



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

LISANDRA CELESTE DA SILVA PÁDUA

USO DO DNA AMBIENTAL NO MONITORAMENTO E DISTRIBUIÇÃO DA
ESPÉCIE *Corydoras cf. garbei* NA BACIA DO RIO PAJEÚ, PERNAMBUCO

SERRA TALHADA, PE

2024

LISANDRA CELESTE DA SILVA PÁDUA

**USO DO DNA AMBIENTAL NO MONITORAMENTO E DISTRIBUIÇÃO DA
ESPÉCIE *Corydoras cf. garbei* NA BACIA DO RIO PAJEÚ, PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Linha de pesquisa: Ecologia, Conservação e uso da Biodiversidade de Ambientes Aquáticos.

Prof. Dr. Carlos Henrique dos Anjos dos Santos

Orientador

Prof. Dr. Adalberto Luis Val

Coorientador

SERRA TALHADA, PE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Suely Manzi – CRB-4 809

P125u Pádua, Lisandra Celeste da Silva.
Uso do DNA ambiental no monitoramento e distribuição da espécie *Corydoras* cf. *garbei* na bacia do Rio Pajeú, Pernambuco / Lisandra Celeste da Silva Pádua. – Serra Talhada, 2024.
53 f.; il.

Orientador(a): Carlos Henrique dos Anjos dos Santos.

Co-orientador(a): Adalberto Luis Val.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica Serra Talhada - UAST, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Serra Talhada, BR-PE, 2024.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Caatinga. 2. Bagre (Peixe). 3. Peixes de água doce. 4. Regiões áridas - Pernambuco 5. Pajeú, Rio, Vale (PE). I. Santos, Carlos Henrique dos Anjos dos, orient. II. Val, Adalberto Luis, coorient. III. Título

CDD 338.95

LISANDRA CELESTE DA SILVA PÁDUA

**USO DO DNA AMBIENTAL NO MONITORAMENTO E DISTRIBUIÇÃO DA
ESPÉCIE *Corydoras cf. garbei* NA BACIA DO RIO PAJEÚ, PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Linha de pesquisa: Ecologia, Conservação e uso da Biodiversidade de Ambientes Aquáticos.

Aprovada em: 30/04/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Henrique dos Anjos doas Santos - Orientador

Unidade Acadêmica de Serra Talhada/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Nivaldo Nascimento da Silva

Unidade Acadêmica de Serra Talhada/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Elton José de França

Unidade Acadêmica de Serra Talhada/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha amada família, cujo amor, apoio e compreensão foram o alicerce que sustentou cada passo desta jornada acadêmica. A vocês, que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo palavras de incentivo nos momentos difíceis e compartilhando minha alegria nas conquistas, expresso minha profunda gratidão. Cada página deste trabalho é dedicada a vocês, que são minha fonte de inspiração e meu maior orgulho. Que este trabalho seja um tributo ao amor e dedicação que vocês me proporcionaram ao longo de toda a minha vida.

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, por me guiar e iluminar meu caminho ao longo desta jornada de pesquisa. Sua constante orientação e proteção foram fundamentais para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

À minha família e amigos, expresso minha profunda gratidão por seu apoio incondicional, compreensão e incentivo durante todo o período do meu mestrado. Seu amor e encorajamento foram verdadeiros pilares que me sustentaram nos momentos mais desafiadores.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Henrique dos Anjos dos Santos, agradeço por sua orientação sábia, paciência e dedicação ao longo deste trabalho. Seu apoio e expertise foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço também à Carol e sua família pela generosa hospedagem e pelo acolhimento durante minha estadia. Sua hospitalidade fez toda a diferença e tornou minha experiência ainda mais enriquecedora.

À equipe do LEEM/INPA, meu sincero agradecimento pela disponibilidade, suporte técnico e infraestrutura oferecida durante o desenvolvimento deste estudo. Sem o apoio de vocês, esta pesquisa não teria sido possível.

À UFRPE/UAST e ao PPGBC, expresso minha gratidão pela oportunidade de realizar este mestrado e pelo ambiente acadêmico estimulante proporcionado por vocês.

Por fim, gostaria de agradecer a CAPES pela bolsa de estudos e apoio financeiro concedidos, que foram fundamentais para a realização deste trabalho de pesquisa.

A todos os mencionados e a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, meu mais sincero obrigado. Esta conquista é também de vocês.

Resumo

Os ecossistemas aquáticos em áreas áridas e semiáridas têm sofrido com a escassez hídrica, sendo o bioma Caatinga o mais afetado por chuvas irregulares e altos níveis de radiação solar. A diversidade de espécies de peixes do bioma Caatinga corre grande risco de se perder, além de não conseguir se adaptar às mudanças climáticas. Neste contexto, são necessários estudos de monitoramento e distribuição de espécies-alvo no bioma Caatinga. No presente estudo realizamos um levantamento bibliográfico sobre o uso da metodologia do DNA ambiental nos ambientes de água doce na região Neotropical afim de identificarmos o avanço nas pesquisas sobre o assunto para a região, em seguida nós aplicamos a metodologia em uma bacia hidrográfica da Caatinga para monitoramos a distribuição da espécie *Corydoras cf. garbei* na bacia do rio Pajeú (Pernambuco, Brasil). Amostras de água foram coletadas em trechos específicos da bacia do Rio Pajeú e enviadas ao laboratório da UAST/UFRPE para filtragem. Após a filtragem das amostras de água, os filtros foram colocados em tubos falcon e armazenados em freezer a -20°C. As análises de DNA ambiental foram realizadas no LEEM/INPA (Manaus, Brasil), onde foram realizadas extração, quantificação, purificação e detecção de DNA por PCR. Na detecção convencional por PCR, utilizamos primers específicos para a espécie desenvolvidos no programa OligoAnalyzer. A detecção da espécie-alvo foi confirmada em gel de agarose e verificamos que a distribuição da espécie é restrita, ou seja, a espécie *C. cf. garbei* não possui ampla distribuição e foi detectada em áreas de maior impacto antropogênico pelo método de DNA ambiental. Em suma, para monitorar a espécie é necessário padronizar a técnica para que tenhamos maior eficiência no monitoramento.

Palavras-chave: Caatinga, Bagre (peixe), Peixe de água doce, Regiões áridas – Pernambuco, Vale do rio Pajeú (PE).

Abstract

Aquatic ecosystems in arid and semi-arid areas have suffered from water scarcity, with the Caatinga biome being most affected by irregular rainfall and high levels of solar radiation. The diversity of fish species in the Caatinga biome is at great risk of being lost, in addition to being unable to adapt to climate change. In this context, monitoring and distribution studies of target species in the Caatinga biome are necessary. In the present study, we carried out a bibliographical survey on the use of environmental DNA methodology in freshwater environments in the Neotropical region to identify advances in research on the subject for the region, then we applied the methodology in a Caatinga river basin, we monitored the distribution of the species *Corydoras* cf. *garbei* in the Pajeú river basin (Pernambuco, Brazil). Water samples were collected in specific sections of the Pajeú River basin and sent to the UAST/UFRPE laboratory for filtering. After filtering the water samples, the filters were placed in falcon tubes and stored in a freezer at -20° C. Environmental DNA analyzes were carried out at LEEM/INPA (Manaus, Brazil), where DNA extraction, quantification, purification and detection by PCR were carried out. In conventional PCR detection, we use specie-specific primers developed in the OligoAnalyzer program. The detection of the target specie was confirmed in agarose gel, and we verified that the distribution of the specie is restricted, that is, the specie *C. cf. garbei* do not have a wide distribution and were detected in areas of greatest anthropogenic impact using the environmental DNA method. In short, to monitor the species it is necessary to standardize the technique so that we have greater monitoring efficiency.

Keywords: Arid Regions-Pernambuco, Caatinga, Catfish, Freshwater fish, Pajeú river valley (PE).

Lista de figuras

Artigo científico 1: Aplicações do DNA Ambiental em Ecossistemas de Água Doce

Neotropicais: Uma Revisão

Figura 1: Número de artigos publicados por ano na literatura revisada no período de 2015 a 2023 avaliando o uso do DNA ambiental em ambientes de água doce da região neotropical (A), média de citações dos documentos, demonstrando a relevância dos estudos publicados no ano de 2019 (B)..... 20

Figura 2: Ranking dos dez primeiros periódicos com mais artigos publicados sobre o assunto, destacando-se os três primeiros periódicos como as principais fontes de publicação (A) em seguida o gráfico com a divisão em zonas, segundo a lei de Bradford, onde a zona 1 é formada pelos periódicos com maior produtividade, zona 2, periódicos com média produtividade e zona 3 periódicos com pouca produtividade (B). 20

Figura 3: Produtividade dos autores, segundo a Lei de Lotka, 79% dos autores aqui revisados produziram apenas um artigo sobre eDNA (A), ranking dos dez autores mais produtivos, ou seja, os que mais possuem artigos publicados seja como primeiro autor ou como colaborador (B) em seguida temos um diagrama de árvore com as palavras-chave mais citadas dentre os artigos aqui revisados (C).....22

Figura 4: Tipos de ecossistemas mais estudados, destacando-se os ambientes lóticos que foram os mais documentados (50%), sendo os rios os mais estudados (35%), seguido lago/lagoa (A), e em seguida os espécimes mais estudados, destacando-se o grupo dos peixes (40,38%) como os mais documentados (B).....23

Figura 5: Número de publicações por países que compõem a região neotropical (A) e biomas Brasileiros mais estudados nos artigos aqui revisados.....24

Figura 6: Usos da metodologia na região neotropical sendo 45% dos estudos utilizando para fins de detecção (A), em seguida os tipos de detecção mais comuns na região, sendo mais empregado nos estudos de detecção de biodiversidade (B) e os marcadores mais utilizados na região neotropical, destacando-se o 12s rRNA, que foi utilizado em 50% das pesquisas.24

Artigo científico 2: Detecção da espécie *Corydoras cf. garbei* (Ihering, 1911) em um afluente do Rio Pajeú

Figura 1: Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Pajeú.....37

Figura 2: Locais e pontos de coleta das amostras de água para as análises de DNA ambiental em um trecho do Rio Pajeú, na cidade de Flores, PE. Os pontos 7 e 8 são pontos extras em um

afluente (Riacho da Velha) para verificação da ocorrência da espécie por estarem próximos ao trecho estudado.....39

Figura 3: Produtos de amplificação dos pares de primers utilizados nas reações de PCR convencional. Apenas a amostra 7 amplificou para o primer espécie-específico (CP, controle positivo – amostra de DNA da espécie-alvo). O primer universal não amplificou nas amostras 2 e 3. A seta em vermelho indica a presença de DNA genômico e a seta laranja provável amplificação.....43

Lista de tabelas

Artigo científico 1: Aplicações do DNA Ambiental em Ecossistemas de Água Doce Neotropicais: Uma Revisão

Tabela 1: Ranking dos dez artigos mais citados pelos pesquisadores.....21

Artigo científico 2: Detecção da espécie *Corydoras cf. garbei* (Ihering, 1911) em um afluente do Rio Pajeú

Tabela 1: Coordenadas geográficas dos pontos de coletas de amostras de água na bacia hidrográfica do Rio Pajeú, Flores, PE.38

Tabela 2: Quantificação e pureza do DNA extraído das amostras de filtros e tecido do musculo branco da espécie-alvo.....41

Sumário

1. Introdução	11
2. Referencial Teórico	13
3. Artigo científico 1: Aplicações do DNA Ambiental em Ecossistemas de Água Doce Neotropicais: Uma Revisão	16
3.1 Introdução	17
3.2 Metodologia	18
3.3 Resultados	19
3.4 Discussão	25
3.5 Conclusão	27
Referências	28
4. Artigo 2: Detecção da espécie <i>Corydoras cf. garbei</i> (Ihering, 1911) em um afluente do Rio Pajeú	34
4.1 Introdução	35
4.2 Metodologia	37
4.2.1 Área de Estudo	37
4.2.2 Captura e Estocagem de Amostras Biológicas	38
4.2.3 Coleta e Filtragem das Amostras de Água do Rio Pajeú	38
4.2.4 Extração do DNA Total (Amostras de Tecido e Filtros)	39
4.2.5 Desenho dos Primers Degenerados e Espécie-específico	40
4.2.6 Gradiente de Temperatura e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	40
4.3 Resultados e Discussão	41
4.4 Conclusão	43
Referências	44
5. Considerações Finais	47
Referências Bibliográficas	48
Apêndice A	53

1. Introdução

Avaliar a biodiversidade em regiões ricas em números de espécies é de fundamental importância para a conservação ambiental (MILAN et al., 2020), e os peixes é um grupo com maior diversidade de espécies dentro dos vertebrados (KESKIN et al., 2016). As atividades antrópicas estão causando perdas significativa na diversidade biológica nos ambientes aquáticos, e isso tem contribuído para alteração e funcionamento dos ecossistemas aquáticos ao redor do mundo (MILAN et al., 2020). No entanto, a eficiência na conservação e manejo da biodiversidade de organismos de água doce tem sido limitada pela falta de conhecimento sobre a distribuição de algumas espécies (BOYD et al., 2020), principalmente, as espécies que apresentam distribuições restritas e pequenas (isto é, endêmicas de curto alcance) e, que possui limitada capacidade de dispersão nos ambientes de água doce.

Dados da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN; inglês International Union for Conservation of Nature's), sugerem que mais de 25% das espécies de animais de água doce estão ameaçadas ou já foram extintas em todo o mundo (KESKIN et al., 2016). Diante disso, realizar o biomonitoramento nos ecossistemas aquáticos se tornou crucial para fornecer dados atuais sobre o estado de conservação das espécies de peixes de água doce, bem como das possíveis mudanças nas comunidades ictiológicas (KELLY et al., 2014). Porém, o monitoramento rápido da biodiversidade para conservação, manejo ou avaliação dos impactos das pressões antropogênicas tem sido difícil de mensurar utilizando os métodos tradicionais de captura da ictiofauna local (e.g., pesca elétrica, rede de emalhar, tarrafas, hidroacústica, entre outros métodos) (HANDLEY et al., 2019), e métodos inovadores e não invasivos como o DNA ambiental (eDNA; inglês environmental DNA) tem ganhado um importante impulso nos últimos anos devido ao potencial no biomonitoramento rápido e econômico, evitando assim a coleta e identificação visual de espécimes vivos no ambiente selvagem (FICETOLA et al., 2008; KNUDSEN et al., 2019).

Assim, o eDNA nos últimos anos tem sido cada vez mais utilizado para o monitoramento dos organismos aquáticos (ambiente de água doce, marinho e estuarino), principalmente na identificação de espécies (raras, crípticas, em risco de extinção, exóticas e endêmicas), verificação da ausência ou presença de espécie-alvo, monitoramento de espécies (raras, invasoras ou ameaçadas de extinção) e ainda auxiliando na determinação da biodiversidade local (ao nível de espécie, gênero, família, ordem) (HANSEN et al., 2020; BAUDRY et al., 2023; FERNANDEZ et al., 2023; KALOGIANNI et al., 2024; LI et al., 2024; MAURO et al., 2023; OSATHANUNKUL e SUWANNAPOOM, 2024; WU et al., 2024). Diante disso, uma

das vantagens no uso do método do eDNA é que ele pode ser aplicado para um tempo curto de atividade de campo e sua confiabilidade permite a detecção de espécies que ocorrem ou estiveram presentes no ambiente aquático (REES et al., 2014).

