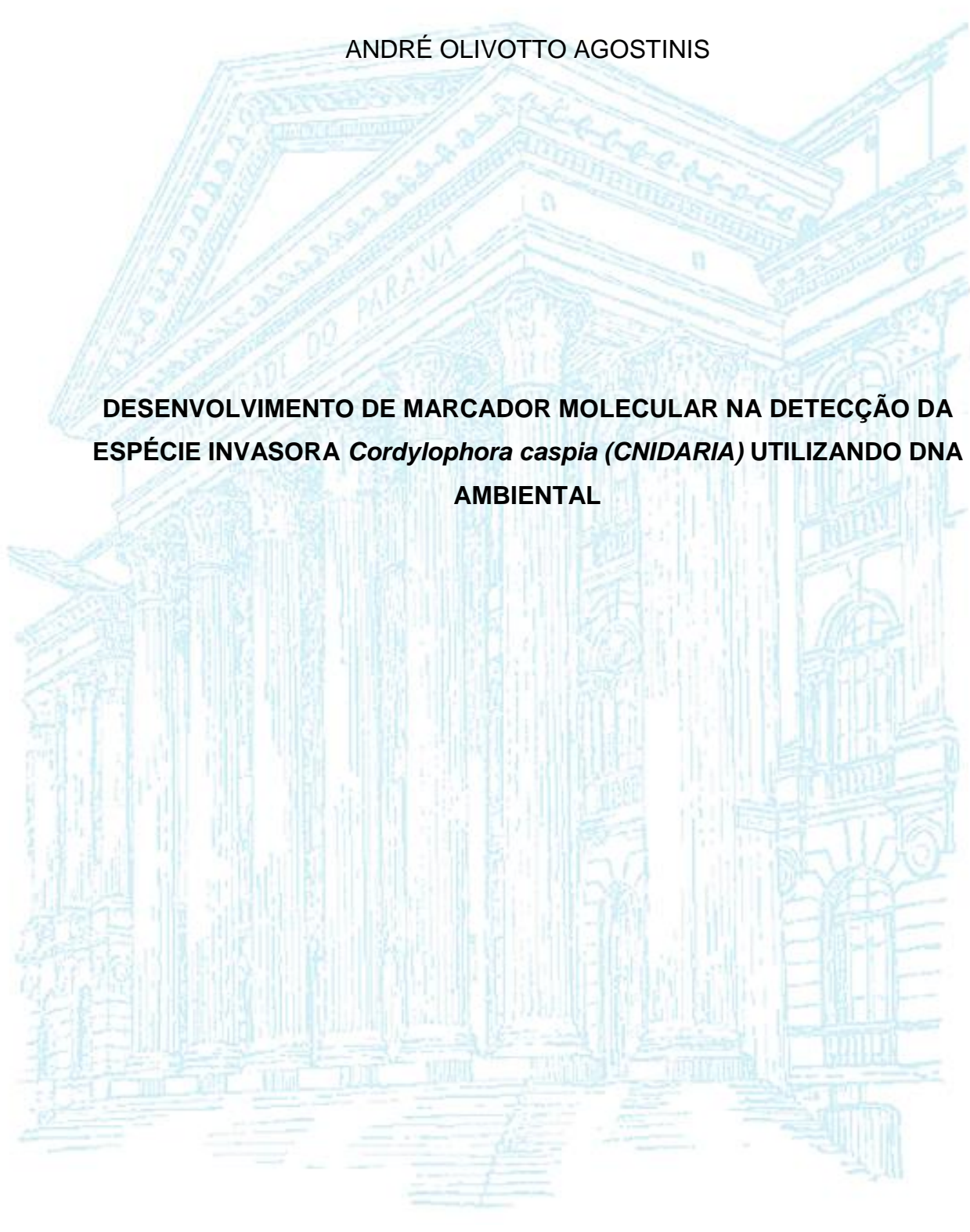


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ OLIVOTTO AGOSTINIS

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR MOLECULAR NA DETECÇÃO DA  
ESPÉCIE INVASORA *Cordylophora caspia* (CNIDARIA) UTILIZANDO DNA  
AMBIENTAL**



CURITIBA

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANDRÉ OLIVOTTO AGOSTINIS**

**DESNVOLVIMENTO DE MARCADR MOLECULAR NA DETECÇÃO DA  
ESPÉCIE INVASORA *Cordylophora caspia* (CNIDARIA) UTILIZANDO DNA  
AMBIENTAL**

Monografia apresentada à  
disciplina Estágio Supervisionado  
em Biologia (BIO028), como  
requisito parcial à conclusão da  
modalidade de Bacharelado do  
Curso de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Marcio R.  
Pie

**CURITIBA**

**2016**

“Você que diz até onde vai,  
Cada limite um novo começo  
Infinitas chances vão surgir,  
Se permitir”

Scalene – Sublimação

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO/ABSTRACT.....	VII
1 BIOINVASÃO E <i>Cordylophora caspia</i> .....	8
2 DNA AMBIENTAL.....	10
3 DESENVOLVIMENTO DO MARCADOR MOLECULAR.....	17
4 RESULTADOS.....	18
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	21
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

## **ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1 Sequência dos primers e da sonda desenvolvidos para a detecção da espécie invasora.....	19
Tabela 2: Lista de sequências utilizadas.....	20

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1 Posição de anelamento dos oligonucleotídeos.....	20
---	----

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Marcio Pie, pela oportunidade de trabalhar em uma área emergente tão interessante, por todo o incentivo sempre, e pela inspiração do que é ser um cientista.

Ao Laboratório de Dinâmica Evolutiva e Sistemas Complexos, por oferecer estrutura para a realização do trabalho. Agradeço aos membros: Patrícia, Ricardo, Raquel, Deborah, Andressa, Andreas, André e Júnior pela companhia, e especialmente à Patrícia e Ricardo pelos ensinamentos em biologia molecular e evolução.

Ao Grupo de Estudos em Aquicultura (GIA), sob a orientação do Prof. Dr. Antonio Ostrensky, no qual o projeto de DNA ambiental é desenvolvido em parceria.

A minha mãe, Helena e minha irmã, Renata, pelo apoio e incentivo em toda a minha jornada de querer ser biólogo desde criança. Agradeço aos meus amigos de graduação Letícia, Julie, Maria Carolina, Gabriela, Ana Carolina, Roberta, Bruna, Anankha, Ayrton, Tainá e Stephanie pelo apoio, e a Flavia Monteiro e Roger Castro pelo apoio e amizade incondicionais.

## RESUMO

Espécies invasoras causam grandes problemas financeiros e ecológicos. Entre as espécies aquáticas incrustantes que têm causado problemas no Paraná recentemente, está o hidróide colonial *Cordylophora caspia*. A espécie é encontrada de ambientes marítimos a estuários e águas continentais, devido a sua grande capacidade de reprodução, plasticidade fenotípica e fisiológica. Sua dispersão tem sido auxiliada por atividades humanas, ao ser transportada por água de lastro. Hoje, ela se espalha em rios da Bacia do Paraná, e causa problemas ecológicos ao competir por substrato, e problemas financeiro ao formar biofilmes em estruturas relacionadas ao saneamento. Medidas de manejo e conservação para lidar com o avanço da espécie requerem um método eficaz de detecção para o seu monitoramento. O método tradicional, entretanto, se baseia no crescimento de colônias em placas submersas, o que pode ser impreciso sob certas condições e consumir muito tempo. Métodos alternativos de detecção de espécies surgiram nos últimos anos utilizando o DNA ambiental. Esse se baseia na coleta de amostras ambientais, onde o material genético dos organismos se deposita, e o uso de um marcador molecular aplicado a uma técnica de biologia molecular para o diagnóstico da presença da espécie. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um marcador molecular para aplicação de um ensaio de PCR em tempo real (RT-PCR) para a detecção do hidróide em amostras de água de locais de interesse. O método permite uma detecção mais precisa e um resultado mais rápido do que o método tradicional, o que auxilia na tomada de decisões para manejo e conservação.

