

SISTEMÁTICA MOLECULAR DE DROSOFILÍDEOS MICÓFAGOS

COORDENADOR:

Elgion Lúcio da Silva Loreto – Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal (PPGBA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) –

Curriculum lattes: <http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.jsp?id=K4785575A7>

DEMAIS PARTICIPANTES:

Lizandra Jaqueline Robe – Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal (PPGBA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) –

Curriculum lattes: <http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.jsp?id=C861113>

Marco Silva Gottschalk – Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Rio Grande (FURG) –

Curriculum lattes: <http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.jsp?id=C126940>

ESTUDANTES:

João Pedro Junges dos Santos - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal (PPGBA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) –

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.jsp?id=K4217131T5>

Francine Cenzi de Ré Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal (PPGBA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.jsp?id=K4245036Y0>

Stela Machado - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal (PPGBA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) –

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.jsp?id=K4233488D9>

SISTEMÁTICA MOLECULAR DE DROSOFILÍDEOS MICÓFAGOS

O projeto proposto faz parte da linha de pesquisa envolvendo "Taxonomia, filogenia, filogeografia e evolução molecular nos Neotrópicos", que vem sendo desenvolvida junto ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal (PPGBA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob coordenação do Prof. Dr. Elgion Lucio da Silva Loreto. Além disso, este projeto está diretamente vinculado ao projeto de pós-doutorado "Filogenética molecular como ferramenta para a modernização das linhas de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal" desenvolvido atualmente pela Dra. Lizandra Jaqueline Robe e ao projeto PRONEX – Fapergs/CNPq “Evolução dos Pampas: padrões evolutivos e impacto das alterações ambientais sobre a diversidade biológica dos Biomas Sulinos” coordenado pela Profa. Dra. Vera Lúcia Gaiesky Valente. Este projeto tem ainda como colaborador o Prof. Dr. Marco Silva Gottschalk, recentemente contratado pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG), e está vinculado aos projetos de mestrado dos estudantes Francine Cenzi de Ré e João Pedro Junges, e ao projeto de doutorado da aluna Stela Machado, todos vinculados ao PPGBA-UFSM Trata-se, pois, de uma iniciativa de integrar grupos distribuídos em diferentes Universidades do Rio Grande do Sul, na tentativa de auxiliar na compreensão da biodiversidade de drosofilídeos micófagos brasileiros, um importante, mas ainda essencialmente desconhecido, grupo de espécies pertencentes à família Drosophilidae, cujos padrões e processos evolutivos e ecológicos ainda não foram elucidados. Este é um projeto de impacto junto à comunidade científica brasileira e mundial, que busca preencher lacunas no conhecimento taxonômico e evolutivo de uma importante família de dípteros (Drosophilidae).

I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA

Drosophilidae apresenta, atualmente, 76 gêneros descritos, com mais de 4.000 espécies (Bächli, 2010), distribuídas em todas as regiões biogeográficas da Terra, com exceção das regiões Árticas (Patterson & Stone, 1952; Throckmorton, 1975). Desde os tempos de Morgan e seus colaboradores, diversas espécies pertencentes a esta família tem se constituído em organismos-modelo ideais para os mais diferentes estudos evolutivos (Markow & O’Grady, 2007). Entretanto, a despeito do fato de drosofilídeos possam encontrar-se associados tanto a hábitos frugívoros, quanto a hábitos micófagos e antófilos (Val et al., 1981), a grande maioria dos estudos realizados até o momento foca em espécies que utilizam frutos fermentados como substrato de alimentação e/ou oviposição (Döge et al., 2007). Além disso, há que se destacar ainda as tendenciosidades relacionadas ao estudo preferencial de espécies pertencentes ao gênero *Drosophila*, em detrimento de grande parte das demais, o que ocorre em nível mundial.

Segundo Gottschalk et al. (2008), existem 304 espécies de Drosophilidae descritas para o Brasil, sendo que a maioria destas pertence à *Drosophila* (181 espécies). Outros gêneros estão presentes, entretanto, em menor frequência, como por exemplo: *Zygothrica* com 54 espécies, *Hirtodrosophila* com dezesseis, *Leucophenga* com seis espécies, e *Mycodrosophila* com três espécies ocorrendo em nosso país.