Recentemente, alguns estudos têm sido realizados na região Neotropical com aplicação do método do eDNA (CANTERA et al., 2019; CILLEROS et al., 2019; NOBILE et al., 2019; SALES et al., 2019; MILAN et al., 2020; HÄRER et al., 2021; JACKMAN et al., 2021; PONT et al., 2021; QUÉMÉRÉ et al., 2021, SALES et al., 2021). Neste âmbito, estudar os biomas existentes na região Neotropical tornou-se de suma importância para conservação da biodiversidade na região, e o bioma Caatinga localizado no semiárido brasileiro é um dos biomas menos estudados comparados com outros biomas brasileiros. Por outro lado, ainda é necessário reconhecer o semiárido brasileiro como um importante sítio de biodiversidade e que essa diversidade está intimamente associada aos padrões naturais de fluxo e aos distúrbios hidrológicos, ou seja, aos padrões climáticos complexos que levam a uma distribuição irregular da pequena quantidade de chuvas e baixa amplitude térmica para região (MALTCHIK e MEDEIROS, 2006). Além disso, os efeitos dos distúrbios hidrológicos causados por enchentes e secas no semiárido nordestino afetam significativamente a estabilidade das comunidades de peixes que vivem nos rios temporários da região (MEDEIROS e MALTCHIK, 2001). Portanto, o uso do método do DNA ambiental no bioma Caatinga será de grande valia e uma promissora ferramenta para detecção de espécies de peixes de água doce para o semiárido brasileiro, em especial do Estado de Pernambuco.

A nossa capacidade em identificarmos adequadamente as espécies presentes em uma paisagem ou no ambiente aquático é de fundamental importância para os estudos na área de ecologia e essencial para os programas de manejo e conservação dos recursos naturais (MCELROY et al., 2020). Sabe-se que as espécies de peixes que ocorrem no semiárido nordestino são resultado de processos evolutivos impulsionados por fatores climáticos e pelo regime hidrológico da região. Porém, a influência humana por meio de mudanças ambientais e a introdução de espécies exóticas podem estar modificando a própria estrutura da fauna original (SANTOS e ZANATA, 2006).

Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram (I) realizar um levantamento bibliográfico sobre o uso do DNA ambiental na região Neotropical e (II) aplicar o método do DNA ambiental como ferramenta para verificar a ocorrência e distribuição da espécie de peixe de água doce *Corydoras cf. garbei* na bacia do rio Pajeú, Pernambuco. Vale salientar, a importância de aprofundar o conhecimento sobre a distribuição e ocorrência da espécie numa bacia hidrográfica no bioma Caatinga, principalmente em suas bacias adjacentes, que até o

momento, não se tem muito conhecimento e com isso enriquecer os estudos sobre a espécie-alvo ajudaria nas políticas de conservação e manejo para espécie. Além disso, o estudo será pioneiro na região utilizando o método do DNA ambiental para o monitoramento da espécie-alvo para a bacia do rio Pajeú.

2. Referencial teórico

A Caatinga, localizada na região semiárida do Nordeste do Brasil, é dominada por uma floresta tropical sazonalmente seca e abrange uma rede hidrográfica relativamente modesta, caracterizada por cursos de água intermitentes. Apesar de algumas explorações iniciais que datam do século XVI e da compilação sistemática de espécies de peixes iniciada no início do século XIX, até recentemente a ictiofauna do bioma Caatinga era considerada pouco conhecida devido à falta de amostragem adequada. A riqueza de espécies de peixes na Caatinga é estimada em cerca de 386 espécies, das quais 371 são espécies nativas de água doce, 203 são consideradas endêmicas das ecorregiões hidrográficas onde ocorre a Caatinga, 15 são introduzidas de outras bacias, e 15 espécies listadas têm status taxonômico duvidoso (LIMA et al., 2017). Assim, a compilação taxonômica dos peixes que ocorrem na Caatinga revela a presença de sete ordens, sendo a ordem Siluriformes (Loricariidae, Pimelodidae e Callichthyidae; sendo as famílias mais diversificadas) a de maior diversidade, seguidas das ordens: Characiformes, Cyprinodontiformes, Gymnotiformes, Perciformes, Myliobatiformes, Clupeiformes e Symbranchiformes (LIMA et al., 2017).

Algumas questões têm sido levantadas sobre a biodiversidade aquática no bioma Caatinga e com base neste panorama de descobertas, alguns pontos foram detectados como desafios em relação ao nosso conhecimento sobre a ictiofauna do bioma Caatinga, são eles: (i) pesquisas de longo prazo para determinar a real diversidade de espécies de peixes neste ecossistema; (ii) uma revisão taxonômica dos grupos sistematicamente ambíguos; (iii) a caracterização da história natural das espécies de peixes da Caatinga, especialmente aquelas envolvidas na economia local; (iv) monitoramento mais preciso das consequências da introdução de espécies exóticas, o que requer a elaboração de projetos de conservação mais eficientes para proteger essas espécies e os ecossistemas em que vivem (ALBUQUERQUE et al., 2012). Além disso, descrever a distribuição geográfica das espécies pode ampliar o conhecimento da biodiversidade regional e contribuir para o desenvolvimento de políticas de conservação (LÉVÊQUE et al., 2008).

No entanto, o monitoramento da diversidade de peixes para conservação, gestão ou avaliação do impacto das pressões antropogênicas tem sido difícil de ser mensuradas com o uso exclusivo de métodos tradicionais. O levantamento da fauna de peixes de água doce pelos métodos tradicionais exige esforços e custos substanciais devido às suas enormes áreas superficiais e níveis de profundidades da água, e desse modo podendo ser considerados como perturbadores para a fauna nativa (DARLING e MAHON, 2011). Porém, o monitoramento e distribuição da ictiofauna é particularmente relevante para regiões com alta diversidade de peixes em ecossistemas aquáticos dinâmicos, uma vez que nenhum método tradicional é adequado para todos os tamanhos e profundidades nos corpos d'água (HANDLEY et al., 2019). Assim, determinar a presença, distribuição e abundância de uma espécie é fundamental para um monitoramento das mudanças na distribuição das espécies e no tamanho da população (PIGGOTT et al., 2021), especialmente quando as populações de espécies-alvo diminuem para níveis ameaçados, representando uma questão fundamental para a conservação e gestão da biodiversidade de água doce (THOMSEN et al., 2012).

A necessidade de monitorar a distribuição de espécies aquáticas sem a utilização de métodos de captura invasivos levou a busca por abordagens alternativas de amostragem, como a análise por DNA ambiental (eDNA). O método do eDNA tem sido considerado uma ferramenta emergente e promissora para detecção de espécies-alvo, sendo o seu uso considerado econômico e sensível na detecção de organismos aquáticos em qualquer fase do ciclo de vida (SHU et al., 2020). Neste âmbito, o eDNA tem mostrado ser um método com alta sensibilidade de detecção, menor impacto no ecossistema amostrado e facilidade de aplicação, além de proporcionar uma amostragem alternativa e valiosa para espécies aquáticas (BALASINGHAM et al., 2018). Atualmente, a PCR convencional (cPCR) e a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) são as duas principais abordagens utilizadas na detecção de espécies baseadas em eDNA, mas a PCR digital de gotículas (ddPCR) tem sido sugerida como mais sensível, embora seu uso seja limitado devido ao custo e complexidade operacional (XIA et al., 2018). Segundo Nathan et al. (2014), verificaram que sinais de eDNA usando cPCR, qPCR e ddPCR em aquários do mesocosmo, obtiveram 100% de detecção da espécies-alvo em todas as plataformas; no entanto, eles não distinguiram o poder de detecção de cPCR ou qPCR.

Em suma, a presença de eDNA de uma espécie-alvo permite-nos detectar a sua presença ou presença muito recente sem a necessidade de observação direta ou captura. Além disso, a análise do eDNA é particularmente útil para aquelas espécies (e.g., espécies aquáticas que vivem no fundo ou substrato) que são difíceis de detectar utilizando métodos convencionais, tais como aquelas que necessitam de captura ou para as quais são necessárias licenças para

captura, como é o caso de algumas espécies ameaçadas ou em perigo. Por outro lado, a análise do eDNA envolve a coleta de uma amostra de água, extração do eDNA e uma etapa de PCR (cPCR ou qPCR ou ddPCR) para amplificar o DNA da espécie-alvo, podendo ser realizadas em poucas horas, tornando esta técnica um método rápido para detectar a presença de uma espécie-alvo (REES et al., 2014).

3. Artigo científico 1: Aplicações do DNA Ambiental em Ecossistemas de Água Doce Neotropicais: Uma Revisão

Mini-Revisão a ser enviada para os Anais da Academia Brasileira de Ciências (Online), ainda sem a formatação da revista.

Lisandra Celeste da Silva Pádua¹, Aldaberto Luis Val², Carlos Henrique dos Anjos dos Santos¹

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação (PPGBC), Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Av. Gregório Ferraz Nogueira, s/n, 56909-535, José Tomé de Souza Ramos, Serra Talhada (PE), Brasil. lisandrapadua@gmail.com; carlos.hasantos@ufrpe.br

²Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Av. André Araújo, 2936, 69067-375, Petrópolis, Manaus (AM), Brasil. dalval.inpa@gmail.com

RESUMO

A região Neotropical é uma das mais biodiversa do mundo e abrigando uma diversidade ictiológica distintas para os seus diferentes habitats aquáticos. Essa mini-revisão buscou mostrar os estudos realizados com DNA ambiental na região Neotropical e sua aplicabilidade no monitoramento das comunidades de peixes de água doce da região. A pesquisa foi realizada com base na literatura científica contida no Scopus e Web of Science e revisados por pares para as palavras-chave predeterminadas, “Environmental DNA” and “Freshwater” and “eDNA”, os resultados foram filtrados por país/território, linguagem (inglês) e tipo de documento (artigo). Os resultados foram exportados em arquivos no formato CSV (Scopus) e TXT (Web of Science) para tratamento no software RStudio, com o pacote Bibliometrix e sua interface Biblioshiny. Esta revisão mostrou um acentuado uso da metodologia do DNA ambiental em ambientes de água doce na região neotropical, porém, comparadas com as outras regiões geográficas, ainda é considerado recente. Além disso, é perceptível que a maioria dos autores recomendam que a região necessita urgentemente de um banco de dados genéticos para nossas espécies e de mais estudos que esclareçam a ecologia do DNA ambiental em ambientes aquáticos neotropicais.

Palavras-chave: Água doce, Comunidade de peixes, Metagenômica, qPCR, ddPCR.

3.1 Introdução

A região Neotropical é a mais biodiversa do mundo abrigando muitas espécies únicas de plantas e animais. Nesta região também se encontram sete, dos 35 hotspots de biodiversidade mundial existentes e possui também uma grande diversidade de espécies de água doce, sendo atualmente identificadas mais de 6.000 espécies só de peixes (Tundisi & Tundisi 2008; Antonelli & Sanmartín 2011; Mittermeier et al. 2011; Williams et al. 2011; Albert et al. 2020).

Apesar dos esforços dos pesquisadores para quantificar toda essa diversidade da região, há ainda muitas lacunas de conhecimento especialmente para ambientes aquáticos. Todavia essa diversidade vem sendo ameaçada, principalmente por alterações ambientais antropogênicas (ex. construção de barragens, mineração, mudança de uso da terra, aquicultura e pesca), que são as grandes responsáveis pela maioria das extinções das espécies e muitas acabam sendo extintas antes mesmo de seu descobrimento (Zinger et al. 2020; Pelicice et al. 2021).

Segundo Rees e colaboradores (2014) essa lacuna é por causa dos métodos de amostragem convencionais, que são caros e dispendiosos e necessitam de muito tempo e pessoal e como a cada dia que passa a biodiversidade declina cada vez mais, métodos mais rápidos e econômicos como o eDNA tem sido empregado para estudos da biodiversidade em todos os continentes (Deiner et al. 2017; Ruppert et al. 2019) sendo considerado como uma ferramenta-chave (Zinger et al. 2020).

Inicialmente a ideia de se isolar DNA de amostras ambientais surgiu da necessidade de pesquisadores em saber a real composição das comunidades microbianas, pois os métodos baseados em meio de cultura muitas vezes alteravam grosseiramente os resultados das populações como ocorre naturalmente pois muitos micróbios não sobrevivem em meios de cultura (Ogram et al. 1987; Olsen et al. 1986; Pace et al. 1986).

Desde a sua primeira aplicação para estudo de monitoramento de uma espécie de anfíbio invasora (Ficetola et al. 2008), essa técnica vem ganhando espaço e demonstrando-se eficaz para diversas finalidades como identificação, monitoramento, determinação de biodiversidade local e biomassa de espécies (Goldberg et al. 2011; Jerde et al. 2011; Dejean et al. 2012; Takahara et al. 2012; Thomsen et al. 2012; Goldberg et al. 2013; Rourke et al. 2022; Baudry et al., 2023; Fernandez et al., 2023; Kalogianni et al., 2024; Li et al., 2024; Mauro et al., 2023; Osathanunkul e Suwannapoom, 2024; Wu et al., 2024). Sendo um método bastante empregado para realizar levantamentos, principalmente em ambientes temperados (Jetz et al. 2019).

Apesar de promissor o uso da metodologia aqui na região neotropical ainda se encontra muito recente, sendo comprovada pela falta de banco de dados de referência apropriados para

região bem como a escassez de estudos que esclareçam a ecologia do eDNA para a região (Jackman et al. 2021). A maioria dos estudos descrevem a composição e as mudanças na diversidade ao longo dos gradientes ambientais, a fim de identificar padrões da diversidade e seus condutores (Zinger et al. 2020).

Os levantamentos bibliográficos são uma parte importante para as pesquisas científicas, através das revisões sistemáticas da literatura, os pesquisadores conseguem mapear o estado da arte, identificar padrões, relações e lacunas em uma determinada área que necessitam ser investigados, assim alinhando os esforços científicos com as necessidades e desafios atuais além de facilitar a disseminação do conhecimento e orientar as novas pesquisas (Araújo and Alvarenga, 2011; Macias-Chapula, 1998; Vosgerau and Romanowski, 2014). Para isso os pesquisadores fazem uso da cienciometria e da bibliometria, campos de estudos essenciais para compreensão e avaliação do desenvolvimento científico e acadêmico.

A bibliometria concentra-se na análise quantitativa de publicações científicas e a cienciometria foca na medição e análise da produção científica e juntas oferecem ferramentas poderosas para avaliar o impacto e a qualidade das pesquisas ajudando a identificar tendências emergentes, áreas de destaques e as lacunas no conhecimento (Machado Junior et al., 2016; Macias-Chapula, 1998). Através desses dados o governo e as agências de fomento sabem onde alocar seus recursos, garantindo a eficácia e eficiência dos investimentos em pesquisas. Sendo esses três campos fundamentais para o avanço da ciência, pois fornecem bases sólidas para avaliação e desenvolvimento contínuo das pesquisas científicas (Camargo e Barbosa, 2018; Araújo e Alvarenga, 2011).

Diante do exposto o objetivo do trabalho foi fazer um levantamento do uso da metodologia do DNA ambiental na região neotropical em ambiente de água doce, por meio de uma revisão sistemática da literatura e assim identificar as tendências de publicação, principais autores, periódicos, países, métodos utilizados entre outros aspectos além de identificar os principais desafios e as lacunas existentes no conhecimento.

3.2 Metodologia

Foi realizada uma pesquisa nas bases de dados Scopus e Web of Science em março de 2023 para literatura publicada e revisada por pares com as palavras-chave, “Environmental DNA”, “Freshwater” e “eDNA”, o operador booleano escolhido foi AND, utilizamos os campos de busca TITLE, ABSTRACT, KEYWORDS (Scopus) e TOPIC (Web of Science), além disso nós também utilizamos os filtros de país/território (sendo selecionados os países que compõem a região Neotropical), linguagem (inglês) e tipo de documento (artigos). Foram

exportados todos os campos e as respectivas referências em arquivos do tipo “CSV” (Scopus) e “TXT” (Web of Science) para serem tratados no RStudio, com o pacote Bibliometrix (Aria; Cuccurullo, 2017) e sua interface Biblioshiny. Em seguida os resultados foram filtrados manualmente sendo retidos apenas os que fossem consistentes com o objetivo do estudo. As informações foram tabuladas usando-se o programa Microsoft Excel ® e usadas para escrever essa revisão.

