



Projeto de pesquisa

Estudo da diversidade críptica, filogeografia e sistemática molecular das espécies *Traverhyphes indicator* e *Traverhyphes pirai* (Ephemeroptera, Leptohyphidae) usando DNA barcodes

Proponentes:

Bruno Moreira

Iancor Pereira

Jonathan Macedo

Lília de Cássia

Luíza Quadros

Michele Araújo

Thiago Araújo

Belo Horizonte, Junho de 2008

Índice

<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>2</u>
<u>OBJETIVO GERAL</u>	<u>5</u>
<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	<u>5</u>
<u>JUSTIFICATIVA</u>	<u>6</u>
<u>METODOLOGIA</u>	<u>7</u>
<u>ORÇAMENTO</u>	<u>9</u>
<u>CRONOGRAMA</u>	<u>10</u>
<u>RESULTADOS ESPERADOS</u>	<u>11</u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>12</u>

Introdução

Os rios são coletores naturais das paisagens, refletindo o uso de ocupação do solo e de sua respectiva bacia de drenagem (Goulart et al., 2003). As comunidades biológicas refletem a integridade ecológica dos ecossistemas (p. ex., integridade física, química e biológica), integrando os efeitos dos diferentes agentes impactantes e fornecendo uma medida agregada dos impactos, fato que levou à criação do termo bioindicadores. Portanto, a qualidade de um ecossistema pode ser analisada na diversidade e abundância da sua fauna aquática (Barbour et al., 1999). As náíades de Ephemeroptera constituem um dos principais grupos de macro invertebrados bentônicos. Ocupam a maior parte dos meso-habitats aquáticos disponíveis, e possuem uma importância fundamental na transformação da matéria orgânica. Podem viver de algumas semanas a poucos anos, contrastando com o estágio adulto, terrestre, que dura questão de horas. Elas respondem sensivelmente a alterações na qualidade da água, sendo assim um dos principais grupos utilizados como bioindicadores desses habitats. A ordem Ephemeroptera é composta atualmente por cerca de 4000 espécies, sendo considerada o grupo de insetos alados mais antigos que se conhece (Salles, FF et al., 2004).

Em Ephemeroptera, a família Leptohiphidae é, atualmente, composta por nove gêneros, divididos em quatro grandes grupos: (1) *Tricorythopsis*; (2) *Leptophyes*; (3) *Allenhyphes-Traverhyphes*; (4) *Leptohiphes-Haplohiphes-Tricorythodes*, sendo *Tricorythopsis* o mais basal e os grupos 3 e 4, irmãos, compartilhando cinco caracteres (Molineri, 2006). Para estudos de filogenia, faz-se necessária a escolha de um grupo externo, garantindo, assim, quais são as apomorfias e plesiomorfias do grupo em questão. No presente estudo, o gênero *Leptohiphes* será utilizado para tal propósito, comparando-o ao gênero *Traverhyphes*, foco do projeto.

O sistema de classificação tradicional, baseado principalmente em caracteres morfológicos, levou taxonomistas a enquadrarem muitos organismos em uma espécie só por serem “suficientemente” parecidos. Porém, várias vezes, essa espécie criada inclui indivíduos com diferenças bastante distintas, como hábitos alimentares, localização e interações específicas com outros organismos. Assim, essa variedade de características indica que uma espécie se trata, na verdade, de um complexo de espécies crípticas (Burns,

J. M., 2008). Note, porém, que esse complexo não é um grupo natural. Trata-se de um termo científico para designar aquelas espécies que não podem ser diferenciadas pelas percepções humanas, mas que no ecossistema ou por análises moleculares são normalmente diferenciadas.

A maioria dos grupos de vetores de doenças, tais como mosquitos, triatomíneos, flebotomíneos e outros artrópodes (carrapatos), é agrupada em complexos de espécies crípticas e estudos genéticos têm destacado diversidade críptica em diversos outros táxons, com implicação geral de que há mais espécies do que realmente aparenta (Barrat et al., 1997).

