

FACULDADE DE CIÊNCIAS E LETRAS DE ASSIS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSETOS AQUÁTICOS DE RIACHOS: TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO

Lucas Henrique de Almeida

Pós-doutorando, FCLA, UNESP

Laboratório de Biologia Aquática, FCLA, UNESP

Av. Dom Antônio, 2100; Parque Universitário; CEP 19.806-900; Assis, SP

Assis-SP

-2018-

RESUMO

O presente projeto será desenvolvido com os seguintes objetivos: 1) identificar morfologicamente as espécies de insetos aquáticos e posteriormente obter as sequências do gene mitocondrial COI para cada uma delas; 2) obter a associação adulto-imaturo utilizando as sequências do gene mitocondrial COI; 3) descrever os imaturos das espécies associadas; 4) prosseguir a formação do aluno em entomologia aquática e em ferramentas morfológicas e moleculares em estudos de biodiversidade. Os imaturos serão coletados em riachos utilizando rede D e os adultos através de puçás e armadilhas luminosas. Todo o material será acondicionado em álcool absoluto e armazenados em freezer (-20 °C). A identificação morfológica das espécies será feita baseada nos adultos e, posteriormente, cada espécie será caracterizada com base no gene mitocondrial COI. Os imaturos serão morfotipadas e também caracterizadas em relação a este gene. Posteriormente as sequencias serão comparadas com o objetivo de associar imaturos e adultos.

INTRODUÇÃO

A região tropical possui a maior diversidade do planeta e falta muito para que tenhamos um conhecimento razoável da diversidade aquática dessa região. Um dos grandes obstáculos para o conhecimento da diversidade da biota de riachos é o baixo número de taxonomistas se dedicando a esta tarefa. O reconhecimento de diferentes unidades taxonômicas (e.g. espécies) ou de linhagens filogenéticas é um passo fundamental para documentar a biodiversidade, entender os processos ecológicos e evolutivos associados aos padrões de diversidade e estabelecer estratégias de conservação. Por exemplo, os locais com espécies endêmicas, com maior número de espécies e/ou de clados ou que contribuam para uma maior complementaridade (beta diversidade) deveriam ser priorizadas para conservação. O problema é como fazer isso desconhecendo os táxons. Por isso, diante da escassez de dados taxonômicos sobre as espécies de riachos, somente um importante investimento em taxonomia reduzirá os déficits Linneano (que se refere ao fato de grande parte das espécies ainda não estarem descritas) e Wallaceano (que se refere ao fato dos dados sobre a distribuição das espécies estarem incompletos) (Bini et al., 2006), dois grandes obstáculos para o entendimento dos padrões de diversidade e para o estabelecimento de estratégias eficazes de conservação. O conhecimento sobre as espécies, incluindo distribuição e relações filogenéticas, pode ser integrado por meio de uma abordagem biogeográfica histórica, ampliando o conhecimento sobre os cenários de diversificação dos grupos estudados.

A identificação taxonômica correta é essencial tanto em estudos básicos (e.g. análises filogenéticas, biogeográficas, de comunidades e da biologia das espécies) quanto em estudos aplicados (e.g. estabelecimento de estratégias de conservação e avaliação da qualidade ambiental usando bioindicadores). No Brasil, apesar de manter em seu território uma das maiores biodiversidades do mundo, por muito tempo houve um desinteresse de novos pesquisadores na área taxonômica. Por outro lado, iniciativas louváveis como os Programas Biota da FAPESP e PROTAX (Programa de Capacitação em Taxonomia) do CNPq têm formado novos taxonomistas e ampliado o nosso conhecimento sobre a diversidade tropical. Apesar dos avanços no conhecimento taxonômico da biota de ambientes aquáticos, ainda temos um longo caminho para termos uma visão mais completa sobre a biodiversidade aquática.

O processo de degradação ambiental tem rapidamente elevado a taxa de extinção de diferentes espécies. Nesse cenário, uma grande questão que se apresenta atualmente é como propiciar a identificação correta com a rapidez necessária para que estratégias de conservação e de desenvolvimento sustentável sejam implementadas a tempo de diminuir a probabilidade

de extinção de diferentes espécies. Adicionalmente, a conservação da biodiversidade, o uso sustentável de seus componentes e a repartição justa dos benefícios de sua exploração dependem em grande parte do conhecimento sobre biodiversidade (CBD, 2008). Portanto, o aumento da capacidade de levantamento da biodiversidade é desejável, no entanto, há importantes obstáculos como a diminuição do interesse pela taxonomia, a pouca representatividade de muitas coleções científicas, a insuficiência de verba para o fomento de pesquisas básicas nessa área e a dificuldade de acessar as informações taxonômicas existentes (CBD, 2008). A impossibilidade de identificar a maior parte da biodiversidade, devido ao baixo número de taxonomistas, entre outros fatores, cria obstáculos para o desenvolvimento de outras áreas (conservação, entendimento de processos ecológicos e evolutivos, aplicações biotecnológicas, entre outras).

