

CARACTERIZAÇÃO DO GENE 18S RDNA PARA ESTUDOS TAXONÔMICOS E FILOGENÉTICOS NO GÊNERO *Camelobaetidius* (Ephemeroptera: Baetidae)

Cláudia Nayara da Silva ALVES¹; Ana Maria de Oliveira PES², Carlos Gustavo NUNES³, Rafael BOLDRINI³

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; Orientadora CBIO/INPA; ²Coorientador UFAM; ³Colaborador 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 & 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.

Nessa proposta de trabalho busca-se no marcador molecular nuclear 18s rDNA observar qual (is) a (s) melhor (es) região (ões) dessa sequência de DNA que possa trazer informações para o avanço no entendimento taxonômico.

2. Material e Métodos

Os insetos aquáticos utilizados nesse trabalho foram coletados nos estados do Amazonas, Santa Catarina e Espírito Santo, Brasil. A extração de DNA manual foi feita para as espécies do gênero *Camelobaetidius*: *C. anubis*, *C. francischetti*, *C. janae*, *C. phaedruss*, *C. tuberosus*, *C. rufiventris*, *C. billi*. Realizou-se também extração por kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen), usando um indivíduo de cada uma das seguintes espécies: *C. francischetti*, *C. anubis*, *C. janae*, *C. billi*, *C. phaedruss*, *C. matilei*, *C. edmundsi*, *C. lassance*, *C. yacutinga*, *C. cayumba*, *C. hamadae*, *C. penai*, *C. rufiventris*, *C. tuberosus*, *C. ipaye*. A amplificação pelo método da PCR utilizou MgCl₂ 50 mM, tampão 10x, dNTP, Taq polimerase e água miliQ, incluindo o par de primer parcial do gene 18s (Sun *et al.* 2006): 18sF (5' AGGGCAAGTCTGGTGCCAGC) e 18sR (5' TTTCAGCTTTGCAACCATAC). O sequenciamento foi feito apenas para as espécies que apresentaram melhor amplificação, que foram: *C. francischetti*, *C. anubis*, *C. janae*, *C. billi*, *C. phaedruss*, *C. edmundsi*, *C. lassance*, *C. yacutinga*, *C. cayumba*, sendo realizado em sequenciador ABI Systems – 3130x/Genetic Analyzer e o alinhamento foi feito no programa BioEdit.

3. Resultados e Discussão

A extração de DNA feita manualmente não obteve um resultado esperado quanto da quantificação em NanoDrop, mostrando graficamente que esse método de extração não foi apropriado para essa pesquisa. No entanto, o contrário ocorreu na extração com DNeasy Blood & Tissue Kit, onde as amostras analisadas (*C. francischettii*, *C. anubis*, *C. janae*, *C. billi*, *C. phaedruss*, *C. matilei*, *C. edmundsi*, *C. lassance*, *C. yacutinga*, *C. cayumba*, *C. hamadae*, *C. penai*, *C. rufiventris*, *C. tuberosus*, *C. ipaye*) obtiveram resultados satisfatórios em relação à razão entre a leitura das absorvâncias 260/280 atingindo até 2,14nm.

Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1%, onde as bandas ficaram na faixa de 500 e 700 pares de bases (Figura 01). Esse resultado foi satisfatório, pois o par de primer utilizado amplifica cerca de 620 pares de base (Sun *et al.* 2006). As espécies usadas para o sequenciamento foram aquelas que obtiveram melhores bandas quando visualizadas em gel de agarose, após terem sido amplificadas (Figura 02): *C. francischettii*, *C. anubis*, *C. janae*, *C. billi*, *C. phaedruss*, *C. edmundsi*, *C. lassance*, *C. yacutinga*, *C. cayumba*. Das 18 amostras encaminhadas para sequenciamento, apenas quatro foram sequenciadas com êxito: *C. billi*, *C. edmundsi*, *C. francischettii* e *C. lassance*, sendo todas elas no sentido reverse (anexo 1). O alinhamento foi realizado no programa BioEdit, constatando-se que suas sequências são semelhantes, principalmente entre 300 e 610 pares de base.

