

# **AVALIAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES COMO BARCODE EM TAXONOMIA INTEGRATIVA**

Izabeli Elisa dos Santos Zanetti<sup>1</sup>; Rodrigo Marques Lima Dos Santos<sup>2</sup>

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: iza.jesus@hotmail.com <sup>1</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: santosrml@gmail.com <sup>2</sup>

Área de Conhecimento: Taxonomia Integrativa

Palavras-chave: DNA barcode, Taxonomia Integrativa, COI.

## **INTRODUÇÃO**

O DNA código de barras ou barcode foi inicialmente proposto para a identificação de espécies do reino animal, no qual foi utilizado um fragmento mitocondrial, citocromo c oxidase subunidade I, com cerca de 650 pares de base (pb). A taxonomia integrativa, combinando vários tipos de dados e perspectivas complementares, ou seja, a filogeografia, morfologia comparativa, genética de populações, ecologia, desenvolvimento, comportamento, entre outros, tem sido reconhecido como a maioria dos meios objetivos para delimitar as unidades de diversificação da vida. Avanços tecnológicos forneceram novas ferramentas que facilitam a obtenção de diferentes tipos de dados biológicos, que são confrontados em estudos de taxonomia e evolução das espécies. O DNA barcode tornou-se um instrumento eficaz na identificação de novas espécies e o conhecimento de vários grupos (CRUZ-BARRAZA *et al.* 2012).

## **OBJETIVOS**

O objetivo principal do projeto é de analisar o uso de diferentes marcadores moleculares como barcode em taxonomia integrativa. Para isso foi proposta uma análise comparativa do principal marcador utilizado (o gene COI) com outros marcadores, utilizando dados disponíveis no GeneBank para uma grande diversidade de metazoários e outros dados a serem coletados experimentalmente para lagartos teídeos.

## **METODOLOGIA**

A metodologia deste trabalho constitui-se de revisão bibliográfica, entre o mês de Agosto/2016 e Outubro/2016, no qual foram selecionados artigos acadêmicos através de buscas no site da Scielo, Pubmed, CAPES, utilizando palavras-chaves como “integrative taxonomy”, “COI” e “barcoding”. Os artigos selecionados tiveram seus dados reanalisados em programas de reconstrução filogenética e as filogenias obtidas para os diferentes marcadores descritos para estas espécies comparadas. Quanto a parte prática, a metodologia constituiu de extração de DNA de exemplares de lagartos teídeos depositados no Banco de Tecidos de Vertebrados do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da USP (IBUSP), sob a curadoria do Dr. Miguel T. Rodrigues (MTR) e sequenciamento do gene COI. As sequências foram alinhadas e editadas no programa Codon Code Aligner e Bioedit. Ainda no Codon Code será observada a existência de códons de parada inesperados e problemas no quadro de leitura das regiões codificadas. A seguir foram realizadas análises filogenéticas utilizando o programa MEGA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação a análise de dados da literatura, foram selecionados nove artigos para execução dos resultados; os demais artigos não foram selecionados devido a não apresentarem dados comparativos, como a presença de outros marcadores. Para espécies de grupos diversos como Aranea, Brachyura, Díptera, Efemerópteros, Lepdópteros, parasitóides, tartarugas e peixes, os resultados mostram uma total correspondência entre as filogenias apresentadas pelo COI com os demais marcadores utilizados. Assim, os dados apresentados na literatura até o momento corroboraram o uso deste marcador como taxonomicamente relevante na delimitação de espécies com base em dados genéticos. No entanto, as medidas de distância genética entre as espécies apresentadas nestes artigos variou bastante: Em **Araneae**, para os dois clados observados, supostamente grupos irmãos, a menor média interespecífica foi de 12/11% encontrado em *G. cipingensis* e *G. jianensis* sp. que foi cerca de oito vezes maior que a distância intraespecífica 1,62% / 1,57%. **Brachyura**: Foram utilizados o gene mitocondrial COI e a subunidade ribossomal 16S. Os valores de divergência para o COI mostraram uma clara separação entre as espécies morfológicamente bem definidas. Foi observado valores inferiores em indivíduos da mesma espécie, que variou de 0 – 0,013%, enquanto os valores maiores observados em espécies e/ou gêneros diferentes variaram de 0,190 – 0,193%. Os valores para divergência do 16S mostrou também uma separação entre espécies morfológicamente bem definidas. Os valores intraespecíficos observados, comparando indivíduos *P. crinita* do Golfo do México entre os indivíduos de *P. mediterranea* do Brasil variaram de 0,000 – 0,010%. Houve uma separação do clado identificado como *P. crinita*. *Persephona mediterranea* (Golfo do México) foram agrupadas em um clado bem suportado assim como os espécimes do Brasil. A divergência em COI foi cerca de 3% que pode ou não indicar variação esperada à nível da população, porém em 16S, os valores para distância genética foram cerca de 1% o que é acima dos observados para separação de alguns crustáceos. De acordo com a morfologia *P. aquilonaris* e *P. mediterranea* devem ser tratados como espécies separadas. *P. punctata* e *P. edwardsii*, a distância interspecífica para COI foi de 17% e 3% para 16S, a morfologia difere. *Persephona orbicularis* foi recuperado no mesmo subtipo que *P. townsendi*, a divergência COI foi 1,7%, valor correspondente as distâncias intra – interespecíficas, assim com base na evidência molecular e morfológica, as duas espécies são sinonimizadas. *P. subovata* e *Iliacantha hamcocki*, a separação desses não é apoiada, divergência do valor obtido com COI era apenas de 0,3% e o estudo morfológico entre essas espécies não revelou diferenças significativas, ou seja as duas espécies, tendo em base as evidências moleculares e morfológicas devem ser sinonimizadas. Foi proposto então, alterar substancialmente a taxonomia atual dos *Persephona* (MAGALHÃES *et al.* 2016). **Díptera**: Para a maioria dos gêneros os números de espécies identificados eram muito limitados; observou uma extensa sobreposição entre divergência intraespecífica e interespecífica em gêneros ricos em espécies. O COI obteve bom desempenho em algumas linhagens, porém é indicado uma abordagem integrativa (NAGY *et al.* 2013). **Efemerópteros**: Foi utilizado o COI onde onze de doze famílias foram representadas por uma espécie identificada. Nove famílias formaram grupos coesos, com duas exceções: *Heptageniidae*, formado por três subgrupos, cada grupo incluindo espécies de um ou dois gêneros. *Ephemerellidae* contendo três subgrupos, cada grupo representando um gênero diferente. O COI identificou corretamente 99%. A única exceção foi um indivíduo que foi identificado através de análise morfológica. O COI foi eficaz na identificação destas espécies (BALL *et al.* 2005).