No estudo da evolução molecular, um haplogrupo é um grupo de haplótipos, séries de combinações de alelos, que não se encontram em equilíbrio de ligamento, encontrados em lugares específicos de um cromossomo, ou seja, uma seqüência de DNA mitocondrial de um indivíduo específico e seqüências idênticas de DNA mitocondrial de outros indivíduos constituem um haplótipo. Indivíduos com o mesmo haplótipo têm relações genealógicas. Os haplótipos são identificados principalmente a partir de marcadores polimórficos de DNA. Diversos marcadores estão distribuídos por todo o genoma e eles deram uma nova dimensão nos estudos moleculares de variabilidade genética, e vem sendo amplamente utilizados em diversas áreas (Jane et al. 2003).

Considerando que as linhagens haplotípicas apresentam diferentes variações nas suas seqüências de DNA mitocondrial em razão de suas histórias evolutivas distintas, é possível correlacionar um indivíduo a um dado haplogrupo. Já que a proporção de alelos varia de um lugar para outro, é possível estimar sua origem e distribuição, ocorrendo, portanto, pequenas diferenças entre populações vizinhas e maiores diferenças entre populações distantes. Para tanto, usam-se as freqüências alélicas que potencialmente conferem a cada sublinhagem haplotípica um padrão característico de polimorfismo (Sheppard et al. 1994).

Uma maneira de estudar as populações atuais, no caso de efemerópteros da América do sul, é através de amostragens geográficas dos dados. Para isso, consideram-se principalmente as freqüências alélicas.

Os haplótipos do DNA mitocondrial têm sido usados em estudos de evolução, auxiliando na identificação da origem geográfica de um indivíduo. A escolha do DNA

mitocondrial é explicada pelo fato de ele ser herança matrilinea (herdado exclusivamente do gameta materno), não trocando, portanto, genes com nenhum outro segmento cromossômico, o que torna possível, ao fragmento, se manter inalterado até que ocorra uma mutação. A alternativa encontrada para esses estudos populacionais de efemerópteros foi a utilização dos haplotipos do DNA mitocondrial constituídos por marcadores de DNA barcodes (Sheppard et al. 1994).

O uso de marcadores moleculares tem sido amplamente utilizado para reconstruir filogenias de Ephemeroptera, já que algumas espécies possuem caracteres morfológicos similares. A análise genômica se torna indispensável quando os exemplares se tratam de espécies crípticas. Esse tipo de estudo permite a fragmentação de uma espécie em complexos de várias espécies. A comparação de sequências da subunidade 1 do Citocromo Oxidase (CO1) do DNA mitocondrial já possibilitou o entendimento de relações filogenéticas de outros táxons da ordem Ephemeroptera (McCaVerty, 1998; Ogden and Whiting, 2003; Monaghan et al., 2005; Ogden and Whiting, 2005) e outras citações afirmam que essa região é capaz de distinguir as espécies desse gênero (Ball et al., 2005). Além disso, como os primers são bem conservados para esse grupo (Simon et al., 1994), o uso de CO1 como DNA barcode será satisfatório em nossos estudos.

Objetivo Geral

Aperfeiçoar técnicas de monitoramentos de ambientes aquáticos avaliando a diversidade críptica do gênero *Traverhyphes* através do uso de MtDNA COI barcodes, assim como a capacidade bioindicadora de cada espécie.

Objetivos específicos

1- Comparar marcadores moleculares das supostas espécies crípticas e usar outros métodos de biologia molecular para criar uma filogenia do complexo a ser analisado e, assim, tornar possível a diferenciação das respectivas espécies após coleta da água.

2- Avaliar uma possível associação entre as espécies crípticas descobertas neste estudo e a resistência diferencial à poluição orgânica e à contaminação por metais pesados.

3- Construir a filogeografia (distribuição de haplótipos no ambiente) e a sistemática molecular das espécies crípticas que forem descobertas a partir das duas espécies (*Traverhyphes indicator* e *Traverhyphes pirai*).

4- Quantificar e inferir os haplogrupos a partir de haplótipos modais de referência, usando marcadores de DNA mitocondrial.

