

EFICÁCIA DO DNA BARCODE PARA IDENTIFICAÇÃO ESPÉCIES DE ESPÉCIES DE *Oxysarcodexia* (DIPTERA, SARCOPHAGIDAE)

TAÍS MADEIRA¹; PATRÍCIA JACQUELINE THYSSEN²; JULIANA CORDEIRO³

¹Universidade Federal de Pelotas – tais18m@hotmail.com

²Universidade Estadual de Campinas – thyssenpj@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – jlncdr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

DNA Barcode é uma técnica molecular padronizada que propõe a identificação de espécies através da utilização de uma região de 648pb do gene mitocondrial citocromo oxidase, subunidade I (*COI*) apresentando como premissa o fato de que os indivíduos de uma mesma espécie apresentem um padrão de sequências nucleotídicas que atuam como um ‘código de barras’ para o reconhecimento da espécie (HEBERT et al., 2003). Essa técnica está bem estabelecida (HAJIBABAEI, et al., 2006) possibilitando a potencial identificação dos espécimes de forma confiável, relativamente rápida e barata.

Oxysarcodexia é um gênero da família Sarcophagidae (Diptera, Insecta) que se destaca como um dos gêneros mais diversos desta família na Região Neotropical (PAPE, 1996). Esse grupo apresenta indivíduos associados a uma ampla gama de recursos, tais como fezes, carcaças e vísceras (DIAS et al., 1984), inclusive cadáveres, o que lhes confere importância forense (KUTTY et al., 2010).

A utilização de indivíduos desse gênero para a análise forense é dependente da identificação correta das espécies. Contudo, o uso de sarcófagídeos de forma geral é dificultada devido à semelhança morfológica entre as espécies, cuja identificação se restringe à observação da genitália masculina de indivíduos adultos (CARVALHO; MELLO-PATIU, 2008).

Dessa forma, a técnica de *DNA barcode* é a alternativa para a identificação de sarcófagídeos encontrados em cenas criminais, visto que é capaz de transpor o impedimento taxonômico, além de tornar o procedimento de identificação das espécies mais rápido. Este trabalho tem como objetivo avaliar a efetividade do método de *DNA Barcode* na identificação de espécies de *Oxysarcodexia* (Diptera: Sarcophagidae) encontradas nos Estados do Rio Grande do Sul e São Paulo.

2. METODOLOGIA

Os espécimes foram coletados com armadilhas adaptadas por MORETTI et al. (2009), expostas em campo por 72 horas, contendo isca atrativa. Em laboratório, o material foi triado, preservado em etanol absoluto e armazenado a 4°C. Posteriormente, os indivíduos foram identificados com auxílio de chaves taxonômicas (CARVALHO; MELLO-PATIU, 2008; VAIRO et al., 2011).

O DNA de nove indivíduos de *O. admixta* e cinco indivíduos de *O. carvalhoi* foi extraído com o kit de extração de *DNA DNeasy® Blood&Tissue Kit* (Qiagen). O gene *COI* foi amplificado com o par de *primers* LCO1490 e HCO2198, descritos por FOLMER et al. (1994). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µl, conforme protocolo indicado pelo fabricante da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). O programa de PCR foi realizado da seguinte forma: 3min

de desnaturação a 95°C, 35 ciclos de 1min a 95°C, 1min a 48°C e 1,5min a 72°C, finalizando com 5min a 72°C.

Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese de gel de agarose 1% e purificados com o kit *QIAquick® PCR Purification* (Qiagen). O sequenciamento foi realizado na empresa MacroGen (<http://www.macrogen.com/eng>). Ambas as fitas forward e reverse foram sequenciadas.

Após a edição das sequências pelo programa Staden Package (STADEN, 1996), a matriz de dados foi montada no programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013) e o alinhamento foi realizado com o algoritmo ClustalW, inserido no MEGA6. Foi realizada uma análise filogenética utilizando o método evolutivo Neighbor-Joining com o modelo de evolução das sequências Kimura 2-parâmetros (K2P), conforme indicado pela técnica de *DNA Barcode* (HEBERT et al., 2003). As divergências nucleotídicas intra e interespecíficas foram analisadas utilizando o programa MEGA6. A identificação de *Barcode Gap* foi realizada com o programa *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) (PUILLANDRE et al., 2012). A sequência da espécie *Sarcophaga subvicina* (GBDP12453-12), obtida no BOLD (<http://www.boldsystems.org/>), foi utilizada como grupo externo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram amplificados aproximadamente 700pb do gene mitocondrial *COI* das espécies *O. admixta* e *O. carvalhoi*. Foi gerada uma árvore filogenética a partir da análise com o método evolutivo Neighbor-Joining e modelo de evolução das sequências K2P (Figura 1). Verificou-se que os indivíduos, identificados morfológicamente como pertencentes à mesma espécie, foram agrupados de forma monofilética.

As análises intraespecíficas apresentaram valores de divergência de 0,006 para *O. carvalhoi* e 0,007 para *O. admixta*. Estes valores são esperados para distâncias genéticas entre indivíduos de mesma espécie. Já as análises de divergência interespecíficas resultaram em um valor de 0,021, ou seja, abaixo do valor de limite entre duas espécies considerado pelo barcode (0,03) (HEBERT et al., 2003).

