

Título do Projeto: Avaliação de indicadores de saúde e efeitos genotóxicos em população humana e peixes de igarapés sob potencial exposição à pesticidas na região Oeste do Pará.

Código: PICE1372-2024

Título do Plano de Trabalho: Diversidade taxonômica e molecular da ictiofauna de igarapés da região do Planalto Santareno sob influencia da agricultura de grãos.

Nome do Orientador: Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues

1. INTRODUÇÃO:

No grupo dos peixes (Classe Pisces), são registradas mais de 32.000 descrições científicas de espécies válidas das quais cerca de 13.000 ocorrem em ambientes de água doce (NELSON et al. 2016). A região neotropical abrange a ictiofauna mais diversificada, com estimativas superiores a 7.000 espécies (ALBERT & REIS 2011), onde 2.416 são descritas para a bacia amazônica e 2.072 restritas a esta região (LEVEQUÊ et al. 2008). Este elevado número de espécies não reflete somente a grande diversidade que existe, mas também um constante e expressivo aumento do conhecimento sobre a ictiofauna (BUCKUP et al. 2007).

A identificação de espécies biológicas é o conhecimento mais básico para o entendimento e proteção da biodiversidade, levando em consideração os apelos do planeta para a proteção e conservação da biodiversidade. Considera-se que a tendência de aumento do reconhecimento sobre novas espécies de peixes deverá continuar no futuro próximo e que, a grande maioria das espécies novas a serem descobertas serão de peixes de pequeno porte que vivem fora das áreas centrais da calha de grandes rios e lagos (CASTRO 1999; BUCKUP et al. 2007).

A identificação de espécies biológicas comumente ocorre através da análise de caracteres morfológicos diagnósticos, onde os grupos taxonômicos são formados de acordo com o compartilhamento de caracteres. Apesar de direcionar a classificação dos organismos há bastante tempo, a identificação morfológica tradicional pode apresentar limitações, o que demanda de outras alternativas em adição que busquem facilitar e acelerar o processo de reconhecimento e classificação taxonômica de espécies biológicas (HEBERT et al. 2003a; TAUTZ et al. 2003; DAYRAT 2005; PADIAL et al. 2010; RIEDEL et al. 2013).

Abordagens que fazem uso de outras metodologias de identificação associadas à taxonomia tradicional podem ser úteis para solucionar a crise taxonômica atual e dar um novo impulso aos estudos sobre biodiversidade (TAUTZ et al. 2003; DAYRAT 2005; PIRES & MARINONI 2010). Entre as alternativas propostas, a metodologia de DNA *barcoding* (HEBERT et al. 2003a,b) tem

sido bem sucedida na identificação e delimitação de novas espécies de vários grupos de animais (HEBERT et al. 2003a,b, 2004; BLAXTER 2004; CLARE et al. 2007; KERR et al. 2007; BORISENKO et al. 2008; KERR et al. 2009; HEBERT et al. 2009), inclusive de peixes (GOMES et al. 2015; HENRIQUES et al. 2015; PUGEDO et al. 2016).

No presente estudo utilizaremos a metodologia de DNA *barcoding* para avaliar a diversidade taxonômica das assembleias de peixes de igarapés em áreas atingidas pela expansão da agricultura de larga escala na região oeste paraense. Essa região representa uma fronteira agrícola em consolidação sobre o bioma Amazônia, que por consequência altera a paisagem florestal e os sistemas hidrológicos de igarapés, além disso, o uso intensivo de agroquímicos (herbicidas, fertilizantes, etc...) podem atingir os corpos d'água e promover risco à saúde da biota aquática.

2. JUSTIFICATIVA (até 2.000 caracteres)

Inúmeros obstáculos têm dificultado o avanço no conhecimento da biodiversidade brasileira, especialmente a carência de especialistas taxonomistas, a insuficiência de infraestrutura para amostragens, a necessidade de revisão taxonômica para vários grupos, a dificuldade de identificação de muitas espécies, o grande número de formas ainda não descritas e de locais nunca inventariados (AGOSTINHO et al. 2005).

