



Técnicas moleculares inovadoras para responder a diversas questões ecológicas



Projeto Conexão Mata Atlântica

Levantamento intensivo da biodiversidade do corredor Sudeste da Mata Atlântica inferidos por sequenciamento de DNA Ambiental (eDNA)



Equipe

Análises de eDNA



Dra. Priscilla M. S. Villela
Cofundadora/Diretora
EcoMol Consultoria e Projetos



Dr. Daniel Cardoso Carvalho
Consultor Científico EcoMol
PUC Minas



Dra. Renata A. Miotto
Diretora de projetos
EcoMol Consultoria e Projetos



Dr. Heron Hilário
Consultor Científico EcoMol
PUC Minas



Dra. Paula C.R. Oliveira
Consultora Científica EcoMol
ESALQ / USP



Dr. Gabriel Brejão
Consultor Científico EcoMol
UFSCar, campus Lagoa do Sino

1. **Levantamento intensivo da biodiversidade** do corredor na área de intervenção do Projeto Conexão Mata Atlântica inferidos por sequenciamento de DNA Ambiental: caracterização da **riqueza de espécies, composição de comunidades e a quantificação absoluta de espécies;**
1. Ampliar o conhecimento sobre a biota da Mata Atlântica quanto à ocorrência e à quantificação absoluta de **espécies bioindicadoras, invasoras e ameaçadas de extinção;**
1. **Coletar, armazenar, e analisar por meio da técnica de *metabarcoding*, amostras de DNA ambiental** extraído de amostras de solo e água coletadas em propriedades selecionadas dentro do escopo de intervenção do Projeto (22.319,54 km²) contemplando os **estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais;**
1. Apresentar **diferenças das comunidades entre métodos e entre tratamentos (com e sem intervenção do Projeto)** e identificar das principais espécies que contribuem para as diferenças entre as comunidades, e entre os métodos e tratamentos e demais indicadores.

O DNA ambiental

eDNA metabarcoding



Extração de DNA



Amplificação primers vertebrados invertebrados



Sequenciamento Nova Geração (NGS)

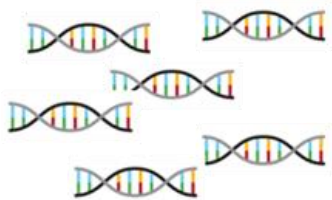


Comparação banco de dados



Invertebrados

Vertebrados



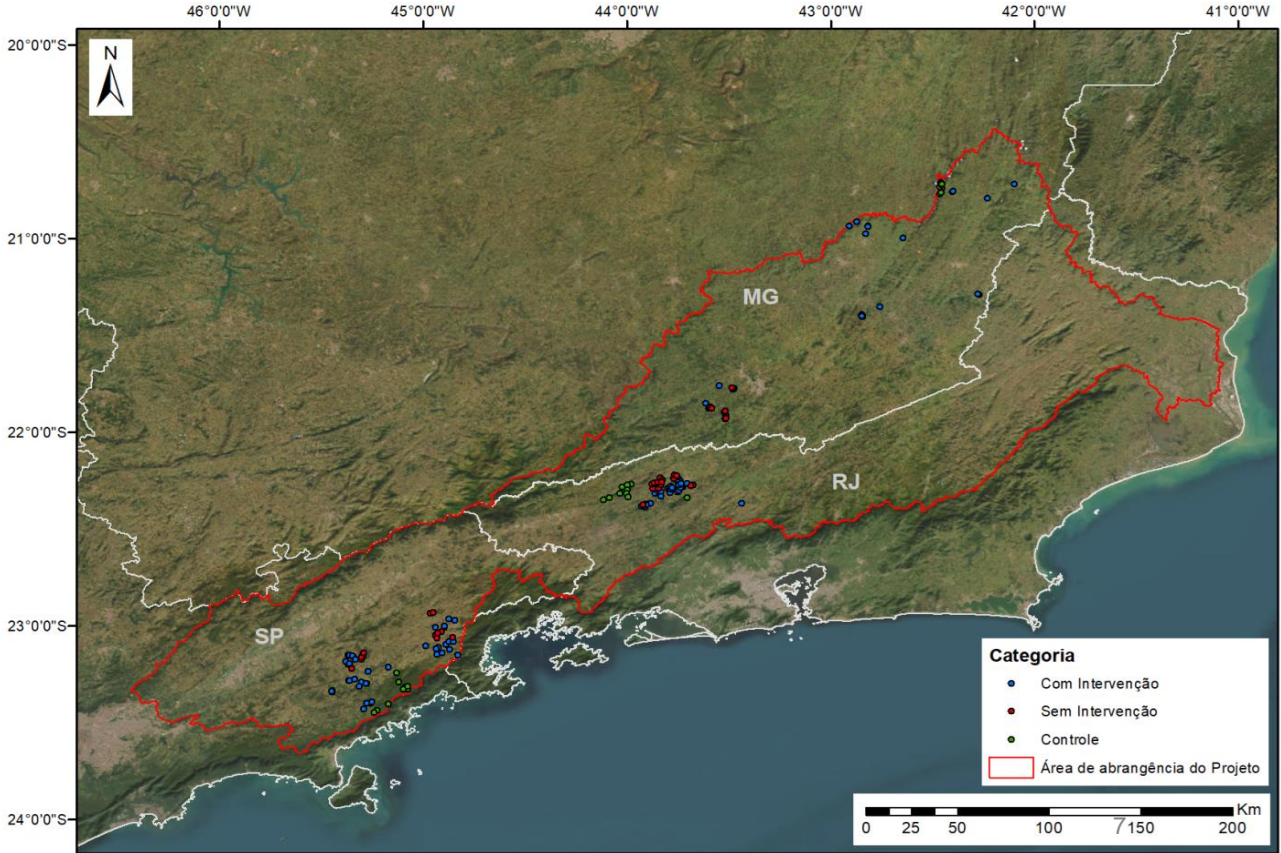
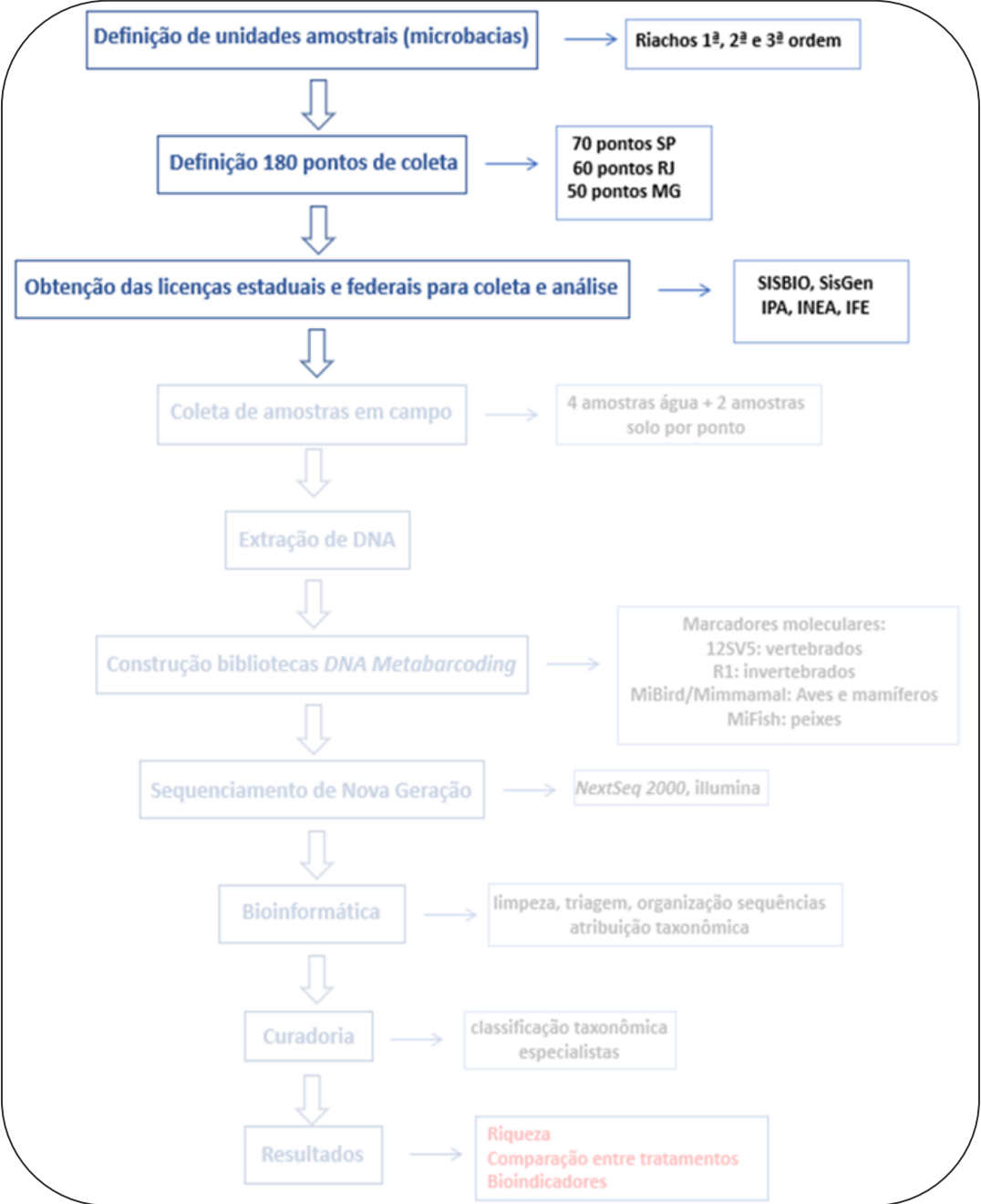
- 1 amostra, vários grupos investigados;
- Identificação automática baseada em referência.

Por que usar eDNA?

Vantagens da utilização de eDNA comparativamente com outras metodologias:

- Menor esforço amostral
 - 1 amostra, diversos grupos taxonômicos
- Não invasivo
 - menor impacto, não requer captura
- Detecção de espécies elusivas
 - espécies furtivas, raras
- Análise molecular e computacional passível de atualizações
 - Melhores bancos de referência:
 - **sequências parcialmente identificadas podem ser reclassificadas**
 - Mesmas amostras, novas perguntas:
 - **DNA armazenado pode ser investigado para outros grupos taxonômicos**

Fluxo de análises



Área de estudo

- 180 localidades ao longo dos estados de SP, RJ e MG;
- Tipos de intervenção (Gradiente de Status de Conservação):
 - **Unidade de Conservação (UC)**
 - **Com intervenção (CI - propriedades apoiadas):**
 - cercamento;
 - conservação ou restauração florestal;
 - manejo sustentável do solo;
 - **Sem intervenção (SI - propriedades não-apoiadas).**

Classes	Código	SP	RJ	MG	Total
PSA Proteção	PP	23	0	0	23
PSA Usos Múltiplos	PU	22	35	0	57
PSA Cercamento	PC	0	0	25	25
Sem intervenção	OU	15	15	15	45
Controle	UC	10	10	10	30
Total		70	60	50	180

Área de Estudo - Unidade de Conservação (UC)

SP



RJ



MG



Área de Estudo – Com intervenção (CI)

SP



RJ



MG



Área de Estudo – Sem intervenção (SI)