3.3 Resultados

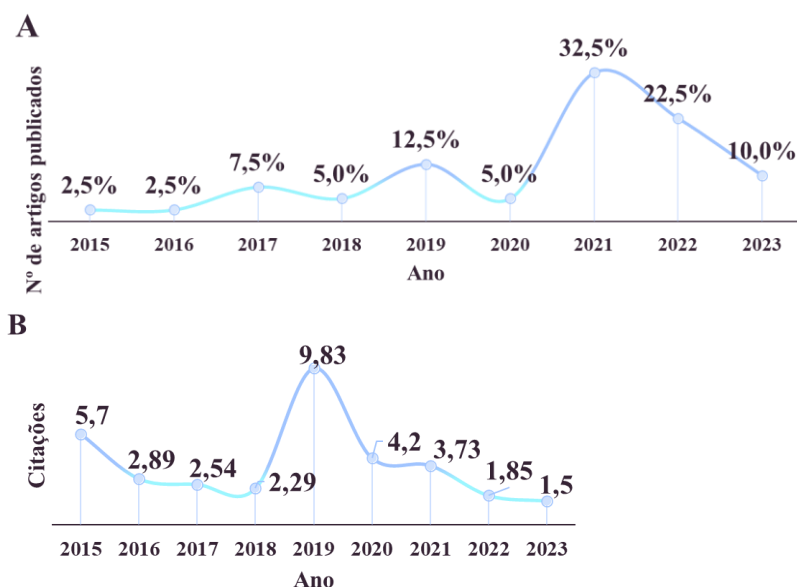
Os resultados obtidos a partir do levantamento bibliográfico nos permitiu enxergar a metodologia de eDNA como uma ferramenta em potencial, útil para auxiliar no monitoramento da biodiversidade Neotropical e assim acelerar a criação de políticas públicas para conservação dos ecossistemas de água doce, que declinam cada vez mais rápido.

No total, 40 documentos que utilizaram a metodologia de DNA ambiental na região Neotropical em ambientes de água doce atenderam aos critérios de revisão, apresentando idade média de 3,6 anos. As publicações ocorreram entre 2015 e 2023, com aumento quase exponencial (Figura 1 a) e taxa de crescimento anual de 18,92%, ocorrendo o maior número de publicações no ano de 2021 (13), sendo os documentos publicados em 2019 os mais citados com média de 9,83 citações (Figura 1 b e Tabela I), demonstrando a relevância dos estudos para o desenvolvimento de novas pesquisas.

Nós registramos um total de 26 fontes de publicação (Figura 2 a), no entanto apenas três foram mais relevantes, Environmental DNA (7), Molecular Ecology Resources (4) e Scientific Reports (3), compondo a zona 1 sendo consideradas como as fontes mais produtivas de acordo com a lei de Bradford (Figura 2 b), que mensura a produtividade dos periódicos dividindo-os em zonas, a zona 1 é composta pelos periódicos com maior produtividade, logo são consideradas como as fontes de dados mais relevantes para o assunto em questão, para os demais periódicos havia uma ou duas publicações.

Ao todo registramos 224 autores e de acordo com a lei de Lotka, que representa a produtividade dos autores sobre determinado assunto durante toda sua carreira acadêmica, 79% dos autores produziram apenas um artigo, enquanto 0,45% produziram de 8 a 12 artigos (Figura 3 a) sendo os autores mais produtivos: Valentini A com 12 artigos, seguido por Dejean T (11), Brosse S (8), Murienne J, Vigoroux R (5), Cantera I, Haddad C, Lopes C (4) e Coscia I, Coutant O (3) (Figura 3 b), a taxa de coautoria internacional foi de 17,5% e a média de coautores por documento foi de 7,92.

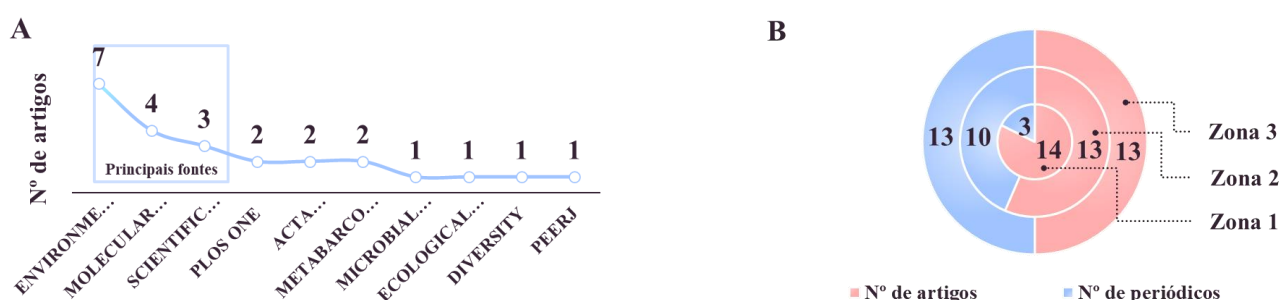
Figura 1: Número de artigos publicados por ano na literatura revisada de 2015 a 2023 avaliando o uso do DNA ambiental nos ambientes de água doce da região neotropical (A), média de citações dos documentos, demonstrando a relevância dos estudos publicados no ano de 2019 (B).



Fonte: Pádua, 2024.

Concluindo a análise registramos um total de 152 palavras-chave, e as mais frequentes foram: biodiversidade (23), DNA (13), Brasil (11) e peixe (10), a figura 3c mostra um diagrama de árvore com o ranking das 10 palavras-chave mais citadas nos artigos aqui revisados.

Figura 2: Ranking dos dez primeiros periódicos com mais artigos publicados sobre o assunto, destacando-se os três primeiros periódicos como as principais fontes de publicação (A) em seguida o gráfico com a divisão em zonas, segundo a lei de Bradford, onde a zona 1 é formada pelos periódicos com maior produtividade, zona 2, periódicos com média produtividade e zona 3 periódicos com pouca produtividade (B).



Fonte: Pádua, 2024.

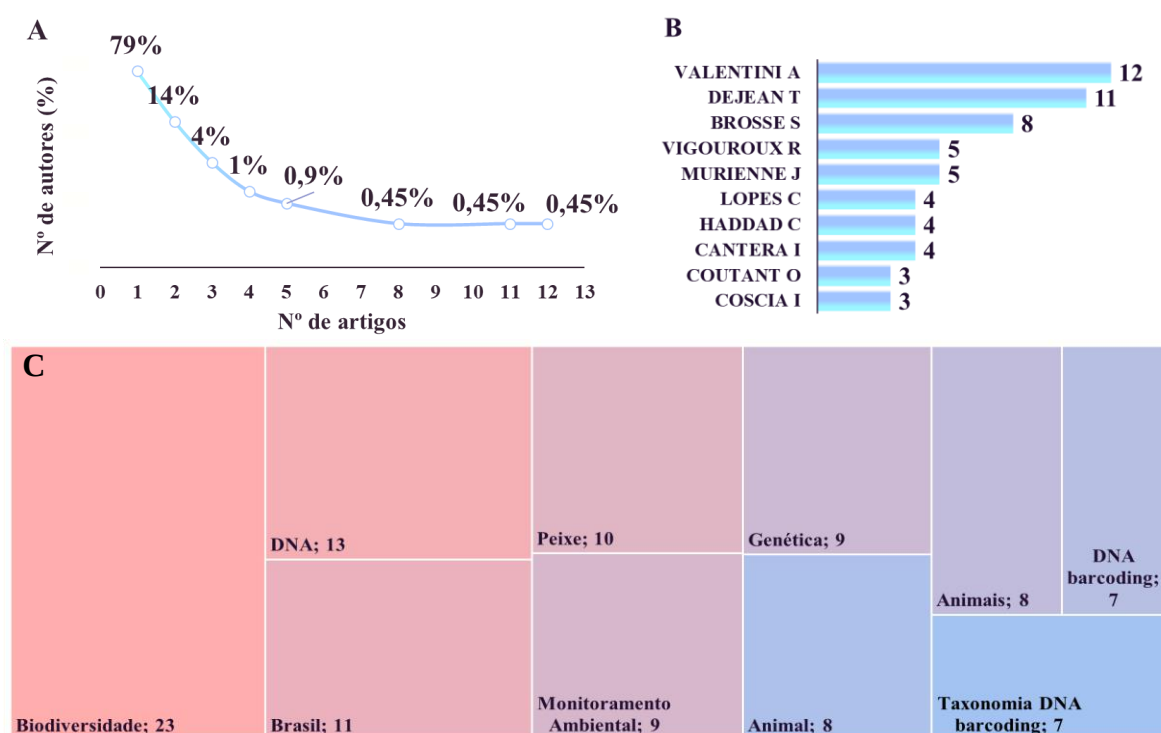
Tabela 1: Ranking dos dez artigos mais citados pelos pesquisadores.

Autor	Título	DOI	Periódico	Citações
Cilleros, et al. 2019	Unlocking biodiversity and conservation studies in high diversity environments using environmental DNA eDNA a test with Guianese freshwater fishes	10.1111/1755-0998.12900	Molecular Ecology Resources	115
Cantera, et al. 2019	Optimizing environmental DNA sampling effort for fish inventories in tropical streams and rivers	10.1038/s41598-019-39399-5	Scientific Reports	81
Sales, et al. 2021	Spacetime dynamics in monitoring neotropical fish communities using eDNA metabarcoding	10.1016/j.scitotenv.2020.142096	Science of the Total Environment	58
Frantine-Silva, et al. 2015	DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the neotropics as a tool for ecological monitoring	10.1111/1755-0998.12385	Molecular Ecology Resources	57
Sales, et al., 2019	Influence of preservation methods sample medium and sampling time on eDNA recovery in a neotropical river	10.1002/edn3.14	Environmental DNA	42
Valdez-Moreno, et al. 2019	Using eDNA to biomonitoring the fish community in a tropical oligotrophic lake	10.1371/journal.pone.0215505	PLOS ONE	38
Polanco, et al. 2021	Comparing the performance of 12s mitochondrial primers for fish environmental DNA across ecosystems	10.1002/edn3.232	Environmental DNA	33
Sasso, et al. 2017	Environmental DNA characterization of amphibian communities in the Brazilian Atlantic Forest potential application for conservation of a rich and threatened fauna	10.1016/j.biocon.2017.09.015	Biological Conservation	29
Sales, et al. 2020	Assessing the potential of environmental DNA metabarcoding for monitoring neotropical mammals a case study in the Amazon and Atlantic Forest Brazil	10.1111/mam.12183	Mammal Review	27
Vences, et al. 2016	Freshwater vertebrate metabarcoding on Illumina platforms using double indexed primers of the mitochondrial 16s rRNA gene	10.1007/s12686-016-0550-y	Conservation Genetics Resources	26

Fonte: Pádua, 2024.

Observou-se uma tendência para estudos realizados em campo, com o ambiente Lótico (rios, riachos e canais; 50%) sendo o mais estudado, em contrapartida o ambiente lântico (lagos, lagoas, aquíferos, reservatórios e outros [aquário e bromélia-tanque]) só foi estudado em 30% das pesquisas, o restante (20%) foi uma combinação dos dois ambientes (lótico e lântico) (Figura 4a). O ambiente lótico mais documentado foi, rio (35%) e para o lântico foi, lago/lagoa (17,50%) (Figura 4a). Quanto ao espécime alvo 40,38% dos estudos foram realizados com peixes, seguido por anfíbios (11,54%), mamíferos (7,69%) aves, mamíferos terrestres, ictioplâncton, microbiota e molusco (5,77%), crustáceos (3,85%), microbioma, répteis, insetos e aracnídeos (1,92%) (Figura 4b).

Figura 3: Produtividade dos autores, segundo a Lei de Lotka, 79% dos autores aqui revisados produziram apenas um artigo sobre eDNA (A), ranking dos dez autores mais produtivos, ou seja, os que mais possuem artigos publicados seja como primeiro autor ou como colaborador (B) em seguida temos um diagrama de árvore com as palavras-chave mais citadas dentre os artigos aqui revisados (C).

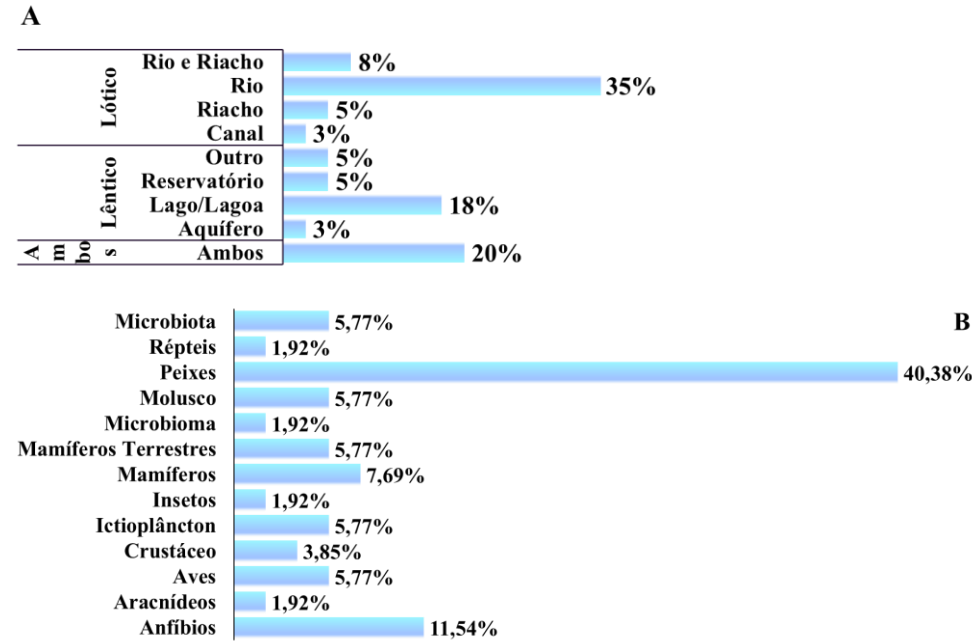


Fonte: Pádua, 2024.

A região Neotropical se estende por 32 países localizados nas Américas do Norte (Sul do México), Central e Sul (Morrone et al. 2022) no entanto apenas 12 países realizaram estudos empregando a metodologia do eDNA, sendo a maior parte deles concluídos no Brasil (17) seguido por Guiana Francesa (8), México (4) e Equador (3) os demais países tiveram apenas

uma publicação (Figura 5a). E como o Brasil foi o país com maior número de publicações nós também analisamos quais biomas foram mais documentados nos estudos, e o mais estudado foi Mata Atlântica (65,22%) seguido por Cerrado e Amazônia (13,04%) e Pantanal (8,70%), não houve nenhum estudo feito no bioma Caatinga (Figura 5b).

Figura 4: Tipos de ecossistemas mais estudados, destacando-se os ambientes lóticos que foram os mais documentados (50%), sendo os rios os mais estudados (35%), seguido lago/lagoa (A), e em seguida os espécimes mais estudados, destacando-se o grupo dos peixes (40,38%) como os mais documentados (B).

