

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

ÉRIKA SAYURI TANINO

SÃO CARLOS – SP

2023

ÉRIKA SAYURI TANINO

Análise molecular de seis populações de
Thalassomya gutae (Diptera, Chironomidae) da
costa nordeste brasileira.

Monografia apresentada à
Universidade Federal de São Carlos
como parte dos requisitos para
conclusão do curso de graduação em
Bacharelado em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^a Dr^a Livia Maria Fusari

SÃO CARLOS - SP

2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Meire e Silvio, que são meu exemplo e motivação, e que não mediram esforços para me apoiar em todos os momentos da graduação.

Aos amigos que fiz na turma da Biologia UFSCar 016, com quem dividi os momentos bons e ruins dessa jornada.

Aos colegas de laboratório, em especial Érika Mayumi Shimabukuro e Karime de Araujo Paina, pela grande ajuda durante os experimentos realizados neste trabalho.

A CAPES, pelo apoio financeiro através do projeto Entre Mares.

À Lívia Maria Fusari, por ser orientadora paciente e compreensiva, e por ter insistido neste projeto apesar dos percalços causados pela pandemia.

RESUMO

As espécies de Chironomidae vivendo em ambientes marinhos são registradas em zonas costeiras por todo o mundo. Essas espécies pertencem a vários grupos taxonômicos, incluindo representantes da subfamília Telmatogetoninae. Telmatogetoninae é predominantemente encontrada em habitats entremarés, estando associada a costões rochosos. É representada por dois gêneros: *Telmatogeton* Schiner e *Thalassomya* Schiner. *Telmatogeton* é registrado para o Brasil através da ocorrência de três espécies: *Telmatogeton atlanticus* Oliveira, *Telmatogeton eshu* Oliveira e *Telmatogeton nanus* Oliveira, sendo conhecidos somente os adultos. *Thalassomya*, por sua vez, foi registrada no país com a descrição de adulto macho, pupa e larva de *Thalassomya gutae* Neubern, Silva & Trivinho-Strixino. A espécie *T. gutae* possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em muitos locais na costa litorânea nordestina. Nesse contexto, o presente trabalho visou verificar se as populações analisadas, reconhecidas como *T. gutae*, pertencem a essa espécie ou são consideradas espécies crípticas. Assim, analisamos seis populações distribuídas na região nordeste, nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas e Bahia. Dessa forma, foram promovidos avanços no protocolo de extração e amplificação do DNA *barcode* para essa espécie e definida o status molecular das populações.

Palavras-chave: divergência molecular, estruturação genômica, chironomidae marinhos.

ABSTRACT

Chironomidae species living in marine environments have been recorded in coastal zones all over the world. These species belong to several taxonomic groups, including representatives of the Telmatogetoninae subfamily. Telmatogetoninae is predominantly found in intertidal habitats, being associated with rocky shores. It is represented by two genera: *Telmatogeton Schiner* and *Thalassomya Schiner*. Imatogeton is recorded for Brazil through the occurrence of three species: *Telmatogeton atlanticus* Oliveira, *Telmatogeton eshu* Oliveira and *Telmatogeton nanus* Oliveira, only the adults are known. *Thalassomya*, in turn, was recently registered in the country with the description of adult male, pupa and larva of *Thalassomya gutae* Neubern, Silva & Trivinho-Strixino. The *T. gutae* species has a wide geographic distribution, being found in many places on the northeastern coast. In this context, the present work aimed to verify if the analyzed populations, recognized as *T. gutae*, belong to this species or are considered cryptic species. Thus, we analyzed six populations distributed in the northeast region, in the states of Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas and Bahia. In this way, advances were promoted in the protocol of extraction and amplification of the DNA barcode for this species and defined the molecular status of the populations.

Keywords: molecular divergence, genomic structuring, marine chironomidae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Distribuição das populações de <i>Thalassomya gutae</i> (Chironomidae).....	16
Figura 2 -	Rede de háplótipos dos pontos de coleta.....	20
Figura 3 -	Rede de háplótipos dos períodos de coleta.....	21
Figura 4 -	Correntes Marítimas.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Matriz de valores Fst.....	21
-------------------	----------------------------	----

Sumário

1	INTRODUÇÃO	9
	1.1. SUBFAMÍLIA TELMATOGETONINAE.....	10
	1.2. POPULAÇÕES DE <i>THALASSOMYA GUTAE</i> E DNA BARCODE.....	11
2	OBJETIVOS	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
	1.1. ÁREA DE ESTUDO.....	15
	1.2. EXTRAÇÃO DE DNA	16
	1.3. PCR.....	17
	1.4. ANÁLISES.....	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5	CONCLUSÕES	24
	REFERÊNCIAS	25
	APÊNDICE	<u>29</u>

1 INTRODUÇÃO

Chironomidae é uma família da ordem Diptera e é composta por espécies que são consideradas moscas verdadeiras (CRANSTON, 1995).

Essa família possui uma ampla distribuição e grande abundância, podendo ser encontrada nos mais variados habitats, desde profundezas abissais a elevadas altitudes do Himalaya, e suportam até mesmo condições extremas de temperatura, salinidade e pH (CRANSTON, 1995; FERRINGTON, 2008). Estimativas indicam que existam até 20.000 espécies distribuídas em todos os continentes, incluindo a Antártica (FERRINGTON, 2008).

Os quironomídeos são divididos em 11 subfamílias: Aphroteniinae, Buchonomyiinae, Chironominae, Chilenomyiinae, Diamesinae, Orthoclaadiinae, Podonominae, Prodiamesinae, Tanypodinae, Telmatogetoninae e Usumbaromyiinae (SPIES; REISS, 1996).