Neste aspecto, entretanto, é necessário ressaltar que estes números refletem uma provável subestimativa. Gottschalk et al. (2008) demonstram que os estudos com Drosophilidae conduzidos no Brasil concentram-se amplamente nas regiões Sul e Sudeste do país. Mesmo nessas regiões, entretanto, o gênero *Drosophila* apresenta um amplo destaque frente aos demais gêneros, sendo que a amostragem destes é pelo menos duas vezes menor do que de *Drosophila* em todos os estados brasileiros, com exceção do Rio de Janeiro, São Paulo, Pará e Rondônia. Estas tendenciosidades amostrais também refletem a estratégia de coleta utilizada pelos pesquisadores, já que na maior parte delas é utilizada isca de banana para atrair as moscas, o que recupera, preferencialmente, espécies de *Drosophila* (Döge et al., 2007). Neste sentido, em concordância, com Val et al. (1981) e Gottschalk et al. (2008) demonstram que a maior parte dos gêneros de Drosophilidae não tem recebido a merecida atenção por parte da comunidade científica.

Em face a presente crise da biodiversidade, uma das primeiras tarefas relacionadas à conservação é o conhecimento das espécies existentes. A proposta do DNA-Barcode foi formalizada por Hebert et al. (2003a), e se baseia no uso de uma pequena sequência padronizada de aproximadamente 648 pares de bases da extremidade 5' do gene citocromo c oxidase 1 (COI), que segundo seus autores tem o potencial de proporcionar um “salto quântico” na taxa com que espécies são registradas (Hoag, 2010). A tecnologia do DNA-Barcode agrupa dois objetivos diferentes e independentes (Hebert et al., 2003a): (1) identificar e designar espécimes desconhecidos a espécies previamente descritas; (2) facilitar a descoberta e o diagnóstico de novas espécies, auxiliando a desvendar a diversidade críptica. Segundo Hebert et al. (2003a), este marcador é capaz de distinguir indivíduos de diferentes espécies porque a variação genética entre espécies excede aquela apresentada dentro das espécies.

A grande vantagem do DNA-Barcoding frente à taxonomia morfológica está refletida em uma solução para o impedimento taxonômico, ou seja, à impossibilidade de cumprir a tarefa de descrever toda a diversidade dado o baixo número de sistematas. Entretanto, a taxonomia molecular implementada por meio do uso da tecnologia do DNA-Barcoding apresenta importantes restrições, tais como (Moritz & Cícero, 2004; Packer et al., 2009; Whitworth et al., 2007): (1) retenção de polimorfismo ancestral; (2) migração diferencial entre os sexos com estruturação assimétrica; (3) seleção em nível de DNA mitocondrial ou outro DNA materno herdado; (4) introgressão devido à hibridação entre espécies; (5) paralogia resultante de cópias nucleares do gene alvo; (6) negligência de espécies novas, que divergiram

recentemente, e ainda não acumularam maiores níveis de diferenciação; (7) casos em que as variações intra e interespecífica se sobrepõem ou em que as espécies não são monofiléticas.

Entretanto, é importante destacar que a execução da taxonomia alfa por meio de técnicas baseadas no uso de caracteres morfológicos também apresenta algumas importantes limitações (Hebert et al., 2003b; Hebert et al., 2004b; Valentini et al., 2008): (1) A presença de plasticidade fenotípica e variabilidade intraespecífica para os caracteres empregados, o que pode levar a identificações incorretas; (2) Táxons crípticos, comuns em muitos grupos e regiões, podem ser erroneamente agrupados; (3) As chaves morfológicas costumam ser eficazes para apenas alguns estágios do ciclo de vida e/ou para apenas um dos sexos; (4) A frequência de erros devido à má utilização das chaves biológicas, que requerem um grande nível de especialização e entendimento.