Palavras-chave: *Cordylophora caspia*, invasão biológica, RT-PCR, marcador molecular, DNA ambiental

## ABSTRACT

Invasive species are a major cause of ecological and financial problems. In the aquatic invasive species group, the biofouling species are the most troublesome. One of these species, that have been causing problems in the state of Paraná, is the colonial hydroid *Cordylophora caspia*. It's great reproductive capability and its phenotypical and physiological plasticity allows the species to occupy from sea waters to continental waters. Its dispersion has been facilitated recently by human activity, mostly by indirect transport through ballast water. Nowadays, the species spreads in the Paraná River Basin, and has been causing ecological problems as a substrate competitor, and financial problems as it forms biofouling in water treating facilities. The efficiency of both control and management depends heavily in an efficient monitoring process. The traditional method, however, is based on growing colonies in sunken plates, which may be inaccurate under certain conditions, as also time consuming. Alternative detection methods have been described recently using environmental DNA. It is based in the collection of environmental samples, which is filled with fragments of DNA of the species which live in that habitat. Then, its applied a molecular marker in an molecular biology protocol, in order to diagnosis the presence of the species. The objective of this work is to develop a molecular marker to be applied in a real time PCR (RT-PCR) assay, in order to detect the hydroid in target locations. The method allows for a faster and more precise answer than the traditional method, which supports the decision making in management and control.

Key-words: *Cordylophora caspia*, biological invasions, RT-PCR, molecular marker, environmental DNA

## 1 BIOINVASÃO E *Cordylophora caspia*

O estabelecimento de espécies invasoras tem sido reconhecido como uma das principais ameaças à biodiversidade mundial recentemente. Em ambientes aquáticos, o principal vetor de introdução de espécies é pelo transporte através de água de lastro de navios (MACK et al., 2000). Diversas espécies são introduzidas, mas poucas se tornam invasoras. Alguns fatores associados a isso são a ausência de predadores, alta plasticidade fenotípica e fisiológica, e alta taxa de reprodução (ou crescimento) (BOLTOVSKOY et al., 2006).

Espécies invasoras frequentemente causam impactos econômicos e ecológicos. No caso de espécies aquáticas, um grupo problemático são o de espécies incrustantes. Essas espécies são formadoras de biofilmes, e rapidamente deslocam a composição das espécies dos locais onde se instalam, tanto por competição por substrato (DARRIGRAN & EZCURRA-DE-DRAGO, 2000), quanto por liberação de compostos tóxicos e introdução de doenças (NEVES & ROCHA, 2006). Já no setor econômico, essas espécies são conhecidas por causar problemas em usinas hidrelétricas e centros de tratamento de água. Nesse contexto, ocorre o entupimento das tubulações, corrosão da estrutura de sustentação e oclusão principalmente de filtros (PHILLIPS et al., 2006). Além do aumento do custo da manutenção e serviços associados ao monitoramento e controle biológico, o serviço da instalação também fica temporariamente indisponível, o que leva a mais prejuízos econômicos e de distribuição de água e energia.

Entre as espécies invasoras que vêm causando impactos ecológicos e econômicos no estado do Paraná, está o hidroide *Cordylophora caspia* PALLAS 1971 (*syn: Cordylophora lacustris* ALLMAN 1844). É um hidroide atecado, que se organiza em colônias estolonais ou arborescentes. As colônias alcançam até 10 cm de altura (FOLINO, 2000). A espécie não apresenta medusa livre-natante, e a reprodução sexuada gera uma larva plânula (MORRI, 1981). Sua dieta é carnívora (passivamente) e consiste principalmente de zooplâncton, microcrustáceos, copépodos e náuplios (GILI & HUGHES, 1995).

Apesar de ser eurihalino e sua alta plasticidade fenotípica permitir que habite diversos tipos de ambientes aquáticos – de águas marinhas a águas continentais, a sua distribuição no mundo é descontínua (ROOS, 1979). As colônias se formam sobre

substratos rochosos, objetos submersos, concreto e até sobre conchas e caules/troncos flutuantes (ROOS, 1979).

A temperatura de crescimento ocorre de 8° C a 30° C, sendo o ideal entre 18° C e 26° C (FULTON, 1962; FOLINO & INDELICATO, 2005). A espécie é insensível à variação de luz e pH (FULTON, 1960; GUTIERRE, 2012), mas necessita de ambientes com boa oxigenação (FULTON, 1962). O crescimento da espécie ocorre em ciclos de regeneração-regressão, nos quais a população começa a crescer na primavera, a reprodução ocorre no verão. Posteriormente, a população regride no inverno (JORMALAINEN, 1994; DAMMSKI, 2008). As colônias também podem ter seus ciclos alterados por dinâmica de populações modulares (JORMALAINEN, 1994), e por fatores ecológicos (como competição e predação) (TARDENT, 1963). Smith et al. (2002) também mostra que a espécie demonstra alterações morfológicas em habitats de baixa salinidade, como diferenças nos pólipos e formato das células. A taxa de crescimento e de reprodução dessas populações também apresenta redução. Após o período de dormência no inverno, ocorre um período forte de reprodução sexuada, seguido de um período de crescimento de hidrantes para a alimentação (JORMALAINEN, 1994).

Em períodos frios, a espécie sobrevive através da formação de formas latentes chamadas menontes (fragmentos de tecido com propriedades regenerativas) (FOLINO-ROREM & INDELICATO, 2005). Esses fragmentos também podem ficar suspensos na coluna d'água, o que dificulta o controle da dispersão da espécie e sua remoção.

A espécie é originária dos Mares Cáspio e Negro. A distribuição da espécie se expandiu rapidamente devido ao transporte por água de lastro e pela capacidade da espécie de proliferar em salinidades variadas (FOLINO, 2000). O principal mecanismo de dispersão é por água de lastro (FOLINO, 2000) uma vez que a dispersão clonal é praticamente negligenciável (DARLING & FOLINO-ROREM, 2009). Atualmente, a espécie ocorre em águas continentais da América do Sul e do Norte, e em águas oceânicas da América do Norte, Europa e Oceania (ZAMPONI, 1991; HULRBERT & VILLALOBOS-FIGUEROA, 1982; CORDERO, 1941; RICCIARDI & MACISAAC, 2000; VAATE et al., 2000). O primeiro registro no Brasil foi em 1991, no Rio Paraná (HADDAD & NAKATANI, 1996). A espécie também possui registro nos estados do Rio de Janeiro (GROHMANN, 2007), São Paulo (SILVEIRA & BOSCOLO, 1996). Além

das rotas de dispersão por água de lastro, o potencial aumento da temperatura das águas do planeta pelo aquecimento global aumentará a taxa de crescimento das populações, o que facilitará rotas de invasão alternativas e tornará mais severo os impactos ecológicos da espécie (MEEK et al., 2013).

As medidas de controle da população são geralmente ineficientes por serem inespecíficas (e.g. tratamentos por temperatura ou com cloro [FOLINO-ROREM, 2005; MANT et al., 2012]) e com pouca aplicabilidade a ambientes abertos. Populações distintas também demonstram diferentes respostas aos tratamentos (FOLINO-ROREM, 2005), potencialmente por incerteza taxonômica associada a complexos populacionais geneticamente distintos (FOLINO-ROREM & DARLING, 2009).