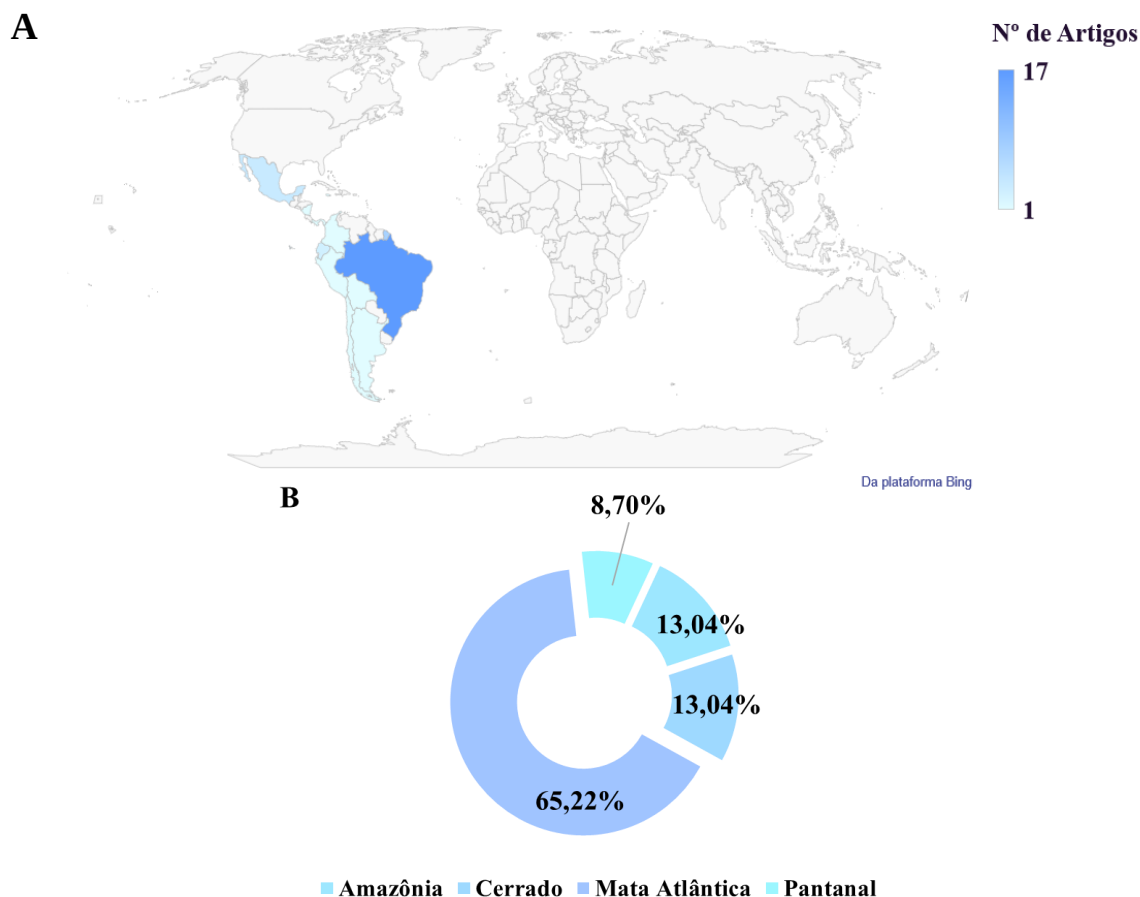


Fonte: Pádua, 2024.

A maioria dos estudos utilizou a metodologia em biomonitoramentos de comunidades para detecção (45%) (Figura 6 a), sendo divididos em: detecção de biodiversidade (50%), detecção de espécies (raras ou invasoras; 44%) e detecção de toxinas (6%) (Figura 6b), seguido por caracterização de comunidades (28%), e identificação de espécies (10%) o restante dos estudos foram focados no desenvolvimento ou otimização de protocolos (18%) (Figura 6 a).

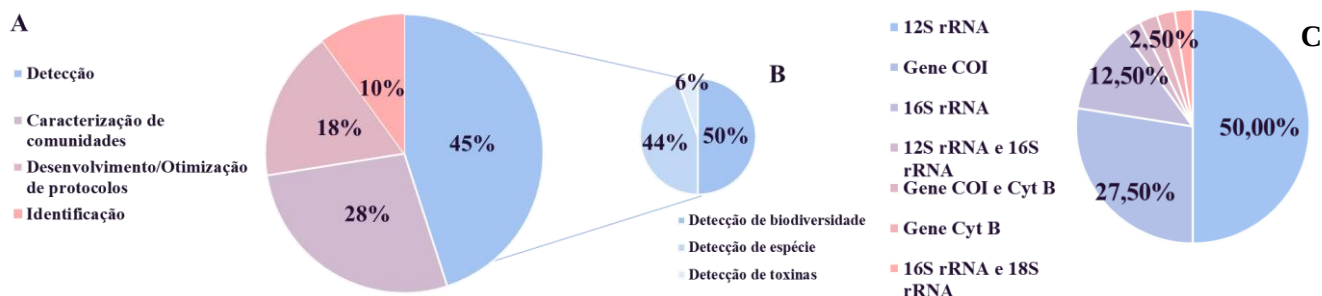
Aqui 50% dos artigos utilizaram o gene mitocondrial 12S rRNA como região alvo, seguidos por gene Citocromo C Oxidase I (COI; 23,68%), 16S rRNA (12,50%) e os demais estudos utilizaram uma combinação entre os genes citados anteriormente e os genes Cyt B e 18S rRNA (Figura 6 c).

Figura 5: Número de publicações por países que compõem a região neotropical (A) e biomas Brasileiros mais estudados nos artigos aqui revisados (B).



Fonte: Pádua, 2024.

Figura 6: Usos da metodologia na região neotropical sendo 45% dos estudos utilizando para fins de detecção (A), em seguida os tipos de detecção mais comuns na região, sendo mais empregado nos estudos de detecção de biodiversidade (B) e Marcadores mais utilizados na região neotropical, destacando-se o 12s rRNA, que foi utilizado em 50% das pesquisas (C).



Fonte: Pádua, 2024.

3.4 Discussão

Como sabemos a metodologia foi criada por microbiologistas, com intuito de avaliar a verdadeira diversidade da microbiota existente em amostras naturais (Venter et al, 2004), no entanto a primeira vez que o método foi empregado para recuperar DNA de macroorganismos em amostras de água foi em 2005, para detectar fontes de água contaminadas com fezes de animais (humanos, vacas, ovelhas e porcos) (Martellini et al., 2005) já em 2008 Ficetola e colaboradores empregaram pela primeira vez a metodologia para biomonitoramento de uma espécie de anfíbio invasora, a rã-touro americana (*Rana catesbeiana* = *Lithobates catesbeianus*).

Contudo o primeiro estudo empregando a metodologia em amostras de água doce na região neotropical foi publicado em 2015 e a finalidade foi identificar a ictiofauna de reservatórios e afluentes do rio Paranapanema no Brasil (Fratine-Silva et al, 2015), percebemos então uma janela de tempo de sete anos, desde a primeira aplicação da metodologia para fins de biomonitoramento. Podemos atribuir esse fato talvez as dúvidas que surgiram sobre a verdadeira eficácia da metodologia, principalmente em amostras de água, devido a sensibilidade do DNA aos parâmetros físico-químicos da água, como pH, temperatura, oxigênio dissolvido, entre outros, inclusive por se tratar de regiões com características climáticas diferentes que interferem diretamente nesses parâmetros (Rees et al, 2014; Roussel et al, 2015; Goldberg et al, 2016).

Entretanto nos anos posteriores houve um crescimento gradual e quase que exponencial no número de publicações, fato também observado por outros pesquisadores em suas revisões (Takahashi et al., 2023; Schenekar, 2023), em 2020, devido ao período de lockdown, houve uma queda no número de publicações, mas imediatamente no ano seguinte esse número teve um aumento de 27%, acreditamos que grande parte desse aumento foi por causa de estudos que não foram publicados em 2020 devido a pandemia e por isso em 2022 o número de publicações foi menor por esse motivo nós não interpretamos como tendência de queda. A revista mais reportada foi a Environmental DNA, e como o nome já sugere é dedicada somente a publicações sobre o assunto, além de ter acesso aberto, foi fundada em 2019 pelo Dr. Louis Bernatches, e logo tornou-se um ponto central para publicações básicas e aplicadas sobre ácidos nucleicos ambientais (Yates; Laporte, 2023).

Como já era esperado o maior número de publicações foi no Brasil, pois dentre os países que fazem parte dessa ecorregião é um dos que possui grande riqueza de espécies de peixes com altas taxas de endemismo (Abel et al, 2008) além do mais tem uma grande diversidade de ecossistemas de água doce e grandes quantidades de recursos hídricos (Barlow et al., 2018), o

que o torna um candidato promissor para aplicação do método aqui revisado. Apesar da ecorregião neotropical ser a mais biodiversa, ela encontra-se na parte do globo onde os estudos são mais escassos. Atualmente existe uma divisão geográfica dos estudos sobre eDNA, sendo o Norte global (Europa, Ásia e América do Norte), com maiores números de pesquisas sobre o assunto e o Sul global (América do Sul, África e Oceania), com menos estudos (Takahashi et al., 2023; Schenekar, 2023), entretanto o sul global apresenta maior número de estudos voltados para o biomonitoramento, que foi o uso mais documentado aqui para a região (Schenekar, 2023).

Quanto ao ambiente de estudo percebemos uma tendência para estudos realizados em campo e em ambientes lóticos, o que parece ser mundial visto que existe uma urgência em estudar os ambientes aquáticos, principalmente os de água doce, que são os mais afetados pelas ações antrópicas e que precisam urgentemente de medidas para sua conservação (Takahashi, et al., 2023). Além disso esses ambientes também fornecem importantes serviços ecossistêmicos que sustentam diversos biomas globais, por isso o conhecimento sobre esses habitats é importante (Acerman et al, 2020).

Geralmente os estudos com eDNA são baseados na detecção de fragmentos curtos de DNA mitocondrial (mtDNA) (Hebert & Gregory 2005). Esses marcadores são preferencialmente usados devido ao número substancialmente maior de cópias de mtDNA do que o DNA nuclear por célula e em ambientes onde o DNA está presente em baixas concentrações e/ou é degradado (Rees et al., 2014). Dentre os marcadores disponíveis, no presente estudo o mais utilizado foi o 12S rRNA, ao que parece esse marcador é preferencialmente usado quando os autores visam estudar comunidades completas, ou seja, esse marcador é mais universal, em segundo temos o marcador COI, que parece ser mais específico.

O grupo mais documentado foi peixes, que atualmente é também o grupo com mais avanços em termos de pesquisas em eDNA e são também bioindicadores muito importantes (Pont et al, 2021). Possui uma base de dados de referência quase completa em alguns lugares (Kinebelsberger et al, 2015) e os marcadores específicos do grupo são bem definidos (Miya et al, 2015; Valentini et al, 2016; Zang et al, 2020), além disso os protocolos tanto para amostragem quanto para processamento estão bem estabelecidos (Valentini et al, 2016; Miya et al, 2020). Contudo os esforços atuais nas pesquisas são para resolução de questões quanto aos dados quantitativos de DNA ambiental de peixes para inferir índices em biomonitoramentos de rotina (Pawlowski et al, 2021).

Além disso, fatores como a padronização do método do eDNA em regiões neotropicais são necessários para tornar sua aplicação rotineira. Como comentado o ambiente aquático

permite com que o DNA permaneça estável no ambiente aquático por um curto período, tornando assim seu uso para detecção afetado quanto mais tempo demorar para coleta de amostras. Por outro lado, tem-se verificado que as moléculas de DNA são mais bem preservadas em amostras de solo do que em amostras de água, neste caso coletar amostras de solo para detecção de espécies pode ser uma alternativa além da amostra de água. Por tanto, para um uso mais corriqueiro do DNA ambiental será necessário padronizarmos algumas etapas em laboratório, como por exemplo; coleta e conservação das amostras, extração do DNA, eliminar a presença de inibidores de PCR das amostras, testar a eficiência dos primers já projetados, validação do método em campo e laboratório, técnicas a serem adotadas de biologia molecular (cPCR, qPCR, ddPCR, metabarcoding) entre outros.

Em suma, o uso do eDNA é promissor na região Neotropical e tornar essa técnica amplamente difundida faz-se necessário para realizarmos o monitoramento das espécies nativas e exóticas. Por outro lado, os custos de aplicação do eDNA ambiental em alguns países da região Neotropical pode ser uma problemática pois muitos dos insumos utilizados são importados para o uso da técnica. Na verdade muitos são os fatores que podem dificultar a difusão do método do eDNA nas regiões neotropicais, e por incrível que pareça a própria biodiversidade de peixes da região pode ser um dos fatores, pois a história de diversificação dessa biodiversidade pode apresentar histórias evolutivas diferentes devido as características da região, podendo isso afetar na detecção de espécies-alvo devido à ausência de um banco genético para nossas espécies que possam ser realmente representativa para o uso do eDNA.

3.5 Conclusão

Apesar do uso da metodologia do eDNA em ambientes de água doce na região Neotropical ser bem recente, com apenas 8 anos de pesquisas, podemos um acentuado uso da metodologia para detectar espécies na região e que as pesquisas com DNA se encontram avançadas apesar das dificuldades enfrentadas pelos autores, como por exemplo a falta de uma biblioteca de genes adequada das espécies da região e mais estudos que esclareçam a ecologia do eDNA nos corpos de água neotropicais, no entanto está caminhando para aplicabilidade como uma ferramenta útil para o biomonitoramento de espécies neotropicais.

Referências

- Abell, R., Thieme, M.L., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N., Coad, B., Mandrak, N., Balderas, S.C., Bussing, W., Stiassny, M.L.J., Skelton, P., Allen, G.R., Unmack, P., Naseka, A., Ng, R., Sindorf, N., Robertson, J., Armijo, E., Higgins, J.V., Heibel, T.J., Wikramanayake, E., Olson, D., López, H.L., Reis, R.E., Lundberg, J.G., Sabaj Pérez, M.H., Petry, P., 2008. Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. *BioScience* 58, 403–414. <https://doi.org/10.1641/B580507>
- Acreman M, Hughes KA, Arthington AH, Tickner D. Dueñas M-A. (2020). Protected areas and freshwater biodiversity: A novel systematic review distils eight lessons for effective conservation. *Conservation Letters*. 13(1): e12684. <https://doi.org/10.1111/conl.12684>
- Albert, J. S., Tagliacollo, V. A., & Dagosta, F. (2020). Diversification of Neotropical freshwater fishes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 51, 27-53.
- Antonelli, A., & Sanmartín, I. (2011). Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon*, 60(2), 403-414.
- Araújo, R.F., Alvarenga, L., (2011). A bibliometria na pesquisa científica da pós-graduação brasileira de 1987 a 2007. *Encontros Bibli Rev. Eletrônica Bibl. E Ciênc. Informação* 16, 51–70. <https://doi.org/10.5007/1518-2924.2011v16n31p51>
- Aria, M., & Cuccurullo, C. (2017). bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. *Journal of Informetrics*, 11(4), 959-975.
- Barlow, J., França, F., Gardner, T. A., Hicks, C. C., Lennox, G. D., Berenguer, E., ... & Graham, N. A. (2018). The future of hyperdiverse tropical ecosystems. *Nature*, 559(7715), 517-526.
- Baudry, T., Mauvisseau, Q., Arqué, A., Goût, J.-P., Delaunay, C., de Boer, H.J., Grandjean, F., (2023). Environmental DNA survey to detect an endemic cryptic fish, *Anablepsoides cryptocallus*, in tropical freshwater streams. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 33, 325–335. <https://doi.org/10.1002/aqc.3916>
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., ... & Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular ecology*, 26(21), 5872-5895.
- 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(4), 953-959.

