

DNA AMBIENTAL APLICADO A ESTUDOS DE MONITORAMENTO E CONSERVAÇÃO DE ANFÍBIOS ANUROS NA MATA ATLÂNTICA

Pós-doutoranda: Dra. Carla Martins Lopes

Supervisor: Dr. Célio Fernando Baptista Haddad

Instituição sede: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus Rio Claro

Resumo

O Brasil apresenta a maior diversidade de anfíbios do mundo, com mais de 1000 espécies descritas. Aproximadamente metade destas é encontrada na Mata Atlântica, Bioma que apresenta menos de 16% da sua cobertura original. Os anfíbios são bastante sensíveis à degradação ambiental, enfrentando sérios problemas de declínios populacionais, extinções locais ou mesmo extinções de espécies. No Brasil, 40 espécies de anfíbios estão listadas como ameaçadas. Porém, muitas espécies ainda são pouco estudadas ou completamente desconhecidas e seu estado de conservação requer maiores investigações. A análise de vestígios de DNA em amostras ambientais permite descrever a diversidade de espécies no ambiente em um único experimento, sendo uma metodologia não invasiva, fornecendo resultados efetivos em um curto período de tempo e permite superar algumas dificuldades relacionadas a metodologias clássicas de monitoramento de espécies. Na distribuição Sul da Mata Atlântica, algumas espécies de anuros associadas a corpos de água foram registradas apenas nas coletas que descrevem a série tipo ou em coletas ocasionais no passado, mas grande parte não se encontra classificada em nenhum nível de ameaça segundo a lista da IUCN, principalmente devido à falta de informações a respeito da biologia e área de distribuição dessas espécies. Este projeto visa ampliar o conhecimento sobre a área de ocorrência e status de conservação de espécies de anfíbios desaparecidas ou em declínio da distribuição Sul da Mata Atlântica, utilizando a análise do DNA ambiental através de metabarcodes para procurar por vestígios de DNA dessas espécies que estão associadas em alguma fase de vida a corpos de água.

Introdução

A classe Amphibia é constituída por mais de 7000 espécies, agrupadas em três ordens: Gymnophiona (cobras-cegas), Caudata (salamandras) e Anura (sapos, pererecas, jias e rãs), e grande parte dessas espécies se encontra distribuída nas regiões tropicais (Haddad *et al.* 2013). O Brasil apresenta a maior diversidade de anfíbios do mundo, com mais de 1000 espécies descritas (Segalla *et al.* 2014). Aproximadamente metade destas espécies é encontrada na Mata Atlântica que, por apresentar uma ampla variação longitudinal (4^o to 32^o S) e altitudinal (desde o nível do mar até 2900 m), abriga não só uma grande diversidade de anfíbios, mas aproximadamente 88% das espécies que ocorrem nesse Bioma são endêmicas (Myers *et al.* 2000; Tabarelli *et al.* 2005; Haddad *et al.* 2013).

A Mata Atlântica é um dos 25 hotspots de biodiversidade global restando menos de 16% da sua cobertura original (Myers *et al.* 2000; Ribeiro *et al.* 2009). Grande parte dos remanescentes de Mata Atlântica são distribuídos de forma fragmentada e isolados uns dos outros, o que afeta as espécies devido à fragmentação das populações e o aumento dos efeitos de borda e endocruzamentos, reduzindo a variabilidade genética, potencializando a desconexão de habitats e ameaçando principalmente as espécies endêmicas de distribuição restrita (Becker *et al.* 2007; Ribeiro *et al.* 2009).

