



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA REGIÃO TOCANTINA DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E TECNOLÓGICAS – CCENT  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA

**AROLDO FRANCISCO MIRANDA DE SOUSA**

**FILOGENIA MOLECULAR DE ESPÉCIMES DOS GÊNEROS *Diaphanossoma* e  
*Machrotrix* (CRUSTACEA:  
BRANCHIOPODA) NA PORÇÃO ORIENTAL AMAZÔNIA BRASILEIRA**

IMPERATRIZ – MA

2024

**AROLDO FRANCISCO MIRANDA DE SOUSA**

**FILOGENIA MOLECULAR DE ESPÉCIMES DOS GÊNEROS *Diaphanosoma* e  
*Machrotrix* (CRUSTACEA:  
BRANCHIOPODA) NA PORÇÃO ORIENTAL AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas Naturais e Tecnológicas da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL, como pré-requisito para obtenção do título de graduação em Ciências Biológicas Licenciatura.

Orientador: Marcelo Francisco da Silva

IMPERATRIZ – MA

2024

S725f

Sousa, Aroldo Francisco Miranda de

Filogenia molecular de espécimes dos gêneros Diaphanossoma e Machrotrix (crustacea: branchiopoda) na porção oriental Amazônia Brasileira. / Aroldo Francisco Miranda de Sousa. – Imperatriz, MA, 2024.

42 f.; il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL, Imperatriz, MA, 2024.

1. Cladóceros. 2. Filogenia. 3. Amazônia - biodiversidade. 4. Imperatriz - MA. I. Título.

CDU 574

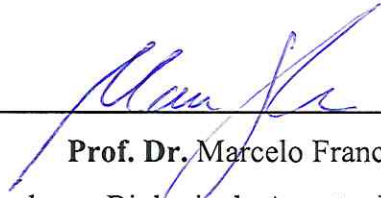
Ficha elaborada pelo Bibliotecário: **Mateus de Araújo Souza CRB13/955**

AROLDO FRANCISCO MIRANDA DE SOUSA

FILOGENIA MOLECULAR DE ESPÉCIMES DOS GÊNEROS *Diaphanossoma* e  
*Machrotrix* (CRUSTACEA:  
BRANCHIOPODA) NA PORÇÃO ORIENTAL AMAZÔNIA BRASILEIRA

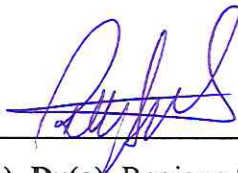
Aprovada em: 18 / 03 / 2024

Banca Examinadora:



---

**Prof. Dr.** Marcelo Francisco da Silva  
Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Patasitários  
UEMASUL/CCENT



---

**Prof(a). Dr(a).** Regiane Saturnino Ferreira  
Doutorado em Zoologia  
UEMASUL/CCENT



---

**Prof(a). Dr(a).** Ivaneide de Oliveira Nascimento  
Doutorado em Agroecologia  
UEMASUL/CCENT

## AGRADECIMENTOS

Caro leitor, é com imensa gratidão que inicio estas palavras, expressando meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Esta jornada acadêmica não teria sido possível sem o apoio, incentivo e colaboração de pessoas incríveis que estiveram ao meu lado durante todo o processo.

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha profunda gratidão ao meu orientador Marcelo Franciso da Silva, cuja dedicação, conhecimento e orientação foram fundamentais para a concretização deste trabalho. Seu comprometimento e paciência foram essenciais para que eu pudesse compreender os desafios e nuances do tema abordado, moldando não apenas o conteúdo do TCC, mas também o meu desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal.

Agradeço também à instituição de ensino, seus professores e toda a equipe administrativa que, de maneira diligente, proporcionaram um ambiente propício para a pesquisa e aprendizado, em especial para todos os professores que me acompanharam nessa jornada. A estrutura, os recursos e o suporte oferecidos foram determinantes para o êxito desta empreitada acadêmica.

Minha jornada de pesquisa foi enriquecida pelos valiosos insights de outros acadêmicos, pesquisadores e profissionais que generosamente compartilharam seus conhecimentos e experiências. Agradeço a todos que contribuíram para a construção do arcabouço teórico desta pesquisa, fornecendo bases sólidas e perspectivas enriquecedoras.

À minha família, em especial a meus pais: Walter Francisco de Sousa; Aclésia Maria Miranda de Sousa, expresse meu profundo agradecimento pelo constante apoio emocional e financeiro. Suas palavras de encorajamento foram como um farol nos momentos mais desafiadores, iluminando o caminho e fortalecendo minha determinação em concluir este trabalho. Agradeço por compreenderem as demandas que este projeto trouxe e por serem a minha fonte inesgotável de amor e suporte. Pois muitos momentos pensei em desistir e me aventurar em outras áreas das graduações, as suas constantes palavras de fortalecimento pessoal me moldaram para continuar uma luta que não deixarei incompleto.

Aos amigos: Tamires Silva Dutra; Felipe da Silva Rodrigues; Ketlen de Lourdes Morais da Silva; Welington Silveira Pereira, cuja presença trouxe alegria aos dias de

estudo intenso, meu agradecimento especial. Sua compreensão, risadas e momentos de descontração foram fundamentais para manter o equilíbrio entre o trabalho árduo e a necessidade de relaxamento.

Agradeço aos colegas de curso, com os quais compartilhei desafios, descobertas e conquistas ao longo desta jornada. Cada um de vocês desempenhou um papel vital na construção de uma comunidade de aprendizado que se tornou um alicerce para o nosso crescimento acadêmico e pessoal.

Às instituições, organizações e pessoas que disponibilizaram recursos, dados e informações necessárias para a realização da pesquisa, meu sincero agradecimento. Sua contribuição foi essencial para a robustez e relevância deste trabalho.

Não posso deixar de agradecer à tecnologia, que se revelou uma ferramenta indispensável na coleta, análise e apresentação de dados. As plataformas, softwares e recursos digitais foram aliados valiosos, ampliando as possibilidades de pesquisa e proporcionando eficiência no processo.

Por fim, agradeço a mim mesmo por perseverar, superar desafios e manter o foco ao longo dessa jornada acadêmica. Este TCC é não apenas um reflexo do meu esforço, mas também um testemunho do meu comprometimento com o aprendizado contínuo e o aprimoramento pessoal e profissional.

Em suma, a conclusão deste Trabalho de Conclusão de Curso é um marco significativo, e expressar minha gratidão a todos que contribuíram é uma tarefa desafiadora, dada a magnitude do apoio recebido. Este trabalho é fruto do esforço coletivo, e cada palavra escrita reflete a soma de contribuições valiosas.

Que este agradecimento sirva como uma manifestação sincera de minha profunda gratidão a todos que, de alguma forma, participaram desta jornada. Este trabalho não é apenas meu, mas de uma comunidade dedicada à busca do conhecimento e ao aprimoramento constante.

**Muito obrigado a todos!**

*“O anjo do Senhor acampa-se ao redor dos que o temem, e os livra. Provai e vede que o Senhor é bom; bem-aventurado o homem que nele confia.”*

*- Salmos 34: 7-8*

## RESUMO

Releva-se a importância da comunidade zooplancônica, em especial aos microcrustáceos da ordem Cladocera, em ecossistemas aquáticos da região amazônica brasileira. Os microcrustáceos desempenham funções cruciais em cadeias tróficas e na ciclagem de nutrientes. Apesar de sua relevância, o conhecimento sobre a biodiversidade desses organismos na região tropical é limitado, especialmente em comparação com regiões de clima temperado. A pesquisa se estruturou em caracterizar a diversidade genética de organismos do grupo Cladocera na porção oriental da região amazônica, utilizando a técnica de DNA barcode como ferramenta molecular. Os resultados filogenéticos revelaram a presença de dois gêneros, *Macrothrix* e *Diaphanosoma*, e apontaram para a possível identificação de uma nova espécie dentro do gênero *Macrothrix* no rio Mosquito. Além disso, o espécime do rio Tocantins foi filogeneticamente relacionado ao gênero *Diaphanosoma*, sugerindo a presença de uma espécie parente a *Diaphanosoma spinulosum*. Destaca a importância das abordagens moleculares na identificação de espécies e na compreensão da biodiversidade em regiões pouco exploradas. Conclui-se que estudos mais aprofundados, incluindo análises morfológicas detalhadas e a utilização de outros marcadores genéticos, são necessários para confirmar e ampliar o conhecimento sobre as espécies encontradas na região amazônica. Este trabalho contribui para o entendimento da biodiversidade e pode apoiar ações de preservação e conservação em ecossistemas aquáticos na Amazônia.

**Palavras-chave:** Cladóceros, Amazônia, Filogenia.

## **ABSTRACT**

The importance of the zooplankton community, especially microcrustaceans of the order Cladocera, in aquatic ecosystems in the Brazilian Amazon region is highlighted. Microcrustaceans play crucial roles in trophic chains and nutrient cycling. Despite their relevance, knowledge about the biodiversity of these organisms in the tropical region is limited, especially in comparison to regions with a temperate climate. The research was structured around characterizing the genetic diversity of organisms from the Cladocera group in the eastern portion of the Amazon region, using the DNA barcode technique as a molecular tool. The phylogenetic results revealed the presence of two genera, *Macrothrix* and *Diaphanosoma*, and pointed to the possible identification of a new species within the genus *Macrothrix* in the Mosquito River. Furthermore, the specimen from the Tocantins River was phylogenetically related to the genus *Diaphanosoma*, suggesting the presence of a species related to *Diaphanosoma spinulosum*. Highlights the importance of molecular approaches in identifying species and understanding biodiversity in little explored regions. It is concluded that more in-depth studies, including detailed morphological analyzes and the use of other genetic markers, are necessary to confirm and expand knowledge about the species found in the Amazon region. This work contributes to the understanding of biodiversity and can support preservation and conservation actions in aquatic ecosystems in the Amazon.

