

DNA barcoding na definição taxonômica de espécimes do gênero *Pasipha* (Platyhelminthes: Tricladida) no Sul do Brasil

Giovana Gamino Ribeiro¹, Victor Hugo Valiati¹

¹ Laboratório de Biologia Molecular UNISINOS

Introdução:

Os marcadores genéticos, aliados à técnicas de bioinformática, tornaram-se ferramentas essenciais para a compreensão das relações filogenéticas e evolutivas de diferentes táxons. Planárias terrestres é um bom exemplo do uso dessas ferramentas para identificar grupos morfologicamente semelhantes, bem como, auxiliar no entendimento da história evolutiva desses grupos. Revisões taxonômicas nos últimos anos apontaram que muitas das espécies incluídas no gênero *Geoplana*, por exemplo, deveriam ser revisadas. Entre estes está o gênero *Pasipha* que inclui 25 espécies formalmente descritas no Brasil, Chile e Panamá. No Rio Grande do Sul há o registro de apenas três espécies: *P. hauseri*, *P. backesi*, *P. brevilineata*. Espécimes do referido gênero, coletados em diferentes locais do Rio Grande do Sul e Paraná, foram inicialmente diferenciados pela característica morfológica externa de possuir, ou não, uma listra de cor clara na extremidade posterior do corpo (Fig. 1). Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o referido caractere possui importância taxonômica, bem como, estabelecer o status específico de 30 espécimes do gênero *Pasipha* utilizando o gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) como marcador molecular.

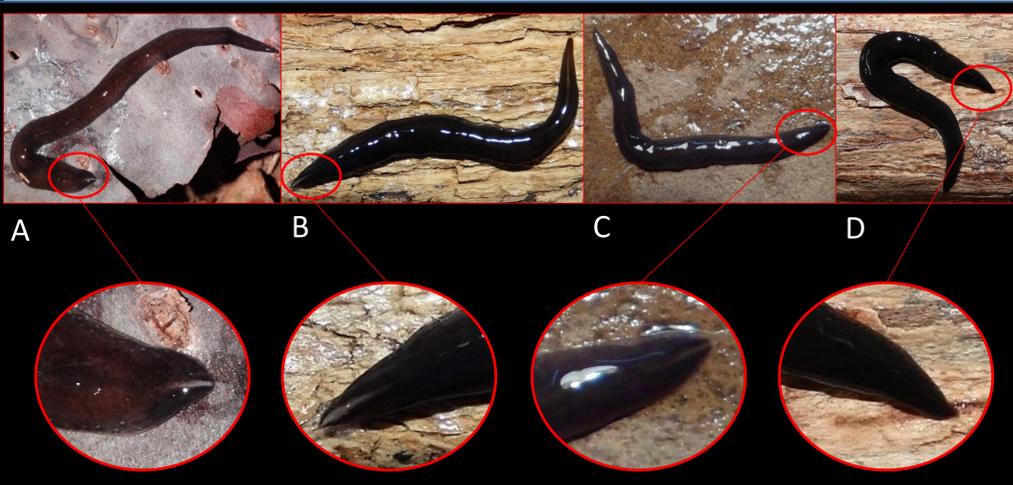


Fig. 1: Espécimes coletados no Paraná e Rio Grande do Sul. A) PR com listra clara conspícua na extremidade posterior; B) RS com listra clara conspícua na extremidade posterior, C) RS com listra clara inconspícua na extremidade posterior e D) RS sem listra clara na extremidade posterior.

Materiais e Métodos:

Os espécimes utilizados são provenientes do Instituto de Pesquisa de Planárias/UNISINOS. A extração de DNA foi feita com o Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA), o gene COI foi isolado e amplificado pela técnica de PCR, sequenciado automaticamente na MACROGEN Inc. na Coréia do Sul e recuperado uma região de aproximadamente 600-pb utilizadas em diferentes análises. Para estas, foram utilizados os seguintes programas: **Chormas Pro**: Análise das sequências; **Bioedit 5.0.9**: Ajuste manual das sequências, quando necessários; **BlastN**: Testar a integridade das sequências; **ClustalX2**: Alinhamento; **Dambe**: Teste de saturação; **ABGD**: Máximas divergências intraespecíficas; **Mr Model Test 2.2**: Escolha do Modelo evolutivo; **Mr bayes**: Análise bayesiana; **PhyML**: Máxima Verossimilhança; **DnaSP v5** e **Network**: Rede haplotípica e **Mega 5.2**: Edição das árvores filogenéticas

Resultados e Discussão:

As reconstruções filogenéticas (Bayesiana e de Máxima Verossimilhança) indicaram que os espécimes formam grupos independentes, de acordo com os diferentes locais onde foram coletados (Fig. 2).

