



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Curso: Licenciatura em Biologia Marinha, Aquática e Costeira

Trabalho de Culminação de Estudos

Variante: Monografia

Tema: Uso da técnica do ADN ambiental (*eDNA*) como uma ferramenta promissora na deteção e no monitoramento de espécies exóticas invasoras e nativas no ambiente marinho.



Autora:

Lukoji, Victória Clotilde



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Curso: Licenciatura em Biologia Marinha, Aquática e Costeira

Trabalho de Culminação de Estudos

Variante: Monografia

**Tema: Uso da técnica do ADN ambiental (*eDNA*) como uma ferramenta promissora na
detenção e no monitoramento de espécies exóticas invasoras e nativas no ambiente
marinho.**

Autora:

Lukoji, Victória Clotilde

Supervisora:

Prof^a. Doutora. Daniela C. de Abreu

Co-Supervisoras:

Doutora Elisa Taviani

Mestre Erica Tovela

Maputo, Setembro 2024

Agradecimento

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo seu infinito e ousado amor, e por me ter abençoado e iluminado durante esta jornada, e por ter estado ao meu lado de modo a alcançar todas minhas metas e objectivos, sem Ele nada disso seria possível.

À minha família por todo apoio incondicional, preocupação, pelo amor e carinho.

Aos meus queridos pais por amarem-me tanto e por sempre apoiarem-me incondicionalmente. Aos meus irmãos por apoiarem, investirem e acreditarem na minha formação. Aos meus amados sobrinhos (Junior, Mateus, Lucas, Miguel, Lebo e Melody) por todo carinho e prestação. Amo-vos a todos.

À Doutora Daniela C. de Abreu pelo apoio, e pelos ensinamentos construtivos que levarei para a vida toda, sua visão crítica e construtiva durante todas as fases da elaboração do trabalho que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Agradeço imenso pelas críticas construtivas e valiosas dicas na elaboração deste trabalho. Agradecer de igual forma as Doutoradas Erica Tovela e Elisa Taviani.

À Florentina, Miria, Rhulany, Izilda, Jennifer e Mônica pela amizade e pelos melhores momentos juntas eu agradeço, pela ajuda directa ou indirecta, pela paciência, pelos conselhos, pelos momentos descontraídos.

Sou de igual forma especialmente grata pela eficiente e crucial ajuda nos meus primeiros e delicados momentos de formação e, até ao fim da minha formação pelo apoio, ensinamentos, conselhos, pela paciência, pelos recursos valiosos por si dispensados, e pelo curso de informática grátis, esta vai para si meu querido Jorge Ranito.

Agradeço aos colegas do curso, pela oportunidade de poder conviver com pessoas com histórias de vida tão distintas e motivadoras. Foram muito importantes para mim, e a todos que directa ou indirectamente contribuíram no percurso da minha formação, o meu muito obrigado.

Declaração de Honra

Eu Victoria Clotilde Lukoji, declaro por minha honra que o presente trabalho foi elaborado por mim, o seu conteúdo é original e fi-lo com recurso a metodologia apresentada ao longo do mesmo, respeitando as orientações da minha supervisora e do regulamento de culminação de estudos do Departamento de Ciências Biológicas. Declaro que este trabalho não foi apresentado em nenhum momento para a obtenção de qualquer grau académico ou outros fins.

Maputo, Setembro de 2024

Victoria Clotilde Lukoji

(Victoria Clotilde Lukoji)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais como uma forma de agradecimento por tudo que eles fizeram por mim até chegar aqui, tenho doces memórias de desde a infância como eles sempre apoiaram e priorizaram a minha formação, faço isso como uma forma de honrá-los.

Resumo

Face ao cenário actual, em que a biodiversidade vê-se ameaçada por distúrbios como a ocorrência de espécies exóticas invasoras, ameaçando a ocorrência das espécies nativas, por vários factores como a sobreposição de nichos, ocasionado a competição com as espécies nativas, o que pode culminar com a redução ou extinção das espécies nativas, e contribuir para o desequilíbrio dos ecossistemas marinhos. A detecção pode ser desafiadora no ambiente marinho, por este não possuir barreiras o que torna desafiadora a detenção e monitoria de espécies exóticas e nativas e, por vezes, os métodos tradicionais podem ser limitados e demorados. Recentemente foi desenvolvida a técnica do ADN ambiental (eDNA), com o desenvolvimento da técnica de *PCR* quantitativa (*qPCR*) e dos sequenciadores de nova geração. A técnica consiste na identificação do organismo sem que seja necessária a presença do organismo, no ambiente em que estão inseridos deixam “pegadas” que são as suas excreções. Esta técnica já foi introduzida em alguns países da América, Ásia, Europa, e em alguns países da África. Tem sido aplicada na detecção de espécies invasoras, identificação de microrganismos do solo, ou da comunidade de organismos em córregos, represas e ambientes marinhos fazendo o uso de amostras de água. Os resultados são obtidos de maneira rápida, automatizada, em grandes áreas e a riqueza de espécies identificadas é maior do que aquela obtida quando se usa outro tipo de método. Amostragens em intervalos regulares de tempo permitem também que seja realizado o monitoramento do ambiente, detectando mudanças como o surgimento ou desaparecimento de espécies ao longo do tempo. Deste modo, o presente trabalho visa contribuir para o conhecimento desta promissora técnica, tendo em conta o cenário actual vivido na Baía de Maputo, que refere-se a ocorrência de espécies exóticas de camarão, esta técnica promissora poderá auxiliar na detenção, e no monitoramento destas espécies, que estejam possivelmente a competir com as espécies de camarão nativas de alto valor ecológico e económico, No entanto são necessárias intervenções para minimizar os possíveis impactos da ocorrência destas espécies acções tais como: (investigações, dados de base, plano de monitoramento, plano de gestão e manejo das espécies exóticas e nativas) para o principal objectivo que é a conservação e protecção das espécies nativas de uma possível extinção a longo prazo, pois este cenário poderá ser o início de vários outros distúrbios no ecossistema marinho, pois neste ambiente os efeitos são em forma de cascata.

Palavras-Chave: Ambiente marinho, espécies exóticas e invasoras, eDNA, detenção, monitoramento.

Lista de Abreviaturas

ADN- Ácido desoxirribonucleico

GC- Conteúdo de guanina-citosina

eDNA- Ácido desoxirribonucleico ambiental

SSR-Repetições de Sequências Simples

P-DNA- Ácido desoxirribonucleico particulado

mtDNA- ADN mitocondrial

D-DNA- Ácido desoxirribonucleico dissolvido

cpDNA- ADN do cloroplasto

PCR- Reação em cadeia de polimerase

qPCR- Reação em cadeia de polimerase em tempo real

AIS- Espécies aquáticas invasoras

UV- Raios ultra violeta

UVB- Raios ultra violeta B

BOLT- Códigos de barra de vida

UT- Unidade taxonômica operacional

NCBI- Centro Nacional de Informação Biotecnológica

CBD- Convenção sobre Diversidade Biológica

RAPD- DNA de Poliformismo Amplificado Aleatório

ISSR- Entre Repetições de Sequências Simples

AFLP- Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado

Lista de figuras

Figura 1: Esquema da vantagem de detenção se espécies usando o eDNA em comparação com métodos tradicionais.

Figura 2: Ilustração da estratégia de amostragem e suas **eficiências quando a espécie-alvo é rara ou tem mobilidade limitada.**

Figura 3: Mapa de África que fornece uma visão geral do número de artigos sobre pesquisas de ADN ambiental.

Figura 4: Mapa da área de estudos da proposta de trabalho.

Lista de tabelas

Tabela 1: Cronograma de actividades da proposta de trabalho.

Tabela 2: Orçamento dos itens necessários para a materialização do estudo.

Índice

Agradecimento.....	i
Declaração de Honra.....	ii
Dedicatória.....	iii
Resumo	iv
Lista de Abreviaturas	v
1. Introdução.....	1
2. Objectivos.....	6
2.1. Objectivo geral..	6
2.2. Objectivos específicos	6
3. Metodologia.....	7
4. Caracterização do ADN ambiental (eDNA).....	8
4.1. O que é o ADN ambiental (eDNA).....	8
4.2. História do ADN ambiental.....	9
5. Bases técnicas para a utilização do ADN ambiental.....	24
5.1. Controle de qualidade e requisitos básicos de laboratório.....	24
6. Importância do conhecimento ecológico.....	34
6.1. Probabilidade de detecção com o método eDNA.....	35
7. Uso do eDNA na detecção e monitoria de espécies exóticas invasoras.....	37
7.1. Alerta precoce com o método de eDNA.....	39
8. Estágio de implementação da técnica do eDNA regional e localmente.....	42
9. Conclusão	45
10. Referências bibliográficas.....	46
11. Anexos.....	52

1. Introdução

O planeta Terra vive hoje uma das maiores crises da perda da biodiversidade, especialmente nos países tropicais detentores de alta diversidade (Wilson, 1997). As invasões biológicas são consideradas uma das maiores causas da perda de biodiversidade e, nas últimas décadas as bioinvasões marinhas tem crescido a um ritmo exponencial, principalmente no que diz respeito a aspectos ecológicos das invasões biológicas (Rilov e Crooks, 2008).

Após 20 anos da popularização do termo “Antropoceno” por Gordon Orians, o termo tornou-se evocativo de uma redistribuição global de espécies sem precedentes. Agora a maioria das paisagens no mundo são dominadas por espécies exóticas, devido a sua rápida propagação, tanto à propagação de espécies “benéficas” e à propagação inadvertida de espécies “pragas” pelo Homem (Rosenzweig, 2001).

No ano de 1996, Peter Vitousek considerou que tanto os ecologistas e biólogos conservacionistas que trabalham para controlar as invasões de pragas não estavam a levar o problema suficientemente a sério e apelou a um reconhecimento mais amplo das consequências globais das invasões para a perda da biodiversidade (Wilcove, 1998).

Desde então, tem havido um aumento significativo na ênfase dada às espécies invasoras como uma das principais causas do declínio das espécies, e a invasão biológica é agora considerada uma das “grandes” questões ambientais de interesse público (Wilcove, 1998).

Muitas espécies exóticas são introduzidas de forma intencional ou accidental no ambiente marinho, o que implica importantes mudanças na estrutura e no funcionamento dos ecossistemas. Esforços devem ser empreendidos para a implementação de mecanismos de prevenção de novas introduções, controle e gestão dos organismos introduzidos (Halle *et al.*, 2023).

Espécies exóticas são organismos ou materiais biológicos (sementes, ovos, esporos, etc) que tenham entrado acidentalmente ou tenham sido introduzidos em um ambiente onde antes não existiam (Barbieri e Melo, 2006; Azevedo *et al.*, 2010).

A introdução de espécies exóticas com potencial de se tornar invasor é descrita como uma das principais causas para o declínio e perda da biodiversidade, e nos casos mais graves pode levar à extinção das espécies nativas (Rodriguez *et al.*, 2005; Ates *et al.*, 2013).

O seu estabelecimento num determinado ambiente pode afectar negativamente a ecologia e a biologia de diversos organismos nos ecossistemas em causa, podendo ocorrer extirpação, predação e exclusão pela competitividade com as espécies nativas (Wilcove, 1998).

Estas espécies impactam de forma significativa, sendo consideradas a segunda maior ameaça aos ecossistemas, após a destruição dos habitats, afectando directamente as comunidades biológicas, a economia e a saúde humana (Wilcove, 1998).

A frequente invasão de espécies exóticas em ambiente aquático está em grande parte associada às actividades humanas como a introdução accidental através de água de lastro de navios principalmente com rotas internacionais, incrustação em cascos de embarcações que atracam nos portos, fuga de espécies provenientes da aquacultura mal planeada ou caso de despejo de efluentes (introdução voluntária), pesca desportiva ou para fins ornamentais e através das correntes marinhas (Barbieri e Melo, 2006; Azevedo *et al.*, 2010; Leão *et al.*, 2011).

O conhecimento ecológico preciso da distribuição das espécies é um ponto chave para estratégias de conservação, especialmente quando as espécies focais são invasoras, ameaçadas ou em perigo (Wilcove, 1998). Este conhecimento é de importância pois permite que se possa implementar medidas de contingência apropriadas (Wilcove, 1998).

A detecção de espécies em ambiente marinho, não tem sido fácil devido aos ciclos de vida complexos que os organismos apresentam. Nestes ambientes as detenções são geralmente conduzidas usando os métodos tradicionais como (métodos acústicos, captura manual, visualização e armadilhas etc) (Thomsen *et al.*, 2012a).

No entanto, os métodos de detecção tradicionais podem ter limitações logísticas, ser demorado, dispendiosos, e em alguns casos, invasivos ao meio ambiente (por exemplo, as redes de arrasto) (Thomsen *et al.*, 2012b).

O surgimento de novas técnicas moleculares fornecem ferramentas inovadoras para detecção de organismos marinhos e aquáticos que podem contornar as limitações supracitadas (Taberlet, 2012).

Uma das técnicas práticas e de baixo esforço amostral para confirmar a presença de espécies exóticas no ambiente é a de ADN ambiental e é uma forma poderosa de avaliar comunidades

inteiras e a biodiversidade (NISC, 2022). O eDNA pode ser definido como pequenos fragmentos de ADN que um organismo liberta em componentes não vivos do ecossistema (seja, água, ar ou sedimentos) (Herder *et al.*, 2013).

O ADN ambiental (eDNA) demonstra o seu potencial para identificar espécies invasoras, mesmo quando estas encontram-se em baixas densidades, independentemente do seu estágio de vida e nos casos mais críticos em que um ou mais caracteres do indivíduo são removidos e fica difícil o seu reconhecimento em qualquer fase da vida e ao longo do ano (Thomsen *et al.*, 2012a).

A identificação precisa de espécies é uma actividade de extrema importância que pode ser usada para uma gestão sustentável dos recursos, para o monitoramento de populações, sobretudo as de valor económico (Ward, 2000; Beerkircher *et al.*, 2009).

O eDNA representa um método rápido e não invasivo, com avançadas tecnologias de sequenciamento e processamento bioinformático, com ampla aplicabilidade taxonómica. Este demonstra ser uma ferramenta promissora para estudos de biodiversidade, permitindo grandes progressos em comparação ou em combinação com métodos de amostragem tradicionais (Herder *et al.*, 2013).

Dependendo da metodologia utilizada, os estudos de eDNA concentram os seus esforços em espécies únicas, grupos de espécies ou comunidades inteiras. O método mais acessível e económico usado para atingir espécies únicas é a análise quantitativa da reação em cadeia de polimerase em tempo real (*qPCR*) (Ficetola *et al.*, 2008).

Ao longo da última década, o uso de tecnologias de eDNA na conservação e gestão de populações animais evoluiu de uma novidade para uma ferramenta valiosa e promissora para pesquisadores e gestores de recursos (Rees, 2014).

A tecnologia de eDNA pode ser mais eficiente permitindo gastar menos tempo e recursos financeiros, e pode ultrapassar os desafios associados à captura de espécies raras ou espécies ameaçadas. E em alguns casos o eDNA pode substancialmente gerar mais informação sobre as espécies em menos tempo em relação aos métodos tradicionais (Taberlet *et al.*, 2012b; Yoccoz, 2012).

Em Moçambique algumas legislações apoiam o combate à espécies exóticas ,através do Decreto n.º 45/2006 De 30 de Novembro e, através da criação de leis tal como: a Lei n.º 5/2017, de 11 de Maio (estratégia e plano de acção para a conservação da diversidade biológica de moçambique, 2003).

Moçambique é um país que localiza-se na costa leste da África Austral e com cerca de 2.700 km de linha costeira, rica em diversidade de recursos marinhos (FAO, 2007) e são escassos os estudos sobre as espécies exóticas no ambiente marinho no território nacional, principalmente relacionados com a sua monitoria usando eDNA.

Poderá a técnica do ADN ambiental auxiliar de forma significativa as investigações no ambiente marinho, face às limitações dos métodos tradicionais actualmente utilizados, que de alguma forma limitam a obtenção de dados de base para a concepção de planos de manejo e de conservação mais precisos, para espécies nativas e especialmente para as espécies exóticas invasoras no ambiente marinho.

Deste modo o objectivo deste trabalho é demonstrar a aplicabilidade da técnica do ADN ambiental como uma ferramenta promissora na detenção e no monitoramento de espécies exóticas e nativas no ambiente marinho, a fim de colher informação que será útil para as autoridades de manejo, de modo a desenvolver estratégias para o monitoramento das espécies exóticas, bem como obter informação para desenhar um plano de gestão para as espécies nativas, a fim de evitar danos futuros, como a perda de espécies de elevada importância tanto ecológica e económica para o país.

Portanto, o estudo de espécies exóticas é de extrema importância, devido às características ameaçadoras por si apresentadas, conhecer a biologia destas espécies exóticas, a sua distribuição e compreender como estes organismos comportam-se no ecossistema em que estão inseridos, pode auxiliar significativamente na compreensão de seus impactos, e na tomada de decisões que ajudem a poupar o ecossistema dos impactos negativos por si causados, sendo a invasão de espécies a segunda maior ameaça para a perda da biodiversidade (Bezeng e Van der Bank, 2019).

2. Objectivos

2.1. Objectivo geral

- Contribuir para o conhecimento da técnica do ADN ambiental (eDNA) como uma ferramenta promissora na deteção e no monitoramento de espécies exóticas invasoras e nativas no ambiente marinho.

2.2. Objectivos específicos

- Caracterizar a técnica do ADN ambiental;
- Identificar as Vantagens e Desvantagens da técnica do ADN ambiental;
- Descrever o uso da técnica do ADN ambiental na deteção e no monitoramento de espécies exóticas e invasoras;
- Descrever o estágio de implementação da técnica do ADN ambiental internacional e localmente.

3. Metodologia

O presente trabalho foi concebido com base em pesquisas e levantamento bibliográfico, tendo acesso através de sites credíveis a artigos científicos, livros e outros tipos de publicações que estejam diretamente ligados ao tema em alusão, e que abordem total ou parcialmente o ADN ambiental e espécies exóticas ou aspectos directamente ou indirectamente relacionados ao tema. A procura bibliográfica foi feita obedecendo as palavras-chaves em Português e Inglês: ADN ambiental no ambiente marinho, ADN ambiental na detenção de espécies exóticas, eDNA AND Marine environment AND Maputo bay, Environmental DNA AND Exotic species.

3.1. Recolha de dados

Para a presente pesquisa foram usados documentos tais como: Livros, artigos científicos, dissertações, teses de pós-graduação, relatórios científicos e vídeos, os quais foram obtidos em diferentes bases de dados online: Google Académico, ResearchGate, DW, Scielo, Wiley Online Library, NOAA Ocean Exploration, The Oceanography Society, Elsevier, Oxford Academic, Frontiers in Marine Science.

Dentro dos termos de pesquisa, as principais palavras-chave foram: ADN ambiental no ambiente marinho, ADN ambiental na detenção de espécies exóticas, eDNA AND Marine environment AND Maputo bay, Environmental DNA AND Exotic species, eDNA AND Marine Science.

3.2. Selecção de dados

Depois da recolha dos dados, seguiu-se a fase de pré-selecção, onde os estudos encontrados foram analisados conforme as palavras chave: ADN ambiental, Espécies exóticas, Ecologia Marinha, Monitoramento, Detenção de espécies. Tendo sido compilados os resultados que correspondiam aos termos sobre a aplicação da técnica do eDNA no ambiente marinho, para a detecção e monitoramento de espécies invasoras e nativas.

3.2.1. Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão incluíam:

- Estudos que foram publicados em periódicos científicos revisados por pares;
- Não foi estabelecido um intervalo de tempo para a inclusão dos artigos selecionados, devido a uma ligeira escassez de publicações directamente relacionadas ao tema;
- Estudos que discutem o uso do ADN ambiental;
- Estudos que demonstram a aplicabilidade da técnica na detenção de espécies-alvo;
- Estudos que serviram de base de dados para aplicação de planos de manejo, a partir do eDNA;
- Estudos que relacionam o uso do eDNA e espécies exóticas;
- Estudos que descrevem como usar as ferramentas de eDNA ;
- Estudos que abordam parcial ou totalmente o tema em alusão.