Os anfíbios são bastante sensíveis à degradação ambiental, enfrentando sérios problemas de declínios populacionais, extinções locais ou mesmo extinções de espécies. Dentre os principais fatores listados como contribuindo para a ameaça aos anfíbios estão a disseminação de agentes patogênicos, como o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, a perda e fragmentação do habitat, além dos efeitos causados pelas mudanças climáticas, introdução de espécies exóticas e poluição dos ambientes (Kats & Ferrer 2003; Relyea 2005; Pounds *et al.* 2006; Becker *et al.* 2007). No Brasil, 40 espécies de anfíbios estão listadas como ameaçadas (http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-risco/PORTARIA_N%C2%BA_444_DE_17_DE_DEZEMBRO_DE_2014.pdf). Porém, devido a grande diversidade de anfíbios que ocorrem no Brasil, muitas espécies ainda são pouco estudadas ou completamente desconhecidas e seu estado de conservação requer maiores investigações.

O levantamento da composição da comunidade e distribuição geográfica das espécies é crucial para monitorar e gerenciar a persistência destas no ambiente e definir estratégias de conservação efetivas. No entanto, em ambientes heterogêneos como a Mata Atlântica, que abriga uma grande diversidade de espécies, muitas das quais ainda pouco investigadas, os

inventários sobre a biodiversidade são complexos, custosos e demorados (Ribeiro *et al.* 2009). Neste sentido, novas técnicas moleculares vêm sendo desenvolvidas desde 2008 (Ficetola *et al.* 2008) para a análise de vestígios de DNA que permanecem em amostras ambientais (como solo, água ou ar) devido às atividades biológicas desenvolvidas pelos organismos no ambiente (Pompanon *et al.* 2011). A análise do DNA ambiental pode ser feita através do uso de metabarcodes, o qual utiliza o princípio do DNA código de barras, associado ao sequenciamento de nova geração e a ferramentas de bioinformática, para descrever a diversidade de espécies presentes no ambiente em um único experimento (Taberlet, Prud'Homme, et al., 2012a).

A análise do DNA ambiental através de metabarcodes é uma metodologia não invasiva, de alto rendimento, fornecendo resultados efetivos em um curto período de tempo. Essa técnica permite superar algumas dificuldades relacionadas a metodologias clássicas de monitoramento de espécies, uma vez que pode ser padronizada, não dependendo da experiência do observador, permite acessar organismos que são difíceis de amostrar ou de identificar morfologicamente em campo, mas desempenham papéis essenciais no funcionamento dos ecossistemas, além de abrir a possibilidade para detecção de novas espécies (Pompanon et al., 2011; Taberlet, Coissac, Hajibabaei, & Rieseberg, 2012b). O DNA ambiental vem sendo aplicado com sucesso em estudos de detecção espécie-específicos (Ficetola *et al.* 2008) ou para descrição da composição de comunidades (Pansu *et al.* 2015; Valentini *et al.* 2016) e o monitoramento de espécies invasoras (Jerde *et al.* 2011; Dejean *et al.* 2012; Tréguier *et al.* 2014) ou ameaçadas (Thomsen *et al.* 2012; Sigsgaard *et al.* 2015), visando estratégias de conservação, mesmo quando estas apresentam baixas densidades populacionais (Thomsen & Willerslev 2015).

Dependendo do seu modo reprodutivo e estágio de vida, os anfíbios podem ser encontrados associados a corpos d'água (rios, riachos, brejos e poças d'água), rochas, plantas fitotelmatas (como as bromélias), árvores ou em ambientes terrestres (como tocas no solo ou na camada de serrapilheira) (Dodd 2010). Na Mata Atlântica, algumas espécies de anuros associadas à corpos de água foram registradas apenas nas coletas da série tipo ou em coletas ocasionais no passado, não sendo registradas novamente há muitos anos ou com relatos de acentuado declínio no tamanho de suas populações. Como exemplo, temos as espécies listadas na tabela 1, a maioria não sendo classificada em nenhum nível de ameaça segundo a lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN, principalmente devido à falta de informações a respeito da biologia e área de distribuição dessas espécies. Tais espécies são monitoradas até

hoje utilizando apenas metodologias tradicionalmente aplicadas, como encontros audiovisuais e uso de armadilhas.

Tabela 1. Espécies pouco conhecidas, com relatos de forte declínio em suas populações ou não registradas há vários anos na distribuição Sul da Mata Atlântica. DD – Data Deficient; NT – Near Threatened; LC – Least Concern; X.