Os igarapés da região do baixo rio Tapajós são pouco estudados e considerados ambientes vulneráveis às ações antrópicas, que representam ameaças para a sua biodiversidade e estrutura ecossistêmica. Processos de modificação da paisagem natural decorrentes de expansão de áreas de agricultura, além de grandes projetos de infraestrutura, como a pavimentação de rodovias, abertura de estradas e usinas hidrelétricas, têm causado impactos sobre as populações de peixes. Segundo MENDONÇA et al. (2005), a composição das comunidades ícticas é afetada por processos que modificam as estruturas dos ambientes aquáticos. A diminuição da riqueza de espécies nativas, introdução de espécies exóticas e a perda de diversidade genética são processos associados à degradação ambiental em igarapés. A estimativa correta da biodiversidade de peixes em ambientes altamente impactados ou susceptíveis a degradação devido a efeitos antropogênicos como igarapés é importante para conservação adequada da ictiofauna megadiversa encontrada nesses lugares.

3. RESUMO DO PLANO DE TRABALHO (até 2.000 caracteres)

Grande parte da ictiofauna amazônica é constituída por peixes de pequeno porte (< 15cm), principalmente das ordens Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes e Cichliformes, cujas identidade taxonômica e relações filogenéticas ainda permanecem pobremente conhecidas. Esse

componente ictiofaunístico ocorre e muitas vezes está restrito aos sistemas aquáticos de igarapés. No presente estudo, iremos investigar a diversidade taxonômica de peixes de igarapés do planalto Santareno, na região oeste paraense utilizando-se de métodos morfológicos e genético/moleculares de modo integrado, visando-se a caracterização da fauna íctica tanto em ambientes antropizados como ambientes preservados. Espera-se contribuir para o avanço do conhecimento sobre a biodiversidade aquática da Amazônia e para a preservação/recuperação de ecossistemas aquáticos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Contribuir para o conhecimento sobre a biodiversidade amazônica no estudo da ictiofauna de igarapés da região oeste paraense impactada por expansão da agricultura de larga escala.

4.2. Objetivos específicos

1. Identificar os diferentes grupos/espécies de peixes de igarapés da região oeste paraense;
2. Analisar a possível presença de diversidade críptica intraespecífica com base no DNA *bar-coding*;
3. Avaliar possíveis impactos da modificação ambiental associada a expansão agrícola sobre a diversidade genética de peixes de igarapés.

5. MATERIAL E MÉTODO (METODOLOGIA)

Amostragem

Os peixes serão coletados em igarapés antropizados em áreas próximas de campos de agricultura de soja. Amostras adicionais serão obtidas em igarapés preservados em áreas da Unidade de Conservação Flona Tapajós para servir como sítios de referencia (área controle). De cada espécie ou morfoespécie serão obtidas amostras de tecidos de até 4 indivíduos/localidade para estudo molecular. Será escolhida uma espécie de alta abundância para servir como organismo bioindicador para análise da diversidade genética entre a área agrícola e área controle, nesse caso em particular utilizaremos 30 indivíduos por espécie. Após a coleta, os peixes serão direcionados ao Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBIO) da Universidade Federal do Oeste do Pará, onde serão inicialmente fixados em formol 10% e enviados para a Coleção Ictiológica da UFOPA/ICTA para tombamento e estudos morfológicos.

Procedimentos laboratoriais

O DNA genômico de cada espécime será extraído utilizando-se do protocolo de extração “*Salting out*”, adaptado (SUNNUCKS et al. 1996; ALJANABI & MARTINEZ 1997) ou alternativamente com o kit comercial Wizard Genomic DNA (Promega). As extrações positivas serão visualizadas em gel de agarose 1% corado com gelRed (Biotium).

O fragmento da região 5' do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I (DNA barcoding) será isolado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se os primers Fish F1 - 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' e Fish R1 - 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3', (WARD et al. 2005).

