

EMPREGO DO eDNA METABARCODING NA INVESTIGAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DE PEIXES DE UM RESERVATÓRIO URBANO

Introdução

Primeiro para entendermos essa pesquisa, precisamos compreender que a América Latina é um abrigo de diversas espécies ameaçadas de extinção. Entretanto a biodiversidade encontrada em países como México, Brasil e muitos outros, está sendo cada vez mais ameaçada e sendo destruída gradativamente. Essa degradação está ocorrendo principalmente devida a ação humana, podendo ser derramamento de lixo e substâncias tóxicas em ambientes aquáticos como: rios, mares, lagos e muitos outros; Além da construção de barragens e outras construções, uso incorreto de recursos naturais, alteração climática e muitas outras ações humanas. Com a biodiversidade sendo prejudicada, sistemas essenciais também chamados de ecossistemas são prejudicados, pois os peixes e a biodiversidade inteira desempenham funções naturais importantes, sendo elas: a obtenção de recursos, produção de biomassa, decomposição e ciclagem de nutrientes.

Para impedir que as espécies desapareçam, é necessário tomar atitudes para conservar a biodiversidade existente nos ambientes aquáticos, entretanto as ações humanas fazem o processo de conservação um verdadeiro desafio, pois grande parte da sociedade não dá o devido valor para a vida aquática. Além disso, os biólogos e estudantes da biodiversidade perceberam que seria necessário um monitoramento constante para a conservação de espécies ser possível, os métodos de monitoramento dos atributos físico-químicos dos ecossistemas são simples porém são ineficazes pelo fato de serem demorados e não conseguem monitorar um ambiente aquático muito grande. Por conta desse problema, foi usada uma maneira de monitoramento mais eficiente. Os seres vivos macroscópicos normalmente liberam uma pequena amostra de material genético (DNA), acontece que essa amostra de DNA pode dissolver-se na água ou ficar acumulado em pedras ou outros sedimentos, assim é produzido o que é chamado na ciência de eDNA ou DNA ambiental. O DNA ambiental pode ser usado por pesquisadores, podendo ser extraído, amplificado e em seguida analisando e identificando os seres cujo aquela amostra de DNA pertence. A técnica descrita anteriormente chama-se Técnica de Metabarcoding de DNA ambiental ou eDNA.

Apesar de suas muitas vantagens a técnica de Metabarcoding de DNA, o monitoramento em ambientes com ecossistemas muito diversos ainda é complicado. Além disso, ainda é necessário avaliar a eficácia de diferentes protocolos de metabarcoding de eDNA para o biomonitoramento dos ecossistemas neotropicais. O principal problema no ambiente ao utilizar o Metabarcoding é a alta incidência de raios ultravioletas (UV) e temperaturas elevadas, pois a temperatura média elevada leva a degradação do DNA mais rapidamente.

Motivo do Início da Pesquisa

Um dos principais motivos e objetivos dessa pesquisa é o monitoramento dos peixes de uma lagoa de água doce em uma região neotropical, chamada de Lagoa dos Ingleses no Estado de Minas Gerais. Sendo a Lagoa dos Ingleses sendo um lago de fácil acesso, tendo biodiversidade reduzida, ictiofauna não descrita e é um local que é bastante sujeito a ação humana, a Lagoa dos Ingleses foi uma ótima escolha. Nesse lago os resultados serão mais eficazes pelo fato de ter uma fauna pequena.

A pesquisa teve o motivo de, além de monitorar e preservar a vida marítima desse lago em específico, também foi feita para o aprimoramento do método do DNA ambiental e descobrir técnicas eficazes da utilização desse método, por exemplo, na forma como o DNA é coletado.

Objetivos

O objetivo principal dessa pesquisa foi a catalogação e o biomonitoramento das espécies da Lagoa dos Ingleses. Além do teste de diferentes protocolos de extração de DNA ambiental, o aperfeiçoamento do **pipeline** de análises bioinformáticas e desenvolver uma estratégia de curadoria de dados do eDNA, ou seja, gerenciamento do DNA ambiental e a comprovação de dados.

EMPREGO DO eDNA METABARCODING NA INVESTIGAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DE PEIXES DE UM RESERVATÓRIO URBANO

Materiais e Métodos

Como mencionado anteriormente, é necessária a coleta de eDNA para realizar o processo de Metabarcoding de eDNA. Nessa pesquisa foram realizadas coletas de material genético utilizando dois meios: o filtro aberto e o filtro Sterivex. Além disso, um dos objetivos era a coleta de eDNA em períodos de seca, entretanto em 2020 não houve estiagem e o nível do lago ficou normal. Houveram cinco campanhas de coleta, duas em 2020, duas em 2021 e uma em 2022(para a realização das coletas foi necessário uso de garrafas estéreis).