Justificativa

Focalizamos nosso projeto em espécies que aparentaram apresentar uma maior contradição morfológica e taxonômica, e temos como objetivo elucidar estes problemas. Revisões bibliográficas feitas pelo nosso grupo de pesquisa corroboram com a teoria de que essas duas espécies, na verdade, se tratam de dois complexos de espécies crípticas. *Traverhyphes indicator* e *Traverhyphes pirai* são insetos que se encontram consideravelmente espalhados pelo continente sul americano, são abundantes e de grande importância ecológica, já que, particularmente aqueles da espécie *Traverhyphes indicator* (Molineri, 2001), são rotineiramente utilizados em monitoramento aquático. Dúvidas quanto à taxonomia e sistemática tradicionais do complexo não foram resolvidas porque caracteres morfológicos, por si só, não possibilitam a perfeita distinção entre as espécies. Esse problema é observado no estágio imaturo (náíades), o estágio mais duradouro utilizado como bioindicador.

Pretendemos esclarecer a diversidade dos complexos, construindo filogenias com base em comparações de seqüências do gene da CO1 mitocondrial. É a chance de elucidarmos a classificação dessas espécies, com a descoberta de dois novos complexos, é grande, considerando que estudos anteriores feitos, utilizando os mesmo suportes, tiveram resultados favoráveis e próximos aos esperados. Com o propósito de verificar a provável origem evolutiva de cada indivíduo, será desenvolvido um método de trabalho para estabelecer as relações entre as freqüências alélicas dos haplótipos e os haplogrupos.

A elucidação taxonômica desses complexos pode ajudar a reduzir a ocorrência de resultados falso positivos em diagnósticos de qualidade de águas, já que diferentes espécies dentro de um complexo podem exibir diferenças na ecologia, apresentar variações quanto à capacidade e competência bioindicadora, e na resposta a variações no ambiente.

Metodologia

1- Obtenção dos espécimes e cultivo em laboratório:

Os espécimes serão coletados em rios e lagoas dos estados de São Paulo, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, além de localidades na Argentina e Uruguai. A captura será de acordo com técnicas de coleta de bentos pré-estabelecidas e orientadas por professores de laboratórios de ecologia de insetos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O transporte do material coletado será feito em recipientes apropriados e conservados à temperatura do ambiente em que houve a coleta. As amostras de cada região serão transportadas isoladamente.

2- Extração do DNA dos espécimes:

O DNA será obtido a partir de extração com o *PureGene™ DNA isolation kit for cells and tissues* (Gentra Systems cat #: D-5000A), conforme Willian et al. (2006)

3- Amplificação e sequenciamento do DNA mitocondrial.

Os primers conservados C1-N-2191 (5'-CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC-3') e C1-J-1718 (5'-GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC-3') de Simon et al. (1994) serão utilizados para amplificar a região do mtDNA COI. Desnaturação inicial (2 minutos a 94°C) será seguida de 35 ciclos de 70s a 94°C, 70s a 58°C, 90s a 72°C e uma extensão Wnal de 72 °C por 5 min.

Condições necessárias para o PCR serão otimizadas de acordo com os procedimentos feitos por Chippindale et al. (1998), Innis et al. (1990), e Logan (1999). Os produtos serão purificados usando *GeneClean® Turbo for PCR kit* e sequenciados em direções diretas e reversas usando o *ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0* (PE Biosystems). Após, serão visualizados em gel de eletroforese 1,3% de agarose corado com brometo de etídio utilizando luz UV.

O sequenciamento dos barcodes será necessário, já que seqüências das espécies em estudo não constam em bancos de dados.

4- Análise e comparação de dados moleculares

Softwares serão utilizados para cálculos da composição nucleotídica; alinhamento das seqüências (barcodes); comparação e identificação de similaridades; construção de gráficos com as freqüências alélicas encontradas em cada região e construção da nova árvore filogenética e da filogeografia das espécies.

