

## O quase código da vida, quase...

Lucas Henrique de Almeida\*; Pitágoras da Conceição Bispo

Departamento de Ciências Biológicas. Faculdade de Ciências e Letras. Univ Estadual Paulista. UNESP - Câmpus de Assis. Avenida Dom Antonio, 2100, Parque Universitário - 19806-900 - Assis-SP. \*lucasalmeida768@yahoo.com.br

Palavras-chave: COI, diversidade, insetos aquáticos, **taxonomia**.

No dia a dia estamos acostumados a realizar diversas tarefas, uma delas é fazer compras nos supermercados. Como se trata de uma atividade rotineira, pode ser que alguns detalhes passem despercebidos. Já parou para pensar porque cada produto tem um código de barras? E o que são estes códigos de barras? Os códigos de barras são sequências numéricas representadas por barras escaneáveis e exclusivas que servem para individualizar os produtos, ou seja, cada tipo de produto possui um código único. É dessa maneira que ao passarmos o produto pelo caixa conseguimos imediatamente saber seu preço, além disso, o estabelecimento comercial consegue organizar os produtos e manter um controle maior sobre cada um deles, como alterações de preço e o controle do prazo de validade.

Mas porque estamos falando sobre códigos de barras de supermercados? É simples, em 2003 uma nova estratégia para documentar a diversidade biológica, inspirada nos códigos de barras, foi proposta. A ideia era encontrar uma sequência de **DNA** que servisse como código para todos os tipos de seres vivos existentes e que fosse capaz de separá-los adequadamente, como acontece com os produtos dos supermercados. Assim, cada espécie teria sua própria sequência, o que tornaria possível o seu reconhecimento, esta estratégia ficou conhecida como *DNA Barcode*. Na época uma grande expectativa tomou conta da comunidade científica, porém, aos poucos, cientistas foram

constatando que a ideia de utilizar a sequência de um único gene, como código para separar cada um dos seres vivos não seria possível.

Mesmo reconhecendo a limitação, a ideia avançou e hoje temos métodos bem estabelecidos e grandes bancos públicos de dados (como exemplo o GenBank que armazena sequências de DNA, RNA e proteínas). Atualmente se reconhece que o gene mais eficiente para a separação das espécies depende do grupo e que, no caso de animais, o DNA do **gene mitocondrial COI** (citocromo c oxidase subunidade I) pode ser bastante eficiente.

Neste contexto, começamos a aplicar a técnica do *DNA Barcode* no estudo de insetos da ordem Plecoptera do Estado de São Paulo. Os **plecópteros** são encontrados em riachos com correnteza, pois esses ambientes possuem características físico-químicas particulares, como por exemplo, a elevada oxigenação da água. Seus estágios imaturos vivem na água, sendo alguns deles **detritívoros e raspadores**, ao passo que outros são **predadores**. Os adultos são terrestres e habitam a vegetação às margens dos riachos. Estes insetos são importantes **bioindicadores** de qualidade ambiental, pois são sensíveis aos efeitos negativos causados pelas **atividades antrópicas** ocorridas nos riachos e/ou em suas margens.