**Key words:** Cladoceran, Amazon, Phylogeny.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Municípios na porção leste da Amazônia legal brasileira onde foram realizadas coletas de Cladocera límnicos.....	23
<b>Figura 2 -</b>	Coleta de plâncton utilizando rede 68 µm.	23
<b>Figura 3 -</b>	A: Estereomicroscópio utilizado; B: Eppendorf utilizados para armazenamento dos cladóceros.....	24
<b>Figura 4 -</b>	Kit comercial Utilizado para Extração do mtDNA.....	25
<b>Figura 5 -</b>	Termociclador para PCR.....	25
<b>Figura 6 -</b>	Equipamento para eletroforese.....	26
<b>Figura 7 -</b>	Imagens de microscópio óptico em 40X do cladóceros em estudo, <i>Macrothrix</i> sp. (A) Visualização lateral. (B) Visualização lateral (escala = 53,8µm).....	28
<b>Figura 8 -</b>	Imagem de microscópio óptico em 40X do cladóceros em estudo, <i>Diaphanosoma</i> sp., visualização dorsal.....	29
<b>Figura 9 -</b>	Árvore filogenética de grupos relacionados na pesquisa através da análise de inferência Baysiana. Marcados em vermelho estão as espécies que estão sendo estudadas nesta pesquisa.....	30
<b>Figura 10 -</b>	Espécimes de <i>D. spinulosum</i> do Equador. (A) Cabeça e olho (escala=200 µm); (B) Vista lateral (escala= 100 µm); (C) Margem pósterio-ventral das valvas (c= 20 µm); (D) Garra pós-abdominal, vista Zateral (escala= 20 µm).....	31

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

<b>Tabela 1-</b>	Conjunto de primer's que foram utilizados para amplificação do gene mitocondrial COI de cladóceros límnicos da porção oriental da região amazônica brasileira.....	25
------------------	--	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>12</b>
2.1.Biodiversidade aquática na Amazônia.....	12
2.2.Comunidades zooplancônicas e sua importância ambiental e econômica na região amazônica.....	15
2.3.Os cladóceros, grupo de zooplânctons.....	16
2.4. DNA Barcode uma ferramenta essencial para a filogenia da biodiversidade.....	19
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
4.1. Coleta.....	23
4.2.Triagem e Extração de DNA.....	24
4.3. Análise Filogenética.....	26
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>

## INTRODUÇÃO

A comunidade zooplanctônica é composta por organismos aquáticos que ocupam posição importante na estrutura trófica da maioria dos ambientes marinhos e dulcícolas (KIØRBOE, 2008). Segundo LITCHMAN et al. (2013), os estudos da estrutura destas comunidades se estabelecem como um componente chave para a compreensão global dos ecossistemas aquáticos.

Apresentando uma dinâmica de migração vertical ao longo da coluna d'água, os microcrustáceos são importantes componentes do zooplâncton dulcícola, desempenhando papéis fundamentais em muitas cadeias tróficas e por isso sendo rotineiramente abordados em estudos sobre a produtividade e o estado trófico de rios, lagos e reservatórios (BRITO, 2008; BRITO et al., 2015).

Os organismos da ordem Cladocera (Crustacea, Branchiopoda), apesar de normalmente não figurarem entre os mais abundantes grupos de zooplâncton (SILVA & PERBICHE-NEVES 2017; DEBASTIANI-JÚNIOR et al., 2016), podem se destacar em importância numérica em resposta a variações nas condições do ambiente por estarem envolvidos no controle *top-down* na comunidade planctônica límnic, frente a seu papel como um grupo herbívoro (HAYASHI-MARTINS et al., 2017; ROSA et al., 2020). Atuando como importantes componentes para ciclagem de nutrientes em ecossistemas aquáticos (COLE et al., 2011).

Estes organismos têm sido utilizados em estudos aplicados à alimentação de alevinos em virtude da facilidade de cultivo em laboratório, o que lhes confere uma importância econômica (ARAGÃO et al., 2004), além de utilizados em estudos ecotoxicológicos e de bioindicação das condições de ambientes aquáticos (NADDY et al., 2011; SILVA, 2011). Apesar disso, os principais avanços sobre o estudo taxonômico de microcrustáceos dulcícolas ainda são realizados em regiões de clima temperado (RAYNER, 1999; MARTINS et al., 2019). Na região tropical, esta linha de estudo está bastante consolidada em grandes bacias da região Sudeste e Sul do Brasil, havendo uma tênue contribuição em estudos de outras regiões hidrográficas brasileiras (SILVA, 2003; MATSUMURA-TUNDISI & TUNDISI, 2011; SILVA & MATSUMURA-TUNDISI, 2011; ROSA, 2014).

O conhecimento da biodiversidade brasileira é ainda bastante incipiente para a maioria dos grupos de seres vivos. A partir dessa premissa gera-se entraves para o

estabelecimento de medidas de preservação e conservação da diversidade biológica, uma condição imprescindível para o desenvolvimento sustentável. Tratando-se de uma conotação mundial a perda de biodiversidade ocorre de forma acelerada fazendo com que muitas espécies não possam ser catalogadas antes de uma possível extinção (SANTOS et al., 2021). Os ambientes dulcícolas podendo ser apontado como um dos ecossistemas com maior ameaça de perda de biodiversidade, pela elevada vulnerabilidade desses sistemas devido a uma conjunção de fatores como: poluição generalizada, eutrofização, invasão por espécies exóticas, alteração e ou destruição dos habitats (ROCHA et al. 2011).

Constituído por organismos do plâncton heterotrófico de tamanho compreendido entre 200 e 2000  $\mu\text{m}$ , o mesozoplâncton representam um compartimento importante para o funcionamento da rede trófica pelágica (VALENTIN et al., 2020). Por sua abundância e diversidade, estes organismos constituem o principal elo de transferência da matéria e energia entre os níveis tróficos superiores, que incluem a maioria dos recursos vivos de interesse econômico, e a alça microbiana que sustenta a cadeia alimentar dos metazoários em ecossistemas aquáticos (JUNIOR et al., 2013; LELES et al., 2017).

A taxonomia convencional de Cladóceros é baseada na observação de características morfológicas dos indivíduos, o que torna a identificação a nível infra-genérico complexa e onerosa sob o ponto de vista de tempo de pesquisa e recursos (SOUSA & ELMOOR-LOUREIRO, 2008). Contudo, esse tipo de identificação pode sofrer influência por parte de caracteres que compartilham semelhança entre as espécies, devido a grande plasticidade fenotípica que pode ser observada nestes microcrustáceos límnicos, tornando os estudos taxonômicos muito restritos e escassos, em especial no Brasil (STOLLEWERK, 2010; SOARES & ELMOOR-LOUREIRO, 2011).

É na elucidação desta problemática, que a melhoria na precisão da detecção de espécies crípticas de Cladocera de corpos hídricos tropicais pode ser alcançada com o auxílio de ferramentas moleculares que possibilitam evidenciar as divergências genéticas existentes entre as espécies (BELYAEVA & TAYLOR, 2009; ELIAS-GUTIERREZ & VALDEZ- MORENO, 2008).

É frente a essa realidade que o melhor entendimento sobre a estrutura e diversidade da comunidade de Cladocera de água doce na região tropical é uma etapa necessária para possibilitar a ampliação da utilização destes organismos, não só em ações de monitoramento da qualidade ambiental, como também em setores produtivos voltados para o cultivo de organismos aquáticos e na indústria farmacêutica.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1. Biodiversidade aquática na Amazônia**

Biodiversidade ou diversidade biológica, de acordo com o conceito científico compreende-se como a variabilidade de seres vivos em escala planetária da Terra, em que não se trata somente do número de espécies, mas inclui-se os abrangentes tipos taxonômicos, genéticos e funções ecológicas. O termo “biodiversidade” veio a ganhar relevância na Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento em 1992, com tal evento a biodiversidade se tornou um assunto de relevância mundial (XIONG et al., 2020).

Apresentando tal conceito, o Brasil se encontra entre os cinco países com maior biodiversidade da Terra, segundo a WWF (World Wide Fund for Nature), o Brasil possui 41% de suas florestas restantes classificadas como “floresta pluvial tropical”, diante da grandiosidade da fauna e flora amazônica se caracteriza a biodiversidade (FERNESIDE, 1999).

Amazônia, um bioma conhecido mundialmente pela sua alta biodiversidade, abrangência geográfica de sua floresta tropical, e rios, como o famoso Rio Amazonas, o maior rio do mundo. Dadas tais informações, a sua preservação se torna um dever mundial ainda mais quando se trata de uma área que mantém preservado povos originários indígenas, onde muitas ainda não tiveram o contato com o homem moderno (ELLWANGER et al., 2020).

A preservação das grandes florestas da Amazônia é uma discussão global que vem aumentando a cada ano pelas nações, por tal bioma conter aproximadamente metade das florestas tropicais do mundo e um quarto de toda água doce do planeta, além desses dados, ela opera com a capacidade de um terço de todas as espécies conhecidas atualmente no mundo. Diante de tais fatores, fica visível a grande importância que é dada pela grande mídia, cientistas, ativistas e políticos, sendo um

receptáculo da biodiversidade mais críticos para sua emergência preservação e conservação das espécies e riquezas naturais (HECKENBERGER et al., 2007).

O bioma amazônico ocupa uma área aproximada de 4.196.943 Km<sup>2</sup>, com uma área total do território brasileiro (Km<sup>2</sup>) equivalendo a 49,3% (IBGE/MMA, 2023). Tal bioma é considerado um ponto “hotspot”, sendo um de doze pontos espalhados pelo planeta Terra, em que são pontos de alta biodiversidade e reguladoras climáticas e ecológicas, sendo assim, um grande desequilíbrio em um desses “hotspot” poderiam alavancar as grandes mudanças antrópicas que está acontecendo, devido a fatores stress do solo, ocasionado pelo desmatamento excessivo, alteração drástica da atmosfera devido a liberação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) pelos combustíveis fósseis (HECKENBERGER et al., 2007).

Entende-se que o bioma amazônico abrange nove países (Brasil, Colômbia, Peru, Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Bolívia, Equador) em sua extensão geográfica, considerado o maior sistema fluvial mundial, pois, dentro o território do bioma, ele é composto por muitas bacias hidrográficas sendo a maior a bacia amazônica (ELLWANGER et al., 2020). Conhecer o número real de espécies presentes na Amazônia não é uma tarefa fácil, além de áreas remotas nunca visitadas por humanos modernos, a limitada quantidade de taxonomistas diminui a descoberta de tais espécies. Considerando tal fator determinante em estudos aprofundados de taxonomia, as informações disponíveis sobre os sistemas aquáticos do bioma amazônico estão incompletas e escassas devido a sua alta abrangência geográfica (SANTOS et al., 2022).