Dentre as subfamílias, 5 são encontradas no Brasil (Chironominae, Orthoclaadiinae, Podonominae, Tanypodinae e Telmatogetoninae) e há registro de 99 gêneros e 659 espécies de Chironomidae (PINHO, 2023). Ao contrário de Chironominae, Tanypodinae e Orthoclaadiinae que tem ampla distribuição, a subfamília Telmatogetoninae, composta pelos gêneros *Telmatogeton* e *Thalassomya*, limita-se à região litorânea e Podonominae, representada pelo gênero *Podonomus*, aparece em altitudes mais elevadas (ROQUE; TRIVINHO-STRIXINO, 2004).

Holometábolos, os quironomídeos apresentam as fases de ovo, larva, pupa e adulto (OLIVER, 1971).

A fase adulta é considerada efêmera, cumprindo rapidamente os aspectos reprodutivos (OLIVER, 1971). Já a fase larval constitui a maior parte do ciclo de vida deles, podendo variar de algumas semanas a mais de um ano (OLIVER, 1971; COFFMAN; FERRINGTON, 1996; TRIVINHO-STRIXINO, 2011). Nessa fase de maior duração, a larva se alimenta e acumula energia para completar o resto do ciclo. (OLIVER, 1971).

Em regiões temperadas e polares, os ciclos de vida tendem a ser mais longos porque as larvas podem entrar em um estado de inatividade por um certo período para se adaptar às condições do ambiente (OLIVER, 1971).

Usualmente, a fase larval e pupal são restritas a ambientes aquáticos e a fase adulta é aérea (FERRINGTON, 2008).

As larvas geralmente são encontradas em ambientes lóticos, lênticos, mares, costões rochosos ou associadas a algas (SÆTHER; ASHE; MURRAY, 2000). Porém, também existem espécies cujas larvas podem ser encontradas nas margens dos corpos d'água ou em ambientes não aquáticos, como em esterco bovino (SÆTHER; ASHE; MURRAY, 2000; OLIVER, 1971). Essa capacidade das larvas de viver em diversos ambientes é um diferencial dessa família e contribui para a ampla distribuição e abundância desse grupo (OLIVER, 1971; TRIVINHO- STRIXINO, 2011).

A fase pupal dos quironomídeos pode durar algumas horas ou alguns dias (TRIVINHO-STRIXINO, 2011; OLIVER, 1971). Na maior parte da família a pupa é sedentária e possui um revestimento. Para a emergência do adulto, a pupa se desloca para a superfície auxiliada por ar que fora acumulado dentro dela (OLIVER, 1971). Esse trajeto é um momento crítico para o inseto por conta da vulnerabilidade da pupa e pela mudança de condições ambientais (OLIVER, 1971). Depois de alguns minutos o adulto já é capaz de voar (TRIVINHO-STRIXINO, 2011; OLIVER, 1971).

Os adultos vivem um período que pode variar entre dias e algumas semanas (OLIVER, 1971). Nessa fase eles desempenham suas funções reprodutivas, que incluem acasalamento e a oviposição (TRIVINHO-STRIXINO, 2011; OLIVER, 1971). Esse período é breve e eles não se alimentam

Próxima à sua superfície acontece a oviposição. Os ovos são depositados numa matrix gelatinosa, que, por sua vez, pode se aderir a rochas, plantas e outros objetos (OLIVER, 1971; SÆTHER; ASHE; MURRAY, 2000). Esses ovos podem ter o formato alongado ou mais esférico (OLIVER, 1971).

1.1. SUBFAMÍLIA TELMATOGETONINAE

A subfamília Telmatogetoninae é um grupo de predominância marinha, e as espécies aparecem associada a costões rochosos e fica sob ação das marés (OLIVER, 1971). Compreende os gêneros: *Telmatogeton* Schiner, 1866 e *Thalassomya* Schiner, 1856. São sete espécies registradas na Região Neotropical, e dentre elas, três no Brasil: *Telmatogeton atlanticus* Oliveira, 1950, *Telmatogeton eshu* Oliveira, 2000 e *Telmatogeton nanus* Oliveira, 1950

(OLIVEIRA, 1954; OLIVEIRA, 2000a; SPIES; REISS, 1996). *Thalassomya* possui seis espécies na Região Neotropical, umadelas registrada no Brasil, *Thalassomya gutae* Neubern, Silva & Trivinho-Strixino, 2013, com descrição de adulto macho, pupa e larva.

Seus gêneros, *Thalassomya* e *Telmatogeton*, estão amplamente distribuídos, sendo encontrados em todas as regiões zoogeográficas, embora *Thalassomya* seja principalmente registrado em regiões de mares mais quentes (ASHE; MURRAY; REISS, 1987; CRANSTON, 1989). Até o momento, encontram-se validadas trinta espécies de *Telmatogeton* e doze espécies de *Thalassomya* (ASHE; O'CONNOR, 2009).

O grupo está presente, principalmente, em costões rochosos da região entremarés, mais especificamente no médio-litoral e, em muitos casos, em sua franja supralitoral (OLIVER, 1971; NEUMANN, 1976; HASHIMOTO, 1976). No entanto, há registro de espécies vivendo em áreas que recebem escoamento de água doce, onde a salinidade é reduzida, ou, ainda, em ambientes afastados de habitats marinhos periféricos (OLIVER, 1971; HASHIMOTO, 1976).

