



Programa de Pós-graduação
em Biodiversidade,
Ambiente e Saúde



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA

CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE CAXIAS - CESC

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE, AMBIENTE E
SAÚDE – PPGBAS**

**CARACTERIZAÇÃO DE INSETOS DA ORDEM EPHEMEROPTERA (INSECTA)
EM TRIBUTÁRIOS DO RIO ITAPECURU ATRAVÉS DE MARCADORES
MITOCONDRIAIS**

CAXIAS-MA

2022

JORDÂNIA LETÍCIA DO NASCIMENTO SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE INSETOS DA ORDEM EPHEMEROPTERA (INSECTA)
EM TRIBUTÁRIOS DO RIO ITAPECURU ATRAVÉS DE MARCADORES
MITOCONDRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Silva de Azevêdo

Coorientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga

CAXIAS - MA

2022

JORDÂNIA LETÍCIA DO NASCIMENTO SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE INSETOS DA ORDEM EPHEMEROPTERA (INSECTA)
EM TRIBUTÁRIOS DO RIO ITAPECURU ATRAVÉS DE MARCADORES
MITOCONDRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Silva de Azevêdo

Coorientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Augusto Silva de Azevêdo (Orientador)
Doutorado em Ciências Biológicas
Universidade Estadual do Maranhão – CESC/UEMA

Profa. Dra. Antônio Suely Guimarães e Silva (Membro)
Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA

Profa. Dra. Maria Claudene Barros (Membro)
Doutorado em Ciências Biológicas
Universidade Estadual do Maranhão – CESC/UEMA

Lucas Ramos Costa Lima (Suplente)
Doutorado em Biologia Animal
Universidade Estadual do Piauí – UESPI Campo Maior/PI

Dedico a minha família que me deu apoio durante esta jornada, em especial a minha mãe Luzia por ser meu exemplo de pessoa e inspiração.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me abençoar muito mais do que mereço!

Ao meu orientador, professor Dr. Carlos Augusto Silva de Azevêdo por toda paciência, compreensão e confiança.

Ao Co-orientador professor Dr. Elmary Fraga pela oportunidade, confiança, orientação e paciência, que me permitiram crescer e vencer os vários desafios encontrados.

À professora Dr. Maria Claudene Barros pelo apoio e orientação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e o Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela concessão da bolsa e ao Programa de Pós - Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde (PPGBAS) pela formação.

A minha família em especial a minha mãe Luzia Félix, meu pai José Ribamar, aos meus irmãos Josevan e Josean, as minhas avós Alzerina e Benta por sempre me incentivar em todas as decisões da minha vida.

Às minhas amigas-irmãs Geysla e Amanda pela amizade sincera e verdadeira que pretendo levar para vida inteira.

Aos meus sobrinhos postigos Maria Alice e Adam que me encheram de amor e alegria fazendo eu voltar a ser criança de novo.

Aos queridos amigos Antônio Luís, Ana Alice Torrês e Eduardo Silva pela amizade.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL), em especial a, Maria Histelle (Amiga HIS), Amanda Caroline, Marcelo Almeida, Bruno, Roseane Oliveira e Andreлина Alves que nas horas que mais precisei estiveram ali me ajudando.

Aos amigos do Laboratório de Entomologia Aquática (LEAq), em especial a Aparecida e Ivirlane.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde (PPGBAS) por contribuírem com meu aprendizado e crescimento acadêmico durante esses anos, ao secretário Jaliade por toda orientação e ajuda.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho minha eterna gratidão. Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Esquema representativo do genoma mitocôndria.	14
---	----

CAPÍTULO 1

Figura 1. Locais de coleta da ordem Ephemeroptera em rios e riachos da Bacia do Itapecuru (Números indicando os locais coletados)	28
--	----

Figura 2. Árvore de inferência Bayesiana baseada nos genes mitocondriais rRNA 16S e COI através do algoritmo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G+I)	33
---	----

Figura 3. Árvore de inferência Bayesiana evidenciando os agrupamentos das OTU's obtidas pelas diferentes abordagens de delimitação de espécies, baseada no gene mitocondrial COI através do algoritmo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G+I)	34
--	----

Figura suplementar 1. Árvore filogenética obtida através do método Máxima verossimilhança (MV) com 1000 réplicas de <i>bootstrap</i> baseada em 1124pb dos genes mitocondriais rRNA 16S e COI através do algoritmo de Tamura-Nei3 parâmetros.....	44
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Localidades e coordenadas da obtenção dos espécimes da Ordem Ephemeroptera obtidos em rios e riachos da Bacia do Itapecuru no Leste-maranhense.....	27
Tabela 2. Espécimes da Ordem Ephemeroptera coletados em rios e riachos da Bacia do Itapecuru, em área de Cerrado do leste Maranhense.....	30
Tabela 3. Médias de divergências genéticas Tamura-Nei3 interespecífica e intraespecífica (diagonal) para espécies da ordem Ephemeroptera para o estado do Maranhão através de pares de bases dos genes rRNA16s e COI.....	32

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. REFERENCIAL TEÓRICO	11
1.1 Aspectos gerais da ordem Ephemeroptera	11
1.2 A Genética Molecular como ferramenta taxonômica: Marcadores mitocondriais	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 1	24
O USO DE MARCADORES MITOCONDRIAIS PARA CARACTERIZAÇÃO E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DA ORDEM EPHEMEROPTERA EM TRIBUTÁRIOS DO RIO ITAPECURU, MARANHÃO	24
Introdução	25
Materiais e métodos.....	26
Área de estudo e Identificação das amostras.....	26
Caracterização Molecular	28
Análises dos Dados.....	29
Resultados.....	30
Discussão.....	34
Conclusão	36
Agradecimentos	36
Referências	36

RESUMO

A ordem Ephemeroptera ocupa quase todos os ambientes aquáticos, e são sensíveis as alterações ambientais, por isso considerados bioindicadores de qualidade de água e ambiental, fazendo parte do grupo dos ETP (Ephemeroptera, Tricoptera e Plecoptera). Apesar da grande importância, a dificuldade ou limitação do avanço da identificação morfológica cria obstáculos ao avanço dos estudos para essa ordem de insetos. Um exemplo são as chaves taxonômicas que geralmente existem apenas para um determinado estágio de vida ou gênero e suas estruturas que são facilmente danificadas ou perdidas, assim ferramentas moleculares como marcadores moleculares mitocondriais vem auxiliando nessa problemática. Diante disso, esse trabalho tem como objetivo caracterizar e delimitar espécies/gêneros da ordem Ephemeroptera em rios e riachos da Bacia do Itapecuru, no Cerrado do Leste Maranhense, utilizando sequências dos genes mitocondriais rRNA 16S e COI. As coletas das ninfas e adultos foram realizadas em trechos de rio e riachos nas delimitações da Bacia Hidrográfica do Rio Itapecuru, posteriormente os espécimes foram identificados usando chaves de identificações específicas para a família Leptophlebiidae. Materiais depositados no Laboratório de Entomologia Aquática do CESC/UEMA, foram submetidas as técnicas moleculares como a Extração de DNA, amplificação dos genes via PCR e sequenciamento. Os produtos do sequenciamento foram submetidos a softwares para realizar as análises filogenéticas, distâncias genéticas e delimitação de espécie para o gene COI. Foram obtidas 122 sequências, sendo 82 para o gene rRNA 16S e 40 para o gene COI, as análises foram realizadas com os dados concatenados, obtendo um fragmento de 1121 pares de bases, correspondendo a 17 gêneros, 26 espécies e cinco famílias, com médias das divergências genéticas intraespecíficas variando de 0 a 0,3% e interespecíficas de 1,20 a 55,30%. Os agrupamentos pelas reconstruções filogenéticas de Máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) apresentaram clados fortemente sustentados, indicando concordância com as espécies atribuídas por identificação morfológica, com exceção de *Hidrosmilodon* sp. e *Hidrosmilodon gilliesae*, que se apresentaram em clados separados. As análises de delimitação de espécies para o gene COI identificaram 17 OTUs para os métodos ABGD, ASAP, PTP e 16 para o GMYC. Novos registros de gêneros/espécie foram confirmados para o Maranhão como *Hagenulopsis*, *Cloeodes*, *Caenis* e *Campylocia anceps*. Gerando uma base de dados genéticos pioneiros para o estado do Maranhão, cuja utilização poderá ter implicações diretas nos estudos taxonômicos e de conservação para a ordem.

Palavras-Chave: Insetos, Genes Mitocondriais, Itapecuru e Maranhão.

ABSTRACT

The order Ephemeroptera occupies almost all aquatic environments, and is sensitive to environmental changes, therefore considered bioindicators of water and environmental quality, being part of the ETP group (Ephemeroptera, Tricoptera and Plecoptera). Despite its great importance, the difficulty or limitation of morphological identification creates obstacles to the advancement of studies for this order of insects. One example is the taxonomic keys that usually exist only for a certain life stage or genus and their structures that are easily damaged or lost. Therefore, this work aims to characterize and delimit species/genera of the order Ephemeroptera in rivers and streams of the Itapecuru basin, in the Cerrado of eastern Maranhão, using sequences of the mitochondrial genes 16S rRNA and COI. The collections of nymphs and adults were made in stretches of river and streams in the boundaries of the Itapecuru River Basin, later the specimens were identified using specific identification keys for the family Leptophlebiidae. Materials deposited in the Laboratory of Aquatic Entomology of CESC/UEMA, were submitted to molecular techniques such as DNA extraction, gene amplification via PCR and sequencing. The sequencing products were submitted to software to perform phylogenetic analysis, genetic distances and species delimitation for the COI gene. A total of 122 sequences were obtained, 82 for the 16S rRNA gene and 40 for the COI gene. The analyses were performed with the concatenated data, obtaining a fragment of 1121 base pairs, corresponding to 17 genera, 26 species and five families, with mean intraspecific and interspecific genetic divergences ranging from 0 to 0.3% and 1.20 to 55.30%. The groupings by Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) phylogenetic reconstructions showed strongly supported clusters, indicating agreement with the species assigned by morphological identification, with the exception of *Hidrosmilodon* sp. and *Hidrosmilodon gillieesae*, which were presented in separate clades. Species delimitation analyses for the COI gene identified 17 OTUs for ABGD, ASAP, PTP methods and 16 for GMYC. New genus/species records were confirmed for Maranhão as *Hagenulopsis*, *Cloeodes*, *Caenis* and *Campylocia anceps*. Generating a pioneer genetic database for the state of Maranhão, whose use may have direct implications on taxonomic and conservation studies for the order.

Keywords: Insects, Mitochondrial Genes, Itapecuru and Maranhão.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Aspectos gerais da ordem Ephemeroptera

A ordem Ephemeroptera, possui para o mundo aproximadamente 3.500 espécies, distribuídas em 450 gêneros e 42 famílias, ocupando quase todos os ambientes de água doce do mundo, exceto a Antártica (BARBER-JAMES et al., 2013; SALLES et al., 2018). No Brasil, são conhecidas atualmente 415 espécies de Ephemeroptera, distribuídas em 84 gêneros e em 10 famílias: Baetidae, Caenidae, Coryphoridae, Ephemeridae, Euthyplociidae, Leptohyphidae, Leptophlebiidae, Melanemerellidae, Oligoneuriidae e Polymitarcyidae (SALLES; BOLDRINI, 2022).

As famílias Baetidae e Leptophlebiidae, são as mais representativas dentro da ordem Ephemeroptera, a primeira representada no Brasil por 133 espécies e 26 gêneros e para o estado do Maranhão 9 gêneros e 14 espécies, e a família Leptophlebiidae atualmente são registradas 127 espécies e 29 gêneros para o Brasil e 15 gêneros e 21 espécies para o estado do Maranhão (SALLES; BOLDRINI, 2022; NASCIMENTO et al., 2020).

Os insetos da ordem Ephemeroptera são hemimetábolos com desenvolvimento indireto (ovo, ninfa, subimago e imago), e estão presentes em ambientes lênticos e lóticos, por possuírem brânquias abdominais que as permitem viver nesse ambiente. Podem ser encontrados em diferentes tipos de locais e substratos, como por exemplo, embaixo de rochas, em tecidos vegetais, enterrados no substrato ou em túneis no fundo de lagos e rios, folhas, raízes, troncos, macrófitas (SALLES et al., 2014b).

Taxonomicamente as ninfas podem apresentar cabeça com três ocelos, olhos compostos laterais ou dorsais, situados à margem posterolateral, em algumas famílias os machos adultos apresentam olhos compostos turbinados e divididos em duas porções, dorsal e lateral. Peças bucais do tipo mastigadoras do tipo hipognato ou prógnato. O tórax possui três segmentos bem distintos (pró, meso e metatórax), na parte posterior do meso e metanoto apresentam as tecas alares, visíveis principalmente nas ninfas maduras. As pernas possuem uma única garra tarsal, com denticulos distribuídos de forma variável. O abdômen apresenta 10 segmentos, podendo apresentar projeções ou espinhos posterolaterais (em alguns grupos podem estar direcionados dorsalmente). Possuem brânquias abdominais presentes nos segmentos I-VII, geralmente um par por segmento, e de formas variadas (em alguns táxons o segundo par de brânquias é mais desenvolvido, cobrindo e protegendo as demais). A maioria das espécies possui um par de cercos laterais e um filamento mediano e em algumas espécies esse filamento mediano pode ser reduzido ou ausente (DOMÍNGUEZ et al., 2006, SALLES et al., 2014b).