Neste sentido, a tecnologia do DNA-Barcode apresenta-se como uma técnica promissora, cujas vantagens e desvantagens merecem ser testadas em grupos individuais de organismos. A implementação desta técnica apresenta, pois, o potencial de promover a compreensão adequada da biodiversidade brasileira, especialmente dos organismos ainda amplamente desconhecidos, como é o caso dos drosofilídeos micófagos brasileiros. Além disso, marcadores moleculares também podem ser utilizados na avaliação dos padrões e processos evolutivos e ecológicos subjacentes à biodiversidade, sendo que dados de distribuição obtidos durante a realização das coletas podem ser empregados na modelagem dos impactos relacionados a mudanças ambientais futuras.

II – OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Dadas as circunstâncias acima mencionadas, o presente projeto tem como objetivo principal auxiliar na delimitação da biodiversidade de drosofilídeos micófagos na região Neotropical, contribuindo ainda para a compreensão dos padrões e processos associados à evolução e à ecologia dos mesmos.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Contribuir para o entendimento da biodiversidade zoológica brasileira, na forma de um grupo de insetos ainda essencialmente desconhecido, os drosofilídeos micófagos;
- ✓ Testar a utilidade da tecnologia de DNA-Barcode para identificação de drosofilídeos micófagos, bem como na descoberta e delimitação de novas espécies;
- ✓ Contribuir para a redução do impedimento taxonômico relacionado a estas espécies ao promover a rápida identificação possibilitada pela implementação da tecnologia de DNA-Barcode (uma vez que sua utilidade se confirme);
- ✓ Auxiliar na resolução de questões relacionadas à história evolutiva de diversas espécies pertencentes à família Drosophilidae;

- ✓ Analisar os padrões e processos evolutivos associados à diversificação e estruturação das espécies amostradas;
- ✓ Avaliar os impactos ambientais relacionados ao aquecimento climático na distribuição das espécies de drosofilídeos micófagos junto aos Neotrópicos.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

COLETA DE AMOSTRAS

Drosofilídeos adultos serão coletados de fungos com o auxílio de um aspirador entomológico, de armadilhas com iscas de banana e de rede entomológica. No primeiro, as amostras envolverão indivíduos encontrados pousados sobre ou sobrevoando corpos de frutificação de fungos. Também poderão ser obtidos indivíduos imaturos através da coleta dos corpos de frutificação de fungos macroscópicos, sendo estes frutos levados ao laboratório para o término do desenvolvimento das larvas de Drosophilidae e obtenção dos adultos.

As coletas serão realizadas em diversos municípios distribuídos especialmente ao longo das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste Brasileiro. Em cada uma delas, os fungos serão procurados em áreas de mata úmida, nativa ou reflorestada.

Os indivíduos coletados serão armazenados em frascos fechados com álcool absoluto (que mantém a integridade do DNA por mais tempo).

DETERMINAÇÃO DOS INDIVÍDUOS

Os indivíduos coletados serão identificados por meio da análise da morfologia externa e terminália masculina (preparada de acordo com Wheeler & Kambyzellis, 1966, modificada por Kaneshiro, 1969), sendo comparadas com descrições e revisões encontradas na literatura especializada. Além disso, em caso de necessidade, poderão ser visitadas coleções científicas para comparação do material coletado com espécimes tipo depositados, como a Coleção Entomológica do Instituto Osvaldo Cruz, a Coleção de Diptera do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e a Coleção de Diptera do Museu Nacional do Rio de Janeiro, onde está depositada a maior parte dos espécimes-tipo da fauna neotropical de Drosophilidae. Dez por cento dos indivíduos de cada espécie coletada serão reservados para análises morfológicas e depositados na Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul para testemunho do estudo.

MANIPULAÇÃO DO DNA

O DNA será extraído individualmente de moscas inteiras com o uso do kit NucleoSpin Tissue XS (MACHEREY-NAGEL). Posteriormente, a amplificação por PCR dar-se-á com o uso dos seguintes pares de primers (Simon et al., 1994): (1) TYJ1460 e C1N2329M para o gene mitocondrial Citocromo Oxidase c Subunidade I (COI); e (2) TL2J3037 e TKN3785 para o gene mitocondrial Citocromo Oxidase c Subunidade II (COII).