A presença de áreas remotas, nunca documentadas, se torna pontos de alta probabilidade de descoberta de novas espécies que nunca foram estudadas e detalhadas (SOUZA et al., 2019). É notório o baixo conhecimento do que diz a respeito da biodiversidade límnic brasileira, principalmente em relação aos invertebrados por estarem tal biodiversidade localizada nos trópicos e não ocorrendo condições climáticas morfométricas e regionais atípicas. O ambiente aquático brasileiro é uma rica fonte de biodiversidade por oferecer *habitats* favoráveis para a vida prosperar de forma plena (NEVES et al., 2003).

Os ecossistemas de água doce são habitats únicos e dificilmente replicáveis pela sua alta complexidade, com tal conotação, ainda sustentam uma alta riqueza e

abundância de espécies, caracterizados pela sua única biodiversidade. Os ecossistemas límnicos ocupam em distribuição geográfica aproximadamente 0,8% de toda a superfície do planeta Terra, tal informação caracteriza a alta biodiversidade deste habitat, pois representa 6% das espécies catalogadas (DUDGEON et al., 2006).

Por fatores ambientais associados a poluição dos corpos hídricos, a perda da biodiversidade se torna maior em ecossistemas límnicos, do que em ecossistemas terrestres. Para um entendimento, 40% de todas as espécies de peixes, se encontra nos ecossistemas de água doce, a manutenção desses ambientes se torna constante para regredir as ameaças antrópicas e a cada ano que se passa, lacunas na biodiversidade são deixadas pela extinção de espécies na região ou completamente (BUTCART et al., 2010).

Em uma análise mais abrangente cientificamente, a perda da biodiversidade nos ecossistemas de água doce é enorme e gravíssima, pelo fato de que respostas nas variações ambientais por organismos é uma área da ciência que ainda exige estudos mais aprofundados para quantificar a verdadeira perda. Devido a alta densidade de diversos táxons microscópicos, como protozoários, rotíferos, cladóceros, copépodos, ostracodas e etc. como os zooplânctons não se sabe ainda a perda de diversas espécies que ocorrem devido a mudanças antrópicas no ambiente natural (GATTI, 2016). Literaturas científicas acerca da perda gradual de macroeucariotos, proveniente da perturbação causada pelas ações humanas, estão disponíveis em grande volume na comunidade científica. Já para microeucariotos, os estudos são escassos, e ainda necessários novos métodos de análises rápidos e práticos para melhor abrangência no meio científico. Entre todas as comunidades presentes no ambiente de água doce, o zooplâncton apresenta enorme importância (XIONG et al., 2019).

A importância da conservação dos zooplânctons se dá pelo fato, de sustentarem as importantes cadeias alimentares límnicas, um ser microscópico que é esquecido e desempenha um papel ecológico fundamental, pois, muitos zooplânctons se alimentam do bacterioplâncton e do fitoplâncton, e assim, os zooplânctons servem de alimentos para alevinos de peixe, invertebrados e outros organismos heterotróficos aquáticos em níveis tróficos mais elevados, desta forma, a conservação de macroeucariotos depende também da conservação de microeucariotos e outro grupos microscópicos, para um funcionamento do ambiente aquático em um equilíbrio dinâmico. Com tal pontuação, os zooplânctons se tornam aliados importantes na

preservação e conservação da biodiversidade (JOHNSON et al., 2011; XIONG et al., 2020).

## 2.2. Comunidades zooplantônicas e sua importância ambiental e econômica na região amazônica

Em relação a metazoários comumente conhecidos, como os peixes, animais bastante abordados quando se trata de bioma amazônico, representam 15% de todos os peixes de água doce do mundo, em relação a espécies o número vem crescendo exponencialmente a cada ano, tendo aproximadamente 2.200 espécies de peixes de água doce no bioma amazônico (OBERDORFF et al., 2019). Comparada a outros biomas e ecossistemas ribeirinhos tanto a Amazônia quando a fauna piscícola está em um estado saudável de preservação e conservação, no entanto, é afetada anualmente por eventos antrópicos indiretos e diretos que prejudicam o ecossistema amazônico, e por consequência grupos de espécies ainda pouco ou não explorados cientificamente, como os zooplânctons (JÉZÉQUEL et al., 2020).

Determina-se zooplâncton como um grupo artificial genérico de organismos heterotróficos, abrangendo desde metazoários à protistas de uma variada gama taxonômica e sistemática, mas apresentando entre si uma característica global de ocuparem a coluna d'água como o *habitat* desses organismos zooplantônicos. Holoplâncton é aquele zooplâncton que passa todo o período de vida ocupando a coluna d'água, já, meroplâncton é aquele organismo que ocupa um determinado período de sua história de vida na coluna d'água, como, por exemplo as larvas da ordem Diptera (ESTEVES, 2011).

Com características morfológicas, estratégias reprodutivas, táxons diversos e dietas alimentares diversificadas. Entre os grandes grupos dentro dos zooplânctons estão as tecamebas (Testacea), os cladóceros (Branchiopoda, Cladocera), copépodos (Maxillopoda, Copepoda), rotíferos (Rotifera), ostrácodos (Oligostraca, Ostracoda). Possuindo assim cada grupo suas características particulares que o definem, desde detritívoros a carnívoros (ESTEVES, 2011; NEVES et al., 2003).

Em um tamanho que chega a nanômetros, o zooplâncton pelo seu tamanho diminuto e um ciclo de vida curto acaba sendo um grupo de seres vivos que apresenta alta sensibilidade as variações ambientais que ocorre como resultante desse processo,

mudanças na biomassa e estrutura da comunidade de zooplânctons. Com mudanças tão significativas para a comunidade de zooplânctons, alterações na distribuição das ligações tróficas da teia alimentar se torna evidente e bastante expressivo a sua alteração negativa, afetando o sucesso dos sucessores da cadeia trófica. Pelo fato de que os zooplânctons servem de alimento para alevinos de peixes e alguns invertebrados, sendo assim, os zooplânctons uma das bases da teia trófica (CHIBA et al., 2018).

As comunidades zooplânctônicas tem papel fundamental na reciclagem de nutrientes, são suscetíveis a flutuações no ambiente e demonstram respostas rápidas, sendo, assim, valiosos como indicadores da qualidade e do estado trófico de ecossistemas aquáticos.

Em ecossistemas aquáticos da região amazônica, vale ressaltar a sua conotação em estudos no diz respeito a composição de comunidades zooplânctônicas como ferramenta auxiliar na gestão ambiental das bacias hidrográficas, já que, diferentes grupos variam na conformidade de seu ambiente (SOUZA et al., 2019).

Os primeiros programas de monitoramento do zooplâncton, se concentraram na variabilidade da biomassa zooplânctônica, com o intuito de apresentar uma gestão ativa no controle devido a volatilização dos recursos pesqueiros e sua variabilidade em determinada bacia hidrográfica, ecossistema marítimo e oceânico e sistemas artificiais de pesca (CUSHING, 1990). Como já apontado por estudos de séculos passados, organismo aquáticos tem uma capacidade intrínseca de dispersão, sendo mais evidente em relação as elevadas taxas de estágios dormentes (DARWIN, 1859). Dado tal fator, zooplânctons apresentam uma alta capacidade de dispersão o que favorece o sucesso ecológico de muitos ambientes que foram degradados e estão em processo de recuperação, tornando o fluxo de energia, a conexão entre produtores e macroconsumidores possível para a estabilidade dinâmica do sistema (LOUETTE & MEESTER, 2005).

### 2.3. Os cladóceros, grupo de zooplânctons

Habitantes do mundo aquático que em sua maioria medem cerca de 0,2-3,0 mm, ocupam em sua maior parte ecossistemas límnicos do que ecossistemas marítimos e oceânicos. Os cladóceros (Branchiopoda, Cladocera), subordem pertencente aos crustáceos (Crustacea), são separados taxonomicamente em Anomopoda, Onichopoda,

Haplopoda e Ctenopoda. A maioria dos cladóceros são holoplanctônicos, porém magitoriamente estão presentes no litoral de ecossistemas lacustres. No geral, as famílias de cladóceros planctônicos como Daphnidea, Sididae e Bosminidae apresentam um percentual de abundância maior do que os cladóceros litorâneos de ecossistemas lacustres e lóticos. Já as famílias Macrothricidae e Chydoridae apresentam indivíduos que ocupam a margem litorânea, por serem usuários da flora local e residirem no fundo do sistema (ESTEVES, 2011).

Por se tratar de um grupo pertencente aos crustáceos (Crustacea), muitas características são semelhantes ao subfilo Crustacea. Desta forma, o corpo dos cladóceros são constituídos morfologicamente de cabeça, tórax e abdome; constituem em volta de si uma carapaça bivalve, que é comumente protuberante, tendo uma abertura verticalizada. Em alguns cladóceros, a carapaça pode ser menor, e pode ocorrer da cabeça estar separada por uma depressão do corpo. Outros caracteres importantes são a presença de um olho composto, um ocelo, dois pares de antena (altamente quitinizada), um pós-abdome (altamente quitinizada) e 5 ou 6 pares de apêndices torácicos e ventrais que são utilizados para levar uma corrente de água do exterior para o interior da carapaça e assim receber material orgânico particulado de alimento e oxigênio dissolvido do meio. O último segmento abdominal, chamado de pós-abdome ou pigídio, apresenta função higiênica em que é utilizado para limpar os apêndices torácicos, ou em algumas espécies que habitam regiões profundas do corpo límnic, como na família Macrothridae, são usados para locomoção (ESTEVES, 2011).

Popularmente conhecidas como “pulgas d’água”, os cladóceros apresentam um sistema de locomoção no ambiente aquático baseado morfologicamente utilizando suas antenas, principalmente para o segundo par de antenas por serem maiores, bifurcados e com muitas cerdas rígidas de tamanho e número diferentes para cada espécie formam um sistema de locomoção baseado em saltos no ambiente aquático, por este motivo, se deriva o nome popular de “pulgas d’água”. O primeiro par de antenas, também chamado de antênulas, apresenta um tamanho menor comparado ao segundo par, e por assim, exerce a função de orientação espacial, sendo um órgão do sentido, por caracterizar na ponta das suas antênulas cerdas finas e sensitivas. Tantas características apresentadas, algumas tem relevância para estudos taxonômicos: Tamanho e detalhes da cabeça, formato, mosaico da carapaça, estrutura de apêndices e cerdas do pós-

abdômen, poros do corpo, e as patas torácicas são caracteres importantes para a diferenciação entre famílias, gêneros e espécies (ESTEVES, 2011).