3.3.3. Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão excluíam:

- Informações não relevantes e de fontes não credíveis;
- Que não abordam de forma clara o eDNA;
- Que não possuem relações directas com o tema.

3.4. Estudos selecionados

Após a selecção dos estudos elegíveis para o presente estudo, fez-se um levantamento para cada estudo científico identificado, das seguintes informações: Aplicação do ADN ambiental no ambiente marinho, Uso do ADN ambiental na detenção e monitoramento de espécies, Relação do eDNA com os métodos tradicionais.

3.5. Resultados3.5.1. Estudos identificados

Foram identificados 79 estudos científicos no total. Todos foram identificados por meio de pesquisa em diferentes bases de dados como: Google Acadêmico, ResearchGate, DW, Scielo, Wiley Online Library, NOAA Ocean Exploration, The Oceanography Society, Elsevier, Oxford Academic, Frontiers in Marine Science. Foram excluídos 18 estudos devido a falta de correlação específica com o tema em em alusão.

4. Capítulo 1: Caracterização da técnica do ADN ambiental (eDNA)

4.1. O que é o ADN ambiental (eDNA).

ADN ambiental (eDNA) ou Ácido desoxirribonucleico ambiental é o termo empregue para a definição do ácido desoxirribonucleico (ADN) que pode ser detectado em uma amostra colhida no ambiente (água, solo e ar ect.), sem contudo necessária a presença física do organismo (tecido, sangue etc..) (Ficetola *et al.*, 2008).

Durante o ciclo de vida dos animais, estes passam por renovações celulares em todos os sistemas, com a senescência das células que por sua vez são eliminadas durante os processos fisiológicos como: urina, fezes, descamação epidérmica, etc. Estas células mortas são eliminadas e, são libertadas no ambiente, e podem fornecer informações sobre os organismos que lá ocorrem (Ficetola *et al.*, 2008; Rees, 2014).

O ácido desoxirribonucleico (ADN), armazena informação genética de todos organismos vivos, está presente em alguns vírus, no interior das células de todos os organismos vivos (ADN intracelular) e também pode estar presente fora das células, onde não está protegido por uma membrana plasmática (ADN extracelular). Deste modo, quando o ADN desses tecidos é libertado no ambiente é denominado como ADN ambiental ou simplesmente (eDNA) (Levy-Booth *et al.*, 2007; Taberlet *et al.*, 2012).

Quando ocorre a libertação do ADN extracelular no ambiente, este pode ter três destinos: 1- Pode ser incorporado a um genoma microbiano como uma fonte de informação por recombinação; 2- pode ser degradado por agentes microbianos e finalmente serem usadas como nutrientes para as plantas ou para o crescimento microbiano; 3- Ou este ADN extracelular pode persistir no ambiente (Ficetola *et al.*, 2008).

As amostras de eDNA podem fornecer dados derivados das análises moleculares para apoiar pesquisas nas áreas de paleontologia, ecologia e biologia de conservação (Thomsen *et al.*, 2015). Estas análises moleculares permitem a detecção de espécies de vida livre, terrestres, aquáticas e marinhas (Rees, 2014; Jerde *et al.*, 2011) com potenciais aplicações em programas de conservação detecção e monitoramento de espécies criticamente ameaçadas, espécies invasoras, e a quantificação de organismos principalmente quando métodos tradicionais de colecta são inadequados (Darling, 2011; Jerde, 2011; Takahara *et al.*, 2012).

4.2. História do ADN ambiental

A técnica do eDNA é comumente percebida como um “método moderno”, no entanto esta técnica é utilizada desde os meados da década de 80, onde esta técnica foi empregue para a detecção de comunidades bacterianas em sedimentos marinhos (Ogram, Sayler, e Barkay, 1987). E na década de 1990, a técnica de eDNA foi mais uma vez empregue para monitorar a proliferação de fitoplâncton e avaliar mudanças na biomassa de comunidades bacterianas (Bailiff e Karl 1991; Paul *et al.*, 1996).

Neste período, o tamanho das partículas é que determinava a classificação do (eDNA). Deste modo, o (eDNA) encontrado em agregados maiores que 0,2 µm associados às células foi denominado ADN particulado ou (P-DNA), enquanto que o eDNA menor que esse tamanho foi considerado ADN dissolvido ou (D-DNA) (Paulo *et al.*, 1996). O uso da técnica do ADN ambiental tem como objectivo detectar a presença de espécies no ambiente através de amostras coletadas no ambiente como a água, neve, solo ou sedimentos (Paul *et al.*, 1996).

A primeira publicação relacionada à aplicação do eDNA como ferramenta de detecção de organismos ameaçados foi em 2011 por Goldberg, Pilliod, Arkle, e Waits, 2011. Neste estudo, os pesquisadores exploraram o efeito sazonal na detecção de eDNA de anfíbios. No mesmo ano, foi publicado o primeiro estudo sobre a persistência de eDNA de espécies de anfíbios que habitam nos ecossistemas de água doce por (Dejean *et al.*, 2011).

No ambiente marinho as primeiras pesquisas foram conduzidas por Foote *et al.*, (2012a) onde estes usaram a técnica do eDNA na detecção e no monitoramento genético de mamíferos marinhos, e Thomsen *et al.*, (2012b) usou o eDNA para estimar a biodiversidade de peixes marinhos.

As primeiras revisões do eDNA também ocorreram em 2012 (Taberlet *et al.*, 2012a; Yoccoz, 2012). Artigos relacionados a metodologias que tentam fazer aproximações entre biomassa de peixes, abundância e probabilidade de detecção de eDNA foram de igual modo publicados durante o mesmo período por Dejean (2011) (Takahara *et al.*, 2018). A ecologia molecular permitiu-nos revelar com mais detalhes processos anteriormente pouco conhecidos, facilitando o monitoramento da diversidade genética, função do ecossistema, conectividade entre habitats, oscilações no fluxo de energia e saúde do ecossistema (Volckaert *et al.*, 2008).

Nos últimos 25 anos o desenvolvimento de técnicas moleculares tem sido bem recebido tanto entre biólogos e ecologistas marinhos, pois estas técnicas moleculares tem permitido grandes avanços nas áreas de biologia, ecologia marinha e pescas, que por muito tempo permaneceram no mesmo lugar (estáticas), por exemplo o conceito de stock pesqueiro nas pescarias, interações entre organismos, teias ou redes alimentares, ciclos biogeoquímicos no oceano, marés vermelhas, efeitos ecologia de microbianos, efeitos em cascata, estabilidade de nicho, produtividade primária e fluxo gênico ou conectividade entre ecossistemas, comunidades e populações (Taberlet *et al.*, 2012; Yoccoz, 2012).

A aplicação de técnicas moleculares em estudos de ecologia e biologia marinha começou na década de 1960. Nestes estudos os pesquisadores exploraram variantes eletroforéticas da mesma enzima para caracterizar indivíduos de uma mesma população (análise isoenzimática) e conhecer a resposta e/ou capacidade adaptativa em populações de peixes (Yoccoz, 2012).

No ano de 1970, prosseguiu-se com a importante etapa no desenvolvimento da Ecologia Molecular Marinha, o início do sequenciamento Sanger. Com o desenvolvimento deste método, diferenças populacionais entre indivíduos, espécies e populações puderam ser inferidas com melhor resolução com base em uma determinada sequência de ADN (Bailiff e Karl 1991).

Inúmeras aplicações de eDNA podem ser usadas nas áreas de ecologia marinha e biologia da conservação, e estas aplicações incluem: a análise forense de ADN de vida selvagem, detecção de espécies e/ou populações crípticas e ameaçadas de extinção, detecção de espécies aquáticas invasoras (AIS), avaliação de biodiversidade e comunidade, dinâmica populacional, saúde do ecossistema, interações tróficas, estudos dietéticos e padrões históricos de distribuição das espécies. Abaixo está uma breve sinopse de cada uma dessas aplicações daremos mais ênfase a detecção de espécies exóticas e a saúde do ecossistema:

- I. **Detecção de espécies invasoras:** O uso de ferramentas moleculares para detectar espécies invasoras tem aumentado nos últimos tempos. O desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para as espécies-alvo fornece uma nova ferramenta para gestores de conservação que buscam monitorar. Deste modo, o uso do eDNA fornece a possibilidade de confirmar a presença de espécies invasoras em horas ou dias em vez de semanas ou meses, o que permite que os gestores atuem rapidamente para minimizar a dispersão e assentamento do invasor (Darling e Mahon, 2011). Além disso, o uso de eDNA

na detecção de espécies exóticas invasoras pode fornecer pistas para determinar a origem da introdução e possíveis rotas de invasão.

- II. **Saúde do ecossistema:** A presença de espécies invasoras, bem como de agentes patogénicos introduzidos (virais ou fúngicos), pode ter graves impactos demográficos e genéticos nas populações nativas (Blanc, 2001). Ao aplicar o eDNA para monitorar espécies invasoras, os gestores podem monitorar indirectamente a saúde do ecossistema. Além disso, o uso do eDNA para monitorar mudanças na composição da comunidade e reduções no número de espécies a diversidade também pode servir como proxy para avaliar a saúde do ecossistema. Mais especificamente, as mudanças na diversidade de espécies podem influenciar a dinâmica geral do ecossistema, direta ou indirectamente, reduzindo a qualidade da água, alterando a dinâmica dos nutrientes, Deste modo o eDNA pode ser uma ferramenta interessante para futuras tomadas de decisões baseadas em riscos de recursos naturais ou avaliações de impacto ambiental (Takahara, *et al.*, 2018).

4.3. eDNA no mar

Oceanos e mares formam os maiores corpos de água na terra, o que torna os ambientes marinhos e os ambientes aquáticos mais desafiadores para a aplicação do método eDNA. Isto deve-se ao facto de existir uma extrema relação entre volume da água e biomassa, aos efeitos das correntes e da acção das ondas na dispersão e diluição do eDNA e ao impacto da salinidade na preservação e extração do eDNA (Thomsen *et al.*, 2012b).

No ambiente marinho vários estudos foram conduzidos visando os organismos microbianos (por exemplo, Preston *et al.*, 2011; Sogin *et al.*, 2006; Venter *et al.*, 2004), ou em fases larvais de macroorganismos (Jones *et al.*, 2008). Para macroorganismos, alguns estudos foram conduzidos em ambientes marinhos, um deles detectou a presença de 15 espécies de peixes com eDNA ao longo da costa da Dinamarca (Thomsen *et al.*, 2012b).

O número de espécies detectadas foi comparado com o número obtido usando os métodos tradicionais, porém a composição exata das espécies no local amostrado era desconhecida e por isso não se sabe quantas espécies foram perdidas. Outros estudos focaram em focena (*Phocoena phocoena*) usando o método eDNA em ambientes marinhos. Dentro de um recinto eles tiveram sucesso, mas em mar aberto o eDNA só conseguiu detectar em 1 de 5 locais onde foram

encontrados usando o método acústico. Estes resultados mostram que a aplicação bem-sucedida do eDNA em ambientes marinhos é um desafio. Em simultâneo, mostram o potencial do eDNA se forem desenvolvidas estratégias de amostragem mais adequadas, (por exemplo, filtrando maiores volumes de água) (Foote *et al.*, 2012)

4.4. Persistência em diferentes ambientes

A persistência do ADN ambiental é definida como a continuação de fragmentos do ADN libertado no ambiente pelo organismo (Dejean *et al.*, 2011). Este ADN libertado no ambiente, pode ser transformado, incorporado ou degradado por factores bióticos e abióticos ou pode persistir, ser absorvido em partículas orgânicas ou inorgânicas (Levy-Booth *et al.*, 2007).

A persistência do ADN está relacionada com a densidade da espécie, o tamanho do corpo, a sua actividade no ambiente, mudanças no tamanho, comportamento, estágio de desenvolvimento e a proporção entre as quantidades de ADN libertado e degradado pelas espécies no ambiente podem afectar a quantidade de ADN disponível em escala local (Thomsen *et al.*, 2012a). A detecção de ADN reduz com o tempo, uma vez que a fonte de ADN é removida do ambiente (Dejean *et al.*, 2011).

Outros factores bióticos, como concentrações bacterianas e fúngicas, o corpo de água e suas características, e as condições ambientais externas, são algumas das razões para os resultados variados da análise de eDNA (Dejean *et al.*, 2011). Factores abióticos incluem: temperatura, pH, condutividade, radiação UV, actividade de nuclease, mudanças no clima, taxa de fluxo de água, alta precipitação ou seca, e distância entre as amostras coletadas. A distância percorrida pelo ADN ambiental é proporcional às taxas de fluxo do rio e as correntes, porém aumenta a degradação do mesmo (Matthew *et al.*, 2014).

O clima altera algumas características dos cursos de água: a alta pluviosidade induz um efeito de diluição do eDNA (Buxton *et al.*, 2017b; Harper *et al.*, 2019), enquanto a seca cria baixos níveis de água que podem, levar a uma menor detecção de espécies (Deiner *et al.*, 2016; Sales *et al.*, 2019). Outros fatores abióticos relacionados ao sistema que também podem afectar a persistência incluem: vazão, correntes, oscilações de maré, tipo de sedimento e salinidade (Corinaldesi, *et al.*, 2008).

Várias pesquisas foram conduzidas para avaliar a persistência do ADN, em diferentes tipos de ambiente (marinhos, de água doce e terrestres) e em diferentes substratos (água, solos e sedimentos). Em ambientes marinhos e de água doce, a persistência do eDNA variou consideravelmente entre os estudos, variando de algumas horas, até um mês (Dejean *et al.*, 2011).

De igual modo foi demonstrado que a persistência do eDNA pode oscilar dentro da coluna de água. Matsui *et al* (2001) observaram uma maior degradação do ADN no epilímnio (a camada superior, mais quente, exposto à radiação UV) do que no hipolímnio (a camada inferior, mais fria). Em águas correntes, a persistência do eDNA é ainda menor do que em sistemas marinhos (Dejean *et al.*, 2011).

No estudo de Pilliod *et al* (2014) demonstraram que o eDNA pode ser detectado apenas durante uma hora após a remoção da espécie em águas correntes. Este curto tempo de detecção deve-se ao corrente fluxo da água que causa a diluição do eDNA, e não necessariamente a degradação do ADN, que é uma variável importante quando se trata de sistemas de água corrente. Para o uso prático em sistemas de alerta precoce de detecção de espécies invasoras, as diferenças medidas na persistência na água são de pouca relevância, visto que o método produz resultados rápidos para garantir a presença recente das espécies-alvo.

Várias ordens de grandeza interferem na persistência do eDNA, o que reflete as condições ambientais as quais o ADN é preservado. Em geral, condições frias e secas retardam consideravelmente a degradação do ADN, enquanto condições quentes e húmidas facilitam rapidamente a degradação, a maneira mais eficiente é filtrar a água a ser estudada e logo após a filtração o filtro deve ser armazenado a -20°C. Deste modo, a filtração da água deve ser feita o mais rápido possível após a coleta (Willerslev e Cooper 2005).

Pesquisas recentes foram conduzidas removendo o organismo alvo de um ambiente aquático controlado e logo após a persistência do ADN alvo foi monitorado ao longo do tempo. As taxas de degradação observadas dependem de como o experimento foi conduzido. Por exemplo, eDNA de peixes manteve uma probabilidade de detecção acima de 5% por 17 dias em pequenos reservatórios (Dejean, 2011).

Em uma experiência realizada com peixes marinhos colocados em um aquário de água salgada, a quantidade de eDNA reduziu exponencialmente e foi reduzido abaixo do limite de detecção da

qPCR (PCR quantitativa) em menos de 24 horas para a espécie *Platichthys flesus* e para a espécie *Gasterosteus aculeatus* o ADN foi abaixo do detectável após aproximadamente 7 dias (Thomsen *et al.*, 2012).

Na Nova Zelândia foi conduzido um experimento com caramujos (*Potamopyrgus antipodarum*), onde o eDNA foi detectável durante 21 dias (Goldberg *et al.*, 2013).

Publicações recentes sugeriram que factores temporais como as migrações sazonais devem de igual modo ser considerados na persistência de eDNA e na detecção do mesmo (Barnes e Turner 2016; Thomsen e Willerslev 2015).

Spear (2015) encontrou uma forte correlação entre aumento do eDNA durante a época de reprodução em comparação com outras pesquisas. De igual modo, Goldberg (2011) encontrou uma variação sazonal na detecção de eDNA de dois anfíbios de riachos e atribuíram isso a mudanças sazonais específicas da espécie na abundância. São necessárias futuras pesquisas sobre os aspectos temporais e espaciais do eDNA em várias espécies e habitats, isto irá auxiliar no incrementar a aplicação do método de eDNA à conservação e monitoria de espécies (Thomsen e Willerslev 2015).

De forma característica as amostras de eDNA, apresentam uma significativa quantidade de ADN degradado ou fragmentado, são escassos estudos que explicam como ocorre a degradação do eDNA, e quais as taxas de degradação e como os factores ambientais impactam nesse processo, pois se não soubermos explicar como a degradação do eDNA ocorre quando exposto ao ambiente, será desafiador afirmar se o ADN detectado no ambiente representa um material genético fresco de um organismo que ocupou uma área recentemente ou se o ADN pertence a outro organismo que esteve na mesma área há mais tempo (Eichmiller *et al.*, 2016).

4.5. Validação da técnica do ADN ambiental

Apesar da técnica permitir detectar a presença da espécie alvo sem muito esforço amostral é importante confirmar a presença da espécie fazendo o uso de métodos tradicionais antes que se colha a amostra, pois é a partir desta validação que se confirma a ocorrência da espécie-alvo nos locais onde as amostras serão colhidas, e deste modo se pode comparar os resultados da validação com os resultados obtidos através da técnica do eDNA (Darling, 2019; Alex *et al.*, 2021).

Adoptar unicamente a técnica do eDNA sem a validação pode fazer cair em um erro falso positivo ou falso negativo. É importante usar os métodos tradicionais para confirmar a ocorrência da espécie-alvo, métodos tradicionais como a captura e visualização (Darling, 2019).

4.6. Factores que influenciam a qualidades da técnica do eDNA

Após a morte das células, dá-se início a degradação do ADN, por factores como: nucleases endógenas, água, radiação UV e a ação de bactérias e fungos no ambiente (Shapiro, 2008).

O principal factor que influencia na quantidade de ADN no ambiente é a nuclease endógena. Endonucleases são enzimas que tornam os ácidos nucleicos em fragmentos menores. Além disso, a ruptura da estrutura celular irá libertar ADN e fluidos celulares no meio ambiente. Este processo estimulará o crescimento de microrganismos, uma vez que as condições favorecem e levará a uma maior degradação do ADN pelas suas DNases exógenas (Willerslev e Cooper, 2005).

Os microrganismos aproveitam as pequenas partículas de ADN como fonte de nutrientes, que por sua vez as mesmas incorporam (carbono, nitrogênio e fósforo), e de igual modo, estas usam para reparar danos no seu próprio ADN (Chen e Dubnau, 2004). Em contra-partida, as baixas temperaturas podem inactivar ou retardar a acção de endonucleases e microrganismos, o que permitirá a preservação do ADN (Zhu, 2006).

Por outro lado, a oxidação do ADN pode causar alterações nas bases do ADN pela interação directa da radiação ionizante com o ADN e pela interação do ADN com radicais livres na água, criados pela radiação ionizante. A radiação UV é responsável por causar a oxidação do material genético. A radiação UV pode romper as ligações dos pares de bases do ADN e lesões de pirimidina dimérica do ADN, como consequência da absorção directa dos fótons UVB pelo ADN (Shapiro, 2008).

Pilliod *et al.* (2014) investigou o efeito da radiação UV na detectabilidade do eDNA, os resultados demonstraram que para amostras expostas ao sol a chance de detecção era baixa após 8 dias, porém em amostras armazenadas no escuro após 11 e 18 dias, foi possível detectar o eDNA, o que demonstra o efeito direto da radiação UV sobre o eDNA.

