

# Identificação molecular de Thysanoptera da Bahia

Molecular identification of Bahia's Thysanoptera

Matheus Souza Rodrigues<sup>1,2</sup>, Juvenal Cordeiro Silva Júnior<sup>3</sup>

## Resumo

A ordem Thysanoptera inclui insetos de corpo macio, com asas franjadas, popularmente conhecidos como tripses. Atualmente são reconhecidas cerca de 7700 espécies de tripses, distribuídas em 1200 gêneros. A base da técnica de DNA barcoding é a análise da diferenças genéticas entre sequências correspondentes do DNA de indivíduos de espécies de táxons correspondentes. A eficácia da análise depende de uma baixa variabilidade intraespecífica da sequência do gene analisado, associada a uma alta variabilidade interespecífica. O gene COI se configura como um marcador molecular ideal na identificação de espécies de tripses. A pesquisa em questão se propõe a fazer uma análise da diversidade de espécies da ordem Thysanoptera na bahia, a partir de uma perspectiva de taxonomia integrativa, utilizando DNA barcoding para levantar dados moleculares sobre as espécies pesquisadas. Até o momento foram amplificadas cerca de 95 amostras de 23 populações, para um total 17 espécies, todas fotodocumentadas através do aparelho LPix (Loccus®).

**Palavras-chave:** Barcoding, Identificação molecular, Thysanoptera.

## Abstract

The order Thysanoptera includes soft-bodied insects, with fringed wings, popularly known as thrips. Nowadays, about 7700 species of thrips are known, distributed in 1200 genera. The basis for the technique of DNA barcoding is the analysis of the genetic differences between correspondent sequences of DNA of individuals of species in different taxa. The efficacy of the analysis relies on a low intra-specific variability in the sequency of the gene tested, associated to a high inter-specific variability. The COI gene constitutes an ideal molecular marker in the identification of species of thrips. The present research proposes to undertake an analysis of the diversity of species in the order Thysanoptera in Bahia, coming from an integrative taxonomy perspective, using DNA barcoding in order to gather molecular data about the species researched. Till the

<sup>1</sup>Bolsista de Iniciação Científica pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)

<sup>2</sup>Graduando, Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). E-mail: matheussrodrigues1701@outlook.com

<sup>3</sup>Orientador, Departamento de Ciências Biológicas (DCB), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). E-mail: juvenaljr@yahoo.com.br

moment, about 95 samples of 23 populations were amplified, for a total of 17 species, all documented photographically through the LPix (Loccus) device.

**Key-words:** Barcoding, Molecular identification, Thysanoptera.

### **Introdução**

A identificação de espécies de tripes é complexa e exige um grande nível de especialização, utilizando frequentemente fatores ecológicos e morfológicos (MARULLO, MERCATI, VONO, 2020). O diminuto tamanho, hábito críptico, diferenças de coloração, caracteres sexuais secundários e variantes genéticas são fatores que dificultam a identificação de tripes. A identificação morfológica tradicional utilizando chaves dicotomas para a delimitação de espécies é um processo laborioso, demorado e que inclui várias etapas de preparação de espécimes, preparação de lâminas e análise microscópica, todas exigindo alto nível de especialização na área. Além disso, as chaves de identificação geralmente se limitam a indivíduos na fase adulta, além de serem limitadas pela presença de espécies crípticas e variantes genéticas (GHOSH, et al., 2021). A técnica de DNA barcoding utilizando o gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI) é propícia para a construção de um sistema internacional de identificação de espécies. A associação de barcodes provenientes de dados de sequenciamento deste gene às espécies e táxons permite uma solução acessível para os problemas de identificação. Tal circunstância representa grande potencial futuro para o campo da sistemática, uma vez que a identificação por meio da análise morfológica tradicional apresenta frequentemente complicações técnicas e, cada vez mais, falta de profissionais qualificados (HEBERT, 2003).