5- Teste de potencial (individual) bioindicador para eutrofização

Para o teste de eutrofização, serão feitos cinco ambientes em aquários, contendo, cada um, uma concentração inicial de fertilizante que varie em dez vezes de aquário para aquário, e um controle, contendo a água do local de coleta. Os líquidos ficarão, em cada um dos recipientes, em repouso por cerca de um mês, sendo feita, ao fim desse intervalo, uma contagem da DBO dos meios com o auxílio de um oxímetro. Após esse período, um número padronizado de espécimes será introduzido nos meios poluídos, de forma que as náíades de cada localidade tenham sua resistência avaliada em diferentes níveis de poluição orgânica. Semanalmente, o número de indivíduos será contado e um gráfico com a taxa de mortalidade será feito, assim, poderemos avaliar a eficiência desses efemerópteros como bioindicadores de eutrofização.

6- Avaliar a viabilidade das larvas como bioindicadores para mercúrio

Os espécimes referentes a cada localidade serão submetidos a meios com diferentes concentrações do metal pesado mercúrio. Cada aquário terá concentrações graduais de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} mg/L de mercúrio, havendo também um controle, contendo água do local da coleta. Semanalmente, o número de indivíduos será contado e um gráfico com a taxa de mortalidade será feito, assim, poderemos avaliar a eficiência dessas náíades como bioindicadores de presença de mercúrio.

Orçamento

Quantidade/ Produto/ Descrição/ #catálogo/ preço

1- Produtos de consumo:

- 01 DNA isolation kit for cells and tissues (Roche Applied Science) ----- R\$ 911,00
- 10x96 Tips (1-200ul) (Progene) # 24-TR222-CR ----- R\$ 50,00
- DryRelease reagents BioRad Chelex 100 142-1253 ----- R\$ 156,00
- Primers Invitrogen Custom Oligos N/A ----- R\$ 22,5/unidade
- 10X96 Tips Corning (Fisher) filter tips - boxed; 0.1-10 µl CS004807 ----- R\$ 124,05
- Pre-cast gels Invitrogen E-gel 96 2% G7008-02 ----- R\$ 363,75
- Sephadex Sigma-Aldrich Sephadex G-50 G5080 ----- R\$ 1662,90
- 10 X 96 Tips (1-300 µl) ProGene (Ultident) Tips - boxed; 1-300 µl 24-T350CRS ----- R\$ 47,90
- 80 Aquários de dimensão 30x15x20cm e capacidade 9L (Aquamauro) ----- R\$ 15,00 unidade
- 50 kg de fertilizante organomineral 05-13-13 + 25% M.O. (MF Rural) ----- R\$ 32,50

2- Equipamentos:

- 01 Oxímetro Digital Microprocessado AT-150 ----- R\$ 2.049,00 (e-commerce)
- BigDye ABI BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (5X buffer) ----- R\$ 15.876,00
- Plates Millipore Multiscreen HV Plate MAHVN4550 ----- R\$ 23,80/unidade
- Capillary (50cm) 4331250 ----- R\$ 6.721,00

Cronograma

objetivo / mês	1° mês	2° mês	3° mês	4° mês	5° mês	6° mês	7° mês	8° mês	9° mês
coleta	X	X	X						
extração do DNA			X						
sequenciamento do DNA mitocondrial			X	X					
análise de barcodes				X	X				
preparação da água para teste de eutrofização				X					
exposição das larvas a eutrofização					X	X			
preparação e teste de resistência a mercúrio						X	X		
análise de resultados e conclusão do projeto								X	X

Resultados Esperados

As náíades formam dois complexos de espécies crípticas, ao contrário do que se consta na literatura, o que justifica o comportamento diferenciado dos espécimes dentro de cada complexo, quando submetidos às amostras. Essas diferenças não expressas na morfologia são provenientes de genomas distintos de cada uma das espécies formadoras dos complexos.

Bibliografia

Ball, S. L.; Hebert, P. D. N.; Burian, S. K.; Webb, J. M. 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *J. N. Amer. Benthol. Soc.* 24(3): 508-524.

Barbour, M.T.; Gerritsen, J.; Snyder, B.D. & Stribling, J.B. 1999. Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, 2a ed. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C.

