

ANÁLISE MOLECULAR DE EPHEMEROPTERA DA PLANÍCIE DO ALTO RIO PARANÁ

Geovana Jeniffer Ortelã Gonçalves (PIBIC/CNPq), Roger Paulo Mormul (Coorientador), Alessandra Valéria de Oliveira (Orientadora). E-mail: avoliveira@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas / Genética Molecular e de Microorganismos

Palavras-chave: Biodiversidade; COI; Identificação molecular.

RESUMO

A planície de inundação do alto Rio Paraná é uma área com elevada biodiversidade, porém, uma das bacias mais represadas da América do Sul. Um dos grupos integrantes desta biodiversidade é Ephemeroptera, que abrange invertebrados bentônicos altamente sensíveis às alterações ambientais. Entretanto estudos moleculares com este grupo são raros e a identificação de espécies na região é prejudicada pelo uso apenas da taxonomia morfológica. A utilização do marcador molecular mitocondrial citocromo c oxidase (COI), pode facilitar este processo, visto que é amplamente utilizado para identificação de espécies. Diante disso, este estudo visou caracterizar molecularmente espécimes de Ephemeroptera da planície do alto Rio Paraná para o gene COI. Para isso foram coletados espécimes de Ephemeroptera em três pontos da planície, e as suas sequências revelaram baixa similaridade com outros organismos em bancos de dados genéticos, indicando carência de informações genéticas para o grupo. Além disso, foram identificados dois grupos distintos entre os espécimes de acordo com a árvore gênica, todos pertencentes à família Baetidae.

INTRODUÇÃO

A bacia hidrográfica do alto Rio Paraná abrange uma vasta área no território brasileiro e possui grande importância ecológica, devido a sua rica biodiversidade. No entanto, é uma das mais represadas da América do Sul. Impacto que resulta numa homogeneização dos ambientes, introdução de espécies exóticas, extinção de espécies locais e perda de habitat para as comunidades aquáticas.

Parte importante dessa biodiversidade são os invertebrados bentônicos, que possuem papel central na ciclagem de nutrientes e no fluxo de energia. O grupo Ephemeroptera, composto por invertebrados bentônicos tende a incluir representantes de todas as funções ecológicas, podendo ser utilizados para atividades de biomonitoramento. No Brasil, ocorrem 10 famílias, 82 gêneros e 447 espécies registradas, das quais se destaca em numerosidade, Baetidae e

Leptophlebiidae, comportando mais de 60% dos gêneros e 50% das espécies brasileiras (Salles et al., 2004).

Na planície de inundação do alto Rio Paraná, a escassez de estudos moleculares com Ephemeroptera, aliada à dificuldade de identificá-los até o nível de espécie ou gênero por meio da taxonomia morfológica, representa um desafio para a compreensão da sua biodiversidade. Visto isso, o então estudo teve como objetivo caracterizar molecularmente espécimes de Ephemeroptera da então planície.

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes de Ephemeroptera foram coletados em ambientes lânticos, associados à macrófitas aquáticas, em três pontos da planície de inundação do alto Rio Paraná durante novembro e dezembro de 2022. As coordenadas geográficas dos pontos de coleta foram: Ponto 1 (-22.7542762, -53.2893844), ponto 2 (-22.7307342, -53.2451115), e ponto 3 (-22.7682749, -53.2668699). A coleta foi realizada de maneira ativa usando peneiras de malha 2 mm. As amostras foram encaminhadas ao laboratório, onde ocorreu a extração de DNA utilizando o Kit DNeasy® Blood and Tissue (QIAGEN®), seguindo as instruções do fabricante.

O gene COI foi parcialmente amplificado com os *primers* LCO 1490 e HCO 2198, e as reações de amplificação seguiram as propostas por Ball et al. (2005). Os *amplicons* foram quantificados no espectrofotômetro NanoDrop Lite, purificados com Polietilenoglicol-NaCl e posteriormente sequenciados utilizando o kit Big Dye Terminator. A determinação da sequência dos nucleotídeos foi realizada em sequenciador automático ABI 3500.