- Fernandez, S., Gutiérrez, Á., Deconinck, D., Martinez, J.L., Alvarez, A., Marquez, I., Machado-Schiaffino, G., Garcia-Vazquez, E., (2023). Biomass Quantification of the Critically Endangered European eel from Running Waters Using Environmental DNA. *Fishes* 8, 279. <https://doi.org/10.3390/fishes8060279>
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, 4(4), 423-425.
- Frantine-Silva, W., Sofia, S. H., Orsi, M. L., & Almeida, F. S. (2015). DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1226-1237.
- 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(7), e22746.
- Goldberg, C. S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., & Waits, L. P. (2013). Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32(3), 792-800.
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., ... & Taberlet, P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in ecology and evolution*, 7(11), 1299-1307.
- Hansen, B.K.; Jacobsen, M.W.; Middelboe, A.L.; Preston, C.M.; Marin III, R.; Bekkevold, D.; Knudsen, S.W.; Mølle, P.R.; Nielsen, E.E. Remote, autonomous real-time monitoring of environmental DNA from commercial fish. *Scientific Reports*, v. 10, p. 13272, 2020.
- Hebert, P. D., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, 54(5), 852-859.
- Jackman, J. M., Benvenuto, C., Coscia, I., Oliveira Carvalho, C., Ready, J. S., Boubli, J. P., ... & Guimarães Sales, N. (2021). eDNA in a bottleneck: Obstacles to fish metabarcoding studies in megadiverse freshwater systems. *Environmental DNA*, 3(4), 837-849.
- 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(2), 150-157.
- Jetz, W., McGeoch, M. A., Guralnick, R., Ferrier, S., Beck, J., Costello, M. J., ... & Turak, E. (2019). Essential biodiversity variables for mapping and monitoring species populations. *Nature ecology & evolution*, 3(4), 539-551.
- Kalogianni, E., Kalaitzakis, N., Vardakas, L., Koutsikos, N., Zimmerman, B., Meek, S., Weldon, L., Sargeant, S., Steer, M.D., (2024). Nationwide Tracing of Two Top

- Freshwater Fish Invaders in Greece Using Environmental DNA Sampling. *Diversity* 16, 28. <https://doi.org/10.3390/d16010028>
- Knebelsberger, T., Dunz, A.R., Neumann, D., Geiger, M.F., 2015. Molecular diversity of Germany's freshwater fishes and lampreys assessed by DNA barcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 562–572. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12322>
- Li, Y., Tang, M., Lu, S., Zhang, X., Fang, C., Tan, L., Xiong, F., Zeng, H., He, S., (2024). A Comparative Evaluation of eDNA Metabarcoding Primers in Fish Community Monitoring in the East Lake. *Water* 16, 631. <https://doi.org/10.3390/w16050631>
- Machado Junior, C., Souza, M.T.S.D., Parisotto, I.R.D.S., Palmisano, A., (2016). As Leis da Bibliometria em Diferentes Bases de Dados Científicos. *Rev. Ciênc. Adm.* 111–123. <https://doi.org/10.5007/2175-8077.2016v18n44p111>
- Macias-Chapula, C.A., (1998). O papel da informetria e da cienciometria e sua perspectiva nacional e internacional. *Ciênc. Informação* 27, nd-nd. <https://doi.org/10.1590/S0100-19651998000200005>
- Martellini, A., Payment, P., Villemur, R., 2005. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Res.* 39, 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.11.012>
- Mauro, M., Lo Valvo, M., Vazzana, M., Radovic, S., Vizzini, A., Badalamenti, R., Hornsby, L.B., Arizza, V., (2023). Environmental DNA: The First Snapshot of the Vertebrate Biodiversity in Three Sicilian Lakes. *Animals* 13, 3687. <https://doi.org/10.3390/ani13233687>
- Mittermeier, R. A., Turner, W. R., Larsen, F. W., Brooks, T. M., & Gascon, C. (2011). Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. *Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas*, 3-22.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... & 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(7), 150088.
- Ogram et al, 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7, 57–66. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90025-X)
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R., Stahl, D.A., 1986. Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40, 337–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.40.100186.002005>

- Osathanunkul, M., Suwannapoom, C., (2024). A comparative study on eDNA-based detection of Siamese bat catfish (*Oreoglanis siamensis*) in wet and dry conditions. *Sci. Rep.* 14, 8885. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58752-x>
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J., 1986. The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences, in: Marshall, K.C. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*. Springer US, Boston, MA, pp. 1–55. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6_1
- Pawlowski, J., Bonin, A., Boyer, F., Cordier, T., Taberlet, P., 2021. Environmental DNA for biomonitoring. *Mol. Ecol.* 30, 2931–2936. <https://doi.org/10.1111/mec.16023>
- Pellicice, F. M., Bialezki, A., Camelier, P., Carvalho, F. R., García-Berthou, E., Pompeu, P. S., ... & Pavanelli, C. S. (2021). Human impacts and the loss of Neotropical freshwater fish diversity. *Neotropical Ichthyology*, 19.
- Pont, D., Valentini, A., Rocle, M., Maire, A., Delaigue, O., Jean, P., Dejean, T., 2021. The future of fish-based ecological assessment of European rivers: from traditional EU Water Framework Directive compliant methods to eDNA metabarcoding-based approaches. *J. Fish Biol.* 98, 354–366. <https://doi.org/10.1111/jfb.14176>
- 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(5), 1450-1459.
- Rourke, M. L., Fowler, A. M., Hughes, J. M., Broadhurst, M. K., DiBattista, J. D., Fielder, S., ... & Furlan, E. M. (2022). Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 4(1), 9-33.
- Roussel, J. M., Paillisson, J. M., Treguier, A., & Petit, E. (2015). The downside of eDNA as a survey tool in water bodies. *Journal of Applied Ecology*, 823-826.
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547.
- Schenekar, T., 2023. The current state of eDNA research in freshwater ecosystems: are we shifting from the developmental phase to standard application in biomonitoring? *Hydrobiology* 850, 1263–1282. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04891-z>
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., & Kawabata, Z. I. (2012). Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PloS one*, 7(4), e35868.

- Takahashi, M., Saccò, M., Kestel, J. H., Nester, G., Campbell, M. A., Van Der Heyde, M., ... & Allentoft, M. E. (2023). Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *Science of the Total Environment*, 873, 162322.
- Tessler, M., Brugler, M. R., DeSalle, R., Hersch, R., Velho, L. F. M., Segovia, B. T., ... & Lemke, M. J. (2017). A global eDNA comparison of freshwater bacterioplankton assemblages focusing on large-river floodplain lakes of Brazil. *Microbial ecology*, 73, 61-74.
- Thomsen, P. F., Kielgast, J. O. S., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., ... & Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology*, 21(11), 2565-2573.
- Tundisi, J. G., & Matsumura-Tundisi, T. (2008). Biodiversity in the Neotropics: ecological, economic and social values. *Brazilian Journal of Biology*, 68, 913-915.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., ... & Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology*, 25(4), 929-942.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., ... & Smith, H. O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304(5667), 66-74.
- Vosgerau, D.S.R., Romanowski, J.P., (2014). Estudos de revisão: implicações conceituais e metodológicas. *Rev. Diálogo Educ.* 14, 165–190.
- Williams, K. J., Ford, A., Rosauer, D. F., De Silva, N., Mittermeier, R., Bruce, C., ... & Margules, C. (2011). Forests of East Australia: the 35th biodiversity hotspot. *Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas*, 295-310.
- Wu, J., Negishi, J.N., Izumi, H., Kanbe, T., Mizumoto, H., Araki, H., (2024). Application of eDNA methods to evaluate abundance and reproduction of winter-breeding freshwater mussels (*Buldowskia iwakawai*) in the Ishikari River floodplain. *Hydrobiologia* 851, 541–558. <https://doi.org/10.1007/s10750-023-05343-y>
- Yates, M.C., Thalinger, B., Laporte, M., 2023. Beyond life: Louis Bernatchez's (1960–2023) enduring legacy on molecular ecology, conservation, and the science of environmental DNA. *Environ. DNA* 5, 823–828. <https://doi.org/10.1002/edn3.488>
- Zhang, S., Zhao, J., Yao, M., 2020. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. *Methods Ecol. Evol.* 11, 1609–1625. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13485>

Zinger, L., Donald, J., Brosse, S., Gonzalez, M. A., Iribar, A., Leroy, C., ... & Lopes, C. M. (2020). Advances and prospects of environmental DNA in neotropical rainforests. *Advances in ecological research*, 62, 331-373.

4. Artigo científico 2: Detecção da espécie *Corydoras cf. garbei* (Ihering, 1911) em um afluente do Rio Pajeú

Nota científica a ser enviada para os Anais da Academia Brasileira de Ciências (Online), ainda sem a formatação da revista.

Lisandra Celeste da Silva Pádua¹, Aldaberto Luis Val², Carlos Henrique dos Anjos dos Santos¹

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação (PPGBC), Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Av. Gregório Ferraz Nogueira, s/n, 56909-535, José Tomé de Souza Ramos, Serra Talhada (PE), Brasil. lisandrapadua@gmail.com; carlos.hasantos@ufrpe.br

²Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Av. André Araújo, 2936, 69067-375, Petrópolis, Manaus (AM), Brasil. dalval.inpa@gmail.com

RESUMO

O conhecimento sobre a diversidade de peixes de água doce e seus habitats, coincidem com a rápida ocupação humana. Diante disso, a falta de conhecimento sobre a ocorrência e distribuição da espécie *Corydoras cf. garbei* para a região da bacia do Rio Pajeú tornam a espécie uma importante candidata para o uso de novos métodos de monitoramento da ictiofauna na região Nordeste do Brasil. Para realização deste estudo utilizamos o método do DNA ambiental, aplicando os seguintes procedimentos, coleta de mostras de água, filtragem, extração de DNA, desenho de primers espécie-específico, teste de gradiente, PCR convencional e visualização em gel de agarose. As concentrações de eDNA das amostras de filtros foram >50 ng.µL⁻¹ e sua pureza foi considerada baixa, indicando degradação das amostras. Os ensaios de PCR convencional para espécie-específica amplificaram em apenas um ponto de coleta (7), enquanto o primer degenerado não amplificou para as amostras dos pontos 2 e 3, respectivamente. Os ensaios de PCR convencional mostraram que o uso do DNA ambiental no bioma Caatinga é viável e aplicável mesmo em ambientes aquáticos impactados pela ação do homem para detecção de espécies-alvo.

Palavras-chave: PCR convencional, bioma Caatinga, Tributários, Semiárido, Ictiofauna, Detecção por DNA ambiental.

4.1 Introdução

O uso de DNA ambiental (eDNA) tem emergido como uma técnica inovadora e eficiente para a detecção de espécies em diversos ecossistemas. Esta metodologia consiste na coleta de amostras de água, solo ou ar, seguida pela extração e análise de fragmentos de DNA liberados no ambiente por organismos presentes (Ruppert et al., 2019; Thomsen e Willerslev, 2015). Aplicada à ecologia aquática, essa abordagem oferece uma ferramenta poderosa para o monitoramento da biodiversidade, especialmente em áreas de difícil acesso ou onde as populações de espécies são escassas ou crípticas (Ballini et al., 2024; Nardi et al., 2020; Olds et al., 2016; Ripa et al., 2024). No contexto do bioma Caatinga, caracterizado por sua vegetação única e ciclos de seca severa, o eDNA pode ser uma solução promissora para a conservação e estudo de peixes nativos em bacias hidrográficas (Datry et al. 2016; Rodrigues-Filho et al. 2020).

A Caatinga, sendo o único bioma exclusivamente brasileiro, enfrenta pressões significativas devido às atividades humanas e às mudanças climáticas. A degradação ambiental, o uso intensivo da terra e a sobre-exploração dos recursos hídricos comprometem a saúde dos ecossistemas aquáticos e, conseqüentemente, a sobrevivência das espécies nativas de peixes (Araujo et al., 2023; Brito et al., 2020; Lira Azevêdo et al., 2017; Oliveira et al., 2012, 2022, 2021; Tabarelli et al., 2017; Torres et al., 2017; Silva et al., 2017). A detecção precisa e eficiente dessas espécies é crucial para o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo sustentável dos recursos naturais (Brito et al., 2020; McElroy et al., 2020; Keskin et al., 2016; Kelly et al., 2014). Nesse sentido, o eDNA surge como uma abordagem não invasiva que pode complementar ou até substituir métodos tradicionais de monitoramento, como redes de arrasto e mergulho, que são frequentemente limitados por questões logísticas e pela própria condição dos ambientes aquáticos na Caatinga (Ficetola et al., 2008; Knudsen et al., 2019).

A necessidade de métodos eficazes para detectar e monitorar a presença de espécies de peixes nativos em bacias hidrográficas do bioma Caatinga e a tradicional dificuldade de acesso, aliada à variabilidade hidrológica e à escassez de recursos, torna os métodos convencionais de monitoramento menos viáveis e frequentemente insuficientes para fornecer dados precisos (Datry et al. 2016; Rodrigues-Filho et al., 2020). Além disso, a identificação correta das espécies é muitas vezes comprometida por fatores como a similaridade morfológica entre espécies e a presença de juvenis ou estágios larvais. Dessa forma, o eDNA oferece uma alternativa promissora, permitindo a detecção de espécies a partir de amostras ambientais sem a necessidade de capturar fisicamente os organismos (Evans e Lambert, 2018; Wang et al., 2021).

Portanto a investigação do uso do eDNA na detecção de espécies de peixes nativos na Caatinga é necessário por potencial contribuição para a conservação da biodiversidade e o manejo sustentável dos recursos aquáticos. Este método tem o potencial de superar as limitações dos métodos tradicionais, oferecendo uma maneira mais acessível, rápida e precisa de monitorar as espécies. Além disso, ao permitir a detecção de espécies raras ou de difícil captura, o eDNA pode fornecer informações valiosas sobre a distribuição e o estado de conservação das populações de peixes nativos, facilitando a tomada de decisões informadas e a implementação de políticas de preservação.

Aqui escolhemos a espécie *Corydoras* cf. *garbei*, nativa da Caatinga e por fazer parte da ordem e família mais abundantes da região, Siluriformes e Callichthyidae respectivamente (Lima et al., 2017; Espíndola et al., 2018). São animais de pequeno porte (máximo de 90 mm de comprimento padrão) e distingue-se facilmente de outros calictídeos, por apresentarem o corpo profundo e barbilhões maxilares curtos (Britto 2003; Vera-Alcaraz 2013). Além disso essa espécie ocorre com certa abundância nos leitos dos rios (com trechos arenosos e rasos) da bacia hidrográfica aqui estudada (bacia do Rio Pajeú) e sua classificação taxonômica para região ainda apresenta certas dúvidas, pois alguns exemplares não contemplam todas as características descritas para essa espécie (Brunken et al., 2009). Vale salientar ainda que as espécies do gênero *Corydoras* são bastante populares na aquicultura ornamental devido seu hábito alimentar, detritívoro, que contribui para a limpeza do aquário assim como, quando em seu habitat natural destacando-se pela sua importância na ciclagem dos nutrientes (Novák et al., 2022; Bono et al. 2019; Vera-Alcaraz 2013; Strauss 1985). A falta de conhecimento sobre a ocorrência e distribuição da espécie *C.cf. garbei* para a região da bacia do Rio Pajeú tornam a espécie importante candidata para o uso de novos métodos de monitoramento da ictiofauna na região Nordeste do Brasil.