Os adultos apresentam uma cabeça triangular a retangular, olhos compostos bem desenvolvidos, especialmente nos machos, presença de três ocelos. Antena curta, setácea, geralmente tão longa ou mais curta que a largura da cabeça, aparelho bucal atrofiado, com peças bucais vestigiais; tórax bem desenvolvido, pernas bem desenvolvidas, especialmente as anteriores dos machos, as quais podem ter comprimento igual ou maior que o corpo. Garras duplas e de formato variado, muitas vezes dissimilares, com um dos lados pontiagudo e o outro arredondado, asas membranosas, direcionadas para cima, em geral iridescentes ou por vezes apresentando um padrão de coloração distinto. Asas anteriores bem desenvolvidas, triangulares ou alongadas e asas posteriores reduzidas ou ausentes, nunca maior que da asa anterior. Abdômen com onze segmentos, sendo o último vestigial e podem apresentar estruturas acessórias para fixação no substrato (DOMÍNGUEZ et al., 2006; SALLES et al., 2014b).

Os Ephemeropteros são importantes por sua abundância e pelo papel que desempenham nas cadeias tróficas dos ecossistemas aquáticos, são fundamentais na ciclagem de nutrientes, servem como fonte de alimento para peixes, anfíbios, aves e invertebrados (BISPO et al., 2006). Além disso, são sensíveis à poluição, e por isso utilizados na avaliação de impactos ambientais e em programas de biomonitoramento da qualidade dos recursos hídricos (DA-SILVA; SALLES, 2012; SHIMANO; JÜEN, 2016; SHIMANO et al., 2018)

As ninfas possuem um longo período de duração que pode chegar até dois anos, em contraste com a sua forma adulta que pode ser de algumas horas até dois dias (SALLES, 2006). Podem apresentar peças bucais diferentes e especializadas, o que lhes garante uma alimentação diferenciada e são classificadas em vários grupos funcionais tróficos, como coletores, filtradores, raspadores, fragmentadores e predadores. Sendo assim um elo importante dentro da cadeia alimentar aquática como um consumidor primário de algas e perifíton (HAMADA et al., 2014; RAMÍREZ et al., 2014).

Os adultos se restringem basicamente ao processo reprodutivo, onde após a sua emergência produzem revoadas de acasalamento no ambiente aquático, onde após a desova geralmente morrem, ou servem de alimento para pássaros e outros organismos. Outros aspectos a ser destacado refere-se à existência de um estágio denominado de subimago, que representa um estágio intermediário entre a ninfa e o adulto, possuindo uma coloração opaca, leitosa ou escuras nas asas e geralmente ciliadas (DOMÍNGUEZ et al., 2006; SALLES et al., 2014b).

Entretanto, um dos problemas que dificulta o avanço dos estudos de muitas espécies de invertebrados aquáticos e para a ordem em estudo é a identificação morfológica. Uma vez que, as chaves taxonômicas geralmente existem para apenas para um determinado estágio de vida ou gênero, que geralmente contempla apenas a fase adulta. Assim, atribuir nomes para algumas

espécies geralmente é difícil, principalmente em estudos em que os imaturos/ninfas compõem uma grande proporção da amostra, assim como a maioria das estruturas morfológicas, como brânquias, pernas e filamentos caudais, pode ser facilmente danificada e perdida, principalmente em efemérides (Ephemeroptera) (BALL et al., 2005; WEBB et al., 2012). Soma-se ainda a necessidade de anos de experiência dos pesquisadores para que possam usar de forma efetiva as chaves taxonômicas disponíveis e pôr fim a variação fenotípica de características taxonômicas importantes que pode representar um desafio significativo durante a identificação das espécies (BALL et al., 2005; WEBB et al., 2012), assim novas ferramentas torna-se necessárias para auxiliar no processo de identificação e no conhecimento desta diversidade como a genética molecular.

Apesar do número de estudos estar aumentando no Brasil, algumas regiões como o nordeste brasileiro, ainda existem poucos estudos (SHIMANO et al., 2013), e muitas espécies ainda são desconhecidas pela ciência (CARDOSO et al., 2015). Além disso, o Nordeste brasileiro vem sofrendo cada vez mais impactos provenientes de atividades antrópicas sobre seus recursos naturais e aquáticos, sendo uma das principais causas de degradação ambiental (SILVA et al. 2018), dentre estes o bioma Cerrado considerado um dos “*hotspots*” para a conservação da biodiversidade mundial (KLINK; MACHADO, 2005).

Essas alterações ambientais e antrópicas, também tem sido observada em ambientes aquáticos, onde vários organismos são afetados, principalmente os mais sensíveis como é o caso dos efemerópteros (FEITOSA; ALMEIDA, 2002; DOMÍNGUEZ et al., 2006; SILVA, et al., 2016; BARBOSA et al., 2020). Dentre os ambientes aquáticos, vale destacar que o estado do Maranhão possui uma rica rede de bacias hidrográficas, porém, a maioria desses locais vem apresentando diversas alterações antrópicas (queimadas, assoreamento, desmatamento da mata ciliar, lançamento de resíduos sólidos e líquidos em afluentes, uso inadequado do solo, entre outros) (BARROSO; SOUSA, 2007), inclusive a Bacia do Rio Itapecuru (SILVA; CONCEIÇÃO et al., 2011) Como consequência várias espécies estão sendo perdidas mesmo antes de serem conhecidas pela ciência (CARDOSO et al., 2015), assim torna-se necessário esse conhecimento no que se refere a biodiversidade e a utilização de novas ferramentas que possam auxiliam nessa com é o caso da genética molecular.

1.2 A Genética Molecular como ferramenta taxonômica: Marcadores mitocondriais

O DNA mitocondrial (Figura 1) funciona como um marcador microevolutivo em nível intraespecífico, e pode ser utilizado para gerar filogenias, para verificar o grau de diversidade genética das espécies, possibilitando estimar a variabilidade genética entre as populações

1996), onde este marcador tem sido sugerido como um dos genes utilizados como DNA Barcode (VENCES et al., 2005).

Atualmente, existem algumas bibliotecas de códigos de barras (COI) de Ephemeroptera disponíveis com um grande número de táxons em diversas regiões geográficas, como América do Norte (BALL et al., 2005; WEBB et al., 2012), Alemanha (MORINIÈRE et al., 2017), região mediterrânea (CARDONI et al., 2015; GATTOLLIAT et al., 2015), Canadá (ZHOU et al., 2009, 2010), Bolívia (MOLINA et al., 2017), Índia (SELVAKUMAR et al., 2016), Dinamarca (KJAERSTAD et al., 2012), Leste asiático do Japão e Taiwan (WAKIMURA et al., 2016) e Coréia do Sul (SUH et al., 2019), no Brasil apenas alguns trabalhos com algumas famílias e gêneros tem sido realizado para esta ordem (SALLES et al., 2014a; SALLES et al., 2016; DIAS et al., 2019; MORJARDIM et al., 2020; SALLES et al., 2020).

Alguns trabalhos de filogenia com algumas famílias, gêneros também vêm sendo realizado para esta ordem, a partir do gene rRNA 16S, COI ou em combinação com outros genes (nucleares ou mitocondriais), Odgen et al. (2005), em seu trabalho analisou a filogenia das espécies da ordem Ephemeroptera através dos genes nuclear (18S e 28S), mitocondriais (16S e 12S) e proteína Histona (H3).

Para a família Baetidae, Monaghan et al. (2005) analisaram as origens transoceânicas e endêmicas de espécies da família Baetidae de Madagascar através dos genes 16S, 12S e nuclear 18S, Gattolliat; Monaghan (2010) analisou através de genes mitocondriais e nuclear (COI, 16S, 12S e nuclear 18S) espécies do gênero *Adnoptilum* do Madagascar; Pereira-da-Conceição et al. (2012) através dos genes (COI e 16S) avaliaram linhagens distintas de *Baetis harrisoni* na África do Sul; Rutschmann et al. (2014) utilizando os genes (COI e 16S) avalizaram a diversidade genética das espécies *Baetis* e *Cloeon* (Baetidae) nas Ilhas Canárias e Madeira, Salles et al. (2014a) através do gene COI analisaram as relações entre as espécies do gênero *Cloeon* da América do Sul; Ossa-López et al. (2017), com genes COI e 16S estimou a divergência entre os espécimes do complexo *Andesiops peruvianus* da Colômbia e Taylor et al. (2020) através do gene (COI e 16S) investigou a diversidade genética de três espécies de Ephemeroptera (*Afroptilum sudafricanum*, *Demoreptus natalensis* e *Demoreptus capensis*) na África do Sul.

Para Caenidae, Cai et al. (2018), sequenciou o genoma mitocondrial para o gênero *Caenis* sp. na China, já para Leptophlebiidae, Salles et al. (2016) analisou através do gene COI espécies do complexo *Hermanella* de Roraima (Brasil), Morjardim et al. (2020) analisou as relações filogenéticas entre as espécies da família na região neotropical, utilizando o gene mitocondrial COI e nuclear 28S, Salles et al. (2020) através dos genes (COI e 16S) descreveu

uma nova espécie (*Diamantina ulmeri*) para o Parque Nacional da Chapada Diamantina (Brasil) comparando estas com as espécies de *Ulmeritus* e *Ulmeritoides* da subfamília Atalophlebiinae para saber as relações entre estas espécies; Para a família Euthyplociidae, Gonçalves et al. (2017) analisou através do gene COI, espécies do gênero *Campylocia* da América do Sul. Miller et al. (2018) estimou as relações filogenéticas entre sete famílias Behningiidae, Ephemeridae, Euthyplociidae, Ichthybotidae, Palingeniidae, Polymitarcidae, Potamanthidae, através dos genes mitocondriais 12S, 16S e nuclear 18S e 28S.

Para a família Leptohyphidae, Dias et al. (2019) em seu trabalho faz uma análise filogenética entre as espécies do gênero *Tricorythodes* da América Sul, utilizando os genes mitocondriais (COI e 16S) e nuclear 18S. Entretanto, nenhum trabalho tem sido realizado para a ordem Ephemeroptera para o Brasil, como para o Maranhão, neste sentido, estudos genéticos são fundamentais e poderão proporcionar um importante conhecimento sobre a ordem Ephemeroptera que ainda são poucos explorados.

Além disso, complexos de espécies vêm sendo relatados para a ordem Ephemeroptera, para algumas famílias (PEREIRA-DA-CONCEICOA et al., 2012; RUTSCHMANN et al., 2014; SALLES et al., 2016; OSSA-LÓPEZ et al., 2017; DIAS et al., 2019 e SALLES et al., 2020), diante disso, este trabalho possibilitará entender as relações filogenéticas e os possíveis complexos entre as espécies da ordem.

Além das ferramentas moleculares, novas técnicas vem sendo empregadas para a identificação de OTUs (Unidades Taxonômicas Moleculares Operacionais), auxiliando na identificação e delimitação de famílias, gêneros ou espécies, dentre os modelos que incluem ferramentas bioestatísticas e algorítmicas, o *Generalized Mixed Yule Coalescent approach* (GMYC), proposto por Fujisawa; Barraclough (2013), baseia-se no tempo para identificar o ponto de transição entre os processos de ramificação específica e coalescente em árvores ultramétricas, que apresentam múltiplas espécies e dados derivados de um único locus, exigindo apenas uma árvore filogenética de entrada. O modelo *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) proposto por Puillandre et al. (2012) que visa encontrar automaticamente a distância onde os *barcode gaps* estão localizados e o *Poisson Tree Process* (PTP) utiliza o número de substituições de nucleotídeos ao invés de buscar o ponto de transição das derivações, tendo como premissa que as substituições intraespecíficas sejam significativamente maiores que as interespecíficas, descrito por Zhang et al. (2013). O *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP) proposto por Puillandre et al. (2021), utiliza particionamento automático, a partir de alinhamentos de sequências de locus únicos, mesclando essas informações até formarem um único grupo. A utilização destes métodos irá auxiliar ainda mais na delimitação

das espécies de Ephemeroptera do Maranhão, permitindo entender as relações e identificação do OTUs presentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar e delimitar espécies/gêneros da ordem Ephemeroptera em rios e riachos da Bacia do Itapecuru, no Cerrado do Leste Maranhense, utilizando sequências dos genes mitocondriais rRNA 16S e COI.