As sequências nucleotídicas foram analisadas e editadas usando o programa BioEdit e alinhadas através do algoritmo ClustalW (Thompson et al., 1994), implementado no software MEGA 11 (Tamura et al., 2021), onde também a distância genética p foi calculada. As sequências obtidas foram comparadas com sequências de grupos similares no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando a ferramenta "Blastn". Sequências de COI de espécimes de diferentes famílias de Ephemeroptera foram obtidas do Genbank e usadas na construção da árvore gênica, juntamente com um grupo externo, *Phortica foliiseta*, pertencente a Diptera. Sequências com o mesmo haplótipo foram removidas e a árvore gênica foi construída no MEGA 11 usando o método de Máxima Verossimilhança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências de COI obtidas de Ephemeroptera ($n=10$), quando submetidas a ferramenta "Blastn" apresentaram baixo percentual de identidade (inferior ou igual a 85%) em relação a outras sequências de COI depositadas nos bancos de dados, demonstrando uma escassez de dados genéticos de Ephemeroptera, problema já apontado por trabalhos anteriores.

Todas as sequências obtidas neste estudo apresentaram maior semelhança genética com exemplares da família Baetidae, visto os menores valores de distância genética p apresentados, bem como o agrupamento das sequências deste trabalho

dentro de Baetidae (Figura 1), sugerindo que os indivíduos amostrados pertencem a este grupo taxonômico. Ainda, ao analisar a distância genética entre as sequências deste estudo e Leptophlebiidae, a qual juntamente com a Baetidae é responsável por abrigar a maior parte da biodiversidade de Ephemeroptera no Brasil (Salles et al., 2004), foram obtidos valores elevados (27,5% até 32,9%), indicando que os indivíduos amostrados estão geneticamente distantes dessa família, o que é evidenciado pela árvore gênica, com a separação clara entre os dois grupos.