Os amplicons assim obtidos serão purificados com o uso de uma solução contendo PEG 13% e NaCl 1.6M e, então, diretamente sequenciados. Neste caso, o sequenciamento dar-se-á em um sequenciador automático MegaBACE 500, utilizando a técnica de terminação de cadeia implementada mediante utilização do kit DYEnamic ET® (Amersham), de acordo com o protocolo fornecido, e com o uso dos mesmos primers utilizados na PCR.

ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A montagem dos eletroferogramas será realizada com o uso do pacote Staden (Staden, 1996). As sequências consenso assim obtidas terão sua identidade confirmada pelo uso do BLASTN (NCBI site), sendo então, alinhadas entre si no programa ClustalX 2 (Larkin et al., 2007).

Análises de Distância

As distâncias intra e interespecífica serão avaliadas pela utilização do modelo Kimura dois parâmetros (Kimura, 1980).

Análises evolutivas

As análises serão executadas isolada e conjuntamente para os dois genes, mediante utilização dos seguintes métodos:

- a) Critério de Neighbor Joining, a ser executado no MEGA 4 (Tamura et al., 2007);
- b) Método de Máxima Parcimônia, realizado no PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003);
- c) Método de Máxima Verossimilhança, segundo o modelo indicado pelo ModelTest (Posada & Crandall, 1998), executado no PAUP 4.0b10;
- d) Análise Bayesiana, segundo o modelo indicado pelo MrModelTest, realizada no programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

A confiabilidade nas três primeiras análises será medida pela utilização do teste de bootstrap (Felsenstein, 1985), enquanto na Análise Bayesiana a probabilidade posterior de cada um dos agrupamentos será avaliada.

Estimativas Bayesianas dos tempos de divergência serão, por fim, obtidas pelo uso de um relógio molecular relaxado conforme implementado no programa MultiDivTime (Thorne et al., 1998; Thorne & Kishino, 2002), com o uso da topologia de evidências totais obtida para o conjunto de espécies. A avaliação das variações temporais assim obtidas sob um contexto histórico permitirá ainda a inferência de possíveis fatores causais relacionados às especiações e às diversificações.

Cenários biogeográficos alternativos serão, finalmente, avaliados no programa MESQUITE 2.5 (Maddison & Maddison, 2007). Parâmetros ambientais serão avaliados por modelagem de nicho com o uso do Diva-GIS 5.2.02 (Hijmans et al., 2005), do GARP (Stockwell & Nobel, 1992) e do MAXENT (Phillips et al., 2004 e 2006). Modelagem de nicho

será, também, utilizada, para a predição dos efeitos associados às mudanças climáticas na distribuição das espécies em diferentes momentos do futuro.

DESCRIÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES

A partir das análises morfológicas, filogenéticas e do DNA-Barcode serão definidas e descritas as espécies novas eventualmente coletadas, assim como a realização da complementação das descrições de espécies que não foram completamente descritas em função de algumas dificuldades intrínsecas ao grupo trabalhado, como a grande ocorrência de espécies crípticas e a dificuldade de definição de machos e fêmeas de uma mesma espécie. Assim, espécies cujo apenas os machos foram conhecidos e descritos, terão suas fêmeas também descritas.

As descrições seguem os padrões descritos por Bächli et al. (2004). Além disso, as terminálias masculinas e femininas serão montadas em lâminas e ilustradas com auxílio de um microscópio ótico com câmara clara acoplada.

IV - CONTRIBUIÇÕES DA PROPOSTA

Dentro de um cenário de tendenciosidades e incompreensões, muito pouco se sabe a respeito da biologia das espécies de Drosophilidae que colonizam corpos de frutificação de fungos. A realização do presente projeto contribuirá, pois, para a formação de recursos humanos capacitados para o estudo de diversos aspectos relacionados à biologia destas espécies (ou até mesmo à evolução de outros grupos de organismos), ao mesmo tempo em que poderia auxiliar na democratização do acesso as suas identificações, pelo depósito dos dados de sequência em uma biblioteca online de acesso fácil e irrestrito, uma vez que a eficácia da tecnologia do DNA-Barcode tenha sido confirmada para este grupo de espécies. Este projeto deve também auxiliar no conhecimento da biodiversidade brasileira, pela identificação e descrição de novas espécies, que terão seus diferentes aspectos evolutivos avaliados sob diferentes enfoques. Por fim, o projeto também deverá contribuir no entendimento dos impactos das modificações climáticas na distribuição espacial das populações das espécies amostradas.