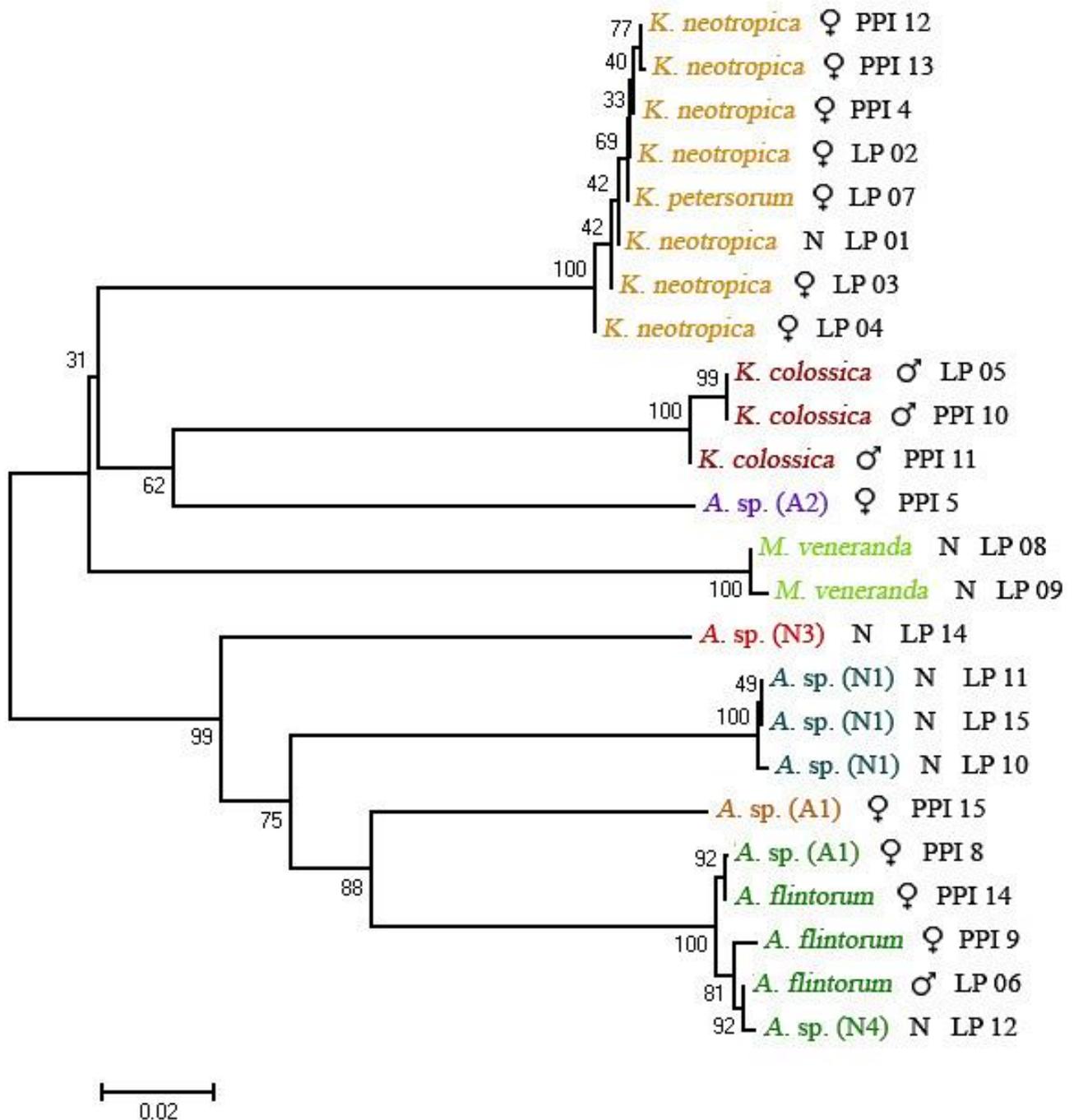
Assim, é importante saber identificar esses animais ao nível de espécie, para que eles possam ser utilizados em outros tipos de estudos como, por exemplo, de **biomonitoramento ambiental**. A identificação desses insetos é feita através da identificação morfológica dos machos adultos, pois as estruturas reprodutivas dos machos são bastante diferentes entre as espécies. Já as fêmeas são difíceis de identificar porque possuem pouca diferenciação, e os estágios imaturos são praticamente desconhecidos. Para efeito ilustrativo, no Brasil são encontradas duas famílias desses insetos, as famílias Perlidae e Gripopterygidae. A primeira (foco do estudo demonstrado neste artigo) é representada por quatro gêneros, são eles: *Anacroneuria*, *Enderleina*, *Kempnyia* e *Macrogynoplax*. Com exceção de *Enderleina*, os demais gêneros ocorrem no Estado de São Paulo.

É justamente para aumentar o conhecimento acerca da identificação dos plecópteros que o nosso grupo de pesquisadores começou a utilizar a técnica de *DNA Barcode*, visando relacionar os

estágios imaturos com os respectivos adultos. Até recentemente, a única forma de obter esta relação era criar o imaturo até tornar-se um adulto (procedimento muito difícil, devido à alta sensibilidade dos imaturos às alterações no ambiente).