2.2 Específicos

- ✓ Identificar e caracterizar as espécies da ordem Ephemeroptera, utilizando sequências dos genes mitocondriais rRNA 16S e COI;
- ✓ Determinar os índices de divergência genética entre as espécies da ordem Ephemeroptera a partir de sequências dos genes mitocondriais;
- ✓ Delimitar espécies da ordem Ephemeroptera através de sequências do gene mitocondrial COI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVISE, J. C. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Georgia: University of Georgia, **Sinauer Associates**, 2004.
- BALL, S. L.; HEBERT, P. D. N.; BURIAN, S. K.; WEBB, J. M. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 24, p. 508–524, 2005.
- BARBER-JAMES, H.; SARTORI, M.; GATTOLLIAT, J.L.; WEBB, J. World checklist of freshwater Ephemeroptera species, 2013. Disponível em: <http://fada.biodiversity.be/group/show/35>. Acessado em: [10/06/2022].
- BARBOSA, D. A.; BRASIL, L. S.; AZÊVEDO, C. A. S.; LIMA, L. R. C. The role of spatial and environmental variables in shaping aquatic insect assemblages in two protected areas in the transition area between Cerrado and Amazônia. **Biota Neotropica**, v. 20, n.3, 2020.
- BARROSO, H. G.; SOUSA, A. P. Áreas potenciais para aquicultura sustentável na bacia do Rio Itapecuru: Bases para o planejamento com uso do Sistema de Informação Geográfica. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 2, n.1, 2007.
- BISPO, P. C. E; CRISCI-BISPO, V. L. Ephemeroptera, In: COSTA, C.; IDE S.; SIMONKA, E. Org. **Insetos imaturos: metamorfose e identificação**. Ribeirão Preto, Holos p. 55-59. 2006.
- CAI, Y-Y; GAO, Y-J; ZHANG, L-; YU, D-N; STOREY, K. B.; ZHANG, J-Y. The mitochondrial genome of *Caenis* sp. (Ephemeroptera: Caenidae) and the phylogeny of Ephemeroptera in Pterygota, **Mitochondrial DNA Part B**, v.3, n.2, p. 577-579, 2018.
- CARDONI, S.; TENCHINI, R.; FICULLE, I.; PIREDDA, R.; SIMEONE, M. C., BELFIORE, C. DNA barcode assessment of Mediterranean mayflies (Ephemeroptera), benchmark data for a regional reference library for rapid biomonitoring of freshwaters. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.62, p.36–50, 2015.
- CARDOSO, M. N.; SHIMANO, Y.; NABOUT, J. C.; JUEN, L. An estimate of the potential number of mayfly species (Ephemeroptera, Insecta) still to be described in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, 2015.
- DA-SILVA, E.R.; SALLES, F.F. Ephemeroptera. In RAFAEL, J.A.; MELO, G.A.R.; CARVALHO, C.J.B.; CASARI, S.A.; CONSTANTINO, R. (eds.), **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. Holos, Ribeirão Preto, 2012.
- DIAS, L. G.; MOLINERI, C.; TAKIYA, D.; BENAVIDES, P.; BACCA, T. Phylogeny of *Tricorythodes* Ulmer (Leptohyphidae: Ephemeroptera) based on molecular and morphological evidence. **Zoologischer Anzeiger**.v.278, p. 38-45, 2018.
- DOMÍNGUEZ, E.; MOLINERI, C.; PESCADOR, M. L.; HUBBARD, M. D.; NIETO, C. **Ephemeroptera of South America**. In: Aquatic Biodiversity of Latin America. ADIS, J.; ARIAS, J. R.; RUEDA-DELGADO, G.; WANTZEN, K. M. (Eds). Pensoft, Moscow – Sofia. 2, p. 1-646, 2006.

- FEITOSA, A. C.; ALMEIDA, E. P. A degradação ambiental do rio Itapecuru na sede do município de Codó - MA. **Cadernos de Pesquisas**, São Luís, v. 13, n. 1, p. 31-45, 2002.
- FUJISAWA, T; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets, **Systematic Biology**, v. 62, p. 707-724, 2013.
- GATTOLLIAT, J. L.; CAVALLO, E.; VUATAZ, L.; SARTORI, M. DNA barcoding of Corsican mayflies (Ephemeroptera) with implications on biogeography, systematics and biodiversity. **Arthropod Systematics & Phylogeny**, v.73, n.1, p. 3–18, 2015.
- GATTOLLIAT, J. L.; MONAGHAN, M. T. DNA-based association of adults and larvae in Baetidae (Ephemeroptera) with the description of a new genus *Adnoptilum* in Madagascar. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 29, n. 3, p.1042–1057, 2010.
- GONÇALVES, I. C.; TAKIYA, D. M.; SALLES, F. F.; PETERS, J. G.; NESSIMIAN, J. L. Integrative taxonomic revision of *Campylocia* (mayflies: Ephemeroptera, Euthyplociidae). **Systematics and Biodiversity**, p. 1-18, 2017.
- HAMADA, N.; NESSIMIAN, J. L.; QUERINO, R. B. **Insetos Aquáticos na Amazônia Brasileira: Taxonomia, Biologia e Ecologia**, 1. ed. Manaus: INPA, 2014.
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B**, v. 270, p. 596–599. 51, 2003.
- HEBERT, P.D.N.; DEWAARD, J.R.; LANDRY, J-F. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. **Biology Letters**, n.6, p. 359–362, 2010.
- KJAERSTAD, G.; WEBB, J.M.; EKREM, T. A review of the Ephemeroptera of Finnmark – DNA barcodes identify Holarctic relations. **Norwegian Journal of Entomology**, n. 59, p. 182–195, 2012.
- KLINK, C. A.; MACHADO R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, n. 1, v. 1, 2005.
- LIMA, L.R.C.; MARIANO, R.; PINHEIRO, U. New species for *Thraulodes* Ulmer, 1920 (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae) and the first key to adults from Brazil. **Zootaxa**, v.3709, n. 3, p. 230–242, 2013.
- MILLER, D. B.; BARTLETT, S.; SARTORI, M.; BREINHOLT, J. W.; OGDEN, T. H. Anchored phylogenomics of burrowing mayflies (Ephemeroptera) and the evolution of tusks. **Systematic Entomology**, 2018.
- MOLINA, C. I.; GIBON, F-M; DOMINGUEZ, E.; PAPE, T.; RØNSTED, N. Associating immatures and adults of aquatic insects using DNA barcoding in high Andean streams. **Ecología en Bolivia**, v. 52, n.2, p. 88-99, 2017.
- MONAGHAN, M.T.; GATTOLLIAT, J.-L.; SARTORI, M.; ELOUARD, J.-M.; JAMES, H.; DERLETH, P.; VOGLER, A.P. Trans-oceanic and endemic origins of the small minnow mayflies (Ephemeroptera, Baetidae) of Madagascar. **Proceedings. Biological sciences** v. 272, n.1574, p.1829-36, 2005.

MONJARDIM, M.; PARESQUE, R.; SALLES, F. F. Phylogeny and classification of Leptophlebiidae (Ephemeroptera) with an emphasis on Neotropical fauna. **Systematic Entomology**, n.45, p. 415–429, 2020.

MORINIÈRE, J.; HENDRICH, L.; BALKE, M.; BEERMANN, A.J.; KÖNIG, T.; HESS, M.; KOCH, S.; MÜLLER, R.; FLORIAN, L.; HEBERT, P. D.N.; HAUSMANN, A.; SCHUBART, C. D.; HASZPRUNAR, G. A DNA barcode library for Germany's mayflies, stoneflies and caddisflies (Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera). **Molecular Ecology Resources**, n.17, p.1293–1307, 2017.

NASCIMENTO, S. R. S.; LIMA, L. R. C.; AZEVÊDO, C. A. S. A new species of *Traverella* Edmunds, 1948 (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) from Brazil. **Zootaxa**, v. 4619, n. 1, p. 195–199, 2019.

NASCIMENTO, S. R. S.; LIMA, L. R. C.; AZÊVEDO, C.A.S. Description of the nymph of *Thraulodes sternimaculatus* Lima, Mariano & Pinheiro, 2013 (Leptophlebiidae: Ephemeroptera) from Northeastern Region of Brazil. **Zootaxa**, n.4683, v. 2 p. 286–290, 2019a.

NASCIMENTO, S. R. S.; LIMA, L.R. C., AZEVÊDO, C. A. S. Leptophlebiidae Banks, 1900 (Insecta, Ephemeroptera) from Maranhão state, Brazil. **Check List**, n.16, v.3, p. 579–591, 2020.

NASCIMENTO, S.R. S.; LIMA, L. R. C.; AZÊVEDO, C. A. S. A new species of *Traverella* Edmunds, 1948 (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) from Brazil. **Zootaxa**, n. 4619, v.1, p. 195–199. 2019b.

OGDEN, T. H.; WHITING, M. F. Phylogeny of Ephemeroptera (mayflies) based on molecular evidence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.37, p.625–643, 2005.

OSSA-LÓPEZ, P. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; RIVERA-PÁEZ, F. A. *Andesiops peruvianus* (Ephemeroptera: Baetidae): a species complex based on molecular markers and morphology. **Hydrobiologia**, v.805, n. 1, p. 351–364, 2017.

PALUMBI, S.R. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: HILLIS, D., MORITZ, C., MABLE, B. (Eds.), **Molecular Systematics**. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA, 1996.

PEREIRA-DA-CONCEICAO, L.L.; PRICE, B.W.; BARBER-JAMES, H.M.; BARKER, N.P.; DE MOOR, F.C.; VILLET, M.H. Cryptic variation in an ecological indicator organism: mitochondrial and nuclear DNA sequence data confirm distinct lineages of *Baetis harrisoni* Barnard (Ephemeroptera: Baetidae) in southern Africa. **BMC Evolution Biology**, v.12, n. 26, 2012.

PULLANDRE, N., BROUILLET, S., ACHAZ, G. 2021. ASAP: Assemble Species by Automatic Partitioning. **Recursos de Ecología Molecular**, p. 609–620, 2021.

PULLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 1864–1877, 2012.

RAMÍREZ, A.; GUTIÉRREZ-FONSECA, P. E. Functional feeding groups of aquatic insect families in Latin America: a critical analysis and review of existing literature. **Revista de Biología Tropical**, v. 62, p. 155-167, 2014.

RUTSCHMANN, S.; GATTOLLIAT, J.-L.; HUGHES, S. J.; BÁEZ, M.; SARTORI, M.; MONAGHAN, M. T. Evolution and island endemism of morphologically cryptic *Baetis* and *Cloeon* species (Ephemeroptera, Baetidae) on the Canary Islands and Madeira. **Freshwater Biology**, v.59, n.12, p. 2516–2527, 2014.

SALLES F.F.; GATTOLLIAT, J.-L.; ANGELI, K.B.; DE-SOUZA, M.R.; GONÇALVES, I.C.; NESSIMIAN, J.L.; SARTORI, M. Discovery of an alien species of mayfly in South America (Ephemeroptera). **ZooKeys**, v. 399, p. 1–16, 2014a.

SALLES, F. F.; DOMÍNGUEZ, E. Systematics and Phylogeny of Ulmeritus-Ulmeritoides revisited (Ephemeroptera: Leptophlebiidae). **Zootaxa**, n. 3571, p. 49-65, 2012.

SALLES, F. F.; DOMÍNGUEZ, E.; MARIANO, R.; PARESQUE, R. The imagos of some enigmatic members of the Hermanella complex (Ephemeroptera, Leptophlebiidae). **ZooKeys**, n. 625, p. 45–66, 2016.

SALLES, F. F.; NASCIMENTO, J. M. C.; CRUZ, P. V.; BOLDRINI, R.; BELMONT, E. L. L. **Ordem Ephemeroptera**. In: HAMADA, N.; NESSIMIAN, J. L.; QUERINO, R. B. (2014). Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia. (Editora do INPA: Manaus, Brazil), 2014b.

SALLES, F. F.; NASCIMENTO, J. M. C.; MONJARDIM, M.; PARESQUE, R.; HAMADA, N.; DOMINGUEZ, E. Diamantina: an endemic new genus of Neotropical Atalophlebiinae (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) evidenced by morphological and molecular data. **Zoologischer Anzeiger**, v. 284, p. 30-42, 2020.

SALLES, F.F.; BOLDRINI, R., 2022. **Ephemeroptera in catálogo taxonômico da fauna do Brasil**. PNUD. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/14756>. Acessado em: [10/06/2022].

SALLES, F.F.; DOMÍNGUEZ, E.; MOLINERI, C.; BOLDRINI, R.; NIETO, C.; DIAS, L.C. Order Ephemeroptera. In: HAMADA, N., THORP, J.H., ROGERS, D.C. (Eds). **Keys to Neotropical Hexapoda. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates**. Fourth edition. Academic Press, London, p.61-117, 2018.

SELVAKUMAR, C.; SIVARAMAKRISHNAN, K. G.; JANARTHANAN, S. DNA barcoding of mayflies (Insecta: Ephemeroptera) from South India. **Mitochondrial DNA Part B**, n.1, v.1, p.651-655, 2016.

SHIMANO, Y., CARDOSO, M., JUEN, L. Ecological studies of mayflies (Insecta, Ephemeroptera): Can sampling effort be reduced without losing essential taxonomic and ecological information? **Acta Amazonica**, v.48, n.2, p.137–145, 2018.

SHIMANO, Y.; JUEN, L. How oil palm cultivation is affecting mayfly assemblages in Amazon streams. **Annales de Limnologie - International Journal of Limnology**, v.52, p. 35–45, 2016.

SHIMANO, Y.; SALLES, F. F.; JUEN, L. Study of the mayfly order Ephemeroptera (Insecta) in Brazil: a scientiometric review. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 57, n.4, p. 359–364, 2013.