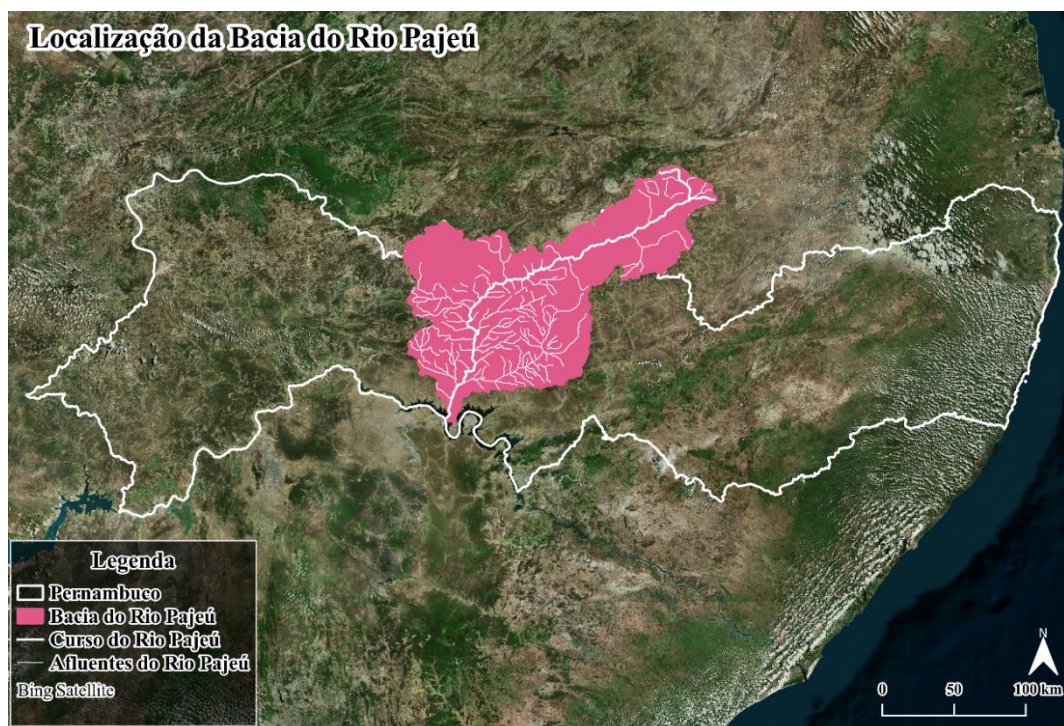
Nosso objetivo foi aplicar a técnica de eDNA para identificar a presença da espécie, *Corydoras* cf. *garbei*, na bacia do Rio Pajeú. Coletamos amostras de água em diferentes pontos da bacia, seguidas pela extração e análise do DNA ambiental para detectar a presença do DNA da espécie alvo, que contribuirá para um melhor entendimento da distribuição desta espécie e fornecerá dados essenciais para estratégias de conservação. Este estudo pioneiro no bioma Caatinga poderá servir como um modelo para futuras pesquisas e ações de conservação em outras regiões semiáridas.

4.2 Metodologia

4.2.1 Área de estudo

A bacia hidrográfica do Rio Pajeú (Figura 1), possui uma área de 16.838,70 km² (corresponde a 16,97% da área do Estado de Pernambuco) e é considerado a maior bacia hidrográfica de Pernambuco. Além disso, essa bacia possui seis Unidades de Conservação (UC), o que corresponde a uma área total de 11.204,60 ha de terras protegidas, ou seja, 0,67% de toda a área da bacia hidrográfica (Soares et al. 2018; Almeida et al. 2021). Localizada em sua totalidade no Estado de Pernambuco, a bacia do Rio Pajeú (7°6'20" e 8°56'01" de latitude sul, e 36°59'00" e 38°57'45" de longitude a oeste de Greenwich) faz parte da Unidade de Planejamento Hídrico 9 - UP9 (Soares et al. 2018), e seu rio principal tem o escoamento no sentido nordeste-sudoeste com um regime fluvial intermitente, percorrendo cerca de 353 km da nascente (Serra do Balanço, no município de Brejinho) até a sua foz (lago de Itaparica, no rio São Francisco). As condições intermitentes do rio Pajeú são caracterizadas pelo clima semiárido com precipitação média anual de 520 mm e temperaturas médias anuais de 24°C, respectivamente. Além disso, o semiárido apresenta alta taxa de insolação, elevadas taxas de evaporação, baixa nebulosidade, regime de chuvas marcado pela irregularidade e escassez, bem como concentração pluviométrica em curto período (Alves & Menezes 2021).

Figura 1: Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Pajeú.



Fonte: IBGE, 2022; ANA, 2017; Elaboração Cartográfica: Lisandra Pádua; Sistema de Coordenadas: SIRGAS 2000 / UTM zone 24S

QGIS

Fonte: Pádua, 2024.

4.2.2 Captura e estocagem de amostras biológicas

As amostras dos espécimes foram adquiridas da coleção zoológica do professor Elton França do laboratório de Ictiologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada. Foi disponibilizado um indivíduo da espécie *C. cf. garbei* da bacia do rio Pajeú. A amostra estava armazenada em álcool para posterior extração do DNA total.

4.2.3 Coleta e filtragem das amostras de água do rio Pajeú

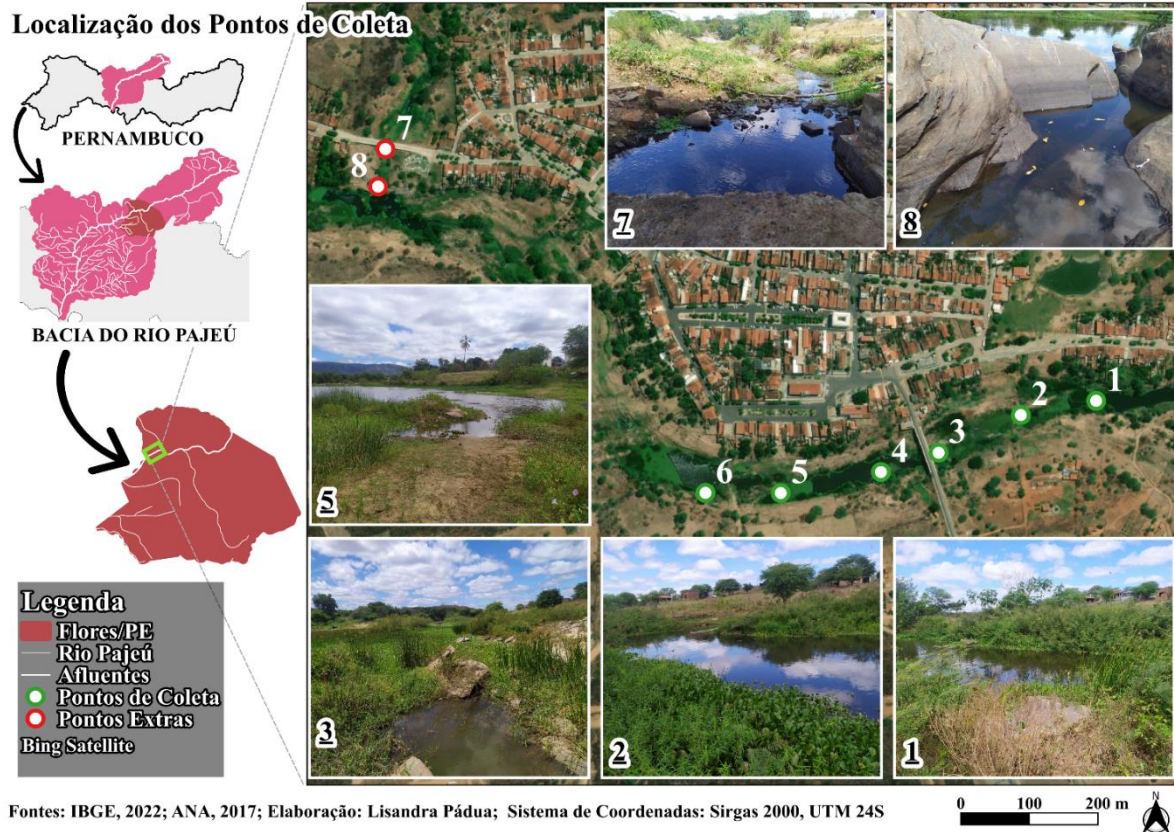
Para as coletas das amostras de água selecionamos oito pontos de coletas ao longo da bacia do Rio Pajeú (Tabela 1 e Figura 1). As coletas foram feitas no mês de agosto do ano de 2023, dois litros (2,0 L) de água foram coletadas em cada ponto utilizando garrafas esterilizadas e, posteriormente as amostras foram filtradas utilizando uma bomba peristáltica com filtros de celulose. Todas as membranas de filtro foram armazenadas em tubos plásticos esterilizados a - 20°C até o isolamento do eDNA. 500 mL de água deionizada foi analisada no momento de cada amostragem para verificação de contaminação cruzada. Todos os utensílios utilizados na coleta de amostras de água e filtração foram esterilizados e lavados em solução com água sanitária 10%.

Tabela 1: Coordenadas geográficas dos pontos de coletas de amostras água no afluente da bacia hidrográfica do Rio Pajeú, Flores, PE.

Ponto de coleta	Latitude	Longitude	Local
1	7°52.0910'S	37°58.2890'O	Antes da ponte
2	7°52.0950'S	37°58.3220'O	
3	7°52.1170'S	37°58.3810'O	
4	7°52.1500'S	37°58.4090'O	Depois da ponte
5	7°52.1550'S	37°58.5430'O	
6	7°52.1550'S	37°58.5970'O	
7	7°52.1490'S	37°58.4090'O	Pontos extras (Riacho da Velha)
8	7°52.8860'S	37°58.8170'O	

Fonte: Pádua, 2024.

Figura 2: Locais e pontos de coleta das amostras de água para as análises de DNA ambiental em um trecho do Rio Pajeú, na cidade de Flores, PE. Os pontos 7 e 8 são pontos extras em um afluente (Riacho da Velha) para verificação da ocorrência da espécie por estarem próximos ao trecho estudado.



Fonte: Pádua, 2024.

4.2.4 Extração do DNA total (amostras de tecido e filtros)

As amostras de DNA total foram extraídas utilizando o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989) com algumas modificações. As etapas de extração seguiram os seguintes procedimentos: três gramas de tecido muscular branco ou papel filtro picado foram macerados e digeridos em solução contendo 330 μL de tampão de lise (10 mM Tris–HCl, pH 8.2; 10 mM EDTA; 200 mM NaCl), 80 μL de SDS (10%), 20 μL de proteinase K (10mg mL^{-1}), 20 μL de RNase A (10 mg mL^{-1}) e 10 μL de DTT (10 mM) em tubos eppendorf de 1,5mL, e em seguida incubados em banho maria seco (Eppendorf) a uma temperatura de 60°C por duas horas ou até a digestão total do tecido. Após a digestão foram adicionados 700 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) nas amostras e centrifugadas por cinco minutos a 14.000 rpm, e o sobrenadante transferido para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL onde adicionou-se 50 μL de Acetato de Sódio (1M), sendo as amostras gentilmente invertidas por 50

vezes para homogeneização. Em seguida os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 14.000 rpm. Após essa etapa o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionados 420 μL de Isopropanol gelado, agitando-se a amostra para homogeneização e centrifugado por cinco minutos a 14.000 rpm. Na etapa seguinte o sobrenadante foi descartado e adicionados 250 μL de etanol 75% gelado e centrifugado por cinco minutos a 14.000 rpm. Como etapa final descartou-se o sobrenadante e os tubos contendo o pellet de DNA genômico foram secos em estufa durante uma hora a temperatura ambiente, sendo em seguida adicionados, em cada tubo, 30 μL de água milliQ autoclavada livre de DNase e RNase, e acondicionados em freezer a -20°C .

4.2.5 Desenho dos primers degenerados e espécie-específico

Os primers degenerados utilizado neste estudo foi desenvolvido no Projeto Rio Doce coordenado pelo pesquisador Adalberto Luis Val do LEEM/INPA. Os pares de primers espécie-específico foram projetados para detectar as amostras de DNA ambiental para o gene mitocondrial (12S rRNA [ver genbank: GU210402.1]) para espécie *C. garbei*. Os primers espécie-específico foram desenhados utilizando o software Oligo Explorer v1.4 (Gene Link TM, Hawthorne, NY, EUA). Os primers foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT Inc., Coralville, Iowa, EUA) e sua eficiência foi testada usando DNA total da espécie-alvo.

4.2.6 Gradiente de temperatura e Reação em Cadeia de Polimerase convencional (PCR)

Para as Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizamos o termociclador VeritiTM 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems) para um volume final de reação de 10 μL . Na reação de PCR utilizamos uma alíquota de DNA total de 2,0 μL (concentração de 50 ng μL^{-1}), 1,5 μL de primer forward (0,4 μM), 1,5 μL de primer reverse (0,4 μM), 5,0 μL do PCR Master Mix (2x) (Fermentas), composto por Taq DNA polimerase (0,05 U), MgCl_2 (1,5 mM) e dNTPs (0,4 mM), e 1,0 μL de BSA. Os ciclos utilizados foram de 94°C por cinco minutos; 35-40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50 – 65°C por 1 minuto (a verificar a temperatura ideal dos primers ou oligonucleotídeos), 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 15 minutos. Para as PCRs de gradiente de temperatura testamos seis temperaturas diferentes com o intervalo de 1°C para cada temperatura testadas.

4.3 Resultados e Discussão

No presente estudo foram utilizadas oito amostras de água coletadas na bacia do Rio Pajeú e um afluente. As amostras de DNA extraídas variaram quanto aos pontos de coletas e verificamos que a concentração de DNA (ver Tabela 2) nas amostras dos filtros variaram de 70,3 ~ 266,6 ng.µL⁻¹, respectivamente. Além disso, as amostras apresentaram concentração de DNA acima do mínimo esperado que era de 50 ng.µL⁻¹ para uso nas reações de PCR. Porém, vale destacar que nas amostras de DNA não contêm somente amostras de DNA de peixes, mas de vários organismos aquáticos e não aquáticos. A pureza das amostras de DNA extraídas foi inferior a 1,70, indicando que o material se encontrava degradado, o que era esperado para as amostras de DNA ambiental e amostras de tecidos que foram imersos em formol para conservação do material biológico em coleções ictiológicas.

Tabela 2: Quantificação e pureza do DNA extraído das amostras de filtros e tecido do musculo branco da espécie-alvo.

Pontos	Concentração do DNA (ng.µL ⁻¹)	Índice de pureza*
1	144,0	1,50
2	98,9	1,47
3	136,5	1,45
4	70,3	1,43
5	164,8	1,48
6	225,6	1,57
7	168,6	1,49
8	266,6	1,53
C1	200,2	1,43
C2	248,8	1,60

**O índice de pureza ideal para as amostras extraídas é de >1,70. Valores abaixo indicam degradação das amostras de DNA. De 1 a 8 são amostras dos locais de coleta, C1 e C2 são amostras de tecido da espécie-alvo. Fonte: Pádua, 2024.*

Devemos salientar, que as diferenças específicas das espécies, tais como taxa de metabolismo, renovação celular, tamanho e biomassa, hábitos de comportamento, estratégias de reprodução entre outros, podem influenciar a quantidade e a fonte de produção de eDNA, que são fortemente influenciadas não apenas pelo tamanho, mas também pela ecologia dos táxons alvo (Senapati et al. 2019). Além disso, deve-se também considerar a estrutura etária das populações selvagens, uma vez que têm sido observadas recorrentemente diferenças na

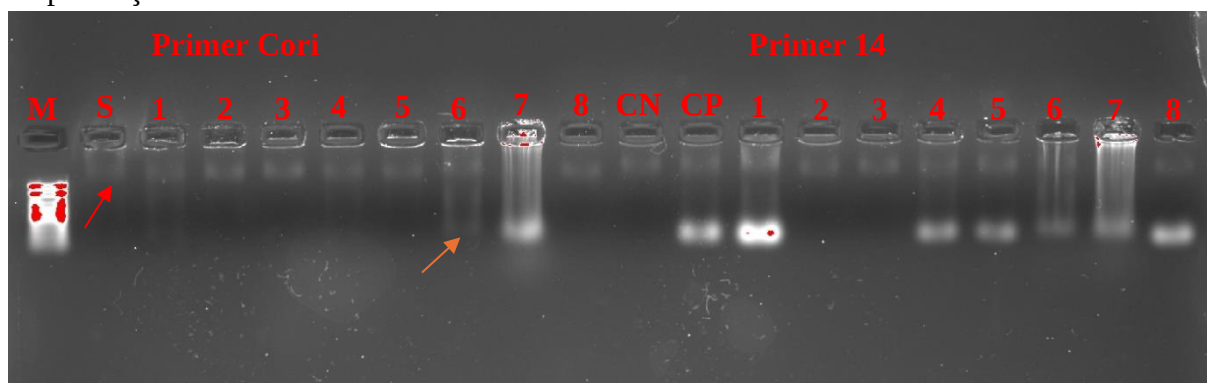
detecção de eDNA devido ao estágio da história de vida (Stewart 2019). Outro ponto relevante neste assunto é o tamanho das populações selvagem, já que populações grandes tendem a deixar maior quantidade de DNA no ambiente do que populações pequenas, ou até mesmo espécies raras ou ameaçadas que tem suas populações muito reduzidas. Buxton et al. (2017) relatam que é necessário compreendermos os fatores que influenciam a concentração de eDNA em relação às mudanças no tamanho da população e aos fatores ambientais. Para Pilliod et al (2014), a detecção e concentração do eDNA dependem das taxas de produção dos indivíduos, das condições ambientais, da densidade dos animais e do seu tempo de residência. Neste âmbito, devemos ficar atentos também aos efeitos das mudanças climáticas contemporâneas que podem estar alterando significativamente os parâmetros físico-químico dos corpos d'água, e subsequentemente afetando o tempo de residência do DNA nos ambientes aquáticos.

