

DNA BARCODING: TÉCNICAS E APLICAÇÕES**DNA BARCODING: TECHNIQUES AND APPLICATIONS**Bianca Roberta Catani Chagas ⁽¹⁾Beatriz Benavides Silva ⁽¹⁾Fernando Santiago dos Santos ⁽²⁾

RESUMO. Um desenvolvimento técnico-científico não muito recente, porém divulgado com grande amplitude nos últimos anos, permite grande eficácia e rapidez na identificação de indivíduos animais e vegetais. Esta técnica, denominada DNA *Barcoding*, tem sido muito utilizada para estudos taxonômico-sistemáticos. Este trabalho apresenta uma síntese do que é tratado sobre este assunto presente em revisão de literatura. Para tanto, foram utilizados artigos científicos e trabalhos acadêmicos (dissertações e teses). **Palavras-chave:** Taxonomia; sistemática; classificação; seres vivos.

ABSTRACT. A non recent technical-scientific development, highly disseminated within academic environments lately, enhances great effectiveness and speed regarding animal and vegetal individual identification. Such technique, DNA barcoding, has been largely used in taxonomic-systematic studies. The present review brings synthetic information on what has been said about the topic. Scientific articles and academic papers (dissertations and PhD theses) have been used. **Keywords:** Taxonomy; systematics; classification; living beings.

⁽¹⁾ Licenciandas em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, campus São Roque - SP. Correspondência: Rod. Prof. Quintino de Lima, 2.100, Paisagem Colonial, São Roque - SP; e-mail: fernandosrq@gmail.com

⁽²⁾ Professor adjunto do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, campus São Roque.

Recebido em: 30 ago. 2014 ▪ Aceito em: 05 out. 2014 ▪ Publicado em: 31 jan. 2015.

1 Apresentação da técnica

O termo DNA *Barcoding*, ou Código de Barras de DNA em uma tradução literal do termo em inglês, surgiu a partir do código de barras que é utilizado em supermercados. A ideia principal é sistematizar e “etiquetar” as sequências de DNA para otimizar o tempo de identificação de espécies que já estejam catalogadas e acelerar processos de descobertas (HERBERT *et al.*, 2003a).

Dentre muitos usos deste novo método, um deles é a ferramenta de pesquisa para identificação de espécies e também para validar a classificação na qual o organismo se encontra baseando-se em sequenciamento de DNA e medida de variabilidade. Com base no DNA *Barcoding*, pode-se, também, expandir os diagnósticos das espécies para todas as fases da história de vida, incluindo frutas, sementes, espécimes danificados, conteúdo estomacal e outras formas (HERBERT *et al.*, 2003b).

O DNA *Barcoding* pode, igualmente, contribuir para a biologia da conservação no que tange à preservação e ao gerenciamento da biodiversidade global (ARMSTRONG & BALL, 2005; RUBINOFF 2006).

Vários métodos de análise foram propostos, sendo alguns deles: a) métodos filogenéticos básicos, baseados em algoritmos de distância ou máxima verossimilhança, assumindo modelos mutacionais diferentes (ELIAS *et al.*, 2007); e, b) análises baseadas em caracteres múltiplos (DeSALLE *et al.*, 2005).

Três tipos de DNA são selecionados para extração: nuclear, mitocondrial e de cloroplasto.

O DNA nuclear é onde estão armazenados os genes com maior variabilidade (FARAH, 2007); entretanto, complicações podem surgir devido às características de famílias multigênicas. Uma família multigênica é constituída por um conjunto de genes com notável similaridade estrutural, quanto ao número e organização dos pares de bases nitrogenadas, embora eles possam exibir diferentes funções. Acredita-se que as famílias de multigenes sejam formadas por uma série de eventos de duplicação durante a evolução e que o acúmulo de mutações ocorridas ao longo do tempo é responsável pelas

pequenas diferenças observadas hoje entre esses genes. No entanto, uma característica comum a essas famílias de genes é que possuem um número considerável de pseudogenes, que mostra grande semelhança com os genes funcionais da mesma família, mas perderam sua capacidade de expressão devido a mutações adquiridas (FARAH, 2007).

