

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE UMA NOVA ESPÉCIE DO GRUPO *SALTANS* GÊNERO *DROSOPHILA* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE) COLETADO NO PARÁ

Tuane L. Carvalho¹; Mariana S. Angonese²; João H. F. de Oliveira²; Marlúcia, B. Martins³; Juliana Cordeiro⁴

1 – Laboratório de Diversidade Genética e Evolução, Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, RS - e-mail: tuane.lfc@hotmail.com

2 – Laboratório de Diversidade Genética e Evolução, Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, RS

3 – Museu Paraense Emílio Goeldi, Pará

4 – Laboratório de Diversidade Genética e Evolução, Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, RS – e-mail: jlnedr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Drosophila* possui aproximadamente 4000 espécies (BÄCHLI, 2013) e vem desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento biológico, principalmente nos âmbitos genético e evolutivo. (ROBE, 2008). O grupo *saltans*, subgênero *Sophophora*, gênero *Drosophila*, é até agora composta por 21 espécies organizadas em cinco subgrupos: *cordata*, agrupando as espécies *D. neocordata* e *D. cordata*; *elliptica*, agrupando as espécies *D. neosaltans*, *D. neoelliptica*, *D. emarginata*, *D. elliptica*; *sturtevantii*, agrupando as espécies *D. sturtevantii*, *D. milleri*, *D. rectangularis*, *D. pulchella*, *D. magalhaesi* e *D. dacunhai*; *saltans*, agrupando as espécies *D. saltans*, *D. pseudosaltans*, *D. prosaltans*, *D. septentriosaltans*, *D. nigrosaltans*, *D. lusaltans* e *D. austrosaltans*; *parasaltans*, agrupando as espécies *D. subsaltans* e *D. parasaltans* (BÄCHLI, 2013). Todas as espécies estão distribuídas geograficamente na região Neotropical (MAGALHÃES, 1962). Como para alguns outros grupos do gênero *Drosophila*, o grupo *saltans* apresenta espécies crípticas, ou seja, são iguais morfológicamente, porém se distinguem quanto à morfologia interna, especialmente pela genitália masculina. Em função do isolamento sexual gerado por variações nesta estrutura, podemos caracterizar processos de especiação ou identificar novas espécies (SANTOS e BLAETH, 2009).

A identificação de espécies tem sido auxiliada, atualmente, pelo uso de sequências gênicas, como é o caso da sequência do gene citocromo oxidase I (COI) (HEBERT et al., 2003). A técnica de DNA barcode utiliza-se de um banco de dados de sequências COI na tentativa de identificar potenciais espécies novas. Este gene tem sido usado como gene candidato para esta finalidade por ser um gene mitocondrial mais conservado em termos evolutivos (SIMON et al., 1994).

Em 2011 uma nova espécie do grupo *saltans* foi identificada por meio de comparações da morfologia externa e interna, principalmente do edeago, a genitália masculina (COSTA, 2011). Nesse trabalho, analisamos as relações filogenéticas desta nova espécie com as demais espécies do grupo *saltans*.