**Espécimes de perlídeos** foram coletados no Parque Estadual Intervales (PEI), um dos resquícios de Mata Atlântica mais bem conservados do Estado de São Paulo. Foram amostrados três riachos, nos quais os imaturos foram coletados em meio às pedras do leito do riacho com a ajuda de puçás e os adultos com a ajuda de armadilhas luminosas de atração. Após a coleta, os insetos foram colocados em álcool 100% e então levados ao laboratório para serem identificados com base em sua morfologia. Os adultos foram identificados ao nível de espécie e os imaturos ao nível possível (sendo **morfortipados** quando preciso). Posteriormente, os adultos identificados e os imaturos em estágios mais avançados foram selecionados para a extração e sequenciamento do gene COI, permitindo, assim, que cada indivíduo recebesse um “código”. Com as sequências em mãos, utilizando programas específicos, foi construído um dendrograma (Figura 1) utilizando o método do “Agrupamento de Vizinhos”. Este método (do inglês “*Neighbor-joining*”) tem como finalidade interpretar as sequências de DNA e agrupar as mais parecidas. Dessa forma conseguimos relacionar os imaturos aos adultos e, conseqüentemente, identificar as suas respectivas espécies.

Como é possível notar na Figura 1, a análise de Agrupamento de Vizinhos das sequências do gene COI de 24 indivíduos resultou em oito linhagens genéticas diferentes, cada uma delas representada por uma cor diferente. É possível notar também que dois imaturos, LP 01 e LP 12, foram relacionados com adultos, o que demonstra que a técnica realmente é eficaz para identificar e associar os estágios destes insetos. O imaturo LP 01 é da espécie *Kempnyia neotropica*, a qual já havia sido descrita por meio de sua criação em laboratório (Figura 2). O imaturo LP 12 é muito jovem, porém, com a análise do COI foi possível associá-lo a espécie *Anacroneuria flintorum*.



**Figura 1.** Árvore (dendograma) obtida através de Agrupamento de Vizinhos de seqüências de COI. Os espécimes estão coloridos de acordo com a espécie. N: Estágio imaturo. (A) Morfotipo adulto e (N) imaturo. ♂: Macho. ♀: Fêmea. PPI/LP: Códigos de identificação.



**Figura 2.** A: Imaturo de *Kempnyia neotropica* (LP 01). B: Fêmea adulta de *Kempnyia neotropica* (PPI 4).

Este tipo de trabalho nos capacita identificar as espécies correspondentes aos estágios imaturos com maior rapidez. No Brasil, o estudo dos insetos da ordem Plecoptera utilizando a técnica do *DNA Barcode* iniciou-se com pesquisadores do Estado do Rio de Janeiro e está sendo realizado também em Assis, São Paulo. Tendo em vista os benefícios da utilização do COI demonstrados aqui, a perspectiva é que a técnica também se dissemine entre os pesquisadores de outros grupos de insetos aquáticos, possibilitando a identificação dos estágios imaturos. A ideia é que exista uma integração entre a identificação morfológica convencional e a utilização de tecnologias moleculares ampliando a nossa capacidade de documentação da biodiversidade.

## Glossário

**Atividade antrópica** - atividade resultante da atuação do homem.

**Bioindicadores** - são espécies, populações ou comunidades biológicas cuja presença, abundância e condições são indicativos biológicos de uma determinada condição ambiental.

**Biomonitoramento ambiental** - acompanhamento das condições ambientais de determinado local utilizando sensores biológicos, ou bioindicadores.

**Detritívoros** - animais que se alimentam de restos orgânicos.

**DNA** - composto orgânico transmitido hereditariamente, que contém as instruções genéticas, que coordenam o desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos.

**Espécimes** - indivíduos.

**Gene mitocondrial** - unidade do DNA presente nas mitocôndrias, menos diferenciado entre indivíduos da mesma espécie, pois não apresenta recombinação gênica.

**Morfotipados** - tipos morfológicos estabelecidos quando não é possível a identificação nominal.

**Perlídeo** - inseto pertencente à ordem Plecoptera, da família Perlidae.

**Plecópteros** - insetos da ordem Plecoptera.

**Predadores** - animais que se alimentam de outros animais.

**Raspadores** - animais que raspam o substrato em busca de alimento.

**Taxonomia** - ciência que visa à descrição da biodiversidade.

#### Referências Bibliográficas

Almeida, L.H. 2015. **Identificação molecular de Perlidae (Plecoptera) do Parque Estadual Intervales, Estado de São Paulo**. Trabalho de Graduação (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências e Letras, UNESP, Assis.

Hebert, P.D., Ratnasingham, S. & de Waard, J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 270 (Suppl 1): S96–S99.