Adultos de *Telmatogetoninae* têm vida curta, geralmente limitada a algumas horas (NEUMANN, 1976). Possuem asas bem desenvolvidas e são capazes de voar. Contudo, sua locomoção acontece por meio de caminhada ou corrida em substratos rochosos, onde também ocorre o acasalamento. A habilidade de voar foi substituída pela habilidade de andar, o que pode ser uma vantagem na presença das fortes brisas marítimas constantes em costões rochosos. Assim, mesmo gêneros totalmente alados e que poderiam voar são inclinados a andar ou correr (HASHIMOTO, 1976)

Vale também registrar que, em *Telmatogeton*, os ovos são depositados isoladamente, sem a presença de matriz gelatinosa, característico na maioria dos Chironomidae. Provavelmente, isso também ocorre em *Thalassomya* (NEUMANN, 1976).

Em comparação com seus parentes de água doce, os Chironomidae marinhos geralmente exibem uma ampla gama de morfologias incomuns, principalmente nas asas, pernas e hipopígio, como também a perda do enxameamento aérea (TANG et al 2022).

Essas autapomorfias muitas vezes enganam a colocação taxonômica e continuam sendo um desafio contínuo. Embora muitos Chironomidae marítimos

tenham sido relatados em todo o mundo (TANG et al 2022), poucos estudos investigaram sua radiação e diversificação de espécies.

1.2. POPULAÇÕES DE *THALASSOMYA GUTAE* E DNA BARCODE

Nos últimos anos, as abordagens moleculares para analisar os limites das espécies tiveram um rápido desenvolvimento. As divergências genéticas nas sequências parciais da subunidade 1 (COI) do citocromo *c* oxidase; denominado DNA barcode (HEBERT, 2003); têm se mostrado eficazes para o reconhecimento de espécies em vários grupos de animais, incluindo mosquitos pertencentes à família Chironomidae (Insecta, Diptera) (por exemplo, BRODIN et al 2012, EKREM et al 2007, 2010, SILVA et al. 2013, LIN et al. 2015).

Em vários casos, DNA barcode também ajudou na detecção de espécies presumivelmente crípticas, cuja a distinção *a posteriori* pode ser confirmada tanto pela morfologia quanto por marcadores genéticos nucleares (por exemplo, ANDERSON et al 2013, LIN et al 2018). Além disso, DNA barcode têm se mostrado adequados para associar fases da vida na família Chironomidae (CAREW et al 2005, STUR & EKREM 2011, SILVA & WIEDENBRUG 2014).

De acordo com estudos anteriores, a espécie *Thalassomya gutae* encontra-se amplamente distribuída pelo litoral brasileiro (MARIGO, 2020). Entretanto, como mencionado acima, a habilidade de voo dos adultos é prejudicada, ao passo que a habilidade de caminhada é desenvolvida (HASHIMOTO, 1976). Além disso, possivelmente não depositam seus ovos em massas gelatinosas, o que dificulta a flutuação pela água. Nesse sentido, a capacidade de dispersão dessa espécie é limitada.

Entretanto, as populações encontradas ao longo da costa litorânea nordestina são morfologicamente reconhecidas como uma única espécie, *Thalassomya gutae*. Embora, essas populações encontram-se isoladas por distância, não sendo observado, a princípio, fluxo gênico entre elas.

Nessa contextualização, três cenários delineiam-se. No primeiro deles, o isolamento por distância seria recente, não tendo havido tempo suficiente para que a seleção natural e à deriva genética produzissem seus efeitos nas várias populações, levando à sua diferenciação e possivelmente culminado em

processos de especiação (FREEMAN & HERRON, 2009). Nesse caso, ter-se-ia, então, diferentes populações de uma mesma espécie.

Num segundo cenário, as populações de *Thalassomya gutae*, na verdade, estariam diferenciadas em espécies crípticas, ou seja, grupos de indivíduos que, embora muito semelhantes morfológicamente, são independentes entre si (FREEMAN & HERRON, 2009). Nessa hipótese, o isolamento genético ocasionado pela limitada dispersão desses indivíduos já teria se consolidado, tratando-se, assim, de populações de diferentes espécies.

Uma terceira conjuntura envolveria a ocorrência de diferentes formas de dispersão para além do voo, possibilitando o fluxo gênico entre as populações de *Thalassomya gutae*. O fluxo gênico tende a homogeneizar as frequências alélicas e a reduzir a diferenciação entre as populações, que pertenceriam todas à espécie em questão (FREEMAN & HERRON, 2009). Nessa circunstância, novas formas de dispersão, como aquela que se dá por meio de ondas, teriam que ser consideradas e estudadas.

Considerando que indivíduos das diferentes populações e localidades da costa litorânea nordestina já foram morfológicamente identificados como pertencentes à espécie *T. gutae*, o que propomos no presente trabalho é a utilização de ferramentas moleculares para, num primeiro momento, aferir a distância genética entre as populações, confirmando, ou não, a ocorrência de uma única espécie.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral: estudar a diversidade genética de populações de *Thalassomya gutae* da costa nordestina brasileira, com base no gene COI.

Objetivos específicos:

- (1) Definir um protocolo de amplificação adequado para as populações amostradas.
- (2) Verificar se as diferentes populações de *Thalassomya gutae* pertencem ou não a mesma espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nas seções seguintes, apresentaremos a área de estudo e descreveremos como foi realizada a coleta e a análise do material biológico.

