

A iniciativa do código de barras em aves e a participação do Brasil

Cristina Yumi Miyaki

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva; Instituto de Biociências; Universidade de São Paulo; Rua do Matão, 277; 05508-090 São Paulo, SP. E-mail: cymiyaki@ib.usp.br

Recebido em 10 de maio de 2007; aceito em 04 de junho de 2007

ABSTRACT. The barcodes initiative for birds and how Brazil can participate. The proposal of using a single and short DNA sequence to identify avian taxa (barcodes of life) is under debate. In the present paper I present some information about this theme wishing to broaden the discussion around it. Should or should not Brazil participate in the consortium?

KEY WORDS: DNA barcodes, biodiversity, taxa identification

RESUMO. A proposta de uso de uma única e curta seqüência de DNA para identificar táxons (denominada como código de barras da vida) está sendo alvo de debates. No presente texto apresento algumas informações sobre o tema buscando ampliar as discussões. Afinal, devemos ou não participar do consórcio internacional?

PALAVRAS-CHAVE: código de barras do DNA, biodiversidade, identificação de táxons

Em 2003 Paul Hebert e colaboradores publicaram um artigo que sugeria que seqüências do gene mitocondrial da citocromo c oxidase I (COI) seriam capazes de identificar corretamente filós, ordens e espécies de animais. Esses pesquisadores utilizaram seqüências disponíveis em um banco de dados (GenBank) e produziram outras seqüências para montar três matrizes de dados: 1) com representantes dos sete maiores filós de animais (100 seqüências de Annelida, Chordata, Echinodermata, Nematoda, Platyhelminthes, Arthropoda e Mollusca), 2) com representantes de oito ordens de insetos (100 seqüências de Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Blattaria, Ephemeroptera, Orthoptera e Plecoptera) e 3) com representantes de 200 espécies próximas de lepidópteros (das superfamílias Geometroidea, Nocturoidea e Sphingoidea). Filogenias foram reconstruídas por Neighbor-joining utilizando essas matrizes de dados. Seqüências de táxons adicionais foram obtidas para testar se elas seriam corretamente atribuídas ao táxon de origem quando incluídas nessas reconstruções. Os resultados obtidos mostraram que 96,4%, 100% e 100% das seqüências testadas foram corretamente atribuídas ao filo, à ordem e à espécie, respectivamente. Assim, os autores sugerem que seria possível desenvolver um banco de dados para as 10 milhões de espécies animais para constituir a base de um sistema de identificação global (Hebert *et al.* 2003a). Ainda no mesmo ano, outro trabalho liderado por Hebert foi publicado sugerindo que, baseado em seqüências do COI seria possível discriminar espécies próximas. Nesse artigo foram analisados pares de espécies pertencentes ao mesmo gênero, num total de 2238 espécies de animais. Os resultados mostraram que mais de 98% dos pares de espécies apresentam divergência maior do que 2%, com exceção de cnidários (Hebert *et al.* 2003b). Assim, foi pro-

posta a construção de um banco de seqüências de um grande número de organismos tendo o COI como gene de referência, ou seja, a seqüência do COI seria usada como um código de barras (*barcode*) específico para cada espécie. Isso permitiria atribuir indivíduos desconhecidos a espécies e facilitar a descoberta de novas espécies (Hebert *et al.* 2003a).

Em 2004 foi publicado um artigo com a análise do COI de 260 das 667 espécies de aves da América do Norte (Hebert *et al.* 2004). Cada espécie estudada apresentou uma seqüência específica e as seqüências de indivíduos da mesma espécie eram idênticas ou mais semelhantes entre si do que a de outras espécies. A análise de espécies de mesmo gênero revelou que a média da distância máxima entre indivíduos da mesma espécie era de 0,29% e a média da distância mínima entre espécies do mesmo gênero era de 7,05%. Já a média geral de distância máxima entre indivíduos da mesma espécie foi de 0,27%. Com isso, os autores propõem usar uma divergência mínima de 2,7% (10 vezes maior do que a distância máxima intraespecífica) para diferenciar potenciais espécies (Hebert *et al.* 2004).