Uma outra fonte de danos para o material genético são as ligações cruzadas entre cadeias que são causadas por diversos agentes ambientais. As ligações cruzadas influenciam a acessibilidade às ADN-polimerases e evitam a separação da cadeia de ADN, o que bloqueia a replicação do ADN

e como consequência, a amplificação do ADN extraído de uma amostra ambiental (água, solo, etc.) é evitada e a espécie não será detectada (Shapiro, 2008).

A redução da detectabilidade do ADN na coluna da água pode ser causada pela absorção de ADN pela matéria orgânica e sedimentos na água. Alguns pesquisadores como Corinaldesi et al. (2008) pesquisaram quais factores ambientais (temperatura, salinidade, cargas de matéria orgânica ou potenciais redox) poderiam afetar os danos ao ADN extracelular e suas taxas de degradação em vários sedimentos marinhos. Os resultados demonstraram que as taxas de danos ao ADN extracelular não dependiam unicamente de um fator, porém de uma interação entre os variados factores (Deere *et al.*, 1996).

Futuros conhecimentos dos possíveis factores que influenciam a quantidade de eDNA nos ambientes permitirá o cálculo de estimativas quanto ao destino do eDNA em ambientes onde a persistência do ADN ainda não foi testada (Herder *et al.*, 2013).

A distância percorrida pelo ADN na água depende da persistência do mesmo e das taxas de fluxo da água. Para os oceanos, calculou-se que, teoricamente, que o ADN poderia mover-se 40 a 600 km antes de ser degradado para além da detectabilidade (Thomsen *et al.*, 2012b). Porém, como consequência da diluição contínua, a probabilidade de detecção de eDNA em águas marinhas provavelmente diminuirá rapidamente com a distância da sua fonte, tornando a recuperação de ADN de origem local muito desafiadora (Herder *et al.*, 2013).

Foi conduzido um experimento nos Estados Unidos, para avaliar a influência da distância na detectabilidade do eDNA, 5 salamandras foram colocadas em uma gaiola em um riacho e amostras de eDNA foram colectadas a uma distâncias de 5 e 50 metros. As amostras colectadas a uma distância de 5 metros foram todas positivas, e para as amostras colhidas a 50m nenhum eDNA. A significativa distância (50m) da fonte e o aumento da diluição resultante foram dados como a explicação para os resultados negativos (Pilliod *et al.*, 2014).

Certamente, pesquisadores presumem que o uso de amostras de água do mar para análise de eDNA será provavelmente mais difícil e desafiador do que o uso de água doce, isto devido ao maior corpo de água de origem, a acção de factores como: forte maré e a acção das correntes, causarão a diluição e dispersão do eDNA, e a salinidade que pode inibir a PCR (Herder *et al.*, 2013).

Várias pesquisas de eDNA usam um gene mitocondrial como marcador, existem apenas duas cópias de ADN nuclear por cada célula contra milhares de cópias de ADN mitocondrial (mtDNA). Este elevado número de cópias eleva a probabilidade de detecção do ADN em amostras degradadas, tais como amostras ambientais. Contudo, alguns genes mitocondriais (por exemplo, citocromo oxidase I, citocromo b, região controle) apresentam uma taxa evolutiva, o que os torna mais apropriados para a identificação de espécies com base na variação genética (Herder *et al.*, 2013).

Entretanto, apesar das vantagens do uso do ADN mitocondrial (mtDNA), este apresenta de igual modo algumas desvantagens: com excepção de alguns casos raros o mtDNA é geralmente herdado pela mãe, o que torna impossível a identificação de organismos híbridos no ambiente, mas permite apenas determinar a espécie materna do organismo. É importante considerar esta limitação principalmente nos casos em que trata-se de uma espécie invasora híbrida com uma espécie nativa (Giles *et al.*, 1980).

A alta frequência de degradação do eDNA limita o tamanho da partícula a exceder 150 pb. O que pode resultar em um fragmento que não possui informação genética suficiente para permitir a detecção da espécie-alvo, porém pode-se recorrer ao mini-barcoding que permite o uso de fragmentos menores. (Levy-Booth *et al.*, 2007).

4.7. Vantagens da técnica do ADN ambiental

➤ Alta probabilidade de detecção

Diversos estudos tiveram maior probabilidade de detecção usando o eDNA em comparação com o uso dos métodos tradicionais de detecção e identificação de espécies no ambiente, por exemplo: Arrasto (Dejean *et al.*, 2012; Herder *et al.*, 2013b (Jerde *et al.*, 2011).

A detecção de espécies fazendo o uso do método de eDNA, demonstra uma maior vantagem em comparação com os métodos tradicionais, apesar de não ser aplicável para todas as espécies, este método pode ser especialmente eficaz para espécies raras, secretas, e não nativas (Van Delft e Creemers 2013).

A técnica do eDNA é altamente aplicável para uso em pesquisas e monitoramento de espécies invasoras, especialmente para sistemas de alerta precoce e inventários, e para monitorar o sucesso dos esforços de erradicação. Entretanto, deve-se considerar que a detecção difere de espécies para

espécie e de igual modo para os habitats. A maior chance de detecção é que os resultados negativos (a conclusão de que uma espécie está ausente) são mais fiáveis com o eDNA do que com os métodos tradicionais. (Van Delft e Creemers, 2013; Van Delft e Herder, 2013)

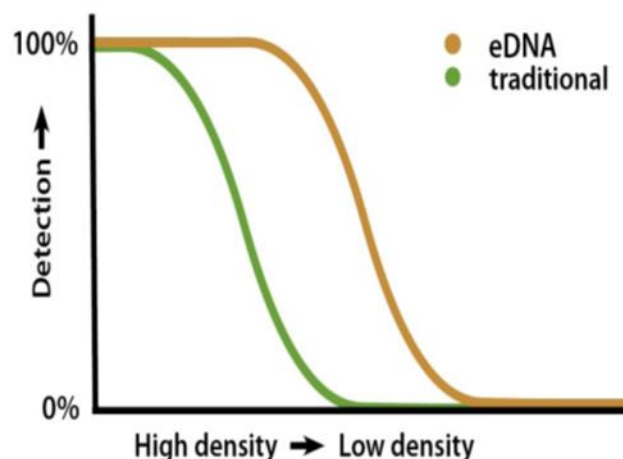


Figura 1: A figura demonstra de forma esquemática a vantagem da maior chance de detecção fazendo o uso da técnica de eDNA representado pela cor laranja, que demonstra uma alta percentagem de detecção de espécies em baixa densidade no ambiente em comparação aos métodos tradicionais representado pela cor verde que reduz o seu poder de detenção com a redução da densidade populacional. (desenhado por Darling e Mahon, 2011).

➤ **Eficiência de custos**

A técnica do eDNA pode significativamente ser mais barata e consumir menos tempo em relação aos métodos tradicionais, quando trata-se especialmente de espécies raras, e exóticas invasoras (Herder *et al.*, 2013).

➤ **Especificidade da espécie**

A identificação acurada de espécie é de extrema importância na ciência, e o uso de conhecimento taxonómico por vezes está sujeito a erros e o conhecimento taxonómico tem se tornando cada vez mais escasso, o que aumenta a necessidade de uso de novas abordagens. Deste modo a técnica de eDNA, é uma das promissoras abordagens. Se os primers desenhados para utilização tiverem sido validados e forem tomadas precauções para um controlo de qualidade adequado, então a

identificação das espécies é confirmada por primers específicos da espécie. Embora seja indispensável, nestes casos, não são necessários conhecimentos taxonómicos adicionais e podem ser evitados erros de identificação (Van Delft e Herder, 2013).

➤ **Maior resolução taxonómica**

A identificação de espécies tendo como base características morfológicas pode ser desafiadora ou impossível dependendo do nível de espécie para muitos táxons. (Exemplo: ovos, formas juvenis e sub-adultos, já que a maioria das chaves de identificação se concentra em espécimes adultos. Nestes casos, os métodos convencionais têm resolução taxonómica limitada, em alguns casos restrita à identificação ao nível do género ou da família. A identificação baseada em ADN, dependendo dos iniciadores utilizados, pode muitas vezes fornecer maior resolução taxonómica do que os métodos convencionais, distinguindo assim entre espécies que não podem ser alcançadas com base em características morfológicas (Jerde *et al.*, 2011).

➤ **Aplicável em diversos tipos de água**

Os métodos tradicionais geralmente têm limitações na sua aplicação em diferentes tipos de água. (Por exemplo: águas com vegetação densa são extremamente difíceis de monitorar, uma vez que as redes não podem ser utilizadas. O método eDNA não é afectado por estas limitações e pode ser especialmente útil em situações onde os métodos convencionais falham. Além disso, a amostragem de eDNA pode ser realizada a qualquer hora do dia e em períodos do ano em que as espécies não podem ser monitoradas com métodos tradicionais, enquanto que alguns métodos tradicionais são restritos a determinados períodos e épocas do ano (Bijkerk *et al.*, 2013).

➤ **Não invasivo**

A técnica do ADN ambiental não é invasiva. Nesta técnica os organismos não precisam ser capturados para detectar a sua presença, e os habitats são intactos pela amostragem. Esta é significativamente uma vantagem sobre os métodos tradicionais, que podem causar estresse aos organismos-alvo e qualquer captura accidental não intencional. Além disso, os métodos tradicionais podem ser destrutivos para os habitats (por exemplo, pesca de arrasto (Jones, 1992) ou pesca intensiva com redes em áreas de vegetação aquática frágil e rara). Como as espécies não têm de ser capturadas, não há necessidade de autorização especial para o manuseamento de espécies (protegidas), como acontece com as abordagens tradicionais (Bijkerk *et al.*, 2013).

➤ **Redução do risco de propagação de espécies invasoras e doenças**

Com a técnica do ADN ambiental, várias precauções são tomadas a fim de evitar contaminações. Isto auxilia na redução do risco de translocações não intencionais de espécies exóticas invasoras ou transmissão de agentes patogénicos para novas áreas, ou fragmentos viáveis de espécies de plantas exóticas invasoras, como a cultura pantanosa australiana (*Crassula helmsii*), poderiam ser potencialmente transportados e introduzidos através de redes (Jones, 1992).

4.5. Desvantagens da técnica do ADN ambiental

➤ **Quantificação**

A relação entre a densidade de uma espécie e a quantidade de eDNA que ela liberta em seu ambiente foi comprovada em vários experimentos em aquários e mesocosmos (Takahara *et al.*, 2012; Thomsen *et al.*, 2012a). No entanto, em condições de campo existem muitos factores diferentes que podem influenciar na persistência e diluição do eDNA. Como o eDNA é frequentemente distribuído de forma irregular no ambiente, a estratégia de amostragem também pode influenciar fortemente a quantidade de ADN encontrada nas amostras. Portanto, o eDNA só pode oferecer algumas indicações das tendências nas densidades actualmente. Deve-se notar que os métodos tradicionais muitas vezes também não são adequados para boas estimativas de densidades.

➤ **Fases da vida, estrutura demográfica ou fecundidade populacional**

A técnica do ADN ambiental pode detectar a presença ou ausência de espécies apenas. Entretanto com os métodos tradicionais, podem ser recolhidas informações sobre as fases da vida, a estrutura demográfica da população, a fecundidade ou a saúde das espécies-alvo. Esta pode ser uma limitação importante se for necessária informação adicional, por exemplo, o sucesso reprodutivo de uma espécie. Para as espécies exóticas invasoras é especialmente importante saber se está a reproduzir-se (Wada *et al.*, 2020).

➤ **Envolvimento na conservação da natureza**

Usar a técnica do ADN ambiental, as próprias espécies não precisam ser observadas para detectar sua presença. Isto traz o risco de que, se o eDNA se tornar o único método aplicado, as espécies

podem se tornar apenas um número na administração dos governos e das ONG, perdendo assim o apoio à sua conservação. Aumentar a compreensão e até mesmo as associações emocionais das espécies, mostrando-as ao público em geral, é crucial para uma conservação bem-sucedida a longo prazo (Jerde *et al.*, 2011).

➤ **Conhecimento colateral**

A técnica do ADN ambiental é tão eficiente e tão específica, que normalmente não será recolhida qualquer informação para além do simples conhecimento sobre a presença ou ausência da espécie-alvo (abordagem específica da espécie) ou do grupo-alvo (abordagem multiespecífica). Isto contrasta com os métodos tradicionais que requerem extensas visitas de campo. Com a utilização de redes de imersão, (por exemplo, são encontradas espécies inesperadas, escassas ou de outro modo relevantes). Com métodos tradicionais, os animais são manuseados, permitindo ao pesquisador de campo observar sua condição física ou a possível presença de doenças (Herder *et al.*, 2013).

4.8. Relação entre os métodos tradicionais e o ADN ambiental

A técnica do ADN ambiental reivindicou um lugar muito importante no kit de ferramentas de monitoramento da biodiversidade marinha e aquática. Dado ao seu potencial de sensibilidade extremamente alta, o eDNA é frequentemente oferecido como uma solução para o problema de detecção de populações. Esse recurso é especialmente atraente para gestores que visam mitigar riscos associados a espécies invasoras (Leung *et al.*, 2002).

Entretanto, muitas das ferramentas tradicionais que são comumente empregues para essas tarefas dependem das tecnologias de “catch-and-look”. Essas tecnologias costumam ser bastante antigas (Por exemplo: redes de pesca), geralmente são muito estáveis e têm o benefício óbvio de permitir uma investigação morfológica detalhada dos indivíduos capturados. Mas o esforço necessário para capturar um organismo-alvo e analisá-lo morfológicamente muitas vezes torna essas ferramentas relativamente ineficazes na detecção de indivíduos raros (Jerde *et al.*, 2011).

A detecção de uma espécie-alvo sem a necessidade de capturar fisicamente qualquer indivíduo dessa espécie confere, deste modo uma enorme vantagem. Muitas espécies são muito difíceis de capturar, algumas vivem em habitats de difícil acesso ou exibem comportamentos irritantes de

evitar a captura. Geralmente é muito mais fácil, rápido e barato obter uma amostra de água do que capturar um peixe usando métodos tradicionais (Wada *et al.*, 2020).

As abordagens da técnica do ADN oferecem o benefício adicional de dissociar a identificação taxonômica da observação morfológica direta dos indivíduos. Este é um avanço significativo, dado que muitos indivíduos não possuem as características nas quais se baseiam as identificações morfológicas das espécies (Herder *et al.*, 2013).

Porém estes benefícios das abordagens “sem captura”, como o eDNA, também apresentam desafios significativos. Este problema foi trazido à tona pelo caso das carpas asiáticas na região dos Grandes Lagos dos Estados Unidos. O medo de que essas espécies introduzidas pudessem entrar nos Grandes Lagos e ameaçar sua altamente lucrativa indústria de pesca desportiva levou a tentativas de delinear melhor as frentes de invasão usando eDNA.

Surpreendentemente, o ADN ambiental foi detectado em áreas onde as carpas nunca haviam sido encontradas pelas técnicas tradicionais de captura, sugerindo que as espécies estavam muito mais próximas de entrar nos lagos do que se supunha (Jerde *et al.*, 2011).

Os métodos tradicionais de amostragem são frequentemente invasivos, destrutivos e demorados. O desenvolvimento de métodos de eDNA representa um grande progresso no monitoramento de organismos que não são facilmente amostrados ou detectados (Dejean *et al.*, 2012).

O exemplo interessante foi a aplicação do eDNA em ambientes de recifes de coral altamente ricos em espécies para revelar espécies que de outra forma não seriam detectadas, ou seja, aquelas que habitam espaços escondidos dentro da matriz do recife. Este “criptobioma de recife” foi estudado com sucesso com metabarcoding de ADN, revelando muitas linhagens raras e localizadas de organismos sésseis e móveis (Carvalho *et al.*, 2019).

A amostragem tradicional pareceu particularmente menos eficiente para recuperar a diversidade e abundância do zooplâncton gelatinoso. A riqueza de espécies e a biomassa do zooplâncton gelatinoso, como os ctenóforos e os cnidários, são consistentemente subestimadas devido aos seus corpos frágeis e aquosos que são facilmente danificados e destruídos nas redes (Hosia *et al.*, 2017).

Recentemente, um estudo comparou a taxa de zooplâncton recuperada com redes e com eDNA de amostras de água filtrada, e demonstrou que o eDNA é particularmente adequado para revelar a diversidade gelatinosa (Govindarajan *et al.*, 2021).

Deste modo a aplicação da técnica do ADN ambiental, quando combinada com a os métodos tradicional, pode aumentar a fiabilidade dos inquéritos de monitoramento, particularmente para espécies raras e crípticas. A técnica do ADN ambiental é vantajosa em relação à rede nestes casos porque o método pode detectar o ADN de uma espécie independentemente de seu tamanho ou classe de idade (Fago, 1998).

Entretanto, a utilização de vários métodos de amostragem pode resultar em melhores estimativas da composição das espécies, porém muitas das vezes, a escolha do método de amostragem depende do objectivo da actividade e da disponibilidade de recursos (Fago, 1998).

4.8.1. Eficiência de custos em comparação com métodos tradicionais

De modo geral, não é possível afirmar taxativamente que o eDNA é mais eficiente em termos de custos do que os métodos tradicionais, uma vez que isto depende da espécie-alvo. Por exemplo, para espécies secretas e raras, o eDNA é muitas vezes mais rentável do que os métodos tradicionais devido à sua maior probabilidade de detecção. Dejean *et al.* (2012) calcularam que o método do ADN ambiental era 2,5 vezes mais barato e menos demorado do que os métodos tradicionais.

Por outro lado, para espécies que são fáceis de observar ou capturar com métodos tradicionais, o eDNA será menos rentável do que os métodos tradicionais, uma vez que acrescenta a etapa extra de análise laboratorial ao trabalho de campo. Assim, com base na dificuldade de monitorar espécies com métodos tradicionais, o eDNA pode ser mais ou menos rentável.

Além disso, deve-se notar-se que a eficiência da detecção utilizando métodos tradicionais é muitas vezes altamente dependente da habilidade e experiência do pessoal que realiza o levantamento para a espécie específica. Portanto, as comparações entre os métodos tradicionais e o eDNA dependem do nível de competência dos profissionais que realizam qualquer tipo de pesquisa (Herder *et al.*, 2013).

4.9. Bases técnicas para o uso de qPCR e Sequenciamento de Nova Geração no ambiente marinho.

Um dos principais factores que influencia a técnica do eDNA no ambiente marinho, é a ação das ondas e correntes fortes que degradam e diluem o eDNA em pouco tempo, ou mesmo desde que este for libertado no ambiente pelo organismo-alvo.

Por essa razão, a tendência é dos fragmentos de eDNA presente nas amostras serem pequenos o que por vezes pode condicionar a sua ampliação, sequenciamento e a detenção do ADN alvo presente na amostra,

Tendo em conta as características apresentadas pela tecnologia de *PCR* em Tempo Real (*qPCR*) que é uma evolução do método de *PCR* Reação em Cadeia da Polimerase), em que o seu princípio se baseia na duplicação de cadeias de ADN “*in vitro*” que pode ser repetida diversas vezes, gerando quantidade de ADN suficiente para realizar diversas análises. Com apenas um único fragmento de ADN é possível reproduzir milhões de cópias (Pilliod *et al.*, 2014).

Os ensaios de *PCR* em Tempo Real são muito mais sensíveis, específicos e rápidos, principalmente quando comparados aos testes convencionais, levando de 2 a 3 horas para emitir o resultado (Pilliod *et al.*, 2014).

Esse ciclo é realizado inúmeras vezes até atingir milhões de cópias. Na *PCR* convencional, a detecção do produto de amplificação normalmente é feita em eletroforese em gel de agarose. Após a coloração, ocorre a visualização do DNA pesquisado

Na *qPCR*, o resultado é visualizado imediatamente, dispensando a eletroforese. Isto é possível pela adição de sondas fluorescentes às reações de *PCR*. A amplificação do ADN-alvo é monitorada durante o processo de *qPCR*. A medida que o ADN é amplificado, o nível de fluorescência cresce proporcionalmente (Pilliod *et al.*, 2014).