Os cladóceros apresentam duas estratégias reprodutivas que são a paternogênese e sexuada. Quando o ambiente está favorável, sem condições adversas, como boa qualidade de água em parâmetros físico-químicos e condições climáticas típicas apresentam reprodução paternogênese por repetidas gerações de descendentes em que somente há a existência de fêmeas, em que eclodem de ovos diploides. Já quando as condições ambientais são negativas uma estratégia adotada é que na próxima geração, em ovos diploides nascem cladóceros machos, podendo assim quando esses machos atingirem a maturidade sexual irá ocorrer a reprodução sexuada. Lembrando que, as diferentes variedades e ciclos de reproduções nos cladóceros variam de acordo com a espécie e suas estratégias diante do ambiente que estão inseridos. Diante de tal conceito, é possível encontrar variações do ciclo reprodutivo, por exemplo, em regiões de clima temperado a reprodução sexuada acontece de forma dicíclica, isto é, dois ciclos reprodutivos por ano, no início do período de veraneio e outra na alvorada do outono, em que, as monocíclicas costumam se reproduzir. Portanto, na reprodução sexuada é possível estabelecer um padrão, de dicíclica, monocíclica e acíclica, em que esta por último não tem um padrão definido, podendo se reproduzir 10 vezes ou 1 vez no ano de acordo com as condições e necessidades que se sentir vulnerável no ambiente hostil (ESTEVES, 2011).

São vários os sinalizadores para suprimir a reprodução paternogênese e produzir machos para reprodução sexuada, como alteração no clima e temperatura, nível da água, disponibilidade de alimento, aumento exponencial de superpopulações e variações físico-químicas da água. Em determinadas espécies, nunca foi observado e registrado o surgimento de machos e conseqüente nunca ocorreu a reprodução sexuada. Diferenças no dimorfismo sexual também estão presentes, os machos comumente são menores comparados as fêmeas de mesma espécie, apresentam também antenas maiores e mais desenvolvidas, especializações também estão presentes como no primeiro par de patas torácicas com formações em formato de ganchos e/ou o pós-abdôme reduzido e a característica mais marcante é a presença de apêndices copuladores usados para fecundar os óvulos das fêmeas. Nota-se nas fêmeas que foram fecundadas uma modificação em uma parte da região dorsal da carapaça a formação em um efípio que armazena de um a dois ovos. Os ovos de cladóceros a partir da

reprodução sexuada são chamados de ovos de resistência e apresentam um visual opaco, de cor escura e bastante resistentes a condições do ambiente. Tal fator apresentado, se torna uma vantagem evolutiva na estratégia de sobrevivência da espécie, sendo a melhor forma de dispersão de cladóceros no ambiente, podendo serem levados pelas correntes de ar (ventos), correntes aquáticas e fixados a outros micro e/ou macrometazoários. O tempo de vida dos ovos de resistência pode ser por décadas, principalmente quando ainda estiverem mantidos dentro do efípio, e assim quando o ambiente for favorável poderão eclodir e viverem plenamente no ambiente (ESTEVEES, 2011).

Já em relação aos ovos dos cladóceros e seu ciclo de crescimento, apresentam uma estratégia de cuidado parental em que os ovos são alocados em uma cavidade dorsal que servem como câmara incubadora, dando origem na eclosão minúsculos cladóceros, lembrando que os cladóceros não apresentam estágio larval, e assim não apresentam diferenciação morfológica em relação a metamorfogênese, sendo considerados organismos vivíparos. O tempo de incubação varia de acordo com a temperatura, mas usando a temperatura das CNTP (Condições Normais de Temperatura e Pressão), isto é, 25°C, os ovos demoram em média de 1 a 2 dias, lembrando que são bastante influenciáveis pela temperatura, assim como a troca de mudas (que pode ser de 2 a 6 antes da reprodução e 20 em adultos) e o tempo de desenvolvimento. O tempo de vida também é influenciado pela temperatura, em que quando menor a temperatura maior vai ser a expectativa de vida que varia de acordo com a espécie, eventos estocáticos e temperatura, no entanto, a média para o grupo no geral de cladóceros está entre 30 a 80 dias de vida (ESTEVEES, 2011).

A fauna de cladóceros possui uma dieta alimentar bastante diversificada, de acordo com as estratégias alimentares adotadas por cada espécie ou grupo taxonômico, Anomopoda e Ctenopoda (Bosminidae, Sididae, Daphniidae, Holopediidae) se alimentam principalmente de fitoplânctons, bactérias e partículas orgânicas e outros protistas e rotífero. Outros grupos apresentam uma dieta alimentar baseado no predatismo como os Leptodoridae e Polyphemidae (ESTEVEES, 2011).

#### 2.4. DNA Barcode uma ferramenta essencial para a filogenia da biodiversidade

A biodiversidade do mundo é enorme, e a descoberta, caracterização de cada táxon se torna um trabalho cansativo e demorado principalmente quando nos referimos a técnicas morfológicas para identificação de espécies, se tornando um sistema de

identificação obsoleto devido as grandes diferenças morfológicas que existem em diferentes espécies, como a sua plasticidade fenotípica, metamorfose e dimorfismo sexual. Associado a estes conceitos de diferenciação morfológica, ainda se tem o dimorfismo sexual presente em muitas espécies de aves, por exemplo, em que as cores de machos são diferentes das fêmeas, mesmo sendo das mesmas espécies. Dado tais fatores, torna evidente que análises morfológicas são um sistema arcaico e duvidoso na identificação das espécies comparado as novas técnicas de biologia molecular surgidas no final do século passado (DESALLE & GOLDSTEIN, 2019).

Com a necessidade de padronizar os seres vivos para melhor simplificação e menos confusão na sistemática, surgiu o DNA barcode como uma ideia criada por um geneticista devido aos avanços da filogenia em 2003 na Universidade de Guelph, Canadá, Professor Doutor Paul Herbert e sua equipe de pesquisadores. Desta forma, propôs escolher uma área do DNA que fosse amplamente utilizada pelos grandes grupos como uma forma de diferenciar cada espécie de acordo com seu código de barras genético. Em tal diretriz de pensamento, o DNA BARCODE é como se fosse um código de barras genético que fosse comum entre todos os seres vivos de cada domínio e assim poder padronizar uma pequena parte do grande código genético para diferenciar cada espécie dentro de seu Domínio. Desta forma, a ideia é criar um banco de dados universal global e democrático de DNA BARCODE em que todos os pesquisadores qualificados teriam acesso para publicar suas descobertas de espécies e assim quando um pesquisador for buscar no banco o seu achado genético e vê que já foi publicada um registro da espécie melhora, diante disso, a comunicação entre taxonomista para não haver divergência de dados e descobertas de novas espécies e táxons (HEBERT et al., 2003).

Com isto, foi proposto para os metazoários e maioria dos eucariotos utilizarem uma parte do DNA mitocondrial chamada COI, que está localizada em um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases de nucleotídeos, a partir da base 58 da extremidade 5' do gene Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI). O COI é um gene responsável por codificar uma enzima muito importante no transporte de elétrons para a respiração celular. A escolha do gene COI, foi devido a sua alta taxa de mutação, apresentar similaridade entre as espécies, não há íntrons e é replicável através da divisão celular, além de ser amplamente fácil de ser utilizado em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Outros grupos de eucariotos como as macrófitas complexas

utiliza-se o rbcL (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase) uma região do DNA cloroplastidial presente nos cloroplastos das plantas em que é responsável por sintetizar uma enzima chamada rubisco, em que é envolvida no processo de fotossíntese para conversão de dióxido de carbono em açúcares, desta forma, a rbcL é um gene bastante conservado ao longo das eras e sua escolha foi crucial para ser o DNA BARCODE das plantas. Já em fungos, é utilizado o ITS (INTERNAL TRANSCRIBED SPACER) uma região do DNA que está presente do núcleo celular do fungo (HERBERT et al., 2003).

O Lançamento do primeiro Consórcio para o Código de Barras da Vida (CBOL) ocorreu em maio de 2004 e, atualmente, reúne mais de 120 instituições provenientes de 45 nações diferentes. O principal objetivo do CBOL é fomentar a formação de colaborações internacionais de pesquisa, com o propósito de criar, ao longo das próximas duas décadas, um acervo abrangente de códigos de barras para todas as formas de vida eucariótica. Já no Brasil o consórcio responsável por gerir e identificar a biodiversidade molecular brasileira é o Brazilian Barcode of Life (BrBOL) onde envia os dados moleculares de novas espécies para o Boldy Systems (Barcoding of Life Database Systems) que se trata de uma instituição internacional que armazena todos os dados moleculares de espécies registradas, desde, o seu DNA BARCODE, fotografias, localizações e distribuições geográficas, descrições morfológicas e comportamentais (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

- Caracterizar a genética de dois organismos do grupo Cladocera presentes na porção oriental da região amazônica brasileira utilizando o DNA barcode como ferramenta molecular, além de verificar possíveis complexos de espécies e detecção de problemas taxonômicos dentro do grupo.

#### **3.2 Específicos**

- Caracterizar a filogenia genética de duas espécies de Cladocera com intuito de identificar a possibilidade da existência de espécies novas de Cladocera de duas bacias hidrográficas na porção oriental da região amazônica brasileira;
- Gerar dados para auxílio na determinação da classificação taxonômica morfológica das espécies de Cladocera na porção oriental da região amazônica brasileira;
- Verificar a ocorrência de espécies crípticas e complexos de espécies na fração da biota límnic em estudo nativas das bacias do rio Tocantins e Gurupi;
- Contribuir para o aumento de sequências de DNA de Cladocera disponíveis nos repositórios mundiais de dados genéticos, como GenBank e BOLD.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1. Coleta

Amostras de cladóceros límnicos foram coletadas na região litorânea de corpos hídricos nos municípios de Imperatriz – MA na bacia Tocantins-Araguaia do rio Tocantins, Açailândia – MA na bacia do rio Gurupi no rio Mosquito (Fig. 1) por arrasto horizontal com rede de plâncton com 50 cm de diâmetro e porosidade de 68  $\mu\text{m}$ .