AS APLICAÇÕES DOS “BARCODES”

Uma vez tendo um banco de seqüências padronizadas, algumas das possíveis aplicações seriam: 1) identificação da espécie de ave envolvida em colisões com aeronaves, o que permitiria auxiliar no plano de manejo para evitar novas colisões; 2) identificação de restos de alimentos encontrados nos estômagos e fezes de predadores, aumentando o conhecimento acerca da dieta desses organismos; 3) reconhecimento da espécie a partir de carcaças ou outras amostras forenses, em

um caso de apreensão de ovos de aves amostras dos embriões que não eclodiram foram identificadas (A. R. Oliveira-Markes e T. Matsumoto com. pess. 2005); e 4) a partir do sangue encontrado em vetores de patógenos (ex. mosquitos com vírus do oeste do Nilo) pode-se chegar à identidade do hospedeiro. Recentemente um renomado periódico científico (*Molecular Ecology Notes*) abriu uma seção especial para publicação de artigos relacionados aos *barcodes* onde outras aplicações podem ser encontradas.

AS LIMITAÇÕES DOS “BARCODES” - CRÍTICAS E RESPOSTAS

Várias discussões foram geradas após o lançamento da proposta de criação desse banco de seqüências de COI (Smith 2005, Will *et al.* 2005, Hebert e Gregory 2005). Dentre as limitações da proposta se destacam:

- 1) A baixa diversidade entre seqüências de determinados grupos, como os cnidários, não permite obter a sua correta identificação (Hebert *et al.* 2003a).
- 2) Espécies que se divergiram recentemente possuem poucas diferenças e pode ser impossível caracterizá-las como duas linhagens independentes. Seria importante ter estudos em grande escala sobre a divergência entre pares de espécies irmãs para avaliar se o COI é informativo nesses casos e, para isso, seria necessário analisar todos os membros de um determinado gênero (Moritz e Cicero 2004).
- 3) Como apenas um gene é analisado e este pertence a um genoma com herança materna, híbridos não podem ser detectados. Tal limitação ocorreria com qualquer gene com herança ligada ao sexo.
- 4) Pseudogenes (cópias não ativas de genes) podem atrapalhar a análise. Nos estudos já realizados, os pseudogenes não são mencionados, talvez por que não foram detectados e aparentemente isso não prejudicou as análises (Hebert *et al.* 2003a, b).
- 5) Em relação às aves, como até o momento apenas espécies da América do Norte foram analisadas, o real desafio será a análise das que ocorrem nos Trópicos, devido à maior diversidade (Moritz e Cicero 2004).

Entre as críticas mais contundentes, está a preocupação de que outros projetos de taxonomia possam ter recursos negados. Em resposta a isso, os pesquisadores que têm gerado os *barcodes* argumentam que o projeto não tem a pretensão de estudar a taxonomia dos grupos.

O CONSÓRCIO DO CÓDIGO DE BARRAS DA VIDA (“CONSORTIUM FOR THE BARCODE OF LIFE”, CBOL, [HTTP://BARCODING.SI.EDU](http://barcoding.si.edu))

Em maio de 2004 foi estabelecido o CBOL com apoio financeiro da Fundação Alfred P. Sloan e em setembro do mesmo ano o CBOL abriu um escritório no *Smithsonian Ins-*

titute. Esse consórcio envolve a colaboração internacional de museus, herbários, coleções biológicas e especialistas em genômica, taxonomia, eletrônica e computação. Seus objetivos são: 1) acelerar a compilação de código de barras de todas as espécies conhecidas de plantas e animais, 2) estabelecer um banco de dados público de seqüências associadas a um espécimen (*voucher*) e 3) promover o desenvolvimento de um aparelho portátil para identificar amostras pelo seu código de barras.

Dentre os grupos de trabalho criados pelo CBOL podemos destacar um que visa desenvolver uma técnica de extração de DNA a partir de amostras estocadas em formol. Como no início da história das coleções biológicas não se previa o uso de marcadores moleculares, os tecidos dos *vouchers* foram preferencialmente preservados em formol. Acredita-se que essa substância causa danos ao DNA e isso prejudica uma etapa importante da metodologia empregada, a amplificação *in vitro*. Assim, caso um protocolo robusto de extração de DNA seja desenvolvido, amostras históricas preservadas em formol (ex. os tipos) poderão ter seu DNA analisado. Tal perspectiva reforça ainda mais a importância das coleções biológicas.

O CBOL tem organizado reuniões regionais para: promover a participação de pesquisadores do mundo todo, disseminar a aplicação dos *barcodes* na ciência e na sociedade, discutir iniciativas voltadas para as necessidades regionais e nacionais, levantar as prioridades e necessidades dos projetos e iniciar redes de colaboração. A reunião da região neotropical ocorreu recentemente (18-20/ março de 2007) em Campinas-SP.