SP



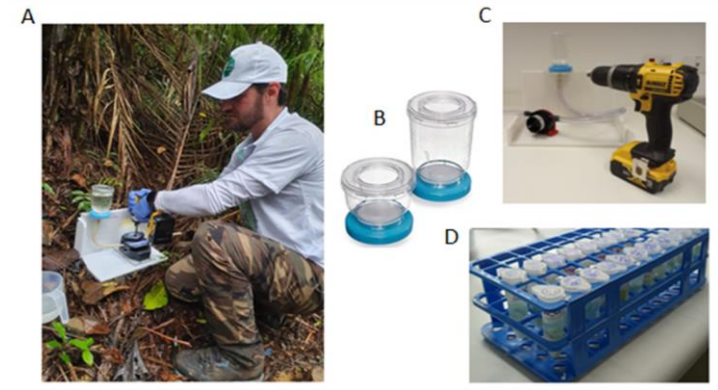
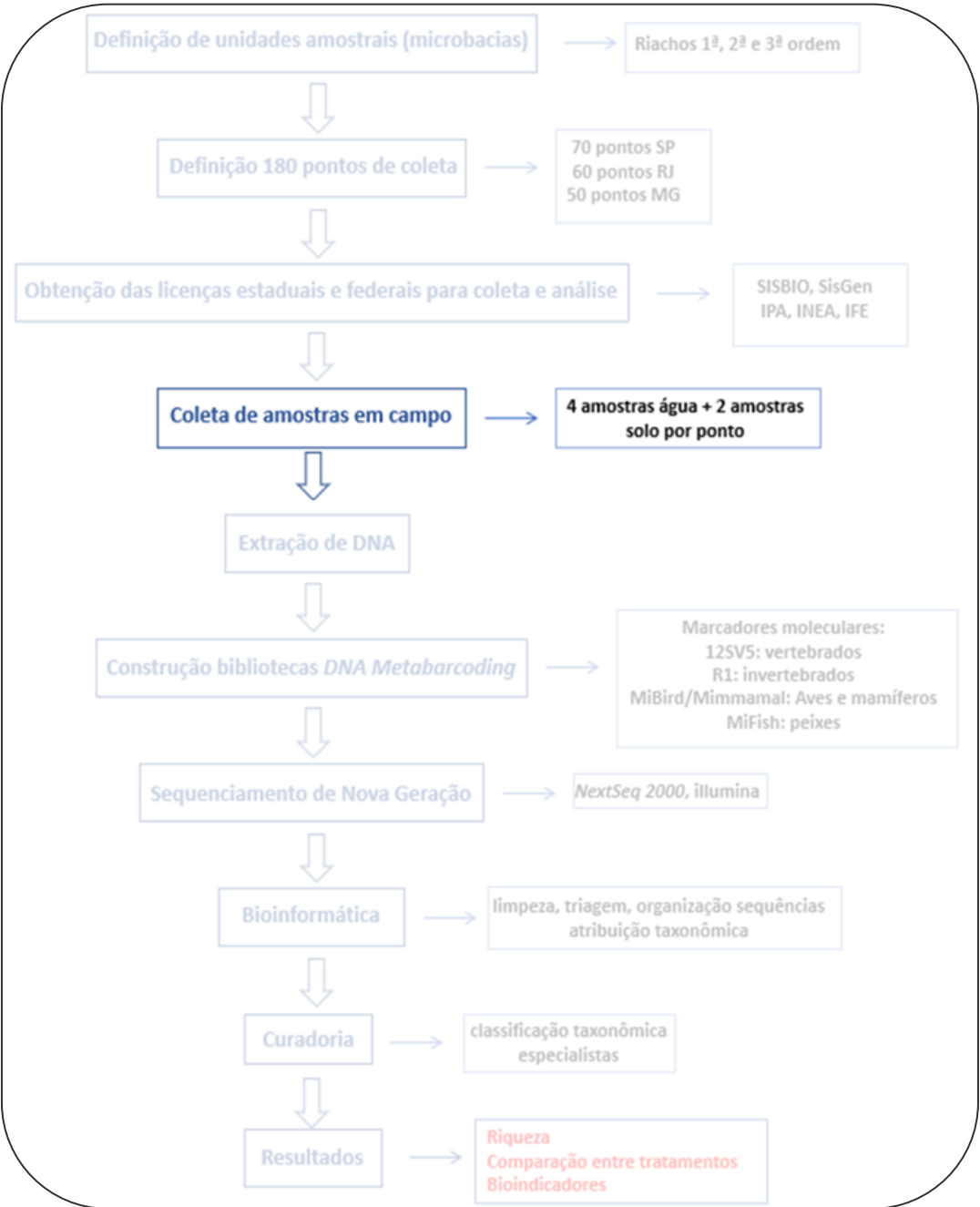
RJ



MG



Fluxo de análises



Grupos focais

- Invertebrados
- Vertebrados
 - Anfíbios
 - Peixes
 - Aves
 - Mamíferos

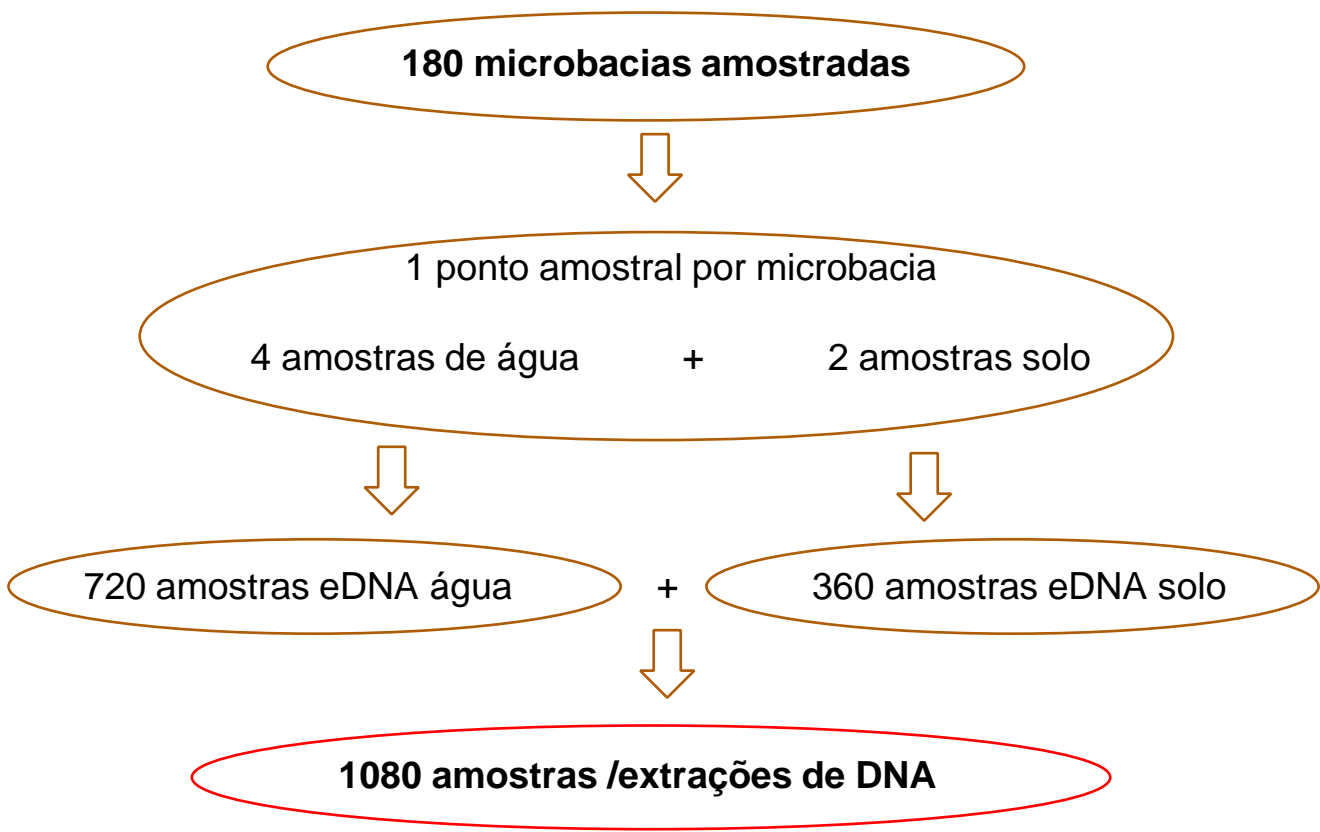
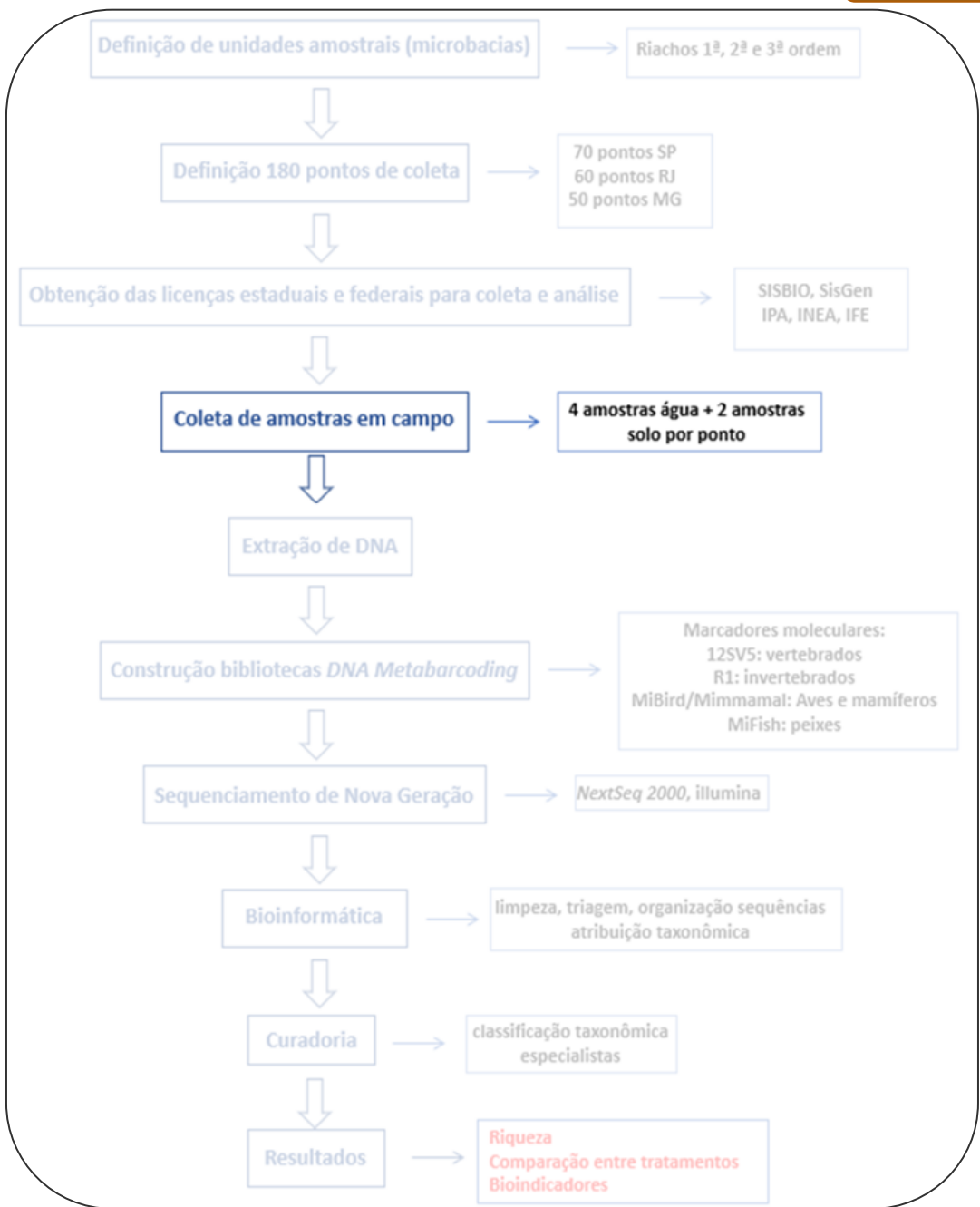


724 amostras amplificadas no total

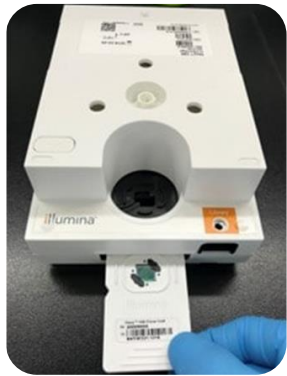
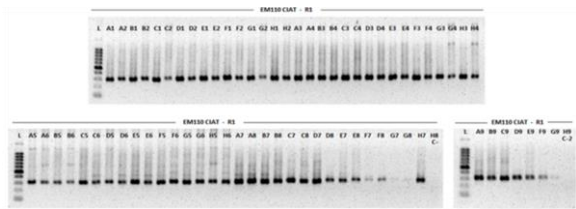
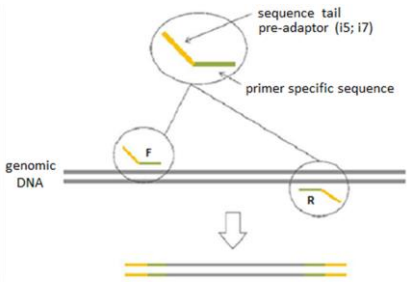
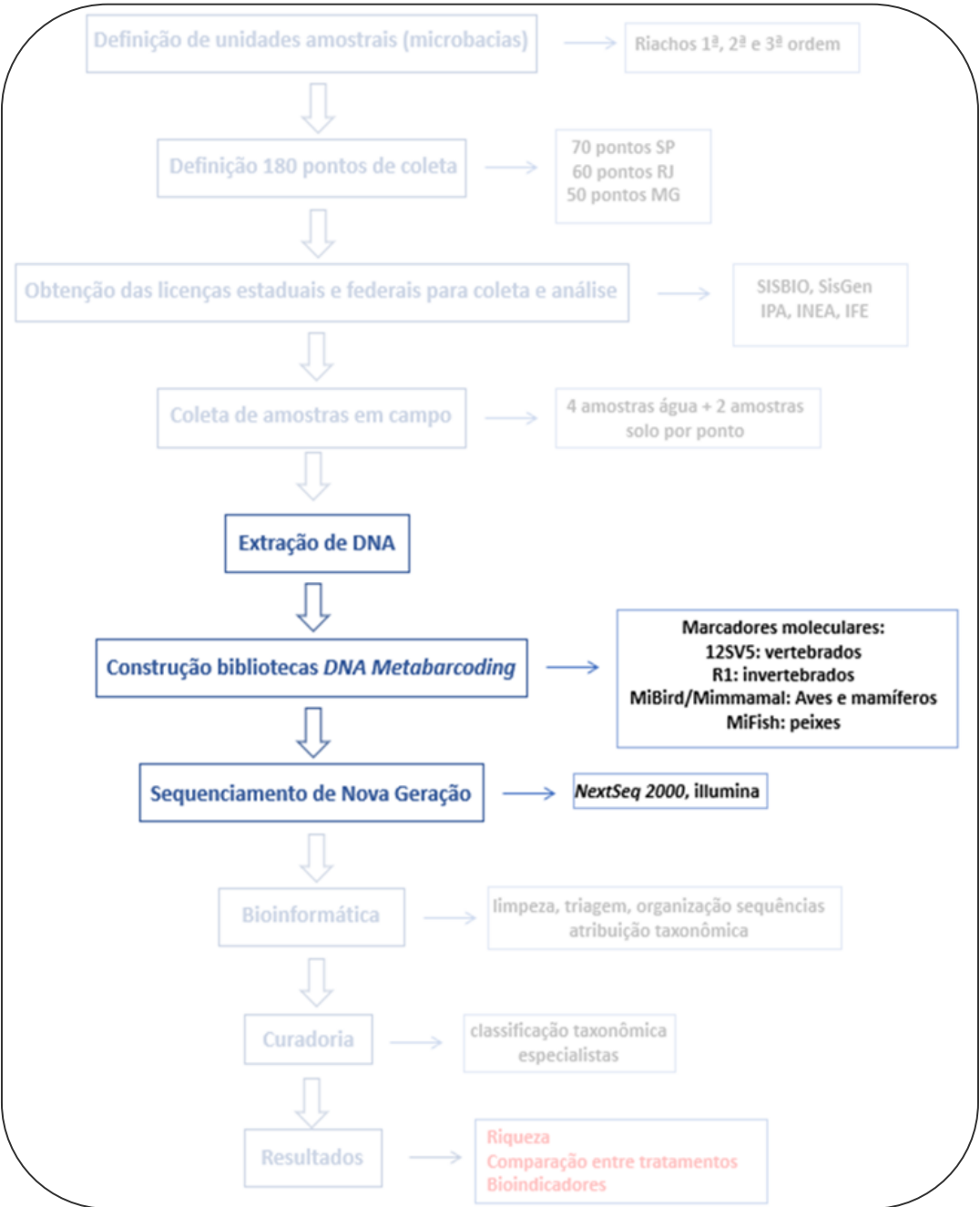
4 marcadores