Estudos para o gênero *Camelobaetidius*, no parâmetro molecular, para comparação e análise de suas espécies ainda não são bastante conhecidos. No entanto, com esses resultados pode-se observar que as quatro espécies sequenciadas são provenientes de Brasil - América do Sul, contribuindo para tal semelhança em relação às suas sequências genômicas e esse fator pode corroborar na aproximação taxonômica e filogenética dentro dessas espécies do gênero *Camelobaetidius*.

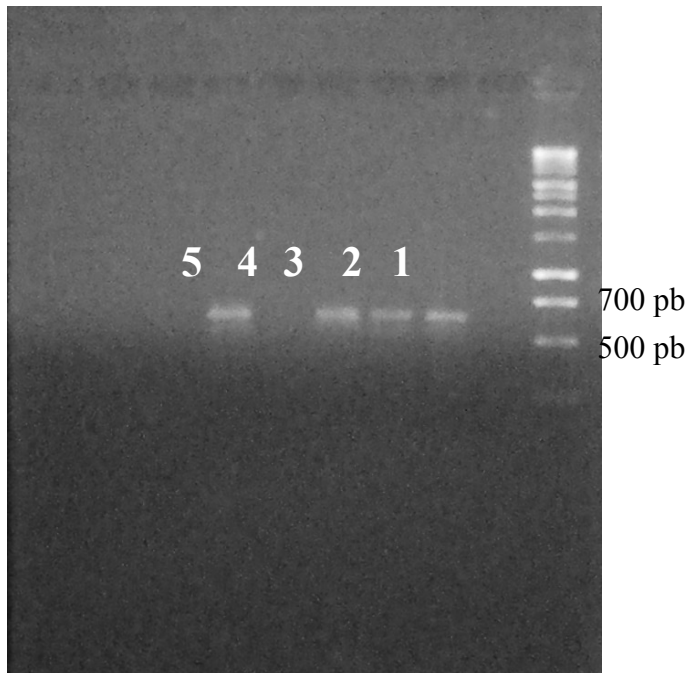


Figura 01 – Visualização de bandas em Gel de agarose 1%: 1) *C. francischettii*, 2) *C. Anúbis*, 3) *C. billi* (AM), 4) *C. janae*