### **Material e métodos**

Os tripes foram coletados principalmente sobre flores, folhas e frutos de plantas cultivadas e silvestres, por meio da técnica de batida na bandeja com auxílio de pincel. Em seguida, foram acondicionados em tubos eppendorfs contendo 2 ml de etanol absoluto e posteriormente armazenados para identificação. Até o momento a identificação dos espécimes coletados foi realizada pelo Dr. Élisson Fabrício Bezerra (UFPI), especialista na ordem. Para extração do DNA total foi utilizado o protocolo “salting-out” de Sunnucks & Hales (1996), adaptado. Posteriormente, as amostras de DNA foram quantificadas por meio do Nanodrop. A concentração do DNA variou em média de 8,5 a 35 ng/ $\mu$ L. Para confirmação da integridade do DNA também foi realizada a quantificação em de Gel de agarose a 1%. A amplificação seguiu um passo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos: desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento dos primers variando entre 49 a 54°C por 2 minutos e

extensão a 72°C por 2 minutos, seguindo com a extensão final a 72°C por 7 minutos. Estes passos variaram de acordo com as espécies e populações estudadas das diferentes regiões do país. As reações foram sempre acompanhadas por um controle negativo. Os produtos das amplificações foram visualizados com o uso do azul de bromofenol e GelRed (Biotium, EUA) na proporção de 3:1 através da eletroforese em gel de agarose a 1.0%. Sendo visualizados em luz ultravioleta e fotodocumentados com o aparelho LPix (Loccus®). Com o intuito de melhorar as condições de PCR, foram realizadas padronizações na concentração de DNA utilizado, além de gradientes de temperatura para o anelamento do primer e gradientes de MgCl<sub>2</sub>. Estas padronizações foram essenciais tendo em vista a qualidade do DNA obtido das amostras doadas, possibilitando realizar amplificações de amostras com pouca qualidade. A qualidade do DNA a ser utilizado deve ser levada em conta, uma vez que esteja degradado, torna-se difícil a padronização e obtenção de bons resultados nas amplificações.

### **Resultados e discussão**

Foram realizadas extrações de DNA para 450 amostras, correspondentes a um total de 40 espécies. Até o momento foram amplificadas cerca de 95 amostras de 23 populações, para um total 17 espécies, todas fotodocumentadas através do aparelho LPix (Loccus®). Tais amostras incluem principalmente espécimes doados do Museu de História Natural da UFPI. As amplificações se deram através da padronização de acordo com o espécime coletado e condições das amostras, tendo em vista a forma e tempo de armazenamento dos exemplares, além da integridade do DNA extraído. A preservação ideal dos insetos para subsequente extração, amplificação e sequenciamento do DNA em geral exige espécimes frescos, preservados e armazenados em um congelador, preferencialmente a -80°C, ou em etanol absoluto e refrigerado (Gullan & Cranston, 2017). Espécimes de museus, se relativamente frescos e preservados de maneira apropriada, podem reter DNA, mas muitos não o mantêm, ou o DNA está muito degradado para ser utilizado de maneira adequada (Gullan & Cranston, 2017). Por isso, levou-se em consideração o fato de grande parte das amostras doadas pelo Museu de História Natural da UFPI não estarem em condições adequadas para amplificação, já que a forma de armazenamento das amostras doadas difere da esperada para a técnicas moleculares, o que resultou na necessidade de mais padronizações para os diferentes grupos e populações estudadas. Mesmo com tentativas de padronizações, ainda não obtivemos resultados para grande parte das amostras doadas. Tendo em vista toda a problemática do correto armazenamento das amostras, buscamos substituir as amostras sem bons resultados através de novas coletas que já estão sendo realizadas.

## Conclusão

Até o momento, sequências inéditas para pelo menos nove espécies podem ser depositadas na plataforma BOLD após o sequenciamento. Nossos resultados tem um potencial de gerar informações não apenas para tripses endêmicos do Brasil, mas também, para espécies distribuídas por toda América Latina.

## Referências Bibliográficas

- 1- GHOSH, A.; JANGRA, S. DIETZGEN, R. G.; YEH, W. **Frontiers Approaches to the Diagnosis of Thrips (Thysanoptera): How Effective Are the Molecular and Electronic Detection Platforms?**. Insects, v. 12, n. 920, 2021.
- 2- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. 2017. **Insetos: fundamentos de entomologia**. 5º ed. São Paulo: Guanabara Koogan. p. 436.
- 3- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; deWAARD, J. R. **Biological Identifications through DNA barcodes**. Proc. R. Soc. Lond, n. 270, p. 313-321, 2003.
- 4- MARULLO, R.; MERCATI, F.; VONO, G. **DNA Barcoding: A Reliable Method for the Identification of Thrips Species (Thysanoptera, Thripidae) Collected on Sticky Traps in Onion Fields**. Insects, v. 11, n. 489, 2020.

## Agradecimentos