2.896 reações PCR

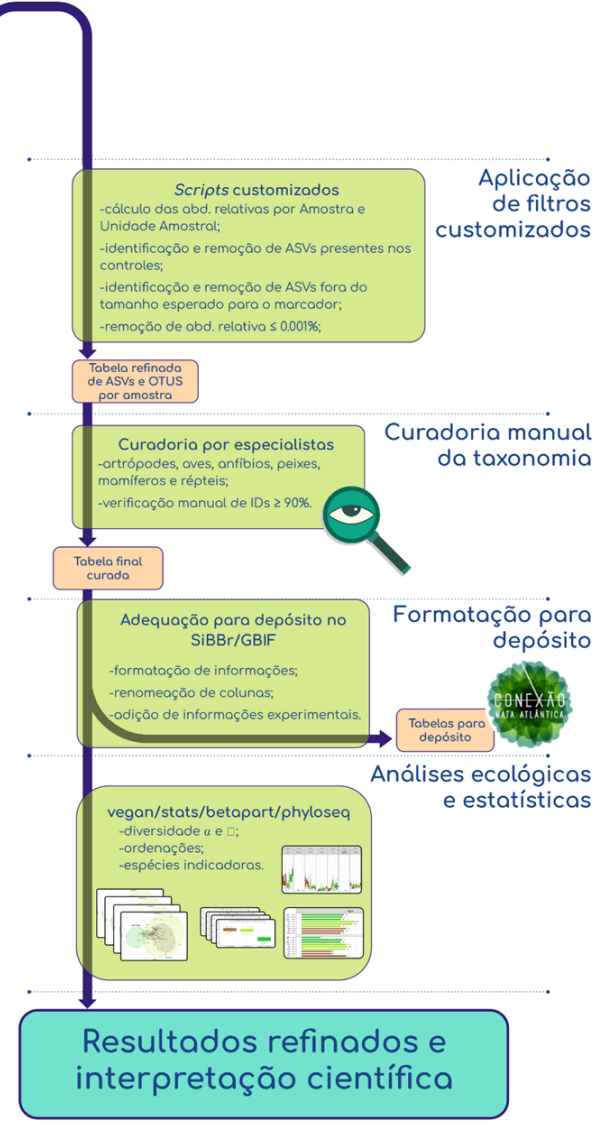
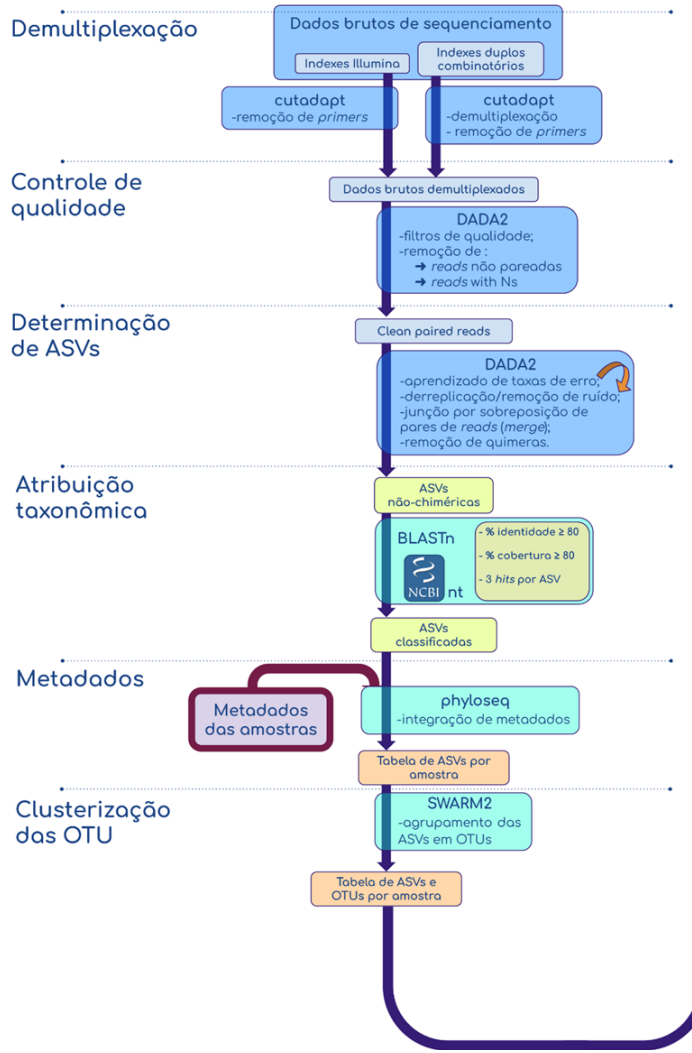
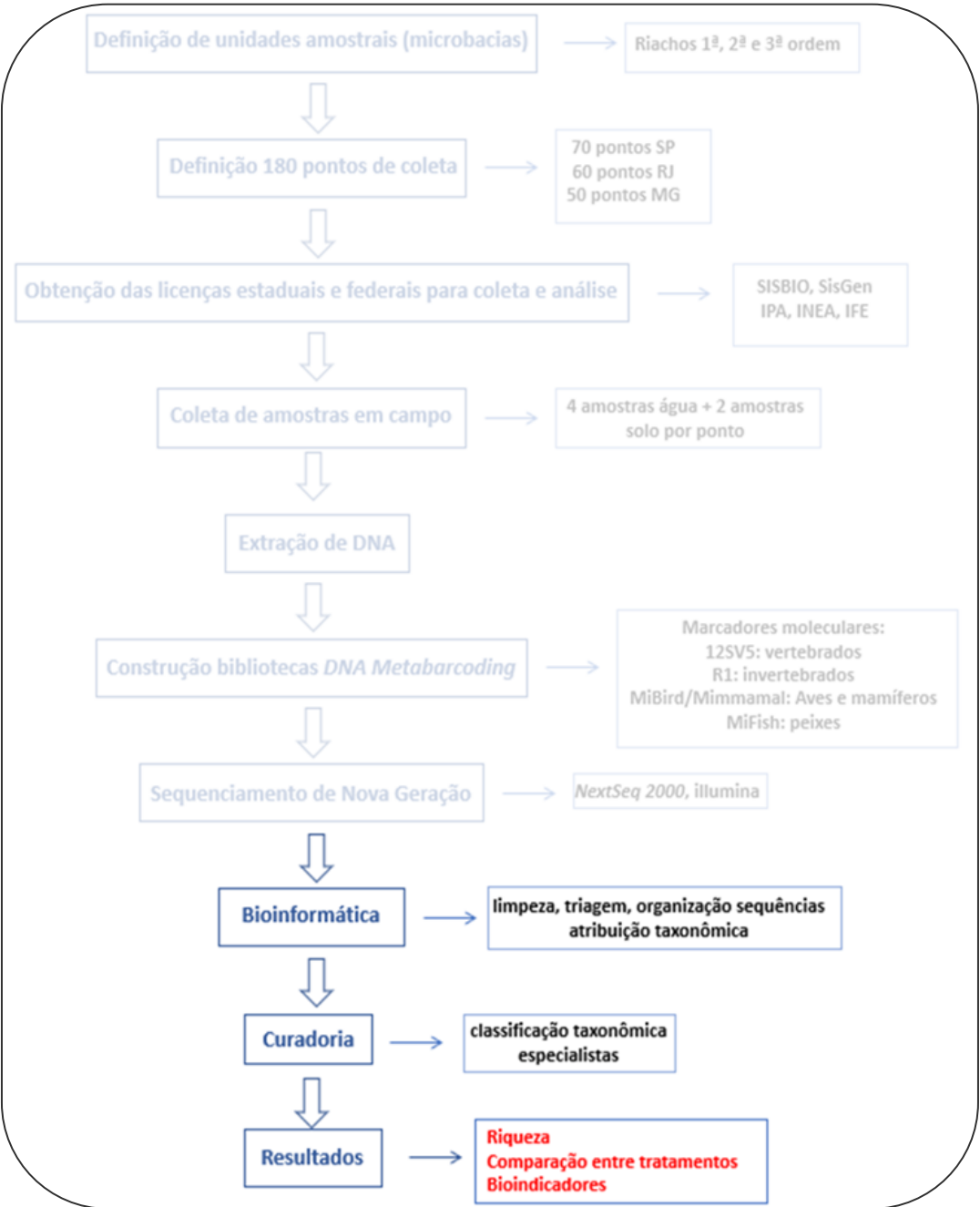
Fluxo de análises