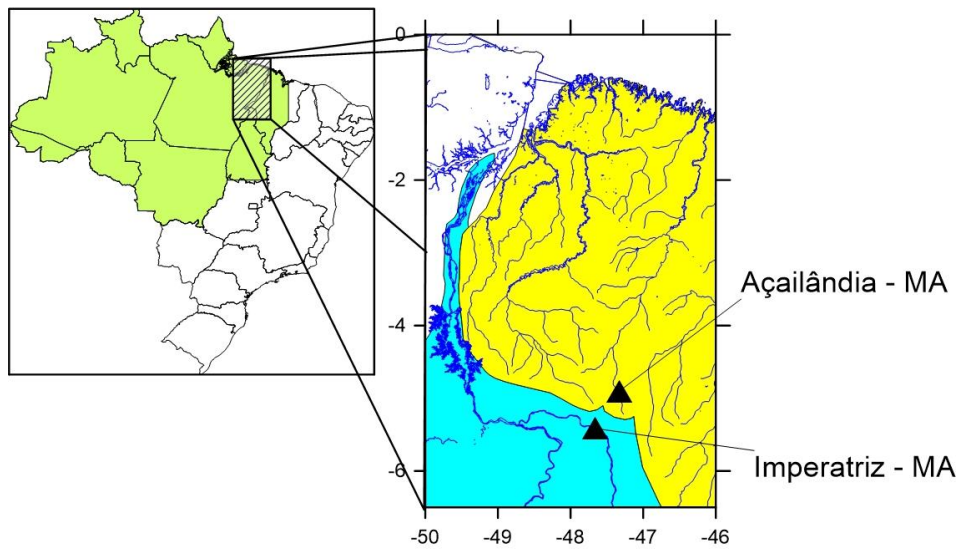


Figura 1 – Municípios na porção leste da Amazônia legal brasileira onde foram realizadas coletas de Cladocera límnicos.



Figura 2 - Coleta de plâncton utilizando rede 68  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2. Triagem e extração de DNA

No Laboratório de Ecologia e Limnologia – LEL da UEMASUL as amostras foram submetidas a triagem sob microscópio óptico AxiovertA1 (ZEISS) equipado com contraste de fase e acoplado em uma câmera ICc 1 (ZEISS). Sendo submetidas a triagem, separando duas espécimes de cladóceros em eppendorf (Fig. 3).

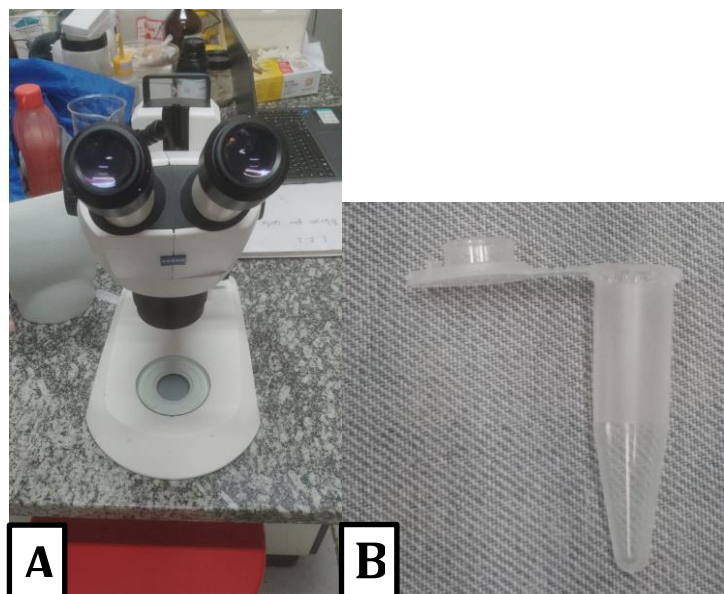


Figura 3 – A: Estereomicroscópio utilizado; B: Eppendorf utilizados para armazenamento dos cladóceros.

A identificação e caracterização morfológica dos espécimes foi realizada de acordo com Elmoor-Loureiro (1997, 2007, 2010), Van Damme & Dumont (2008) e Van Damme et al. (2010). Os espécimes isolados e fixados em etanol 100%, anteriormente à extração de DNA, serão deixados em água Milli-Q por 3h.

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando kits comerciais de extração em coluna (Fig. 4), seguindo o protocolo do fabricante. Para amplificar da região de COI foram utilizados os primers propostos por Folmer et al. (1994) (Tab. 1). As reações de PCR foram processadas em um volume total de 25 $\mu$ l e realizadas de acordo com Ivanova (2006), onde as condições da PCR foram 95°C por 3 min seguido por 40 ciclos de 95°C por 15s, 52°C por 45s e 72°C por 60s seguido de 72°C por 10min (Fig. 5).

Tabela 1 – Conjunto de primer's que foram utilizados para amplificação do gene mitocondrial COI de cladóceros límnicos da porção oriental da região amazônica brasileira.

Primer	Sequência	Autor
LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer et al. (1994)
HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	



Figura 4 – Kit comercial Utilizado para Extração do mtDNA.

Fonte: Loccus



Figura 5 - Termociclador para PCR.

Os produtos de PCR foram evidenciados pela eletroforese em gel de agarose e purificados com GFX™ PCR DNA e um kit de Purificação de Bandas de Gel (GE Healthcare, UK), de acordo com as instruções do fabricante (Fig. 6). As reações de sequenciamento foram conduzidas com o kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EUA), seguindo as instruções do fabricante, em um ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA). O DNA extraído foi enviado por transportadora para um laboratório especializado em PCR, e assim a obtenção do código genético foi possível. Os resultados do PCR são enviados via e-mail.



Figura 6 – Equipamento para eletroforese.

#### 4.3. Análise filogenética

Após o recebimento dos dados genéticos pelo laboratório contratado, a edição do código genético removendo regiões menos informativas, para maior confiabilidade dos dados foi pesquisado códigos genéticos semelhantes e/ou iguais em bancos de dados disponíveis na internet, como o Bold Systems e o GenBank, neles foram constatados trabalhos semelhantes a pesquisa analisada. Com os dados disponíveis, começou-se a realizar a criação de uma árvore filogenética com a finalidade de descobrir a semelhança entre grupos e assim conseguir saber que se trata de uma nova área de ocorrência de uma espécie nova ou uma nova área de ocorrência já publicada.

Para a análise filogenética foram utilizadas 37 sequências dos bancos de dados disponíveis em Body Systems e GenBank para o DNA mitocondrial COI que apresentavam maior similaridade com as sequências obtidas, sendo utilizado como

grupos externos representantes de Diptera e Coleptera e uma espécie de camarão (*Macrobrachium amazonicum*).

O alinhamento sequencial múltiplo (CLUSTALW) das amostras alvo com sequências que apresentaram proximidade na identidade foi realizada pelo software BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 2010). O teste do melhor modelo evolutivo foi realizado com o software jModeltest. A análise de inferência Bayesiana foi realizada por meio do software multi-plataforma de análise Bayesiana BEAST v.1.8.4, o algoritmo de Monte Carlo baseado na cadeia de Markov (MCMC) foi executado com 10.000.000 gerações, amostradas a cada 10.000 passos, e assim, 10 mil gerações de Bootstrap foram criadas no final do processo de carregamento de dados (Sindeaux-Neto, 2021).

Os dados das 10 mil gerações foram utilizados para testar o melhor modelo evolutivo, o programa jModeltest foi o responsável por descobrir o melhor modelo evolutivo e foi constatado como GTR+g. Com os resultados da análise de inferência bayesiana e melhor modelo evolutivo sendo o GTR+g, foram rodados os dados no programa Tracer, e assim como resultado gerou 10 mil árvores filogenéticas. Para encontrar um consenso entre as árvores filogenéticas utilizou-se o programa TreeAnnotator v1.8.4 e assim foi possível obter somente uma árvore de toda a análise feita, e para visualização desta árvore filogenética, o programa FigTree v.1.4.3 foi escolhido e para edição da mesma foi pelo programa CorelDraw.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *Macrothrix* sp. (Fig. 7) apresenta corpo circular, segundo par de antenas não desenvolvido com 3-4 cerdas centrais; primeiro par de antenas apresenta 4-5 segmentações com 3-4 cerdas centrais; 5-6 pares de apêndices torácicos; ocelo bastante protuberante; carapaça pequena com uma abertura na parte ventral; pós-abdômen desenvolvido usado para locomoção e fixação; pós-abdômen apresenta 3 cerdas na ponta; terceiro par de apêndices na região bucal apresenta 6 -7 cerdas subdesenvolvidas.

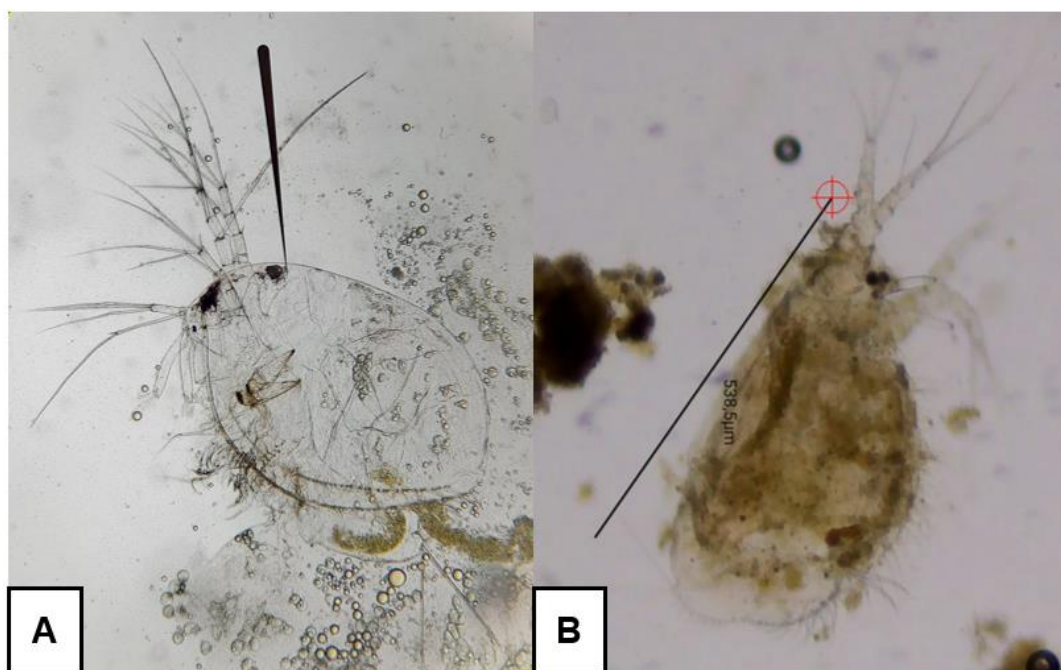


Figura 7 – Imagens de microscópio óptico em 40X do cladóceros em estudo, *Macrothrix* sp. (A) Visualização lateral. (B) Visualização lateral (escala = 53,8  $\mu$ m).