- SILVA, J. L. C.; VIDAL, C. A. S.; BARROS, L. M.; FREITA, F. R. V. Aspectos da degradação ambiental no Nordeste do Brasil. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**. Florianópolis, v. 7, n. 2, p. 180-191, 2018.
- SILVA, K. K. Q.; SIQUEIRA, L. C. N.; VERAS-DOS-SANTOS, D. S.; AZÊVEDO, C. A. S. Avaliação da qualidade ambiental do riacho Lamego pela razão EPT/Chironomidae e teste microbiológico, **Cadernos Cajuína**, v. 1, n. 3, p.15 – 23, 2016.
- STOECKLE, M.; WAGGONER, P.E.; AUSUBEL, J.H. **Barcoding life**, illustrated. Goals, rationale, disponível em (www.barcoding.si.edu), 2005.
- SUH, K. I.; HWANG, J. M.; BAE, Y. J.; KANG, J. H. Comprehensive DNA barcodes for species identification and discovery of cryptic diversity in mayfly larvae from South Korea: Implications for freshwater ecosystem biomonitoring. **Entomological Research**, n.49, p.46–54, 2019.
- TAYLOR, C.L.; BARKER, N.P.; BARBER-JAMES, H.M.; VILLET, M.H.; PEREIRA-DA-CONCEICOA, L.L. Habitat requirements affect genetic variation in three species of mayfly (Ephemeroptera, Baetidae) from South Africa. **ZooKeys**, v. 936, p.1–24, 2020.
- TRAYER, J.R. Mayflies uruguaia. Família Leptophlebiidae: Parte I. **Revista de la Sociedad Uruguay de Entomología**, v. 3, p. 1–13, 1959.
- VENCES, M.; THOMAS, M.; VAN DER MEIJDEN, A.; CHIARI, Y.; VIEITES, D. R. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in zoology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2005.
- WAKIMURA, K.; TAKEMON, Y.; TAKAYANAGI, A.; ISHIWATA, S.-I; WATANABE, K.; TANIDA, K.; SHIMIZU, N.; KATO, M. Characterization of genes for histone H3, 18S rRNA, and cytochrome oxidase subunit I of East Asian mayflies (Ephemeroptera). **DNA Barcodes**, n. 4, p. 1–25, 2016.
- WEBB, J.M.; JACOBUS, L.M.; FUNK, D.H.; ZHOU, X.; KONDRATIEFF, B.; GERACI, C.J.; DEWALT, R.E.; BAIRD, D.; RICHARD, B.; PHILLIPS, I.; HEBERT, P.D.N. A DNA Barcode Library for North American Ephemeroptera: Progress and Prospects. **PLoS ONE**, v.17, n. 5, 2012.
- ZHANG, J.; KAPLI, P.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2869–2876, 2013.
- ZHOU, X.; ADAMOWICZ, S.J.; JACOBUS, L.M.; DEWALT, R. E.; HEBERT, P. D.N. Towards a comprehensive barcode library for arctic life - Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera of Churchill, Manitoba, Canada. **Frontiers in Zoology**, n. 6, p.30, 2009.
- ZHOU, X.; ADAMOWICZ, S.J.; JACOBUS, L.M.; DEWALT, R. E.; HEBERT, P. D.N. Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera fauna of Churchill (Manitoba, Canada): insights into biodiversity patterns from DNA barcoding. **Journal of the North American Benthological Society**, n. 29, p.814–837, 2010.

ZHOU, X.; KJER K.M.; MORSE, J.C. Associating larvae and adults of Chinese Hydropsychidae caddisflies (Insecta:Trichoptera) using DNA sequences. **Journal of the North American Benthological Society**, n. 26, p. 719–742, 2007.

CAPÍTULO 1

O USO DE MARCADORES MITOCONDRIAIS PARA CARACTERIZAÇÃO E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DA ORDEM EPHEMEROPTERA EM TRIBUTÁRIOS DO RIO ITAPECURU, MARANHÃO

A ser submetido à Systematic Entomology



O USO DE MARCADORES MITOCONDRIAIS PARA CARACTERIZAÇÃO E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DA ORDEM EPHEMEROPTERA EM TRIBUTÁRIOS DO RIO ITAPECURU, MARANHÃO

JORDÂNIA L.N., SILVA^{1*}, STÊNIO R. S., NASCIMENTO², MARIA C., BARROS¹,
ELMARY C., FRAGA¹, CARLOS A. S. AZEVÊDO¹

¹ Programa de Pós Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde (PPGBAS) do CESC/UEMA, Caxias/MA, Brasil.

² Programa de Pós Graduação em Entomologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

***Correspondente:** JORDÂNIA L.N., SILVA, Programa de Pós Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde (PPGBAS) do CESC/UEMA, Caxias/MA, Brasil. Silva. E_mail: danialeticia07@hotmail.com.

Resumo

Neste estudo foram obtidas 122 sequências, sendo 82 para o gene rRNA 16S e 40 para o gene COI, as análises foram realizadas com os dados concatenados, obtendo um fragmento de 1121 pares de bases, correspondendo a 17 gêneros e 26 espécies e cinco famílias da ordem Ephemeroptera, com médias de divergências genéticas intraespecíficas variando de 0 a 0,3% e interespecíficas de 1,20 a 55,30%. Os agrupamentos pelas reconstruções filogenéticas apresentaram clados fortemente sustentados, indicando concordância com as espécies atribuídas por identificação morfológica, com exceção de *Hidrosmilodon* sp. e *Hidrosmilodon gilliesae*, que se apresentaram em clados separados. As análises de delimitação de espécies para o gene COI identificaram 17 OTUs para os métodos ABGD, ASAP, PTP e 16 para o GMYC. Novos registros de gêneros/espécie foram confirmados para o Maranhão como *Hagenulopsis*, *Cloeodes*, *Caenis* e *Campylocia anceps*. Uma base de dados genéticos pioneiros foi gerada para o estado do Maranhão, cuja utilização poderá ter implicações diretas nos estudos taxonômicos e de conservação para a ordem.

Introdução

A ordem Ephemeroptera ocupa quase todos os ambientes de água doce do mundo, exceto a Antártica (Salles, 2012), muitas espécies dependem de condições ambientais específicas e são altamente sensíveis as modificações do ambiente (Shimano *et al.*, 2018), em virtude dessas características são muito utilizadas como bioindicador de qualidade ambiental (Shimano & Juen, 2016). Atualmente para o mundo a ordem é composta por aproximadamente 3.500 espécies, distribuídas em 450 gêneros e 42 famílias (Salles *et al.*, 2018). No Brasil, são conhecidas atualmente 415 espécies de Ephemeroptera, descritas em 84 gêneros e 10 famílias (Baetidae, Caenidae, Coryphoridae, Ephemeridae, Euthyplociidae, Leptohyphidae, Leptophlebiidae, Melanemerellidae, Oligoneuriidae e Polymitarcyidae) (Salles & Boldrini, 2022).

Apesar do número de estudos estar aumentando no Brasil para a ordem, algumas regiões como a região do nordeste brasileiro ainda existem poucos estudos (Shimano *et al.*, 2013), e muitas espécies ainda são desconhecidas pela ciência (Cardoso *et al.*, 2015). Outro problema que dificulta o avanço dos estudos de muitas espécies de invertebrados aquáticos inclusive para

a ordem Ephemeroptera refere-se a identificação morfológica, uma vez que, as chaves taxonômicas geralmente existem apenas para um determinado estágio de vida ou gênero, além disso a identificação, em estudos aquáticos os imaturos compõem uma grande proporção das amostras, é difícil, visto que na sua maioria as estruturas morfológicas, pode ser facilmente danificadas ou perdidas durante a coleta, no transporte ou na identificação (Ephemeroptera) (Ball *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2012). Em virtude desse cenário, novas ferramentas são necessárias para auxiliar nessa identificação, tornando o sistema mais ágil e seguro, e possibilitando uma contribuição direta para se conhecer a real biodiversidade existente, uma vez que projeções apontam que muitas espécies ainda precisam ser descritas (Cardoso *et al.*, 2015).

Uma ferramenta que vem ganhando destaque nesse sentido é a utilização da genética molecular através do uso do DNA mitocondrial, cujos resultados têm se mostrado muito eficientes (Avise, 2004). Os marcadores mitocondriais citocromo C oxidase 1 (COI) (*DNA Barcoding*) (Hebert *et al.*, 2003) e o gene rRNA 16S que faz parte da grande subunidade ribossomal do DNA mitocondrial (Palumbi, 1996), têm sido usados para gerar filogenias, identificar espécies, e para verificar o grau de diversidade genética das espécies e estimar a variabilidade genética entre populações. O que torna um importante instrumento para o estudo dessa ordem.

Para Ephemeroptera, atualmente, existem algumas bibliotecas de códigos de barras disponíveis em diversas regiões geográficas (Ball *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2012; Morinière *et al.*, 2017; Cardoni *et al.* 2015; Gattolliat *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2009, 2010; Molina *et al.*, 2017; Selvakumar *et al.*, 2016; Kjaerstad *et al.*, 2012; Wakimura *et al.*, 2016; Suh *et al.*, 2019). Além de alguns trabalhos de filogenia e de complexos de algumas famílias e gêneros a partir do gene rRNA 16S, COI ou em combinação com outros genes (nucleares ou mitocondriais) como Odgen *et al.* (2005), já para famílias e espécies alguns trabalhos também tem sido realizados, como para família Baetidae (Monaghan *et al.*, 2005; Gattolliat *et al.*, 2010; Pereira-da-Conceição *et al.*, 2012; Rutschmann *et al.*, 2014; Salles *et al.*, 2014a; Ossa-López *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2020), Caenidae, (Cai *et al.*, 2018), Leptophlebiidae (Salles *et al.*, 2016; Morjardim *et al.*, 2020; Salles *et al.*, 2020), Euthyplociidae, (Miller *et al.*, 2018) e Leptohyphidae (Dias *et al.*, 2019).

Entretanto para o Brasil e Nordeste, assim como já demonstrado (Shimano *et al.*, 2013) existem poucos trabalhos, inclusive genéticos, sendo alguns voltados apenas para algumas famílias e gêneros desta ordem (Salles *et al.*, 2014a; Salles *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2019; Morjardim *et al.*, 2020; Salles *et al.*, 2020).

Diante disso, este trabalho objetiva-se caracterizar e delimitar espécies/gêneros da ordem Ephemeroptera em rios e riachos da Bacia do Itapecuru, no Cerrado do Leste Maranhense, utilizando sequências dos genes mitocondriais rRNA 16S e COI.

Materiais e métodos

Área de estudo e Identificação das amostras

As coletas foram realizadas em localidades distintos inseridos nas delimitações da Bacia Hidrográfica do Rio Itapecuru, situada na parte Centro-leste do estado do Maranhão, com área de 53.216,84 km², correspondendo a 16,03% da área do Estado (Nugeo, 2022). O rio Itapecuru,

nasce no sul do estado no sistema formado pelas Serras da Croeira, Itapecuru e Alpercatas, com altitude aproximada de 530m, percorrendo cerca de 1.041 km, desaguando na baía do Arraial, a Sudeste da Ilha do Maranhão (Medeiros, 2001; Silva & Conceição *et al.*, 2011 Nugeo, 2022), nesta região possui o clima tropical úmido, com temperaturas elevadas médias acima de 20 °C e precipitação entre 1000 a 1500 mm/ano, com duas estações bem distintas, uma chuvosa e outra seca, a vegetação ao longo do rio é composta por árvores de pequeno e médio porte, retorcidas e tortuosas, de casca grossa, relevo composto por planícies (fluviais e costeiras) e planalto e solo latossolos amarelos e latossolos vermelho-amarelos (Silva & Conceição *et al.*, 2011).

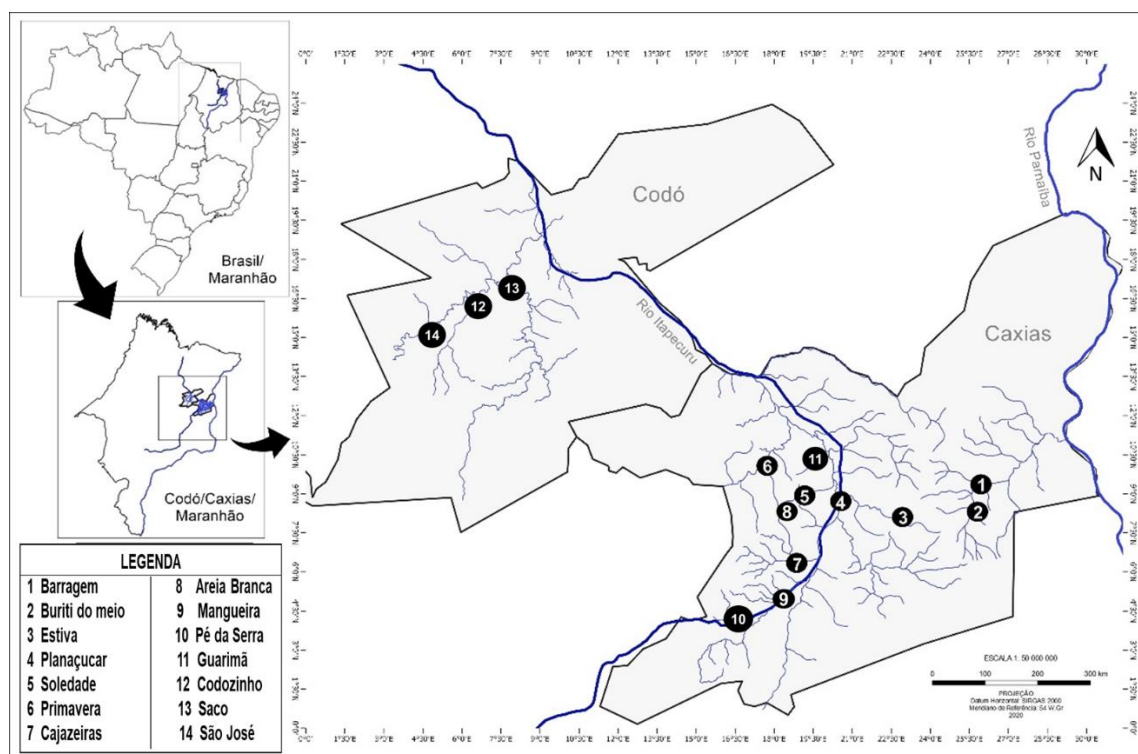
Para realização das coletas foram selecionados trechos de rios e riachos que fazem parte da Bacia Hidrográfica do rio Itapecuru em pontos aleatórios, considerando os locais de acesso (Tabela 1 e Fig. 2). As capturas das ninfas foram realizadas através de rede entomológica aquática em D (rapiché), com abertura de malha de 0,5 mm e catação manual (Frost, 1957). Nos pontos amostrais as ninfas foram coletadas em diferentes tipos de substratos (areia; folhíço; troncos; raízes, pedras e macrófitas) em áreas de correnteza e remanso e em seguida fixadas em frascos contendo álcool a 80% devidamente etiquetado e armazenados em freezer a -20°C.