Nos últimos anos, a comunidade científica tem se mobilizado na discussão de diferentes estratégias no sentido de diminuir o impedimento taxonômico (Wheeler et al., 2004; Carvalho et al., 2007; LaSalle et al., 2009) e entre as principais sugestões levantadas estão: o investimento na formação de novos taxonomistas; a garantia de investimentos para o custeio de pesquisas básicas; o investimento em coleções científicas; a produção de guias de identificação e a incorporação de novas ferramentas como a biologia molecular e a utilização de ferramentas da informática (Godfray, 2002; Wheeler et al., 2004; Carvalho et al., 2007; CBD, 2008). A incorporação de novas ferramentas tem sido considerada por muitos a principal estratégia para a redução do impedimento taxonômico, assim, a adoção de pequenas sequências de DNA (Barcode), as quais poderiam ser utilizadas para a identificação das espécies (Hebert et al., 2003) e o desenvolvimento de uma taxonomia cibernética baseada em uma ciber-estrutura utilizando tecnologias digitais (Godfray, 2002; 2007) têm sido defendidas por diversos pesquisadores. De fato, a utilização de novas ferramentas é salutar, no entanto, não é capaz de substituir a formação taxonômica alicerçada no detalhado conhecimento morfológico acoplado a um profundo conhecimento teórico (e.g. filogenético e biogeográfico) (Dunn, 2003; Carvalho et al., 2007). Apesar das diferentes visões sobre este assunto, seguramente, o aumento do investimento na formação de novos taxonomistas com um importante embasamento teórico, em coleções científicas e em pesquisas básicas é fundamental para a diminuição do impedimento taxonômico (Carvalho et al., 2007).

Segundo, Dayrat (2005) devido à complexidade da vida na terra, documentar a diversidade não é uma tarefa simples, por isso é necessário estudá-la considerando perspectivas múltiplas e complementares. Tendo isso em mente, o presente projeto pretende documentar a diversidade de insetos aquáticos baseado principalmente na análise morfológica, devido à formação do proponente, mas, também, incorporando outras

ferramentas úteis (e.g. biologia molecular), assim, será possível utilizar um princípio taxonômico mais integrativo (Dayrat, 2005; Pires & Marinoni, 2010). Portanto, o cuidadoso estudo morfológico juntamente com a análise de outros atributos (e.g. moleculares, comportamentais, entre outros) alicerçados em um importante arcabouço teórico podem fornecer uma visão mais completa dos limites das espécies.

Considerando este cenário, a identificação das espécies com a exatidão e rapidez necessárias tem se tornado uma tarefa cada vez mais complexa, uma vez que para isso é necessário um forte embasamento teórico e desenvolver a capacidade de trabalhar com múltiplas fontes de variação (morfológica, comportamental, molecular). Diante desse desafio, no presente projeto pretendemos obter um bom conhecimento morfológico sobre os grupos, com uma boa formação teórica em sistemática e utilização de novas ferramentas (e.g. biologia molecular, internet e uso de chaves interativas) disponíveis atualmente. Assim, desenvolver uma taxonomia mais integrativa (Pires & Marinoni, 2010), o que seguramente contribuirá para uma melhor compreensão da diversidade aquática.

Justificativa

Os riachos representam ambientes com alta diversidade de espécies, por outro lado, são alguns dos ambientes mais ameaçados pela ocupação humana. Esses ambientes possuem uma biota característica, a qual, na maioria das vezes é muito sensível às perturbações ambientais. Portanto, é de grande importância que trabalhos sejam feitos nesses ambientes com o objetivo de contribuir para o conhecimento taxonômico e sistemático da biota.

A identificação nominal das espécies possibilita e facilita estudos comparativos, sistemáticos e biogeográficos, além de estudos mais refinados sobre a evolução, biologia e limites de tolerância das espécies. Adicionalmente, para qualquer trabalho tanto básico quanto aplicado, a correta identificação é primordial para a confiabilidade das conclusões tiradas. Portanto, o investimento em estudo taxonômicos e na formação de novos taxonomistas podem alavancar o conhecimento tanto da diversidade quanto da biologia/ecologia da biota tropical.