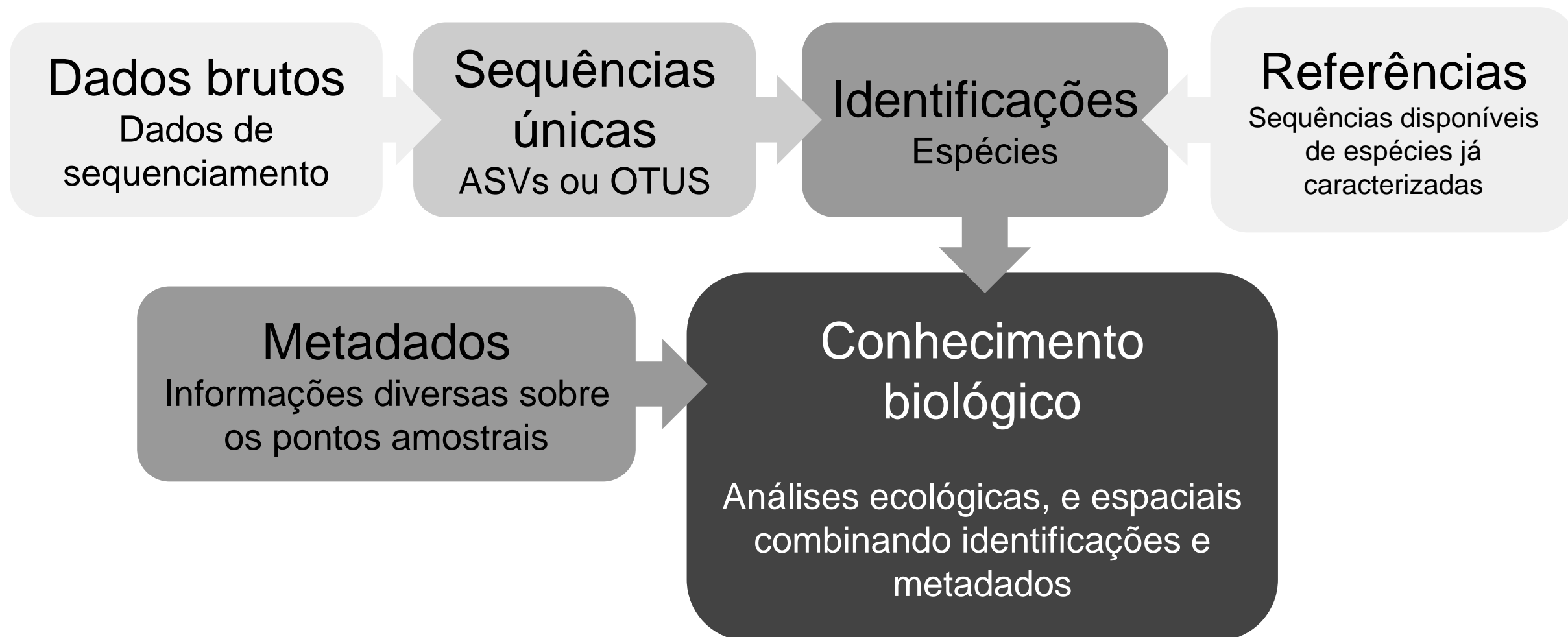
Fluxo de análises



Fluxo de análises



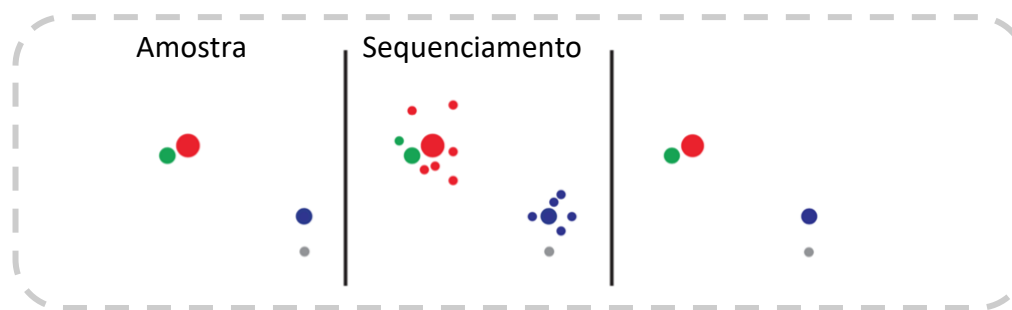
A identificação molecular



ASVs & OTUs

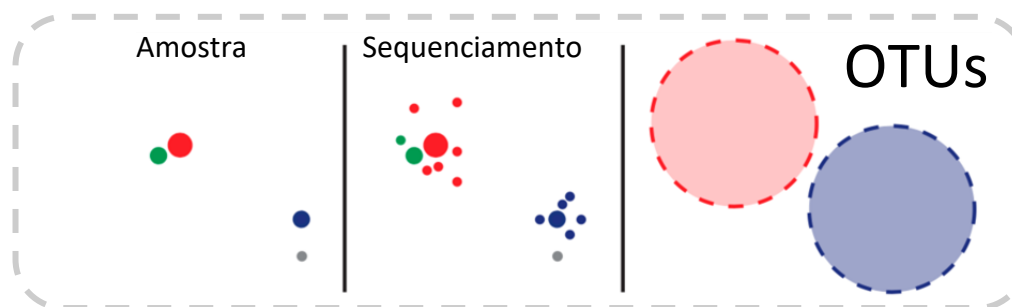
- Sequências que representam a diversidade da amostra;
- Agrupamentos diferentes:
 - ASVs: *Amplicon Sequencing Variants*

→ obtidas pela remoção de ruído das sequências brutas



- OTUs: *Operational Taxonomic Units*

→ obtidas pelo agrupamento por similaridade das sequências brutas

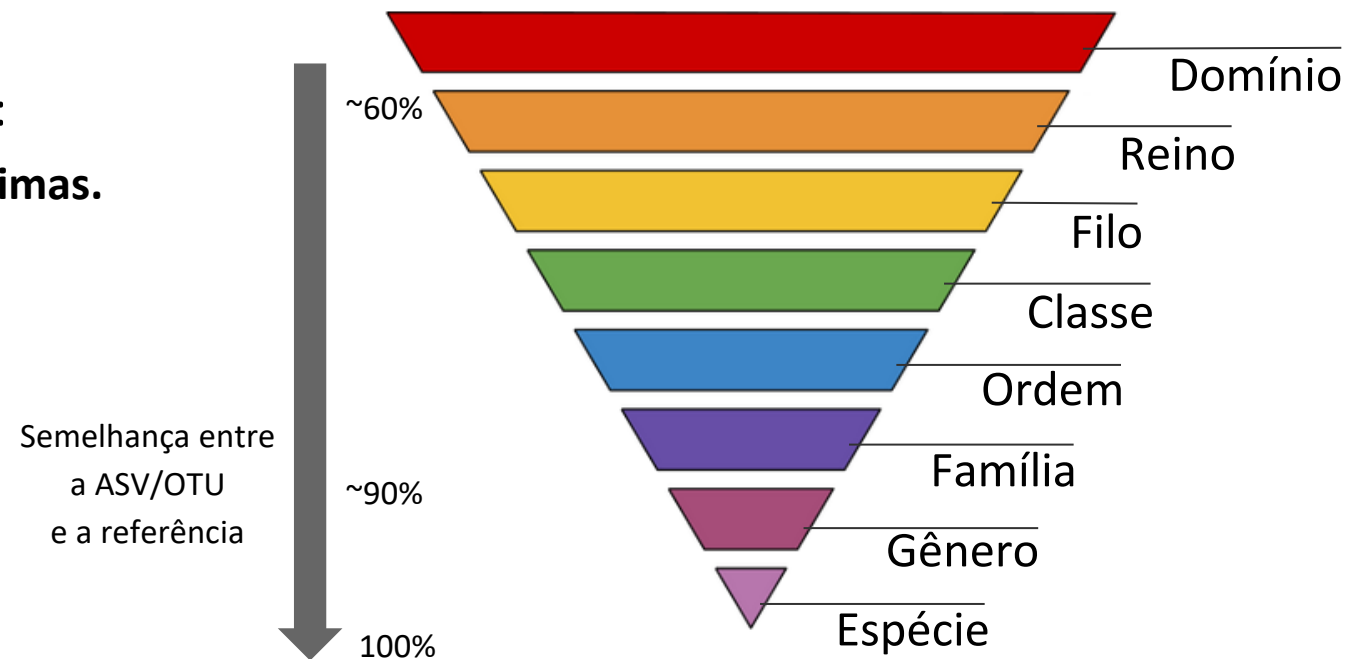


Identificação
taxonômica por
comparação com
banco de referência

Identificação taxonômica:

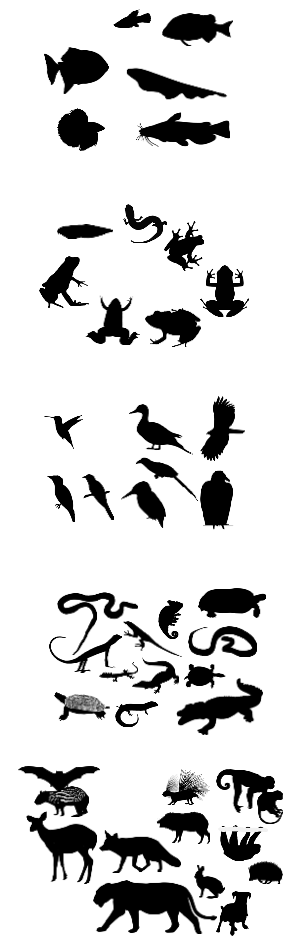
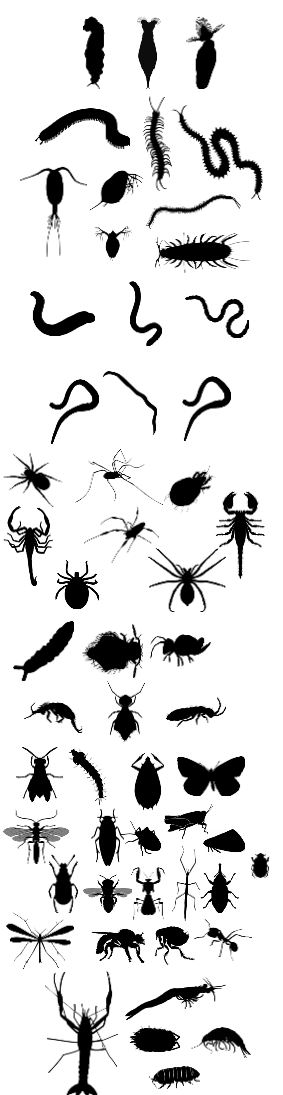
- Quanto mais semelhante, mais precisa:
→ **identificação em nível de espécie.**
- Eventualmente chega a **taxa menos derivados**
- Identificações com baixa similaridade:
→ **ausência de referências próximas.**

Biodiversidade sub representada

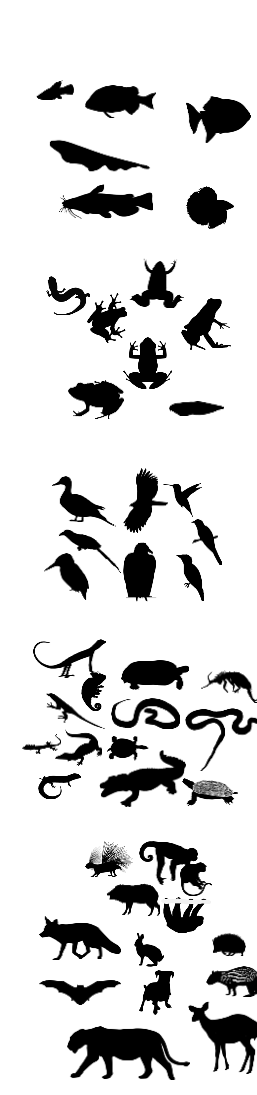
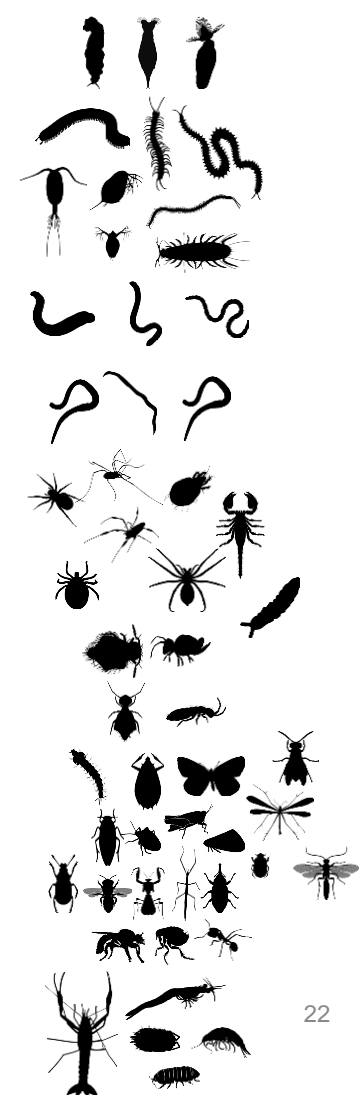





RESULTADOS

Objetivo 1- Levantamento Intensivo da Biodiversidade

	ASV	OTUs	Id taxonômica		
Vertebrados	44.770	30.290	1.324		
Invertebrados	12.389	10.039	2.445		

Objetivo 1- Levantamento Intensivo da Biodiversidade

		ASV	OTUs	Id. Taxonômica		
	Vertebrados	14.461	10.266	502		
	Invertebrados	4.123	3.442	808		
	Vertebrados	13.822	9.159	354		
	Invertebrados	3.445	2.773	616		
	Vertebrados	16.487	10.865	468		
	Invertebrado	4.821	3.824	1.021		

Objetivo 1- Levantamento Intensivo da Biodiversidade

→ eDNA ampliou o conhecimento sobre a biodiversidade de invertebrados e vertebrados no Vale do Paraíba do Sul e no Brasil!

Vertebrados:

- Detecção de espécies elusivas, com poucos registros para a região (e.g. Onça-pintada, ariranha)

Invertebrados:

- Annelida, Rotifera e Arachnida: sem registros para o Vale do Paraíba do Sul (Sibbr);
- Mollusca, Insecta e Crustacea: ampliou o registro de *taxa* para o Vale do Paraíba do Sul (SibBr);
- *Hydra vulgaris*, *Trogloarmadillo* sp., *Aphis citricidus*, *Enchytraeus bigeminus* e *Apamea helva**: novo registro para o Brasil;

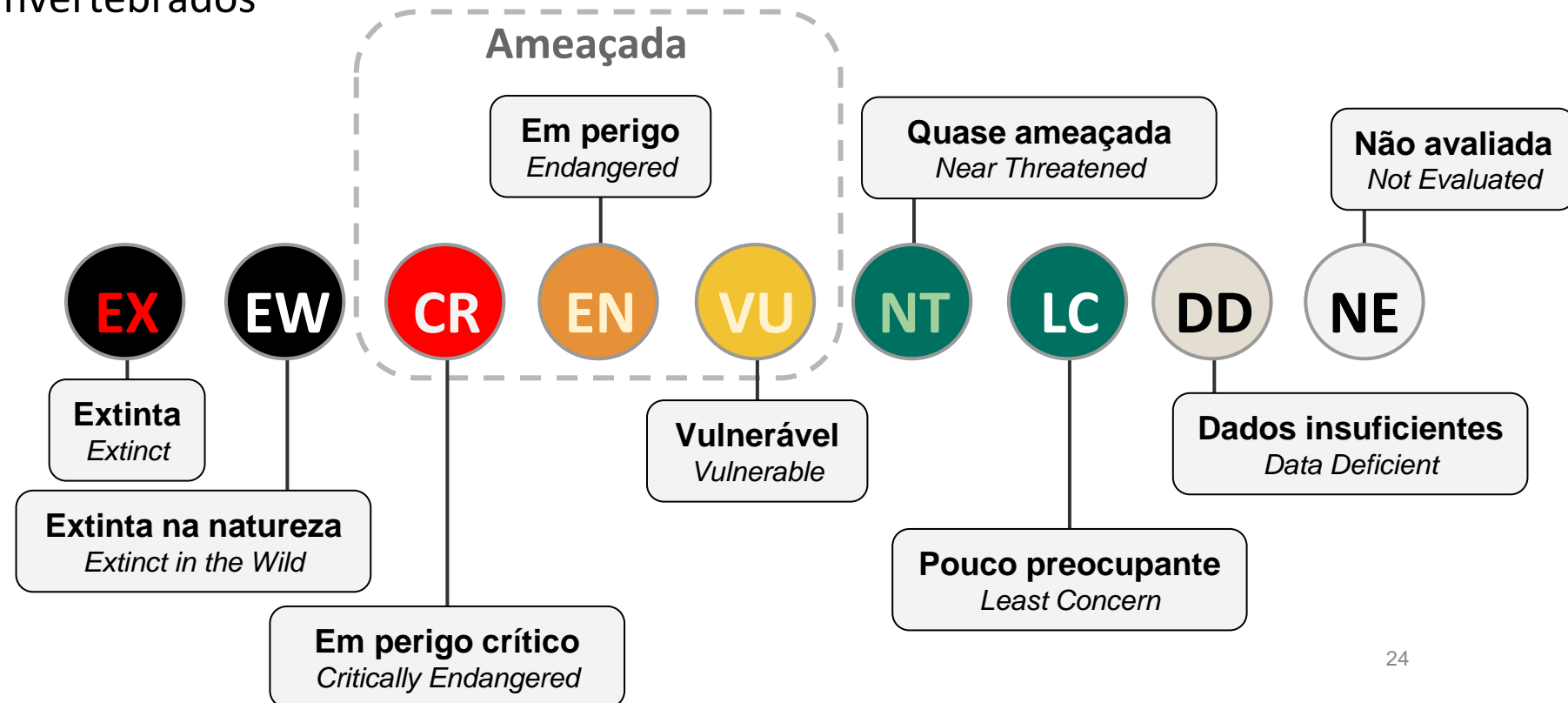


Objetivo 2- Espécies ameaçadas e bioindicadoras

A União internacional para Conservação da Natureza (IUCN)