Os imagos da família Leptophlebiidae foram obtidos dos materiais depositados no Laboratório de Entomologia Aquática do CESC/UEMA, sendo estes coletados através de armadilhas luminosas ao entardecer e armadilha da Pensilvânia do anoitecer ao amanhecer próximo a vegetação marginal e margens dos corpos d'água, alguns adultos foram obtidos através da criação das ninfas (Frost, 1957) (Tabela 1e Fig. 1).

Tabela 1. Localidades e coordenadas da obtenção dos espécimes da Ordem Ephemeroptera obtidos na em rios e riachos Bacia do Itapecuru no Leste-maranhense.

Ponto	Município/UF	Rio/Riachos	Coordenadas
1	Caxias/MA	Areia Branca/APA Inhamum	04°53'34.9"S e 43°26'11.1"W
2		Barragem	04°52'16.9"S e 43°05'53.3"W
3		Buriti do meio	04°54'48,1''S e 43°06'49,2''W
4		Cajazeiras	05°01'03.4'' S e 43°25'46.3'' W
5		Estiva	04°55'40.1'' S e 43°14'41.2'' W
6		Guarimã	04°50'02.9"S e 43°29'06.1"W
7		Mangueira	05°07'05.5"S e 43°33'47.8"W
8		Planaçucar	04°54'24.87"S e 43°21'45.23"W
9		Pé da Serra	05°07'28.5"S e 43°33'02.2"W
10		Primavera	04°50'5.73'' S e 43°29'4.34'' W
11		Soledade/APA Inhamum	04°53'40.8"S e 43°25'18.9"W
12	Codó/MA	Rio Codozinho	04°36'29.1"S e 44°06'53.7"W
13		Rio Saco	04°30'29.6"S e 43°56'26.8"W
14		Riacho São José	04°28'23.1"S e 43°52'22.4"W

101



102

103

104

105

Fig. 1. Locais de coleta da ordem Ephemeroptera em rios e riachos da Bacia do Itapecuru (Números indicando os locais coletados).

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

A identificação dos espécimes foi realizada com o auxílio de Estereomicroscópio binocular Stemi DV4 e microscópio óptico Primo Star ambos da marca Zeiss® sendo esta realizada no Laboratório de Entomologia Aquática (LEAq) do CESC/UEMA. As ninfas foram identificadas em nível genérico e os imagos da família Leptophlebiidae identificados em nível específico, sendo a mesma realizada como base em Domínguez et al. (2006), Salles (2006) e Salles *et al.* (2014), complementadas por artigos pertinentes a cada táxon, além de consulta a pesquisadores especialistas quando necessário. Para as informações da distribuição geográfica das espécies foram consultadas o Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil, onde a lista das espécies de Ephemeroptera registradas para o Brasil é atualizada frequentemente (Salles & Boldrini, 2022). O material (Ninfas e DNA) foi depositado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL) do CESC/UEMA.

117

Caracterização Molecular

118

119

120

121

122

123

124

125

126

O DNA total foi extraído a partir das pernas, tórax, tórax e abdome, ou do corpo inteiro do animal, utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification da Promega em coluna de sílica, seguindo as instruções do fabricante (**Material suplementar 1**). O isolamento e amplificação da região genômica foi realizado via técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para o gene rRNA 16S utilizou-se *primers* específicos: rRNA 16S–16sL1: ‘5-GCCTCGCCTGTTTACCAAAAC-3’ 16SH2: ‘5-CCGGTTCTGAACTCAGATCACGT-3’ como descrito por (Palumbi *et al.*, 1996). A PCR foi realizada em um volume final de 25 µl, com os seguintes reagentes: 4 µl de DNTPs (1.25 M), 4 µl de Buffer/ MgCl₂ (10X), 1 µl de DNA, 0.25 µl de cada primer (200 ng/µl), 0.2 µl da enzima Taq polimerase (5U/µl) e 16.3 de

H₂O purificada. O protocolo de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 95° C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento 50° C por 1 minuto, extensão 72° C por 2 minutos e uma extensão final de 72° C por 7 minutos.

Para gene COI utilizou-se *primers* específicos: LC01490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HC02198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994). A PCR foi realizada em um volume final de 25 µl, com os seguintes reagentes: 2,5 µl de tampão Colorless GoTaq® 5X PROMEGA® (100 mM), 3,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl de dNTP (2,5 mM de cada base), 1,2 µl de cada primer (100 ng/µl), 0,3 µl da enzima Taq polimerase GE (5 U/µl), e 12,3 de H₂O purificada. O protocolo de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 94° C por 1 minuto, seguidos de 36 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 min, anelamento 47° C por 1,5 minuto, extensão 72° C por 1,5 minuto e uma extensão final de 72° C por 5 minutos.

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit ExoSap-IT®, seguindo as recomendações do fabricante, e submetidos à reação de sequenciamento de DNA segundo o método de Sanger *et al.* (1977), utilizando-se o Kit “*Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems)” (**Material suplementar 2**).

Análises dos Dados

As sequências foram alinhadas e editadas no Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) do programa Bioedit 7.2.5 (Hall, 1999). As sequências dos dois marcadores foram concatenadas no programa Seaview4 (GOUY *et al.*, 2010). As médias de divergências genéticas e a árvore de Máxima verossimilhança (ML) foram obtidas no MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), utilizando o modelo Tamura-Nei3, com 1000 réplicas de *bootstrap*.

A escolha do modelo para a construção da árvore de Inferência Bayesiana (IB) foi gerada no JModelTest2 (Darriba *et al.*, 2012) que está disponível no CIPRES Science Gateway v3.3 (Miller *et al.*, 2010), utilizando o algoritmo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G+I). A árvore de IB foi gerada no software BEAST v.1.10.4 (Drummond *et al.*, 2012; Suchard *et al.*, 2018), utilizando um relógio estrito e o processo de especiação de Yule como priori. A análise foi realizada com base em 40.000.000 milhões de gerações. Em seguida, os arquivos de log foram verificados no Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2014a) para avaliar a convergência e o comprimento adequado do *burn in*, onde a convergência foi considerada adequada quando os parâmetros apresentaram ESS (*Effective Sample Size*) superiores a 200. A árvore gerada no BEAST foi resumida no TreeAnnotator v.10.4 (Suchard *et al.*, 2018) para obtenção da árvore consenso, posteriormente visualizada e editada no Fig Tree v1.4.2 (Rambaut *et al.*, 2014b) e Inkscape (Programa de edição de imagem). Clados com porcentagens de BT ≥ 85 ou PP ≥ 0.95 foram considerados fortemente suportados.

As análises de delimitação de OTUs para o gene COI foi realizada, utilizando os modelos: *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD), *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP) *Poisson Tree Process* (PTP) e *Generalized Model Yule Coalescent* (GMYC). O teste ABGD (Puillandre *et al.*, 2012) foi executado em <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/> usando um banco de sequências alinhadas. O teste ASAP (Puillandre *et al.*, 2020) foi realizado em <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html> usando como entrada uma matriz de distância genética realizada no MEGA X. O PTP (Zhang *et al.*, 2013) foi executado no servidor da web <https://species.h-its.org/> usando como arquivo de entrada uma árvore filogenética de

Máxima Verossimilhança construída no programa RaxML v.8.29 (Stamatakis, 2014) que está disponível no CIPRES Science Gateway v3.3 (Miller *et al.*, 2010). O GMYC (Fujisawa & Barraclough, 2013), foi realizado a partir da árvore ultramétrica consenso construída no software BEAST v1.8, a qual foi submetida nos pacotes Ape, Splits, Paran e Mass disponíveis no software R v. 4.1.0 (Venables *et al.*, 2021).

Para a identificação e verificação do grau de similaridade, as sequências foram plotadas nas plataformas de bioinformática BOLD Systemsv4 (Barcode of Life Data) (Ratnasingham; Hebert, 2007) e BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Resultados

Foram obtidas para a ordem Ephemeroptera 122 sequências, sendo 82 para o gene rRNA 16S (71 Ninfas e 11 Imago) e 40 para o gene COI (Ninfas), pertencendo a cinco famílias: Baetidae, Caenidae, Euthyplociidae, Leptohyphidae e Leptophlebiidae, 17 gêneros e 26 espécies. As famílias Leptophlebiidae (N= 40) e Baetidae (N= 23) foram as mais representativas, os gêneros *Callibaetis* (N= 15) e *Simothraulopsis* (N= 13) apresentaram o maior número de espécimes (Tabela 2). As análises foram geradas para os genes concatenados obtendo um fragmento de 1121 pares de bases (rRNA 16S e COI) com 518 conservados, 603 variáveis e 576 informativos a parcimônia, com composição média de nucleotídeos de 34 % para timina (T), 16% para citosina (C), 29,9% para adenina (A) e 20,1% para guanina (G).

Tabela 2. Espécimes da Ordem Ephemeroptera coletados em rios e riachos da Bacia do Itapecuru, em área de Cerrado do leste Maranhense.

Família	Gênero/espécies	Rio/Riacho	Localidade	Estágio	N	16S	COI
Leptophlebiidae	<i>Farrodes</i> sp.	Barragem	Caxias/MA	Ninfa	5	5	1
		Rio Saco	Codó-MA		2	2	1
		Cajazeiras	Caxias/MA		2	2	1
		São José	Codó-MA		1	1	1
	<i>Hagenulopsis</i> sp.	Estiva	Caxias/MA		6	6	3
	<i>Simothraulopsis</i> sp1.	Rio Codozinho	Codó-MA		1	1	1
		Planaçucar	Caxias/MA		3	3	1
	<i>Simothraulopsis</i> sp2.	Planaçucar	Caxias/MA		5	5	2
	<i>Simothraulopsis</i> sp3.	Rio Codozinho	Codó-MA		1	1	1
		Cajazeiras	Caxias/MA		1	1	1
	<i>Simothraulopsis</i> sp4.	Buriti do Meio	Caxias/MA		2	2	1
	<i>Askola</i> sp.	Estiva	Caxias/MA		1	1	1
	<i>Hidrosmilodon</i> sp.	Rio Saco	Codó-MA		2	2	1
	<i>Miroculis dukensis</i>	Areia Branca/APA inhamum	Caxias/MA		1	1	-
	<i>Hidrosmilodon gilliesae</i>	Buriti do Meio	Caxias/MA	Imago	3	3	-
	<i>Hidromastodon sallessi</i>	Mangueira	Caxias/MA		1	1	-
	<i>Thraulodes sternimaculatus</i>	Guarimã	Caxias/MA		2	2	-
	<i>Thraulodes marrerroi</i>	Rio Saco	Codó-MA		1	1	-

	<i>Leentvaaria palpalis</i>	Pé da serra	Caxias/MA		2	2	-
	<i>Paramaka convexa</i>	Pé da serra	Caxias/MA		1	1	-
Caenidae	<i>Caenis</i> sp.	Cajazeiras	Caxias/MA	Ninfa	1	1	1
	<i>Brasilocaenis</i> sp.	Rio Codozinho	Codó-MA		3	3	3
Euthyplocidae	<i>Campylosia</i> sp.	Primavera	Caxias/MA	Ninfa	5	5	3
Leptohyphidae	<i>Amanahyphes</i> sp.	Estiva	Caxias/MA	Ninfa	5	5	4
	<i>Callibaetis</i> sp1.	Planaçucar	Caxias/MA		1	1	1
		Rio Codozinho	Codó-MA		6	6	4
		Estiva	Caxias/MA		1	1	-
	<i>Callibaetis</i> sp2.	Soledade/APA	Caxias/MA		4	4	1
		Inhamum					
Baetidae		Buriti do Meio	Caxias/MA	Ninfa	1	1	-
	<i>Callibaetis</i> sp3.	Rio Codozinho	Codó-MA		1	1	1
	<i>Callibaetis</i> sp4.	Planaçucar	Caxias/MA		1	1	-
	<i>Cloeodes</i> sp.	Barragem	Caxias/MA		1	1	1
		Estiva	Caxias/MA		1	1	1
	<i>Apobaetis</i> sp1.	Rio Saco	Codó-MA		4	4	3
	<i>Apobaetis</i> sp2.	Estiva	Caxias/MA		2	2	-
5	17 gêneros / 26 espécies	-	-	-	82	40	122

As médias das divergências genéticas intraespecíficas para os genes variaram de 0 a 0,3%. As médias de divergências genéticas interespecíficas variaram de 1,20% a 55,30%, a menor foi observada entre as espécies *Leentvaaria palpalis* e *Hidrosmilodon gilliesae* pertencentes a família Leptophlebiidae, e a maior divergência ocorreu entre as espécies *Amanahyphes* sp. e *Callibaetis* sp2. pertencentes as famílias Leptohyphidae e Baetidae, respectivamente. As médias intraespecíficas foram obtidas apenas das espécies representadas por mais de um exemplar (Tabela 3).

