

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA BARCODE) DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *HAMADRYAS* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE).

Dyego Barros Daltro de Santana¹; Eddy José Francisco de Oliveira²

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: dyeego.santana@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: eddyfo@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Lepidoptera*, *Hamadryas*, DNA barcode

INTRODUÇÃO

A preservação da biodiversidade tem se tornado prioridade em todo o mundo, pois sabe-se que existe uma rede de interações entre as espécies e que qualquer dano a uma delas pode levar a modificações no *status* de espécies relacionadas, podendo prejudicar todo o complexo de gerações existentes nesse ecossistema (Savard *et al.*, 2000, Sih *et al.*, 2000).

A ordem Lepidoptera, uma das mais diversas entre os insetos, é composta por borboletas e mariposas. São conhecidas cerca de 160.000 espécies descritas no mundo (Kristensen *et al.* 2007), das quais, aproximadamente 40.000 espécies ocorrem no Brasil (Brown & Freitas, 1999).

Apesar da grande quantidade de espécies identificadas, faltam especialistas em taxonomia para identificar as milhares de espécies ainda desconhecidas e para identificar corretamente as chamadas “espécies crípticas” que, segundo Bickford *et al* (2006), são espécies que são ou já foram identificadas como uma única espécie por serem morfologicamente idênticas, mas que apresentam divergências moleculares.

Para sanar essas dificuldades, a opção mais utilizada é a técnica de *DNA barcoding*, que foi desenvolvida juntamente com as técnicas de PCR, e possibilita a identificação rápida e precisa de espécies através fragmentos de DNA, tanto nuclear quanto mitocondrial, únicos para cada espécie. Além disso, *DNA barcoding* pode ser utilizado para a identificação de espécies crípticas (Silva-Brandão *et al* 2009).

Graças a essa rápida identificação, alguns trabalhos importantes foram publicados a respeito da utilização do barcode em Lepidoptera, dentre os quais pode-se destacar Hajibabaei *et al* (2006) que comprova a eficiência do marcador COI (*cytochrome c oxidase I*) na identificação de espécies de Lepidoptera na Area de Conservación Guanacaste, localizada no noroeste da Costa Rica e Wahlberg *et al* (2005), que comprovaram a filogenia de diversas famílias de Lepidoptera com os genes nucleares EF-1 α e Wingless.

Das 27 espécies do gênero neotropical *Hamadryas* registradas na América Latina (<http://www.boldsystems.org>), 15 ocorrem no Brasil (<http://www.nic.funet.fi>), e nenhum trabalho sobre o DNA barcode dessas espécies brasileiras foi publicado. Esse projeto além de testar o DNA barcode em borboletas do Brasil, pode ajudar a conservar o patrimônio genético do país.

MATERIAL E MÉTODOS

Os indivíduos utilizados no trabalho foram coletados com uso de rede entomológica e armadilhas no Campus da Universidade Estadual de Feira de Santana, e foram identificados com base na literatura e nos exemplares que se encontram na Coleção Entomológica Professor Johann Becker do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Em laboratório, a extração do DNA total das amostras que se encontravam armazenadas a -20°C seguiu o protocolo adaptado a partir do proposto por Higuchi (1989).

Para amplificação das regiões do DNA mitocondrial, foram utilizados os iniciadores (primers) LepF e LepR (Hajibabaei et al. 2006). As reações de PCR foram realizadas seguindo o protocolo disponível no site do Canadian Centre for DNA Barcoding (CCDB), www.dnabarcoding.ca.

REAGENTES	x1
Trealose 10%	6,25µL
ddH ₂ O	2 µL
Tampão 10x	1,25 µL
MgCl ₂ 50mM	0,625 µL
10µM LepR	0,125 µL
10µM LepF	0,125 µL
10 mM dNTPs	0,0625 µL
TAQ Polimerase	0,06 µL
TOTAL	10, 5 µL
Amostra de DNA	2 µL por poço

Tabela 1: lista dos reagentes de acordo com o protocolo do CCBD.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (25µg/µL). Na corrida de eletroforese, foi usado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) Ladder (GE Healthcare®). Os fragmentos foram visualizados em transluminador e fotografados.

Os produtos da amplificação dos genes foram purificados com o protocolo de precipitação de DNA com PEG 20%. As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método direto, em ambas as direções – forward e reverse.