No gradiente de temperatura foram utilizados dois conjuntos de primers, onde um par era o primer universal (Primer 14; desenvolvido no Projeto Rio Doce) e o outro era o par de primers específico (prime Cori) para espécie-alvo do estudo. Assim, as temperaturas obtidas para os primers no gradiente de temperatura foram de 57 °C para o primer 14 e 59 °C para o primer Cori, respectivamente. Para as reações de PCR convencional utilizamos ambos os primers para comparação de amplificação entre o primer universal e espécie-específico (ver Figura 3), sendo que o primer espécie-específico amplificou somente na amostra 7, indicando que a distribuição da espécie-alvo possa ser restrita para alguns pontos dos locais de coletas dependendo do seu ciclo de vida. Por outro lado, o ponto 6 sugere uma provável amplificação para o primer espécie-específico, mas não é conclusivo provavelmente pela baixa concentração do DNA-alvo a ser amplificado. Já o primer universal amplificou para maioria dos pontos, menos para os pontos 2 e 3, indicando a presença de outras espécies de peixes para os pontos de coletas. Diante disso, a PCR convencional pode ser útil para monitoramento de espécie-alvo, mas ainda precisamos de uma padronização da técnica de eDNA no bioma Caatinga.

O presente estudo demonstra que o método de PCR convencional pode ser usado para detectar com segurança a presença de peixes em amostras de água (ver Figura 3), e isto permite que pesquisas sejam realizadas em circunstâncias onde as instalações quantitativas de PCR (qPCR) não estão disponíveis ou quando são financeiramente proibitivas (Davison et al. 2016). Neste âmbito, devemos levar em consideração também os locais amostrados e a necessidade de respostas imediatas para tomadas de decisões quando se objetiva apenas saber a ocorrência de uma espécie-alvo em um ambiente aquático específico. Assim, o uso da PCR convencional torna-se uma ferramenta com rápida resposta quando não necessitamos de tanta especificidade, como por exemplo, determinação de biomassa ou realizar um levantamento da ictiofauna local.

Porém, a aplicação do método do eDNA para detecção de espécies em ambientes aquáticos podem compreender várias etapas até a sua padronização, e durante este processo diversos problemas podem surgir e impedir a sua detecção ou levar a falsas interpretações (Song et al. 2020). Segundo Muha et al. (2019), para o método do eDNA é necessário um plano de amostragem cuidadoso selecionando o protocolo de amostragem de eDNA mais eficiente, sugerindo assim amostrar e filtrar o maior volume possível de água como a melhor estratégia. Neste quesito, nosso estudo realizou a coleta e filtragem de dois litros água, mas por considerar que o corpo d'água que foi trabalhado apresentava um pequeno volume de água, bem como baixo fluxo de água no sistema, com a água permanecendo por mais tempo no sistema. Por outro lado, é desafiador trabalharmos em locais com elevado impacto ambiental, pois diversos fatores podem acabar selecionando espécies que conseguem sobreviver em ambientes que são inóspitos para espécies mais sensíveis.

Figura 3: Produtos de amplificação dos pares de primers utilizados nas reações de PCR convencional. Apenas a amostra 7 amplificou para o primer espécie-específico (CP, controle positivo – amostra de DNA da espécie-alvo). O primer universal não amplificou nas amostras 2 e 3. A seta em vermelho indica a presença de DNA genômico e a seta laranja provável amplificação.



Fonte: Pádua, 2024.

4.4 Conclusão

Nós concluímos que o uso do DNA ambiental no bioma Caatinga é viável e aplicável, mesmo em ambientes aquáticos impactados pela ação do homem, para detecção de espécie-alvo por PCR convencional. A distribuição da espécie foi restrita aos trechos em que apresentavam características semelhantes ao habitat da espécie (trechos arenosos e rochosos [7 e 8]). Além disso, o método do eDNA pode se tornar uma ferramenta crucial para programas de conservação de espécies aquáticas em áreas que sofrem fortes impactos antropogênicos, sendo sua aplicabilidade essencial para avaliarmos como as ações humanas

podem afetar a distribuição de espécies-alvo que são mais sensíveis as mudanças nos habitats.

Referências

- Almeida GVL, Correia JMS, Rodrigues MF, Silva ALB, Silva LAM, Santos EM. (2021). Vertebrados da bacia hidrográfica do Rio Pajeú/Sertão de Pernambuco. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**. 12(4): 155-175. <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.004.0015>
- Alves MDO, Menezes LS. (2021). Impactos ambientais no baixo curso do Rio Pajeú, no trecho urbano de Floresta, Pernambuco. **Revista Cerrados (Unimontes)**. 19(1): 2448-2692. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=576966613003>
- Araujo, H.F.P., Canassa, N.F., Machado, C.C.C., Tabarelli, M., 2023. Human disturbance is the major driver of vegetation changes in the Caatinga dry forest region. **Sci. Rep.** 13, 18440. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45571-9>
- Ballini, L., Ottonello, D., Repetto, V., Natali, C., Chini, G., Tolve, L., Ciofi, C., Fratini, S., Iannucci, A., 2024. Early detection of rare and elusive endangered species using environmental DNA: a case study for the Eurasian otter and the white-clawed crayfish in northwestern Italy. *Conserv. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s10592-024-01619-5>
- Bono A, Caserta Tencatt LF, Alonso F, Lehmann AP. (2019). Redescription of *Corydoras undulatus* Regan, 1912 (Siluriformes: Callichthyidae), with comments on the identity of *Corydoras latus* Pearson, 1924. **PLoS ONE** 14(1): e0211352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211352>
- Brito MFG, Daga VS, Vitule JRS. (2020). Fisheries and biotic homogenization of freshwater fish in the Brazilian semiarid region. **Hydrobiologia**. 847: 3877-3895. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04236-8>
- Britto MR. (2003). Phylogeny of the subfamily Corydoradinae Hoedeman, 1952 (Siluriformes: Callichthyidae), with a definition of its genera. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 153: 119-154. [https://doi.org/10.1635/0097-3157\(2003\)153\[0119:POTSCH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1635/0097-3157(2003)153[0119:POTSCH]2.0.CO;2)
- Brunken H, Soares MCF, Calazans GMT, Luz SCS, Nascimento CM, Severi W. (2009). Identificando peixes da bacia hidrográfica do Pajeú, procedentes do município de Tuparetama, no contexto de educação ambiental. **IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (XI JEPEX)**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, R1279-1. <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1279-1.pdf>
- Buxton, A.S.; Groombridge, J.J.; Zakaria, N.B.; Griffiths, R.A. Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. **Scientific Reports**, 7, p. 46294, 2017.
- Datry T, Bonada N, Heino J. (2016). Towards understanding the organization of metacommunities in highly dynamic ecological systems. **Oikos**. 125: 149-159. <https://doi.org/10.1111/oik.02922>
- Davison, P. I., Créach, V., Liang, W.-J., Andreou, D., Britton, J. R., & Copp, G. H. (2016). Laboratory and field validation of a simple method for detecting four species of non-native freshwater fish using eDNA. *Journal of Fish Biology*, 89(3), 1782–1793.
- Espíndola VC, Tencatt LFC, Pupo FM, Villa-Verde L, Britto MR. (2018). From the inside out: a new species of armoured catfish *Corydoras* with the description of poorly-explored character

- sources (Teleostei, Siluriformes, Callichthyidae). **Journal of Fish Biology**. 92(5): 1463-1486. <https://doi.org/10.1111/jfb.13602>
- Evans, N. T., & Lamberti, G. A. (2018). Freshwater fisheries assessment using environmental DNA: A primer on the method, its potential, and shortcomings as a conservation tool. **Fisheries Research**, 197, 60-66.
- Ficetola, G.F.; Miaud, C.; Pompanon, F.; Taberlet, P. Species detection using environmental DNA from water samples. **Biology Letters**, v. 4(4), p. 4423-425, 2008.
- Kelly, R.P.; Port, J.A.; Yamahara, K.M.; Martone, R.G.; Lowell, N.; Thomsen, P.F.; Mach, M.E.; Bennett, M.; Prahler, E.; Caldwell, M.R.; Crowder, L.B. Harnessing DNA to improve environmental management. **Science**, v. 344(6191), p. 1455-1456, 2014.
- Keskin, E.; Unal, E.M.; Atar, H.H. Detection of rare and invasive freshwater fish species using eDNA pyrosequencing: Lake Iznik ichthyofauna revised. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 67, p. 29-36, 2016.
- Knudsen, S.W.; Ebert, R.B.; Hesselsøe, M.; Kuntke, F.; Hassingboe, J.; Mortensen, P.B.; Thomsen, P.F.; Sigsgaard, E.E.; Hanseni, B.K.; Nielsen, E.E.; Møller, P.R. Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 510, p. 31-45, 2019.
- Lima, S.M.Q.; Ramos, T.P.A.; Silva, M.J.; Souza-Rosa, R. Diversity, distribution, and conservation of the Caatinga fishes: Advances and challenges. In: SILVA, J.M.C.; LEAL, I.R.; Tabarelli, M. (editors). **Caatinga**. Cham: Springer, p. 97-131, 2017.
- Lira Azevêdo, E., Alves, R.R.N., Dias, T.L.P., Molozzi, J., 2017. How do people gain access to water resources in the Brazilian semiarid (Caatinga) in times of climate change? **Environ. Monit. Assess.** 189, 375. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6087-z>
- McElroy, M.E.; Dressler, T.L.; Titcomb, G.C.; Wilson, E.A.; Deiner, K.; Dudley, T.L.; Eliason, E.J.; Evans, N.T.; Gaines, S.D.; Lafferty, K.D.; Lamberti, G.A.; Li, Y.; Lodge, D.M.; Love, M.S.; Mahon, A.R.; Pfrender, M.E.; Renshaw, M.A.; Selkoe, K.A.; Jerde, C.L. Calibrating environmental DNA metabarcoding to conventional surveys for measuring fish species richness. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 276, 2020.
- Muha TP, Robinson CV, Garcia de Leaniz C, Consuegra S (2019) An optimised eDNA protocol for detecting fish in lentic and lotic freshwaters using a small water volume. **PLoS ONE** 14(7): e0219218.
- Nardi, C.F., Sánchez, J., Fernández, D.A., Casalnuovo, M.Á., Rojo, J.H., Chalde, T., 2020a. Detection of lamprey in Southernmost South America by environmental DNA (eDNA) and molecular evidence for a new species. **Polar Biol.** 43, 369–383. <https://doi.org/10.1007/s00300-020-02640-3>
- Novák J, Hofmann J, Hohl D, Magalhães ALB, Patoka J. (2022). Enigmatic armoured catfishes (Siluriformes: Callichthyidae and Loricariidae) in ornamental aquaculture: A new insight into Neotropical fish diversity. **Aquaculture**. 547: 737460. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737460>
- Oliveira, G., Araújo, M.B., Rangel, T.F., Alagador, D., Diniz-Filho, J.A.F., 2012. Conserving the Brazilian semiarid (Caatinga) biome under climate change. **Biodivers. Conserv.** 21, 2913–2926. <https://doi.org/10.1007/s10531-012-0346-7>
- Oliveira, M.L., dos Santos, C.A.C., de Oliveira, G., Perez-Marin, A.M., Santos, C.A.G., 2021. Effects of human-induced land degradation on water and carbon fluxes in two different

- Brazilian dryland soil covers. **Sci. Total Environ.** 792, 148458. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148458>
- Oliveira, M.L., dos Santos, C.A.C., de Oliveira, G., Silva, M.T., da Silva, B.B., Cunha, J.E. de B.L., Ruhoff, A., Santos, C.A.G., 2022. Remote sensing-based assessment of land degradation and drought impacts over terrestrial ecosystems in Northeastern Brazil. **Sci. Total Environ.** 835, 155490. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155490>
- Olds, B.P., Jerde, C.L., Renshaw, M.A., Li, Y., Evans, N.T., Turner, C.R., Deiner, K., Mahon, A.R., Brueseke, M.A., Shirey, P.D., Pfreder, M.E., Lodge, D.M., Lamberti, G.A., 2016. Estimating species richness using environmental DNA. **Ecol. Evol.** 6, 4214–4226. <https://doi.org/10.1002/ece3.2186>
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2014). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. **Molecular Ecology Resources**, 14(1), 109-116.
- Ripa, A., Díaz-Caballero, J.A., Palacios-González, M.J., Espinosa, A., García-Zapata, J.L., Fernández-García, J.L., 2024. Application of real-time PCR for the identification of the endangered species *Galemys pyrenaicus* through faecal samples. **Mol. Biol. Rep.** 51, 76. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-09010-2>
- Rodrigues-Filho CAS, Gurgel-Lourenço RC, Ramos EA, Novaes JLC, Garcez DS, Costa RS, Sánchez-Botero JI. (2020). Metacommunity organization in an intermittent river in Brazil: the importance of riverine networks for regional biodiversity. **Aquatic Ecology**. 54: 145-161. <https://doi.org/10.1007/s10452-019-09732-1>
- Ruppert, K.M., Kline, R.J., Rahman, M.S., 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. **Glob. Ecol. Conserv.** 17, e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd Edition, New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, 1989.
- Senapati, D., Bhattacharya, M., Kar, A., Chini, D. S., Das, B. K., & Patra, B. C. 2019. Environmental DNA (eDNA): A promising biological survey tool for aquatic species detection. In **Proceedings of the Zoological Society** (Vol. 72, pp. 211-228). Springer India.
- Silva JMC, Barbosa LCF, Leal IR, Tabarelli M. (2017). The caatinga: Understanding the challenges. In: Silva JMC, Leal IR, Tabarelli M (eds.), **Caatinga: The largest tropical dry forest region in South America**. Chapter 1, pp. 3-19. Switzerland: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68339-3_1
- Soares DB, Nobrega RS, Galvêncio JD. (2018). Indicadores climáticos de desertificação na bacia hidrográfica do Rio Pajeú, Pernambuco. **Revista Brasileira de Climatologia**. 22: 363-380. <http://dx.doi.org/10.5380/abclima.v22i0.58557>
- Song, J.W.; Schultz, M.T.; Casman, E.A.; Bockrath, K.D.; Mize, E.; Monroe, E.M.; Tuttle-Lau, M.; Small, M.J. A probabilistic model for designing and assessing the performance of eDNA sampling protocols. **Molecular Ecology Resources**, v. 20, p. 404-414. 2020.
- Stewart, K.A. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. **Biodiversity and Conservation**, 28, p. 983-1001, 2019.
- Strauss RE. (1985). Evolutionary allometry and variation in body form in the South American catfish genus *Corydoras* (Callichthyidae). **Systematic Zoology**. 34(4): 381-396.