O método tradicional de monitoramento envolve o uso de placas submersas para que ocorra o crescimento de colônias, e posterior identificação (MANT et al., 2011). A desvantagem do método é que o resultado do estado de invasão ocorre apenas para populações já estabelecidas, e é dependente do período de crescimento. Métodos alternativos para o monitoramento de invasão podem aumentar a eficiência do monitoramento em aspectos financeiros, de tempo de resposta e logísticos. Com esse fim, foi desenvolvido um marcador molecular para a detecção da espécie em amostras de DNA ambiental, em ensaios de PCR em tempo real (RT-PCR, ou qPCR), como forma alternativa de detecção e uso para monitoramento do estado de invasão.

## **2 DNA AMBIENTAL**

De acordo com Taberlet *et al.* (2012), os primeiros estudos envolvendo a identificação de espécies utilizando o DNA se baseavam em digestão por enzima de restrição ou hibridização por sondas espécie-específicas. Esses métodos se baseiam em técnicas de genética, mas que não necessariamente envolvem sequências de DNA.

Atualmente, o uso de DNA ambiental para detecção segue duas grandes vertentes: A detecção por amplificação (sem sequenciamento), e a detecção por unidades taxonômicas operacionais (UTOs, ou OTUs do termo original), que é baseada em sequenciamento.

O mais simples método de detecção por DNA ambiental é a identificação por PCR simples. Ela se baseia em um uso de primer espécie-específico, que irá anelar apenas

ao DNA da espécie alvo. A amplificação do fragmento ocorre apenas então se o locus alvo estiver presente na amostra.

Outro método é a PCR quantitativa, que se baseia na detecção de fluoróforos na reação. O fluoróforo interage com o DNA, e ocorre resposta específica se houver amplificação, que é detectada por um sensor especial no termociclador. Há duas estratégias principais: o fluorômetro repórter sendo específico ou não. Quando não específico, o reportador se liga ao DNA independentemente da sequência, e todo ele fluoresce. A amplificação de fragmentos então aumenta o número de fitas, e conseqüentemente a resposta de luz sobe. O marcador pode também ser específico, quando a sonda é baseada em pareamento de sequência alvo, carregando um fluoróforo. A sonda costuma carregar um *quencher*, que é uma molécula secundária que captura a luz emitida pelo fluoróforo quando não anelado ao DNA alvo. Quando ocorre a amplificação do fragmento, ao passar pela sonda na fita, a DNA polimerase causa a mudança de conformação dessa (por atividade de exonuclease 5'-3'), e o *quencher* se afasta do fluoróforo. Isso causa a liberação de luz visível sem interferência pelo *quencher*, que é capturada pelo termociclador. Em contexto ambiental, é feito um conjunto de primers espécie-específicos, com uma sonda espécie-específica, em que a amplificação só ocorre com o DNA da espécie-alvo na amostra.

Já identificação através de sequências começou com métodos baseados em amplificação (PCR) e sequenciamento; que utilizavam especialmente o gene da Subunidade Citocromo C Oxidase I (COI) (HEBERT *et al.*, 2003). Apesar de ser um popular marcador molecular para metazoários, este não se aplica a todos os organismos. Shokralla *et al.* (2012) cita que para outros grandes grupos de organismos, há outros marcadores populares. Eles são: subunidade ribossomal (16S) para bactérias, introns ribossomais (ITS) para fungos, maturaseK (*matK*) e ribulose-bisfosfato carboxilase (*rbcl*) para plantas. A recorrência desses marcadores é por sua alta representatividade e facilidade de trabalho. Isso ocorre pois se tratam de regiões de evolução rápida – o que permite diferenciar espécies que divergiram recentemente. E apesar de interferência de outros processos evolutivos, como monofilia incompleta ou introgressão (por hibridização), a identidade taxonômica de sequências ainda tem resolução para pelo menos, clados superiores (FREELAND *et al.*, 2006). Isso facilita seu uso para espécies

A obtenção das sequências utilizadas nesses estudos era através do método de Sanger (1977). Por própria limitação do método, não é possível trabalhar com mais de um marcador molecular por reação. Também é necessário que esse marcador tenha um tamanho de fragmento adequado (até 800 pares de bases). Outra desvantagem, é que o sequenciamento é dependente de amplificação prévia, que é uma das fontes de contaminação mais problemáticas, especialmente de amostras ambientais.

Recentemente, novos métodos de sequenciamento foram desenvolvidos. Esses métodos incluem diversas plataformas de sequenciamento, como Roche 454 (Roche Diagnostics Corp.), Illumina (Illumina Inc.) e Ion Torrent (Life Technologies.). Esses sistemas trabalham com estratégias de sequenciamento diferentes, mas todos compartilham uma maior capacidade de sequenciamento (em número de bases e quantidade de loci) em relação ao próprio método de Sanger. O chamado *high throughput*, é quando o sistema é capaz de processar diversas amostras e ao mesmo tempo (ao invés de apenas uma), por lidar com múltiplas sequências marcadas com identificadores. O sistema também apresenta a maior sensibilidade a menores quantidades de DNA.

Apesar das diversas plataformas, a maioria dos estudos emprega a plataforma Illumina – que utiliza a amplificação por ponte, e faz pirosequenciamento por síntese, pelo seu maior poder de processamento e menor preço por base. Resumidamente, os sistemas Roche 454 e Illumina trabalham com pirosequenciamento. Essa estratégia utiliza nucleotídeos marcados com fluoróforos, que emitem luz quando incorporados na sequência. Essa luz é capturada sequencialmente, e a leitura é feita por sensor de luz. O sistema Roche 454 faz PCR por emulsão para amplificação, enquanto o Illumina faz amplificação por ponte (com oligonucleotídeos ligados a uma lâmina, e com adaptadores complementares, que funcionam como primers, ligados aos fragmentos) (SHOKRALLA *et al.*, 2012).

Já o terceiro sistema, Ion Torrent, se baseia na liberação de prótons ao ocorrer a incorporação de bases na sequência. São feitos ciclos em que apenas um tipo de base é incorporada. O microsensor detecta então se houver mudança de pH. Quando positivo, a base correspondente é computada e a sequência é montada. Apenas uma base é ciclada por vez, e a base anterior é lavada após o período de incorporação. Essa mudança de tecnologia permitiu o estudo de fontes de DNA que se podia tirar

pouca informação, pela menor capacidade de sequenciamento. A principal aplicação foi a identificação de múltiplas espécies em amostras de eDNA.

Para a identificação rápida de espécies, entretanto, o sequenciamento de nova geração não é o método mais eficiente. Além do maior tempo de preparação das bibliotecas, os protocolos também são mais custosos no quesito de reagentes e equipamentos.

De acordo com Taberlet *et al.* (2012), o primeiro emprego do sequenciamento de próxima geração (Next Generation Sequencing – NGS), foi no estudo de reconstrução de comunidades ancestrais através de amostras do permafrost. A identificação de múltiplas identidades taxonômicas a partir de uma única amostra de eDNA foi chamada de metabarcoding. Em contraste com o barcoding tradicional, o primeiro identifica uma gama muito maior de espécies alvo.

Já o primeiro estudo mostrando a detecção de espécies aquáticas através de eDNA utilizou anuros como a espécie alvo. Nesse estudo, Ficetola *et al.* (2008) coletou amostras de água de diferentes poças e fez detecção por sequenciamento de produto de PCR (método de Sanger) e pirosequenciamento (Roche 454). Esse estudo mostrou a viabilidade da utilização de amostras do ambiente para a detecção da presença de espécies.