A diversidade intra-específica e a divergência inter-específica foram calculadas utilizando o modelo Kimura 2 parâmetros (K2P, Kimura 1980) no programa MEGA 4.0 (Tamura et. al. 2007).

Nesse mesmo programa uma árvore de Neighbor-Joining (NJ) foi construída utilizando uma matriz de caracteres com todos os táxons, utilizando o modelo K2P e aplicando-se 1000 réplicas de bootstrap, para obter o suporte dos agrupamentos (Felsenstein 1985). Adicionalmente foram utilizadas 201 sequências do gênero *Hamadryas* depositadas no NCBI e como grupo externo foi utilizada a sequência do gene COI de espécies pertencentes aos gêneros *Ectima* e *Panacea*, que segundo Murillo-Hiler (2012) são gêneros irmãos de *Hamadryas*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 32 espécimes foi coletado para a realização do estudo, sendo 16 espécimes de *Hamadryas februa* e 16 de *H. feronia*. Após as reações de PCR e sequenciamento, foram obtidas 32 sequências, que após análise, correção e alinhamento, originaram 18 sequências finais utilizadas para a confecção de um dendograma através do método Neighbour-joining (Figura 1).

O tamanho médio encontrado nas sequências foi de 643 pares de bases, correspondendo à posição entre 7 e 650 do mesmo gene das sequências depositadas no NCBI.

Para dados do projeto DNA *Barcode of Life* geralmente a análise de dados é feita através de Neighbor-Joining (NJ), uma vez que este exige menos tempo computacional e possui um bom desempenho junto às baixas taxas de divergência (Hebert *et al.* 2003).

Assim sendo, um dendograma foi construído tendo como base as 18 sequências finais (dez sequências de *H. feronia* e oito de *H. februa*). Como grupo externo foram adicionadas espécies pertencentes aos gêneros *Ectima* e *Panacea*, que segundo Murillo-Hiler (2012) são gêneros irmãos de *Hamadryas*, para verificar a veracidade das sequências obtidas (Figura 1). Os valores de bootstrap, na maioria dos clado, foram altos (80 – 100%).

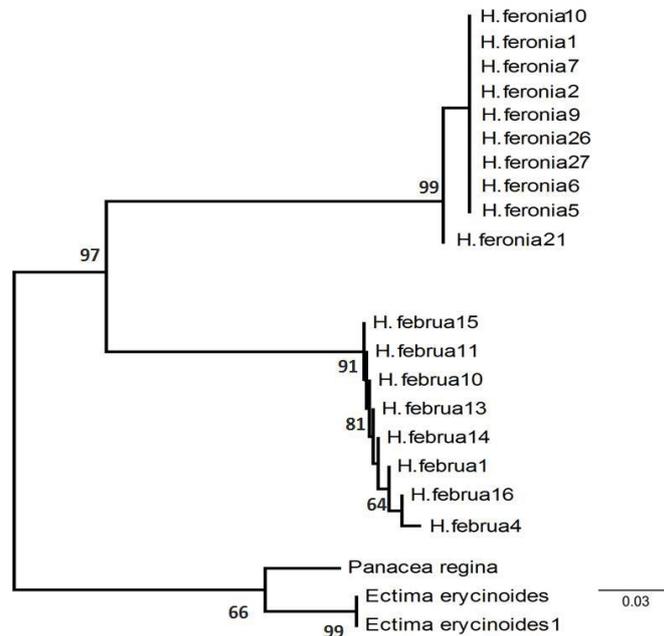


Figura 1: Árvore de Neighbor-Joining das distâncias (K2P) entre as sequências de COI de 18 espécimes de *Hamadryas* (*H. februa* e *H. feronia*).

A análise de todas as sequências de *Hamadryas* depositadas no NCBI (201 sequências de 12 espécies) mostraram que *H. februa* do presente estudo formaram um o clado separado do grupo de *H. februa* da América Central e do Norte. Para um indivíduo de *H. feronia* (21), a inadequação foi comprovada e uma reidentificação deverá ser feita (figura 2). Em casos como este, o veredito molecular e morfológico não coincidem, ocasionando situações em que indivíduos de uma mesma espécie apresentam profundas divergências entre suas sequências *barcode* ou casos em que indivíduos de duas espécies diferentes compartilham sequências próximas entre si (Hebert *et al.* 2003).