O *Diaphanosoma* sp. (Fig. 8) apresenta corpo alongado; cabeça circular; ocelo pequeno, segundo par de antenas bastante desenvolvidos com a presença de 2-3 cerdas centrais na ponta do apêndice; 5-6 pares apêndices torácicos; pós-abdômen desenvolvido com 2 cerdas grandes e pontudas para cada lado; carapaça desenvolvida e circular.



Figura 8 – Imagem de microscópio óptico em 40X do cladóceros em estudo, *Diaphanosoma* sp., visualização dorsal.

Ao longo do estudo foram obtidas duas sequências de cladóceros límnicos. No rio Tocantins em Imperatriz foi obtida amplificação de material genético a partir de indivíduos com características morfológicas relacionadas ao gênero *Diaphanosoma* (478 pares de base), enquanto nas amostras provenientes da bacia do rio Mosquito em Açailândia foi obtida a amplificação de material genético de espécimes com padrão morfológico similar ao gênero *Macrothrix* (527 pares de base).

A análise filogenética (Fig. 9) confirmou a proximidade do espécime amostrado no rio Mosquito com espécies do gênero *Macrothrix* que apresentaram um grande distanciamento genético de outras espécies deste gênero, depositadas no Body Systems. Os espécimes coletados que apresentavam semelhança morfológica no rio Tocantins estão filogeneticamente relacionados com representantes do gênero *Diaphanosoma*.

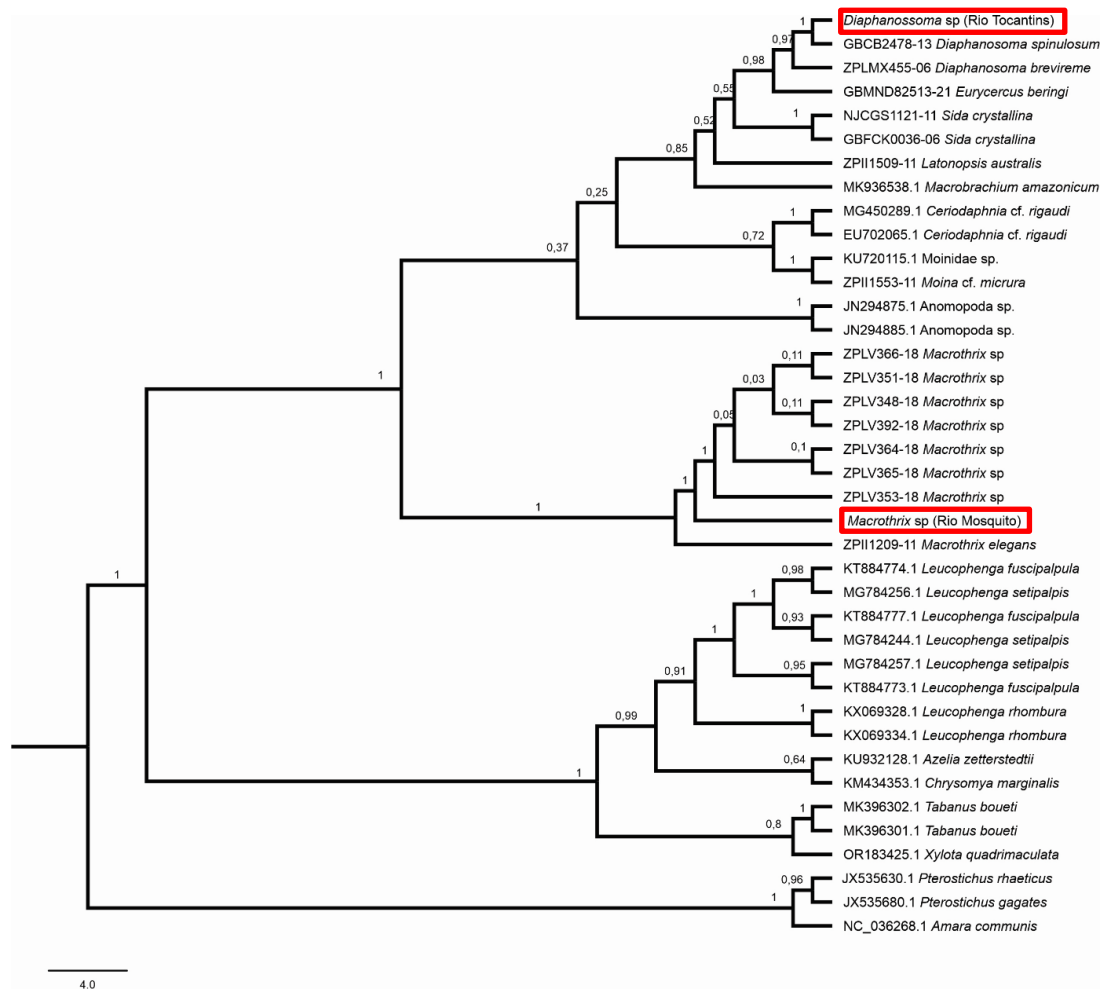


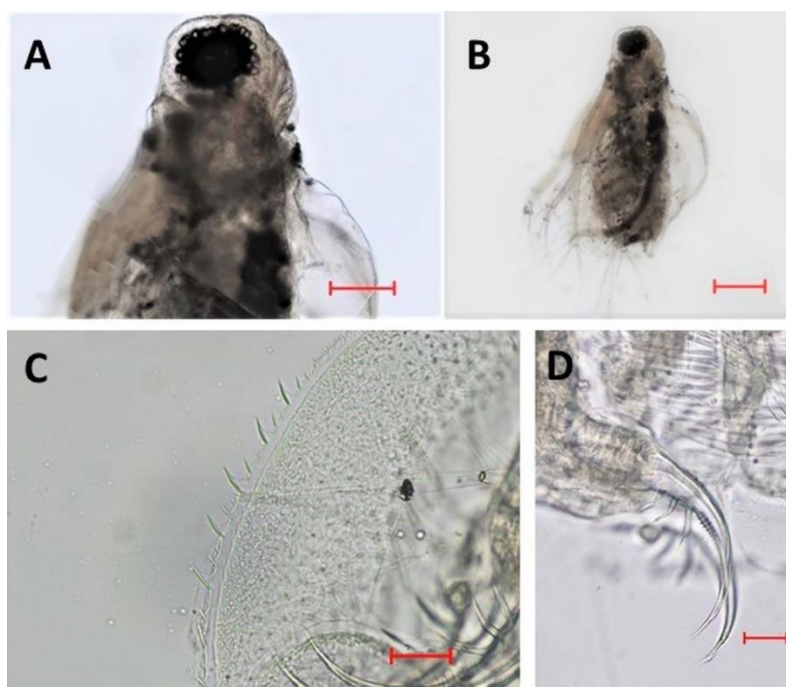
Figura 9 – Árvore filogenética de grupos relacionados na pesquisa através da análise de inferência Baysiana. Marcados em vermelho estão as espécies que estão sendo estudadas nesta pesquisa.

Grupos da árvore filogenética (Fig. 9) que apresentaram uma análise posterior de inferência bayesiana acima de 95% foram amostrados como gênero semelhante as espécies *Macrothrix* sp. (Rio Mosquito) (Fig. 7) e *Diaphanosoma* sp. (Rio Tocantins) (Fig. 8), determinado dado sugere que pesquisas de outros autores estão possivelmente trabalhando com a mesma espécie como no caso de *Macrothrix* sp. amostrados em série na árvore filogenética, já que não aprofundaram o estudo para a publicação de espécie, somente uma análise filogenética sem identificação a nível de espécie, somente marcando a ocorrência e gênero.

Porém no caso dos grupos estudados somente o *Diaphanosoma* sp. (Rio Tocantins) (Fig. 8) apresentou um alto parentesco com uma análise filogenética

publicada em que apresenta, além da publicação filogenética a identificação a nível de espécie, podendo ser uma espécie parente da espécie trabalhada neste estudo, sendo assim *Diaphanossoma spinulosum* (Fig. 10), sendo esta do mesmo gênero que o *Diaphanossoma* sp. (Fig. 8) estudada nesta pesquisa, confirmando a análise morfológica a nível de gênero para o gênero *Diaphanossoma*.

Figura 10 - Espécimes de *D. spinulosum* do Equador. (A) Cabeça e olho (escala=200  $\mu$ m); (B) Vista lateral (escala= 100  $\mu$ m); (C) Margem póstero-ventral das valvas (c= 20  $\mu$ m); (D) Garra pós-abdominal, vista lateral (escala= 20  $\mu$ m).



FONTE: (López, 2021).

A espécie *Diaphanossoma spinulosum* Herbst, 1975 (Crustacea, Branchiopoda, Sididae) é descrita morfológicamente como: (i) corpo alongado (0,80-1,1 mm), (ii) cabeça retangular fortemente desenvolvida dorsalmente e com olho grande, (iii) antenas nadadoras robustas, mas não atingindo a margem posterior das válvulas, (iv) cerdas de fórmula antenal 4-8/0-1-4, (v) margem ventral com ampla inflexão de retalho, (vi) margem posteroventral das valvas com 6-9 grandes espinhos curvos, entre cada par de espinhos maciços, há 1-4 espinhos curtos diminuindo de comprimento em direção ao ângulo posterodorsal das válvulas, (vii) 2-4 grupos de pequenos dentes anais marginais

em cada lado do pós-abdômen, (viii) espinho distal na garra terminal semelhante em comprimento ou ligeiramente mais longo que a maioria dos dentes proximais, (ix) pecten da garra terminal com dentículos bastante grandes ao longo do lado ventral que diminuem distalmente (López, 2021).