Os agrupamentos pelas reconstruções filogenéticas de Máxima verossimilhança (ML) (Figura suplementar 1) e Inferência Bayesiana (BI) apresentaram clados fortemente sustentados (BT=99 a 100; PP= 1.0), indicando a concordância com as espécies atribuídas por identificação morfológica, com exceção de *Hidrosmilodon* sp. e *Hidrosmilodon gilliesae*, que se apresentaram em clados separados (Fig. 2).

As análises de delimitação para o gene COI, revelaram para os métodos ASAP, PTP e ABGD 17 OTUs e 16 OTUs para o GMYC. As espécies *Simothraulopsis* sp1., sp2. e sp3., constituem um único OTU para o GMYC, as espécies *Simothraulopsis* sp1. e sp2. se agruparam em um único OTU para os métodos ASAP, PTP e ABGD (Fig. 3)

206 **Tabela 3.** Médias de divergências genéticas Tamura-Nei3 interespecífica e intraespecífica (diagonal) para espécies da ordem Ephemeroptera para o estado do
 207 Maranhão através de 1124 pares de bases dos genes rRNA16s e COI.

Gêneros/Espécies	Matriz de divergência Genética																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1- <i>Callibaetis</i> sp1.	0,1																		
2- <i>Callibaetis</i> sp2.	20,96	0																	
3- <i>Apobaetis</i> sp1.	32,32	35,95	0																
4- <i>Apobaetis</i> sp2.	27,52	35,79	19,22	0															
5- <i>Cloeodes</i> sp.	28,99	37,85	32,42	30,96	0														
6- <i>Brasilocaenis</i> sp.	36,37	44,41	42,36	42,36	37,70	0													
7- <i>Campylocia</i> sp.	36,77	46,10	45,40	41,35	37,07	26,45	0												
8- <i>Amanahyphes</i> sp.	46,37	55,30	51,84	46,17	40,62	33,47	34,01	0											
9- <i>Farrodes</i> sp.	40,03	45,14	45,95	42,24	35,80	23,76	23,35	27,96	0,3										
10- <i>Hagenulopsis</i> sp.	38,38	47,60	42,05	43,94	40,13	25,37	28,53	37,48	21,36	0									
11- <i>Hidrosmilodon</i> sp.	40,69	50,53	48,27	43,88	37,63	26,77	26,88	31,67	12,08	27,34	0								
12- <i>Miroculis</i> sp.	37,12	45,44	44,49	42,01	37,66	27,37	27,01	35,02	14,31	23,31	18,40	0							
13- <i>Simotrhaulopsis</i> sp1.	37,30	46,17	47,25	43,27	39,61	27,03	25,89	33,92	14,83	23,32	17,43	8,86	0						
14- <i>Simotrhaulopsis</i> sp2.	38,83	46,90	49,11	45,02	41,06	29,85	29,15	34,55	16,66	25,65	19,30	11,59	3,66	0					
15- <i>Simotrhaulopsis</i> sp3.	37,33	45,34	46,30	41,94	39,92	26,34	25,91	33,54	16,13	24,30	17,48	8,59	3,16	6,47	0				
16- <i>Simotrhaulopsis</i> sp4.	36,40	44,73	48,30	43,35	40,55	25,99	26,20	33,62	17,89	25,30	17,44	9,12	7,00	9,94	4,92	0			
17- <i>Hidrosmilodon gilliesae</i>	40,91	51,84	48,41	47,24	37,76	25,75	25,77	32,72	10,94	25,82	7,26	17,11	16,82	18,06	17,45	16,21	0		
18- <i>Thraulodes sternimaculatus</i>	39,88	49,79	44,04	43,48	38,59	28,09	29,95	38,30	16,89	27,07	19,35	18,58	18,59	21,08	18,94	19,54	17,70	0	
19- <i>Leentvaaria palpalis</i>	38,92	49,56	46,24	45,06	35,86	24,10	24,46	31,33	9,59	24,19	6,48	15,64	15,36	17,48	15,98	14,76	1,20	16,80	0

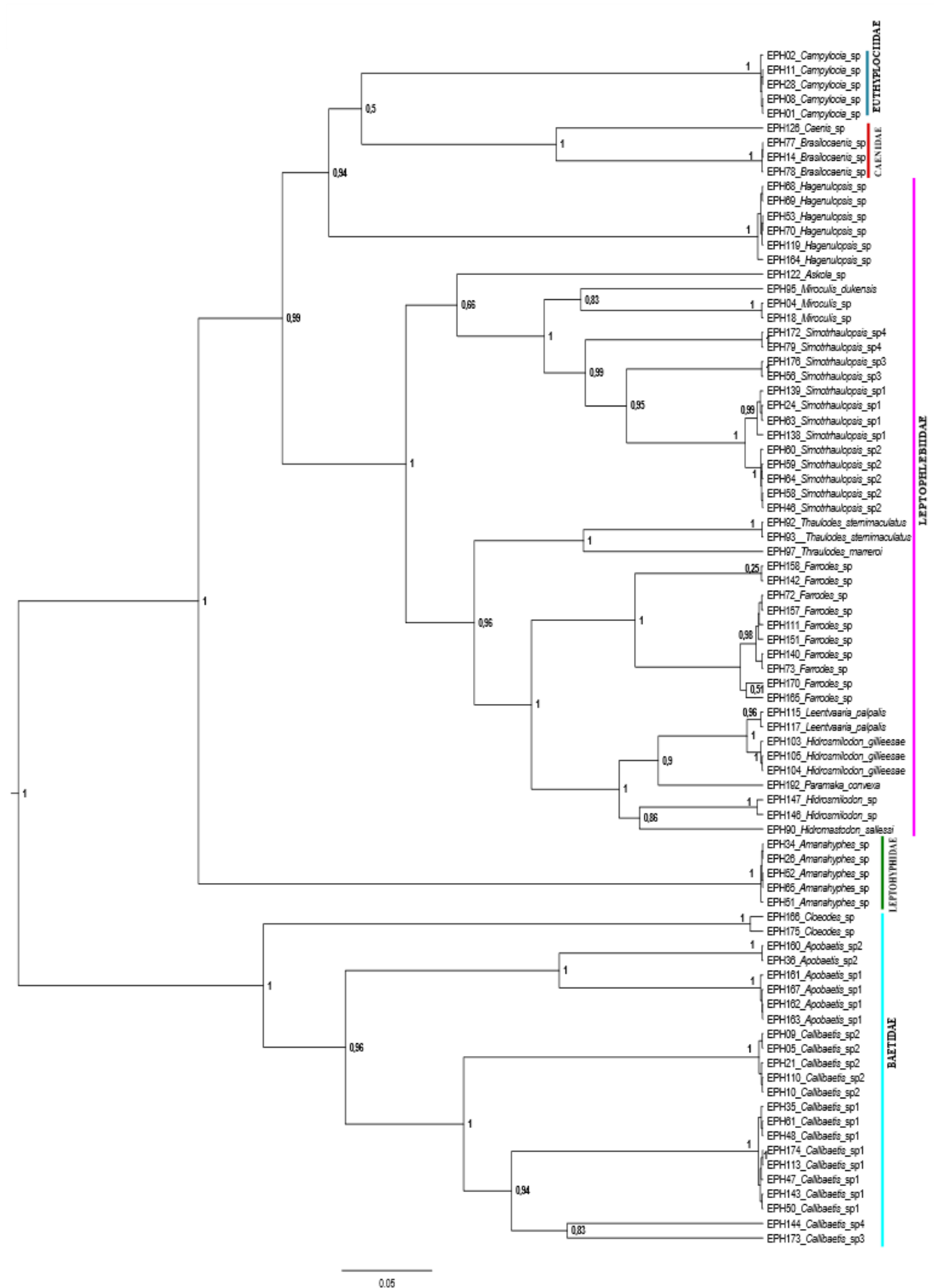


Fig. 2. Árvore de inferência Bayesiana baseada nos genes mitocondriais rRNA 16S e COI através do algoritmo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G+I).

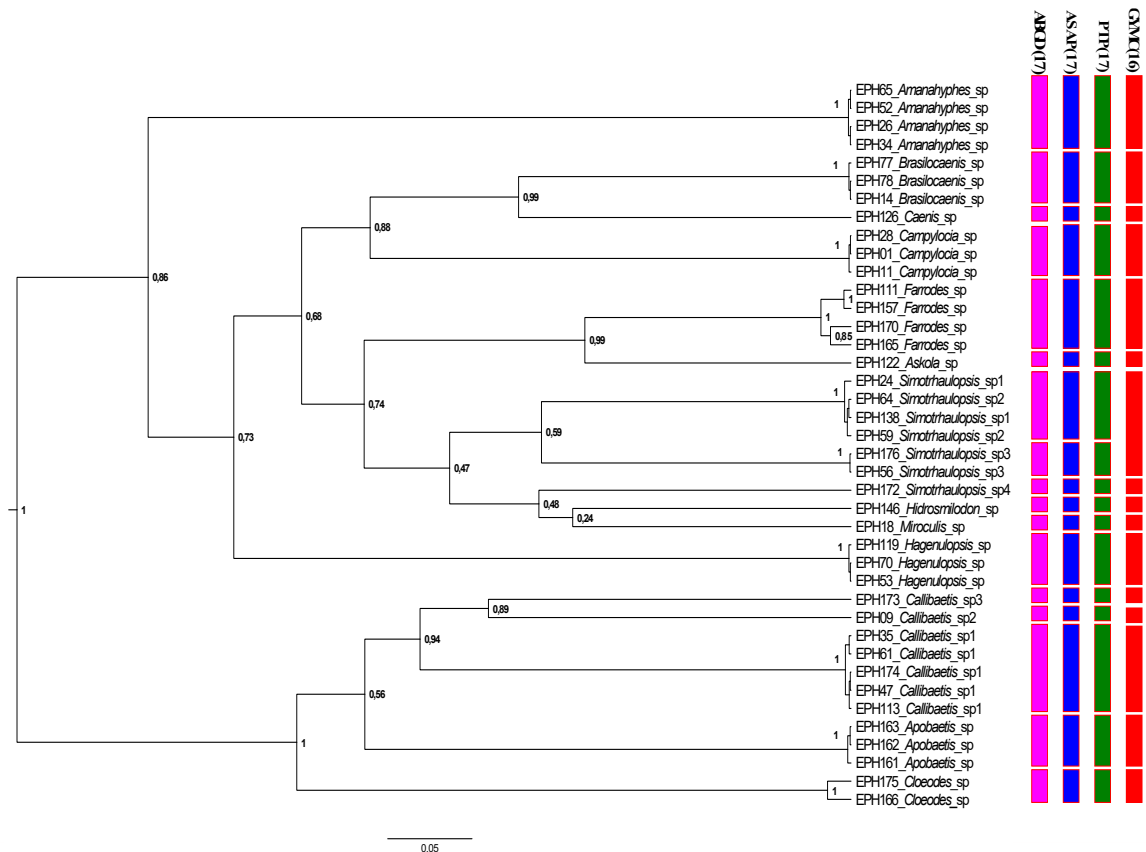


Fig. 3. Árvore de inferência bayesiana evidenciando os agrupamentos das OTUs obtidas pelas diferentes abordagens de delimitação de espécies baseada no gene COI através do algoritmo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G+I).

Quando as sequências dos espécimes foram submetidas as plataformas BOLD/BLAST para analisar os índices de similaridades, apenas o gênero *Campylocia* teve sua identificação específica confirmada com 98,40% com *Campylocia anceps*. Os demais espécimes não foram possíveis ser identificados em nível de espécie, pois não mostraram correspondências significativas com espécies presentes nas plataformas.

Discussão

Os Efemerópteros estão entre os grupos mais utilizados em programas de biomonitoramento de qualidade de água em função das distintas respostas apresentadas por suas espécies à degradação ambiental (Domínguez *et al.*, 2006, Salles, 2006; Feitosa & Almeida, 2002; Silva, *et al.*, 2016; Shimano & Juen, 2016; Shimano *et al.*, 2018; Barbosa *et al.*, 2020), diante disso, conhecer as espécies e entender as relações ecológicas, genéticas deste grupo são de grande importância para o ecossistema, uma vez que tem contribuição direta para conhecermos a real biodiversidade.

A representatividade das famílias Baetidae e Leptophlebiidae, segundo Salles *et al.* (2014b), ocorre por Baetidae possuir uma distribuição mundial e é considerado o grupo de maior diversidade de espécies da ordem Ephemeroptera, sendo a família Leptophlebiidae a segunda maior família em número de espécies e a mais diversa com relação ao número de gêneros (Salles *et al.*, 2014b).