Além disso, por meio do monitoramento da taxa de aumento da fluorescência na reação de *PCR*, é possível determinar com precisão a quantidade de ADN-alvo presente na amostra original. A

qPCR pode ser utilizada para se avaliar a presença de um organismo em uma amostra, podendo ser um teste qualitativo ou quantitativo (Chambers *et al.*, 2014).

O sequenciamento de nova geração , permite sequenciar simultaneamente um grande número de fitas de ADN. Essa alta velocidade permite que todo o genoma seja sequenciado em menos de um dia. Esse método não depende da terminação da cadeia. Em vez disso, este método, sempre que uma nova base é adicionada à cadeia de ADN em replicação, é emitido um sinal fluorescente correspondente que é detectado em tempo real (Latini. *et al.*, 2016).

Logo, no ambiente marinho o uso da qPCR e do Sequenciamento de Nova geração mostram-se vantajosos, pois a partir de partículas de ADN que estão em constante fragmentação devido as características do ambiente em que são libertadas (ambiente marinho), estes métodos podem permitir que mesmo fragmentos muito menores possam ser amplificados milhões de vezes, tornando possível o Sequenciamento do ADN presente na amostra e podendo até tornar possível a quantificação do ADN presente na amostra, onde pode-se fazer uma inferência sobre a possível densidade de organismos presentes na área amostrada.

5. Bases técnicas para a utilização do ADN ambiental

Para prosseguir com pesquisas fazendo o uso do ADN ambiental, podem-se desenhar protocolos ou mesmo podem ser seguidos protocolos previamente publicados. Na metodologia de Díaz-Ferguson e Moyer (2014) argumenta-se que para a detecção de ADN é necessário o desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para cada objetivo do trabalho.

Marcadores moleculares são sequências conhecidas dentro do ácido nucleico a ser estudado e cuja posição é normalmente conhecida. Uma vez detectados esses marcadores moleculares, são sintetizadas sondas moleculares complementares a eles (primers), para posteriormente serem utilizadas em diversos métodos, como a *PCR*, que amplifica milhões de vezes o fragmento de interesse a ser estudado, para depois ser visualizado através de eletroforese em géis de agarose ou agarose poliacrilamida (Díaz-Ferguson e Moyer, 2014).

5.1. Controle de qualidade e requisitos básicos de laboratório

A redução das chances de contaminação, é um dos principais factores a considerar para que se evitem contaminações e posteriores erros durante a análise dos dados. Deste modo os laboratórios devem ser organizados de forma a reduzir as chances de contaminação. O ADN não é visível a olho nu, é difícil detectar os erros durante os procedimentos. É necessário estar inteiramente confiante na robustez e fiabilidade do método aplicado, desde a amostragem no campo até a análise dos resultados em laboratório. Portanto, devido à baixa concentração de ADN alvo nas amostras ambientais, a análise deve ser conduzida com precauções semelhantes às que foram aplicadas noutros estudos antigos de ADN (Willerslev e Cooper, 2005).

5.2. Amostragem da água

A estratégia de amostragem da água é mais controversa. A literatura propõe duas abordagens principais de amostragem, ambas baseiam-se na concentração de ADN em diferentes volumes de água:

A primeira abordagem aplicada em estudos de eDNA baseou-se na precipitação do ADN fazendo o uso de etanol e acetato de sódio e/ou centrifugação de restos celulares (Ficetola *et al.*, 2008). Neste caso o etanol actua como conservante do ADN, e as amostras podem ser armazenadas por alguns dias, ou semanas, em temperatura ambiente, o que torna-se vantajoso quando os locais de amostragem estão distantes das instalações do laboratório (Ficetola *et al.*, 2008).

A principal limitação desta técnica é que o volume de água amostrado é baixo, e se a espécie estiver em maiores densidades no local, a sua detecção será provavelmente positiva mesmo com baixos volumes de água amostrados, mas se a espécie estiver em baixas densidades, ou tenham actividade baixa, ou o ponto de amostragem esteja distante de fonte do ADN, baixos volumes de água amostrados podem dificultar a detenção de espécies e podem levar-nos a cair em erros falsos negativos (Ficetola *et al.*, 2008).

A segunda abordagem propõe a colecta de diferentes sub-amostras de água ao redor da área de estudo. Posteriormente estas amostras podem ser homogenizadas e algumas sub-amostras são retiradas desse grande volume de água para serem transferidas para tubos cheios de etanol e acetato de sódio. Isso é explicado pelo facto do ADN não estar distribuído de forma homogênea e colectar

as amostras em diversos pontos ao redor da amostra, pode aumentar as chances das amostras conterem o eDNA da espécie-alvo (Figura 2) (Biggs *et al.*, 2014; Herder *et al.*, 2013).

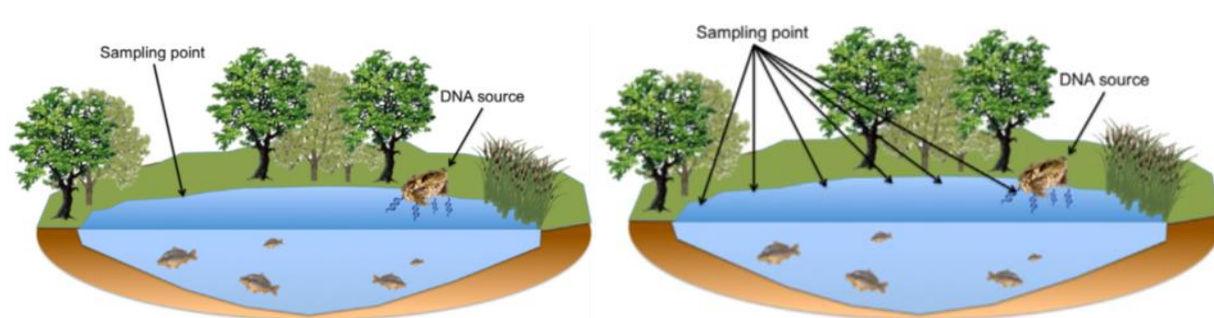


Figura 2: Ilustração da estratégia de amostragem e suas eficiências quando a espécie-alvo é rara ou tem mobilidade limitada. A imagem à esquerda representa um tipo de amostragem não homogenizada, as amostras não foram colhidas em diferentes pontos da área de amostragem (sub-amostras), reduzindo as chances de detecção do organismo-alvo, do lado direito é esquematizado um tipo de amostragem homogenizada, onde foram feitas as amostragens em diferentes pontos do local da amostragem o que eleva as chances de detecção da espécie-alvo.

5.3. Armazenamento

Após a coleta das amostras de água, o eDNA continua a sofrer as ações dos factores ambientais e estes influenciam na sua degradação, no entanto esses factores devem ser imediatamente inactivados para que o ADN possa ser preservado, e uma das formas mais comum de inactivação desses factores ambientais de influência é preservar as amostras em baixas temperaturas -20°C . Para minimizar o efeito de nucleases e microrganismos endógenos (Jerde *et al.*, 2011; Zhu, 2006), ou devem ser completamente desidratados, em gel sílica ou por a adição de álcool e posteriormente congelado para interromper a hidrólise do ADN e o efeito de nucleases e microrganismos (Ficetola *et al.*, 2008; Goldberg *et al.*, 2011).

5.4. Processamento das amostras

5.4.1. Extração do ADN

Após a colecta das amostras em campo, as amostras ambientais são encaminhadas ao laboratório e submetidas à etapa de extração de ADN. Nesta etapa, o ADN e as células são primeiramente isolados por precipitação, centrifugação ou filtração com etanol. Posteriormente, a membrana celular sofre a lise para permitir a liberação de ADN, e o ADN total é purificado com base em

protocolos internos (tampões CTAB ou purificação com fenol-clorofórmio) ou com kits comerciais, baseados no uso de minicolumnas contendo uma fase sólida capazes de absorver o ADN (por exemplo, Qiagen®, MoBio® e MN®) (Herder *et al.*, 2013).

Para que a detecção do eDNA seja possível, as estratégias descritas na literatura visam a concentração do ADN presente na água. Existem dois métodos que permitem a captura de ADN, o primeiro, descrito por Ficetola *et al* (2008) é através da precipitação usando etanol e acetato de sódio e logo em seguida a centrifugação da amostra, o segundo método desenvolvido por Wilcox *et al* (2013), é através da filtração da água. Este permite a filtração de maiores volumes de água, o que teoricamente aumenta a probabilidade de detecção.

Recentemente Eichmiller *et al.*, (2015), comparou estes dois métodos de igual modo, qual tamanho de poro de filtração é mais ideal para estimar a biomassa ou para detectar o ADN, e qual material retém mais ADN no poro (policarbonato ou fibra de vidro).

Os resultados demonstraram que o método de captura mais eficiente é por filtração usando fibra de vidro e os tamanhos de poros mais eficientes foram 1.5 µm, seguido pela fibra de policarbonato com poro de 1.0 µm e 0.6 µm de tamanho, pelo facto de conseguirem filtrar maior quantidade de água do que filtros com poros menores (Eichmiller *et al.*, 2015).

Entretanto, isto não significa que a filtração revela um desempenho melhor em relação ao método de precipitação, pois este método pode ser mais demorado e mais caro (por exemplo, filtros, bomba, etc.). Outro factor não menos importante é que ao filtrar grandes volumes de água, mais inibidores podem ser concentrados na amostra. E o eDNA é altamente degradado em fragmentos pequenos e estes fragmentos podem não ser retidos pelos poros dos filtros porque os tamanhos dos poros são muito grandes diminuindo assim a probabilidade de detecção (Deagle *et al.*, 2006). Até agora, quatro tipos principais de filtros são usados:

- Filtro de fibra de vidro (Jerde *et al.*, 2011)
- Filtro de nitrato de celulose (Goldberg *et al.*, 2011)
- Filtro de carbonato (Takahara *et al.*, 2012)
- Filtro de nylon (Thomsen *et al.*, 2012b)

A filtragem pode ser realizada em campo e as amostras filtradas são então armazenadas em álcool ou em gelo e enviadas ao laboratório para análise. Porém isto pode ser uma limitação se o estudo

for realizado em grande escala e quando diferentes pessoas amostragem pontos diferentes, pois será necessário adquirir inúmeras bombas (Jerde *et al.*, 2011).

Alternativamente, as amostras podem ser coletadas em recipiente estéril e armazenada em gelo e encaminhada imediatamente para o laboratório e a filtração pode ser realizada posteriormente em laboratório, onde as amostras devem ser processadas no prazo de 24 horas ou as amostras devem ser armazenadas (congeladas) até que a filtração seja possível (Thomsen *et al.*, 2012b). No entanto, isso pode ser uma limitação quando os locais de amostragem estão num ambiente distante ou quando o transporte para o laboratório demora mais de 24 horas (Jerde *et al.*, 2011).

5.5. Amplificação do ADN

O ADN extraído é posteriormente amplificado fazendo o uso de primers previamente validados para a espécie-alvo. Durante a extração, o ADN nuclear, mitocondrial e de cloroplasto de vários organismos são co-extraídos. O ADN da espécie-alvo é apenas uma pequena fração do ADN total extraído. Para a análise do ADN específico, podem ser usados dois tipos de amplificação: métodos tradicionais de *PCR* ou métodos quantitativos de *PCR* (*qPCR*) (Goldberg *et al.*, 2011; Nichols *et al.*, 2012; Herder *et al.*, 2013).

➤ Marcadores moleculares utilizados na amplificação do eDNA

Nos últimos anos, com os avanços da genética e da biologia molecular, principalmente, com o advento da tecnologia do ADN recombinante, da reação em cadeia de polimerase (*PCR*) e do sequenciamento automático do ADN foram desenvolvidas poderosas técnicas para o desenvolvimento de marcadores genéticos úteis na identificação, caracterização e avaliação dos recursos em estudo (Chambers *et al.*, 2014).

Para a obtenção de marcadores genético-moleculares, é exigida uma infraestrutura apropriada para realizar as diferentes fases da metodologia que varia de acordo com o tipo de marcador. De modo geral, são necessários equipamentos para a extração de ADN, amplificação via reação em cadeia de polimerase (*PCR*), separação por eletroforese, fotodocumentação e análise estatística dos marcadores gerados (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Actualmente, existe um grande número de tecnologias da genética molecular que podem ser utilizadas para fornecer informações úteis aos programas de conservação e uso de recursos

genéticos. Cada tecnologia apresenta vantagens e desvantagens. O uso de uma ou de outra vai depender, entre outros fatores, do objectivo do estudo, da infraestrutura disponível, dos recursos financeiros para o investimento, da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (Mwadingeni *et al.*, 2017).

Os marcadores de ADN são divididos em três categorias principais: os baseados em hibridização, os baseados em *PCR* (Reação em cadeia de Polimerase) e por fim, marcadores baseados em sequenciamento (Mwadingeni *et al.*, 2017).

Diferentes técnicas para a análise de marcadores de ADN foram desenvolvidas a partir do surgimento da *PCR*, permitindo a amplificação de uma grande quantidade de uma sequência específica de ADN sem necessidade de clonagem, começando com apenas algumas moléculas da sequência alvo. Uma vantagem dos métodos de marcadores baseados em *PCR* sobre os métodos de marcadores baseados em hibridização é que o último requer o isolamento de grandes quantidades de ADN. Entre os marcadores baseados em *PCR*, podemos citar, por exemplo: **RAPD** (Random Amplified Polymorphism DNA), **ISSR** (Inter-simple sequence repeats), **SSR** (Simple Sequence Repeats), **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Rieseberg, 1996).

A técnica de RAPD foi descrita em 1990 independentemente por dois grupos de pesquisa (Welsh e McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Marcadores RAPD foram os primeiros marcadores desenvolvidos baseados em *PCR*. Nesta técnica é utilizado um único primer de geralmente 10 bases de uma sequência arbitrária com 60% ou mais de conteúdo GC. A amplificação ocorre quando o sítio do primer (iniciador ou oligonucleotídeo) está presente no ADN alvo em orientação oposta dentro de aproximadamente 2000 bases. Assim, a correspondência entre os fragmentos amplificados de diferentes espécies pelos mesmos iniciadores RAPD é natural (Rieseberg, 1996).

Os polimorfismos RAPD resultam da variação da sequência nos locais de anelamento do primer e/ou variação de comprimento na sequência alvo situada entre os locais de ligação do primer. O RAPD é uma técnica não radioativa que requer uma pequena quantidade de ADN (15-25 ng), a maior vantagem desta técnica em relação a outras técnicas, e que pode ser realizada em poucas horas.

Outra vantagem é o grande número de marcadores obtidos distribuídos ao longo do genoma. Entretanto, o uso deste marcador é limitante por diversas características, como por exemplo, o aparecimento de bandas não parentais na progênie restringindo o uso para mapeamento molecular. Além disso, esse marcador se comporta como marcador dominante e apresenta baixa reprodutibilidade entre diferentes laboratórios e experimentos, principalmente associados ao uso de baixa temperatura de anelamento, que pode resultar em uma baixa especificidade ou até no não anelamento do primer (Riedy *et al.*, 1992). Pode ser influenciado, por exemplo, pela utilização de diferentes reagentes, incluindo Taq DNA polimerases, ou diferenças na qualidade do ADN (Schierwater e Ender, 1993; Skroch e Nienhuis, 1995).

Outra técnica descrita por Meyer *et al.* (1993), a qual essencialmente combina os benefícios do RAPD (grande número de marcadores obtidos distribuído sobre o genoma), aliados ao aumento na reprodutibilidade e especificidade, são os marcadores **ISSR (Inter-simple sequence repeats)**. ISSR é uma técnica baseada em SSR em que a amplificação é realizada com um único primer consistindo de várias repetições (motivo **RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)** – RAPDs são fragmentos de ADN amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers curtos (geralmente dez nucleotídeos) de sequência aleatória (Williams *et al.*, 1990).

Outra terminologia usada para esses marcadores é a **APPCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction)** (Welsh e McClelland, 1990). A obtenção desses marcadores envolve a extração e a amplificação do ADN, eletroforese normalmente em gel de agarose corado com brometo de etídio e fotodocumentação sob luz ultravioleta. As principais vantagens da técnica são a facilidade e a rapidez para obtenção dos marcadores, a necessidade de quantidades mínimas de ADN e a universalização das análises (Riedy *et al.*, 1992).

Pode-se trabalhar com qualquer espécie, uma vez que não há a necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de ADN para a construção dos primers utilizados. As principais desvantagens referem-se à dominância dos marcadores, não diferenciando os locos em heterozigose dos locos em homozigose e à baixa reprodutibilidade das marcas por causa da sensibilidade da técnica às condições experimentais, principalmente, quando elas não estão bem padronizadas (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Faleiro *et al.*, 2004).

Para reduzir os problemas de reprodutibilidade do marcador **RAPD**, primers específicos (15 a 30 pb) podem ser desenhados a partir do sequenciamento de determinado marcador **RAPD** ligado a uma característica de interesse do investigador, de modo a produzir marcadores **SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)** (Paran e Michelmore, 1993; Corrêa *et al.*, 2000).

PCR-sequencing – Esse tipo de marcador genético-molecular envolve a determinação da sequência de nucleotídeos do fragmento de ADN amplificado via *PCR* utilizando primers específicos (15 a 30 pb) para dada região do genoma em estudo. Para a determinação da sequência de nucleotídeos, existem hoje os sequenciadores automáticos muito utilizados nos projetos genoma. Normalmente, dentro da mesma espécie não há muitas variações na sequência de nucleotídeos e, por isso, o *PCR-sequencing* é mais útil em estudos taxonômicos interespecíficos, como por exemplo, estudos de reconstrução filogenética (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Faleiro *et al.*, 2004).

As principais vantagens desse marcador genético são a alta reprodutibilidade e o nível de detalhamento do fragmento de ADN a ser estudado. As principais desvantagens são o baixo nível de variação em estudos intra-específicos e o custo da técnica (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Faleiro *et al.*, 2004).

Em relação ao tipo de marcador, é importante diferenciar aqueles que fornecem dados de um único loco (Por exemplo: *PCR/DNA sequencing*) daqueles que fornecem dados multilocos obtidos de múltiplas regiões gênicas (Por exemplo: *RAPD*, *AFLP*, *Minissatélites*). Essa diferenciação é importante, pois a quantidade de informação acessada influencia as interpretações dos dados.

Na definição dos marcadores genético-moleculares mais apropriados, deve-se levar em conta o objectivo do estudo (Avisé, 1993). De modo geral, marcadores moleculares multilocos utilizados em *DNA fingerprinting* (Por exemplo: *RAPD*, *AFLP*, *Microsatélites*, *Minissatélites*) são mais apropriados para estudos de identidade genética, testes de paternidade e estudos de variabilidade dentro da mesma espécie (Chambers *et al.*, 2014).

Marcadores baseados em comprimentos de fragmentos de restrição como os *RFLPs* obtidos de *mtDNA*, *cpDNA*, *rDNA* são mais apropriados para estudos de diversidade genética de espécies fortemente relacionadas. Marcadores baseados em análises de sequências (Por exemplo: *PCR*

sequencing) são apropriados para análises de espécies com alto nível de divergência evolucionária, embora possam ser utilizados para análises de espécies ou acessos com qualquer nível de divergência evolucionária (Chambers *et al.*, 2014).

Deste modo, na escolha do marcador a ser utilizado tendo em conta o objectivo do estudo deve-se ter em conta as características, vantagens e desvantagens de cada técnica de modo a reduzir as margens de erro e que os resultados finais possam possibilitar que as análises estatísticas sejam interpretadas sem ambiguidades.

➤ **PCR tradicional**

Na *PCR* tradicional, os resultados da amplificação podem ser visualizados fazendo o uso da eletroforese em gel de agarose ou fazendo o uso da eletroforese capilar (por exemplo: Qiagen® Qiaxcel,) ou, podem ser visualizados em um sequenciador se os primers estiverem marcados com fluorescência (Goldberg *et al.*, 2011; Nichols *et al.*, 2012).