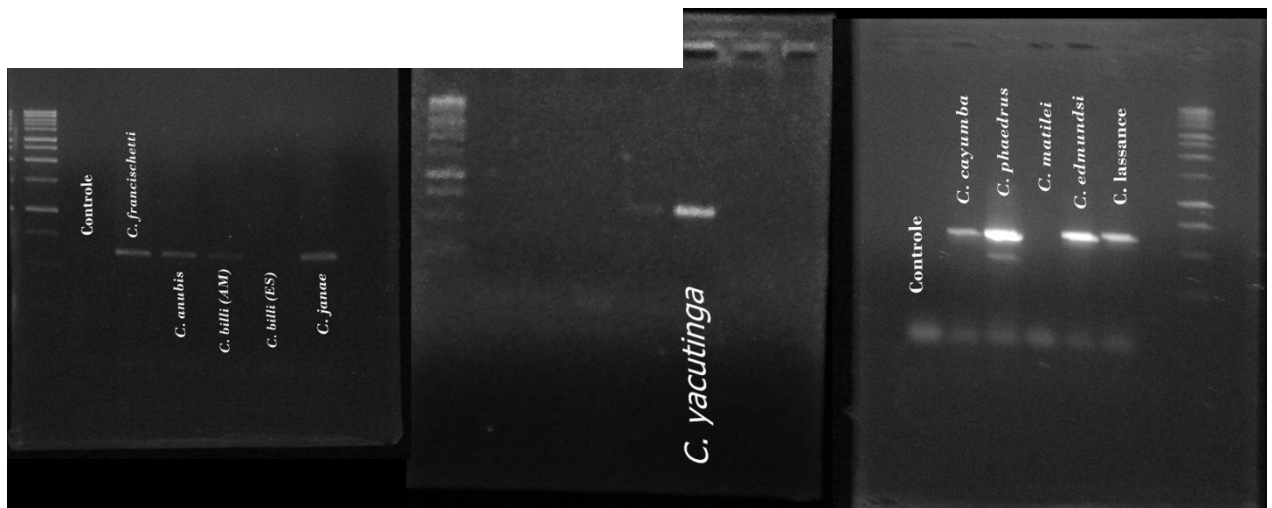


Figura 02 – Visualização de bandas em Gel de agarose 1% das espécies utilizadas no sequenciamento: *Camelobaetidius francischettii*, *C. anubis*, *C. janae*, *C. billi*, *C. phaedrus*, *C. edmundsi*, *C. lassance*, *C. yacutinga*, *C. cayumba*.

4. Conclusão

No decorrer do trabalho, pode-se notar que o gene 18s rDNA correspondeu às expectativas quanto à amplificação da maioria das espécies trabalhadas, dando o número de pares de base estimado para este gene (aproximadamente 620 pb). Apesar de apenas quatro espécies (*C. francischettii*, *C. billi*, *C. edmundsi* e *C. lassance*) terem sido sequenciadas adequadamente, todas possuem semelhanças no decorrer de suas seqüências comprovando a aproximação destas espécies molecularmente.

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 pp.

Anexo

	5	15	25	35	45	55
C. billi	GTTATAAGAT	CATATTTGGA	TCTGTGTATC	CTACCCTCTT	TTAAGGTCTC	AACGGCGTTC
C. edmundsi	GTCATCGGAT	GAACCTCGGC	GCAGCGCTGG	CTGCCGTTGG	TTATGGTTAG	AACTAGGG-C
C. francishettii	GTCATCGGAG	GGACTTCGGC	TCAGCGTTGG	CTCCCTTTTT	GTAGGGTGTT	ACGGAGGG-C
C. lassance	GT-ATCTGTA	TGACTTCGGC	GCATCGTTGG	CTCCCTTTTT	ATATGGTTAA	AACTGGGG-C

	65	75	85	95	105	115
C. billi	AACTGGTCAG	TCCGGACGTC	CTGCCGG-TG	GCGTCCTTTT	-CTAGGCGGC	A-CCTTCTTG
C. edmundsi	GGTATCTGAT	CGCCTTCGAA	CCTCTAA-CT	TTCGTTCTTG	ATTAG-CGAA	AACATTCTTG
C. francishettii	GGTTGCTGAT	CCCCTTCCCC	CTGCCGG-TG	GCGGTTCTTG	ATTAG-CGAA	AACCTTCTTG
C. lassance	GGTATCTGAT	CCCCTACCCC	CTGCTAAGTT	TGCGTTCTTG	ATTAGGCGAA	AACCTTCTTG

	125	135	145	155	165	175
C. billi	TCCCTCCCGG	TTGCTCTTAA	CCGGGTGGGT	CAGTAGGCCG	GAACCTTCAC	TTTAA-ATAA
C. edmundsi	-GCAAACGCT	TTCGCATCCG	TTCGTCGTGC	GACGATCCAA	GAATTTACC	TCTAACGTCG
C. francishettii	-GCAAACGCT	TTCGCATCCG	TTCGTCGTGC	GACGATCCAA	GAATTTACC	TCTAACGTCG
C. lassance	TGCAACCGCT	TTCGCTTCCA	TTCGGCGGGC	CACTGGGCCG	GAATTTCTCC	TCTAACATCA

	185	195	205	215	225	235
C. billi	TTTTACTGAT	GCCCCATGC	GTTCTTATTA	ATGAT-ACCT	CGTGTTTGGA	ATAATGGAAA
C. edmundsi	CAATACGAAT	GCCCCGTCT	GTCCCTATTA	ATCATTACCT	CGAGTTCAGA	AAAGCCAACA
C. francishettii	CAATACGAAT	GCCCCGTGC	GTCCCTATTA	ATCATTACCT	CGAGTTCGGA	AAAGCCAACA
C. lassance	TATTAGTGAT	GCCCCGTGC	GTCCGTATTA	ATGATTACCT	CGAGTTTGGA	AAAACGAAAA