Behere Gajanan T., Wee Tek Tay, Russell Derek A., Heckel David G., Appleton Belinda A., Kranthi Keshav R. and Batterham Phil (2007) Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 117.

Burns, J. M., 2008. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservación Guanacaste, Costa Rica. *PNAS*. 105 (17), 6350-6355.

Chippindale et al., 1998 P.T. Chippindale, P.T; Whitmore, D.H.; Dave, V.K.; Valencia, T.G.; Robinson, J.V., 1998. Effective procedures of the extraction, amplification and sequencing of odonate DNA, *Odonatologica*. 27, 415–424.

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. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 3 (5):294–299.

Goulart, M. & Callisto, M. 2003. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da FAPAM*, ano 2, n^o 1.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B*. 270: 313–322.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W, 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 14813–14817.

Hellawell, J. M., 1986. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. *Elsevier Applied Science*. London. 546 pp.

Hewitt, G., 1998. Diversity in insect species using DNA sequences. In: Karp, A., Isaac, P.G., Ingram, D.S. (Eds.), *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman & Hall, London, 418–425.

Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J., 1990. PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications, *Academic Press Inc., London*.

Jane M. Hughes, Peter B. Mather, Mia J. Hillyer, Cath Cleary, Barbara Peckarsky, 2003. Genetic structure in a montane mayfly *Baetis bicaudatus* (Ephemeroptera: Baetidae), from the Rocky Mountains, Colorado. *Freshwater Biology*. 48 (12), 2149–2162.

Logan, J.A., 1999. Extraction, polymerase chain reaction, and sequencing of a 440 base pair region of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene from two species of acetone-preserved Damselflies (Odonata: Coenagrionidae, Agrionidae), *Environ. Entomol.* 28, 143–147.

McCafferty, W.P., 1998. Ephemeroptera and the great American interchange, *J. N. Am. Benthol. Soc.* 17, 1–20.

Monaghan, J. Gattolliat, M. Sartori, J. Elouard, H. James, P. Derleth, O. Glaizot, F. de Moor and A.P. Vogler, 2005. Trans-oceanic and endemic origins of the small minnow mayflies (Ephemeroptera, Baetidae) of Madagascar, *Proc. R. Soc. Lond. B* 272, 1829–1836.

Molineri C. 2001. *Traverhyphes*: a new genus of Leptohiphidae for *Leptohiphys indicator* and related species (Insecta: Ephemeroptera). *Spixiana* 24:129-140.

Molineri, C., 2006. Phylogeny of the mayfly family Leptohiphidae (Insecta: Ephemeroptera) in South America. *Systematic Entomology*, 31 (4), 711–728.

Ogden, T.H.; Whiting, M.F., 2003. The problem with “the Paleoptera Problem:” sense and sensitivity, *Cladistics*. 19, 432–442.

Ogden, T.H.; Whiting, M.F., 2005. Phylogeny of Ephemeroptera (mayflies) based on molecular evidence, *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 625–643.

Paterson, HEH, 1991. The recognition of cryptic species among economically important species. In: Zaluki MP. , editor. *Heliothis: research methods and prospects*. Springer, New York; 1–10.

Salles, FF, Da-Silva, E. R.; Hubbard, M. D. & Serrão, J. E., 2004. As espécies de Ephemeroptera (Insecta) registradas para o Brasil. *Biota Neotropica*, 4 (2).

Sheppard WS, Arias MC, and Shimanuki H, 1994. Determination of mitochondrial DNA haplotypes from sting remnants of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera Apidae). *Bull Entomol Res* 84:551–554.

Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H.; Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651–701.

Ståhls G; Savolainen E. 2008. MtDNA COI barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46:82-87.

Stoeckle, M.; Waggoner, P. E.; Ausubel, J. H., 2005. *Barcoding life, illustrated*. v3.

Williams HC; Ormerod SJ; Bruford MW. 2006. Molecular systematics and phylogeography of the cryptic species complex *Baetis rhodani* (Ephemeroptera, Baetidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40:370-382.