**Lepidóptera:** Das 200 espécies de lepidópteros analisadas através do COI, 196 foram identificadas corretamente, porém três famílias caíram em classes distintas. O COI foi considerado eficaz para *Lepidoptera* devido à margem de erro ter sido muito pequena em comparação com outros grupos de animais (HEBERT *et al.* 2004). **Espécies *Metrichia*:** A maior divergência intraespecífica foi em *Metrichia vulgaris* sp.nov. (0,048%) e a menor divergência interespecífica foi em *Metrichia talhada* sp.nov.(0,126%). *M. acuminata* sp.nov. foi recuperado como intimamente relacionado com *M. caraça* sp.nov. porém são distintas morfologicamente. *M. azul* sp.nov. pertence ao grupo *penicillata*. *M. bonita* sp.nov. pertence ao grupo *nigritta*. *M. curta* sp.nov. pertence ao grupo *aberrans*, assim como *M. farofa* sp.nov. *M. fórceps* sp.nov. pertence ao grupo *campana*, assim como *M. formosinha* sp.nov. *M. goianasp.nov*, *M. rafaeli* sp.nov. , *M. talhada* sp.nov. , *M. teres* sp.nov. e *M. ubajara* sp.nov. pertencem ao grupo *nigritta*. *M. Itabaiana* sp.nov, *M. peluda* sp.nov., *M. simples* sp.nov., *M. vulgaris* sp.nov pertencem ao grupo *campana*. As sequências de COI, juntamente com a morfologia são apropriadas como uma fonte de identificação e delimitação de espécies (SANTOS *et al.* 2016). **Espécies parasitóides (em Encyrtidae):** O COI e 28S foram comparados com a morfometria. *Encyrtus sasakii* compreende três linhagens que ao compartilhar uma morfologia semelhante são altamente divergentes a nível molecular; a distância média a partir de três populações primária é de 11,3%. O gene 28S foi praticamente invariante para as amostras seqüenciadas. O grau de divergência genética em COI foi encontrado para serem particularmente elevadas entre as três populações. Foi considerado um marcador ideal para identificação desse complexo de espécies (CHESTERS *et al.* 2012). **Testudines:** A distância média geral foi de 8,2%. Entre as famílias *Dermochelyidae* e *Cheloniidae* foi de 11,7%, distância média dentro de *Cheloniidae* era 6,4%. A maior parte dos 71 sítios apomórficos foi encontrada em *D. coriacea* (32) como esperado, uma vez que *Dermochelyidae* divergiu no final do Cretáceo; *E. imbricata* apresentou seis sítios apomórficos. *L. olivácea*, oito sítios; *C. mydas*, 18 sítios e *C. caretta*, sete sítios. As sequências do COI discriminaram significativamente todas as espécies (VARGAS *et al.* 2009). **Peixes:** Os resultados de máxima parcimônia das análises das sequências do COI reconhecem claramente *S. barrybrowni* como uma espécie distinta de *S. caribbaeus* e *S. tredecimspinosus*. A distância genética dentro de cada espécie, no qual a variação para *S. barrybrowni* é de 0,0 – 0,2% e 0,0 – 0,5% para *S. caribbaeus* e *S. tredecimspinosus*. Os dados COI são insuficientes para resolver a maioria dos relacionamentos entre essas espécies, necessitando de mais estudos em relação à família *Scorpaenidae* (BALDWIN *et al.* 2016). Quanto aos dados obtidos experimentalmente para lagartos teideos, encontramos também uma distância de cerca de 3% entre as espécies estudadas e de pelo menos 8% entre indivíduos de gêneros diferentes, corroborando o uso deste marcador como ferramenta importante na Taxonomia Integrativa.