Espécie	Localidade	Microambiente	Último registro	Status IUCN
<i>Cycloramphus asper</i>	Águas Mornas, SC	Riacho	Final década 1970	DD
<i>Cycloramphus catarinensis</i>	Águas Mornas, SC	Riacho	Final década 1970	DD
<i>Cycloramphus cedrensis</i>	Videira, SC	Riacho	Final década 1970	DD
<i>Cycloramphus diringshofeni</i>	São Bento do Sul, SC	Florestal	50 anos atrás	DD
<i>Cycloramphus duseni</i>	Morretes, PR	Larva aquática	1982	DD
<i>Cycloramphus mirandaribeiroi</i>	Morretes, PR	Riacho	Final década 1970	DD
<i>Thoropa saxatilis</i>	Lauro Muller, SC	Paredão	1988	NT
<i>Bokermannohyla langei</i>	Morretes, PR	Riachos	1953	DD
<i>Boana semiguttatus</i>	São Bento do Sul, SC	Riachos	Mais de 20 anos	LC
<i>Physalaemus insperatus</i>	Guaratuba, PR	Poça/brejo	Década de 1950	DD
<i>Phrynomedusa appendiculata</i>	São Bento do Sul e Lauro Muller, SC	Riacho	32 anos atrás	NT

Justificativa e Objetivos

Dentro do contexto exposto acima, o objetivo geral do projeto é ampliar o conhecimento sobre a área de ocorrência e status de conservação de espécies de anfíbios desaparecidas ou em declínio da distribuição Sul da Mata Atlântica. Para isso vamos utilizar a análise do DNA ambiental através de metabarcodes para procurar por vestígios de DNA dessas espécies que estão associadas em alguma fase de vida a corpos de água.

Materiais e métodos

Coleta e processamento das amostras de DNA ambiental

Amostras de 60L de água de poças temporárias, paredões rochosos com filetes de água, lagos, lagoas, riachos e rios serão filtradas, considerando as potenciais áreas de ocorrência onde as espécies foram registradas no passado. Aproximadamente 10 amostras de água serão coletadas por local listado na Tabela 1. As amostras de água serão filtradas diretamente dos corpos de água, usando uma bomba peristáltica (Solinst, modelo 410) e

cápsulas de filtração Envirocheck HV (Pall Life Sciences). As cápsulas serão preenchidas com tampão de lise, estocados a temperatura ambiente e transportadas até o Laboratório de Herpetologia da UNESP – Rio Claro-SP. Os procedimentos de extração do DNA, amplificação do gene mitocondrial 12S, purificação e sequenciamento serão os mesmos descritos em Lopes et al (2017), seguindo as principais etapas apresentadas na Figura 1. Não serão realizadas coletas, nem manipulação de espécimes de anfíbios.

Basicamente, o processo de extração do DNA será realizado utilizando o kit de extração DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. Um pequeno fragmento do gene 12S do RNAr mitocondrial de anfíbios será amplificado em um volume final de 25 μ L, usando 3 μ L do DNA extraído, 1 U de AmpliTaq Gold DNA Polimerase (Applied Biosystems), 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 μ M do primers batra_F (5'-ACACCGCCCGTCACCCT-3') e batra_R (5'-GTAYACTTACCATGTTACGACTT-3') (Valentini *et al.* 2016), 4 μ M de bloqueador de primer para humanos batra_blk (5'-TCACCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGGCA-SPC3I-3') (Valentini *et al.* 2016) e 0.2 μ g/ μ L de albumina do soro bovino (BSA). Os primers serão marcados com um tag molecular único de oito nucleotídeos para cada amostra de DNA ambiental, permitindo a atribuição das sequências corretas às suas amostras correspondentes. Os PCRs serão desnaturados inicialmente a 95°C por 10 min, seguido por 50 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C e 1 min a 72°C, e uma elongação final a 72°C por 7 min. Controles negativos de extração de DNA e PCR e controles positivos serão sistematicamente repetidos para monitorar possíveis contaminações e também o poder de detecção do método. Todos os produtos da PCR serão purificados usando o kit de purificação MinElute (QIAGEN), quantificados e misturados em concentrações iguais para o sequenciamento no equipamento HiSeq 2500 (Illumina), segundo instruções do fabricante.

