *C. phaedrus*, *C. edmundsi*, *C. lassance*, *C. ortizi*, *C. sp. n* (INPA 208), *C. silvudus*, *C. leentvaari*, *C. sp. n* (INPA 309), *C. maranhensis*, *C. ortizi*, *C. cf. mathuriae*, *C. penai*, *C. sp. n. osmobífida*, *C. sp. espinhos*, *C. suapi*, *C. mathuriae*, *C. sp. n* (INPA 291), *C. hamadae*; dois indivíduos de *C. rufiventris*, *C. suapi*, *C. ipaye*, *C. patricki* e *C. matilei* (Mato Grosso do Sul e Roraima). Usaram-se também outras espécies da família Baetidae: *H. gulosus*, *Corinella*, *Nanomis galera* e *Guajirolus rondoni*. Em seguida, foi feita a amplificação pelo método da PCR utilizou MgCl<sub>2</sub> 50 mM, tampão 10x, dNTP, Taq polimerase e água miliQ, incluindo o par de primer parcial - LC01490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HC02198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') - específicos para o gene mitocondrial COI (Folmer *et al.* 1994). Os amplicons foram concentrados no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) e no Núcleo de Abelhas do INPA, sendo posteriormente enviados para o sequenciamento na empresa Macrogen (Korea).

Após sequenciados, foi feito o alinhamento no programa BioEdit e análise filogenética no programa MEGA 5.0.

### 3. Resultados e Discussão

Após a extração de DNA, foi feita a amplificação com o par de *primer* do gene COI e em seguida a leitura das absorbâncias em Nanodrop, onde a maioria das amostras apresentou concentração maior que 600 ng/μL.

Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1%, onde as bandas apresentaram aproximadamente 700 pares de base (Figura 1). Este resultado é satisfatório visto que o par de primer utilizado amplifica 710 bp (Folmer *et al.* 1994).

Todas as espécies do gênero *Camelobaetidius* com DNA amplificado foram enviadas para sequenciamento na empresa Macrogen. As sequências analisadas e alinhadas mostraram que possuem similaridade (Figura 2) e que com um estudo mais aprofundado contribuirá para um resultado mais avançado, usando também outros marcadores moleculares para uma melhor comparação entre espécies.

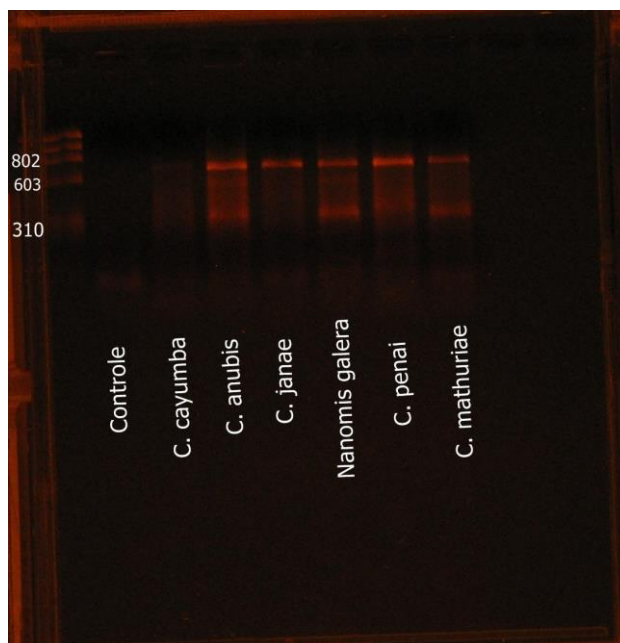


Figura 01 – Visualização de bandas em Gel de agarose 1% do DNA amplificado das espécies *C. cayumba*, *C. Anúbis*, *C. janae*, *Nanomis galera*, *C. penai*, *C. mathuriae*.

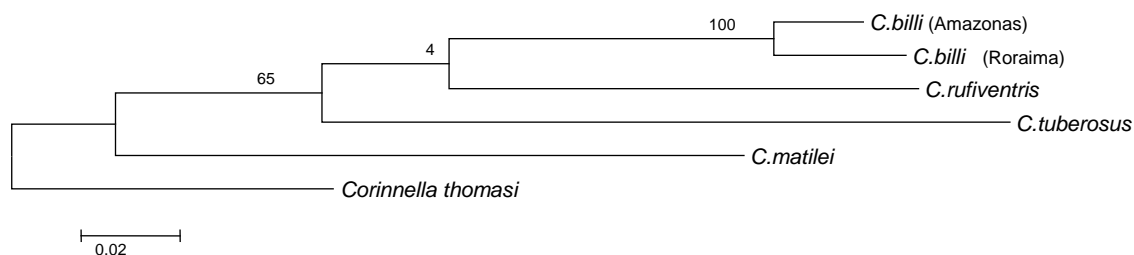


Figura 02 – Simulação da matriz filogenética das espécies alinhadas, utilizando as regiões consenso das espécies *C. billi* (Amazonas), *C. billi* (Roraima), *C. rufiventris*, *C. tuberosus*, *C. matilei* e *Corinnella thomasi*.

#### 4. Conclusão

No decorrer do trabalho, pode-se notar que o gene mitocondrial COI correspondeu às expectativas quanto à amplificação da maioria das espécies trabalhadas, pois, de acordo com trabalhos já descritos, esse gene amplificou os 700 pares de base já esperados. É de grande recomendação continuar a análise utilizando outros marcadores moleculares (por exemplo, 16S e histona) para obter uma melhor comparação entre as espécies.

#### 5. Referências Bibliográficas

- Edmunds, G.F.JR; Jensen, S.L.; Berner, L. 1976. *Mayflies of North and Central America*. University of Minnesota Press, Minneapolis, 341pp.
- Ogden, T.H.; Whiting, M.F. 2005. Phylogeny of Ephemeroptera (mayflies) based on molecular evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 625-643.
- Sun, L.; Sabo, A.; Meyer, M.D.; Randolph, R.P.; Jacobus, L.M.; McCafferty, W.P.; Ferris, V.R. 2006. Tests of current hypotheses of mayfly (Ephemeroptera) phylogeny using molecular (18s rDNA) data. *Annals of the Entomological Society of America*, 99: 241-252.
- 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.
- Brown, W.M. 1985. *The mitochondrial genome of animals*. In: *Molecular Evolutionary Genetics*. R.J. MacIntyre (ed.). New York: Plenum Press, pp. 95-130.