

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Synoestropsis grisoli* NAVÁS, 1924 (TRICHOPTERA: HYDROPSYCHIDAE) ATRAVÉS DO GENE MITOCONDRIAL CÍTOCROMO OXIDASE I (COI)

Ana Paula Viera de OLIVEIRA¹

Ana Maria PES²

Patrik BARCELOS-SILVA³

¹Bolsista Iniciação Científica INPA-PAIC/FAPEAM;

²Orientadora /INPA- PCI/CNPq; ³Colaborador

INTRODUÇÃO

A ordem Trichoptera Kirby, 1813 é uma ordem de insetos com cerca de 15.000 espécies distribuídas em 49 famílias (Morse 2015), tornando-a maior ordem de insetos estritamente aquáticos (Zhang e Shear 2007). Dentre as famílias de Trichoptera destaca-se Hydropsychidae Curtis, 1835 sendo a terceira maior família da ordem (Holzenthal *et al.* 2007b). Um dos gêneros pertencentes a essa família é *Synoestropsis* Ulmer, 1905, com distribuição geográfica que vai desde o nordeste da Argentina até o sul do México (Flint *et al.* 1999b). Esse gênero é composto por 10 espécies, entre elas, a espécie em estudo *Synoestropsis grisoli* Navás, 1924. Quando comparada a outras espécies do gênero, o *S. grisoli* apresenta características únicas, como grande diversidade no padrão de manchas que aparecem em seu tórax.

Apesar de, em nível genérico, o grupo ser bastante singular, é possível detectar pequenas variações morfológicas entre os indivíduos coletados (Pes, com. pessoal). Entretanto, não existe uma caracterização molecular para a espécie, o que dificulta estabelecer se existe alguma correspondência dos resultados moleculares aliada a essas sutis mudanças fenotípicas.

Realizamos a caracterização de diferentes populações, tomando por população espécimes de uma mesma área geográfica, para aumentar o conhecimento na área de taxonomia. Para realizar isso foi necessário utilizar dados moleculares, como o marcador mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados um total de 35 indivíduos, com espécimes provenientes de sete estados brasileiros diferentes: Amazonas, Roraima, Rondônia, Bahia, Mato Grosso, Espírito Santo e Rio Grande do Sul. Foram usados sete indivíduos do Amazonas, um de Roraima, quatro de Rondônia, cinco da Bahia, quatro do Mato Grosso, um do Espírito Santo e oito do Rio Grande do Sul. O DNA de cada indivíduo das diferentes localidades foi extraído pelos métodos destrutivo e não destrutivo no laboratório de Bioprospeção e Bioativos de Insetos do INPA. A amplificação de uma região 648 pb do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I, foi feita pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* 1057F e 1278R.

O que se originou da PCR realizada passou por uma eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras que amplificaram foram purificadas utilizando o método enzimático (EXO-FastAP) e, em seguida, sequenciadas conforme proposto por Platt *et al.* (2007).

As sequências obtidas foram alinhadas e editadas no programa BioEdit v. 5.0.6 (Hall 1999). No programa Arlequin (Schneider *et al.* 2000) foram calculados os parâmetro de diversidade genética. A matriz de distância genética, calculada utilizando o modelo de substituição de bases nucleotídicas Kimura-2-Parâmetros (k2P) e a

árvore, utilizando o método *Neighbour-Joining* (NJ), foram construídas no programa Mega 5 (Tamura *et al.* 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os diferentes indivíduos de *Synoestropsis grisoli* foram obtidas 35 sequências com 621 pares de bases (pb), dos quais 283pb foram polimórficos e desses 215pb foram informativos para parcimônia.

Após a análise da árvore filogenética e da rede de haplótipos construídas não foi visualizada a formação de grupos. Os indivíduos que imaginávamos fazer parte de uma mesma população por procederem de pontos próximos nos mesmos estados não se agruparam nos filogramas, como se era esperado, com exceção daqueles encontrados no estado da Bahia. Não existiu, também, grande suporte que nos possibilitou afirmar o grau de parentesco. Tudo isso nos leva a creditar que não existe estruturação populacional.