➤ **PCR quantitativo**

Em comparação com os métodos tradicionais de *PCR*, os métodos quantitativos são preferíveis por conta da sua especificidade (quando se utiliza uma abordagem TaqMan baseada em sonda) podem ser mais sensíveis (Pilliod *et al.*, 2014). A visualização dos resultados é feita através de uma curva de amplificação, facilitando desta forma determinar se uma amplificação foi positiva, o *qPCR* permite também quantificar o número de moléculas de ADN das espécies-alvo presentes, o que lhe confere uma vantagem em relação aos métodos tradicionais de *PCR* em uma amostra. O método de *qPCR* pode ter como base duas técnicas:

A primeira técnica baseia-se no uso de fluorocromos não específicos que ligam-se ao ADN de fita dupla (SYBR® Green), visando todo o ADN de fita dupla em uma amostra. A segunda técnica baseia-se no uso de sondas de hibridização que se ligam especificamente à cadeia de ADN libertando fluorescência após amplificação, gerando assim um sinal apenas quando o ADN da espécie-alvo está presente (por exemplo, TaqMan®) (Pilliod *et al.*, 2014).

➤ **Número de ciclos de PCR e réplicas**

A baixa concentração de ADN na amostra deve ser levada em consideração, deste modo devem ser tomadas precauções especiais na etapa de amplificação. O número de ciclos de *PCR* pode ser

aumentado para mais de 50, isso ocorre porque o eDNA é muitas vezes raro e menos ciclos resultam numa maior probabilidade de “perder” o ADN alvo. No entanto, deve-se ter cautela com essa abordagem, pois ela também pode aumentar o número de falsos positivos encontrados (Taberlet *et al.*, 1996).

Em outros casos, devido à estocasticidade da *PCR*, a possibilidade da *PCR* falhar porque os iniciadores não conseguem ligar o ADN alvo em concentrações muito baixas de ADN da espécie alvo), devem ser realizadas várias réplicas (Taberlet *et al.*, 1996).

➤ **Controles positivos e negativos**

Para poder detectar a contaminação, devem ser adicionados controles negativos à extração e à *PCR*. Idealmente, “campos negativos” também devem ser incluídos. Todos os tipos de controlos devem apresentar resultados negativos após a *PCR* final, garantindo aos profissionais que não ocorreu contaminação durante a extração ou *PCR*. Se um dos controlos negativos apresentar um resultado positivo para uma das espécies-alvo, todos os outros resultados deverão ser rejeitados. Controlos positivos, contendo ADN de boa qualidade do organismo alvo, também devem ser adicionados à *PCR*. Se um dos controlos positivos for negativo, algo deu errado durante o experimento e a análise deverá ser novamente feita. A inclusão de controlos negativos e positivos é crucial para resultados confiáveis (Pilliod *et al.*, 2014).

➤ **Verificar se há inibição**

A técnica do eDNA possui amostras que são colhidas no ambiente (Exemplo: água e sedimento). Deste modo, estas amostras colhidas no ambiente podem conter inibidores que podem condicionar a *PCR*. Alguns componentes foram identificados como potenciais inibidores: sais biliares e polissacarídeos complexos nas fezes, colágeno em amostras de alimentos e tecidos, heme no sangue, substâncias húmicas no solo, melanina e mioglobina nos tecidos, polissacarídeos e ácido tânico nas plantas, proteinases e íons de cálcio no leite e uréia na urina (Radstrom *et al.*, 2004).

Por exemplo é muito provável que o ácido húmico e os taninos sejam co-extraídos com eDNA e interajam durante a *PCR* ligando-se ao ADN (ácido húmico) ou proibindo a ligação da ADN-polimerase (taninos) (Opel *et al.*, 2010). Outra fonte inibidora pode ser a forma como o mesmo é armazenado, quando amostras de água são armazenadas em álcool, o ADN pode ser absorvido pela matéria orgânica e/ou inorgânica presente na amostra. Isto irá influenciar no rendimento do

ADN extraído, visto que o ADN absorvido não é libertado utilizando métodos tradicionais de extração de ADN e deste modo o próprio álcool pode ser uma fonte de inibidores de *PCR* (Goldberg *et al.*, 2013).

Adicionar um “gene controle” sintético às amostras em determinadas concentrações, pode auxiliar na redução da probabilidade de existirem erros falsos negativos. Este é um gene que não está presente na natureza. Os resultados do *qPCR* podem ser examinados quanto à presença deste gene de controle e, portanto, se houve alguma inibição na extração de ADN e se for detectada inibição, devem ser tomadas medidas para eliminá-la (Goldberg *et al.*, 2013).

Sequenciamento

A sequência do ADN é um pré-requisito para a análise detalhada de um gene. O método de sequenciamento de ADN mais utilizado é o automático, baseado no método de Sanger-Coulson, desenvolvido em 1979, também conhecido como método de terminação de cadeia, que permite determinar a ordem exata dos nucleotídeos em um segmento de ADN (Pilliod *et al.*, 2014).

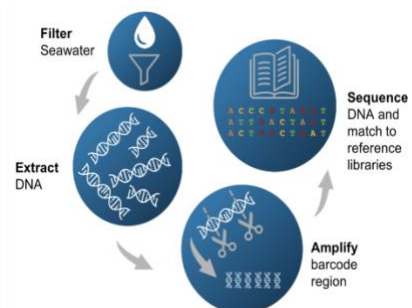
5.6. Análise de dados bioinformáticos

Uma vez, obtidas as sequências, estas são analisadas. Estas análises podem ser feitas, fazendo o uso de softwares bioinformáticas disponíveis. O primeiro passo é ter acesso a uma biblioteca mundial de sequências. Existem diferentes bases de dados, e uma das mais conhecidas é o código de barras da vida (BOLD). Neste momento, cada sequência carregada é classificada e armazenada, para posteriormente ser comparada com as sequências existentes no sistema (Díaz-Ferguson e Moyer, 2014).

O código de barras da vida permite a classificação de grupos de indivíduos relacionados, o que é conhecido como unidade taxonômica operacional (OTU), ou seja, as sequências são agrupadas por semelhança de sequências de ADN de um marcador taxonômico específico (Díaz-Ferguson e Moyer, 2014).

Outra base de dados é a encontrada no GenBank, que foi projetada para fornecer e fomentar o acesso da comunidade científica às informações das sequências de ADN mais atualizadas e completas, e faz parte do site do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), que promove a ciência e a saúde e fornece acesso à informação biomédica e genômica. Ele auxilia a

determinar se a sequência sequenciada existe ou não está nessa base de dados, ou se é uma sequência conhecida ou é a primeira vez que é detectada (Nichols *et al.*, 2012; Díaz-Ferguson e Moyer, 2014).



6.

Figura 3: Ilustração do processo do uso da técnica de

eDNA, desde a amostragem da água, de seguida a filtração da amostra para a obtenção dos fragmentos de eDNA, para a sua amplificação através da PCR e consequentemente o sequenciamento que permitirá a identificação do ADN sequenciado. **Importância do conhecimento ecológico**

O conhecimento ecológico é um factor chave para o alcance do sucesso na técnica do ADN ambiental. Assim sendo a estratégia de amostragem deve ser adaptada à biologia da espécie-alvo e ao ambiente. (Por exemplo, na pesquisa de Thomsen *et al.*, (2012a) estes encontraram uma probabilidade de detecção diferente entre dois ambientes diferentes (lagoas e riachos). A possível explicação desta diferença é que a coleta de 3 amostras de 15 ml de água é adequada para detecção de eDNA em ambientes de água estagnada, mas não em águas correntes, onde o eDNA é rapidamente diluído (Goldberg *et al.*, 2011).

Como o ADN não está distribuído de forma homogênea numa massa de água, os locais de amostragem devem ser seleccionados de acordo com a preferência de habitat das espécies-alvo. As amostras devem ser coletadas em áreas onde a espécie-alvo tem maior probabilidade de ser detectada. Por exemplo, se a espécie-alvo preferir habitat com vegetação, a amostragem deve ser orientada para esses habitats, para aumentar a probabilidade de detecção. Por esta razão, recomenda-se que a amostragem seja realizada por ecologistas que tenham um bom nível de conhecimento da ecologia da espécie-alvo (Herder *et al.*, 2013).

6.1. Probabilidade de detecção com o método eDNA

A probabilidade de detecção de eDNA pode ser descrita como a probabilidade de o ADN do organismo alvo ser detectado usando o método de eDNA, dado que o organismo alvo está presente

no local de amostragem. Essa probabilidade depende da estratégia de amostragem, habitat, densidade do organismo alvo e ecologia do organismo alvo e também de protocolos de extração, análises e especificidade do primer (Goldberg *et al.*, 2011).

Existem vários erros possíveis que podem levar a resultados falsos negativos e, portanto, a uma menor probabilidade de detecção. Portanto, é impossível especificar uma probabilidade geral de detecção para uma espécie-alvo, pois as fontes potenciais de erro diferem entre estudos e organizações que trabalham com eDNA (Jarde *et al.*, 2012).

No entanto, é possível estimar a probabilidade de detecção de eDNA para um determinado ensaio de eDNA em situações específicas (por exemplo, em certas condições ambientais em determinadas épocas do ano e em habitats comparáveis). Isto pode ser conseguido testando o método específico em vários locais com presença conhecida da espécie alvo. Isto dá uma probabilidade de detecção: por exemplo, em 80% dos 20 locais o método eDNA foi bem sucedido na detecção do organismo alvo (Herder *et al.*, 2013).

O conhecimento da probabilidade de detecção de um determinado método é importante para a interpretação dos resultados. A interpretação dos resultados positivos é simples: a espécie está presente (assumindo que foram tomadas medidas para evitar a ocorrência de falsos positivos (Nichols *et al.*, 2012).

A interpretação dos resultados negativos é mais desafiadora: (a espécie está ausente ou o método não conseguiu detectar a espécie?). O conhecimento das probabilidades de detecção com o método utilizado pode aumentar a confiança no resultado de um estudo. Isto não se aplica apenas ao método eDNA, mas também a outros métodos, como observações visuais, armadilhas, redes de imersão, etc. (Nichols *et al.*, 2012).

Outros resultados de estudos fornecem uma boa indicação da possível força do método eDNA na detecção de organismos alvo. A maioria dos estudos incluídos são aqueles em que o método foi testado em campo em locais com presença conhecida do organismo alvo, pois só assim é possível validar os resultados. Também estão incluídos alguns estudos que encontraram altas probabilidades de detecção sem conhecimento prévio da presença das espécies-alvo. Os testes em locais adicionais no futuro levarão a melhores estimativas das probabilidades de detecção (Herder *et al.*, 2013).

6.2. Principais vantagens e limitações

De modo geral técnica do eDNA reuni inúmeras vantagens, embora as limitações estejam de igual forma presentes nesta técnica como em qualquer outra técnica.

A principal vantagem desta técnica, é sem dúvida a sua alta sensibilidade para a detenção de espécies em qualquer tipo de ambiente e principalmente no ambiente marinho, esta técnica pode detectar a presença de espécies em densidades muito baixas sem muito esforço, a sua sensibilidade permite detectar organismos e identifica-los em qualquer estágio de vida sejam ovos, juvenis ou adultos, o que confere ao eDNA uma enorme vantagem principalmente no ambiente marinho onde as espécies possuem ciclos de vida bastante complexos (Van Delft e Creemers, 2013).

Um exemplo desta vantagem foi testado no estudo de um dos mais notórios exemplos de detecção de espécie fazendo o uso do eDNA é a esquiwa lula gigante (*Architeuthis dux*), gigantesca em tamanho, mas escondida dos humanos, apesar dos intensos esforços de levantamento. Durante muito tempo, foi conhecido apenas como carcaça lavada ou proveniente de redes de pescadores, mas sua ecologia e distribuição permaneceram um mistério. Uma sonda de PCR específica para espécie recentemente desenvolvida foi capaz de detectar o ADN da *A. dux* em amostras de água no Mar do Japão (Wada et al., 2020).

Outro estudo foi conduzido por Alex C.K; Raphael K; Anna W; Armin K.Z (2021). Usando o eDNA para detectar simultaneamente a distribuição de lagostins nativos e invasores em um país inteiro, onde foi possível detectar a ocorrência de espécies exóticas invasoras até em áreas onde as técnicas tradicionais não detectaram a ocorrência da espécie alvo.

Para além da sua alta sensibilidade, a outra principal vantagem é o facto da técnica não ser invasiva ao ambiente, primeiramente evitando a captura accidental de espécies, que é o que se verifica ao se usar as técnicas tradicionais por exemplo (Arrasto) que é tido como uma das principais causas da destruição das vegetações ribeirinhas e da zona costeira, como por exemplo as ervas marinhas e a destruição de habitats detentores de alta biodiversidade, criando fragmentos nestas áreas, e o eDNA mostra vantagem face a estas limitações (Bijkerk *et al.*, 2013).

No entanto a técnica apresenta de igual forma limitações, onde a principal limitação é a ausência de contacto directo/visual com a espécie alvo, o que permitiria a uma análise morfológica detalhada da espécie, e a técnica não permite-nos saber se a espécie-alvo está a se reproduzir no

ambiente em que está inserido ou não, e assim não saberemos as tendências de crescimento populacional por parte das espécies exóticas (Wada *et al.*, 2020).

Logo o uso em conjunto de ferramentas da técnica do eDNA é o uso dos métodos tradicionais pode garantir uma melhor qualidade de dados e resultados.

7. Capítulo 2: “Uso do eDNA na detecção e monitoria de espécies exóticas invasoras”

7.1. Uso do eDNA na detecção e monitoria de espécies exóticas e invasoras

Espécies invasoras são uma das maiores ameaças para a biodiversidade, estes podem afectar os serviços ecossistêmicos (Vila *et al.*, 2009). Embora 90% das espécies introduzidas fora da sua área de distribuição nativa tenham impactos biológicos negligenciáveis, várias espécies possuem as características para se tornarem invasoras e terem impactos ecológicos, económicos ou estéticos adversos (Mills *et al.*, 1993).

As espécies exóticas invasoras quando se estabelecem no ambiente podem competir, ou hibridizar com espécies nativas e podem funcionar como vetores de doenças exóticas. Existem no mundo numerosos exemplos, de espécies exóticas invasoras que afetam espécies e ecossistemas nativos (Dejean *et al.*, 2012). Por exemplo, Wilcove e Bean (1994) demonstraram que 68% dos peixes de água doce no território continental dos Estados Unidos, conhecidos por terem sido extintos entre 1890 e 1991, foram afectados negativamente pela introdução de peixes não nativos.

Estas espécies quando estabelecidas num sistema novo, é difícil controlar e provavelmente impossível erradicá-la completamente. A prevenção de novas introduções é, portanto, o componente mais crítico do manejo de espécies invasoras. A aplicação de vigilância com o método de eDNA demonstra que é possível monitorar uma via específica de espécies invasoras em escala regional (Vila *et al.*, 2009).

A detecção de espécies invasoras é, depois da avaliação da biodiversidade, o segundo objectivo mais importante de todos os estudos de eDNA de metazoários marinhos realizados até agora. A detecção precoce de espécies invasoras aumenta a probabilidade de que os esforços de controlo e erradicação sejam bem sucedidos. E, os custos associados à detecção precoce e aos subsequentes esforços de resposta rápida são muito inferiores aos dos programas de gestão a longo prazo para populações que já se estabeleceram e se espalharam (Anderson, 2005).

Para que se tenha sucesso em uma operação de erradicação de espécies invasoras é de extrema importância detectar as espécies ainda em baixas densidades. Na verdade esta é uma estratégia que deve ser aproveitada pois isto diminuirá subsequentemente os custos das acções de gestão e reduzirá o impacto no ecossistema envolvido (Dejean *et al.*, 2012).

No entanto, existe a necessidade de adopção de métodos que melhorem a probabilidade de detecção precoce de espécies exóticas invasoras. É de consenso que a criação de um quadro eficaz

de alerta precoce e de resposta rápida é um elemento crucial de qualquer política destinada a prevenir o estabelecimento de espécies invasoras ou a mitigar os impactos de invasões biológicas (Dejean *et al.*, 2012).

A política internacional concorda de igual modo com a ciência. A política internacional adotou a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) que afirma no seu artigo 8(h) que “Cada Parte Contratante deverá, na medida do possível e conforme apropriado, prevenir a introdução, controlar ou erradicar as espécies exóticas que ameaçam ecossistemas, habitats ou espécies” (CDB, 1992).

Na décima Conferência das Partes da CDB, foi adotada uma importante Meta, que trata da pressão exercida pelas espécies exóticas invasoras sobre a biodiversidade: “Meta 9: Até 2020, as espécies exóticas invasoras e os caminhos serão identificados e priorizados, as espécies prioritárias serão controladas ou erradicadas e existem medidas em vigor para gerir vias que impeçam a sua introdução e estabelecimento” (CBD, 2010).

De igual modo, a Comissão Europeia reconheceu formalmente a necessidade urgente de resolver o problema das espécies exóticas invasoras. Isto é afirmado no seu relatório “Rumo a uma Estratégia da UE sobre Espécies Invasoras” (COM, 2008). Onde compromete-se a desenvolver uma política sobre espécies exóticas invasoras e a estabelecer um sistema de alerta precoce. O Conselho de Ministros Europeu aprovou estes compromissos nas conclusões da sua 2953.^a reunião. Além disso, em 2009, os Ministros do Ambiente do G8 sublinharam a necessidade urgente de combater as espécies invasoras. Apelaram à criação de um sistema global de alerta precoce (Shine *et al.*, 2010).

O uso das ferramentas da técnica do ADN ambiental especialmente no estudo de espécies exóticas no país pode constituir um avanço significativo, principalmente em ambientes e/ou em estágios em que os métodos tradicionais se limitam, outra vantagem que a aplicação desta técnica promissora pode proporcionar é a obtenção de informação de base nos estágios iniciais ou de suspeita de invasão, necessária para as entidades de gestão de forma a desenvolver planos de monitoria e erradicação das espécies exóticas invasoras no ambiente ainda na sua fase inicial, antes que as mesmas alastrem-se de forma indiscriminada colocando em causa a ocorrência das espécies nativas e por último da biodiversidade (Shine *et al.*, 2010).

7.2. Alerta precoce com o método de eDNA

O ADN ambiental pode ser um elo crucial neste importante quadro de alerta precoce e de resposta rápida (EWRR), visto que permite a detecção precoce de espécies exóticas invasoras em densidades baixas e em qualquer fase da vida, o que é importante para a detecção de espécies raras e/ou secretas. (Dejean *et al.*, 2012; Ficetola *et al.*, 2008).

A amostragem fazendo o uso de métodos tradicionais, requerem um esforço adicional pois a probabilidade de detecção de espécies raras é baixa. E por este motivo, várias espécies invasoras não são detectadas até que tenham se estabelecido em grandes populações e se disseminando (Anderson, 2005).

Aumentando o esforço amostral (ou seja, aumentando o número de visitas ou armadilhas por local) a probabilidade de detecção de populações de baixa densidade pode aumentar. Aumentar suficientemente estes esforços de amostragem tradicional pode ser inviável em algumas situações (Jerde *et al.*, 2011). A amostragem de ADN ambiental demonstra ser um método muito mais eficaz para detectar populações (de baixa densidade) de espécies exóticas invasoras, (Dejean *et al.*, 2012; Ficetola *et al.*, 2008; Jerde *et al.*, 2011).

O uso do Ácido desoxirribonucléico ambiental (eDNA) libertado por espécies pode ser uma ferramenta sensível e eficaz para detecção de espécies (Ficetola *et al.*, 2008; Thomsen *et al.*, 2012). As técnicas de eDNA podem ser especialmente úteis na detecção precoce de espécies invasoras.

Além do mais, o eDNA pode ser uma ferramenta extremamente poderosa para monitorar e avaliar resultados de ações de gestão em campo. A aplicação deste método pode aumentar muito o conhecimento sobre quando, onde e por quanto tempo uma ação de gestão deve ocorrer. A ausência deste conhecimento pode levar à não tomada de medidas ou à execução de medidas ineficazes, ou mesmo excessivas e, portanto, desnecessariamente caras (Jerde *et al.*, 2011).

