



PROD. TEC. ITV DS - N003/2021  
DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2021.03.Martins

## RELATÓRIO TÉCNICO ITV DS

# MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE DA FLORA DE CANGA, SERRA DOS CARAJÁS, PARÁ, ATRAVÉS DE DNA METABARCODING

## RELATÓRIO PARCIAL OU FINAL DO PROJETO

Vitória Catarina Cardoso Martins  
Gisele Lopes Nunes  
Renato Renison Moreira Oliveira  
Raíssa Lorena Silva da Silva  
Ronnie Alves  
Santelmo Vasconcelos  
Guilherme Côrrea de Oliveira

Belém / PA

Fevereiro / 2021

<b>Título:</b> Monitoramento da biodiversidade da flora de Canga, Serra dos Carajás - Pará, através de DNA <i>Metabarcoding</i>	
<b>PROD. TEC. ITV DS / 003/2021</b>	<b>Revisão</b>
<b>Classificação:</b> ( ) Confidencial ( ) Restrita ( x ) Uso Interno ( ) Pública	<b>00</b>

**Informações Confidenciais** - Informações estratégicas para o Instituto e sua Mantenedora. Seu manuseio é restrito a usuários previamente autorizados pelo Gestor da Informação.

**Informações Restritas** - Informação cujo conhecimento, manuseio e controle de acesso devem estar limitados a um grupo restrito de empregados que necessitam utilizá-la para exercer suas atividades profissionais.

**Informações de Uso Interno** - São informações destinadas à utilização interna por empregados e prestadores de serviço

**Informações Públicas** - Informações que podem ser distribuídas ao público externo, o que, usualmente, é feito através dos canais corporativos apropriados

#### Citar como

MARTINS, Vitória Catarina Cardoso, *et al.* **Monitoramento da biodiversidade da flora de Canga, Serra dos Carajás, Pará, através do DNA *Metabarcoding***. Belém: ITV, 2021. (Relatório Técnico N003/2021). DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2021.03.Martins

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M386 Martins, Vitória Catarina Cardoso  
 Monitoramento da biodiversidade da flora de Canga, Serra dos Carajás - Pará, através de DNA *Metabarcoding* / Vitória Catarina Cardoso Martins ... [et al.]. - Belém: ITV, 2021.  
 93 p.: il.

Relatório Técnico (Instituto Tecnológico Vale) – 2021  
 PROD.TEC.ITV.DS – N032/2021  
 DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2021.03.Martins

1. Genômica - Plantas. 2. Genômica - DNA *Metabarcoding*. 3. Solos - Amazônia. 4. Carajás, Serra dos (PA). I. Nunes, Gisele Lopes. II. Oliveira, Renato Renison Moreira. III. Silva, Raíssa Lorena Silva. IV. Alves, Ronnie. V. Vasconcelos, Santelmo. VI. Oliveira, Guilherme Côrrea de. VII. Título.

CDD 23. ed. 622.752098115

## RESUMO EXECUTIVO

Os esforços de especialistas para a construção de um banco genético com códigos de barra de DNA para a identificação da Flora de Carajás geraram uma biblioteca de referência das espécies que ali ocorrem. Os dados estão disponíveis no banco de dados criado pelo ITV, o ITVBiobase e em repositórios públicos. Agora, outras tecnologias como a técnica de DNA *metabarcoding*, podem ser aplicadas. Neste sentido, a partir de traços de DNA no solo, é possível a identificação simultânea de múltiplas espécies de plantas com base no sequenciamento em massa de código de barras de DNA de uma amostra ambiental. Contudo, por se tratar de uma abordagem ainda nova, o DNA *metabarcoding* apresenta limitações metodológicas tanto no campo quanto no laboratório e exige esforços para estabelecer protocolos padronizados. Este estudo objetivou avaliar o método de DNA *metabarcoding* como uma ferramenta de monitoramento da flora da canga da Serra dos Carajás, no sudoeste do Pará, sendo estudadas três parcelas na região. Após a extração das amostras de DNA do solo, a região ITS2 foi amplificada e sequenciada na plataforma Illumina Miseq. As análises de dados foram feitas usando o *pipeline* PIMBA, que permite a personalização do banco de dados de referência para etapa de classificação taxonômica. Adicionalmente, análises estatísticas foram realizadas para estimar as abundâncias relativas, diversidades  $\alpha$  e  $\beta$ , e a existência de dependência espacial. As sequências geradas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais, sendo utilizado o banco de referências genéticas de plantas de Carajás para a determinação taxonômica. A diversidade de plantas detectada por eDNA incluiu 37 espécies de 33 gêneros e 19 famílias, identificando um número maior de espécies e gêneros que o método morfológico tradicional. Ainda, a análise baseada em DNA *metabarcoding* evidenciou 13 espécies comuns às listadas no inventário florístico das mesmas áreas de estudo, além de outras sete espécies que não haviam sido registradas pelo método tradicional. O fato do DNA *metabarcoding* ter permitido observar uma concordância com os dados do levantamento florístico aponta para uma robustez da abordagem molecular para ser utilizada em estudos de monitoramento da diversidade vegetal. Adicionalmente, com o desenvolvimento dos estudos de validação da metodologia tanto no campo quanto no laboratório foi criado um manual com o objetivo de facilitar a implementação da técnica de DNA *metabarcoding* em futuros levantamentos de espécies de plantas da canga.