- Tabarelli, M., Leal, I.R., Scarano, F.R., Silva, J.M.C. da, 2017. The Future of the Caatinga, in: Silva, J.M.C. da, Leal, I.R., Tabarelli, M. (Eds.), *Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America*. **Springer International Publishing**, Cham, pp. 461–474. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68339-3_19
- Thomsen, P.F., Willerslev, E., 2015. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. **Biol. Conserv.**, Special Issue: Environmental DNA: A powerful new tool for biological conservation 183, 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- Torres, R.R., Lapola, D.M., Gamarra, N.L.R., 2017. Future Climate Change in the Caatinga, in: Silva, J.M.C. da, Leal, I.R., Tabarelli, M. (Eds.), *Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America*. **Springer International Publishing**, Cham, pp. 383–410. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68339-3_15
- Vera-Alcaraz HS. (2013). **Relações filogenéticas das espécies da família Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes)**. Tese de Doutorado, Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 380p.
- Wang, S., Yan, Z., Hänfling, B., Zheng, X., Wang, P., Fan, J., & Li, J. (2021). Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. **Science of the Total Environment**, 755, 142622.

5. Considerações Finais

A utilização da metodologia do eDNA nos ambientes de água doce neotropicais ainda é recente, entretanto há um uso bastante acentuado apesar da biblioteca genômica incompleta e dos poucos estudos que expliquem a ecologia do eDNA nos ambientes aquáticos da região. Nosso estudo demonstrou que a metodologia é eficiente para detecção do *C. cf. garbei* na bacia hidrográfica do Rio Pajeú, localizada no bioma Caatinga assim como também revelou que sua distribuição é restrita, sendo encontrada em dois dos seis pontos aqui estudados. Recomendamos que sejam realizados mais estudos sobre a ecologia do eDNA aqui para região assim como seja realizado o enriquecimento da biblioteca de genes das espécies neotropicais, também recomendamos que seja feito a padronização do método para utilização em ambientes aquáticos do semiárido. Esperamos que esse estudo seja norteador para o desenvolvimento de mais pesquisas na Caatinga e em outras regiões semiáridas.

Referências Bibliográficas

- ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L.; EL-DEIR, A.C.A.; LIMA, A.L.A.; SOUTO, A.; BEZERRA, B.M.; FERRAZ, E.M.N.; FREIRE, E.M.X.; SAMPAIO, E.V.S.B.; LASCASAS, F.M.G.; MOURA, G.J.B.; PEREIRA, G.A.; MELO, J.G.; RAMOS, M.A.; RODAL, M.J.N.; SCHIEL, N.; LYRA-NEVES, R.M.; ALVES, R.R.N.; AZEVEDO-JÚNIOR, S.M.; TELINO-JÚNIOR, W.R.; SEVERI, W. Caatinga revisited: Ecology and conservation of an important seasonal dry forest. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. ID 205182(1-18 p), 2012.
- BALASINGHAM, K. D.; WALTER, R.P.; MANDRAK, N.E.; HEATH, D.D. Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. **Molecular Ecology**, v. 27(1), p. 112-127, 2018.
- BAUDRY, T., MAUVISSEAU, Q., ARQUÉ, A., GOÛT, J.-P., DELAUNAY, C., DE BOER, H.J., GRANDJEAN, F. Environmental DNA survey to detect an endemic cryptic fish, *Anablepsoides cryptocallus*, in tropical freshwater streams. **Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.** 33, 325–335. <https://doi.org/10.1002/aqc.3916>, 2023.
- BOYD, S.H.; NIEMILLER, K.D.K.; DOOLEY, K.E.; NIX, J.; NIEMILLER, M.L. Using environmental DNA methods to survey for rare groundwater fauna: Detection of an endangered endemic cave crayfish in northern Alabama. **PLoS ONE**, v. 15(12), p. e0242741, 2020.
- CANTERA, I.; CILLEROS, K.; VALENTINI, A.; CERDAN, A.; DEJEAN, T.; IRIBAR, A.; TABERLET, P.; VIGOUROUX, R.; BROSSE S. Optimizing environmental DNA sampling effort for fish inventories in tropical streams and rivers. **Scientific Reports**, v. 9, p. 3085, 2019.
- CILLEROS, K.; VALENTINI, A.; ALLARD, L.; DEJEAN, T.; ETIENNE, R.; GRENOUILLET, G.; IRIBAR, A.; TABERLET, P.; VIGOUROUX R.; BROSSE, S. Unlocking biodiversity and conservation studies in high-diversity environments using environmental DNA (eDNA): A test with Guianese freshwater fishes. **Molecular Ecology Resources**, v. 19(1), p. 27-46, 2019.
- DARLING, A.J.; MAHON, A.R. From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. **Environmental Research**, v. 111(7), p. 978-988, 2011.
- FERNANDEZ, S., GUTIÉRREZ, Á., DECONINCK, D., MARTINEZ, J.L., ALVAREZ, A., MARQUEZ, I., MACHADO-SCHIAFFINO, G., GARCIA-VAZQUEZ, E. Biomass

- Quantification of the Critically Endangered European eel from Running Waters Using Environmental DNA. **Fishes** 8, 279. 2023. <https://doi.org/10.3390/fishes8060279>
- FICETOLA, G.F.; MIAUD, C.; POMPANON, F.; TABERLET, P. Species detection using environmental DNA from water samples. **Biology Letters**, v. 4(4), p. 4423-425, 2008.
- HANDLEY, L.L.; READ, D.S.; WINFIELD, I.J.; KIMBELL, H.; JOHNSON, H.; LI, J.; HAHN, C.; BLACKMAN, R.; WILCOX, R.; DONNELLY, R.; SZITENBERG, A.; HÄNFLING, B. Temporal and spatial variation in distribution of fish environmental DNA in England's largest lake. **Environmental DNA**, v. 1(1), p. 26-39, 2019.
- HANSEN, B.K.; JACOBSEN, M.W.; MIDDELBOE, A.L.; PRESTON, C.M.; MARIN III, R.; BEKKEVOLD, D.; KNUDSEN, S.W.; MØLLE, P.R.; NIELSEN, E.E. Remote, autonomous real-time monitoring of environmental DNA from commercial fish. **Scientific Reports**, v. 10, p. 13272, 2020.
- HÄRER, A.; IBRAHIM, A.; TORRES-DOWDALL, J.; MEYER, A. Heterogeneity across Neotropical aquatic environments affects prokaryotic and eukaryotic biodiversity based on environmental DNA. **Environmental DNA**, v.4(2), p. 469-484, 2022.
- JACKMAN, J.M.; BENVENUTO, C.; COSCIA, I.; CARVALHO, C.O.; READY, J.S.; BOUBLI, J.P.; MAGNUSSON, W.E.; MCDEVITT, A.D.; SALES, N.G. eDNA in a bottleneck: Obstacles to fish metabarcoding studies in megadiverse freshwater systems. **Environmental DNA**, v. 3(4), p. 837-849, 2021.
- KALOGIANNI, E., KALAITZAKIS, N., VARDAKAS, L., KOUTSIKOS, N., ZIMMERMAN, B., MEEK, S., WELDON, L., SARGEANT, S., STEER, M.D. Nationwide Tracing of Two Top Freshwater Fish Invaders in Greece Using Environmental DNA Sampling. 2024, **Diversity** 16, 28. <https://doi.org/10.3390/d16010028>
- KELLY, R.P.; PORT, J.A.; YAMAHARA, K.M.; MARTONE, R.G.; LOWELL, N.; THOMSEN, P.F.; MACH, M.E.; BENNETT, M.; PRAHLER, E.; CALDWELL, M.R.; CROWDER, L.B. Harnessing DNA to improve environmental management. **Science**, v. 344(6191), p. 1455-1456, 2014.
- KESKIN, E.; UNAL, E.M.; ATAR, H.H. Detection of rare and invasive freshwater fish species using eDNA pyrosequencing: Lake Iznik ichthyofauna revised. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 67, p. 29-36, 2016.
- KNUDSEN, S.W.; EBERT, R.B.; HESSELSØE, M.; KUNTKE, F.; HASSINGBOE, J.; MORTENSEN, P.B.; THOMSEN, P.F.; SIGSGAARDA, E.E.; HANSEN, B.K.; NIELSEN, E.E.; MØLLER, P.R. Species-specific detection and quantification of

- environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 510, p. 31-45, 2019.
- LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M.L.J.; TEDESCO, P.A. (2008) Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. In: BALIAN, E.V.; LÉVÊQUE, C.; SEGERS, H.; MARTENS, K (Editors) **Freshwater Animal Diversity Assessment**. Developments in Hydrobiology. Dordrecht: Springer, 2008, p. 545-567.
- LI, Y., TANG, M., LU, S., ZHANG, X., FANG, C., TAN, L., XIONG, F., ZENG, H., HE, S. A Comparative Evaluation of eDNA Metabarcoding Primers in Fish Community Monitoring in the East Lake. 2024. **Water** 16, 631. <https://doi.org/10.3390/w16050631>
- LIMA, S.M.Q.; RAMOS, T.P.A.; SILVA, M.J.; Souza-Rosa, R. Diversity, distribution, and conservation of the Caatinga fishes: Advances and challenges. In: SILVA, J.M.C.; LEAL, I.R.; TABARELLI, M. (editors). **Caatinga**. Cham: Springer, p. 97-131, 2017.
- MALTCHIK, L.; MEDEIROS, E.S.F. Conservation importance of semi-arid streams in north-eastern Brazil: implications of hydrological disturbance and species diversity. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, v. 16(7), p. 665-677, 2006.
- MAURO, M., LO VALVO, M., VAZZANA, M., RADOVIC, S., VIZZINI, A., BADALAMENTI, R., HORNSBY, L.B., ARIZZA, V. Environmental DNA: The First Snapshot of the Vertebrate Biodiversity in Three Sicilian Lakes. 2023. **Animals** 13, 3687. <https://doi.org/10.3390/ani13233687>
- McELROY, M.E.; DRESSLER, T.L.; TITCOMB, G.C.; WILSON, E.A.; DEINER, K.; DUDLEY, T.L.; ELIASON, E.J.; EVANS, N.T.; GAINES, S.D.; LAFFERTY, K.D.; LAMBERTI, G.A.; LI, Y.; LODGE, D.M.; LOVE, M.S.; MAHON, A.R.; PFRENDER, M.E.; RENSHAW, M.A.; SELKOE, K.A.; JERDE, C.L. Calibrating environmental DNA metabarcoding to conventional surveys for measuring fish species richness. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 276, 2020.
- MEDEIROS, E.S.F.; MALTCHIK, L. Diversity and stability of fishes (Teleostei) in a temporary river of the brazilian semiarid region. **Iheringia**, v. 90, p. 157-166, 2001.
- MILAN, D.T.; MENDES, I.S.; DAMASCENO, J.S.; TEIXEIRA, D.F.; SALES, N. G.; CARVALHO, D.C. New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment. **Scientific Reports**, v. 10, p. 17966, 2020.
- NATHAN, L.M.; SIMMONS, M.; WEGLEITNER, B.J.; JERDE, C.L.; MAHON, A.R. Quantifying environmental DNA signals for aquatic invasive species across multiple detection platforms. **Environmental Sciences and Technology**, v. 48(21), p. 12800-12806, 2014.

- NOBILE, A.B.; FREITAS-SOUZA, D.; RUIZ-RUANO, F.J.; NOBILE, M.L.M.O.; COSTA, G.O.; LIMA, F.P.; CAMACHO, J.P.M.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. DNA metabarcoding of neotropical ichthyoplankton: Enabling high accuracy with lower cost. **Metabarcoding and Metagenomics**, v. 3, p. 69-76, 2019.
- OSATHANUNKUL, M., SUWANNAPOOM, C. A comparative study on eDNA-based detection of Siamese bat catfish (*Oreoglanis siamensis*) in wet and dry conditions. 2024. **Sci. Rep.** 14, 8885. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58752-x>
- PONT, G.D.; RITTER, C.D.; AGOSTINIS, A.O.; STICA, P.V.; HORODESKY, A.; COZER, N.; BALSANELLI, E.; MÄDER-NETTO, O.S.; HENN, C.; OSTRENSKY, A.; PIE, M.R. Monitoring fish communities through environmental DNA metabarcoding in the fish pass system of the second largest hydropower plant in the world. **Scientific Reports**, v. 11, p. 23167, 2021.
- PIGGOTT, M.P.; BANKS, S.C.; BROADHURST, B.T.; FULTON, C.J.; LINTERMANS, M. Comparison of traditional and environmental DNA survey methods for detecting rare and abundant freshwater fish. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 31(1), p. 173-184.
- QUÉMÉRÉ, E.; AUCOURD, M.; TROISPOUX, V.; BROSSE, S.; MURIENNE, J.; COVAIN, R.; LE BAIL, P.-Y.; OLIVIER, J.; TYSKLIND, N.; GALAN, M. Unraveling the dietary diversity of Neotropical top predators using scat DNA metabarcoding: A case study on the elusive Giant Otter. **Environmental DNA**, v. 3(5), p. 889-900, 2021.
- REES, H.C.; MADDISON, B.C.; MIDDLEDITCH, D.J.; PATMORE, J.R.M.; GOUGH, K.C. The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. **Journal of Applied Ecology**, v. 51, p. 1450-1459, 2014.
- SALES, N.G.; WANGENSTEEN, O.S.; CARVALHO, D.C.; DEINER, K.; PRÆBEL, K.; COSCIA, I.; MCDEVITT, A.D.; MARIANI, S. Space-time dynamics in monitoring neotropical fish communities using eDNA metabarcoding. **Science of The Total Environment**, v. 754, p. 142096, 2021.
- SALES, N.G.; WANGENSTEEN, O.S.; CARVALHO, D.C.; MARIANI, S. Influence of preservation methods, sample medium and sampling time on eDNA recovery in a neotropical river. **Environmental DNA**, v. 1(2), p. 119-130, 2019.
- SANTOS, A.C.A.; ZANATA, A.M. Fishes in the Brazilian semi-arid. In: QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. (Editors.), **Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity**. Chapter 18, pp. 93-98. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), 2006.

- SHU L.; LUDWIG A.; PENG Z. Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species. **Gene**, v. 11(3), p. 296, 2020.
- THOMSEN, P.F.; KIELGAST, J.; IVERSEN, L.L.; WIUF, C.; RASMUSSEN, M.; THOMAS, M.; GILBERT, P.; ORLANDO, L.; WILLERSLEV, E. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. **Molecular Ecology**, v. 21(11), p. 2565-2573, 2012.
- WU, J., NEGISHI, J.N., IZUMI, H., KANBE, T., MIZUMOTO, H., ARAKI, H. Application of eDNA methods to evaluate abundance and reproduction of winter-breeding freshwater mussels (*Buldowskia iwakawai*) in the Ishikari River floodplain. 2024. **Hydrobiologia** 851, 541–558. <https://doi.org/10.1007/s10750-023-05343-y>
- XIA, Z.; JOHANSSON, M.L.; GAO, Y.; ZHANG, L.; HAFFNER, G.D.; MACLSAAC, H.J.; ZHAN, A. Conventional versus real-time quantitative PCR for rare species detection. **Ecology and Evolution**, v. 8(23), p. 11799-11807, 2018.

Apêndice A

DECLARAÇÃO SOBRE PLÁGIO

Eu, **Lisandra Celeste da Silva Pádua**, autor(a) da dissertação intitulada “**Uso do DNA ambiental no monitoramento e distribuição da espécie *Corydoras cf. garbei* na bacia do Rio Pajeú, Pernambuco**”, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Unidade Acadêmica de Serra Talhada da Universidade Federal Rural de Pernambuco, declaro que:

- O trabalho de pesquisa apresentada nesta dissertação, exceto onde especificado, representa uma pesquisa original desenvolvida por mim;
- Esta dissertação não contém material escrito ou dados de terceiros, de qualquer fonte bibliográfica, a menos que devidamente citada e referenciada no item “Referências Bibliográficas”.

Serra Talhada, 25 de julho de 2024.

Lisandra Celeste da Silva Pádua