- **A lista vermelha:** Espécies ameaçadas

- estabelecida em 1964
- 9 categorias
- vertebrados e invertebrados



Objetivo 2- Espécies ameaçadas e bioindicadoras

● Mamíferos

○ Espécie criticamente ameaçada:

- Muriqui-do-sul (*Brachyteles arachnoides*); áreas de UC - SP
áreas de UC, CI *- MG



○ Espécies em perigo

- pequeno roedor *Phyllomys lundi* (SP);
- tapiti (*Sylvilagus brasiliensis*);
- ariranha (*Pteronura brasiliensis*): CI - SP.



→ registros na área de estudo são quase exclusivamente históricos (no RJ): ariranha

→ congruência entre os levantamentos (câmeras e eDNA): tapiti e muriqui

→ espécies elusivas, com poucos registros para a região

Objetivo 2- Espécies ameaçadas e bioindicadoras

● Mamíferos

- Quase ameaçada - NT
 - onça-pintada (*Panthera onca*)

→ segundo registro recente da espécie na região (SP e RJ).



○ Espécies vulneráveis:

- anta (*Tapirus terrestris*): SP
- queixada (*Tayassu pecari*): SP
- bugio-ruivo (*Alouatta guariba*): SP
- tatu-canastra (*Priodontes maximus*): SP



Objetivo 2- Espécies ameaçadas e bioindicadoras

- **Aves**

- Maioria da Ordem dos Passeriformes
→ baixo risco de extinção ou pouco preocupantes (*Least Concern - LC*).
- Quase ameaçadas: *Amazona farinosa* e *Malacoptila striatas*



- Vulnerável e de ocorrência rara (WIKIAVES 2023): *Sporophila maximiliani*



Objetivo 2- Espécies ameaçadas e bioindicadoras

● Répteis Squamados, Crocódilianos e Testudines



- Não detectado no monitoramento ecossistêmico;
- Menor número de registros: menor quantidade de eDNA liberada no ambiente;
- Baixa especificidade do conjunto de *primers* utilizados.

1. Lagartixa *Phyllopezus lutzae*

2. Serpente *Bothrops jararaca* e lagarto *Aspronema dorsivittatum*: relacionados a ambientes florestados da Mata Atlântica.

3. Cágados de riachos da família Chelidae *Phrynops hilarii*: *Dados Insuficientes*



Objetivo 2- Espécies ameaçadas e bioindicadoras

● Anuros

- Não detectado no monitoramento ecossistêmico
- Espécies com **dados insuficientes (DD)**:
 - *Ischnocnema izecksohni*
 - *Phantasmarana apuana*
 - *Paratelmatobius poecilogaster*;



- Espécies **quase ameaçadas (NT)**:
 - *Scinax trapicheiroi* - distribuição restrita



→ **A maioria dos registros foram espécies lóticis:** O design amostral limitante para lagoas, poças, corpos de água temporários e fitotelmos.

Objetivo 2- Espécies ameaçadas e bioindicadoras

● Anuros

○ Bioindicadores de qualidade de ambientes:

→ famílias com modos reprodutivos associadas a **riachos**:

- Cycloramphidae (Thoropa),
- Hylodidae (Crossodactylus, Hylodes e Phantasmarana);

→ famílias com modos reprodutivos associados ao **folhicho**;

- Brachycephalidae (Ischnocnema),
- Alsodidae (Proceratophrys),
- Craugastoridae (Haddadus);



Objetivo 2- Espécies ameaçadas e bioindicadoras

● Peixes



- Não detectamos espécies vulneráveis;
- Famílias das ordens Characiformes e Siluriformes: boas indicadoras da qualidade do habitat (Casatti e Castro 2006, Brejão *et al.* 2013).
- CHARACIFORMES
 - Raspadores de perifíton das pedras em ambientes de corredeiras: Characiformes, família Parodontidae, gêneros *Apareiodon* e *Parodon*;
 - Se alimentam de insetos aquáticos em ambientes de corredeiras: Crenuchidae: gênero *Characidium*;
- SILURIFORMES
 - Vida entre as frestas das rochas: Siluriformes, famílias Trichomycteridae e Heptapteridae.
 - Insetívoros aquáticos, ambientes de corredeiras pedregosas e muito oxigenadas: *Trichomycterus* (Trichomictoridae);
 - Raspadores de perifíton em ambientes de corredeira: Loricariidae: gêneros *Pareiorhina* e *Neoplecostomus*; Loricariinae: *Harttia* e *Rineloricaria*.



Apareiodon sp.



Characidium sp.



Trichomycterus sp.

Objetivo 2- Espécies ameaçadas e bioindicadoras

- **Invertebrados**

- Não detectamos espécies vulneráveis;
- Ocorrência de espécies sensíveis:
 - Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera (EPT): diversidade de habitat águas oxigenadas sem contaminantes nem sedimentação intensa.









Objetivo 2 - Espécies exóticas ou invasoras

Exótica Invasora ou Exótica

- Invertebrados aquáticos invasoras: *Procambarus clarkii* e *Melanoides tuberculatus*, e *Corbicula fluminea* ;
- Invertebrados terrestres invasores: *Drosophila (Sophophora) suzukii* e *Scaptodrosophila latifasciaeformis*;



- Mamífero exótico invasor javaporco (*Sus scrofa*); exótico doméstico gatos (*Felis catus*) e cachorros (*Canis familiaris*) em áreas CI e UC;
- Aves exóticas domésticas (criação em propriedades rurais): *Anas platyrhynchos*, *Anser anser* e *Gallus Gallus* e *Meleagris gallopavo*;
- Anuro: espécie exótica invasor rã touro americana (*Aquarana castesbeiana*).



Impacto potencial

- tanques de piscicultura: Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e a Cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), Carpas (*Cyprinus carpio* e *Hypophthalmichthys nobilis*) e Tilápias (*Coptodon* sp. e *Oreochromis* sp.)



- aquarismo: Guppy (*Poecilia reticulata*), as Molinésias (*Poecilia sphenops*, *P. latipinna* e *P. formosa*), os espadinhas (*Xiphophorus couchianus*, *X. hellerii*, *X. maculatus* e *X. variatus*); *Uaru amphichanthoides* e *Chaetobranchopsis bitaeniatus*.



Objetivo 2 - Espécies bioindicadoras

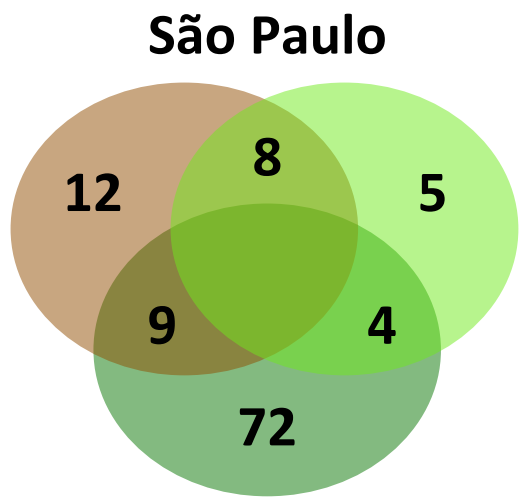
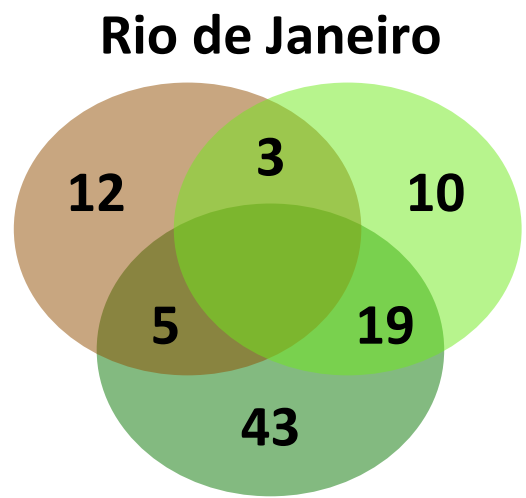
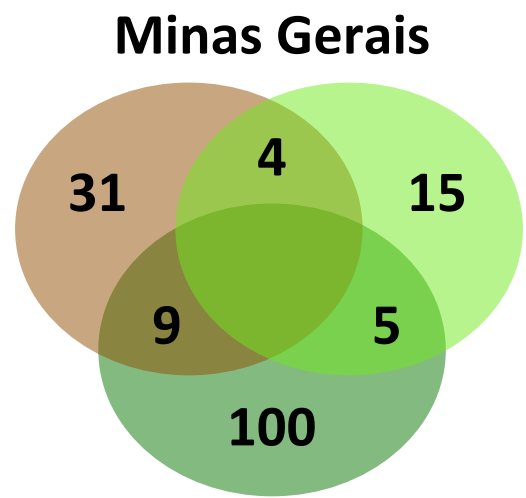
Amostras de água (IndSpecies)

Número de espécies indicadoras de cada *status de conservação*, compartilhadas ou não

Áreas preservadas - Unidades de Conservação (UCs)

O maior número de **espécies exclusivas**

→ A estrutura do ambiente preservado oferece mais nichos.



Objetivo 2 - Espécies bioindicadoras

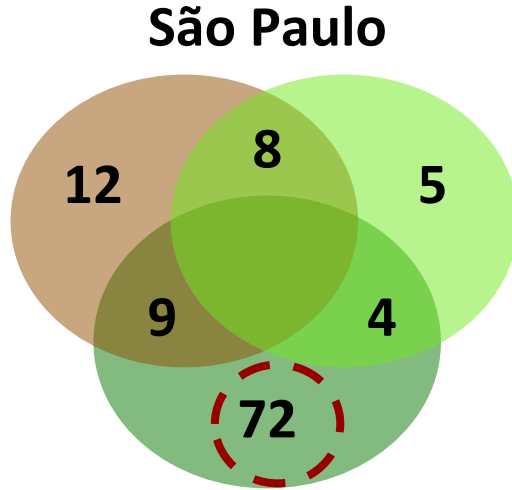
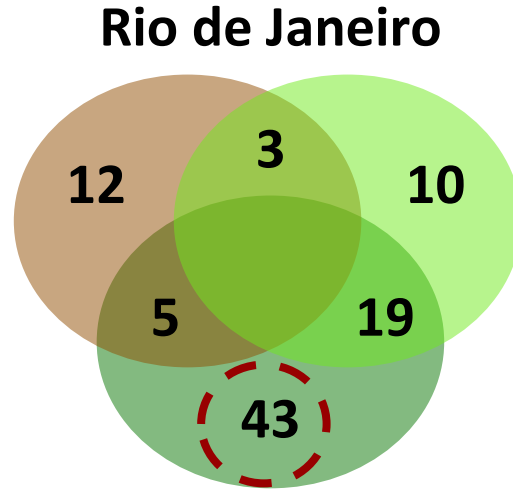
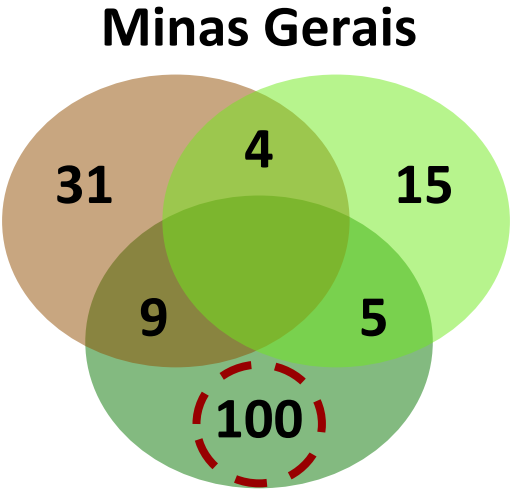
Amostras de água (IndSpecies)

Número de espécies indicadoras de cada *status de conservação*, compartilhadas ou não

Áreas preservadas - Unidades de Conservação (UCs)

O maior número de **espécies exclusivas**

→ A estrutura do ambiente preservado oferece mais nichos.