Em 2021, houve uma estiagem e o reservatório apresentava níveis baixos(menos de 12 m), então foi realizada uma campanha de coleta, sendo coletadas amostras de dois pontos como no ano anterior. Em novembro de 2021, foi realizada outra coleta para filtragem da água no filtro MCE e também para filtrações in loco, ou seja, filtrações com um processo de descontaminação e usando filtro cartucho do tipo sterivex com metodologia própria.

A última campanha ocorreu no início de 2022, tendo seu volume recuperado e altura da água normal. Foram coletadas amostras de eDNA ou seja água, dos mesmos quatro pontos do que as coletas anteriores. Sendo que, nas duas primeiras campanhas o nível de água estava normal, na 3º e 4º campanhas o nível da água estava baixo e na última campanha o nível estava normal. Além disso, o uso dos filtros MCE foram usados em todas as campanhas, ao contrário dos filtros Sterivex que foram usados apenas na 4º campanha.

Extração do DNA Ambiental

Após a etapa anterior ser concluída, foi começada a extração de eDNA dos filtros MCE e Sterivex. As extrações ocorreram em triplicatas ou grupos de três em que os filtros eram todos do mesmo ponto. Os cartuchos foram abertos e os filtros foram removidos e cortados em pedaços usando um bisturi estéril.

Amplificação e Sequenciamento

Para realizar a amplificação do material genético as sequência Forward e Reverse utilizando os primers MiFish. Os primers MiFish são um conjunto de primers usados para detectar DNA ambiental de peixes. O sequenciamento das amostras filtradas com os filtros MCE em 2020 e 2021 foi realizado com a plataforma Illumina MiniSeq, seguindo o protocolo do fabricante, no Laboratório de Genética da Conservação da PUC Minas(Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais). Já o material genético que veio dos cartuchos Sterivex em novembro de 2021 as amostras filtradas com filtros MCE em Janeiro de 2022 foram sequenciadas utilizando a plataforma NextSeq 2000, na facility EcoMol (<https://ecomolconsultoria.com.br>).

Análises Ecológicas

Foram realizadas análises ecológicas temporais com os dados gerados a partir das amostras extraídas dos filtros MCE. Amostras tiradas dos filtros Sterivex foram comparadas com as filtradas pelos filtros MCE que foram coletadas na mesma época/ Novembro de 2021.

Resultados

Os resultados foram satisfatórios tendo 10.590.450 reads(leituras) no total, dos anos 2020 a 2022. Após o registro com pipeline, curadoria e filtragem de leituras sobraram 3.724.843 leituras. O demultiplex não foi possível nas coletas dos períodos de Novembro e Dezembro de 2020, ou seja, o demultiplex que é um circuito que distribui informações de uma única entrada para uma das

EMPREGO DO eDNA METABARCODING NA INVESTIGAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DE PEIXES DE UM RESERVATÓRIO URBANO

diversas não foi permitido. Por isso, as leituras passaram a ser agrupadas pelo fator do ponto da coleta da amostra e pelo ano.

Após as leituras e a passagem pela curadoria, o próximo passo foi a identificação taxonômica que é o processo de verificar em que grupo de classificação um organismo se encaixa de acordo com sua classificação. As classificações taxonômicas são: Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero, Espécie. foram detectadas 563 ASVs atribuídas a 22 famílias, 39 gêneros e a pelo menos 44 espécies de peixes (ASVs: Eles são variantes de sequência amplificada, usadas em estudos de biologia molecular e genética para identificar e classificar organismos com base em sequências de DNA ou RNA).

Conclusão e Importância

A pesquisa feita pela Universidade Federal de Minas Gerais, foi considerada pelos membros do grupo importante, pois os resultados podem gerar benefícios quando movimentos de preservação biológica aquática forem escolher os protocolos de monitoramento. Pois a pesquisa compara a eficiência de protocolos de várias formas, como a comparação dos filtros MCE com os cartuchos Sterivex. Além disso, também teve uma importância considerável à vida aquática da Lagoa dos Ingleses, pois a ictiofauna foi caracterizada e monitorada em épocas de nível da água normal e baixo, melhoramento na amplificação do material genético e as melhoras realizadas no pipeline de bioinformática, em outras palavras foi realizada uma melhora no banco de dados das espécies catalogadas. Foi comprovado o potencial do filtro Sterivex pelas suas vantagens em recuperar o eDNA de peixes. Além de todos esses outros fatores, acreditamos que uma mensagem que foi passada com esse artigo é principalmente, que a ação humana interfere muito na biologia não apenas terrestre, mas também na biologia aquática. Por esses outros motivos ditos anteriormente, essa pesquisa é muito importante.

Participantes: Eduardo, João Victor, Andrey; turma: 2ºF