A maioria dos estudos com eDNA se baseia em detecção de organismos aquáticos. Esses métodos consistem na coleta de água e sua posterior filtragem em um filtro especializado com microporos, que retém fragmentos de DNA na água, células descamadas dos organismos, partes de tecidos dos organismos ou até mesmo larvas (quando muito pequenas). Esses filtros são posteriormente extraídos com um protocolo de biologia molecular, e então são aplicadas diferentes técnicas de análise do material genético para a identificação de espécies (e.g. PCR, q-PCR, sequenciamento).

Uma das principais características de trabalhar com amostras ambientais, é que o DNA está frequentemente degradado. Isso ocorre porque o material genético já está fragmentado, e ainda está exposto a diversos fatores ambientais, como temperatura, salinidade e movimentação da água. Robson *et al.* (2016) mostra também que ao fazer esse tipo de estudo, deve-se considerar a taxa de liberação de material genético do organismo em interesse. As condições do ambiente, para mensurar a taxa de degradação dos fragmentos também devem ser consideradas, como: A temperatura

da água, a incidência de luz solar, a salinidade, e a turbidez devido a outros organismos e à própria topologia e hidrologia do corpo d'água. Também deve-se levar em consideração a acumulação de DNA no corpo d'água, ao se fazer a coleta. Klymus *et al.* (2014) utilizou um sistema aquático com carpas para quantificar a taxa de liberação de DNA desses peixes usando qPCR. Eles mostraram que a taxa de liberação varia muito entre indivíduos da mesma espécie, independente do estágio de desenvolvimento (também observado por Maruyama *et al.* [2014]). O mesmo resultado foi observado também para um mesmo indivíduo, em diferentes condições metabólicas e estado de alimentação. Apesar disso, observaram uma correlação linear entre o aumento da biomassa e o aumento da taxa de liberação de eDNA. Eichmiller *et al.* (2014) mostra que a distribuição de eDNA em corpos d'água se dá especialmente onde as populações vivem; de forma que os hábitos da espécie (local onde vive no corpo d'água, altura na coluna e hábitos) influenciam em como as amostras devem ser coletadas. Dejean *et al.* (2011) também mostra que a persistência de DNA no ambiente é de até 1 mês, e reforça que o método de amostragem deve ser rigoroso. Assim, o método de coleta deve ser adaptado para cada ambiente e de acordo com o organismo estudado.

A escolha do método influencia também no resultado dos protocolos moleculares. Deiner *et al.* (2015) mostra que diferentes métodos de coleta e extração resultam em maior ou menor qualidade dos extratos. Isso influencia todo o processo de detecção dos organismos. Uma menor resolução no sequenciamento pode levar a falsos negativos (quando a espécie não é detectada, mas está no ambiente).

Uma manipulação inadequada também pode causar contaminação (levando a um falso positivo, quando a espécie é detectada, mas não está no ambiente). Em contraste, também pode haver a falsa detecção. Essa ocorre quando a espécie é detectada no ambiente e o DNA está comprovadamente na amostra – mas não ocorreu por contaminação. Isso ocorre por carreamento dos fragmentos por outros animais – como predação e excreção, carreamento por correntes d'água e outros processos relacionados a decomposição (REES *et al.*, 2014; MERKES *et al.*, 2014).

A detecção de organismos em ambientes aquáticos é particularmente útil para o monitoramento de espécies invasoras e para mapeamento de biodiversidade. No caso de espécies invasoras, exemplos de casos onde foram realizados estudos são: com carpas (JERDE *et al.*, 2011; KLYMUS *et al.*, 2014), anuros (DEJEAN *et al.*, 2012),

salamandras (GOLDBERG *et al.*, 2011), jibóias (HUNTER *et al.*, 2015), moluscos (PIE *et al.*, 2006; ARDURA *et al.*, 2016) e moscas (SCHNEIDER *et al.*, 2016). Esses estudos têm em comum o desenvolvimento de um marcador molecular espécie-específico, e sua posterior aplicação em um protocolo molecular adequado para o organismo em estudo. Essa estratégia de detecção é particularmente útil para invasão, pois apresenta alta taxa de detecção em estágios iniciais de colonização. Em contraste com métodos tradicionais de inspeção (e.g. captura, monitoramento e observação), há diversas vantagens do primeiro. Elas incluem menor esforço amostral, menor tempo de detecção, independência dos hábitos do organismo (com a condição de que o animal tenha passado pelo corpo d'água em questão), menor custo e maior taxa geral de detecção (REES *et al.*, 2015).

Já para estudos de diversidade biológica, um exemplo de aplicação é o realizado por Miya *et al.* (2015), onde foi feito o mapeamento de espécies de peixes em um estuário. Esse tipo de estudo consiste no desenvolvimento de um marcador molecular de alta cobertura entre os táxons (geralmente uma região conservada), mas tem que variação suficiente no fragmento para ser capaz de diferenciar entre espécies. Utilizando um protocolo molecular para um sistema de sequenciamento de próxima geração, é possível sequenciar todos os fragmentos presentes na amostra ambiental. Posteriormente, por bioinformática, essa informação é processada, e é possível recuperar a identidade taxonômica de todos organismos presentes. Isso ocorre por comparação da sequência obtida com um bando de dados interno de sequências (a identidade taxonômica empregada pelo pesquisador a cada espécie, em um determinado locus de estudo), em que a equivalência das sequências é interpretada como a presença da espécie. Esse tipo de estudo é particularmente útil para o mapeamento de biodiversidade de locais pouco estudados, ou de difícil acesso/estudo.

Fora de sistemas aquáticos, um outro estudo realizado para o mapeamento de biodiversidade é de Calvinag-Spencer *et al.* (2013), que utilizou moscas carniceiras como vetores para a coleta de material genético. Em contraste com os métodos de mapeamento tradicionais para ambientes terrestres, a detecção por eDNA é muito mais rápida e eficiente em detectar espécies raras. Também é útil para descobrir novas espécies (geralmente não incluídas nos bancos de dados internos). Outras aplicações do uso de DNA ambiental incluem estudos de cadeias alimentares. Os

métodos tradicionais para esse tipo de estudo incluem a observação da interação em campo e a análise de conteúdo fecal dos animais. Estudos recentes, entretanto, utilizam o DNA ambiental (presente nas fezes dos animais) para detectar as espécies presentes e montar redes de interações. Isso ocorre porque nem todo o DNA é digerido, e restam pequenos fragmentos. Esses podem ser utilizados com a estratégia de amplificação de um locus conservado, mas com alta resolução taxonômica, para atribuir identidade as espécies. Um importante detalhe do método é a aplicação de “*blockers*”, que são oligonucleotídeos em que a sequência pareia com o locus de estudo do animal que está sendo estudado – geralmente o predador. Isso causará o bloqueio da amplificação do próprio DNA do animal. Isso facilita os métodos de sequenciamento e aumenta a representatividade dos resultados. Exemplos de estudos incluem aqueles com carnívoros terrestres (SHEHZAD *et al.*, 2012), carnívoros aquáticos (JAUNIAUX *et al.*, 2014), omnívoros terrestres (DE BARBA *et al.*, 2013), herbívoros aquáticos (LERAY *et al.*, 2013), e até mesmo de invertebrados, pela detecção de DNA na teia de aranhas (XU *et al.*, 2014).