Uma vez estabelecida uma espécie exótica invasora, os custos das ações de controlo podem ser extremamente elevados e a sua erradicação completa pode não ser possível (EEA, 2010; Kraus, 2008). Nas fases iniciais após a introdução das espécies exóticas invasoras, a detecção da espécie é quase impossível, a menos que a sua densidade exceda um determinado limiar, este limite depende do método de monitoramento e do esforço utilizado. A detecção de espécies só pode ser possível quando a espécie já estiver bem estabelecida (Myers *et al.*, 2000).

As espécies exóticas invasoras são amplamente aceitas como uma das principais causas diretas da perda de biodiversidade. Contudo, grande parte da evidência para esta afirmação baseia-se em correlações simples entre a dominância exótica e o declínio das espécies nativas em sistemas degradados. Embora atraente, a causalidade direta não é a única interpretação possível (Lehtiniemi *et al.*, 2015).

Uma hipótese alternativa plausível é que a dominância exótica poderia ser a consequência indireta da modificação do habitat que leva à perda de espécies nativas. A detecção oportuna e as respostas de gerenciamento são de suma importância (Lehtiniemi *et al.*, 2015), e a vigilância tradicional pode ser ignorada quando a população ainda está localizada e em baixas densidades. Deste modo, o eDNA está a tornar-se uma ferramenta crucial no monitoramento da biossegurança em ambientes marinhos em todo o mundo (Bowers *et al.*, 2021).

Por exemplo o eDNA quando aplicado para vigilância do plâncton, o eDNA tem a vantagem sobre a amostragem tradicional de detectar o meroplâncton de forma mais eficaz e também contornar o problema de que a identificação morfológica de larvas e juvenis é muitas vezes desafiadora (Pochon *et al.*, 2013).

O eDNA recuperado de apenas alguns litros de água permitiu a detecção precoce de algas invasoras e nocivas numa lagoa mediterrânica. A utilização do eDNA como ferramenta de biovigilância tem o potencial de implementar esforços de erradicação em tempo útil para mitigar os efeitos devastadores das espécies invasoras nas comunidades marinhas em todo o mundo (Myers *et al.*, 2000).

De igual modo o impacto das actividades antropogênicas pode ser monitorado com estudos de impacto ambiental e, neste contexto, o eDNA parece ser uma ferramenta muito útil e rápida. Os exemplos incluem a monitoria do impacto das plataformas de produção de petróleo e das plataformas de gás offshore, nas assembleias bênticas circundantes, o impacto das visitas turísticas na meiofauna que habita as praias arenosas e o impacto da poluição metálica causada por um dejetos de minas na fauna estuarina bentônica (Myers *et al.*, 2000).

Além do mais, o eDNA revelou ser uma estratégia bem sucedida para revelar a contribuição das macrófitas para os sedimentos costeiros como fontes de carbono azul (carbono armazenado em ecossistemas costeiros e marinhos) (Geraldini *et al.*, 2019; Geraldini e Duarte, 2020).

Até aqui, existem poucos estudos que usam os resultados do eDNA para aplicar estratégias de manejo para espécies nativas e invasoras (Cristescu e Hebert, 2018) e, até onde sabemos, ainda não existem aqueles que aplicam o eDNA para implementar planos de conservação em todo o país. Este conhecimento deve ser usado para fornecer estratégias relevantes de manejo, incluindo o estabelecimento de áreas de espécies nativas e aplicação de técnicas de contenção, supressão e erradicação de espécies invasoras.

8. Capítulo 3: “Estágio de implementação da técnica do eDNA regional e localmente”.

8.1. Estágio de implementação da técnica do eDNA regional e localmente.

Os padrões de biodiversidade em África são amplamente compreendidos, no entanto, os desafios na monitoria de espécies e comunidades persistem. E no contexto das alterações climáticas, isto é mais ainda problemático, pois sabe-se que as espécies alteram a sua distribuição em resposta às variações ambientais e provavelmente na grande maioria da biodiversidade de África, os padrões de distribuição contemporâneos ou mesmo os requisitos amplos de habitat, que permitiriam a modelação preditiva de áreas de distribuição futuras, não foram ainda documentados (Brodie *et al.*, 2021).

A África e a América do Sul reportam menos estudos de ADN ambiental do que o Hemisfério Norte, e deste modo tem havido apelos para garantir um acesso igualitário aos dados gerados a partir de pesquisas de biodiversidade de eDNA para garantir uma melhor absorção e aplicação (Berry *et al.*, 2021).

A pesquisa procedida pela WoS reportou que 103 artigos, dos quais 65 foram retidos após avaliação (artigos excluídos não estavam focados em eDNA ou relatados em comunidades microbianas de vida livre. A maioria dos estudos foi realizada em ecossistemas terrestres (n = 51), com apenas nove e cinco focando sistemas marinhos ou de água doce, respectivamente. (Berry *et al.*, 2021).

Através de uma extensa pesquisa e filtragem bibliográfica, foram identificados 65 artigos de 22 países, com a investigação de Madagascar (n=10) e África do Sul (n=15) a constituir a maior parte da literatura (~38%), com muitos países representados apenas por um a três artigos. Houve uma gama diversificada de estudos, com mais da metade reportando sobre comunidades ou análises dietéticas; a pesquisa em água doce e marinha está sub-representada, representando cerca de 5% dos estudos. (Dejene *et al.*, 2021).

A importância de África para a biodiversidade global e os serviços ecossistémicos associados será severamente afectada sem o acesso equitativo à tecnologia eDNA e a todos os benefícios que esta oferece para a monitorização da biodiversidade. Este comentário explora pesquisas de ADN ambiental a partir de uma vasta gama de amostras ambientais, a fim de fornecer um estado de conhecimento da área em África (Berry *et al.*, 2021).

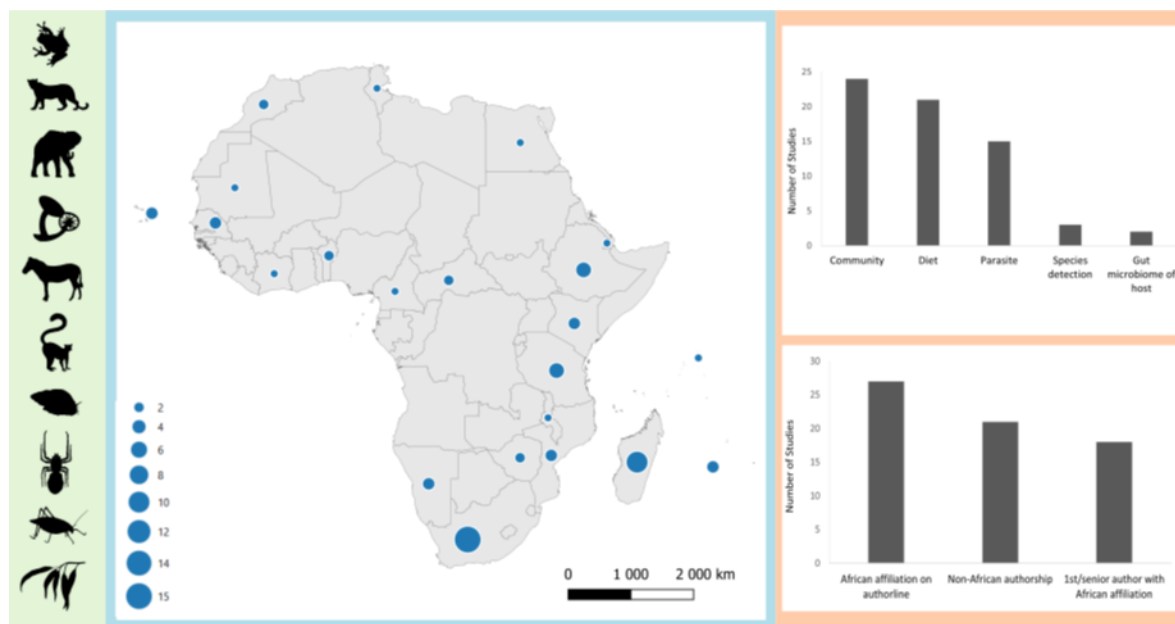


Figura 3: Mapa de África que fornece uma visão geral do número de artigos sobre pesquisas de ADN ambiental recuperados para cada país (painel central), bem como um subconjunto da diversidade taxonómica alvo de estudos (painel verde). O gráfico superior mostra as diferentes categorias de pesquisa de eDNA (observe que a “detecção de espécies” exclui parasitas), enquanto o gráfico inferior indica a autoria dos estudos. O tamanho dos círculos no mapa principal indica o número de estudos.

Recomendações para aumentar o número de pesquisas envolvendo o eDNA na África

1. Significativas colaborações que incluam investigadores africanos e que permitam o desenvolvimento de capacidades para a auto-suficiência a longo prazo, minimizando assim a dependência de investigadores externos. Isto inclui a identificação de problemas de investigação e a criação de projetos, incluindo o acesso a financiamento;
2. Garantir e permitir o acesso aos dados de biodiversidade do eDNA através da padronização de repositórios e relatórios de eDNA, que incluem não apenas dados, mas também métodos, a fim de facilitar aos investigadores incapazes de financiar viagens internacionais para o acesso às últimas novidades em eDNA sejam obtidas e comunicadas autorizações/permittões adequadas e válidas para a recolha de amostras;

3. Construção contínua de bases de dados de códigos de barras de ADN para permitir uma ligação mais precisa de espécimes a partir de dados de eDNA, apoiando assim a conservação, a gestão e o planeamento espacial (Bani *et al.*, 2020; Cristescu, 2014).

A técnica do ADN ambiental é mais implementada como uma ferramenta de investigação na América do Norte e Europa em comparação à África. Esta conclusão surge ao comparar-se o volume de literaturas disponíveis e provenientes destes continentes, em comparação com as literaturas disponíveis na África. Os fortes viés de literaturas disponíveis nos continentes Americano e Europeu, faz com que estas regiões sejam referências no que diz respeito ao uso do ADN ambiental, na detenção e monitoria de espécies, sejam elas nativas ou exóticas (Hanfling *et al.*, 2011).

Outros factores que possivelmente contribuem para que esta região seja uma referência, e que é uma limitação no continente africano, é a disponibilidade de recursos humanos altamente qualificados tanto para a colheita das amostras e tanto para o processamento e análise das mesmas em laboratório, outro factor é a disponibilidade de recursos financeiros para financiar projectos que envolvem o uso da técnica do ADN ambiental e deste modo a maior parte dos casos de estudo são provenientes da Europa e América do Norte devido ao forte viés de literatura naquelas regiões (Hanfling *et al.*, 2011).

Em Moçambique pesquisas envolvendo o uso da técnica do ADN ambiental ainda não foram documentados, este facto deve-se se calhar a falta de oportunidades de financiamento ou oportunidades de poder associar-se a outros pesquisadores que possuam capacidades para exercer pesquisas desta magnitude, transmitindo esta capacidade aos pesquisadores nacionais, contudo espera-se que futuramente este cenário mude e a aplicação da técnica do ADN ambiental seja uma realidade no país, visto que o país é rico em biodiversidade de recursos desde Marinhos, Aquáticos e Terrestres.

9. Conclusão

A técnica do ADN ambiental (eDNA) pode ser usada para detectar espécies-alvo em uma amostra colhida no ambiente (água, solo e ar ect.). O eDNA demonstra ser e pode ser uma ferramenta altamente eficaz em estudos de espécies exóticas invasoras. A técnica de eDNA apresenta um grande potencial para detecção precoce de espécies exóticas invasoras e no monitoramento de espécies invasoras, ameaçadas e nativas. Extensos conjuntos de dados para avaliações de biodiversidade podem ser gerados com, possivelmente maior resolução taxonômica e custos mais baixos.

As vantagens e desvantagens apresentadas por este método, sugerem um ponto importante em relação à correlação de métodos tradicionais e conhecimentos taxonômicos e ecológicos, com o poderoso potencial do eDNA. Somente integrando conhecimentos profundos sobre a biologia das espécies é que os resultados obtidos através dos estudos de eDNA podem ser frutíferos na conservação e monitoria de espécies. Se o objectivo for sistemas de conservação, monitorização e alerta precoce mais eficientes e rápidos para espécies e ecossistemas, é necessário ver o eDNA como um complemento e não como um substituto, ou concorrente, da monitorização e conservação tradicionais.

A aplicação deste método no país seria uma oportunidade para avaliar o eDNA para além da perspectiva teórica, e este método pode, se calhar impulsionar as investigações no ambiente marinho principalmente, visto que actualmente apenas os métodos tradicionais são aplicados até então, e durante esta abordagem pudemos perceber os inúmeros desafios associados ao uso de métodos tradicionais.

E, tendo em conta ao que tem ocorrido na Baía de Maputo (a ocorrência de espécies exóticas de camarão peneídeo) que colocam em causa a ocorrência de espécies nativas de camarão, pois acredita-se numa possível colonização das áreas de viveiro das espécies nativas pelas espécies invasoras, o que pode estar a resultar em sobreposição de nicho ainda na fase juvenil.

Este é um facto que deve ser considerado urgentemente, visto que as espécies nativas em causa são importantes tanto ecológica como economicamente. O eDNA apresenta as ferramentas de interesse que podem ser aplicadas neste estudo, fazendo a monitoria das espécies exóticas invasoras e nativas, com o objetivo de criar políticas de gestão tanto para as espécies nativas e não nativas, com o principal objectivo de conservar as espécies nativas.

10. Referências bibliográficas

- Abreu, M. J.; Santos-Wisniewski, I.; Rocha, M. J. I.; Orlando, T. C. I. *The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: Ceriodaphnia dubia (Richard 1894) and Ceriodaphnia silvestrii (Daday, 1902) (Crustacea Cladocera)* (2010). Braz.J. Biol. São Carlos Vol.70, no.1, 121-124, fev.
- Ates, A. S.; Katagan, T.; Sezgin, M.; Oscan, T (2013). *Exotic Crustaceans Of The Turkish Cost. Arthropods*. 2 (1): 20-25. Disponível em: www.iaees.org. Acesso em 28 de Fevereiro 2024.
- Azevedo, C., Dechoum, M. S., Zenni, R. D., Ziller, S. R. e Zalba, S. M (2010). *Cadernos da Mata Ciliar. Coordenadoria de Biodiversidade e Recursos Naturais*, São Paulo. 5 e 6 pp.
- Bailiff, M. & Karl, D. (1991). *Dissolved and particulate DNA dynamics during a spring bloom in the Antartic Peninsula region, 1986-1987*. Deep Sea Research. Part 1. Oceanographic Research, 38(8-9), 1077-1095.
- Barbieri, E. e Melo, G. A. S. (2006). *Biodiversidade: Ocorrência da Espécie Exótica Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) no Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida*. São Paulo (4): 654-659.
- Barnes, M.A., Turner, C.R., Jerde, C.L., Renshaw, M.A., Chadderton, L., Lodge, D.M. (2013). *Environmental Conditions Influence eDNA Persistence In Aquatic Systems*.
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Lindsay Chadderton, W., e Lodge, D. (2014). *Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems*. Environmental Science and Technology, 48, 1819-1827.
- Bezeng BS e van der Bank HF. (2019). *O DNA barcoding de crustáceos da África Austral revela uma mistura de espécies invasoras e potencial diversidade críptica*. PLoS ONE 14(9): e0222047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222047>
- Bijkerk, R., Patberg, W., Wannink, J.H., Wallaart, E., Warmink, J. (2013). *De toepassing van eDNA in de monitoring van waterorganismen: hoe ver zijn we en wat moeten we nog weten?*
- Crooks, J. A., e M. E. Soule (1999). *Lag times in population explosions of invasive species: causes and implications*. Pages 103–125 in O. T. Sandlund, P. J. Schei, and A. Viken

- (editors). Invasive species and biodiversity management. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- CBD, 1992. Convention on Biological Diversity. <http://www.cbd.int/>.
 - CBD, 2010. COP 10 Decision X/2. Strategic Plan for Biodiversity 2011-2020. <http://www.cbd.int/decision/cop/?id=12268>.
 - Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., Miaud, C. (2011) *Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems*. PLoS ONE 6, e23398.
 - Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., Miaud, C., (2012). *Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus**. J. Appl. Ecol. 49, 953–959.
 - Darling, J.A., e Mahon, A.R., (2011). *From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments*. Environ. Res. 111, 978–988.
 - Darling, J. & Mahon, A. (2012). *From molecules to management: Adopting DNA based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments*. Environmental Research, 111(7), 978-988.
 - Díaz-Ferguson, E. E. e Moyer, G. R. (2014). *History, applications, methodological issues and perspectives for the use environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments*. Revista de Biología Tropical. 62(4): 1273-1284.
 - Díaz-Ferguson, E., Haney, R., Wares, J., & Silliman, B. (2010). *Populations genetics of a trochid gastropod broadens picture of Caribbean Sea connectivity*. PLoS ONE, 5(9), e12675.
 - Díaz-Ferguson, E. (2012). *Introducción a la ecología molecular marina: aplicaciones y perspectivas*. Via Argentina, Panamá, República de Panamá. Universal Books. 212p.
 - EEA, 2010. *Towards an early warning and information system for invasive alien species (IAS) threatening biodiversity in Europe*.
 - Eichmiller J.E., Best S.E., Sorensen P.W. (2016). *Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water*. Environ. Sci. Technol., Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/acs.est.5b05672.

- FAO, Fid/Cp/Moz Fishery Country Profile. Disponível Em: <http://www.fao.org/fi/oldsite/FCP/en/nam/profile.htm>. 2007. Acesso: 27 de Fevereiro de 2024.
- FAO. Governo de Moçambique. Quadro das Demandas e Propostas de Guiné-Bissau para o Desenvolvimento de um Programa Regional de Cooperação entre Países da CPLP no domínio da Luta contra a Desertificação e Gestão Sustentável das Terras. TCP CPLP/FAO -MADRRM, orgs: MOSQUITO, D.; SAMO, G; DE DEUS, N. 2009. Disponível: Site do TCP CPLP/FAO www.fao.org/tc/cplpunccd. Acesso: 24 de fevereiro de 2024.
- Ficetola, G., Coissac, E., Zundel, S., Riaz, T., Shehzad, W., Bessière, J., Taberlet, P., Pompanon, F., (2010). *An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes*. *BMC Genomics* 11, 434.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., (2008). *Species detection using environmental DNA from water samples*. *Biol. Lett.* 4, 423.
- Foote, A., Thomsen, P., Sveegaard, S., Wahlberg, M., Kielgast, J., Kyhn, L., Salling, A., Galatius, A., Orlando, L., Thomas, M., & Gilbert, T. (2012). *Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals*. *PLoS ONE*, 7 (8), e4178.
- Goldberg, C. S., D. S. Pilliod, R. S. Arkle, e L. P. Waits. (2011). *Molecular detection of cryptic vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders*. *PLoS One* 6: e22746.
- Goldberg, C., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., e Waits, L. (2013). *Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (Potamopyrgus antipodarum)*. *Freshwater Science*, 32 (3), 792-800.
- Hallé, F., clemen. G, Loteurneux. F. (2023). *Espécies exóticas, uma ameaça?*. Olhares. São Paulo.
- Herder, J.E., A. Valentini, E. Bellemain, T. Dejean, J.J.C.W. van Delft, P.F. Thomsen e P. Taberlet. (2013). *Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species*. Stichting RAVON, Nijmegen.
- Jerde, C.L., Mahon, A.R., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., (2011). *"Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA*. *Conserv. Lett.* 4, 150–157.