V- CRONOGRAMA

As seguintes atividades deverão ser desenvolvidas durante a execução deste projeto:

- 1) Revisão Bibliográfica;
- 2) Realização das coletas;
- 3) Triagem e identificação dos espécimes;
- 4) Extração de DNA, amplificação, clonagem e sequenciamento de *COI* e *COII*;
- 5) Análise das sequências;

6) Redação e publicação dos artigos.

Neste sentido, espera-se que as atividades anteriormente mencionadas sejam desenvolvidas em concordância com o seguinte cronograma:

Atividades	2011												2012											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
Atividades	2013																							
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D												
1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bächli, G. TaxoDros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae, v. 1.03, Database 2010/06. <http://www.taxodros.uzh.ch/>.

Bächli, G., Vilela, C.R., Andesson-Escher, S. Saura, A. 2004. The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. Fauna Entomologica Scandinavica, vol. 39. Leiden Brill Academic Publishers. 362p.

Döge, J.S., Gottschalk, M.S., Bizzo, L.E.M., Oliveira, S.C., Schmitz, H.J., Silva, V.L., Hofmann, P.R.P. 2007. The genus *Zygothrica* Wiedemann 1830 (Diptera, Drosophilidae) in Santa Catarina state, southern Brazil: distribution and ecological notes. Biota Neotrop. 7, 33-36.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approaching using bootstrap. Evolution 39, 783-791.

Gottschalk, M.S., Hofmann, P.R.P., Valente, V.L.S., 2008. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. Check List 4, 485-518.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B 270, 313-321.

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & deWaard, J. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc. R. Soc. Lond. B 270, S96-S99.

- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. & Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveal cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 14812-14817.
- Huelsenbeck, J. P.; Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17, 754-755.
- Kaneshiro, K. Y. 1969. A study of the relationships of Hawaiian *Drosophila* species based on external male genitalia. Univ. Texas Pub. 6918, 55-70.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111-120.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23, 2947-2948.
- Markow, T.A., O'Grady P.M. 2007. *Drosophila* Biology in the Genomic Age. Genetics 177, 1269-1276.
- Moritz, C. & Cicero, C. 2004. DNA barcoding: Promise and Pitfalls. PLoS Biology 02, 1529-1531.
- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C. & Hanner, R. 2009. DNA barcoding and the mediocrity of morphology. Mol. Ecol. Resour. 9, 42-50.
- Patterson, J.T., Stone, W.S. 1952. Evolution in the genus *Drosophila*. New York, McMillan, 610 p.
- Posada, C., Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14, 817-818.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 87, 651-701.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP: Phylogenetic Analysis using Parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Staden, R. 1996. The Staden sequence analysis package. Mol. Biotechnol. 5, 233-241.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24. 1596-1599.
- Throckmorton, L.H. 1975. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: King, R. C. (Ed.), Handbook of Genetics. Plenum, New York, pp. 421-469.
- Val, F.C., Marques, M.D., Vilela, C.R. 1981. Drosophilidae of Neotropical region. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson JN (eds) The genetics and biology of *Drosophila*. Academic Press, Orlando, pp 123-168

- Valentini, A., Pompanon, F. & Taberlet, P. 2008. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evol.* 24, 110-116.
- Wheeler, M. R. & Kambyzellis, M. P. 1966 . Notes on the Drosophilidae (Diptera) of Samoa. *Univ. Texas Pub.* 6615, 533-565.
- Whitworth, T., Dawson, R. D., Magalon, H. & Baudry, E. 2007. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 274, 731-1739.