O DNA mitocondrial é amplamente utilizado em amostras animais (AVISE, 1991).

Para plantas e organismos dotados de cloroplastos, o DNA desta organela é utilizado de forma eficaz devido, principalmente, ao alto número de cópias de nucleotídeos (BARCODE OF LIFE, 2010-2015).

Uma vez que um indivíduo é selecionado para identificação, seu material genético é coletado e sequenciado. Com a sequência genética completa, os dados são armazenados em programas de computador e remetidos a um banco de dados – BIN, ou Barcoding Index Number – que é de domínio público. Até a publicação desta revisão, havia 315.978 códigos de DNA *barcode* animais e 3.429 BINs de espécies de plantas.

Há diversos grupos de pesquisa no mundo, sendo o maior deles nos EUA (iBOL, 2014), com cerca de 40 mil registros. No Brasil, as pesquisas com DNA *barcoding* ainda são incipientes, embora haja grupos proeminentes em universidades paulistas (USP e Unicamp, em particular), totalizando cerca de 5.700 registros brasileiros.

2 DNA barcoding: amostragem, extração e amplificação

Em animais, o DNA mais utilizado é o mitocondrial, em sua região 648 pb da enzima Citocromo-c-oxidase subunidade 1, ou simplesmente CO1 (KOSMANN, 2009). A escolha deste gene como fragmento padronizado deve-se a algumas características importantes. Este gene pode ser flanqueado mesmo por sequências conservadas, o que o torna relativamente fácil de ser isolado e analisado. Os iniciadores universais para este gene são bem estabelecidos, permitindo a amplificação do mesmo em quase todos os filos animais (AVISE, 1991; SIMON *et al.*, 1994). Além disso, possui um sinal filogenético maior que os demais genes mitocondriais (SAHLS & NYBLUM, 2000) e, finalmente, possui uma maior variação na terceira posição de seus códons, ainda que mudanças nas sequências de aminoácidos ocorram mais lentamente que nos demais genes do DNAm (HEBERT *et al.*, 2003).

Como exemplificação de método de extração de DNA para uso em *barcoding*, o trabalho de Kosmann (2009) foi utilizado como referência. Neste trabalho, o DNA foi extraído a partir do tórax dos exemplares estocados e preservados em etanol a 96%. As amostras foram maceradas em solução de lise SDS/Proteinase K (480 µL de 50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0; 20 µL de 20 mg.mL⁻¹ proteinase K) e, em seguida, incubadas por três horas em banho-maria a 55°C. A seguir, foram adicionados 500 µL de EZDNA KIT (Biosystems®) seguidos por nova incubação à temperatura ambiente por 12 horas. As amostras foram, então, centrifugadas e os sobrenadantes foram lavados três vezes em etanol (95-100%) para a precipitação do DNA, depois secos e ressuspensos em 70 µL de TE (10 mM Tris, 50 mM EDTA, H₂O ultrapura). O DNA total extraído foi quantificado em espectrofotômetro de massa e estocado em freezer a -20°C.

O método de amplificação do DNA foi, analogamente, baseado no trabalho de Kosmann (2009). A região de DNA mitocondrial utilizada foi a porção final de CO1 correspondente à região do DNA *Barcode* (HEBERT, 2003). Este segmento foi amplificado por meio do conjunto de iniciadores LCO1490-L e HCO2198-L (NELSON *et al.*, 2007). A amplificação foi realizada utilizando-se 40 ng de DNA, 25 mM de dNTP, 20 mM de cada iniciador, 2,5 U de Taq e 3-4 mM de MgCl₂.

Os ciclos de temperatura de PCR foram realizados em um termociclador (Mastecycler® - Eppendorf) e consistiram em um passo de desnaturação inicial de 94°C por dois minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 46°C por 30 segundos, e alongação a 72°C por dois minutos. O último ciclo foi seguido de uma incubação a 72°C por cinco minutos para completar quaisquer fitas parcialmente sintetizadas (NELSON *et al.*, 2007). Em todas as reações realizadas, foram incluídos controles brancos para avaliar a presença e/ou ausência de possíveis contaminantes ou inibidores durante o processo de extração de DNA e/ou preparação das reações de PCR.