Amostras ambientais não se limitam a corpos aquáticos, entretanto. Apesar das fontes já mencionadas de origem biológica, outra potencial fonte de material genético é o solo. A metodologia difere especialmente na forma de captura e extração. O solo pode ser coletado tanto de corpos aquáticos, quanto de ambiente terrestre. No caso de corpos aquáticos, o DNA no solo frequentemente é mais conservado do que quando na coluna d’água. Isso ocorre porque a compactação do sedimento reduz a exposição dos fragmentos a fatores ambientais. Em alguns casos, o DNA persiste por décadas, ou até séculos (ANDERSEN *et al.*, 2012). Outras potenciais fontes são de geleiras, permafrost e de outros ambientes com potencial de preservação de ambientes ancestrais. Orgiazzi *et al.* (2014) discute o potencial do uso de solo e concluem que o metabarcoding é uma poderosa ferramenta para tanto mapeamento, quanto entendimento de ambientes transicionais utilizando os organismos que habitam em diferentes tempos. No caso do uso para mapeamento de biodiversidade, a detecção direta de organismos por amostras ambientais de solo já foi mostrada para diversos vertebrados terrestres (ANDERSEN *et al.*, 2012), oligoquetas (BIERNET *et al.*, 2012) e plantas (YOCCOZ *et al.*, 2012).

Aplicado à *Cordylophora caspia*, o DNA ambiental pode ser coletado obtido tanto pela presença das larvas na fase de reprodução sexuada, quanto de menontes nas

fases de dormência (o que não pode ser feito pelo método tradicional). O fato de ser uma espécie incrustante não interfere na captura do DNA ambiental, pois estudos com a ecologia do DNA ambiental mostram que a distribuição do material genético na água não é homogênea, e sim forma uma lâmina na superfície (Klymus *et al.*, 2014). O DNA também pode se depositar no sedimento, onde pode ser coletado por outros protocolos para areia e sedimentos.

É consenso na literatura que as análises com eDNA para a identificação de organismos no ambiente é muito mais custo-eficiente do que as tradicionais. Mas apesar da alta taxa de sucesso da detecção, ela ainda é considerada uma ferramenta, e não uma solução. Apesar disso, essa ferramenta representa um forte potencial para estudos de distribuição e monitoramento de espécies.

### **3 DESENVOLVIMENTO DO MARCADOR MOLECULAR**

Foram baixadas 34 sequências do gene mitocondrial da Subunidade Citocromo Oxidase I (COI), disponíveis no GenBank e no banco de dados do projeto Barcode of Life (BOL v4) (tabela 1), para os registros da espécie invasora *Cordylophora caspia* e de espécies taxonomicamente próximas (Família *Oceanidae*). As sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW2 (LARKIN *et al.*, 2007), e o alinhamento foi corrigido manualmente no software BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999). Foi procurada então uma região conservada dentro da espécie de interesse, evitando polimorfismos que inviabilizassem o marcador dependendo da população de origem do organismo, ao mesmo tempo que é uma região exclusiva da espécie. Esse gene foi escolhido por ser mitocondrial, e logo estar em maior número de cópias por célula (o que facilita a amplificação e aumenta a sensibilidade). Um conjunto de primers e uma sonda TaqMan foram desenvolvidos utilizando o algoritmo PrimerQuest (Integrated DNA Technologies). Testes *in silico* foram realizados utilizando o BLAST (ALTSCHUL, 1990) para testar amplificação cruzada.

## 4 RESULTADOS

Os primers e sonda desenhados estão representados na tabela 2. A região e as sequências foram escolhidas de acordo com diversos critérios reunidos por Caixeta et al. (2016): (i) tamanho dos oligonucleotídeos entre 18 a 30 bp, para balancear especificidade e capacidade de ligação a fita alvo; (ii) composição de GC entre 40 e 60%, assim como distribuição balanceada de bases ao longo do oligonucleotídeo; (iii) número de repetições de purinas/ pirimidinas menor do que 4; (iv) sem sequências palindrômicas e potencialmente sem estruturas secundárias; (v) sem complementaridade de ponta de um primer e qualquer parte do outro (evitar dímeros); (vi) final do oligonucleotídeo terminando em G ou C, mas sem região formadora de grampo; (vii) temperatura de melting muito próxima entre os oligonucleotídeos e (viii) temperatura de anelamento abaixo de 60° C. O desenho também foi ajustado manualmente para que as regiões de anelamento incluíssem regiões de *mismatch* com espécies próximas de *Cordylophora caspia*, estrategicamente nas pontas dos primers e o maior número possível de “*mismatches*” na sonda (para garantir a terceira camada de especificidade). O desenho do primer também seguiu os critérios sugeridos por MacDonald e Sarre (2016) e Veldhoen (2016) para a validação de novos marcadores para a identificação de espécies em amostras ambientais, que inclui as relações filogenéticas entre espécies de interesse, o estabelecimento de um banco de dados de referência e critérios de distância genética para validação de especificidade

Foi testada amplificação cruzada para os primers e a sonda pelo BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), e não há outra sequência registrada a qual o conjunto amplifica. O conjunto amplifica uma região de 109 bp equivalente as posições 344-453 de *Turritopsis rubra* (EF540795.1). O pequeno tamanho do fragmento permite que a amplificação ocorra mesmo nas amostras mais degradadas. O posicionamento do fragmento está representado na figura 1, que mostra o alinhamento das sequências e as respectivas posições dos primers e da sonda.

Tabela 1: Lista de sequências utilizadas (N=34)

Espécie	Entrada	Espécie	Entrada
<i>Cordylophora caspia</i>	KU695595.1	<i>Cordylophora sp.</i>	EF540787.1
<i>Cordylophora caspia</i>	KU695594.1	<i>Cordylophora sp.</i>	EF540786.1
<i>Cordylophora caspia</i>	KU695593.1	<i>Cordylophora sp.</i>	EF540785.1
<i>Cordylophora caspia</i>	KU695592.1	<i>Cordylophora sp.</i>	EF540784.1
<i>Cordylophora caspia</i>	KU695591.1	<i>Cordylophora sp.</i>	EF540783.1
<i>Cordylophora caspia</i>	KU695590.1	<i>Cordylophora sp.</i>	EF540782.1
<i>Cordylophora caspia</i>	KU695589.1	<i>Cordylophora sp.</i>	EF540780.1
<i>Cordylophora caspia</i>	KU695588.1	<i>Cordylophora sp.</i>	EF540779.1
<i>Cordylophora caspia</i>	KU695587.1	<i>Cordylophora sp.</i>	EF540778.1
<i>Cordylophora caspia</i>	KC489509.1	<i>Turritopsis rubra</i>	EF540795.1
<i>Cordylophora sp.</i>	EF540794.1	<i>Turritopsis lata</i>	JX965909
<i>Cordylophora sp.</i>	EF540793.1	<i>Turritopsis lata</i>	JX965908
<i>Cordylophora sp.</i>	EF540792.1	<i>Turritopsis lata</i>	JQ716122
<i>Cordylophora sp.</i>	EF540791.1	<i>Turritopsis nutricula</i>	JQ353763
<i>Cordylophora sp.</i>	EF540790.1	<i>Turritopsis nutricula</i>	JQ716084
<i>Cordylophora sp.</i>	EF540789.1	<i>Turritopsis nutricula</i>	JQ716083
<i>Cordylophora sp.</i>	EF540788.1	<i>Turritopsis nutricula</i>	JQ716082

Tabela 2: Sequência dos primers e da sonda desenvolvidos para a detecção da espécie invasora

Nome	Sequência (5'-3')	Tamanho (bp)	Composição de GC
C. caspia F	GGTGAACAGTTTATCCACCAC	21	47,6%
C. caspia sonda	6FAM*- AGCACATTCTGGACCTTCTGTAGACA- MGB-NFQ (sense)	26	46%
C. caspia R	GCTCCCATAATTGAAGAAGCTC	22	45,5%

\*O fluoróforo pode ser adaptado de acordo com as necessidades do pesquisador.