Considerada endêmica da região neotropical a espécie *D. spinulosum*, a sua descoberta em novas regiões amplia sua área de ocorrência e assim podendo detalhar sua capacidade de expansão geográfica da espécie (López, 2021). Apresentando uma baixa necessidade alimentar, tolerância a eventos de eutrofização e alta capacidade adaptativa a ambientes hostis, tal descrição favorece a sua utilização em tanques, redes e lagos de cultivo de peixes como base alimentar de alevinos, sendo assim, uma ótima opção a baixo custo para alimentação de peixes em estágios larvais (Walseng et al. 2001).

Em análises morfológicas detalhadas constatou-se uma baixa semelhança de caracteres com descrição morfológica da espécie já publicada, e levando em consideração a análise de interferência bayesiana realizada existe a possibilidade de *Diaphanosoma* sp. amostrada no rio Tocantins, se tratar de uma nova espécie para o gênero, intimamente relacionada a *D. spinulosum*. As principais diferenças morfológicas entre *D. spinulosum* e *Diaphanosoma* sp. do rio Tocantins estão relacionadas ao formato do cefalotórax e tamanho do ocelo. Diante do exposto, é necessário estudos genéticos, ambientais e morfológicos aprofundados para o registro de uma nova ocorrência de uma nova espécie, como a utilização do gene rRNA 18S para ter resultados filogenéticos mais precisos do que o utilizado nesta pesquisa.

Em relação a *Macrothrix* sp. (Rio Mosquito) (Fig. 7), apresentou em seus cladogramas certo parentesco dos grupos que foram utilizados para análise de inferência Baysiana, assim mostrou-se que realmente se trata de uma espécie do gênero *Macrothrix*, mas em relação a nível de espécie não foi evidenciado um parentesco filogenético alto suficiente com outro espécime do gênero *Macrothrix*, o que comprova que se trata de uma espécie (*Macrothrix* sp. (Rio Tocantins)) que não está no banco de dados de DNA Barcode COI utilizados nesta pesquisa. Diante disso e as múltiplas espécimes do gênero *Macrothrix* dos grupos na árvore filogenética (Fig. 9) comprova a probabilidade da descoberta de uma nova espécie do gênero *Macrothrix* na região oriental da Amazônia, necessitando de estudos específicos para sua confirmação científica.

O gênero *Macrothrix* Baird, 1843 (Crustacea, Branchiopoda, Macrothricidae) está entre os grupos de cladóceros menos estudados no meio científico, por tal fator, a escassez de novas espécies e a redefinição e reclassificação de espécies já publicadas é um evento comum neste grupo, acarretando baixa informação sobre distribuição geográfica e dados precisos sobre as espécies (Güntzel et al, 2004).

Segundo Donson & Frey, 1994, os *Macrothrix* são crustáceos diminutos, geralmente variando de 0,5 a 2 milímetros de comprimento, com carapaça transparente que cobre parte do corpo. As antenas de *Macrothrix* apresentam antênulas (antenas secundárias) bifurcadas e especializadas, que têm uma aparência de escova ou pente, sendo estas importantes características taxonômicas ajudam na identificação do gênero. A cabeça frequentemente se projeta para a frente, que pode ser vista quando o organismo está se alimentando ou em movimento. As antenas principais (ou antênulas) dos *Macrothrix* são notavelmente curtas em comparação com as de outros cladóceros, sendo, essas antenas principais curtas utilizadas para detectar partículas de alimentos e ajudar na locomoção. Assim como outros cladóceros, os *Macrothrix* possuem uma denticulação labial proeminente, que consiste em pequenas projeções dentadas em torno da boca. Essa estrutura auxilia na captura de partículas de alimentos, o abdômen dos *Macrothrix* é composto por segmentos articulados que permitem flexibilidade e movimento. Isso é uma característica comum entre os cladóceros. As fêmeas de *Macrothrix* produzem ovos que são mantidos em uma estrutura especial chamada ooteca, semelhante a uma bolsa. Esta ooteca protege os ovos e é uma característica típica de muitos cladóceros.

A descrição morfológica do gênero é semelhante aos espécimes amostrados no rio Mosquito o que com a análise da árvore filogenética (Fig. 9) confirma a identificação a nível de gênero. A divergência genética com demais espécies de *Macrothrix* analisadas, aponta a possibilidade de se tratar de uma possível espécie nova para o gênero, sendo necessária a realização de confirmação através de outros marcadores genéticos como o gene rRNA 18S.

## 6 CONCLUSÃO

A riqueza amazônica em espécies é um fator bastante conhecido no meio científico e não seria diferente para os estudados nesta pesquisa. Diante de tal fator, a descoberta de novas espécies e/ou a identificação de novas áreas de ocorrência de espécies já descritas representa um grande avanço para a porção oriental do bioma amazônico.

Descreve-se assim, o aumento da riqueza da região amazônica, sendo um importante banco de dados genéticos vivos para preservar e/ou conservar. Detalhando ainda mais a abordagem de técnicas moleculares como DNA Barcode como uma importante ferramenta na identificação de espécies, para assim quantificar a biodiversidade através de marcadores moleculares, presente na região amazônica. Desta forma, demonstra-se que *Diaphanosoma* sp. (Fig. 9) e *Macrothrix* (Fig. 8) apresentam a possibilidade de se tratar de espécies novas, abrindo múltiplas possibilidades para trabalhos mais aprofundados na taxonomia de espécies, por se tratar de uma área pouco estudada.

Com tal trabalho focado em análise filogenética ainda é preciso expandir sua análise mais detalhadamente para a análise morfológica com maiores detalhes fotográficos, morfológicos e ambientais para uma maior credibilidade na sua identificação no meio científico, como a utilização do gene rRNA 18S. Desta maneira, técnicas moleculares como DNA Barcode atreladas a identificação morfológica com auxílios de chaves dicotômicas pode fornecer insights valiosos sobre a biodiversidade em regiões pouco estudadas, contribuindo para a conservação e o desenvolvimento sustentável desses ecossistemas aquáticos completando um estudo aprofundado na taxonomia de novas espécies e/ou revisão de outras.

## REFERÊNCIAS

- GÜNTZEL, AM; MATSUMURA-TUNDISI, T.; ROCHA, O.. Macrothrix flabelligera, um Cladocera Macrothricidae recentemente registrado em águas doces brasileiras. *Revista Brasileira de Biologia* , v. 64, n. 2, pág. 221–226, maio de 2004.
- DODSON, S. I.; FREY, D. G. Cladocera and other branchiopod crustaceans. In: *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. Academic Press, 1991, p. 723-786.
- SINDEAUX-NETO, J. L. et al.. Myxobolus freitasi n. sp. (Myxozoa: Bivalvulida), a parasite of the brain of the electric knifefish in the Brazilian Amazon region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n. 1, p. e020920, 2021.
- WALSENG, B.; HALVORSEN, S.; Sloeid. Littoral microcrustaceans (Cladocera and Copepoda) as indices of recovery of a limed water system. *Hydrobiologia*, 450: 159-172, 2001.
- LÓPEZ, C. et al.. First record of Diaphanosoma spinulosum Herbst 1975 (Cladocera: Sididae) for inland water bodies of Ecuador. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 3, p. 835–837, jul. 2021.
- ARAGÃO, C; CONCEIÇÃO, L.E.C.; DINIS, M.T.; FYHN, H. Amino acid pools of rotifers and Artemia under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture*, v. 234, p. 429 - 445, 2004.
- BELYAEVA, M.; TAYLOR, D. J. Cryptic species within the Chydorus sphaericus species complex (Crustacea: Cladocera) revealed by molecular markers and sexual stage morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 50, n. 3, p. 534-546, Mar. 2009.
- BRITO, A.S.C.; CAMARGO, M.; MELO, N.F.A.C.; ESTUPIÑAN, R.A. A checklist for the zooplankton of the Middle Xingu ? an Amazon River system. *Brazilian Journal of Biology (Online)* , v. 75, p. 55-64, 2015.
- BRITO, A.S.C. Variação espaço-temporal do zooplâncton em diferentes ambientes do médio rio Xingu – PA. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), UFPA. 2008.
- COLE, J. J; CARPENTER, S. R.; KITCHELL, J.; PACE, M. L.; SOLOMOND, C. T.; WEIDLE, B. Strong evidence for terrestrial support of zooplankton in small lakes based on stable isotopes of carbon, nitrogen, and hydrogen. *PNAS*, v. 108, n. 5, p. 1975–1980, 2011.

- DEBASTIANI-JÚNIOR, J.R.; ELMOOR-LOUREIRO, L.M.A.; NOGUEIRA, M.G. Habitat architecture influencing microcrustaceans composition: a case study on freshwater Cladocera (Crustacea Branchiopoda). *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 76, no. 1, pp. 93-100. 2016.
- ELIAS-GUTIERREZ, M.; JERÓNIMO, F.M.; IVANOVA, N.V.; VALDEZ-MORENO, M.; HEBERT, P.D.N. DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa*, n. 1839, p. 1-42, Aug. 1 2008.
- ELMOOR-LOUREIRO, L.M.A. Manual de identificação de cladóceros límnicos do Brasil. Brasília, Universa. 156p. 1997.
- ELMOOR-LOUREIRO, L.M.A. Phytophilous cladocerans (Crustacea: Anomopoda and Ctenopoda) from Paranã River Valley, Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 24:344-352. 2007.
- ELMOOR-LOUREIRO, L.M.A. Cladóceros do Brasil: Famílias Chydoridae e Eurycercidae. Available at <<http://cladocera.wordpress.com/>>. Accessed on 8.06.2012. 2010.
- FOLMER, O.; BLACK, W. M.; HOEH, R. LUTZ, VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294–299. 1994.
- HALL, S.R.; BECKER, C.R.; DUFFY, M.A. Variation in resource acquisition and use among host clones creates key epidemiological trade-offs. *The American Naturalist* 176: 557- 565. 2010.
- HAYASHI-MARTINS, L.H.; MANSANO, A.S.; HISATUGO, K.F.; ROCHA, O.; SELEGHIM, M.H.R. Avaliação “in vitro” do potencial baterívoro de três espécies de Cladocera de ocorrência tropical e subtropical. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 77, no. 4, pp. 840-847. 2017.
- IVANOVA, N.V.; DEWAARD, J.R.; HEBERT, P.D. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6:998-1002. 2006.
- JÚNIOR, A.N.S.; MAGALHÃES, A.; PEREIRA, L.C.C.; COSTA, R.M. Zooplankton dynamics in a tropical Amazon estuary. *Journal of Coastal Research*, 65, 1230–1235. 2013.