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O material analisado foi obtido a partir de coletas realizadas anteriormente, no período de 2016 e 2020, em costões rochosos litorâneos da Costa nordestina (Figura 1). Para este estudo foram analisado exemplares de seis populações, nas seguintes localizações: Praia de Itapuã, Salvador, Bahia (12°57'10,50"S 38°21'44,51"W); Praia da Ladeira, Japaritinga (9°05'20,58"S 35°15'24,78"W), Praia da Sereia, Maceió (9°34' 01,30"S 35°38'49,51"W), Pontal do Coruripe, Coruripe, (10°09'32,18"S 36°08'00,52"W), estes no estado do Alagoas; Praia de Coqueirinho, Conde, Paraíba (7°19'41,61"S 34°47'41,92"W); e na Praia de Pipa, Tibau do Sul, Rio Grande do Norte (6°13'37,64"S 35°02'43,13"W).

A imagem utilizada para ilustrar o panorama das espécies de Telmatogetoninae na costa nordestina foi obtida utilizando o *software* QGIS 3.16.1 (QGIS.ORG, 2020).

Figura 1- Distribuição das populações de *Thalassomya gutae* (Telmatogetoninae, Chironomidae) nos estados da Bahia, Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte.



Fonte: Elaborado por Bruno Luiz Melo.

Os imaturos e adultos de Chironomidae foram coletados manualmente, com auxílio de pincel de cerdas embebido em etanol 100% e pinça entomológica, e foram coletados diretamente das aflorações rochosas. As larvas, as pupas e os adultos foram fixados em etanol 100% e mantidos refrigerados.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Foram selecionados três indivíduos de cada população; da primeira coleta foram extraído DNA de dois machos e uma fêmea e da segunda foram selecionados um macho, uma fêmea e uma larva. Pernas, asas e genitálias dos adultos e cápsula cefálica das larvas, de cada indivíduo, foram retirados para a confecção de lâminas e depositados como voucher.

A extração foi feita com o QIAmp DNA Mini Kit seguindo as orientações do fabricante. Foi realizado o método não destrutivo, em que o espécime é incubado *overnight* em tampão específico e enzima proteinase K. Durante este processo é preservada a estrutura externa dos indivíduos.

O DNA extraído foi mantido refrigerado a -20°C .

3.3 PCR

Foram usados os primers LCO1490 e HCO2198, que amplificam o gene mitocondrial Citocromo c Oxidase, subunidade I, desenvolvidos por Folmer et al. (1994).

As reações foram preparadas com volume total de 25 μL , contendo 2,5 μL de tampão 10X (KCl 50mM, Tris-HCl 200 mM, em pH 8,4); 2 μL de dNTP; 0,2 μL de Taq DNA polimerase; 2 μL de DNA; 2 μL de MgCl_2 , 1 μL do primer HCO, 1 μL do primer LCO e água ultrapura estéril para completar o volume final. As reações de PCR foram realizadas em termociclador, utilizando programa proposto por Pramual et al. (2005), com modificações: 95°C por 3 minutos; 36 ciclos de 95°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos, para anelamento dos iniciadores, 72°C por 1 minuto e um passo adicional para extensão a 72°C por 7 minutos. Os produtos das amplificações serão submetidos à corrida eletroforética. O material da PCR será purificado utilizando kit de purificação da Applied Biosystems (Thermo Fisher) seguindo o protocolo do fabricante. A leitura das sequências foi obtida por sequenciamento terceirizado. Os vouchers moleculares serão depositados no GenBank/BOLD.

3.4 ANÁLISES

Não foi possível amplificar algumas extrações e, assim, algumas populações ficaram com tamanho amostral menor, com um ou dois indivíduos ao invés de três (Apêndice A).

No total foram sequenciadas 31 amostras (indivíduos).

As sequências obtidas foram alinhadas e editadas com o BioEdit. A matriz de distâncias genética foi feita por meio do *software* MEGA e a de Pairwise Fst pelo Arlequinn. As redes de haplótipo foram desenvolvidas pelo Network 10.

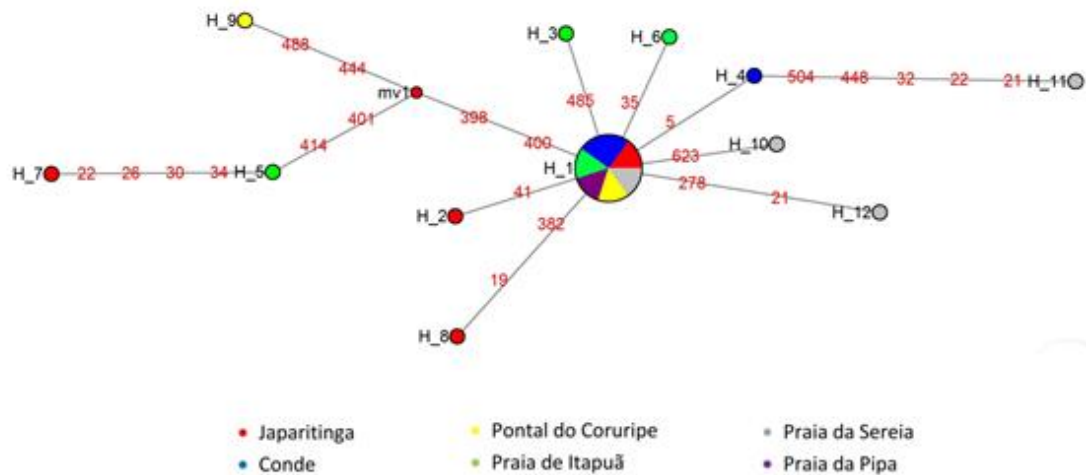
O material biológico e os *vouchers* estão depositados na Coleção de Chironomidae do Laboratório de Entomologia Aquática da Universidade Federal de São Carlos (LEA – UFSCar).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos dados obtidos com o sequenciamento do fragmento do gene COI de 31 amostras, foi gerada uma matriz de distância genética (Apêndice A) por meio do software MEGA a fim de mostrar a similaridade entre os pares de indivíduos. Os valores obtidos variam entre 0% e 1,8%. Um dos primeiros trabalhos que mostraram a eficiência do gene COI para a delimitação de espécies através do sistema de *DNA barcode* estipulou um limite de 3% para distâncias intraespecíficas em Lepidoptera (HEBERT et al., 2003). Em Chironomidae, já foram identificados valores médios de 0,82% (BRODIN et al., 2012), 0,91% (SILVA, 2011), 1,94% (SONG, 2016) e 2,3% (SINCLAIR & GRESENS, 2008) para as distâncias intraespecíficas. Os valores obtidos no presente estudo, entre 0% e 1,8%, foram baixos e próximos aos encontrados na literatura para amostras que pertencem a uma mesma espécie, além disso, as distâncias genéticas entre os indivíduos de uma mesma população e entre indivíduos de populações diferentes são muito similares, o que dificilmente aconteceria se essas populações pertencessem a espécies diferentes.