- Jones, J.B., (1992). *Environmental impact of trawling on the seabed: A review*. N. Z. J. Mar. Freshw. Res. 26, 59–67.
- Leão, T. C. C., Almeida, W. R., De Sá Dechoum, M. e Ziller, S. R. (2011). *Espécies Exóticas Invasoras no Nordeste do Brasil*. Contextualização, Manejo e Políticas Pública. 11 pp.
- Levy-Booth DJ, Campbell RG, Gulden RH. (2007). *Cycling of extracellular DNA in the soil environment*. *Soil Biology and Biochemistry*. 39, 2977–2991.
- Lodge, D.M., N.D. (2012). *Biological Invasions: Recommendations For U.S. Policy And Management*.
- Mills L.S., Citta J.J., Lair K.P., Schwartz M.K., Tallmon D.A. (2000). *Estimating animal abundance using noninvasive DNA sampling: promise and pitfalls*. *Ecological Applications* 10: 283–294, [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[0283:EAAUND\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[0283:EAAUND]2.0.CO;2)
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., e de Fonseca, G. A. B. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858.
- Moyer GR, Díaz-Ferguson E, Hill JE, Shea C (2014). *Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems*. *PloS ONE* 9: e103767, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103767>.
- Nichols, R.V., Königsson, H., Danell, K., e Spong, G. (2012). *Browsed twig environmental DNA: diagnostic PCR to identify ungulate species*. *Mol. Ecol. Resour.* 12, 983–989.
- Ogram, A., Sayler, G., e Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*. 7, 57-66.
- Paul, J., Kellogg, C., e Jiang, S. (1996). *Viruses and DNA in marine environments*. In R. R. Colwell (pp. 115- 124) (Eds.). *Microbial diversity in time and space*. Plenum Press, New York.
- Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Leramie, M.B., Waits, L.P. (2012). *Application of Environmental DNA for Inventory and Monitoring of Aquatic Species* (No. 3146), U.S. Geological Survey Fact Sheet.
- Rilov, G., Crooks, J. A. (2009). *Biological Invasions in Marine Ecosystems: Ecological, Management, and Geographic Perspectives*. Alemanha: Springer.

- Rodriguez, C. F., Becares, E., Fernandez-Alaez, M., Fernandez Alaez, C. (2005). *Loss of diversity and degradation of wetlands as a result of introducing exotic crayfish*. Biological Invasions 7: 75-85, doi:10.1007/s10530-004-9636-7.
- Rosenzweig, M.L. (2001). *The four questions: what does the introduction of exotic species do to diversity?* Evol. Ecol. Res. 3, 361–367
- Rees, H.C., Maddison, B.C., Middleditch, D.J., Patmore, J.R., Gough, K.C. (2014). The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51. pp. 1450-1459. ISSN 0021-8901.
- Shapiro, B. (2008). *Engineered polymerases amplify the potential of ancient DNA*. Trends Biotechnol 26: 285–287.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L.H. (2012). *Environmental DNA*. Mol. Ecol. 21, 1789–1793.
- Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H. (2013). *Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds*. PLoS ONE 8, e56584.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., Kawabata, Z. (2012). *Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA*. PLoS One 7, e35868.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E. (2012a). *Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA*. Mol. Ecol.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M., Willerslev, E. (2012b). *Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples*. PLoS One 7, e41732
- Van Delft, J.J.C.W., Herder, J.E. (2014). *Analyse eDNA Italiaanse kamsalamander 2013* (No. 2013.108). Stichting RAVON i.o.v. De Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit, Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering, Team Invasieve Exoten., Nijmegen, the Netherlands.
- Vitousek, P.M. (1996) *Biological invasions as global environmental change*. Am. Sci. 84, 468–478
- Willerslev, E., Capellini, A., Boomsman, W. R., e Nielsen, M. (2007). *Ancient biomolecules from deep ice cores reveals a forested Southern Greenland*. Science, 317, 111-114

- Wilcox, T.M., McKelvey., K.S., Young., M.K., Jane., S.F., Lowe., W.H., Whiteley., A.R., Schwartz., M.K., (2013). Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. PLoS ONE 8, e59520.
- Wilcove, D.S. (1998) *Quantifying threats to imperiled species in the United States*. Bioscience 48, 607–615.
- Wilson, E. O. (1997). A situação atual da diversidade biológica.” In Biodiversidade, de Wilson." In A situação atual da diversidade biológica., by Wilson E.O., P 3-24. Rio de Janeiro-Brasil: In Biodiversidade, de Wilson.
- Yoccoz, N.G., (2012). *The future of environmental DNA in ecology*. Mol. Ecol. 21, 2031–2038.
- Zhu, B. (2006). *Degradation of plasmid and plant DNA in water microcosms monitored by natural transformation of real time polymerase chain reaction (PCR)*. Water Research, 40, 3231-3238.



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Biologia Marinha, Aquática e Costeira

Proposta de Trabalho

Tema: Identificação das áreas de viveiro (estuarinas) da Baía de Maputo, colonizadas pelas espécies de camarão exótico *Metapenaeus dobsoni* e *Mierspenaeopsis sculptilis* (Heller, 1862) através da técnica do eDNA.

Autora:

Lukoji, Victória Clotilde

Supervisora:

Prof^ª. Doutora. Daniela C. de Abreu

Co-Supervisoras:

Doutora Elisa Taviani

Mestre Erica Tovela

Maputo, Setembro 2024

Índice

1. Introdução	3
1.1. Problema e justificativa	6
1.1.1. Problema	6
1.1.2. Justificativa	6
2. Objectivos	8
2.1. Objectivo geral	8
2.2. Objectivos específicos	8
3. Hipóteses	8
4. Área de estudo	9
5. Material e Métodos	11
5.1. Material	11
5.1.1. Material para validação	11
5.1.2. Material laboratorial	11
5.1.3. Amostragem de água	11
5.2. Metodologia	12
5.2.1. Amostragem	12
5.2.2. Técnicas de amostragem Definição do tamanho da amostra	12
5.2.3. Validação das áreas de amostragem	12
5.2.4. Trabalho de campo-amostragem da água	12
5.2.5. Tratamento laboratorial	13
5.2.6. Desenho dos primers e sondas específicas	13
5.3. Detecção do gene subunidade 1 da citocromo C Oxidase (COI)	14
5.3.1. Condições de Ciclagem do PCR	14
5.3.2. Análise do produto de PCR	15
5.4. PCR quantitativa	15
5.5. Análise de dados	16
6. Cronograma	17
7. Orçamento	18
8. Referências bibliográficas	20

1. Introdução

Os crustáceos são animais invertebrados pertencentes ao filo Artropoda, sendo um exemplo o camarão. O camarão da família Penaeidae é um recurso de elevada importância para o país, tanto ecológica, como economicamente. Este é recurso alvo da pesca dos três tipos de pescaria nacional (artesanal, semi-industrial e industrial) particularmente nas duas maiores áreas de pesca do país: o Banco de Sofala e a Baía de Maputo (IIP, 2015).

A pesca do camarão da família Penaeidae em todo o mundo suporta um valor de cerca de 68 milhões de dólares anualmente (FAO, 2007). No país, esta pescaria é hoje a segunda mais importante e rentável, desembarcando centenas de toneladas anualmente (IIP, 2007). Na Baía de Maputo, a segunda maior área de pesca de camarão do país, a actividade pesqueira é realizada nos estuários e na parte central da Baía, próximo à boca dos principais estuários, onde a pesca artesanal e semi-industrial do camarão é documentada desde o ano de 1960 (Macie, 1990).

As principais espécies de camarão nativo alvo da pesca e de maior importância na Baía de Maputo são: *Penaeus indicus* (conhecido como camarão branco), *Penaeus monodon* (conhecido como camarão tigre gigante), *Penaeus semisulcatus* (conhecido como camarão flor), *Penaeus japonicus* (conhecido como camarão tigre), *Metapenaeus monoceros* (conhecido como o camarão castanho) e *Metapenaeus stebingii*, Sendo *P. indicus* e *M. monóceros* os que perfazem a maior percentagens das capturas (MIMAIP, 2019).

O nível de capturas deste recurso tem reduzido na Baía de Maputo, e uma das possíveis causas, para além da sobrepesca, é a ocorrência de duas espécies de camarão exóticas que: *Metapenaeus dobsoni* (conhecido como o camarão “kadal”) e *Mierspenaeopsis sculptilis* (Heller, 1862) (conhecido como o camarão arco-íris), ambas da família Penaeidae, cuja identificação foi confirmada no ano 2013 (IIP, 2015). O surgimento dessas espécies gera grande preocupação para as autoridades e a comunidade, pois são espécies que atingem menor tamanho, logo têm um menor valor comercial, e a sua presença é acompanhada por uma redução das capturas das espécies nativas, visto que presentemente as espécies exóticas representam mais de 50% das capturas semi-industriais (IIP, 2015).

As espécies exóticas por vezes são competitivamente mais fortes e podendo até eliminar as espécies nativas, através da sobreposição de nicho trófico, de habitat e outras interações bióticas (predação, competição, ect) em diversas fases do ciclo de vida (Azevedo et al., 2010).

O ciclo de vida do camarão da família Penaeidae é feito em várias fases, onde inicialmente as fêmeas geram e libertam os ovos em alto mar e, após algumas semanas as larvas planctónicas migram para zonas próximas à costa onde ocupam as áreas de viveiro, e terminam o ciclo quando estes retornam as águas oceânicas (Primavera, 1998; Ronnback et al, 2002).

Habitats costeiros tropicais, tais como estuários, mangais e tapetes de ervas marinhas, são tidas como importantes áreas de viveiro para muitas espécies de importância comercial, incluindo camarões da família Penaeidae (de Abreu, 2017).

Sendo a fase juvenil altamente vulnerável e sendo os camarões da família Penaeidae um grupo de organismos que faz uso destas áreas de viveiro natural, é importante perceber se na Baía de Maputo, as áreas naturais de viveiro das espécies nativas (áreas estuarinas) estão colonizadas pelas espécies exóticas.

O estudo de espécies exóticas é de extrema importância, devido as características ameaçadoras por si apresentadas, conhecer a biologia destas espécies exóticas e compreender como estes organismos comportam-se no ecossistema em que estão inseridos, pode auxiliar significativamente na compreensão de seus impactos, e na tomada de decisões que ajudem a poupar o ecossistema dos impactos negativos por si causados, sendo a invasão de espécies a segunda maior ameaça para a perda da biodiversidade (Bezeng e Van der Bank, 2019).

Uma das técnicas práticas e de baixo esforço amostral para confirmar a presença e colonização de espécies exóticas no ambiente é a de ADN ambiental *eDNA* (NISC,2022).

A técnica do *eDNA*, permite detectar a presença do ADN libertado por animais e plantas quer seja na água, solo, sedimento e ar, e permite a identificação taxonômica precisa de espécies baseada em marcadores moleculares (NISC, 2022). Estas amostras são úteis para determinar a presença ou ausência da espécie-alvo ou para caracterizar a biodiversidade de uma comunidade ecológica (NISC,2022; Alex *et al.*,2021).

O uso da amostragem de *eDNA* permite inferir sobre a presença ou ausência da espécie, quer seja nativa ou exótica e mesmo quando apenas um (1) ou alguns estão presentes na área de interesse, incluindo indivíduos pequenos, crípticos ou difíceis de diferenciar morfologicamente (NISC, 2022Alex *et al.*,2021).

O ADN pode durar uma estação no ambiente, particularmente na água, porém esta duração pode variar em mais ou em menos tempo dependendo da taxa do fluxo da água do rio ou estuário. Tendo em conta a característica dos estuários quanto ao fluxo da água, o ADN pode durar mais que uma estação completa. E, esta técnica permite ainda detectar a presença da espécie-alvo ao longo do ano (Alex et al, 2021).

Apesar da técnica permitir detectar a presença da espécie alvo sem muito esforço amostral é importante confirmar a presença da espécie antes que se colha a amostra, pois é a partir desta validação que se confirma a ocorrência da espécie-alvo nos locais onde as amostras serão colhidas, e deste modo se pode comparar os resultados da validação com os resultados obtidos através da técnica do *eDNA* (Darling, 2019; Alex *et al.*, 2021).

Adoptar unicamente a técnica do *eDNA* sem a validação pode fazer cair em um erro falso positivo. É importante usar os métodos tradicionais para confirmar a ocorrência da espécie-alvo, métodos tradicionais como a captura e visualização (Darling, 2019).

São escassos estudos sobre as espécies exóticas no território nacional, principalmente no que diz respeito as áreas de viveiro por si ocupadas nas fases de juvenis e sua sobreposição de nicho com as espécies nativas em fase juvenil.

O presente estudo pretende, aplicando a técnica de *eDNA* identificar áreas de viveiro da Baía de Maputo, ocupadas pelas espécies exóticas de camarão, afim de colher informação que será útil para as autoridades de manejo, de modo a desenvolver estratégias para o monitoramento das espécies exóticas, bem como obterem informação para desenhar um plano de gestão para as espécies nativas, afim de evitar danos futuros, como a perda destas espécies de elevada importância para o país.

1.1. Problema e justificativa

1.1.1 Problema

Em Moçambique nos últimos tempos as pescarias de camarão vem registando redução dos níveis de captura (Malauene, 2015). Criando um desequilíbrio no ecossistema e na economia do País, várias causas estão relacionadas a esta redução, causas antrópicas como a sobrepesca, destruição dos ecossistemas, uso de redes nocivas, que suscitaram o interesse de gestores para a criação e implementação de medidas de gestão e controlo das pescarias (Sousa *et al.*, 2011) Contudo apesar dos esforços empregues pelas entidades de gestão tem se registado ainda a redução destas pescarias, o que pode estar relacionado a causas naturais como a ocorrência de espécies exóticas e talvez as mudanças climáticas. São escassas informações e dados detalhados sobre as espécies exóticas de camarão que ocorrem na Baía, porém a bibliografia indica possuírem um nicho ecológico semelhante ao das espécies nativas (Dall, 1990).

Será que as duas espécies exóticas de camarão colonizaram todas as áreas de viveiro (estuarinas) da Baía de Maputo?

1.1.2. Justificativa

As espécies exóticas possuem um ciclo de vida semelhante ao das espécies nativas (Dall, 1990) ambas passam parte do seu ciclo de vidas em áreas de viveiro na fase de juvenil e, após algum tempo migram para a área de pesca na fase adulta.

Tendo a presença das espécies exóticas na Baía de Maputo sido acompanhada por uma redução das capturas das espécies nativas, visto que presentemente as espécies exóticas representam mais de 50% das capturas semi-industriais (IIP, 2015), surge a necessidade de um estudo pormenorizado sobre as áreas de viveiro natural colonizadas pelas espécies exóticas na sua fase de juvenis, fase potencial maior vulnerabilidade das espécies nativas em caso de sobreposição de nicho.

Trabalhos incluindo as duas espécies exóticas *Metapenaeus dobsoni* e *Mierspenaeopsis sculptilis* na sua fase juvenil e sobre aspectos relacionados as áreas de viveiro por si ocupadas são escassos, sendo que estas representam perigo para espécies nativas. Pois a invasão de espécies é a segunda maior ameaça para a perda da biodiversidade (Bezeng e Van der Bank 2019).

Através da técnica do *eDNA* que é uma ferramenta que permite detectar a presença de espécies-alvo (de estudo) com maior sensibilidade, em pouco tempo, e com menor esforço amostral (Darling, 2019), acredita-se que se poderá gerar informação que servirá de base para as autoridades de manejo para o desenvolvimento de estratégias de gestão e protecção dos recursos em causa.

2. Objectivos

2.1. Objectivo geral

- Conhecer as áreas de viveiro (estuarinas) da Baía de Maputo, ocupadas pelas espécies de camarão exótico *Metapenaeus dobsoni* e *Mierspenaeopsis sculptilis* através da técnica do *eDNA*.

2.2. Objectivos específicos

- Verificar a eficácia da técnica do *eDNA* na identificação de espécies exóticas de camarão, presentes nas amostras ambientais de água, que tenham ocupado as áreas de viveiro estuarinas da Baía de Maputo;
- Confirmar as áreas de viveiro da Baía de Maputo colonizadas pelas espécies de camarão exótico.

3. Hipóteses

As espécies exóticas possuem um ciclo de vida semelhante ao das espécies nativas (Dall, 1990) ambas passam parte do seu ciclo de vidas em áreas de viveiro na fase de juvenil e, após algum tempo migram para a área de pesca na fase adulta.

Considerando que as espécies de camarão exótico *Metapenaeus dobsoni* e *Mierspenaeopsis sculptilis* representa em conjunto 50% da captura na pesca semi-industrial, espera-se deste modo, que estas duas espécies de camarão exótico estejam a colonizar todas as áreas de viveiro (estuarinas) das espécies nativas de camarão na Baía de Maputo.

4. Área de estudo

A Baía de Maputo, localiza-se no Sul de Moçambique (26° 04'S, 34° 45'E) (**Figura 1**) com uma largura de 34 km e comprimento de 90 km é limitada a leste pela Ilha da Inhaca. O clima predominante é tropical seco, o período mais quente do ano ocorre entre os meses de Novembro-Abril (estação chuvosa) e o mais frio, de Maio-Outubro (estação seca). A Baía é bem misturada na maioria das partes, a salinidade e a temperatura média da Baía é de 31 PSU e 26° C respectivamente, nas partes centrais. As marés são semidiurnas com uma amplitude acima dos 3m (Hoguane, 1998). Resultando no transporte de águas para o sul durante a maré cheia e com uma velocidade máxima de 0.8-1.0 m s⁻¹ na parte central da baía, apenas 175Km² da Baía é profunda (10m) e 250Km² da área fica exposta durante a maré baixa (de Freitas, 1969).

Cinco rios desaguam na Baía de Maputo, dando origem a três grandes estuários (Estuário do Espírito santo, Maputo e Incomáti), onde os rios Maputo e Incomáti efectuam maiores descargas na Baía. A máxima descarga ocorre no mês de Fevereiro durante a estação chuvosa, quando ocorre a intensificação do gradiente de salinidade horizontal proveniente do estuário para dentro da Baía e a fraca estratificação é observada na Baía. Durante a estação chuvosa de Maio a Outubro a Baía torna-se bem misturada e a circulação é impulsionada principalmente pelas marés (Canhanga e Dias, 2014). Os três estuários são rasos geralmente (<10m) com águas turvas, a salinidade varia dos (5-40 PSU) e são limitados na maior parte por florestas de mangal (Kramer et al., 2003; Kijper e Rjin 2011; Scarlet, 2015). E, representam importantes áreas de viveiro de camarão na Baía de Maputo (de Abreu, 2017).

Uma extensa floresta de mangal limita a parte sudoeste da Baía de Maputo, do foz da Baía de Maputo até a área do Bembe, que é uma enseada costeira rasa com pouca influência de água doce. O mangal também é encontrado em parte na Ilha da Inhaca, cujo mangal do Saco da Inhaca (localizado no Sul da ilha) representa uma importante área de viveiro de camarão (de Abreu, 2017), e um largo tapete de ervas marinhas (de Boer, 2002). As principais espécies dominantes de mangal nos estuários da Baía e ao longo da costa são: *Avicennia marina*, *Rhizophora mucronata*, *Bruguiera gymnorhiza* e *Ceriops tagal* (Paula et al., 2014).

Para uma descrição biológica da Baía de Maputo mais detalhada, consultar (de Paula e Bandeira, 2014). São desenvolvidos diferentes níveis de actividade nos estuários, todos são usados para a

prática da agricultura intensiva, particularmente a montante, tornando-se vulnerável ao *input* de fertilizantes e pesticidas (Scarlet e Bandeira, 2014).