- KIØRBOE, T. A mechanistic approach to plankton ecology. Princeton University Press, Princetonpp. 209. 2008.
- LELES, SG.; MOSER, GAO.; VALENTIN, JL.; FIGUEIREDO, G.M. A Lagrangian study of plankton trophodynamics over a diel cycle in a eutrophic estuary under upwelling influence. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1–12. 2017.
- LITCHMAN, E.; OHMAN, M.D.; KIORBOE, T. Traitbased approaches to zooplankton communities. *J. Plankton Res.* 35: 473–484. 2013.
- MARTINS, K.P.; DA SILVA BANDEIRA, M.G.; PALMA-SILVA, C.; ALBERTONI, E.F. Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) in coastal temporary environments in southern Brazil. *Zootaxa*. 2;4701(5). 2019.
- MATSUMURA-TUNDISI, T; TUNDISI, J.G. Checklist dos Copepoda Calanoida de água doce do Estado de São Paulo. *Biota Neotrop.* 11(1): 249-255. 2011.
- NADDY, R.B.; MCNERNEY, G.R.; GORSUCH, J.W.; BELL, R.A.; KRAMER, J.R.; WU, K.B.; PAQUIN, P.R.. The effect of food on the acute toxicity of silver nitrate to four freshwater test species and acute-to-chronic ratios. *Ecotoxicology*, v. 20, n. 8, p. 2019- 2029, Nov. 2011.
- PROSSER, S.; MARTINEZ-ARCE, A.; ELIAS-GUTIERREZ, M. A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular Ecology Resources* 13: 1151- 1155. 2013.
- ROCHA, O.; SANTOS-WISNIEWSKI, M. J.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Checklist de Cladocera de água doce do Estado de São Paulo. *Biota neotrop.*(Online, Ed. port.), v. 11, n. supl. 1, p. 571-592, 2011.
- ROSA, J.C.L.; BATISTA, L.L.; MONTEIRO-RIBAS, W.M. Tracking of spatial changes in the structure of the zooplankton community according to multiple abiotic factors along a hypersaline lagoon. *Nauplius*, vol. 28. 2020.
- ROSA, F.R. Atlas complementar dos microcrustáceos zooplanctônicos e límnicos do estado de Mato Grosso do Sul. Dissertação: Mestrado em Biologia Animal: UFMS, 2014.
- SANTOS, A.S.; SOUSA, F.D.R.; ELMOOR-LOUREIRO, L.M.A.; ANDRADE, D.S.;

- MUGNAI, R. Richness and composition of the Cladocera community (Crustacea: Branchiopoda) from the Maranhão State, Northeast Brazil. *Zootaxa*. 13;5081(3):420-432. 2021.
- SILVA, W.M.; PERBICHE-NEVES, G. Trends in freshwater microcrustaceans studies in Brazil between 1990 and 2014. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 77, no. 3, pp. 527-534. 2017.
- SILVA, W.M. Diversidade de Cyclopoida (Copepoda, Crustacea) de água doce do estado de São Paulo: Taxonomia, ecologia e genética. Tese de Doutorado: UFSCar, São Paulo, SP. 2003.
- SILVA, W.M. Potencial use of Cyclopoida (Crustacea, Copepoda) as trophic state indicators in tropical reservoirs. *Oec. Austr.* 15(3): 511-521. 2011.
- SILVA, W.M; MATSUMURA-TUNDISI, T. Checklist of fresh-water living Copepoda Cyclopoida from São Paulo State, Brazil. *Biot Neotro.* 11(1):1-11. 2011.
- SOARES, C.E.A.; ELMOOR-LOUREIRO, L.M.A. An updated checklist of Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) from Pernambuco State, Brazil. *Biota Neotropica*, v. 11, n. 2, p. 409-414, Apr-Jun. 2011.
- SOUSA, F.D.R.; ELMOOR-LOUREIRO, L.M.A. Cladóceros fitófilos (Crustacea, Branchiopoda) do Parque Nacional das Emas, estado de Goiás. *Biota Neotropica*, v. 8, n. 1, p. 159-166, 2008-03 2008.
- STOLLEWERK, A. The water flea *Daphnia*--a 'new' model system for ecology and evolution? *J Biol*, v. 9, n. 2, p. 21, 2010.
- VALENTIN, J.; GOUVÊA, G.; GOMES, C. Mesozooplâncton e massas d'água na Baía de Guanabara: dez anos de monitoramento. *Oecologia Australis*. 24. 349-364. 2020.
- VAN DAMME, K.; DUMMONT, H.J. Further division of *Alona* Baird, 1843: separation and position of *Coronatella* Dybowski & Grochowski and *Ovalona* gen. n. (Crustacea: Cladocera) *Zootaxa* 1960: 1-44. 2008.
- VAN DAMME, K.; KOTOV, A. A. & DUMMONT, H. J. A checklist of names in *Alona* Baird 1843 (Crustacea: Cladocera: Chydoridae) and their current status: an analysis of the taxonomy of a lump genus. *Zootaxa* 2330:1-63. 2010.

ELLWANGER, JH et al.. Além da perda de diversidade e das mudanças climáticas: Impactos do desmatamento da Amazônia nas doenças infecciosas e na saúde pública. Anais da Academia Brasileira de Ciências , v. 1, pág. e20191375, 2020.

HECKENBERGER, Michael J; CHRISTIAN, Russell J; TONEY, Joshua R; SCHMIDT, Morgan J. O legado de paisagens culturais na Amazônia brasileira: implicações para a biodiversidade. Philosophical Transactions of the Royal Society B, v. 362, p. 197-208, 2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Brasil em Síntese: Território. Disponível em: <https://brasilemsintese.ibge.gov.br/territorio.html>. Acesso em: 11 de outubro de 2023.

FERNESIDE, Philip M. Biodiversidade nas florestas amazônicas brasileiras: riscos, valores e conservação. Revista do STA Holos, órgão informativo do Centro de Estudos Ambientais da Universidade Estadual Paulista, p. 33-59, 1999.

SANTOS, LÁ DOS. et al.. Diversidade do zooplâncton no estado do Acre, Amazônia, Brasil: uma visão geral de estudos anteriores. Biota Neotropica , v. 1, pág. e20201132, 2022.

SOUZA, C. A. D.; VIEIRA, L. C. G.; LEGENDRE, P.; CARVALHO, P. D.; VELHO, L. F. M.; BEISNER, B. E. O represamento interage com o pulso de inundação para alterar as comunidades zooplanctônicas em um rio amazônico. Revista de Biologia de Água Doce, v. 64, n. 5, p. 1040-1053, 2019.

ESTEVES, Francisco de Assis. Fundamentos de Limnologia. – 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

OBERDORFF, T. et al. Unexpected fish diversity gradients in the Amazon Basin. Science Advances, v. 5, p. eaav8681, 2019.

JÉZÉQUEL, C. et al. Freshwater fish diversity hotspots for conservation priorities in the Amazon Basin. Conserv Biol., v. 34, n. 4, p. 956-965, ago. 2020. DOI: 10.1111/cobi.13466. PMID: 31990088.

CHIBA, Sanae et al. Zooplankton monitoring to contribute towards addressing global biodiversity conservation challenges. Journal of Plankton Research, v. 40, n. 5, p. 509-518, set.-out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/plankt/fby030>.

CUSHING, D. H. Plankton production and year-class strength in fish populations: an update of the match/mismatch hypothesis. In: BLAXTER, J. H. S.; SOUTHWARD, A.

J. (Eds.). *Advances in Marine Biology*. San Diego, CA: Academia Press Limited, 1990. p. 250-313.

Xiong, W.; Huang, X.; Chen, Y.; Fu, R.; Du, X.; Chen, X.; Zhan, A. Zooplankton biodiversity monitoring in polluted freshwater ecosystems: A technical review. *Environmental Science and Ecotechnology*, v. 1, 2020, p. 100008. ISSN 2666-4984.

DUDGEON, D. et al. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.*, v. 81, n. 2, 2006, p. 163–182.

BUTCART, Stuart H. M. et al. Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. *Science*, v. 328, p. 1164-1168, 2010. DOI: 10.1126/science.1187512.

GATTI, R. Cazzolla. Freshwater biodiversity: a review of local and global threats. *Int. J. Environ. Stud.*, v. 73, n. 6, p. 887-904, 2016.

XIONG, W. et al. Biological consequences of environmental pollution in running water ecosystems: a case study in zooplankton. *Environ. Pollut.*, v. 252, p. 1483–1490, 2019.

JOHNSON, C. L. et al. Biodiversity and ecosystem function in the Gulf of Maine: pattern and role of zooplankton and pelagic nekton. *PLoS One*, v. 6, n. 1, p. e16491, 2011.

Darwin, C. R. *The origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. 6. ed. London: John Murray, 1859.

LOUETTE, Gerald; MEESTER, Luc De. HIGH DISPERSAL CAPACITY OF CLADOCERAN ZOOPLANKTON IN NEWLY FOUNDED COMMUNITIES. *Ecology*, Ecological Society of America. v. 86, n. 2, p. 353-359, Fevereiro 2005.

NEVES, I. F. et al.. Zooplankton community structure of two marginal lakes of the River Cuiabá (Mato Grosso, Brazil) with analysis of Rotifera and Cladocera diversity. *Brazilian Journal of Biology*, v. 63, n. 2, p. 329–343, maio 2003.

HEBERT, P.D.N; CYWINSKA, A; BALL, SL; et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B*. v.270, p.313-322, 2003.

DeSalle, R.; Goldstein, P. Review and Interpretation of Trends in DNA Barcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 7, 2019. DOI: 10.3389/fevo.2019.00302. ISSN 2296-701X.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The barcode of life data system [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, n. 7, p. 355–364, 2007.