3 Dificuldades do métodos e considerações finais

A principal dificuldade encontrada na técnica de DNA *barcoding* é quando há ocorrência de grupos-irmãos, pois a sequência gênica dos mesmos é muito semelhante, impedindo, portanto, uma identificação individual precisa.

Com base nos trabalhos analisados, pode-se inferir que a técnica de DNA *barcoding* é eficiente por dois motivos principais: há a utilização de uma sequência única e com baixo número de mutações presentes nos indivíduos e, após o sequenciamento, a amostra é inserida em um sistema de banco de dados, no qual são armazenadas todas essas sequências para futuras pesquisas e/ou descobertas.

A técnica do DNA *barcoding* pode ser utilizada para identificação de espécies de forma bastante rápida e eficiente, sendo um aparato científico promissor. Sugerimos, ainda, a leitura de Naoe (2014), Pimenta-Neto (2014) e Bold Systems (2014).

4 Referências

ARMSTRONG, K. F.; BALL, S. L. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 360, 1813-1823, 2005.

AVISE, J. C. 1991. Tem unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetics findings on mitochondrial DNA. **Annual Review of Genetics**, v. 25, 45-69, 1991.

BARCODE OF LIFE. **Identifying species with DNA Barcoding**. 2010-2015. Disponível em: <<http://www.barcodeoflife.org/>>; acesso em: 05 set. 2014.

BOLD SYSTEMS. **Database, taxonomy, identification, workbench and resources**. 2014. Disponível em: <<http://www.boldsystems.org/index.php/databases>>; acesso em 18 set. 2014.

DeSALLE, R.; EGAN, M. G.; SIDDALL, M. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 360, 1905-1916, 2005.

ELIAS, M.; HILL, R. I.; WILMOTT, K. R.; DASMAHAPATRA, K. K.; ANDEW, V. Z.; BROWER, A. V. Z.; MALLETT, J.; CHRIS, D.; JIGGINS, C. D. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. **Proc. R. Soc. Lond. B**, 274, 2881-2889, 2007.

FARAH, S. B. Decifrando o genoma humano. In: FARAH, S. B. **DNA: Segredos e Mistérios**. São Paulo: Sarvier, 2007.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings**. Royal Society Biological Sciences Meeting, v. 270, 313-321, 2003.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DeWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. **Proceedings**. Royal Society, Series B, Biological Sciences Meeting, v. 270, 313-321, 2003.

iBOL. **International Barcoding of Life**. 2014. Disponível em: <http://www.boldsystems.org/index.php/Public_BarcodeIndexNumber_Home>; acesso em 18 set. 2014.

KOSMANN, C. **Código de barras (DNA barcode) de dípteros de interesse forense**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Curitiba - PR, Universidade Federal do Paraná, 2009.

NAOE, A. **DNA vira ‘código de barras da vida’ em rede de pesquisa.** 2014. Disponível em: <<http://www.usp.br/agen/?p=182903>>; acesso em: 18 set. 2014.

NELSON, L. A.; WALLMAN, J. F.; DOWNTON, M. Using CO1 barcodes to identify forensically and medically important blowflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 21, 44-52, 2007.

PIMENTA-NETO, D. A. **DNA barcoding, o código de barras da natureza e sua aplicação para pescado.** 2014. Disponível em: <<https://www1.portaleducacao.com.br/biologia/artigos/55955/dna-barcoding-o-codigo-de-barras-da-natureza-e-sua-aplicacao-para-pescado>>; acesso em: 05 set. 2014.

RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conserv. Biol.**, v. 4, 1026-1033, 2006.

SAHLS, G.; NYBLUM, K. Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 15, 235-241, 2000.

SIMON, C. F.; FRATI, A.; BECKEMBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, 651-701, 1994.

Como citar esta revisão de literatura

CHAGAS, B. R. C.; SILVA, B. B.; SANTOS, F. S. dos. DNA *barcoding*: técnicas e aplicações. **Scientia Vitae**, v. 2, n. 7, ano 2, jan. 2015, p. 20-23. Disponível em: <www.revistaifpsr.com/v2n7ano2_2015.htm>; acesso em: ___/___/___.