- Necessidade de melhoria na diversidade de sequências depositadas no banco de dados para melhor entendimento da biodiversidade local através do e-DNA
1. Invertebrados: identificações acima de 99% de similaridades entre as ASVs identificadas e o banco de referência (*blast*) foram pouco frequente.
 2. Vertebrados: maioria das identificações taxonômicas ocorreu em um nível acima de 95% de similaridade entre as ASVs geradas e o banco de referência;
 3. Identificações frequentes na faixa entre 80% e 83%: pequenos mamíferos com pouca representatividade nos bancos de dados.

e-DNA como ferramenta de avaliação

Objetivo 4 - Comparações entre tratamentos

Objetivo 4 - Comparações entre tratamentos

Análises ecológicas preliminares

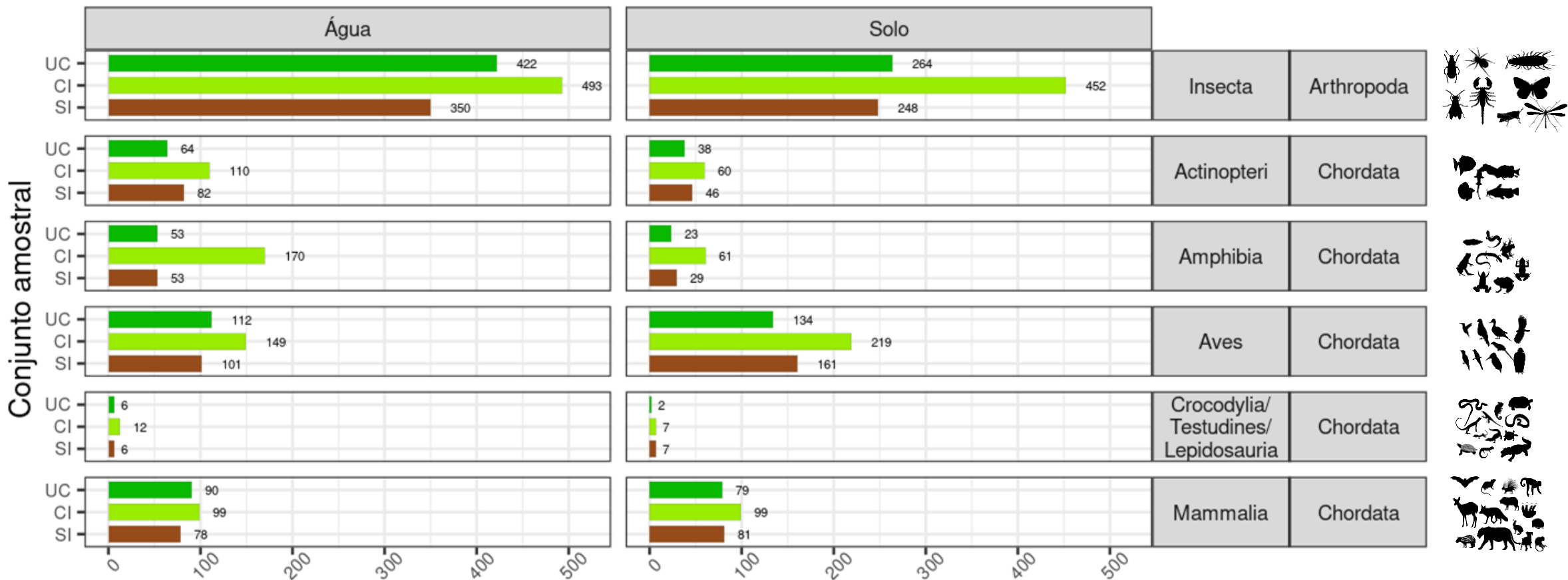
Comparar:

- Áreas: com intervenção por PSA (CI), sem intervenção por PSA (SI) e unidade de conservação (UC - referência)
- Estados: São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ) e Minas Gerais (MG)

Parâmetros:

- 1) Índices de diversidade;
- 2) Táxons bioindicadores
- 3) Composição da comunidade encontrada (vertebrados + invertebrados)

Número de diferentes espécies encontradas por Classe, para Status de conservação:

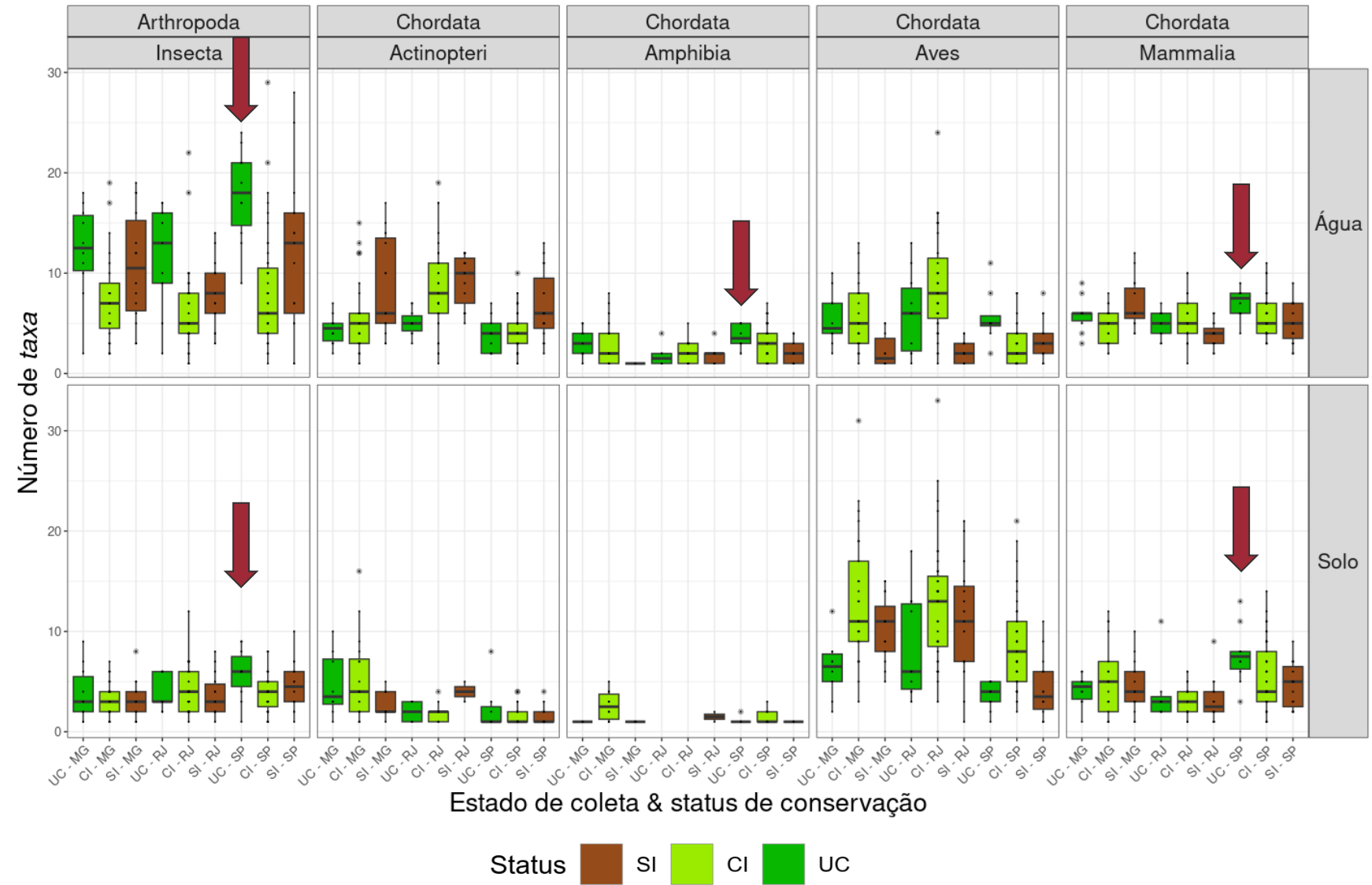


Status ■ SI ■ CI ■ UC

- Maior diversidade em CIs
 - congregam espécies de UCs e SIs.
 - diferentes graus de recuperação, diferentes nichos.

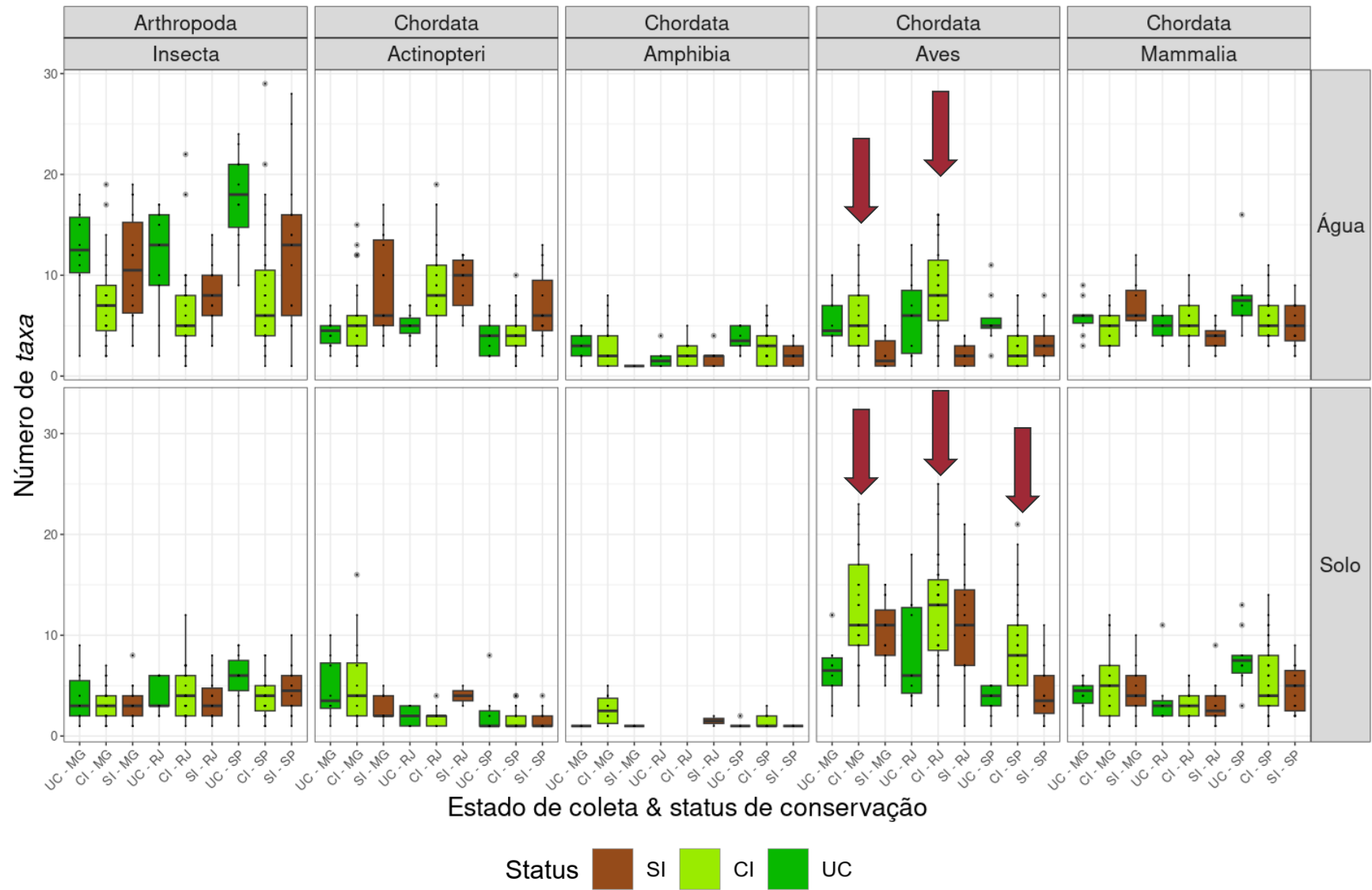
Diversidade Alfa

- Não houve um padrão para todos os táxons;
- Insecta, Amphibia e Mamíferos: maior em UC e SP