A análise de identificação de Barcode Gap, ABGD, encontrou seis espécies hipotéticas com valor de $p = 0,001$ (grupo 1: sequências do clado A com exceção de *OadmixaJun4*; grupo 2: sequências do clado B; grupo 3: sequência *OadmixaJun4*; grupo 4: sequências do clado D; grupo 5: *OcarvalhoiMogi3*; grupo 6: *OcarvalhoiMogi5*) (ver Figura 1). De forma menos significativa ($p = 0,007$) agrupou as sequências em três potenciais espécies (grupo 1: clado A; grupo 2: clado B; grupo 3: clado C) (ver Figura 1).

Do ponto de vista morfológico, a genitália, o cerco e a forma do falo são muito similares entre as duas espécies; embora *O. admixta* não apresente uma concavidade ventro-apical no *distiphallus*, e sua *vesica* é menos desenvolvida quando comparada com *O. carvalhoi* (SOUZA, 2014). Com isso, podemos supor que os espécimes aqui analisados são espécies diferentes, porém com uma diversificação recente, como identificado por SOUZA (2014).

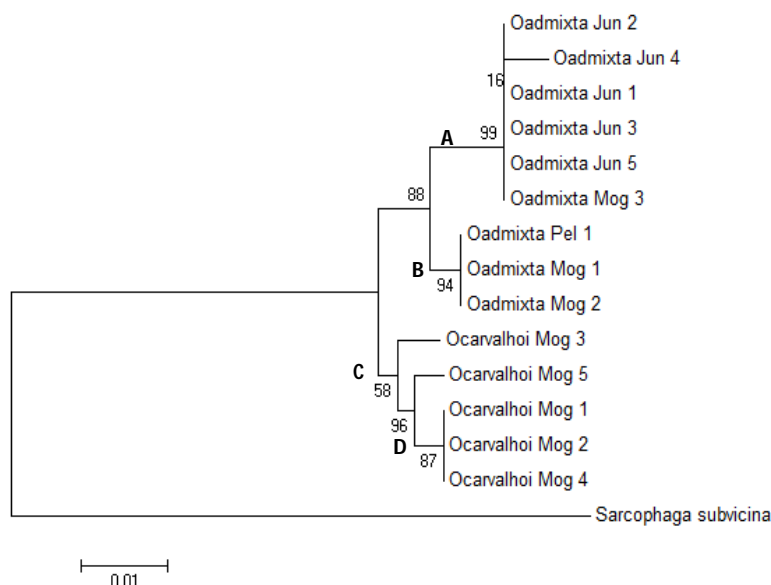


Figura 1 - Árvore filogenética das sequências analisadas gerada pelo método evolutivo Neighbor-Joining, modelo de evolução das sequências Kimura 2-parâmetros, com 1000 réplicas de reamostragem de Bootstrap. As letras A, B, C e D indicam os clados comentados no texto.

4. CONCLUSÕES

Concluimos que apesar da técnica de DNA barcode não ter sido eficaz para a divergência interespecífica de *O. admixta* e *O. carvalhoi*, foi possível verificar o agrupamento de indivíduos das espécies morfologicamente distintas, permitindo distingui-las como espécies com divergência recente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, C. J. B.; MELLO-PATIU, C. A. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 52, n.3, p. 390-406, 2008.
- DIAS, E.S.; NEVES, D.P.; LOPES, H. S. Estudos sobre a fauna de Sarcophagidae (Diptera) de Belo horizonte, Minas Gerais III – Atratividade das iscas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.79, n. 4, p. 413-417, 1984.
- HAJIBABAEI, M.; JANZEN, D. H.; BURNS, J. N.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **PNAS**, v. 103 n. 4, p. 968–971, 2006
- HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society**, Londres, v. 270, p. 313–321, 2003.
- KUTTY, S. N. et al. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorrhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of

Mystacinobiidae and McAlpine's fly. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 35, p. 614–635, 2010.

MORETTI, T.C.; THYSSEN, P. J.; SOLIS, D. R. Breeding of the scuttle fly *Megaselia scalaris* in a fishcarcass and Implications for the use in forensic entomology (Diptera: Phoridae). **Entomology Generalis**, Stuttgart, v.31, n. 4, p. 349–353, 2009.

PAPE, Thomas. **Catalogue of the Sarcophagidae of the world (Insecta: Diptera)**. Gainesville: Associated Publishers, 1996. 558 p.

PUILLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 1864-77, 2012.

SOUZA, C.M. **Diversidade de espécies e abordagem filogenética do gênero *Oxysarcodexia* Townsend, 1917 (Diptera: Sarcophagidae)**. 2014. 212f. Tese (Doutorado em arazitologia) – Curso de Pós-graduação em Parasitologia, Universidade Estadual de Campinas.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 5, p. 233-241, 1996

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.30, p.2725-2729, 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.30, p.2725-2729, 2013.

VAIRO, K.P.; MELLO-PATIU, C.A.; CARVALHO, C.J.B. Pictorial identification key for species of Sarcophagidae (Diptera) of potential forensic importance in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 55, n. 3, p. 333-347, 2011.