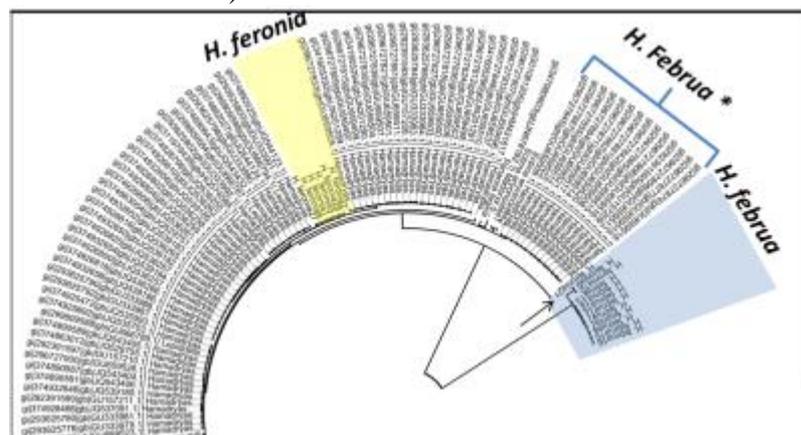


Figura 2: árvore filogenética. Destaque para a posição de *H. februa* e *H. feronia* utilizadas no estudo. *H. februa**: exemplares da América Central e do Norte.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A abordagem do DNA *barcode* surge de uma crescente necessidade de obter conhecimento sobre a biodiversidade de uma forma mais acurada e mais rápida. Com relação

aos lepidópteros, a identificação errônea ou imprecisa de espécies é um problema significativo e abordagens exclusivamente morfológicas têm limitações para a identificação devido ao baixo número de taxonomistas capazes de realizar a identificação, bem como para a identificação de espécies crípticas.

A identificação molecular dos 18 espécimes estudados foi compatível com a identificação morfológica, confirmando o sucesso da ferramenta DNA *barcode* para a determinação de espécies, pelo menos do gênero *Hamadryas*, que ocorrem no Brasil.

Contudo, a utilização de sequências de *barcode* não deve ser o único critério a ser utilizado para a identificação de espécies, e sim um suporte para os especialistas em taxonomia quando os métodos tradicionais se mostram pouco eficientes para tal atividade.

REFERÊNCIAS

- SAVARD, J.L.; CLERGEAU, P.; MENNECHEZ, G. 2000. Biodiversity concepts and urban ecosystems. *Landscape and Urban Planning*, 48, 131-142.
- SIH, A.; JONSSON, B.G.; LUIKART, G. 2000. Habitat loss: ecological, evolutionary and genetic consequences. *Trends in Ecology and Evolution*, 15, 132-134.
- SILVA-BRANDÃO, K.L.; LYRA, M.L.; FREITAS, A.V.L. 2009. Barcoding Lepidoptera: Current Situation and Perspectives on the Usefulness of a Contentious Technique. *Neotropical Entomology*, 38(4).
- KRISTENSEN, N.P.; SCOBLE, M.J. & KARSHOLT, O. 2007. Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. *Zootaxa* 1668:699-747.
- BROWN Jr., K.S. & FREITAS, A.V.L. 1999. Lepidoptera. In *Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX*, 5: invertebrados terrestres (C.R.F. Brandão & E.M. Cancellato, org.). FAPESP, São Paulo, p.227-243.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; SODHI, N.S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; DRAS, I. 2003. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *TRENDS in Ecology and Evolution*, vol.22 n°33.
- HAJIBABAEI, M.; JANZEN, D.H.; BURNS, J.M.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P.D.N. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *PNAS*, vol. 103, n°4, 968-971.
- HERBERT, P. N. D. 2003. Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 313-321.
- HIGUCHI, R. 1989. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In *PCR technology* (ed. H.A. Erlich), Stockton Press, pp. 31-38.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- MURILLO-HILLER, L.R. 2012. Phylogenetic Analysis of the Subtribe Ageroniina with Special Emphasis on *Hamadryas* (Lepidoptera, Nymphalidae) with an Identification Key to the Species of *Hamadryas*. *ISRN Zoology*, 17p.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. 2007 MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- WAHLBERG, N., BRADY, M.F., BROWER, A.V.Z., de JONG, R., LEE, M., NYLIN, S., PIERCE, N.E., SPERLING, F.A.H., VILA, R., WARREN, A.D, ZAKHAROV, E. 2005. Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogeny of butterflies and skippers. *Proceedings of The Royal Society*. 272:1577-1586