Das 31 amostras, foram identificados 12 haplótipos (Fig. 2). Dentre eles, 11 são únicos, dispostos perifericamente de modo a formar uma rede do tipo estrela. Há um haplótipo principal identificado como H_1, compartilhado por 20 indivíduos, que está presente em todas as seis populações amostradas. Esse perfil de rede com os haplótipos circundantes de frequência muito baixa não permite fazer qualquer relação entre as sequências genéticas encontradas e os locais de coleta.

Figura 2. Rede de háplótipos dos pontos de coleta



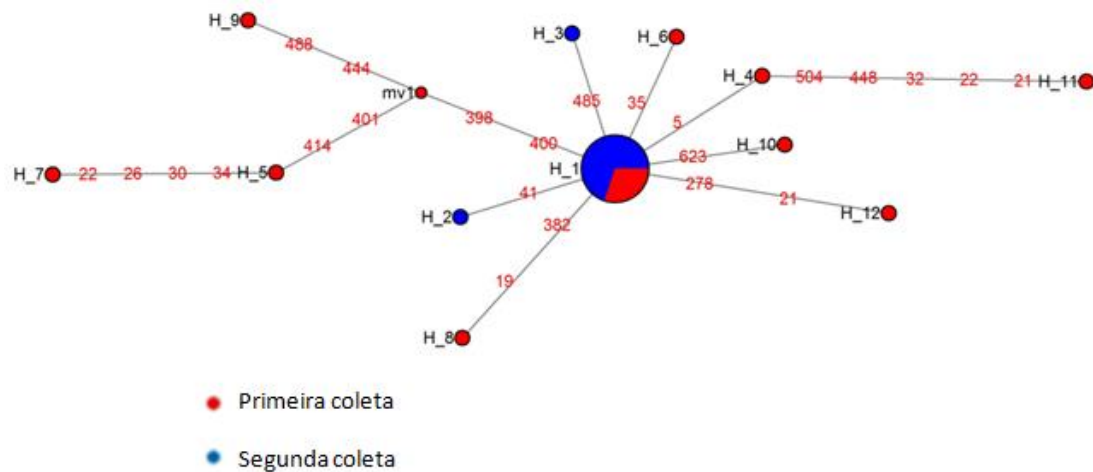
Rede de háplótipos do fragmento do gene mitocondrial COI relacionado as populações coletadas ao longo da costa nordestina. Pontos em vermelho são referentes a população de Praia da Ladeira, Japaritinga (AL); em azul da Praia do Coqueirinho, Conde (PB); em amarelo do Pontal do Coruripe, Coruripe (AL); em verde da Praia de Itapuã, Salvador (BA); cinza da Praia da Sereia, Maceió (AL); e em roxo da Praia da Pipa, Tibau do Sul (RN).

Fonte: Érika Sayuri Tanino.

Na figura 2 pode-se observar que cada círculo representa um háplótipo e seu tamanho representa a frequência. Os números em vermelho indicam as mutações ao longo da sequência genética.

Considerando os períodos em que o material foi coletado (Fig. 3) é possível observar que dos 11 háplótipos que possuem apenas um indivíduo, nove são provenientes da primeira coleta realizada em 2016. O tempo de armazenamento das amostras é um dos principais fatores que influenciam na qualidade do DNA (DEAN & BALLARD 2001). Em ambientes úmidos, nucleases podem ficar ativas por muito tempo e isso pode danificar o material (DEAN & BALLARD 2001). É possível que algumas divergências que foram consideradas como passos mutacionais que deram origem a háplótipos de baixa frequência sejam artefatos, visto que na segunda coleta (realizada em 2020) a maior parte dos háplótipos pertencem ao agrupamento principal.

Figura 3. Rede de háplótipos dos períodos de coleta



Rede de háplótipos do fragmento do gene mitocondrial COI relacionado aos períodos de coleta. Em vermelho referente as populações coletadas em 2016, e em azul as populações coletadas em 2020.

Fonte: Érika Sayuri Tanino.