2. METODOLOGIA

Os indivíduos analisados foram coletados na Floresta Nacional de Caxiuanã e foram inicialmente identificados pelos pesquisadores do Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém, Pará), por meio da morfologia externa e interna. Os procedimentos de biologia molecular foram realizados no Laboratório de Diversidade Genética e Evolução da Universidade Federal de Pelotas. O DNA de 10 indivíduos machos foi extraído usando o kit de extração NucleoSpin-XS (Macherey-Nagel). As genitálias desses indivíduos foram conservadas em glicerol, caso haja a necessidade de reanalisá-las. A sequência do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) foi amplificada usando os primers TYJ e C1N (SIMON et al., 1994). Esses primers anelam na porção inicial do COI, gerando um fragmento de aproximadamente 600pb. As reações de PCR foram feitas em 25ul finais usando aproximadamente 25ng de DNA, 5pmol de cada primer, 1U de Taq PhireHotStart (Thermo Scientific), 0,2mM de cada dNTP, 1X de tampão. Os ciclos de PCR foram feitos com temperatura de anelamento de 58°C iniciando com um ciclo de 98°C de desnaturação inicial do DNA, 35 ciclos com três etapas: 98°C para desnaturação do DNA, 58°C para anelamento dos primers, 72°C para polimerização da nova fita; finalizando com um ciclo de 72°C de polimerização final. Os amplicons foram conferidos em gel de agarose 1%. As amostras foram purificadas com ExoSAPIT (USB). As amostras foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Biologia Molecular do Museu Paraense Emílio Goeldi, usando um sequenciador ABI3031. Em todos os casos, ambas as fitas (forward e reverse) foram sequenciadas. A qualidade do cromatograma foi verificada com o programa Chromas. As sequências foram editadas usando o programa PreGap e Gap4 do Staden Package (STADEN, 1996). O alinhamento foi feito na ferramenta ClustalW contida no programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). As análises filogenéticas foram realizadas acrescentando sequências disponíveis no GenBank para as outras espécies do grupo *saltans*, como para o subgrupo *sturtevantii*: *D. sturtevantii* (AF045098, AF045100, AF045099), *D. milleri* (AF045105); para o subgrupo *saltans*: *D. saltans* (GU597450, AF045097), *D. prosaltans* (AF045102, AF045103), *D. austrosaltans* (AF045107), *D. lusaltans* (AF045106); para o subgrupo *parasaltans*: *D. subsaltans* (AF045101); para o subgrupo *elliptica*: *D. emarginata* (AF045109, AF045110, AF045108); e para o subgrupo *cordata*: *D. neocordata* (AF045104). Como *outgroup* foi usada a sequência de *Scaptodrosophila latifasciaeformis* (GU597448). A análise filogenética foi realizada no programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011) por meio do método de reconstrução filogenético Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987), usando o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980), normalmente utilizado para análises do gene COI. Os valores de confiança para cada lado foi calculado por teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 replicações. A análise de distância genética foi feita também no programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011) usando o modelo Kimura 2-parâmetros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram obtidas 26 sequências alinhadas. Estas sequências possuem 102 sítios polimórficos ao longo dos 305pb analisados. Na nossa análise a nova espécie agrupou com sequências do subgrupo *saltans* (*D. saltans*, *D. prosaltans* e *D. austrosaltans*). A divergência nucleotídica das sequências de COI desta nova espécie apresentaram valores muito menores nas comparações com *D. saltans*

(2,4%), *D. prosaltans* (2,6%), *D. austrosaltans* (3,3%) e de *D. lusaltans* (2,9%) do que nas comparações com *D. subsaltans* (8,3%), *D. milleri* (6,8%), *D. sturtevantii* (9,7%) e *D. emarginata* (12,3%).

4. CONCLUSÃO

Nossos dados corroboram os dados morfológicos prévios, alocando esta nova espécie no subgrupo *saltans*, fazendo com que esta seja a 22ª espécie do grupo *saltans*.

5. REFERÊNCIAS

BÄCHLI, G. 2011. **Taxodros**: The database on taxonomy of Drosophilidae. Disponível em < <http://www.taxodros.unizh.ch> > Acesso em: 01 de outubro de 2013

COSTA, **Revisão dos subgrupos *parasaltans* e *saltans* DO GRUPO *saltans* de *Drosophila* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)** 2011 Dissertação (Pós-Graduação em Zoologia, Curso de Mestrado) Universidade Federal do Pará Museu Paraense Emílio Goeldi

FELSENSTEIN J Confidence limits on phylogenies: an approaching using bootstrap. **Evolution** 39:783–791, 1985

HEBERT P D N, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR Biological identifications through DNA barcodes. **Proc R Soc Lond** 270:313-321, 2013

KIMURA M A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol** 16:111–120, 1980

MAGALHÃES, L.E Notes on the taxonomy, morphology and distribution of the *saltans* group of *Drosophila*, with descriptions of four new species. **The University of Texas Publication**, 6205: 134-154, 1962

ROBE, L. J. **Relações filogenéticas no gênero *Drosophila* (DIPTERA DROSOPHILIDAE: uma abordagem molecular)** 2008 Tese (Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS) Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SAITOU N, NEI M The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol** 4:406–425, 1987

SANTOS J P J, Blauth M L. Variação da Genitália Masculina de *Drosophila hydei* (Diptera, Drosophilidae) **Anais da 2ª. jornada científica da Unemat**, 2009

SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H., FLOOK, P., 1. 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, 1994.

STADEN R The Staden sequence analysis package. **Mol Biotechnology** 5:233-241, 1996

TAMURA, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.** 28, 2731–2739, 2011