Os gêneros da família Leptophlebiidae, *Simothraulopsis*, *Farrodes*, *Askola*, *Hidrosmilodon*, *Miroculis* e as espécies *Miroculis dukensis*, *Hidrosmilodon gillieesae*, *Hidromastodon sallessi*, *Thraulodes sternimaculatus*, *Thraulodes marreroi*, *Leentvaaria palpalis* e *Paramaka convexa* possuem espécies registradas para o Maranhão (Nascimento *et al.*, 2020), já *Hagenulopsis* é registrada para o Nordeste na Bahia, no entanto, sem espécie registrada para o Maranhão (Salles & Boldrini, 2022).

Dos gêneros da família Baetidae registrados neste trabalho, *Callibaetis* e *Apobaetis* possuem uma espécie para cada registrada no Maranhão (Boldrini *et al.*, 2012; Salles & Boldrini, 2022). O gênero *Cloeodes* possui registro para o Nordeste na Bahia, Ceará e Pernambuco sem espécie registrada para o Maranhão (Salles & Boldrini, 2022). A espécie da família Euthyplociidae *Campylocia anceps* identificada molecularmente neste trabalho, possui registro para o Nordeste no estado da Bahia, no entanto sem registro para o estado do Maranhão (Salles & Boldrini, 2022). *Amanahyphes* da família Leptohyphidae possui uma espécie registrada para Maranhão (Cruz *et al.*, 2011). Os gêneros da família Caenidae, *Brasilocaenis* possui uma espécie para o Maranhão (Lima *et al.*, 2016), já *Caenis* não possuem espécies registradas para o Maranhão, apenas para Bahia e Pernambuco (Salles & Boldrini, 2022).

As médias de distâncias genéticas revelaram baixos níveis de divergência entre os gêneros/espécies (0 a 0,3%), essas baixas divergência vem sendo encontradas para as espécies da ordem utilizando genes mitocondriais (Ball *et al.*, 2005, Zhou *et al.*, 2009, Webb *et al.*, 2012). As espécies *Leentvaaria palpalis* e *Hidrosmilodon gillieesae* apresentaram baixos níveis de divergências interespecíficas (1,50%), Sartori (2005) e Morjardim *et al.* (2020) ressaltam em seus trabalhos que estas espécies/gêneros fazem parte do complexo Hermanella, e que são espécies irmãs com muita proximidade.

As Árvores filogenéticas deste trabalho revelaram clados bem suportados em todos os métodos ML e BI, para as espécies do Maranhão que se agruparam com os representantes de suas determinadas famílias. Este resultado é esperado uma vez que a monofilia da grande maioria das famílias de Ephemeroptera é consenso entre os autores (Ogden *et al.*, 2005, Ogden *et al.*, 2009). A espécie do gênero *Hidrosmilodon* se apresentou em clados distintos, estes resultados apoiam, com os obtidos por Sartori (2005) e Morjardim *et al.* (2020) na qual sugerem a parafilia das espécies deste gênero.

Os conjuntos de dados analisados pelos quatro métodos de agrupamentos, confirmou a concordância entre grupos de sequências e designações de espécies por taxonomia para maioria das espécies, demonstrando a eficiência na utilização destes modelos para delimitar espécies (PUILLANDRE *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013; FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013; PUILLANDRE *et al.*, 2020).

Não foi possível identificar em nível específico e genérico a maioria dos espécimes, assim como confirmar molecularmente as identificadas em nível de espécie, uma vez que há poucas sequências disponíveis para o gene rRNA16S e COI para a comparação nas plataformas BOLD/BLAST, uma vez que a maioria das sequências disponíveis serem de espécies de outros países (Ball *et al.*, 2005; Monaghan *et al.*, 2005; Gattolliat; Monaghan, 2010; Pereira-da-Conceição *et al.*, 2012 Webb *et al.*, 2012; Rutschmann *et al.*, 2014; Morinière *et al.*, 2017; Ossa-López *et al.*, 2017; Cardoni *et al.* 2015; Gattolliat *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2009, 2010; Molina *et al.*, 2017; Selvakumar *et al.*, 2016; Kjaerstad *et al.*, 2012; Wakimura *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2018; Suh *et al.*, 2019; Taylor *et al.*, 2020).

Os dados gerados, são de grande relevância para ordem uma vez que para o Brasil apenas alguns estudos de gêneros e família (Salles *et al.*, 2014a, Salles *et al.*, 2016, Dias *et al.*, 2019, Morjardim *et al.*, 2020, Salles *et al.*, 2020), vem sendo realizado, sendo estes dados pioneiros para o estado do Maranhão.

Conclusão

Os bancos de dados gerados servirão de base para estudos na ordem, cuja utilização poderá ter implicações diretas nos estudos taxonômicos e de conservação. Nossos resultados geraram 122 sequências para os genes COI e rRNA 16S, que demonstraram baixas divergências intraespecíficas entre as espécies, permitindo ainda registrar novos gêneros/espécies como *Hagenulopsis*, *Cloeodes*, *Caenis* e *Campylocia anceps* para o Estado do Maranhão.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL) e Laboratório de Entomologia Aquática (Leaq) do Centro de Estudos Superiores de Caxias (CESC) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) por todo aparato fornecido para o desenvolvimento dessa pesquisa e a Fundação de Amparo à Pesquisa e o Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela concessão da bolsa autora.

Referências

- Avise, J. C. (2004) Molecular Markers, Natural History and Evolution. Georgia: University of Georgia, Sinauer Associates.
- Ball, S. L., Hebert, P. D. N., Burian, S. K. & Webb, J. M. (2005) Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society*, **24**, 508–524.
- Barbosa, D. A., Brasil, L. S., Azêvedo, C. A. S., Lima, L. R. C. (2020) The role of spatial and environmental variables in shaping aquatic insect assemblages in two protected areas in the transition area between Cerrado and Amazônia. *Biota Neotropica*, **20**:3.
- Cai, Y-Y, Gao, Y-J; Zhang, L, Yu, D-N, Storey, K. B. & Zhang, J-Y. (2018) The mitochondrial genome of *Caenis* sp. (Ephemeroptera: Caenidae) and the phylogeny of Ephemeroptera in Pterygota, *Mitochondrial DNA Part B*, **3**: 2,577-579.
- Cardoni, S., Tenchini, R., Ficulle, I., Piredda, R., Simeone, M. C. & Belfiore, C. (2015) DNA barcode assessment of Mediterranean mayflies (Ephemeroptera), benchmark data for a regional reference library for rapid biomonitoring of freshwaters. *Biochemical Systematics and Ecology*, **62**, 36–50.
- Cardoso, M. N., Shimano, Y., Nabout, J. C., Juen, L. (2015) An estimate of the potential number of mayfly species (Ephemeroptera, Insecta) still to be described in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*.
- Cruz, P.V., Belmont, E.L., Boldrin, R., Hamada, N. (2011). Leptohiphidae (Insecta: Ephemeroptera) from northeastern Brazil. *Neotropical Entomology*, **40**: 6, 682–688.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) JModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**, 772.

- 317 Dias, L. G., Molineri, C., Takiya, D., Benavides, P. & Bacca, T. (2018) Phylogeny of
318 *Tricorythodes* Ulmer (Leptohyphidae: Ephemeroptera) based on molecular and morphological
319 evidence. *Zoologischer Anzeiger*, **278**,38-45.
- 320 Domínguez, E., Molineri, C., Pescador, M.L., Hubbard, M.D. & Nieto, C. (2006)
321 Ephemeroptera of South America. In: Adis, J., Arias, J.R., Rueda-Delgado, G., Wantzen, K.M.
322 (Eds) Aquatic biodiversity of Latin America, 2, Pensoft, Moscow/Sofia, 646.
- 323 Drummond, A. J., Suchard, A. M., Xie, D. & Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with
324 BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, **29**: 8, 1969–1973, 2012.
- 325 Feitosa, A. C., Almeida, E. P. (2002). A degradação ambiental do rio Itapecuru na sede do
326 município de Codó - MA. *Cadernos de Pesquisas*, São Luís, 13:1,31-45.
- 327 Folmer, O., Hoeh, W. R., Black, M. B. & Vrijenhoek, R. C. (1994) Conserved primers for PCR
328 amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Molecular Marine*
329 *Biology and Biotechnology*, **3**, 294–299.
- 330 Frost SW (1957) The Pennsylvania insect light trap. *Journal of Economic Entomology*, **50**: 287-
331 292.
- 332 Fujisawa, T & Barraclough, T. G. (2013) Delimiting species using single-locus data and the
333 generalized mixed yule coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on
334 simulated datasets, *Systematic Biology*, **62**, 707-724.
- 335 Gattolliat, J. L. & Monaghan, M. T. (2010) DNA-based association of adults and larvae in
336 Baetidae (Ephemeroptera) with the description of a new genus *Adnoptilum* in Madagascar.
337 *Journal of the North American Benthological Society*, **29**: 3,1042–1057.
- 338 Gattolliat, J. L., Cavallo, E., Vuataz, L. & Sartori, M. (2015) DNA barcoding of Corsican
339 mayflies (Ephemeroptera) with implications on biogeography, systematics and biodiversity.
340 *Arthropod Systematics & Phylogeny*, **73**:1, 3–18.
- 341 Gouy, M., Guindon S., Gascuel, O. (2010). SeaView versão 4: uma interface gráfica de usuário
342 multiplataforma para alinhamento de seqüências e construção de árvores filogenéticas. *Biologia*
343 *Molecular e Evolução*, **27**:2, 221-224.
- 344 Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
345 program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, **41**, 95-98.
- 346 Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S.D.E & Waard, J. R. (2003) Barcoding animal life:
347 cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the*
348 *Royal Society of London Series B*, **270**, 596–599.
- 349 Kjaerstad, G., Webb, J.M. & Ekrem, T. (2012) A review of the Ephemeroptera of Finnmark –
350 DNA barcodes identify Holarctic relations. *Norwegian Journal of Entomology*, **59**,182–195.
- 351 Kumar, S., Stecher, G., LI, M., Knyar, C. & Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular
352 Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and*
353 *Evolution*, **35**, 1547-1549.
- 354 Lima, L. R. C., Molineri, C., Pinheiro, U., Salles, F. F. (2016). Two new species of *Caenis*
355 *Stephens, 1835* (Ephemeroptera: Caenidae) from South America. *Zootaxa*, **4170**:1, 114–124

- 356 Medeiros, R. (2001) Rio Itapecuru: águas que correm entre pedras. São Luís: Ed. *Associação*
357 *Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 120.
- 358 Michel Sartori (2005) A new species of the genus *Paramaka* Savage & Dominguez, 1992 with
359 some comments on related genera (Ephemeroptera, Leptophlebiidae, Atalophlebiinae), *Studies*
360 *on Neotropical Fauna and Environment*, **40**:3, 237-245
- 361 Miller, D. B., Bartlett, S.; Sartori, M., Breinholt, J. W. & Ogden, T. H. (2018) Anchored
362 phylogenomics of burrowing mayflies (Ephemeroptera) and the evolution of tusks. *Systematic*
363 *Entomology*.
- 364 Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). "Creating the CIPRES Science Gateway for
365 inference of large phylogenetic trees". In *Proceedings of the Gateway Computing Environments*
366 *Workshop*, 1-8.
- 367 Molina, C. I. Gibon, F-M, Dominguez, E., Pape, T. & Rønsted, N. (2017) Associating
368 immatures and adults of aquatic insects using DNA barcoding in high Andean streams.
369 *Ecología en Bolivia*, **52**:2, 88-99.
- 370 Monaghan, M.T., Gattolliat, J.-L., Sartori, M., Elouard, J.-M., James, H., Derleth, P. & Vogler,
371 A.P. (2005) Trans-oceanic and endemic origins of the small minnow mayflies (Ephemeroptera,
372 Baetidae) of Madagascar. *Proceedings. Biological sciences*, **272**:1574, 1829-36.
- 373 Monjardim, M., Paresque, R. & Salles, F. F. (2020) Phylogeny and classification of
374 Leptophlebiidae (Ephemeroptera) with an emphasis on Neotropical fauna. *Systematic*
375 *Entomology*, **45**, 415–429.
- 376 Morinière, J., Hendrich, L., Balke, M. Beermann, A.J., König, T., Hess, M., Koch, S., Müller,
377 R., Florian, L., Hebert, P. D.N., Hausmann, A., Schubart, C. D. & Haszprunar, G. (2017) A
378 DNA barcode library for Germany's mayflies, stoneflies and caddisflies (Ephemeroptera,
379 Plecoptera and Trichoptera). *Molecular Ecology Resources*, **17**, 1293–1307.
- 380 Nugeo. (2022) Geoambiental. Bacias hidrográficas e climatologia no Maranhão. Universidade
381 Estadual do Maranhão. São Luís. Disponível em: <http://www.nugeo.uema.br>. Acesso em: 07
382 junho de 2022.
- 383 Ogden, T. H. & Whiting, M. F. (2005) Phylogeny of Ephemeroptera (mayflies) based on
384 molecular evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**, 625–643.
- 385 Ogden, T.H., Gattolliat, J.L., Sartori, M., Staniczek, A.H., Soldán, T., & Whiting, M.F. (2009).
386 Rumo a um novo paradigma na filogenia da mosca (Ephemeroptera): análise combinada de
387 dados morfológicos e moleculares. *Systematic Entomology*, **34**:4, 616-634.
- 388 Ossa-López, P. A., Camargo-Mathias, M. I. & Rivera-Páez, F. A. (2017) *Andesiops peruvianus*
389 (Ephemeroptera: Baetidae): a species complex based on molecular markers and morphology.
390 *Hydrobiologia*, **805**:1, 351–364.
- 391 Palumbi, S.R. (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D., Moritz, C.,
392 Mable, B. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA.
- 393 Pereira-Da-Conceicao, L.L., Price, B.W., Barber-James, H.M., Barker, N.P., De Moor, F.C. &
394 Villet; M.H. (2012) Cryptic variation in an ecological indicator organism: mitochondrial and