Também é possível analisar a diferença genética entre as populações através do F_{st} . De acordo com os valores entre 0 e 1, estima-se se existe ou não uma estrutura genética entre as populações. Os dados obtidos através da comparação em pares entre as 12 populações (referente aos dois períodos de coleta, 2016 e 2020) estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 Matriz de valores F_{st}

	Populações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	japaratinga2	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	conde2	0.00	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	itapuã2	0.00	0.00	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	pipa2	-0.20	0.00	-0.20	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-
5	pontal_coruripe2	-0.20	0.00	-0.20	0.00	0.00	-	-	-	-	-	-	-
6	sereia2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-	-	-	-	-
7	conde1	0.00	0.00	0.00	-0.20	-0.20	0.00	0.00	-	-	-	-	-
8	itapuã1	0.00	0.00	0.00	-0.20	-0.20	0.00	0.00	0.00	-	-	-	-
9	japaratinga1	0.00	0.00	0.00	-0.20	-0.20	0.00	0.00	-0.22	0.00	-	-	-
10	pipa1	-1.00	0.00	-1.00	0.00	0.00	0.00	-1.00	-1.00	-1.00	0.00	-	-
11	pontal_coruripe1	0.17	0.25	0.17	0.00	0.00	0.25	0.17	-0.20	-0.20	-1.00	0.00	-
12	sereia1	0.10	0.11	0.10	-0.08	-0.08	0.11	0.04	0.07	0.02	-0.78	0.04	0.00

A tabela mostra os valores de F_{st} para as populações pareadas na parte inferior. A parte superior indica os p-valores significativos, onde o traço (-) corresponde a “não significativo”.

Uma das possíveis interpretações desse índice indica que um F_{st} maior que 0,15

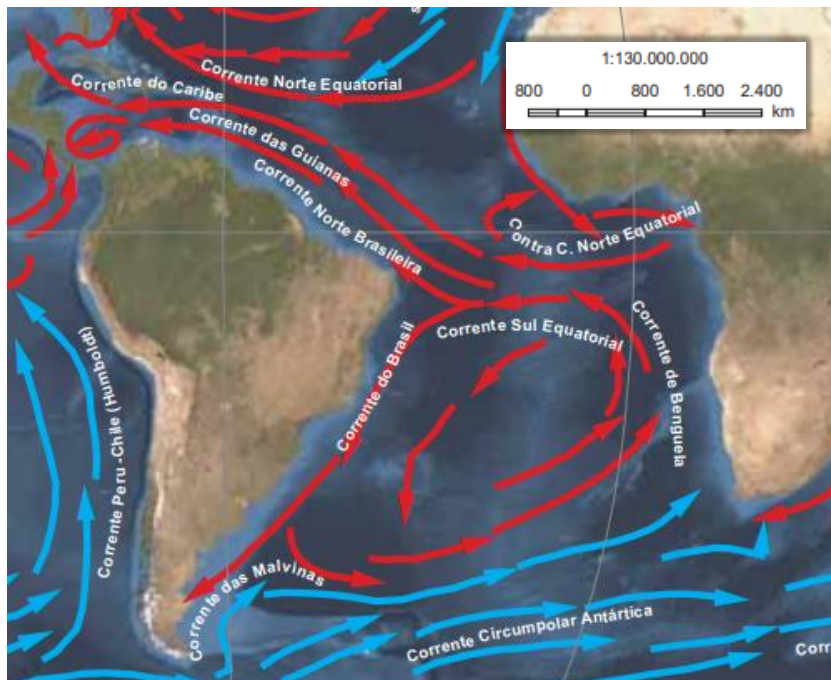
representa grande diferenciação entre as populações (WRIGHT, 1978). No entanto, o valor-p do Fst das combinações na matriz não foram significativos. Os valores-p obtidos foram maiores do que 0.05, e isso significa que há uma grande probabilidade de que a diferença observada entre os grupos seja ao acaso, ou seja, não podemos rejeitar a hipótese nula e afirmar que existe uma estruturação genética. Os vários valores negativos de Fst obtidos também indicam que o número amostral não foi suficiente para essa análise, já que valores negativos são resultado das correções feitas em função do tamanho desigual entre as amostras (GERLACH, 2010).

Apesar das populações amostradas estarem distribuídas em diversas localidades da costa do nordeste, as análises não mostraram divergências genéticas suficientes para identificá-las como espécies diferentes.

As análises do presente trabalho apontam duas possibilidades. A primeira é de que essas populações compartilham uma origem ainda muito recente, configurando várias populações de uma mesma espécie. Nesse caso elas ainda não teriam tido o tempo necessário para que as barreiras geográficas tenham levado essas populações a se estruturarem geneticamente.

A segunda possibilidade é a de que ainda esteja ocorrendo o fluxo gênico entre essas populações. Considerando a locomoção limitada da espécie *Thalassomya gutae* e a distância entre os pontos de coleta, esse contato poderia estar sendo promovido de uma outra forma que não seja o voo, e sim uma forma passiva.

Figura 4. Correntes Marítimas



O mapa mostra representações das correntes marítimas, com setas vermelhas indicando águas quentes e em azul as águas frias.

Fonte: adaptado de Atlas geográfico das zonas costeiras e oceânicas do Brasil – IBGE.

Para CHENG E HASHIMOTO (1978), é possível que a dispersão de Chironomidae por longas distâncias ocorra por meio de ações antrópicas, como através de barcos pesqueiros ou por motivos naturais, como correntes marítimas que carregam algas onde os insetos depositam seus ovos. Uma das correntes oceânicas que contornam o país é a Corrente Brasileira (Fig. 4), que tem origem a partir de uma bifurcação da Corrente Sul Equatorial próxima ao Cabo de São Roque, no estado do Rio Grande do Norte, e flui em direção ao sul (STRAMMA, 1989). Essa corrente poderia contribuir para que essas populações se deslocassem, permitindo assim uma troca de material genético entre elas.