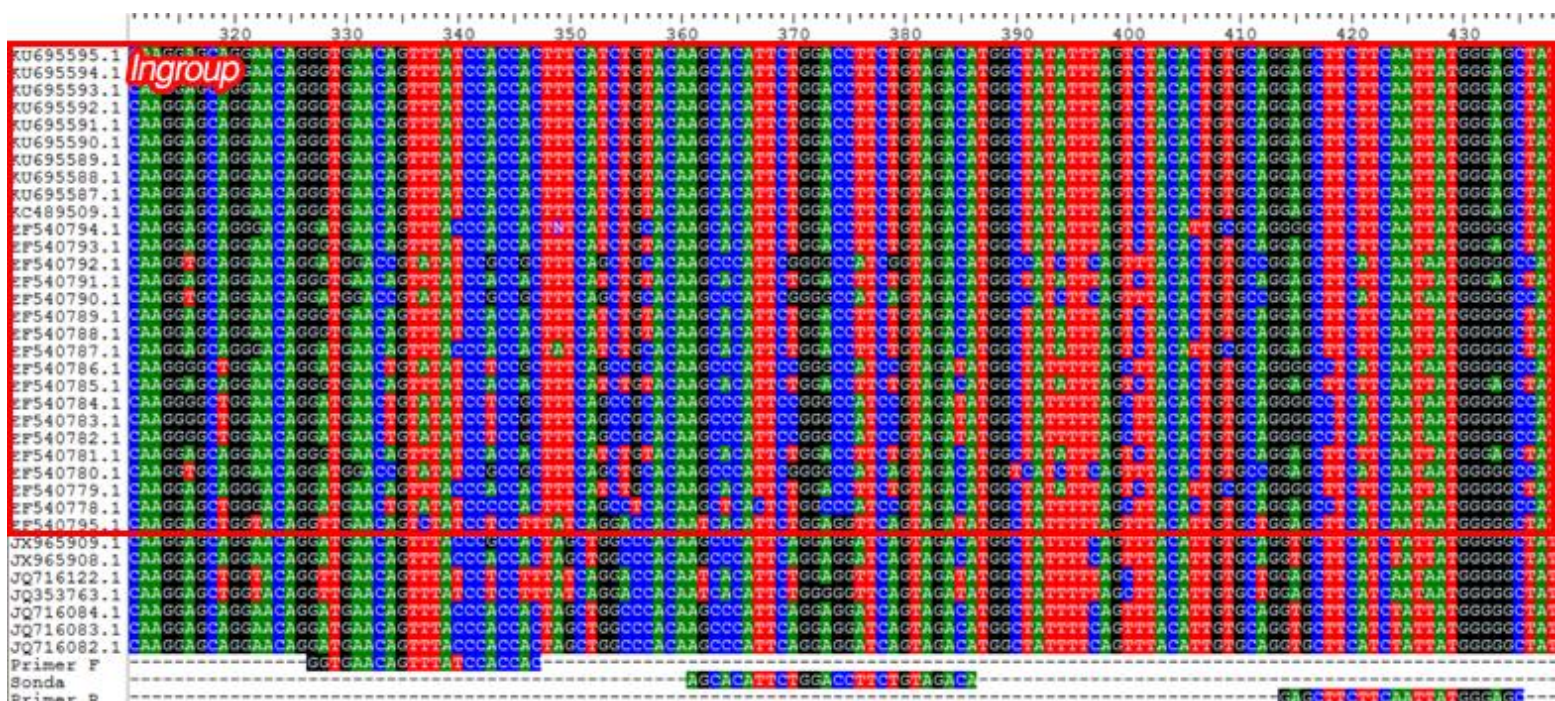


Figura 1: Posicionamento dos oligonucleotídeos desenvolvidos em relação ao gene escolhido.

## 5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O principal momento no processo da bioinvasão é o estágio inicial. Precisamente, é o momento em que há maior dificuldade de detecção do organismo. No caso de *Cordylophora caspia*, a detecção nos estágios iniciais é dificultada pela espécie só apresentar o crescimento da população em épocas específicas de crescimento (podendo estar dormente no ambiente sem que possa ser detectada). As colônias também são de pequeno porte no estágio inicial, o que dificulta a localização para coleta e identificação. O método molecular permite a detecção precisa em casos no quais o monitoramento tradicional não é eficiente.

Aliado a isso, o método molecular é mais custo-efetivo (SMART *et al.*, 2016). O método tradicional requer mão-de-obra intensiva, assim como requer muito tempo e treinamento para instalação e manutenção das placas, e a posterior identificação dos hidroides. O método molecular é então uma alternativa mais barata (em quesito de reagentes e materiais, mas não em equipamentos) e que retorna um resultado mais rápido. Isso permite tomar decisões de manejo e conservação mais rapidamente, o que aumenta o custo-efetividade do método.

Os próximos passos incluem os testes *in vitro* e *in situ*. O primeiro consiste em testes de amplificação direta com extratos da espécie invasora e de espécies próximas, enquanto o segundo consiste de testes de amplificação em amostras ambientais de locais com informação prévia de invasão, e locais em que a espécie não invadiu (como controle). A partir disso, pode-se ajustar a quantidade de reagentes para otimizar a reação, ao mesmo tempo que definir limites mínimos de detecção, de acordo com MacDonald & Sarre (2016).

A sensibilidade extra da q-PCR e a possibilidade de quantificar DNA molde na amostra abre a possibilidade de mudanças nos protocolos e novos métodos. Maior sensibilidade pode levar a uma necessidade de menor quantidade de água a ser filtrada, o que leva a melhoramentos no método de captura e a diferentes protocolos de extração. Isso pode aumentar a facilidade de aplicação do método, assim como reduzir o custo. A possibilidade de quantificação também leva à criação de curvas de concentração de DNA, que podem ser associadas a curvas de captura em amostras ambientais e associadas à biomassa. Dessa forma, pode-se construir um método que avalia a biomassa do organismo invasor em campo. Modificações recentes no método

(HUNTER *et al.*, 2016) também facilitam a construção da curva de biomassa especialmente para espécies com baixa concentração de DNA no ambiente.

O marcador molecular também pode ser aplicado em um ensaio de q-PCR com outros marcadores moleculares para outras espécies. Dessa forma, pode-se testar para várias espécies invasoras com uma mesma amostra, em um ensaio *multiplex*. Sob esse contexto, o primer apresentado também foi desenvolvido para ser usado em uma mesma reação com outro marcador molecular para a espécie invasora *Limnoperna fortunei* (dados não publicados). Os primers e sonda para ambas espécies foram desenhados para poderem ser usados em um mesmo ensaio de q-PCR (temperaturas de anelamento e *melting* semelhantes, tanto para primers, quanto para a sonda). O uso de diferentes fluoróforos possibilita que a mesma reação possa incorporar diferentes marcadores moleculares para diferentes espécies.

As vantagens dos métodos moleculares sobre os métodos tradicionais envolvem principalmente fatores econômicos e de mão-de-obra. Métodos não invasivos para mapeamento requerem marcadores moleculares de alta resolução e fácil uso, e a mesma metodologia para o desenvolvimento desses pode ser usada para outros organismos, e adaptado para outros métodos que envolvem sequenciamento.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. (1990). **Basic local alignment search tool**. *Journal of Molecular Biology*. 215(3): 403-410.