## RESUMO

Os esforços de especialistas para a construção de um banco genético com códigos de barra de DNA para a identificação da Flora de Carajás geraram uma biblioteca de referência das espécies que ali ocorrem. Os dados estão disponíveis no banco de dados criado pelo ITV, o ITVBioBase e em repositórios públicos. Agora, outras tecnologias como a técnica de DNA *metabarcoding*, podem ser aplicadas. Neste sentido, a partir de traços de DNA no solo, é possível a identificação simultânea de múltiplas espécies de plantas com base no sequenciamento em massa de código de barras de DNA de uma amostra ambiental. Contudo, por se tratar de uma abordagem ainda nova, o DNA *metabarcoding* apresenta limitações metodológicas tanto no campo quanto no laboratório e exige esforços para estabelecer protocolos padronizados. Este estudo objetivou avaliar o método de DNA *metabarcoding* como uma ferramenta de monitoramento da flora da canga da Serra dos Carajás, no sudoeste do Pará, sendo estudadas três parcelas na região. Após a extração das amostras de DNA do solo, a região ITS2 foi amplificada e sequenciada na plataforma Illumina MiSeq. As análises de dados foram feitas usando o *pipeline* PIMBA, que permite a personalização do banco de dados de referência para etapa de classificação taxonômica. Adicionalmente, análises estatísticas foram realizadas para estimar as abundâncias relativas, diversidades  $\alpha$  e  $\beta$ , e a existência de dependência espacial. As sequências geradas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais, sendo utilizado o banco de referências genéticas de plantas de Carajás para a determinação taxonômica. A diversidade de plantas detectada por eDNA incluiu 37 espécies de 33 gêneros e 19 famílias, identificando um número maior de espécies e gêneros que o método morfológico tradicional. Ainda, a análise baseada em DNA *metabarcoding* evidenciou 13 espécies comuns às listadas no inventário florístico das mesmas áreas de estudo, além de outras sete espécies que não haviam sido registradas pelo método tradicional. O fato do DNA *metabarcoding* ter permitido observar uma concordância com os dados do levantamento florístico aponta para uma robustez da abordagem molecular para ser utilizada em estudos de monitoramento da diversidade vegetal. Adicionalmente, com o desenvolvimento dos estudos de validação da metodologia tanto no campo quanto no laboratório foi criado um manual com o objetivo de facilitar a implementação da técnica de DNA *metabarcoding* em futuros levantamentos de espécies de plantas da canga.

**Palavras-chave:** Amazônia. Carajás. DNA *metabarcoding*. Plantas. Solo.

## ABSTRACT

Efforts to build a referenced DNA barcode genetic database to identify the flora of Carajás made it possible to obtain “fingerprints” of the species that occur there. From the reference database created by ITV, ITVBiobase, other approaches such as DNA *metabarcoding* can be applied to monitor species and environments. The DNA *metabarcoding* approach can simultaneously identify multiple plant species present in environmental samples through DNA traces in the soil matrix based on DNA barcodes mass sequencing from an environmental sample. However, as a new approach, DNA *metabarcoding* has methodological limitations both in the field and in the laboratory and requires efforts to establish standardized protocols based on environmental samples. The goal of this study was to evaluate the DNA *metabarcoding* method as a tool for monitoring the flora of Canga da Serra dos Carajás, in southwestern Pará, in three different plots. After extracting the DNA samples from the soil, the ITS2 region was amplified and sequenced on the Illumina Miseq platform. Data analysis was performed using the PIMBA pipeline, which allows for the customization of the reference database for the taxonomic classification stage. Statistical analyses estimated relative abundances,  $\alpha$  and  $\beta$  diversity, and the existence of spatial dependence. Sequences were grouped into operational taxonomic units (OTUs) using the Carajás plant genetic reference bank for taxonomic determination. The detected plant diversity by using eDNA included 37 species from 33 genera and 19 families, identifying a greater number of species and genera than the traditional morphological method. Furthermore, the analysis based on DNA *metabarcoding* showed 13 species common to those listed in the floristic inventory of the same study areas and seven other species that had not been registered by the traditional morphological method. The DNA *metabarcoding* results obtained agreed with the traditional morphological method. These results point out to the viability of using the molecular approach to determine and monitor plant diversity. As a result of validation studies of the methodology both in the field and in the laboratory, a manual was created with the aim of facilitating the implementation of the DNA *metabarcoding* approach in future routine environmental studies.

**Keywords:** Amazon. Carajás. DNA *metabarcoding*. Plants. Soil.