5 CONCLUSÕES

Um protocolo de extração e amplificação de DNA foi desenvolvido para a espécie *T. gutae*.

A pouca divergência e estruturação genética encontradas nas populações com base no gene COI, indicam que todas as populações amostradas pertencem a *T. gutae*.

As análises moleculares apresentadas nesse estudo, aliam-se às análises morfológicas já desenvolvidas e possibilita uma melhor identificação e entendimento da espécie registrada para o Brasil.

Entende-se que o trabalho deve ser continuado agregando mais informações por meio de outros marcadores genéticos e também uma maior amostragem.

REFERÊNCIAS

- ASHE, P.; O'CONNOR, J. P. **A World Catalogue of Chironomidae (Diptera)**. Part 1. Buchonomyiinae, Chilenomyiinae, Podonominae, Aphroteniinae, Tanypodinae, Usambaromyiinae, Diamesinae, Prodiamesinae and Telmatogetoninae. Dublin: Irish Biogeographical Society & National Museum of Ireland, 2009. 445 p.
- BIOEDIT. **BioEdit software**. Versão 7.2.5, 2021. Disponível em: <https://bioedit.software.informer.com>. Acesso em: 10 nov. 2021.
- BRODIN, Y.; EJDUNG, G.; STRANDBERG, J.; LYRHOLM, T. Improving environmental and biodiversity monitoring in the Baltic Sea using DNA barcoding of Chironomidae (Diptera). **Mol. Ecol. Resour.** 2012, 13, 996–1004.
- CHENG, L.; HASHIMOTO, H. The marine midge *Pontomyia* (Chironomidae) with a description of females of *P. oceana* Tokunaga. **Syst Entomol**, Oxford, v. 3, p. 189- 196, 1978.
- CRANSTON, P. S. The adult males of Telmatogetoninae (Diptera: Chironomidae) of the Holarctic region: keys and diagnoses. **Entomologica scandinavica**, Copenhagen, v. 34, pt. 3, p. 17-22, 1989. Supplement.
- CRANSTON, P. S. Introduction. *In*: ARMITAGE, P. D.; CRANSTON, P. S.; PINDER, L. C. V. (ed.). **The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges**. 1st ed. London: Chapman & Hall, 1995. ch. 1, p. 1-7.
- DEAN, M. D.; BALLARD, J. W. O. Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 98, n. 3, p. 279–283, mar. 2001.
- EXCOFFIER, L. and H.E. L. Lischer Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**. 10: 564-567., 2010. Disponível em: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>.
- FERRINGTON JR, L. C. Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. **Hydrobiologia**, Den Haag, v.

595, p. 447-455, 2008.

FREEMAN, S.; HERRON, J. C. **Análise evolutiva**. Tradução: Maria Regina Borges Osório, Rivo Fischer. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 831 p.

GERLACH, G. et al. Calculations of population differentiation based on GST and D: forget GST but not all of statistics! **Molecular Ecology**, v. 19, n. 18, p. 3845–3852, 23 ago. 2010.

HASHIMOTO, H. Non-biting midges of marine habitats (Diptera: Chironomidae). *In*: CHENG, L. (ed.). **Marine Insects**. Amsterdam: North-Holland, 1976. ch. 14. p. 377- 414.

HEBERT, P.; CYWINSKA, A.; BALL, S.; DE WAARD, J. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 2003, 270, 313–321.

IBGE. **IBGE | Portal do IBGE**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>>.

MARIGO, T. C. **Levantamento e taxonomia de Telmatogetoninae (Diptera, Chironomidae) da costa brasileira**. Trabalho de conclusão de curso. Ciências Biológicas, CCBS. UFSCar. 2020.

MARIGO, T. C., LAMAS, C. J. E.; FUSARI, L. M. A new marine intertidal chironomid from the Brazilian coast (Diptera: Chironomidae: Telmatogetoninae). **Zootaxa**, Auckland, v. 4763, n. 1, p. 117-124, 2020.

MEGA, MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Versão 11 , 2022. Disponível em: <https://www.megasoftware.net>. Acesso em: 15 nov. 2021.

NETWORK, [Free Phylogenetic Network Software](#), Versão 10.2.0.0., 2021. Disponível em: <https://www.fluxus-engineering.com/netwinfo.htm>. Acesso em: 25 maio. 2020.

NEUMANN, Dietrich. Adaptations of chironomids to intertidal environments. **Annu Rev Entomol**, Palo Alto, v. 21, p. 387-414, 1976.

OLIVEIRA, S. J. Sobre *Telmatogeton atlanticum* Oliveira, 1950, com descrição

do alótipo fêmea (Diptera, Chironomidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 1, p. 149-151, 1954.

OLIVEIRA, S. J. Contribution to the knowledge of the Brazilian marine chironomids. I. Description of a new species of the genus *Telmatogeton* Schiner, 1866 (Diptera, Chironomidae, Telmatogetoninae). *In*: HOFFRICHTER, O. (ed.). **Late 20th century research on Chironomidae**: an anthology from the 13th International Symposium on Chironomidae, Freiburg, 5-9 September 1997. Aachen: Shaker Verlag, 2000a. p. 197-200.

OLIVEIRA, C. S. N.; SILVA, F. L.; TRIVINHO-STRIXINO, S. *Thalassomya gutae* sp. n., a new marine chironomid (Diptera: Chironomidae: Telmatogetoninae) from the Brazilian coast. **Zootaxa**, Auckland, v. 3701, n. 5, p. 589-595, 2013.