A INICIATIVA DO CÓDIGO DE BARRAS DE TODAS AS AVES (“ALL BIRDS BARCODE INITIATIVE”, ABBI)

Foi realizado um *workshop* como marco inicial do ABBI na Universidade de Harvard nos dias 8 e 9 de setembro de 2005. Nesse encontro estiveram presentes cerca de 50 participantes de todo o mundo, inclusive do Brasil. Um dos assuntos debatidos foi que o ABBI pode se beneficiar muito do *Ornithological Information System* (ORNIS, <http://ornisnet.org>). O ORNIS tem como objetivo facilitar o acesso às informações sobre 5 milhões de espécimens de aves depositadas nas coleções norte-americanas. Tal integração deve melhorar a comunicação e a colaboração entre as partes envolvidas. Além disso, os organizadores do encontro buscaram ressaltar que os *barcodes* podem auxiliar a criar um bom ambiente para pesquisas em taxonomia, pois integraria um grupo de pesquisadores das mais diversas áreas.

Ainda durante a reunião, os participantes foram organizados em grupos regionais (paleártico, neotropical, australasiático e antártico, afrotropical, indomalaio e oceânico) para avaliar a infraestrutura local e a capacidade de participação no ABBI. Dentro do contexto neotropical, ficou bastante claro que o Brasil tem a capacidade de participar de forma considerável (ver o item “A participação do Brasil no ABBI”).

A PARTICIPAÇÃO DO BRASIL NO ABBI

REFERÊNCIAS

Como vários pesquisadores no Brasil já tinham se organizado para apresentar uma grande proposta de financiamento de recursos voltado para gerar *barcodes* (projeto negado), a posição do Brasil durante o ABBI foi de que somos um grupo de pesquisadores que teria capacidade de participar de todas as etapas do projeto, desde as expedições de coleta até a geração das seqüências e as análises dos dados, inclusive poderíamos ajudar a coordenar o grupo neotropical. O levantamento das amostras de aves neotropicais que poderiam ser utilizadas no projeto do *barcodes* mostrou que as coleções na América do Norte possuem uma boa representação das espécies. Já entre as coleções no Brasil com tecidos associados a *vouchers* se destacam o Museu Paraense Emílio Goeldi (com mais de 5.000 amostras) e a Universidade de São Paulo (com cerca de 1000 amostras), ambas com grande representatividade de vários táxons / espécies não disponíveis em outras coleções.

COMENTÁRIOS FINAIS

O cenário atual ao redor do projeto dos *barcodes* é em vários aspectos semelhante ao que foi gerado quando do lançamento dos grandes projetos de sequenciamento de genomas. Houve muita polêmica, mas os projetos foram realizados. No final, os genomas estavam seqüenciados e analisados, os grupos que anteriormente não dominavam a tecnologia laboratorial de sequenciamento de DNA e análise computacional desses dados foram treinados, os laboratórios com infra-estrutura até então deficiente para análises moleculares foram equipados, e como os grupos de pesquisadores estavam voltados para o mesmo objetivo houve grande colaboração. Seria este um momento propício para agregar colaboradores ao redor dos *barcodes*?

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos organizadores do *workshop* inaugural do ABBI pelo convite para participar do evento, ao Editor Especial Alexandre Aleixo e ao Editor da *Revista Brasileira de Ornitologia* Marco Aurélio Pizo pelo convite em apresentar esse relato feito durante o XIII Congresso Brasileiro de Ornitologia realizado em Belém, Pará. Adriana R. Oliveira-Markes e Tania Matsumoto realizaram as análises dos embriões apreendidos. Aos financiadores das pesquisas realizadas pelo nosso laboratório: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

- Hebert, P. D. N., A. Cywisnska, S. L. Ball e J. R. deWaard (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Royal Soc. Lond. B* 270: 313-321.
- _____ e T. R. Gregory (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst. Biol.* 54: 852-859.
- _____, S. Ratnasingham e J. R. deWaard (2003b) Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. Royal Soc. Lond. B (Suppl.)* 270: S96-S99.
- _____, M. Y. Stockle, T. S. Zemlank e C. M. Francis (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* 2: 1657-1663.
- Moritz, C. e C. Cicero (2004) DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol.* 2: 1529-1531.
- Smith, V. C. (2005) DNA barcoding: perspectives from a "Partnerships for Enhancing Expertise in Taxonomy" (PEET) debate. *Syst. Biol.* 54: 841-844.
- Will, K. W., B. D. Mishler e Q. D. Wheeler (2005) The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst. Biol.* 54: 844-851.