ANDERSEN, K., BIRD, K.L., RASMUSSEN, M., HAILE, J., BREUNING-MADSEN, H., KJAER, K.H., ORLANDO, L., GILBERT, M.T.P., WILLERSLEV, E. (2012). **Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity**. *Molecular Ecology*. 21(8): 1966-1979.

ARDURA, A., ZAIKO, A., MARTINEZ, J.M., SAMULIOVIENE, A., SEMENOVA, A., GARCIA-VAZQUEZ, E. (2016). **eDNA and specific primers for early detection of invasive species – A case study on the bivalvia *Rangia cuneate*, currently spreading in Europe**. *Marine Environmental Research*. 112: 48-55.

BIERNET, F., DE DANIELI, S., MIQUEL, C., COISSAC, E., POILLOT, C., BRUN, J-J., TABERLET, P. (2012). **Tracking earthworm communities from soil DNA**. *Molecular Ecology*. 21: 2017-2013.

BOLTOVSKOY, D., CORREA, N., CATALDO, D., SYLVESTER, F. (2006). **Dispersion and Ecological Impact of the Invasive Freshwater Bivalve *Limnoperna***

**fortunei in the Río de la Plata Watershed and Beyond.** *Biological Invasions* 8:947-963

CAIXETA, E.T., BAIÃO, A.C.d.O., BRITO, G.G., SAKIYAMA, N.S. (2016). **Tipos de marcadores moleculares.** In: *Marcadores Moleculares*. Borém, A. Caixeta, E. (eds). Editora UFV (Universidade Federal de Viçosa).

CALVINAG-SPENCER, S., MERKEI, K., KUTZNER, N., KUHL, H., BOESCH, C., KAPPELER, P., METZGER, S., SCHUBERT, G., LEENDERTZ, F. (2013). **Carrion fly-derived DNA as a tool for comprehensive and cost-effective assesment of mammalian biodiversity.** *Molecular Ecology*. 22(4) 915-924.

CORDERO, E.H. (1941). **Observaciones Sobre Algunas Especies Sudamericanas del Genero Hydra. Hydra Y Cordylophora em el Uruguay.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 11: 335-400.

DAMMSKI, P.B. (2008). **ASPECTOS DO CICLO DE VIDA DA ESPÉCIE INVASORA *Cordylophora caspia* (CNIDARIA) NO RESERVATÓRIO DA USINA HIDRELÉTRICA GOVERNADOR JOSÉ RICHÁ, RIO IGUAÇU, PARANÁ.** Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2008.

DARLING, J. A., FOLINO-ROREM, N.C. (2009). **Genetic analysis across differential spatial scales reveals multiple dispersal mechanisms for the invasive hydrozoan *Cordylophora* in the Great Lakes.** *Molecular Ecology*. 18: 4827-4840.

DARRIGRAN, G., EZCURRA-DE-DRAGO, I. (2000). **Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) in South America.** *Nautilus*. 114: 69-73.

DEINER, K., WALSER, J.-C., MÄCHLER, E., ALTERMATT, F. (2015). **Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA.** *Biological Conservation*. 183: 53–63.

DE BARBA, M., MIQUEL, C., BOYER, F., MERCIER, C., RIOUX, D., COISSAC, E., TABERLET, P. (2014). **DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assesment: applicaton to omnivorous diet.** *Molecular Ecology Resources*. 14(2): 30623.

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(8): 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*.** *Journal of Applied Ecology*. 49:953-959.

EICHMILLER, J.J., BAJER, G.P., SORENSEN, P.W. (2014). **The Relationship between the Distribution of Common Carp and Their Environmental DNA in a Small Lake.** *PLoS ONE* 9(11): e112611

FICETOLA, F. G., MIAUD, C., POMPANON, F., TABERLET, P. (2008). **Species detection using environmental DNA from water samples**. *Biology Letters*, 4(4) 423-425.

FOLINO, N.C. (2000). **The freshwater expansion and classification of the colonial hydroid *Cordylophora* (Phylum Cnidaria, Class Hydrozoa)**. In Pederson, Judith (ed.) *Marine Bioinvasions: Proceedings of the First National Conference*, January 24-27, 1999. Massachusetts Institute of Technology Sea Grant College Program, Cambridge MA. p. 139-144

FOLINO-ROREM, N.C.; INDELICATO, J., 2005. **Controlling biofouling caused by the colonial hydroid *Cordylophora caspia***. *Water Research*. 39:2731-2737.

FULTON, C. (1960). **Culture of a Colonial Hydroid under Controlled Conditions**. *Science*. 132(3425): 473-474.

FULTON, C. (1962). **Environmental factors influencing the growth of *Cordylophora***. *Journal of Experimental Zoology*. 151: 61-78

FREELAND, J.R., PETERSEN, S.D., KIRK, H. (2011). **Molecular Ecology**. 2nd ed. WileyBlackwell.

GILI, J-M.; HUGHES, R.G. (1995). **The ecology of marine benthic hydroids**. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*. 33: 351-426.

GROHMANN, P.A. BRUM, P.R. (2007). ***Cordylophora caspia* (HYDROZOA, ANTHOMEDUSAE, CLAVIDAE) em corpos d'água doce no Brasil: um caso de bioincrustação no sistema de resfriamento das turbinas da usina de funil, Itatiaia, RJ**. XII congresso latino-americano de ciências do mar - XII colacmar

GOLDBERG, C.S., PILLIOD, D.S., ARKLE, R.S., WAITS, L.P. (2011). **Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using rocky mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders**. *PLoS ONE*, 6, e22746.

HALL, T. A. (1999). **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

HEBERT, P.B., CYWINSKA, A., BALL, S.L., DEWAARD, J.R. (2003). **Biological identifications through DNA barcodes**. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270(1512):313-21.

HURLBERT, S.H.; VILLALOBOS-FIGUEROA, A. (Eds.) (1982). **Aquatic biota of México, Central America and West Indies**. *Aquatic Biotic SDSU Fondation*, San Diego. 529: 62-63

HUNTER, M.E, OYLER-MCCANCE, S.J., DORAZIO, R.M., FIKER, J.A., SMITH, J.B., HUNTER, C.T., REED, R.N., HART, M.K. (2015). **Environmental DNA (eDNA) Sampling Improves Occurrence and Detection Estimates of Invasives Burmese Pythons**. *PLoS ONE* 10(4): e0121655. doi:10.1371/journal.pone.0121655

HADDAD, M.A.; NAKATANI, K., 1996. **Primeiro registro de *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771) (Cnidaria, Hydroida) em águas continentais brasileiras**. In XIV Congresso Brasileiro de Zoologia., SBZ, Porto Alegre, p.10.

JERDE, C.L., MAHON, A.R., CHADDERTON, W.L., LODGE, D.M. (2011). **Sight-unseen detection of rare aquatic species using environmental DNA.** *Conservation Letters*. 4: 150–157.

JORMALAINEN, V; HONKANEN, T; VUORISALO, T; LAIHONEN, P. (1994) **Growth and reproduction of an estuarine population of the colonial hydroid *Cordylophora caspia* (Pallas) in the northern Baltic Sea.** *Helgoländer Meeresunters.* 48, 407-418.

KLYMUS K.E., RICHTER, C.A., CHAPMAN, D.C., PAUKERT, C. (2014). **Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*.** *Biological Conservation*. 183(2015): 77-84.

LARKIN, M. A., Blackshields, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. (2007). **Clustal W and Clustal X version 2.0.** *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.