Os produtos positivos da PCR serão purificados por centrifugação em coluna usando-se o kit E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega Bio-tek) de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de sequenciamento será usado o kit ABI PRISM® Big Dye™ Terminator V.3 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). As reações ocorrerão em placa de 96 poços com volume final de 10 µL em cada poço, contendo 5,0 µL de H₂O, 1,5 µL de Buffer 5x, 0,5 µL de primer (10 µM), 1,0 µL de solução Big Dye e 2,0 µL de produto de PCR purificado. O programa de ciclagem utilizado no termociclador será: Passo 1) desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, Passo 2) desnaturação por 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos, repete-se o passo 2 por 35 ciclos.

Após a reação de sequenciamento, as amostras serão precipitadas pelo método Etanol/EDTA. Depois de secas, as placas serão guardadas envoltas em papel alumínio em freezer a -20°C. Momentos antes da eletroforese de sequenciamento, os poços serão ressuspensos com 10 µL de Formamida Hi-Di e em seguida encaminhada para o termociclador e aquecida a 94°C por três minutos para desnaturação do DNA. Após essa etapa, as placas serão encaminhadas para o sequenciador automático de DNA modelo ABI 3500 (Applied Biosystems™) e sequenciadas bidirecionalmente.

Análise dos dados

As sequências de DNA serão editadas para remoção das extremidades e inspeção de códons de parada (*stop codons*) prematuros utilizando-se os programas Bioedit (HALL 1999) e MEGA v6.0 (TAMURA et al. 2013). Análises de identificação molecular e distâncias genéticas serão processadas com as ferramentas disponíveis no BOLDSystems (www.boldsystems.org) (RATNASINGHAM & HEBERT 2007). A visualização dos arranjos taxonômicos por espécies/grupos será processada pelo método de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-Joining*) usando-se MEGA 6.0 (TAMURA et al. 2013), com o modelo de distância Kimura-2-parâmetros

(K2P) (KIMURA 1980). A robustez dos agrupamentos será estimada por *bootstrap* com 1000 replicações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M., GOMES, L. C. 2005. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade** (1): 70–78.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research** 25 (22): 4692–4693.

ALBERT, J. S.; REIS, R. E. 2011. Introduction to Neotropical Freshwaters. p. 3-16. *In*: ALBERT, J. S. REIS, R. E. (eds.). **Historical biogeography of neotropical freshwater fishes**. The Regents of University of California Press, Oakland, ix+388 p.

BLAXTER, M.L. 2004. The promise of a DNA taxonomy (one contribution of 19 to a theme issue entitled "Taxonomy for the twenty-first century"). **Philosophical Transactions of the Royal Society of London** (359): 669 – 679.

BORISENKO, A. V.; LIM, B. K.; IVANOVA, N. V.; HANNER, R. H.; HEBERT, P. D. N. 2007. DNA *barcoding* in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. **Molecular Ecology Resources** 8 (3): 471–479.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, S. M. 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: **Museu Nacional**, 195 p.

CASTRO, R. M. C. 1999. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. *In*: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (eds.). **Ecologia de Peixes de Riachos**. Série Oecologia Brasiliensis 6, Programa de Pós-graduação em Ecologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CLARE, E. L.; LIM, B. K.; ENGSTROM, M. D.; EGER, J. L.; HEBERT, P. D. N. 2007. DNA *barcoding* of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. **Molecular Ecology Notes** (7): 184–190.

DAYRAT, B. 2005. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society** (85): 407–415.

GOMES, L. C.; PESSALI, T. C.; SALES, N. G.; POMPEU, P. S.; CARVALHO, D. C. 2015. Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. **Genetica** (143): 581–588.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium** (41): 95–98.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL S. L.; DEWAARD, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Philosophical transactions of The Royal Society B**, (270): 313–321.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. 2003b. *Barcoding* animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** (270): 96–99.

HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. 2004. Ten species in one: DNA *barcoding* reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fuligator*. **PNAS**, 101 (41): 14812-14817.

- HEBERT, P. D. N.; DEWAARD, J. R.; LANDRY, J-F. 2009. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. **Biology Letters**: 1-4.
- HENRIQUES, J. M; SILVA, G. J. C.; ASHIKAGA, F. Y.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. 2015. Use of DNA barcode in the identification of fish species from Ribeira de Iguape Basin and coastal rivers from São Paulo State (Brazil). **DNA barcodes** (3): 118-128.
- KERR, K. C. R.; STOECKLE, M. Y.; DOVE, C. J.; WEIGT, L. A.; FRANCES, C. M.; HEBERT, P. D. N. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. **Molecular Ecology Notes** (7): 535–543.
- KERR, K.C.R.; LIJTMAR, D.A.; BARREIRA, A.S.; HEBERT, P.D.N.; TUBARO, P.L. 2009. Probing Evolutionary Patterns in Neotropical Birds through DNA Barcodes. **PLOS ONE** 4 (2): e4379.
- KIMURA, M. 1980. A Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** (16): 111–120.
- LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M. L. J.; TEDESCO, P. A. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia** (595): 545-567.
- MENDONÇA, F. P.; MAGNUSSON, W. E.; ZUANON, J. 2005. Relationships Between Habitat Characteristics and Fish Assemblages in Small Streams of Central Amazonia. **Copeia** (4): 751–764.
- MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B; WORM, B. 2011. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? **Plos Biology** 9 (8): e1001127.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. 2016. Fishes of the world. Fifth edition. **Hoboken**, 752 p.
- PADIAL, J. M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. 2010. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology** (7): 16.
- PIRES, A. C.; MARINONI, L. 2010. DNA *barcoding* and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. **Biota Neotropica** (2): 10.
- PUCKRIDGE, M.; ANDREAKIS, M.; APPLEYARD, S. A.; WARD, R. D. 2013. Cryptic diversity in flathead fishes (Scorpaeniformes: Platycephalidae) across the Indo-West Pacific uncovered by DNA *barcoding*. **Molecular Ecology Resources** (13): 32–42.
- PUGEDO, M. L.; NETO, F. R. A.; PESSALI, T. C.; BIRINDELLI, J. L. O.; CARVALHO, D. C. 2016. Integrative taxonomy supports new candidate fish species in a poorly studied neotropical region: the Jequitinhonha River Basin. **Genetica** (144): 1-9.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. 2007. BOLD: O Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes** (7): 355364.
- RIEDEL, A.; SAGATA, K.; SUHARDJONO, Y. R.; TÄNZLER, R.; BALKE, M. 2013. Integrative taxonomy on the fast track – towards more sustainability in biodiversity research. **Frontiers in Zoology** (10): 15.
- STOECKLE, M.; WAGGONER, P. E.; AUSUBEL, J. H. 2005. **Barcoding life, illustrated. Goals rationale, results**. Disponível em: <http://www.barcoding.si.edu> (Acessado em 10 de Março de 2016).
- SUNNUCKS, P.; HALES, D. F. 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular Biology and Evolution** 13 (3): 510-524.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** (30): 2725-2729.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A. P. 2003. A plea for DNA taxonomy. **Ecology and Evolution** 18 (2): 70-74.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N. 2005. DNA *barcoding* Australia's fish species. **Philosophical transactions of The Royal Society B** (359): 1847–1857.

.

7. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

ATIVIDADES	2018						2019					
				M	E	S	E	S				
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
Revisão da Literatura/Apresentação seminários equipe LGBIO	X		X		X		X		X		X	
Amostragem	X	X	X	X	X	X						
Métodos laboratoriais		X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Análise dados					X	X	X	X		X	X	
Relatório parcial						X						
Apresentação do trabalho em congresso nacional						X						
Relatório final												X
Apresentação seminário de iniciação científica da UFOPA												X
Redação de artigo científico											X	X