- 395 nuclear DNA sequence data confirm distinct lineages of *Baetis harrisoni* Barnard
396 (Ephemeroptera: Baetidae) in southern Africa. *BMC Evolution Biology*, **12**:26.
- 397 Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2020). ASAP: Assemble Species by Automatic
398 Partitioning. *Molecular Ecology Resources*, **21**, 609–620.
- 399 Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. & Achaz, G. (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap
400 Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, **21**: 8, 1864–1877.
- 401 Rambaut, A. (2014a). FigTree v1.4.2. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- 402 Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D., & Drummond, A. J. (2014b). Tracer v1.6, Disponível
403 em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.
- 404 Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD. The barcode of Life Data System 650
405 (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 355–364.
- 406 Rutschmann, S., Gattolliat, J.-L., Hughes, S. J., Báez, M., sartori, M. & Monaghan, M. T. (2014)
407 Evolution and island endemism of morphologically cryptic *Baetis* and *Cloeon* species
408 (Ephemeroptera, Baetidae) on the Canary Islands and Madeira. *Freshwater Biology*, **59**:12,
409 2516–2527.
- 410 Salles, F. F. & Domínguez, E. (2012) Systematics and Phylogeny of *Ulmeritus-Ulmeritoides*
411 revisited (Ephemeroptera: Leptophlebiidae). *Zootaxa*, **3571**, 49-65.
- 412 Salles, F. F. (2006) A Ordem Ephemeroptera no Brasil (Insecta): Taxonomia e diversidade.
413 Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- 414 Salles, F. F., Domínguez, E., Mariano, R. & Paresque, R. (2016) The imagos of some enigmatic
415 members of the *Hermanella* complex (Ephemeroptera, Leptophlebiidae). *ZooKeys*, **625**, 45–66.
- 416 Salles, F. F., Nascimento, J. M. C., Cruz, P. V., Boldrini, R. & Belmont, E. L. L. Ordem
417 Ephemeroptera (2014b). In: Hamada, N., Nessimian, J. L., and Querino, R. B. (2014). Insetos
418 aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia. (Editora do INPA: Manaus,
419 Brazil).
- 420 Salles, F. F., Nascimento, J. M. C., Monjardim, M., Paresque, R., Hamada, N. & Dominguez,
421 E. (2020) Diamantina: an endemic new genus of Neotropical Atalophlebiinae (Ephemeroptera:
422 Leptophlebiidae) evidenced by morphological and molecular data. *Zoologischer Anzeiger*, **284**,
423 30-42.
- 424 Salles, F.F. & Boldrini, R., (2022). **Ephemeroptera in catálogo taxonômico da fauna do**
425 **Brasil**. PNUD. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/14756>. Acessado
426 em: [01/06/2022].
- 427 Salles, F.F., Domínguez, E., Molineri, C., Boldrini, R., Nieto, C. & Dias, L.C. (2018) Order
428 Ephemeroptera. In: Hamada, N., Thorp, J.H. & Rogers, D.C. (Eds). *Keys to Neotropical*
429 *Hexapoda. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates*. Fourth edition. Academic Press,
430 London, 61-117.

- 431 Salles, F.F., Gattolliat, J-L, Angeli, K.B., De-Souza, M.R., Gonçalves, I.C., Nessimian, J.L. &
 432 Sartori, M. (2014a) Discovery of an alien species of mayfly in South America (Ephemeroptera).
 433 *ZooKeys*, **399**, 1–16.
- 434 Salles, F.F., Lugo-Ortiz, C.R., Da-Silva, E.R. & Francischetti, C.N. (2003) Novo gênero e
 435 Espécie de Baetidae (Insecta, Ephemeroptera) do Brasil. *Arquivos do Museu Nacional*, **61**:1,
 436 23-30.
- 437 Selvakumar, C., Sivaramakrishnan, K. G. & Janarthanan, S. DNA barcoding of mayflies
 438 (Insecta: Ephemeroptera) from South India. *Mitochondrial DNA Part B*, **1**: 1, 651-655. 2016.
- 439 Shimano, Y., Cardoso, M., Juen, L. (2018). Ecological studies of mayflies (Insecta,
 440 Ephemeroptera): Can sampling effort be reduced without losing essential taxonomic and
 441 ecological information? *Acta Amazonica*, **48**:2, 137–145.
- 442 Shimano, Y., Salles, F. F., Juen, L. (2013) Study of the mayfly order Ephemeroptera (Insecta)
 443 in Brazil: a sciencimetric review. *Revista Brasileira de Entomologia*, **57**:4, 359–364.
- 444 Shimano, Y.; Juen, L. (2016). How oil palm cultivation is affecting mayfly assemblages in
 445 Amazon streams. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, **52**, 35–45.
- 446 Silva, D. de J., & da Conceição, G. M. (2011). Rio Itapecuru: caracterização geoambiental e
 447 socioambiental, município de Caxias, Maranhão, Brasil. *Scientia Plena*, **7**,1.
- 448 Silva, K. K. Q.; Siqueira, L. C. N.; Veras-dos-Santos, D. S.; Azêvedo, C. A. S. (2016).
 449 Avaliação da qualidade ambiental do riacho Lamego pela razão EPT/Chironomidae e teste
 450 microbiológico, *Cadernos Cajuína*, **1**:3,15 – 23.
- 451 Stamatakis, A. (2014). “RAxML Version 8: A Tool for Phylogenetic Analysis and PostAnalysis
 452 of Large Phylogenies.” *Bioinformatics*.
- 453 Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L, Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018).
 454 Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 *Virus Evolution*.
- 455 Suh, K. I., Hwang, J. M., Bae, Y. J. & Kang, J. H. Comprehensive (2019) DNA barcodes for
 456 species identification and discovery of cryptic diversity in mayfly larvae from South Korea:
 457 Implications for freshwater ecosystem biomonitoring. *Entomological Research*, **49**, 46–54.
- 458 Taylor, C.L., Barker, N.P., Barber-James, H.M., Villet, M.H & Pereira-Da-Conceicao, L.L.
 459 (2020) Habitat requirements affect genetic variation in three species of mayfly (Ephemeroptera,
 460 Baetidae) from South Africa. *ZooKeys*, **936**,1–24.
- 461 Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibons, T. J. (1994). CLUSTAL W. Improving the
 462 sensitivity of progressive multiple sequence alignment though sequence weighting,
 463 positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 4673- 4680.
- 464 Venables, W.N., & Smith, D. M. (2021) The R Core Team. R version 4.1.0 Patched. R: A
 465 Programming Environment for Data Analysis and Graphics. Vienna: *The Foundation for*
 466 *Statistical Computing* **144**.
- 467 Wakimura, K., Takemon, Y., Takayanagi, A., Ishiwata, S.-I, Watanabe, K., Tanida, K.,
 468 Shimizu, N. & Kato, M. (2016) Characterization of genes for histone H3, 18S rRNA, and

- cytochrome oxidase subunit I of East Asian mayflies (Ephemeroptera). *DNA Barcodes*, **4**, 1–25.
- Webb, J.M., Jacobus, L.M., Funk, D.H., Zhou, X., Kondratieff, B., Geraci, C.J., Dewalt, R.E., Baird, D., Richard, B., Phillips, I. & Hebert, P.D.N. (2012) A DNA Barcode Library for North American Ephemeroptera: Progress and Prospects. *PLoS ONE*, **17**: 5.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P. & Stamatakis, A. (2013) A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, **29**: 22, 2869–2876.
- Zhou, X., Adamowicz, S.J., Jacobus, L.M., Dewalt, R. E. & Hebert, P. D.N. (2010) Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera fauna of Churchill (Manitoba, Canada): insights into biodiversity patterns from DNA barcoding. *Journal of the North American Benthological Society*, **29**, 814–837.
- Zhou, X., Adamowicz, S.J., Jacobus, L.M., Dewalt, R. E. & Hebert, P. D.N. (2009) Towards a comprehensive barcode library for arctic life - Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera of Churchill, Manitoba, Canada. *Frontiers in Zoology*, **6**, 30.

500 **MATERIAL SUPLEMENTAR**

501 **Material suplementar 1 – Protocolo de extração de DNA kit PROMEGA**

- 502 ✓ Macerou-se o inseto todo ou parte com auxílio de um pistilo, adicionou-se em microtubos
503 de 1,5 ml;
- 504 ✓ Preparou-se uma solução composta de EDTA (60 µl) e Nuclei Lysis Solution (250 µl) em
505 quantidade proporcional as amostras;
- 506 ✓ Misturou-se a solução manualmente;
- 507 ✓ Levou-se a solução ao freezer por 5 minutos, tomando-se o cuidado para não congelar;
- 508 ✓ Adicionou-se em cada um dos tubos 300 µl da solução preparada;
- 509 ✓ Colocou-se 10 µl de proteinase K e deixou-se as amostras em banho Maria a 65° C ou 30
510 minutos no shak até degradar todo o tecido;
- 511 ✓ Adicionou-se 10 µl de RNase e levou-se os tubos à estufa a 37° C por 20 minutos;
- 512 ✓ Após retirar as amostras da estufa adicionou-se 150 µl do reagente Protein Precipitation;
- 513 ✓ Agitou-se delicadamente os tubos;
- 514 ✓ Agitou-se no vórtex para garantir a homogeneização dos reagentes;
- 515 ✓ Colocou-se no freezer por cinco minutos, tomando o cuidado para não congelar;
- 516 ✓ Centrifugou-se por 10 min. a 15.000 rpm;
- 517 ✓ Adicionou-se 400 µl de isopropanol (para precipitar o DNA) em um novo tubo;
- 518 ✓ Retirou-se o tubo da centrífuga, em seguida, retirou-se o sobrenadante, colocando-o junto
519 com o isopropanol;
- 520 ✓ Agitou-se gentilmente os tubos;
- 521 ✓ Colocou-se a mistura em uma coluna fixada em um tubo de 2ml;
- 522 ✓ Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm, até a coluna secar;
- 523 ✓ Em seguida adicionou-se 500 µl de álcool 70% a coluna;
- 524 ✓ Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm, até a coluna secar;
- 525 ✓ Transferiu-se a coluna para um novo tubo de 1,5ml;
- 526 ✓ Colocou-se 100 µl de solução DNA rehydratation ou TE;
- 527 ✓ Deixou-se as amostras em overnight;

528 ✓ Posteriormente o DNA foi visualizado por meio de um sistema de eletroforese em gel de
529 agarose a 1% em uma proporção de 3 µl do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para
530 cada 3 µl de DNA.

531 **Material suplementar 2 – Protocolo da Reação de Sequenciamento do DNA**

532 Para reação de sequência foram utilizados os seguintes reagentes e parâmetros:

533 ✓ 3,9µl de H₂O;

534 ✓ 1,05µl de Buffer;

535 ✓ 0,35µl de Primer (0,8 pmol/µl);

536 ✓ 1µl de DNA;

537 ✓ 0,7µl de Big Dye;

538 O produto da reação de sequenciamento foi precipitado seguindo o seguinte protocolo:

539 ✓ Submeteu-se a placa a um spin (centrífuga de placa);

540 ✓ Adicionou-se 2,5µl de EDTA (125 mM);

541 ✓ Vedou-se a placa e submeteu-se a um spin;

542 ✓ Adicionou-se 30µl de Etanol 100%;

543 ✓ Vedou-se a placa e misturou-se invertendo 4-5x;

544 ✓ Envolveu-se a placa em papel alumínio e deixou-se em repouso à temperatura ambiente por
545 15 minutos;

546 ✓ Centrifugou-se a 4.000 rpm por 30 minutos;

547 ✓ Inverteu-se bruscamente a placa para descartar o álcool e secou-se sobre o papel absorvente;

548 ✓ Centrifugou-se a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;

549 ✓ Adicionou-se 30µl de Etanol a 70%;

550 ✓ Vedou-se a placa;

551 ✓ Centrifugou-se a 4.000 rpm por 15 segundos (centrífuga refrigerada 4° C);

552 ✓ Inverteu-se bruscamente para descartar o álcool e secou-se sobre o papel absorvente;

553 ✓ Centrifugou-se a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;

554 ✓ Deixou-se a placa na estufa a 37° C por aproximadamente 10 minutos para evaporação do
555 excesso de álcool;

556 ✓ Colocou-se Formamida (10µl) e levou-se ao sequenciador automático de DNA (ABI 3500).

Figura Suplementar 1. Árvore filogenética obtida através do método Máxima verossimilhança (MV) com 1000 réplicas de *bootstrap* baseada em 1124pb dos genes mitocondriais rRNA 16S e COI através do algoritmo de Tamura-Nei3 parâmetros.