Objetivos

Diante do exposto, o presente projeto tem os seguintes objetivos;

- 1) identificar morfológicamente as espécies de insetos aquáticos e posteriormente obter as sequências do gene mitocondrial COI para cada uma delas;
- 2) obter a associação adulto-imaturo utilizando as sequências do gene mitocondrial COI;
- 3) descrever os imaturos das espécies associadas;

4) prosseguir a formação do aluno em entomologia aquática e em ferramentas morfológicas e moleculares em estudos de biodiversidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas

As coletas serão realizadas no verão, sob lua nova, situação na qual existe maior probabilidade de se coletar um número satisfatório de adultos. A partir do crepúsculo, os adultos serão coletados por atração luminosa utilizando luz mista contra um pano branco (Vanzolini & Papávero, 1967) e tendo como fonte de energia um gerador a gasolina. Adicionalmente, utilizaremos bandejas com álcool 96% com luz ultravioleta e branca a serem alimentadas por bateria. Estas coletas serão feitas próximas aos riachos. Durante o dia, os adultos serão coletados em meio a vegetação com o auxílio de puçás, já os imaturos serão coletados nos riachos utilizando rede D. As coletas do projeto serão realizadas entre 2026 e 2030 e as unidades de conservação a serem amostradas estão discriminadas na Tabela 1. Todo material coletado será fixado diretamente em álcool absoluto e posteriormente será armazenado em freezer -20 °C para garantir a preservação do DNA.

Tabela 1. Unidades de conservação estaduais do Estado do Paraná que serão amostradas durante do projeto.

Cidade	Unidade
Tibagi	Parque Estadual do Guartelá
Piraquara	Mananciais da Serra (SANEPAR)
Campina Grande do Sul	Parque Estadual do Pico Paraná
Morretes	Parque Estadual do Pico Marumbi
Morretes	Parque Nacional de Guaricana
Foz do Iguaçu	Parque Nacional do Iguaçu

Identificação Morfológica

A identificação dos espécimes quanto a morfologia será realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópio e de um microscópio óptico. Os machos adultos serão identificados com base, principalmente em chaves de identificação e através de comparações com espécimes de museus. Os imaturos serão identificados com base na literatura, e caso o imaturo não esteja descrito, estes serão separadas em morfótipos. A associação aos adultos será realizada utilizando ferramentas moleculares e a descrição dos imaturos será feita

posteriormente. Em caso de registro de novas espécies, estas também serão descritas. Todo material coletado será depositado no Laboratório de Biologia Aquática da Unesp de Assis. Eventuais tipos serão depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Incorporando ferramentas moleculares

A extração do DNA e obtenção do gene mitocondrial COI serão realizadas através do uso de partes dos espécimes coletados, a princípio serão utilizadas as pernas. As partes não utilizadas dos espécimes serão armazenadas em microtubos contendo álcool absoluto, devidamente etiquetados (data, coletor, local e código de acesso ao GenBank), e serão acondicionados a -20° C em freezer como material testemunho na Coleção Entomológica do Laboratório de Biologia Aquática da Faculdade de Ciências e Letras da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Assis, SP.

O gene mitocondrial COI (citocromo c oxidase subunidade I) tem sido utilizado para diversas finalidades (Fochetti *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 2012 e Kato *et al.*, 2013), incluindo associação de imaturos e adultos. Sendo assim, será realizada a associação entre adultos e imaturos com base no COI, neste caso serão utilizadas as sequências obtidas para os adultos (devidamente identificados), e as sequências de três imaturos de cada morfótipo. A associação será realizada com base em árvores obtidas a partir da análise das sequências COI, levando em conta os morfótipos dos imaturos e os adultos identificados.

Para extrair o DNA será utilizado DNeasy® Blood e Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Usaremos os protocolos já testados no nosso laboratório e as instruções do fabricante. Posteriormente, será realizada a amplificação do DNA via PCR (Polymerase Chain Reaction), neste processo serão utilizados os primers LCO-1490 combinado ao HCO-2198 (Folmer *et al.*, 1994, Simon *et al.*, 1994). Primers estes que tem se mostrado eficazes na amplificação de sequências do gene COI nos insetos aquáticos, como registrado por análises feitas em nosso laboratório. Os protocolos a serem utilizados para a extração, mesmo que já testados em nosso laboratório, podem sofrer ajustes com a finalidade de melhorar o processo.