MACDONALD, A.J., SARRE, S.D. (2016). **A framework for developing and validating taxon-specific primers for specimen identification from environmental DNA.** *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.12618

MACK, R.; SIMBERLOFF, D.; LONSDALE, M.W; EVANS, H.; CLOUT, M., BAZZAZ, F.A. (2000). **Biotic invasions: causes, epidemiological, global consequences, and control.** *Ecological Applications*. 10(3): 689-710.

MANT, R.C., MOGGRIDGE, G.D., ALDRIDGE, D.C. (2012). **Control of biofouling by *Cordylophora caspia* in freshwater using one-off, pulsed and intermittent dosing of chlorine: laboratory evaluation.** *Biofouling*. 28(5), 433-40.

MARUYAMA, A., NAKAMURA, K., YAMANAKA, H., KONDOH, M., MINAMOTO, T. (2014). **The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish.** *PLoS ONE* 9(12): e114639

MEEK, M.H., WINTZER, A.P., WETZEL, W.C., MAY, B. (2013). **Climate Change Likely to Facilitate the Invasion of the Non-Native Hydroid, *Cordylophoracaspia*, in the San Francisco Estuary.** *PLoS ONE* 7(10): e46373. doi:10.1371/journal.pone.0046373

MERKES, C.M., MCCALLA, S.C., JENSEN, N.R., GAIKOWSKI, M.P., AMBERG, J.J. (2014). **Persistence of DNA in Carcasses, Slime and Avian Feces May Affect Interpretation of Environmental DNA Data.** *PLoS ONE* 9(11): e113346

MIYA, M., SATO, Y., FUKUNAGA, T., SADO, T., POULSEN, J.Y., SATO, K., MINAMOTO, T., YAMAMOTO, S., YAMANAKA, H., ARAKI, H., KONDOH, M., IWASAKI, W. (2015). **MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species.** *Royal Society Open Science*. 2:150088

MORRI, C. (1981). **Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque lagunari e costiere italiane.** Consiglio Nazionale Delle Ricerche. AQ/1/94 – 6.

NEVES, C.S.; ROCHA, R.M. (2006). **Bioinvasão mediada por embarcações de recreio na Baía de Paranaguá, PR e suas implicações para a conservação.** 74

p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná.

ORGIAZZI, A., DUNBAR, M.B., PANAGOS, P., ARJEN DE GROOT, G., LEMANCEAU, P. (2015). **Soil biodiversity and DNA barcodes: opportunities and challenges.** *Soil Biodiversity & Chemistry*. 80: 244-250.

PHILLIPS, S.; DARLAND, T.; SYTSMA, M., 2005. **Potential Economic Impacts of Zebra Mussels on the Hydropower Facilities in the Columbia River Basin.** Prepared for the Bonneville Power Administration by Pacific States Marine Fisheries Commission. <http://www.psmfc.org/>.

PIE, M.R., BOEGER, W.A., PATELLA, L., FALLEIROS, R.M. (2006). **A fast and accurate molecular method for the detection of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Mytilidae) in plankton samples.** *Journal of Molluscan Studies*. 72(2) 218219.

REES, H.C., MADDISON, B.C., MIDDLEDITCH, D.J., PATMORE, J.R.M., GOUGH, K.C. (2014). Review: **The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology.** *Journal of Applied Ecology*. 51(5): 1450-1459.

REES, H.C., GOUGH, K.C., MIDDLEDITCH, D.J., PATMORE, J.R., MADDISON, B.C. (2015). **Applications and limitations of measuring environmental DNA as indicators of the presence of aquatic animals.** *Journal of Applied Ecology*. 52(4): 827-831.

RICCIARDI, A., MACISAAC, J.H. (2000). **Recent mass invasion of the North American Great Lakes by Ponto-Caspian species.** *Trends in Ecology and Evolution*. 15(2), 62-65.

ROBSON, H.L., NOBLE, T.H., SAUNDERS, R.J., ROBSON, S.K., BURROWS, D.W., JERRY, D.R. (2016). **Fine-tuning for the tropics: application of eDNA technology for invasive fish detection in tropical freshwater ecosystems.** *Molecular Ecology Resources*.

ROOS, P. J. (1979). **Two-stage life cycle of a *Cordylophora* population in the Netherlands.** *Hydrobiologia*, Vol. 62(3): 231-239.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977). **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. 74(12): 5463-5467

SCHNEIDER, J., VALENTINI, A., DEJEAN, T., MONTARSI, F., TABERLET, P., GLAIZOT, O. *et al.* (2016). **Detection of Invasive Mosquito Vectors Using Environmental DNA (eDNA) from Water Samples.** *PLoS ONE* 11(9): e0162493. doi:10.1371/journal.pone.0162493

SHEHZAD, W., RIAZ, T., NAWAZ, M.A., MIQUEL, C., POILLOT, C., SHAH, SAFDAR, A., POMPANON, F., COISSAC, E., TABERLET, P. (2012). **Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan.** *Molecular Ecology*, 21, 1951–1965.

SILVEIRA, F.L.; BOSCOLO, H. K. 1996. **Primeira Ocorrência de *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771) (Hydrozoa, Clavidae) para o estado de São Paulo**. In: Resumos XIV Congresso Brasileiro de Zoologia. SBZ, Porto Alegre, p. 10.

SMART, A.S., WEEKS, A.R., VAN ROOYEN, A.R.S, MOORE, A., MCCARTHY, M.A., TINGLEY, R. (2016). **Assessing the cost-efficiency of environmental DNA sampling. *Methods in Ecology and Evolution***. doi: 10.1111/2041-210X.12598

SMITH, D.G., WERLE, S.F., KLEKOWSKI, E. (2002). **The rapid colonization and emerging biology of *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771) (Cnidaria: Clavidae) in the Connecticut River**. *Journal of Freshwater Ecology* 17(3): 423-430.

TABERLET, P., COISSAC, E., POMPANON, F., BROCHMANN, C., WILLERSLEV, E. (2012). **Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding**. *Molecular Ecology*. 21(8): 2045-2050

TARDENT, P. (1963). **Regeneration in the Hydrozoa**. *Biological Reviews*. 38(3): 293-333.

VAATE, A.B., JAZDEWSKI, K., KETELAARS, H.A.M., GOLLASCH, S., VAN DE VELDE, G. (2000). **Geographical patterns in range extension of Ponto-Caspian macroinvertebrate species in Europe**. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 59(7): 1159-1174.

VELDHOEN, N., HOBBS, J., IKONOMOU, G., HIL, M., LESPERANCE, M., HELBING, C.C. (2016). **Implementation of Novel Design Features for qPCR-Based eDNA Assessment**. *PLoS ONE* 11(11): e0164907. doi:10.1371/journal.pone.0164907

YOCCOZ, N.G., BRATHEN, K.A., GIELLY, L., HAILE, J., EDWARDS, M.E., GOSLAR, T., VON STEDINGK, H., BRYSTING, A.K., COISSAC, E., POMPANON, F., SONSTEBØ, J.H., MIQUEL, C., VALENTINI, A., DE BELLO, F., CHAVE, J., TUILLER, W., WINCKER, P., CRUAUD, C., GAYORY, F., RASMUSSEN, M., GILBERT, M.T.P., ORLANDO, L., BROCHMANN, C., WILLERSLEV, E., TABERLET, P. (2012). **DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity**. *Molecular Ecology*. 21: 3647-3655.

ZAMPONI, M. O. 1991. **Los Cnidaria de la republica Argentina**. Castellanos, Z.A (eds.) *Fauna de Agua Dulce de la Republica Argentina*, V.7:20-2