## CONCLUSÕES

Devido à taxonomia integrativa ser uma área nova, traz diferentes abordagens priorizando o uso do COI, porém é de conhecimento que a taxonomia integrativa necessita de diferentes abordagens em um mesmo contexto. Dos nove artigos, apenas cinco utilizaram uma abordagem taxonômica, utilizando marcadores genéticos, morfologia e comparando-os. *Aranae*, *Brachyura*, espécies de *Metrichia* obtiveram resultados positivos, no qual em *Brachyura*, foi proposto mudar a taxonomia. Em espécies parasitóides o 28S foi invariante, porém o COI juntamente com a morfologia foi eficiente. Nos Peixes a taxonomia integrativa foi insuficiente para resolver a maioria dos relacionamentos entre as espécies. Nos demais grupos não houve uma abordagem

integrativa, só foi utilizado o COI como barcode, em todos o COI foi eficiente para identificação das espécies porem necessita de uma integração com outros métodos. Para os lagartos teideos os dados obtidos, até o momento, são promissores e devem fornecer importantes subsídios para a identificação e delineamento de espécies utilizando-se a taxonomia integrativa.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BALDWIN C.; PITASSY D.E.; ROBERTSON D.R. **A new deep-reef scorpionfish (Teleostei, Scorpaenidae, Scorpaenodes) from the southern Caribbean with comments on depth distributions and relationships of western Atlantic members of the genus.** *ZooKeys* 2016.

BALL S. L.; HEBERT P.D.N. **Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes.** *The North American Benthological Society*, v 24, n. 3, p. 508-524, 2005.

CRUZ-BARRAZA, J.A.; CARBALLO, J.L.; ROCHA-OLIVARES, A.; EHRLICH H, HOG M. **Integrative Taxonomy and Molecular Phylogeny of Genus Aplysina (Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 8. 2012.

HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN, D.H. **Ten Species In One: DNA Barcoding Reveals Cryptic Species In The Neotropical Skipper Butterfly *Astraptes Fulgerator*.** *PNAS*, v. 101, n. 41, p. 14812–14817. 2004.

MAGALHÃES T.; ROBLES R.; FELDER D.L.; MANTELATTO F.L. **Integrative Taxonomic Study of the Purse Crab Genus *Persephona* Leach, 1817 (Brachyura: Leucosiidae): Combining Morphology and Molecular Data.** *PLoS ONE*, v. 11, n.4. 2016.

NAGY Z.T.; SONET G.; MORTELMANS J.; VANDEWYNKEL C.; GROOTAERT P. **Using DNA barcodes for assessing diversity in the family Hybotidae (Diptera, Empidoidea).** In: *DNA barcoding: a practical tool for fundamental and applied biodiversity research.* *ZooKeys* v.365, p. 263–278, 2013.

SANTOS A.P.M.; TAKIYA D.M.; NESSIMIAN J.L. **Integrative taxonomy of *Metrichia* Ross (Trichoptera: Hydroptilidae: Ochrotrichiinae) microcaddisflies from Brazil: descriptions of twenty new species.** *PeerJ*. 2016.

VARGAS, S.M.; ARAÚJO, F.C.F.; SANTOS, F.R. **DNA barcoding of Brazilian sea turtles (Testudines).** *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, n. 3, p. 608-612, 2009.

XU X.; LIU F.; CHEN J.; LI D.; KUNTNER M. **Integrative taxonomy of the primitively segmented spider genus *Ganthea* (Araneae: Mesothelae: Liphistiidae): DNA barcoding gap agrees with morphology.** *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 175, p. 288-306. 2015.