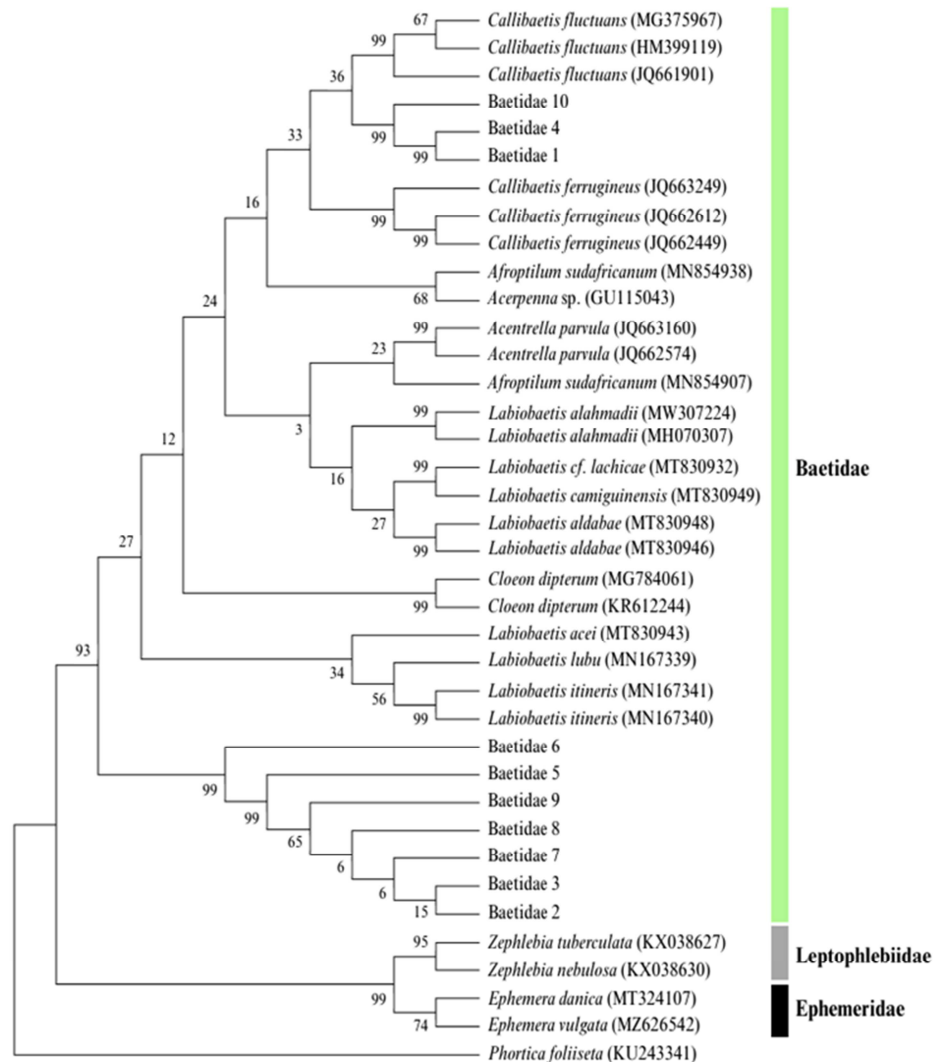


Figura 1 – Dendrograma de Máxima Verossimilhança com 1.000 reamostragens de *bootstrap*, demonstrando as relações entre os espécimes amostrados neste estudo e espécies de três famílias de Ephemeroptera (Baetidae, Leptophlebiidae e Ephemeridae), com haplótipos únicos de COI.

Ademais, na árvore gênica, os espécimes amostrados se separam em dois grupos, um formado pelos indivíduos Baetidae 1,4 e 10, que se agruparam com espécimes de *Callibaetis*, gênero já reportado na planície de inundação (Souza-Franco et al., 2009) e outro grupo formado pelos demais espécimes amostrados, provavelmente pertencentes a um gênero não analisado nesse trabalho.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam a presença de pelo menos dois grupos entre os espécimes amostrados de Ephemeroptera na planície de inundação do alto Rio Paraná, todos pertencentes à Baetidae. Um dos grupos apresenta uma estreita relação com *Callibaetis*. Ainda, é evidente a carência de dados genéticos de Ephemeroptera, destacando a necessidade de estudos genéticos com este grupo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço pela bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, a qual possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

BALL, S.; HEBERT, P.; BURIAN, S.; WEBB, J. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. **J. N. Am. Benthol. Soc.**, v. 24, n. 3, p. 508-254, set. 2005. Disponível em: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1899/04-142.1>. Acesso em: 03 ago. 2023.

SALLES, F.; DA-SILVA, E.; HUBBARD, M.; SERRÃO, J. As espécies de Ephemeroptera (Insecta) registradas para o Brasil. **Biota Neotropica**, v. 4, n.2, p. 1-34, out. 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bn/a/tyXG6BYkthK8st7NjcD3s4k/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 03 ago. 2023.

SOUZA-FRANCO, G.M.; ANDRIAN, I. F.; FRANCO, R. M. Comunidade de insetos aquáticos associados à *Eichhornia azurea* (Schwartz) Kunth, em uma lagoa de várzea na planície de inundação do Alto Rio Paraná, Mato Grosso Do Sul, MS, Brasil. **Biológico**, São Paulo, v.71, n.1, p.83-91, jan./jun., 2009. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v71_1/franco.pdf. Acesso em: 03 ago. 2023.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Geenetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v 38 (7), p. 3022-3027, jul. 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com/mbe/article/38/7/3022/6248099?login=false>. Acesso em: 21 ago. 2023.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 22, n. 22, p. 4673 - 4680, 1994.