OLIVER, D. R. Life history of Chironomidae. **Annu Rev Entomol**, Palo Alto, v. 16, p. 211-230, 1971.

PINHO, L. C. Chironomidae. *In*: **Catálogo taxonômico da fauna do Brasil**. [S.l.], 2023. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/2>. Acesso em: 31 março, 2023.

QGIS.ORG. **QGIS Geographic Information System**. Versão 3.16.1, 2020. Disponível em: <http://www.qgis.org>. Acesso em: 24 nov. 2020.

ROQUE, F. O.; TRIVINHO-STRIXINO, S. *Podonomus pepinelli* n. sp., first record of the genus and subfamily from Brazil (Chironomidae: Podonominae). **Zootaxa**, Auckland, v. 689, p. 1-7, 2004.

SÆTHER, O. A.; ASHE, P.; MURRAY, D. E. Family Chironomidae. *In*: PAPP, L.; DARVAS, B. (ed.). **Contributions to a manual of Palaearctic Diptera (with special reference to the flies of economic importance)**. Budapest: Science Herald, 2000, p. 113-334. v. 4.

SILVA, F.L.D.; EKREM, T.; FONSECA-GESSNER, A.A. DNA barcodes for species delimitation in Chironomidae (Diptera): A case study on the genus

Labrundinia. **Can. Entomol.** 2013, 145, 589–602.

SINCLAIR CS, GRESENS SE. Discrimination of *Cricotopus* species (Diptera: Chironomidae) by DNA barcoding. **Bull Entomol Res.** 2008 Dec;98(6):555-63. doi: 10.1017/S0007485308005865. Epub 2008 Jul 1. PMID: 18590594.

STRAMMA, L. The Brazil current transport south of 23°S. **Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers**, v. 36, n. 4, p. 639–646, abr. 1989.

SONG C, WANG Q, ZHANG R, SUN B, WANG X. Exploring the utility of DNA barcoding in species delimitation of *Polypedilum* (Tripodura) non-biting midges (Diptera: Chironomidae). **Zootaxa.** 2016 Feb 16;4079(5):534-50. doi: 10.11646/zootaxa.4079.5.2. PMID: 27394207.

SPIES, M.; REISS, F. Catalog and bibliography of Neotropical and Mexican Chironomidae (Insecta, Diptera). **Spixiana**, München, v. 22, p. 61-119, 1996. Supplement..

TRIVINHO-STRIXINO, S. **Larvas de Chironomidae**: guia de identificação. São Carlos, SP: UFSCar, 2011. 3 v.

WIEDENBRUG, S.; LAMAS, C. J. E.; TRIVINHO-STRIXINO, S. A review of Neotropical species in *Thienemanniella* Kieffer (Diptera, Chironomidae). **Zootaxa**, Auckland, v. 3670, n. 2, p. 215-237, 2014.

WRIGHT S. **Evolution and, the Genetics of Populations** Volume 4. Chicago: University of Chicago Press. 1978).

APÊNDICE

	pair	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
1	JAP_L_201																																
2	JAP_M_201	0																															
3	JAP_M_202	0,15	0,15																														
4	CON_L_201	0	0	0,15																													
5	CON_M_201	0	0	0,15	0																												
6	CON_M_202	0	0	0,15	0	0																											
7	ITA_L_201	0	0	0,15	0	0	0																										
8	ITA_M_201	0	0	0,15	0	0	0	0																									
9	ITA_M_202	0,15	0,15	0,29	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15																								
10	PIP_M_201	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15																							
11	PIP_M_202	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15	0																						
12	PON_M_201	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15	0	0																					
13	PON_M_202	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0																				
14	SER_L_201	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0																			
15	SER_M_201	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0	0																		
16	SER_M_202	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0																	
17	CON_F_101	0,15	0,15	0,29	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,29	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15																
18	CON_M_101	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0	0,15																
19	CON_M_102	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0	0,15	0															
20	ITA_F_101	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0	0	0,15	0	0													
21	ITA_M_101	0,59	0,59	0,73	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,73	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,73	0,59	0,59	0,59												
22	ITA_M_02	0,15	0,15	0,29	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,29	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,29	0,15	0,15	0,15	0,73											
23	JAP_F_101	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0,59	0,15										
24	JAP_M_101	1,18	1,18	1,33	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18	1,33	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18	1,33	1,18	1,18	1,18	1,18	0,59	1,33	1,18									
25	JAP_M_102	0,29	0,29	0,44	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,44	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,44	0,29	0,29	0,29	0,29	0,88	0,44	0,29	1,48								
26	PIP_M_102	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0,59	0,15	0	1,18	0,29								
27	PON_F_101	0,59	0,59	0,73	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,73	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,73	0,59	0,59	0,59	0,59	0,73	0,59	1,18	0,88	0,59							
28	PON_M_101	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0,59	0,15	0	1,18	0,29	0	0,59						
29	SER_F_101	0,15	0,15	0,29	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,29	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,29	0,15	0,15	0,15	0,73	0,29	0,15	1,33	0,44	0,15	0,73	0,15				
30	SER_M_101	0,88	0,88	1,03	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	1,03	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,73	0,88	0,88	0,88	1,48	1,03	0,88	1,78	1,18	0,88	1,48	0,88	1,03			
31	SER_M_102	0,29	0,29	0,44	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,44	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,44	0,29	0,29	0,29	0,29	0,88	0,44	0,29	1,48	0,59	0,29	0,88	0,29	0,44	0,88		