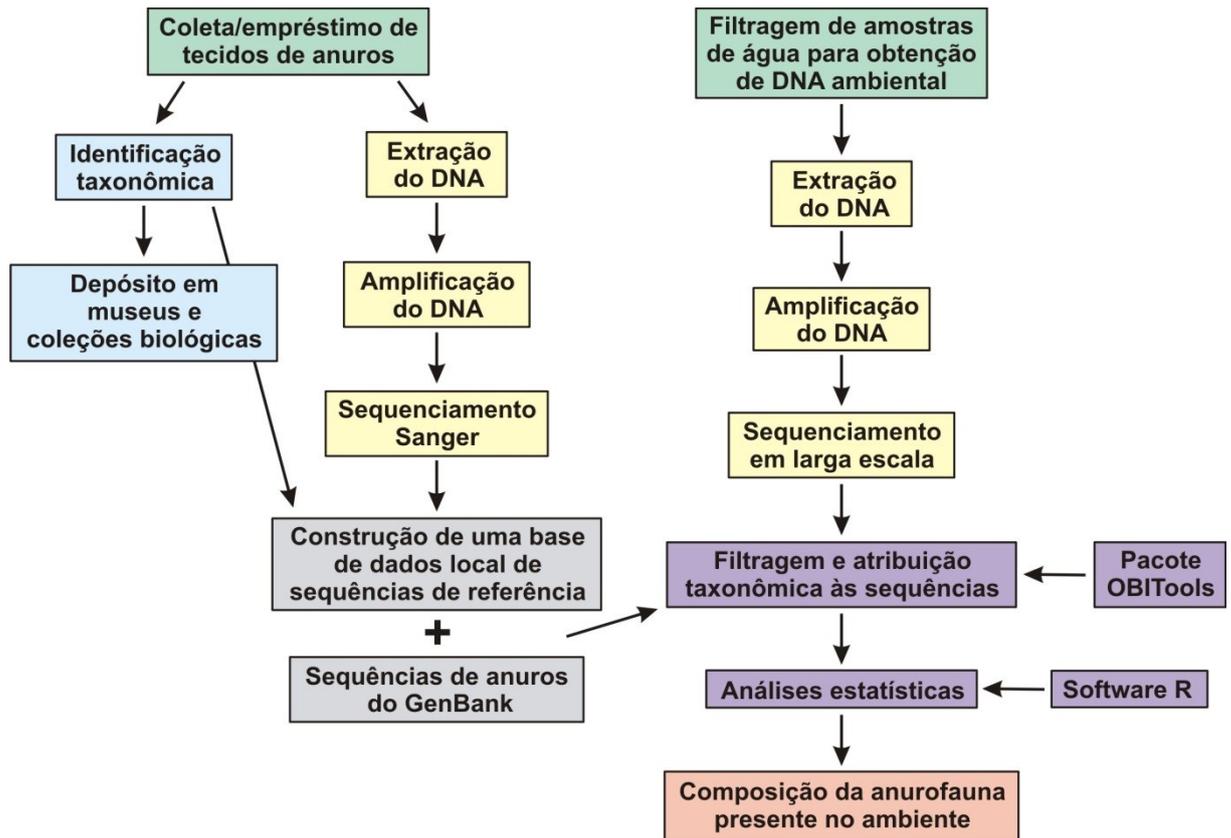


Figura 1. Fluxograma das principais etapas de trabalho a serem desenvolvidas durante o período de prorrogação de 12 meses deste projeto. Verde – coleta de amostras, azul – identificação e preservação de material biológico, amarelo – procedimentos de laboratório, cinza – base de dados de seqüências de referência, lilás – análise dos dados e rosa – resultados.