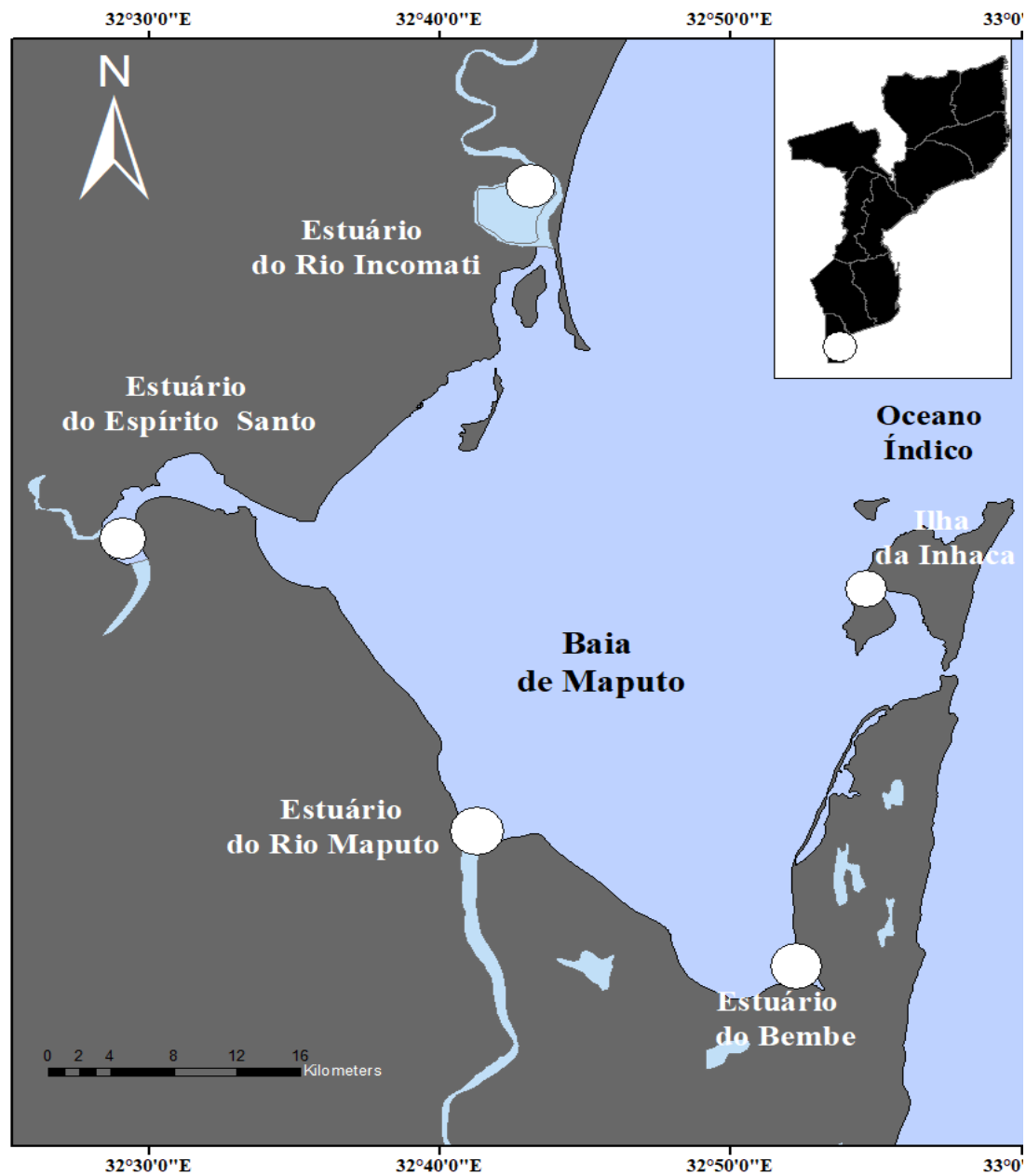


Figura 1: Mapa da localização geográfica das áreas de amostragem, estuários da Baía de Maputo, e o Saco da Inhaca na Ilha da Inhaca. **Fonte:** ArcGis Adaptado por Victoria Lukoji (2023).

5. Material e Métodos

5.1. Material

5.1.1. Material para validação

- Barco
- Redes de arrasto (1 x 0,5m boca com malha de 2mm).
- Plásticos ziplocks grandes;
- Gelo seco
- Caixas térmicas
- Etiqueta
- Marcador
- Canetas

5.1.2. Material laboratorial

- Bloco de anotações;
- Lápis e Marcadores;
- Congelador;
- Frascos com amostras;
- Guia de identificação de espécies;
- Pinça;
- Sonda multiparamétrica Hanna;
- ▶ Luvas;
- ▶ Sabão;
- ▶ Kit de extração;
- ▶ Kit de purificação;
- ▶ Kit de qPCR/PCR;
- ▶ Primers

5.1.3. Amostragem de água

- Barco
- Garrafas plásticas (5L)
- Seringa
- Filtro seringa
- Membrana de filtro
- Luvas
- ▶ Tubos falcon
- ▶ Gelo seco
- ▶ Caixas térmicas
- ▶ Etiqueta
- ▶ Marcador
- ▶ Álcool etílico 99%

5.2. Metodologia

5.2.1. Amostragem

O presente estudo será realizado com base em amostras ambientais de água, a serem colectadas em Fevereiro de 2025. As amostras de água serão colectadas nos três grandes estuários da Baía de Maputo, na área do Bembe e no Saco da Inhaca no período diurno em condições de maré morta.

5.2.2. Técnicas de amostragem Definição do tamanho da amostra

5.2.3. Validação das áreas de amostragem

A validação será feita em todos os pontos de amostragem predeterminados, Estuário do Espírito Santo, do Rio Incomáti, do Rio Maputo, e na área do Bembe e no Saco da Inhaca, usando os métodos tradicionais de captura e visualização através de redes de arrasto de superfície (1 x 0,5m boca com malha de 2mm) descrito em de Abreu (2017) O objetivo desta validação é de reforçar a técnica do *eDNA*, confirmando a ocorrência desta espécie e consequentemente o seu ADN libertado naquela área.

5.2.4. Trabalho de campo-amostragem da água

Fazendo uso de um barco com motor fora de bordo, serão colhidas amostras de água 2 litros em dois pontos de cada área da amostragem. Um ponto será próximo à boca dos estuários e da abertura do Saco da Inhaca e da área do Bembe para a Baía. O segundo ponto será no interior dos estuários, e do Saco da Inhaca e da área do Bembe. Nos estuários este ponto será definido pelo limite da salinidade referente ao limite fisiológico inferior de tolerâncias das espécies de camarão e no Saco da Inhaca e na área do Bembe irá ser considerado no limite da franja de *Avicennia marina* que limita estas áreas. Durante a amostragem serão colhidos de igual forma os parâmetros físico-químicos da água, fazendo uso de uma sonda multiparamétrica (parâmetros medidos: temperatura (oC), salinidade (PSU), turbidez (NUT), pH e profundidade (m).

Cada amostra de 2 litros será colectada em um balde, e transferidas para garrafas pet de 2 litros, e serão encaminhadas para o Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane onde serão utilizados aparelhos de filtração específicos que utilizam bombas de vácuo para acelerar a filtração. Após a filtração o filtro é transferido com pinça estéril para um tubo de *falcon* com etanol a 99% ou para um tubo do kit PowerWater DNeasy (Qiagen). Os tubos serão transportados do local da filtração para o Laboratório de Caracterização Genética do Museu de História Natural em

gelo numa caixa térmica. Onde serão armazenados no congelador a temperatura de -20°C até a extração do ADN.

5.2.5. Tratamento laboratorial

Extração do DNA

1. O equipamento de laboratório será desinfetado com solução de alvejante a 10% e etanol e descontaminados sob luz ultravioleta e;
2. Os filtros serão removidos e preservados em etanol 99% e serão deixados a secar em placas de Petri estéreis;
3. De seguida os filtros serão dobrados (ou rasgados) e serão colocados em microtubos de 1,5 mL. Serão adicionados 500 µl de tampão ATL se estiver usando o DNEasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) ou o tampão do Water power Kit (Qiagen) o Power Water DNA Isolation Kit (MoBio, Hilden, Germany);
4. Serão incubados com 50 µl de proteinase K durante a noite a 37°C ou 56°C por 2h em uma plataforma oscilante (200 rpm);
5. Antes de prosseguir com a extração, será removido todo o filtro com uma pinça estéril. Em caso de um filtro fragmentado, irá se centrifugar e separar o sobrenadante em um novo tubo;
6. De seguida será feita a extração do ADN de acordo com o protocolo padrão do fabricante. O ADN extraído será eluído num volume de eluição 100 µl. O ADN eluído será purificado usando o OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research, Irvine, CA, EUA) com um volume final de 100 µl (Alex *et al.*, 2021).

5.2.6. Desenho dos *primers* e sondas específicas

1. O desenho dos *primers* e sondas só será feito no caso de os *primers* e ensaios de PCR já testados para as duas espécies-alvo não sejam indicados na literatura.
2. Os *primers* específicos das espécies *Metapenaeus dobsoni* e *Mierspenaeopsis sculptilis*, serão desenhados visando o gene mitocondrial da subunidade 1 da citocromo C Oxidase (COI) das espécies alvo, serão projetados usando o software Geneious Pro R10 ou o software UGENE ou o software Primer3. Para *qPCR*, uma sonda 6-FAM marcada é desenhada para complementar o *forward and reverse primers* para aumentar a

especificidade da reação. Isso resultará na amplificação de um fragmento de 2.000 p/b de ADN da região *COI* quando amplificado.

3. Sequências de diferentes espécies estreitamente relacionadas, que são taxonomicamente semelhantes e provavelmente presentes nos mesmos habitats, serão utilizadas durante o desenvolvimento e avaliação da sensibilidade e especificidade do ensaio.

5.3. Detecção do gene subunidade 1 da citocromo C Oxidase (*COI*)

1. A reação de *PCR* será preparada em tubos de paredes finas usando o sistema de *PCR* GeneAmp 2700 (Applied Biosystems).
2. Será feita uma MasterMix de *PCR* contém os seguintes componentes: 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase.
 - Buffer de *PCR* com 1,5 mM de MgCl₂.
 - 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (*dNTP*).
 - 0,2 µM do primer PA.
 - 0,2 µM do primer PD.
 - 10 µL do ADN molde.
 - O volume total da reação é de 100 µL.

5.3.1. Condições de Ciclagem do *PCR*

1. As amostras serão desnaturadas a 95°C por 15 minutos. Este início quente será utilizado para evitar a amplificação não específica.
2. A amplificação consistirá em:
 - Pré-desnaturação a 94°C por 3 minutos
 - Desnaturação a 94°C por 30 segundos
 - Recozimento a 60°C por 30 segundos
 - Anelamento a 58°C por 1 minuto.
 - Extensão a 72°C por 1 minuto.
 - Um total de 32 ciclos são realizados.
 - Extensão do complexo a 72°C por 10 minutos.

Nota: Controles negativos com água destilada estéril no lugar do *DNA* molde serão incluídos para verificar a contaminação.

5.3.2. Análise do produto de *PCR*

1. O produto de *PCR* será detectado por eletroforese em gel de agarose a 2%, e o produto único e brilhante da tira de eletroforese foi selecionado para extração em gel usando um kit de extração em gel (OMEGA). O tamanho do fragmento do produto de *PCR* foi determinado usando uma escada de ADN de 2.000 pb.

Purificação dos Produtos de *PCR*

1. Os produtos de *PCR* serão purificados usando o kit de Extração de Gel QIAquick (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.
2. O produto de *PCR* purificado foi armazenado a -20°C. As etapas experimentais específicas referem-se às instruções.

Clonagem e Sequenciamento

1. Os produtos de *PCR* purificados serão ligados ao vetor plasmídico pMD-18-T (TaKaRa).
2. Dez microlitros do produto de ligação serão adicionados a 100 µL de células competentes DH5α (TaKaRa) e colocados em gelo por 30 min.
3. O plasmídeo recombinante serão transformado em células competentes por choque térmico a 42 °C durante 1 min.
4. Os tamanhos corretos dos insertos serão determinados por *PCR* usando *primers forward e reverse*, seguido de eletroforese em gel de agarose a 2%.

5.4. *PCR* quantitativa

1. A *PCR* quantitativa será realizada em volume final de 25 IL usando 3 IL de ADN modelo, 125 IL de TaqMan EnvironmentalMaster Mix 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), 65 IL de ddH₂O, 1 IL de cada *primer* (10 IM) e 1 IL de sonda (25 IM) sob ciclagem térmica 50 °C por 5 min e 95 °C por 10 min, seguidos de 55 ciclos de 95 °C por 30 s e 56 °C por 1 min.

3. As amostras serão processadas em 12 réplicas em um sistema de detecção de *PCR* em tempo real BIO-RADCFX96 Touch (Hercules, Califórnia, EUA).
4. O ADN de *Metapenaeus dobsoni* e *Mierspenaeopsis sculptilis* será extraído de uma amostra de tecido, utilizando DNA blood and Tissue kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. O ADN extraído será quantificado utilizando um NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA).
6. Uma curva padrão será estabelecida analisando uma série de diluições 1:10 de ADN extraído de amostras das espécies alvo. As diluições serão feitas de 10^{-1} a 10^{-9} com réplicas usadas para cada uma das etapas de diluição.
7. Definiremos o *LOD* (Limite de detecção) como a última diluição na curva padrão na qual o *eDNA* é detectado com um ciclo limiar (*Ct*) abaixo de 45.
8. O Limite de Quantificação (*LOQ*) será definido como a última diluição na curva padrão na qual o *eDNA* é detectado e quantificado em pelo menos 90% das replicações *qPCR* com um ciclo de limiar abaixo de 45.

5.5. Análise de dados

Os dados moleculares serão analisados usando softwares bioinformáticos (MEGA, Geneious) específicos, e o Software R (ANOVA estatística) para a análise multivariada e para a Regressão linear.

Sequenciamento - Que será o processo de determinação da sequência de nucleotídeos, em um pedaço de ADN que será a leitura do ADN, o que vai possibilitar a identificação da espécies presentes na amostra ambiental de água, este será efectuado na Macrogen. usando amostras de produto de PCR.

Regressão Linear - Esta técnica de análise de dados ajudará a prever o valor dos dados desconhecidos usando outro valor de dados relacionado e conhecido, esta pretende avaliar a relação dos dados projetados e estudar a relação entre as duas variáveis.

Análise multivariada - Esta técnica permitirá avaliar em simultâneo diversas variáveis do conjunto de dados, aumentando a fiabilidade dos dados obtidos à partir do sequenciamento.

7. Cronograma

Tabela 1: Cronograma de actividades da presente proposta de trabalho.

Mês De realização Etapas por Realizar	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto
1. Revisão bibliográfica							
2. Validação das áreas							
3. Amostragem							
4. Tratamento de dados							
5. Análises laboratoriais							
6. Redação do relatório							
7. Revisão do relatório final							
8. Submissão do relatório							

7. Orçamento

O presente estudo terá os seus custos cobertos pelo projeto *Biodiversity for Mozambique* (BIOFORMOZ).

Tabela 2: Orçamento dos itens necessários para a materialização do presente estudo.

Descrição dos itens	Quantidade-necessária	Custo-unitário (Mtn)	Custo-total (Mtn)
Redes de arrasto*	1	-	-
Barco*	1	-	-
Sonda Multiparametrica Hanna*	-	-	-
Garrafas plásticas	8	1,067.00	8,536.00
Etiquetas	10	120.00	1,200.00
Plásticos ziplocks	5 pacotes	200.00	2,000.00
Botas impermeáveis	1 par	500.00	500.00
Congelador*	-	-	-
Marcadores	2	50.00	100.00
Bloco de anotações	1	50.00	50.00
Canetas	2	10.00	10.00
Frascos	5	820.00	4,100.00
Luvas	1 pacote	830.00	830.00
Pinça	1	548.00	548.00
Sabão	1	100.00	100.00
Gelo seco	20KG	5,000.00	5,000.00

Caixa térmica	2	500.00	1,000.00
Filtro de seringa	8	776.00	6,208.00
Membrana de filtro	8	1,230.00	9,840.00
Tubos falcon	10	1,600.00	1,600.00
Álcool etílico 99%	2,5L	2,500.00	2,500.00
Transporte	-	2,000.00	2,000.00
Kit Big Dye v3.1 Kit de sequenciamento de Ciclo Terminator 100 reações	1	193,077.19	193,077.19
Kit de purificação	1	45,000.00	45,000.00
Kit PCR, Promega Master Mix	1	87,825.70	87,825.70
Primers	2	48,097.56	96,195.56
Água Destilada (5L)	4	300	1,200.00
Solução de extração CTAB	1	7,800.78	7,800.78
Total			431,211.23

*: Disponibilizado e custos cobertos pelo grupo de Ecologia Marinha do DCB.

8. Referências bibliográficas

- Abreu, M. J; Santos-Wisniewski, I.; Rocha, M. J. I.; Orlando, T. C. I. (2010). The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) and *Ceriodaphnia silvestrii* (Daday, 1902) (Crustacea Cladocera). Vol.70, no.1, 121-124. Brasil.J. Biol. São Carlos.
- Alex C.K; Raphael K; Anna W; Armin K.Z (2021). Usando o eDNA para detectar simultaneamente a distribuição de lagostins nativos e invasores em um país inteiro. Journal of Environmental Management. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113929>.
- Azevedo, C; Dechoum, M. S., Zenni, R. D., Ziller, S. R. e Zalba, S. M. (2010). Cadernos da Mata Ciliar. Coordenadoria de Biodiversidade e Recursos Naturais. Pp 5 e 6. São Paulo.
- Barbieri, E. e Melo, G. A. S. (2006). Biodiversidade: Ocorrência da Espécie Exótica *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) no Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida. São Paulo (4): 654-659.
- Bezeng BS, van der Bank HF (2019) O DNA barcoding de crustáceos da África Austral revela uma mistura de espécies invasoras e potencial diversidade críptica. PLoS ONE 14(9): e0222047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222047>
- Cohen.AN, Carlton JT. (1997). Mecanismos de transporte transoceânico: introdução do Caranguejo Mitten Chinês, *Eriocheir sinensis*, na Califórnia. Pac Sci 51:1–11.
- Coradin, L. e Tortato, D. T. (2006). Espécies Exóticas Invasoras: Situação Brasileira. 5 Pp. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- Dall, W., D. J. Hill, P. C. Rothlisberg e D. J. Staples (1990). The Biology of the Penaeidae. Adv. Mar. Bio., 27: 1-489.
- de Abreu, D.C. (2017). Evaluation of Suitable Nurse Areas for Penaeid Shrimps in Southern Mozambique. Ph. D. Thesis. 36 pp. Suécia, Universidade de Gothenburg.
- Devin S, Bollache L, Noel PY, Beisel JN (2005). Padrões de invasões biológicas em sistemas de água doce franceses por macroinvertebrados não indígenas. Hydrobiologia 551:137–146.
- Galil BS (2009) Fazendo um balanço: inventário de espécies exóticas no mar Mediterrâneo. Biol Invasion 11:359–372.
- Hänfling, B., Kollmann, J., 2002. Uma perspectiva evolutiva das invasões biológicas. Tendências Eco. Evolução 17, 545-546.

- IIP (2015). Relatório Anual 2015. 97 pp. Maputo. Instituto Nacional de Investigação Pesqueira.
- Karatayev AY, Burlakova LE, Padilla DK, Mastitsky SE, Olenin S (2009) Os invasores não são uma seleção aleatória de espécies. *Biol Invasion* 11:2009– 2019.
- Leão, T. C. C., Almeida, W. R., De Sá Dechoum, M. e Ziller, S. R. (2011). Espécies Exóticas Invasoras no Nordeste do Brasil. 11 Pp Contextualização, Manejo e Políticas Pública.
- Malauene, B.S. (2015). Environmental influences on banana shrimps of the Sofala Bank ,Mozambique Channel. Cape Town, South Africa, University of Cape Town (PhD thesis).
- Martins, A. S. P, (2013). Estrutura populacional e distribuição espaço-temporal dos portunídeos (crustácea, decapoda) da Baía de Sepetiba – RJ. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- MIMIAP (2019). Avaliação do Plano de Gestão de Pescaria do Camarão no Banco de Sofala. 119pp. Maputo. Ministério Do Mar, Águas Interiores E Pescas
- Silva, M. C. N. (2006). Dinâmica Populacional do camarão cascudo *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) Da Ilha de Combú – Belém-Pa, Pp 24-35.
- Primavera, J. H. (1998) Mangrove as nurseries: shrimp populations in mangrove and nonmangrove habitats. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 46: 457-464.
- Ronnback, P., Macia, A., Almqvist, G., Shultz, L. & Troel, M. (2002). Do *penaeid* shrimps prefer mangrove habitats? Distribution pattern analysis on Inhaca Island, Mozambique. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 55: 427-436.
- Simbine, L. (2015). Identificação Molecular das Espécies Exóticas de *Peneídeos* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) Ocorrentes na Costa de Moçambique com base no mtDNA. Dissertação do Doutorado, Brasil.
- WARD, R. D. (2000). Genetics in Fisheries Management. *Hydrobiology*. 420, Pp 191-201.
- Willianson, M. (1986). Biological invasions. Londres: Chapman & Hall.