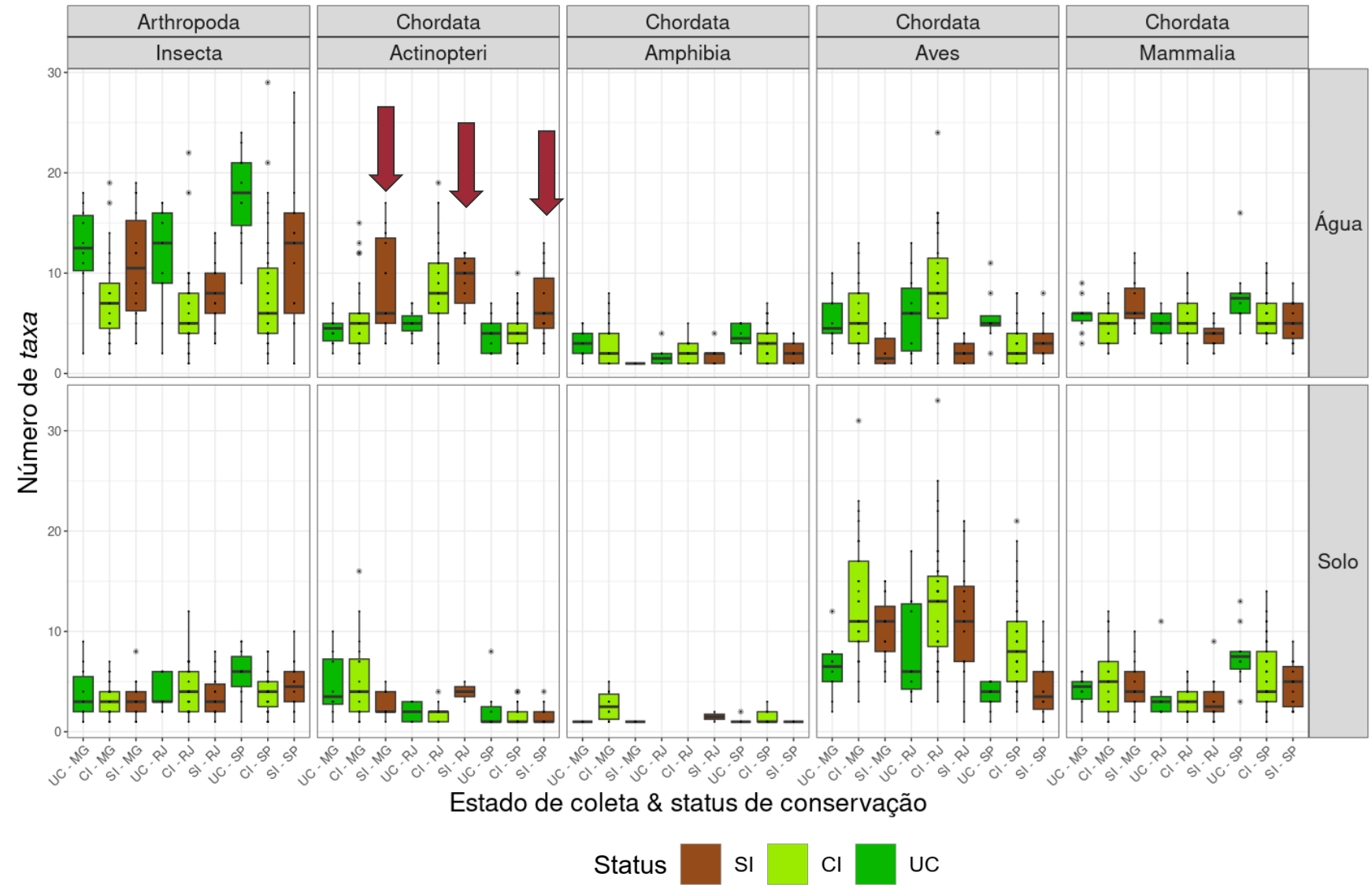
Diversidade Alfa

- Não houve um padrão para todos os táxons;
- Insecta, Amphibia e Mamíferos: maior em UC e SP
- Aves: maior em CI



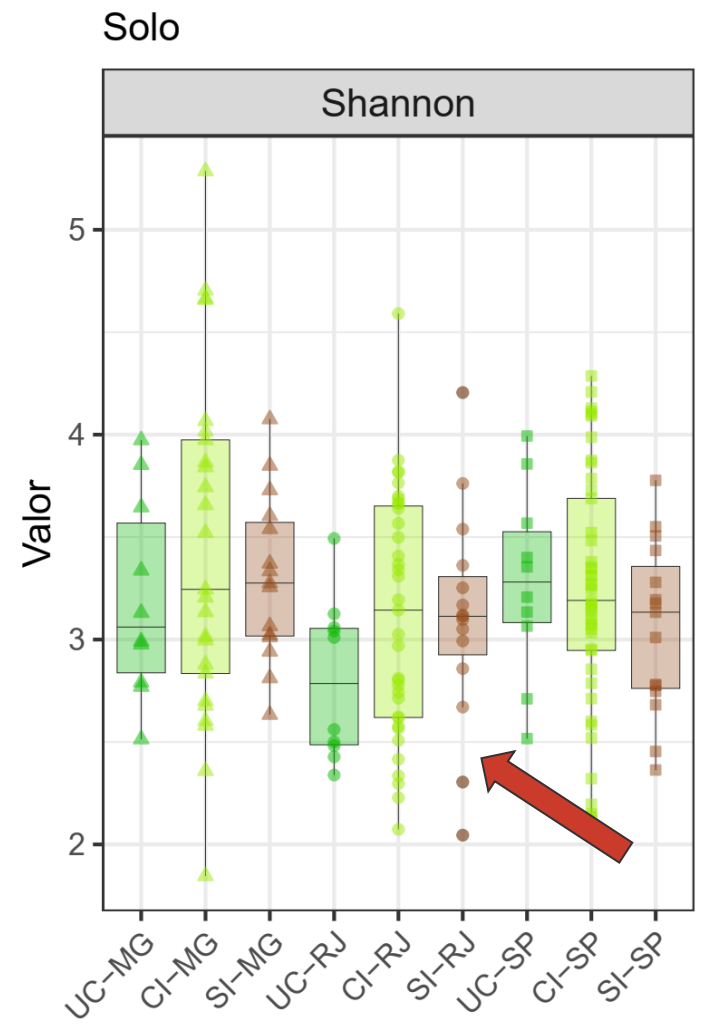
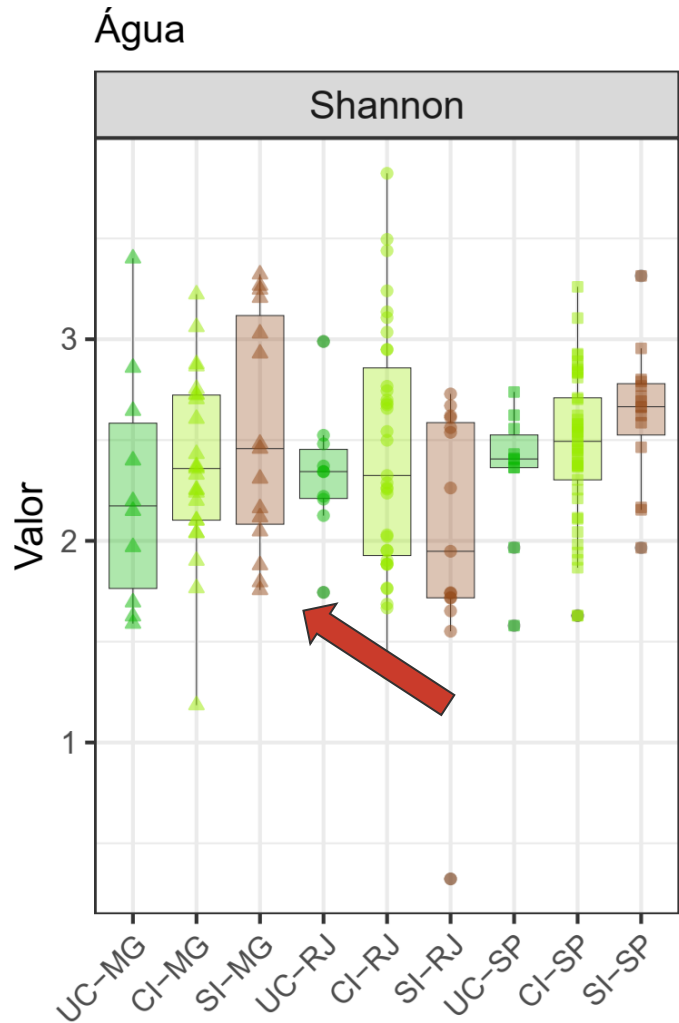
Diversidade Alfa

- Não houve um padrão para todos os táxons;
- Insecta, Amphibia e Mamíferos: maior em UC e SP
- Aves: maior em CI
- Peixes Actinopterygii: maior em SI



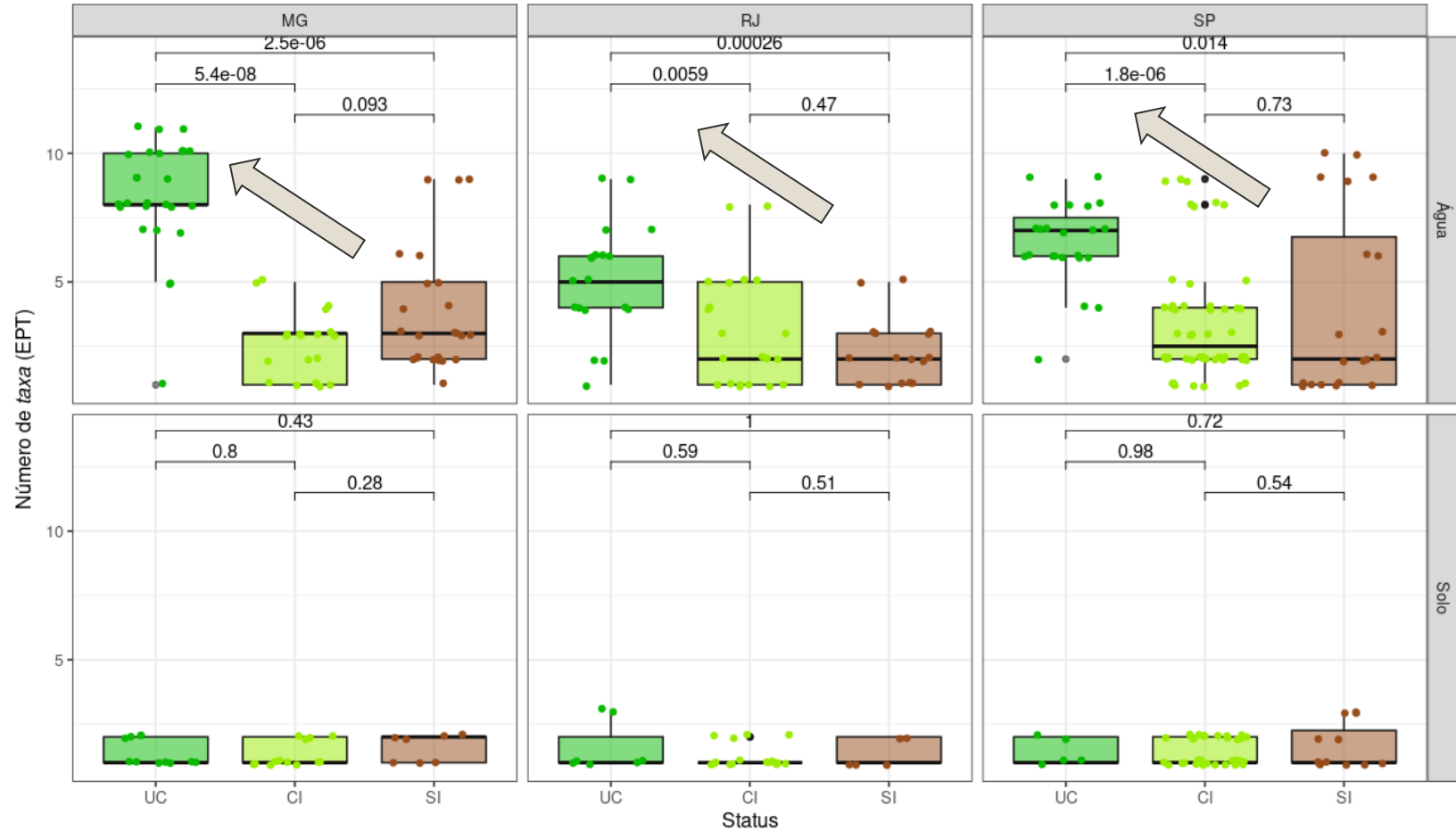
Índices de Diversidade

- Maior diversidade de Shannon
UC-CI-SI: RJ-água; SP- solo



Status ■ SI ■ CI ■ UC

Bioindicadores clássicos de qualidade de água: Ordens Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera



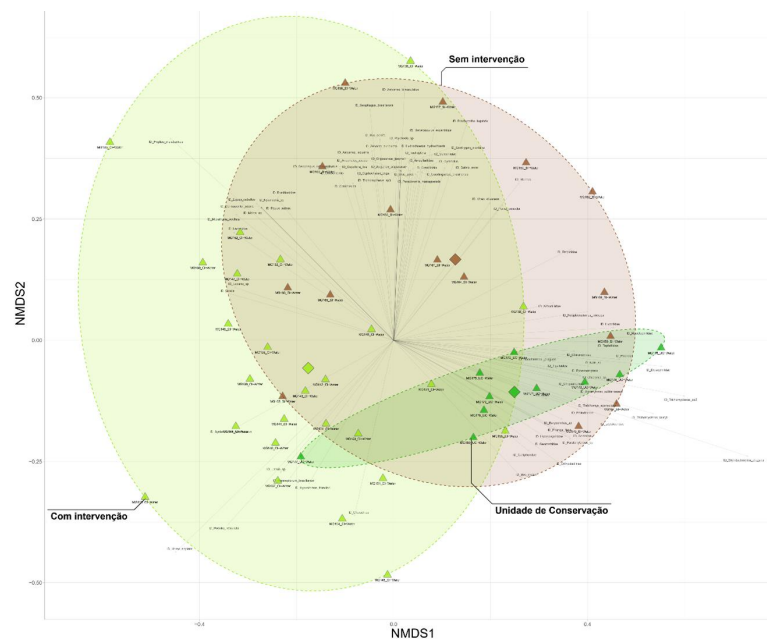
Status
■ UC
■ CI
■ SI

→ **Tendência de aumento da riqueza de EPT de SI - CI - UC**

Status ■ SI ■ CI ■ UC

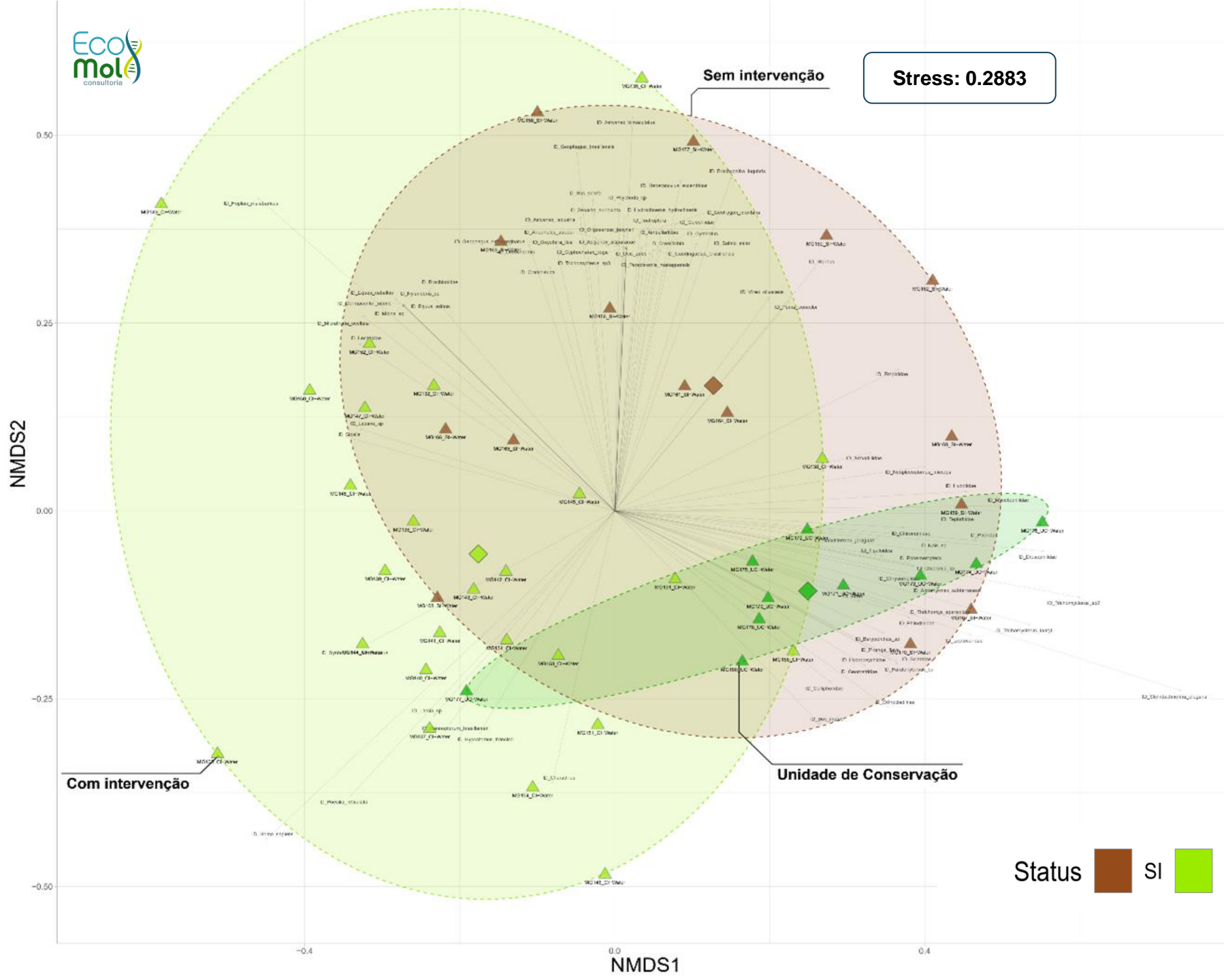
Composição da Comunidade: Vertebrados + Invertebrados

- 90% ou mais de identidade com o banco de referência (*BLASTn* contra o *NCBIInt*).
- ex. Amostras de Água
 - Distribuição dos pontos de coleta com relação à composição da comunidade (espécies e suas abundâncias);
 - Elipses representa a distribuição dos pontos por Status de Conservação (UC, CI, SI);
 - Elipses amplas representam comunidades muito distintas entre os pontos daquela classe e vice-versa;
 - Elipses separadas representam comunidades diferentes entres os Status de conservação;
 - O que seria esperado...

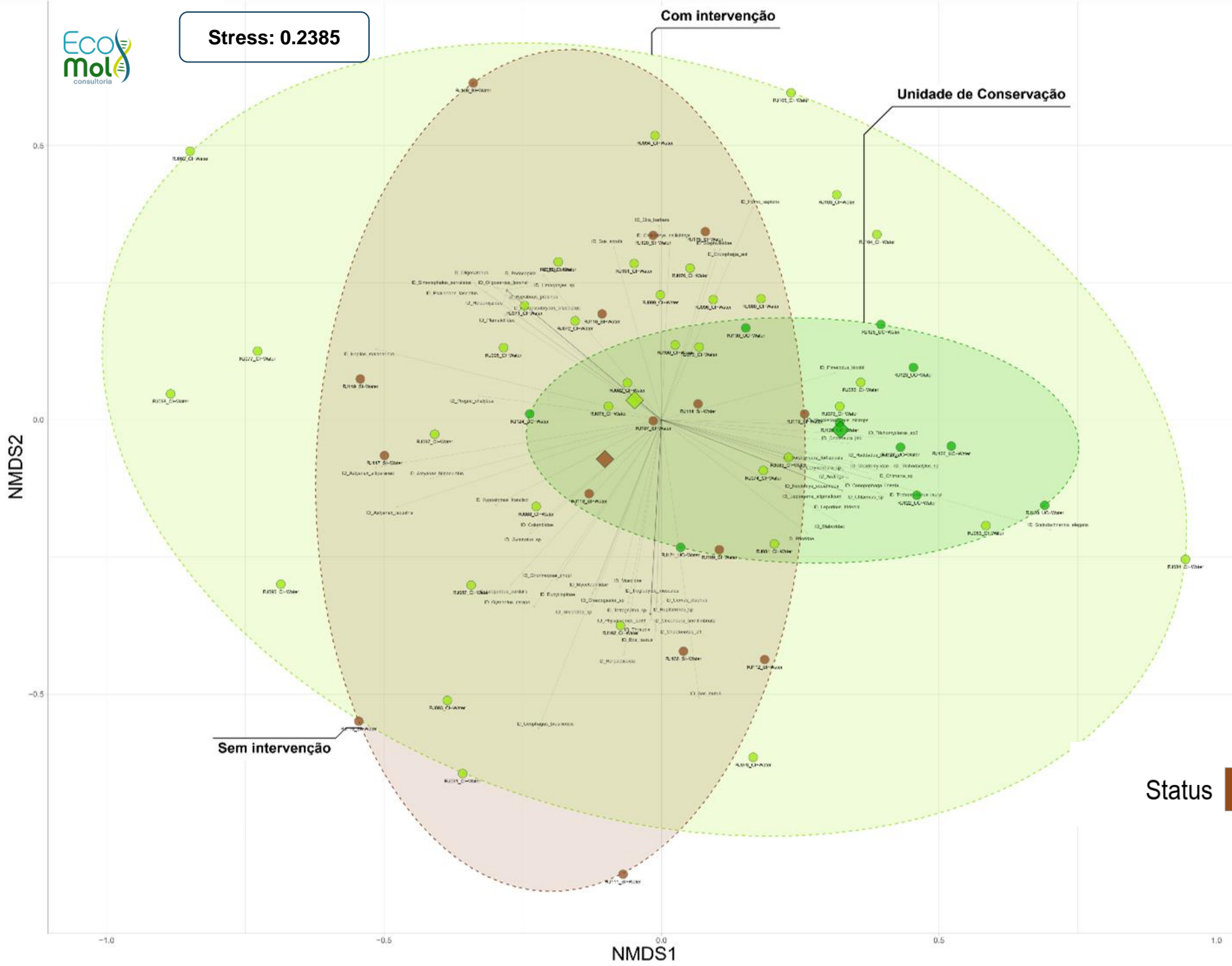


Amostras de água

Identificação com Identidade $\geq 90\%$
& Abundância relativa $\geq 0.005\%$



Stress: 0.2385



Amostras de água

Identificação com Identidade $\geq 90\%$
& Abundância relativa $\geq 0.005\%$

Minas Gerais

Rio de Janeiro

São Paulo

NMDS2

Unidade de Conservação

Sem intervenção

Com intervenção

NMDS1

Amostras de água

Identificação com Identidade $\geq 90\%$
& Abundância relativa $\geq 0.005\%$

Minas Gerais

Rio de Janeiro

São Paulo

Status SI CI UC

CONCLUSÕES

Informação abundante sobre a biodiversidade do Vale do Paraíba do Sul

- DNA ambiental possibilita rápido levantamento da biodiversidade
 - ferramenta de fácil aplicação;
 - reduzido tempo de coleta e abrangência ampliada;
 - diversos grupos taxonômicos a partir de uma única amostra;
 - cada Estado tem sua especificidade com relação a biodiversidade
 - espécies bioindicadoras e vulneráveis foram detectadas
 - melhoria na diversidade de sequências depositadas no banco de dados: invertebrados e pequenos mamíferos irá aumentar a capacidade informativa desse dados de e-DNA.
- eDNA como ferramenta de avaliação e monitoramento do PSA:
 - houve uma tendência de que CI fosse mais similar a UC em SP;
 - essa tendência não foi clara nos Estados de MG e RJ (tempo e tipo de intervenção).

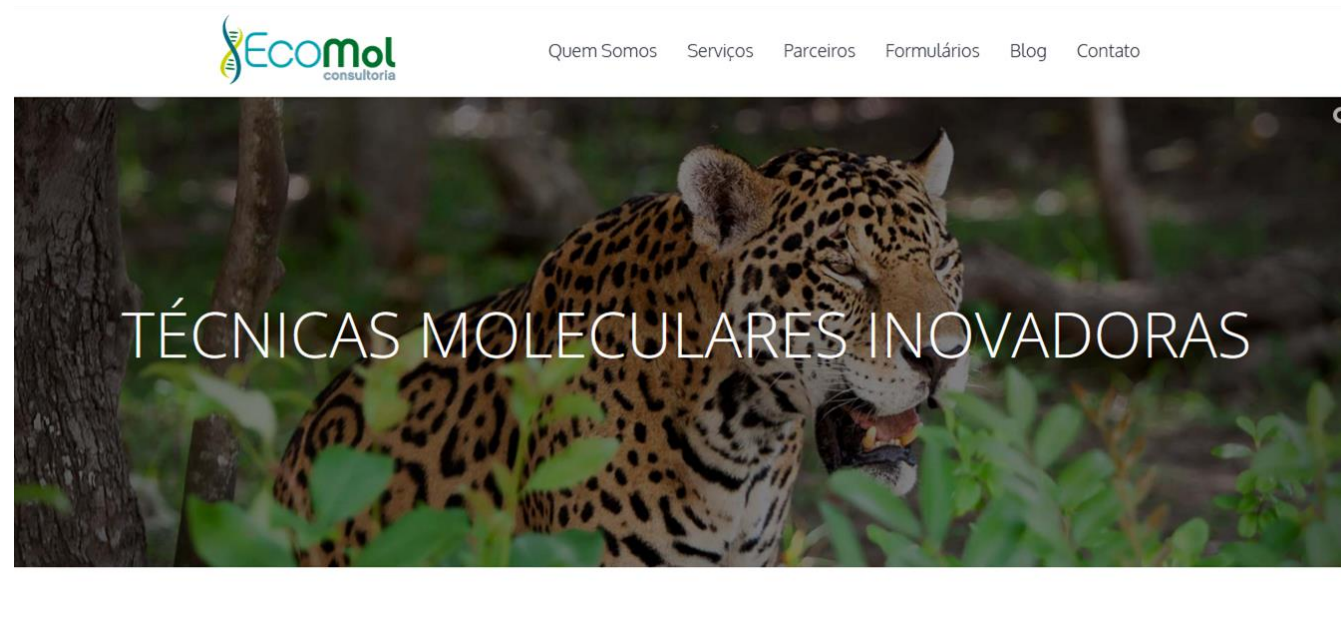
Alguns exemplos de aplicação do conhecimento gerado da biodiversidade

- Manejo focado para a conservação de espécies ameaçadas/ vulneráveis;
- Manejo focado para o controle dessas espécies exóticas invasoras;
- Controle de atividades potencialmente impactantes: Espécies relacionadas a piscicultura e aquarismo;
- Potencialidade: avaliar tipos de PSA e características da paisagem (tamanho dos fragmentos; idade dos fragmentos; outros).

Muito Obrigado!

Contato

www.ecomolconsultoria.com.br



E-mail: contato@ecomolconsultoria.com.br