	245	255	265	275	285	295
C. billi	AA--GGCAAC	CGATGCCTTA	TTCCGTTATT	CCATGCACAC	AGTTTTCAAG	CAACCAAAAG
C. edmundsi	AAATAG-AAC	CGAGGCCCTA	TTCCGTTATT	CCATGCACAC	AGTTTTCAGG	CAACCAAAGG
C. francishettii	AAATAC-AAC	CGAGGCCCTA	TTCCGTTATT	CCTTGCCAC	AGTTTTCAGG	CGACCAAAGG
C. lassance	AAAGGCCAAC	CGAGGCCCTA	TTCCGTTTTT	CCTTGCACAC	AGTTTTCGAG	CAACCAAAAG

	305	315	325	335	345	355
C. billi	CCTGGTTTGA	GCACTCAAAT	TTGTTCAAAG	TAAAC--ATG	CCGGCCCACC	GAGCCACCCG
C. edmundsi	CCTGCTTTGA	GCACTCAAAT	TTGTTCAAAG	TAAAC--GTG	CCGGCCCACC	GGGCCACCCG
C. francishettii	CCTGCTTTGA	GCACTCAAAT	TTGTTCAAAG	TAAAC--GTG	CCGGCCCACC	GAGCCACCCG
C. lassance	CCTGCTTTGA	GTACTCATAT	TTGTTCAAAG	TAGAACAATG	CCGGCCCACC	GGGCCACCCG

	365	375	385	395	405	415
C. billi	GTTAAGAGCA	GCCCCGAGGG	AGCTACGGGC	GCCGCCGCGA	AGCGACGCCC	ACCGGCAGGA
C. edmundsi	GTTAAGAGCA	GCCCCGAGGG	AGCTACGGGC	ACCGGCCGGA	AGCGATGCCC	ACCGGCAGGA
C. francishettii	GTTAAGAGCA	GCCCCGAGGG	AGCTACGGGC	GCCGCCGCGA	AGCGACGCCC	ACCGGCAGGA
C. lassance	GTTAAGAGCA	GCCCCGAGGG	AGTACGGGC	GCCGCCGCGA	GGCGACGCCC	ACCGGCAGGA

	425	435	445	455	465	475
C. billi	CGTCCGGACC	GACCAGTTGA	ACGCCGCGAG	CGGCGAACCG	GCCGTCCGAT	ACACAGATCC
C. edmundsi	CGCCCCGACC	GACCAGTTGA	ACGCCGCGAG	CGGCGAACCG	GCCGTCCGAT	GCACAGATCC
C. francishettii	CGTCCGGACC	GACCAATTGA	ACGCCGCGAG	CGGCGAACCG	GCCGTCCGAT	ACACAGATCC
C. lassance	CGTCCGGACA	TACCAGTTGA	ACGCCGCGAG	CGGCGAACCG	GCCGTCCGAT	ACACAAATCC

	485	495	505	515	525	535
C. billi	AACTACGAGC	TTTTTAACCG	CAACAACCTT	AATATACGCC	AATGGAGCTG	GAATTACCGC
C. edmundsi	AACTACTAGC	TTTTTAACCG	CAACAACCTT	AATATACGCC	AATGGAGCTG	GAATTACCGC
C. francishettii	AACTACTAGC	TTTTTAACCG	CAACAACCTT	AATATACGCC	AATGGAGCTG	TGATTACCGC
C. lassance	AACTACGAGC	TTTTTAACCG	CAACAACCTT	ATTATACGCC	AATGGAGCTG	GAATTACCGC

```
      ....|....|  ....|....|  ....|....  
      545      555      565  
C. billi      GGCTGCTGGC ACCGTACTTT GCCCTAAAA  
C. edmundsi   GGCTGCTGGC ACAAACTTT GCCCTAAAA  
C. francishetti GGCTGCTGGC ACCATACTT- GCCTTAAAA  
C. lassance   GGGTGCTGTG TCCTGACTTA GCCCTAAAA
```