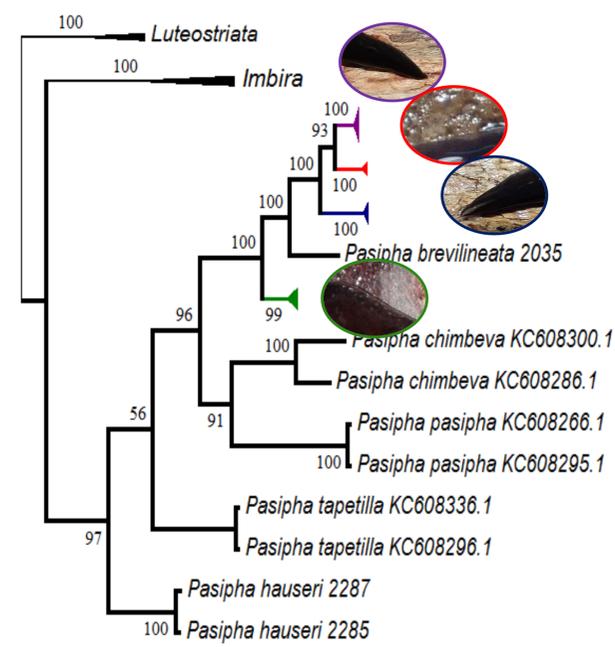


Fig. 2: Análise Bayesiana. Modelo Evolutivo: GTR+I+G.

As taxas de substituições nucleotídicas intra (< 1%) e intergrupos (> 2%) ratificam a hipótese desses espécimes serem novas espécies para o gênero. Os relacionamentos haplotípicos (Fig. 3), entre os espécimes das diferentes localidades, demonstrou a existência de dois grupos geográficos, um com espécies de *Pasipha* no Rio Grande do Sul, com 3 subgrupos separados por muitos passo mutacionais (>16), e outro com uma espécie no Paraná, ratificando hipótese sustentada pela recuperação filogenética.

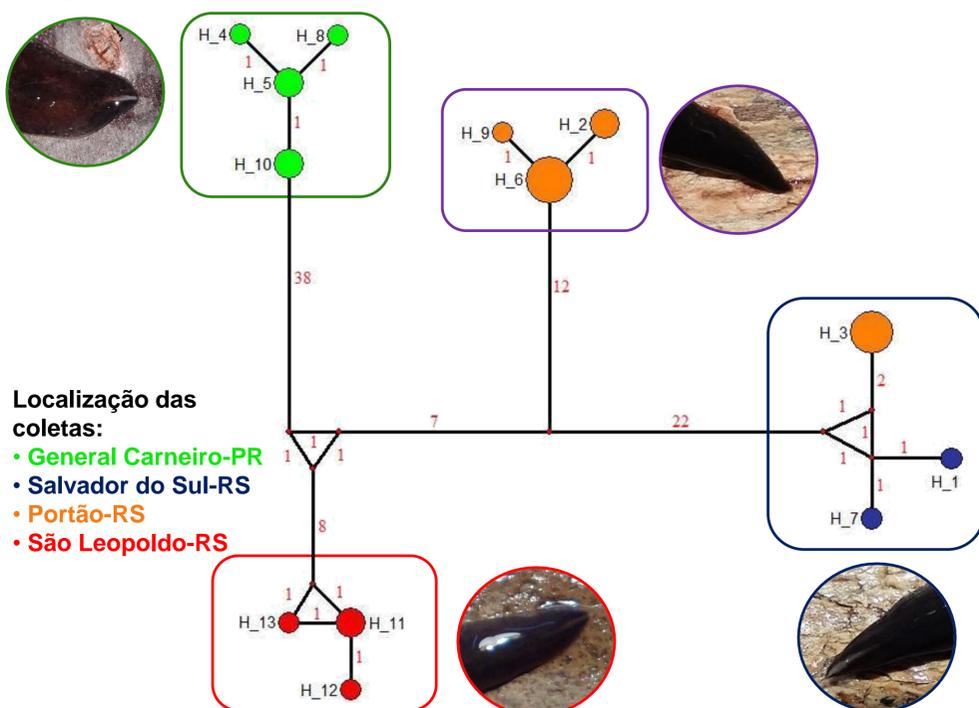


Fig. 3: Rede haplotípica utilizada para verificar a relação entre os grupos estudados. As cores nos haplótipos diferenciam os locais de coleta. O resultado demonstra que os grupos se separam de acordo com as características morfológicas e distribuição geográfica.

Conclusões:

Os haplótipos encontrados, a distribuição geográfica e os altos grau de suporte das filogenias suportam a existência de quatro grupos independentes. O gene da COI como *barcode* pode apresentar algumas restrições para as planárias em decorrência de saturação com baixa divergência genética. Entretanto, neste caso específico do gênero *Pasipha*, o mesmo demonstrou-se eficiente para a definição de espécies para este gênero.