Construção da base de seqüências de referência

Um dos componentes mais importantes em um projeto envolvendo a análise de amostras de DNA ambiental através de metabarcodes é a disponibilidade de uma boa base de dados de seqüências de DNA de referência. Esta base é utilizada para atribuir um táxon às seqüências recuperadas a partir das amostras ambientais, através da comparação com o registro correspondente mais similar que se tem disponível na base de dados de seqüências de referência. Dentro deste contexto, uma base de dados de seqüências de referência para o gene mitocondrial 12S será construída para atribuir um táxon às seqüências recuperadas a partir das amostras ambientais. Amostras de tecidos das espécies listadas na Tabela 1 serão obtidas de Museus e Coleções Biológicas (Coleção de Anfíbios CFBH, Museu de Zoologia da USP, Museu de Zoologia da UNICAMP e Museu Nacional, RJ) para extração de DNA e sequenciamento.

As amostras de tecido obtidas de museus e coleções biológicas terão o DNA total extraído a partir de 10 mg de tecido muscular, seguindo protocolo modificado de Sambrook & Russel (2001). Entre um e três indivíduos serão utilizados para cada espécie de ocorrência conhecida nas localidades listadas na Tabela 1 que se encontram associadas à corpos de água. A subunidade 12S do RNAr de mitocôndrias será amplificada em um volume final de 25 µL, utilizando 3 µL de DNA, 1 U de AmpliTaq Gold DNA Polimerase (Applied Biosystems), 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP e 0.2 µL dos primers 12SK-H (5'-TCCGGTATACTTACCATGTTACGA-3') e 12SJ-L (5'-AAAGGTTTGGTCCTAGCCTT-3'). As reações de PCR serão desnaturadas a 95 °C por 10 min, seguidas por 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C e 1 min a 72 °C e uma elongação final de 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR serão purificados usando as enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase (ThermoFischer Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Ambas as fitas de DNA serão sequenciadas na empresa Macrogen Inc. (Seul, Coreia do Sul). As sequências serão visualmente inspecionadas, editadas e as sequências consenso serão reconstruídas usando o programa CodonCode Aligner 5.1.5 (CodonCode Corporation).

Análise dos dados

As sequências presentes nas amostras de DNA ambiental serão filtradas e anotadas taxonomicamente usando os programas implementados no pacote de programas OBITools (Boyer *et al.* 2016) e o software R 3.3.3 (R Core Development Team 2017). O fragmento relevante do gene 12S de anuros será extraído a partir de sequências disponíveis no GenBank e da base de dados local de sequências de referência construída durante este estudo, utilizando os programas ecoPCR (Ficetola *et al.* 2010) e OBITools.

As análises estatísticas serão realizadas utilizando o software R para calcular a proporção de leitura de sequências obtidas para cada táxon em cada localidade e para estimar a probabilidade de detecção de cada uma das espécies e a ocupação dos sítios através do modelo de ocupação-deteção de Royle & Link (2006).

Resultados esperados

Os resultados obtidos por este projeto permitirão acessar a composição da anurofauna associada a corpos de água nas localidades descritas na Tabela 1, abrindo a possibilidade para detecção de novas espécies até então desconhecidas e, principalmente, permitindo ampliar o conhecimento sobre a área de distribuição geográfica e o estado de conservação de espécies

de anfíbios há muito não registradas na distribuição Sul da Mata Atlântica, fornecendo subsídios para traçar planos e estratégias de manejo e conservação dos ambientes e das espécies a estes associadas. Os resultados deste projeto serão divulgados através de entrevistas para meios de comunicação como jornais, revistas de divulgação científica, rádio e televisão, palestras e pôsteres apresentados em eventos científicos, podendo ser incluídos em áreas do conhecimento como genética, zoologia, biologia tropical e conservação. Serão também publicados artigos em revistas científicas de impacto internacional. Os dados deste projeto permitirão contribuir diretamente com outros estudos desenvolvidos no laboratório de Herpetologia da UNESP – Rio Claro e dentro do âmbito do projeto temático Biota – FAPESP (processo 2013/50741-7) “Diversidade e conservação dos anfíbios brasileiros” sob a coordenação do Dr. Célio F. B. Haddad.