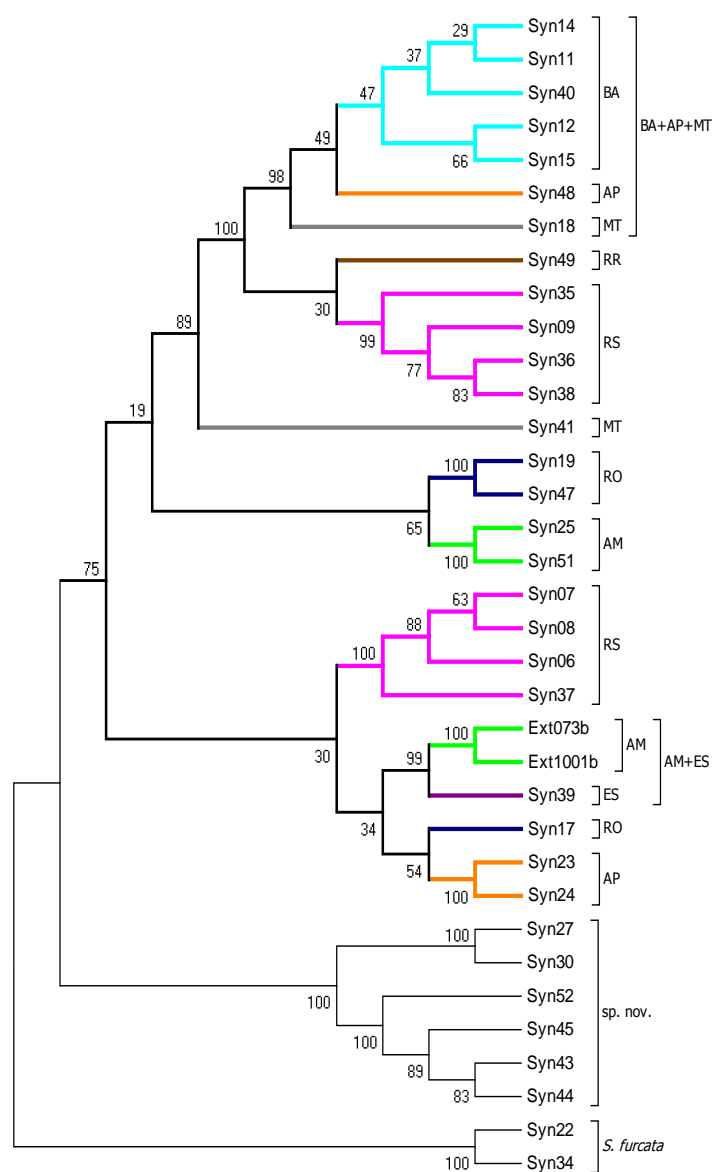


Figura 1. Árvore de *Neighbor Joining* de *Synoestropsis grisoli* gerada com gene COI na qual os indivíduos do Estado da Bahia são representados por azul claro, Amapá laranja, Mato Grosso cinza, Roraima marrom, Rio Grande do Sul rosa, Rondônia azul escuro, Amazonas verde e Espírito Santo roxo.

Apesar de não haver uma estruturação geográfica, podemos perceber que há a clara formação de clados dentro dessa espécie. E muitos desses clados possuem suporte elevado. A distância genética dentro de cada clado (mínima 6,38 e máxima de 7,82) é menor do que aquela apresentada entre os clados (mínima 9,5 e máxima de 25,3). Ainda assim, a distância apresentada é bem maior do que o esperado para indivíduos pertencentes à mesma espécie. Esse resultado pode indicar que não estamos lidando com apenas uma espécie e sim com um complexo de espécies crípticas.

A distância genética foi investigada com a adição de outra espécie do mesmo gênero, a *S. furcata*, para análise de como ocorre a variação entre espécies diferentes já conhecidas. Também encontramos um grupo formado por indivíduos que, por conta dos dados moleculares e análises morfológicas achamos ser uma espécie nova. Não fomos capazes de achar o *barcoding gap*, já que os valores de distância genética interespecíficos (mínima 11,7 e máxima de 29,9) se sobrepõem aos valores de distância intraespecíficos. Entretanto as inferências devem ser feitas com cuidado já que o número de espécimes usados para o estudo foi muito baixo e, por essa razão, possa não ser representativa. Aliado a isso foi usado apenas um marcador e ele pode não ser aquele com os melhores resultados, por isso, tentou-se usar a Histona, um marcador nuclear, para comparação. Os resultados obtidos não foram satisfatórios.

CONCLUSÃO

Os resultados apontam a existência de um complexo de espécies em vez de uma só espécie de *S. grisoli*, por conta da alta distância genética entre os indivíduos de localidades diferentes e mesmo entre aqueles dentro de uma mesma localidade. Entretanto, alguns trabalhos feitos sobre análise genética da ordem com outras espécies de Trichoptera mostram que uma alta variabilidade genética entre indivíduos da mesma espécie. O estudo também aponta que não há relação entre a variação genética interpopulacional e a distância geográfica. Trabalhos posteriores se beneficiariam com o aumento do número amostral, com a utilização de novos marcadores moleculares, que poderiam dar informação que não conseguiram ser obtidas com o COI e com a investigação de novos caracteres morfológicos. É necessário analisar novamente os resultados para se encontrar diferenças morfológicas que expliquem essa estruturação.

REFERÊNCIAS

- Flint, O.S.; Holzenthal, R.W.; Harris, S.C. 1999. *Catalog of the Neotropical Caddisflies (Insecta: Trichoptera)*. Columbus, Ohio Biological Survey. Iv + 239p.
- 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.
- Holzenthal, R.W.; Blahnik, R.J.; Prather, A.L.; Kjer, K.M. 2007a. An update on the phylogeny of caddisflies (Trichoptera), p. 143-153. In: Bueno-Soria, J.; Barba-Álvarez, R.; Armitage B. (Eds.). *Proceedings of the 12th International Symposium on Trichoptera*. The Caddis Press. 378p.
- Morse, J.C. 2015. Trichoptera World Checklist. URL: <http://www.clemson.edu/cafls/departments/esps/trichopt/index.htm>. Último acesso: 28/01/2016.
- Pes, A.M.O.; Hamada, N.; Nessimian, J.L. 2005. Chaves de identificação de larva para famílias e gêneros de Trichoptera (Insecta) da Amazônia Central, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 49(2): 181-204.
- Platt, R.W. 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques*, 43: 58-62.

- Schneider, S.; Roessli, S.; Excoffier, L. 2000. Arlequin: software for population genetic data analysis, version 2.000. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- Swofford, D.L. 2003. PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) and Other Methods, Version 4.0b10. Sinauer Associates: Sunderland, MA.
- Tamura, K. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- Zhang, Z.-Q.; Shear, W.A. (eds.) 2007. *Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy*. Zootaxa 1668. Magnolia Press, Auckland, 766 pp.