Os procedimentos moleculares serão realizados no Laboratório de Biologia Aquática da UNESP/Assis, o qual possui estrutura adequada obtida com apoio da FAPESP (proc. 2012/21196-9). A purificação e o sequenciamento do DNA serão realizados em empresa especializada (e.g. Macrogen, Helixxa, entre outras). Com as sequências prontas, estas serão alinhadas com a utilização do programa MEGA (versão 5.1; Tamura *et al.*, 2011), através do método ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Os haplótipos terão a distância entre eles aferida par-a-par pelo método Kimura 2 parâmetros (K2P), já os grupos monofiléticos serão delimitados pelo uso do método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbour-Joining* – NJ).

Todas as análises serão feitas utilizando o programa MEGA.

Considerações finais

O Laboratório de Biologia Aquática (UNESP/Assis) possui uma boa infraestrutura para o desenvolvimento de análises moleculares e tem total condições orçamentarias para que o projeto seja realizado. Assim, o discente terá à disposição a infraestrutura necessária (incluindo veículo para coleta e equipamentos para análise molecular) para o bom desenvolvimento de seu projeto.

O presente projeto dará continuidade às pesquisas desenvolvidas pelo aluno no Laboratório de Biologia Aquática (UNESP de Assis) sobre taxonomia de insetos aquáticos. Com o desenvolvimento do trabalho, buscaremos diminuir o deficit Linneano, Wallaceano para insetos aquáticos, principalmente de riachos. Como resultado deste esforço, esperamos publicar artigos descrevendo novas espécies, documentando a associação entre imaturos e adultos utilizando métodos moleculares e registrando novas ocorrências para diferentes táxons.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bini, L.M., Diniz-Filho, J.A.F., Rangel, T.F.L.V.B., Bastos, R.P. & Pinto, M.P. 2006. Challenging Wallacean and Linnean shortfalls: knowledge gradients and conservation planning in a biodiversity hotspot. *Diversity and Distributions*. 12: 475-482.
- Carvalho, M.R., Bockmann, F.A., Amorim, D.S., Brandão, C.R.F., Vivo, M., Figueiredo, J.L., Britski, H.A., Pinna, M.C.C., Menezes, N.A., Marques, F.P.L., Papavero, N., Canello, E.M., Crisci, J.V., McEachran, J.D., Schelly, R.C., Lundberg, J.G., Gill, A.C., Britz, R., Wheeler, Q.D., Stiassny, M.L.J., Parenti, L.R., Page, L.M., Wheeler, W.C., Faivovich, J., Vari, R.P., Grande, L., Humphries, C.J., DeSalle, R., Ebach, M.C. & Nelson, G. 2007. Taxonomic impediment or impediment to taxonomy? A commentary on systematics and the cybertaxonomic-automation paradigm. *BMC Evolutionary Biology*. 34: 140-143.
- CBD. 2008. Guide to the Global Taxonomy Initiative. *CBD (Convention on Biological Diversity) Technical Series* 30: pp vii + 195 (<http://www.cbd.int/gti>).
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc.* 85:407-415.
- Dunn, C.P. 2003. Keeping taxonomy based in morphology. *Trends. Ecol. Evol.* 18:270-271.
- Godfray, H. C. J. 2002. Challenges for taxonomy. *Nature*. 417: 17-19.
- Godfray, H. C. J. 2007. Linnaeus in the information age. *Nature*. 446: 259-260.



- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & Dewaar, J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B-Biological Sciences*, 270: 96-99.
- Fochetti, R., Sezzi, E., Tierno De Figueroa, J.M., Modica, M.V., & Oliverio, M. (2009) Molecular systematics and biogeography of the western Mediterranean stonefly genus *Tyrrhenoleuctra* (Insecta, Plecoptera). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 47(4), 328–336.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for application of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Kato, Y., Morii, Y., & Tojo, K. (2013) Molecular phylogeographic analysis of East Asian cryptoperlan stoneflies (Insecta: Plecoptera, Peltoperlidae). *Limnology*, 14(2), 179–194.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.
- 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 Neotrop.* 10(2): 339-346.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87,651–701.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731–2739.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673–4680.
- Vanzolini, P.E. & Papávero, N. (1967) *Manual de Coleta e Preparação de Animais Terrestres e de Água Doce*. Secretaria de Estado da Agricultura de São Paulo. São Paulo. 223p.
- Weiss, S., Stradner, D., & Graf, W. (2012) Molecular systematics, evolution and zoogeography of the stonefly genus *Siphonoperla* (Insecta: Plecoptera, Chloroperlidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 50(1), 19–29.



Wheeler, Q.D., Raven, P.H. & Wilson, E.O. 2004. Taxonomy: impediment or expedient?
Science, 303: 285.