Custos do projeto

O projeto terá um custo total aproximado de R\$ 30.000,00 e suas atividades serão realizadas com recursos da FAPESP (projeto temático, processo 2013/50741-7).

Cronograma

	2019												2020												2021			
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A		
Coleta de amostras																												
Tecidos de coleções para base de referência																												
Filtragem de amostras de água																												
Procedimentos de laboratório																												
Extração, amplificação, sequenciamento de DNA para base de referência																												
Extração, amplificação, sequenciamento de DNA ambiental																												
Análise dos dados																												
Sequências para base de referência																												
Amostras de DNA ambiental																												
Divulgação dos resultados																												
Resultados parciais																												
Redação de artigos																												

Referências bibliográficas

- Becker CG, Fonseca CR, Haddad CFB, Batista RF, Prado PI (2007) Habitat split and the global decline of amphibians. *Science*, **318**, 1775–1777.
- Boyer F, Mercier C, Bonin A *et al.* (2016) OBITools: A unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, **16**, 176–182.
- Dejean T, Valentini A, Miquel C *et al.* (2012) Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, **49**, 953–959.
- Dodd CKJ (2010) *Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques* (CKJ Dodd, Ed.). Oxford University Press, Oxford.
- Ficetola GF, Coissac E, Zundel S *et al.* (2010) An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, **11**, 434.
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, **4**, 423–425.
- Haddad CFB, Toledo LF, Prado CPA *et al.* (2013) *Guia dos Anfíbios da Mata Atlântica - Diversidade e Biologia*. Anolisbooks, São Paulo.
- Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM (2011) “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, **4**, 150–157.
- Kats LB, Ferrer RP (2003) Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity and Distributions*, **9**, 99–110.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.
- Pansu J, De Danieli S, Puissant J *et al.* (2015) Landscape-scale distribution patterns of earthworms inferred from soil DNA. *Soil Biology and Biochemistry*, **83**, 100–105.
- Pompanon F, Coissac E, Taberlet P (2011) Metabarcoding, une nouvelle façon d’analyser la biodiversité. *Biofutur*, **319**, 30–32.
- Pounds JA, Bustamante MR, Coloma L a *et al.* (2006) Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, **439**, 161–167.
- R Core Development Team (2017) R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*.
- Relyea RA (2005) The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, **15**, 1118–1124.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, **142**, 1141–1153.
- Royle JA, Link WA (2006) Generalized site occupancy models allowing for false positive and false negative errors. *Ecology*, **87**, 835–841.
- Sambrook J, Russel DW (2001) Rapid isolation of yeast DNA. In: *Molecular cloning, a laboratory manual* (eds Sambrook J, Russel DW), pp. 631–632. Cold Spring Harbor, New York, New York.
- Segalla M V, Caramaschi U, Cruz CAG *et al.* (2014) Brazilian amphibians: list of species. *Herpetologia Brasileira*, **3**, 37–48.
- Sigsgaard EE, Carl H, Møller PR, Thomsen PF (2015) Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation*, **183**, 46–52.
- Tabarelli M, Pinto LP, Silva JMC, Hirota M, Bede L (2005) Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic forest. *Conservation Biology*, **19**, 695–700.

- Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg LH (2012a) Environmental DNA. *Molecular Ecology*, **21**, 1789–93.
- Taberlet P, Prud’Homme SM, Campione E *et al.* (2012b) Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular Ecology*, **21**, 1816–1820.
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL *et al.* (2012) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, **21**, 2565–2573.
- Thomsen PF, Willerslev E (2015) Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, **183**, 4–18.
- Tréguier A, Paillisson J-M, Dejean T *et al.* (2014) Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *Journal of Applied Ecology*, **51**, 871–879.
- Valentini A, Taberlet P, Miaud C *et al.* (2016) Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, **25**, 929–942.