

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
“Condições de uso do eDNA (environmental DNA) no  
monitoramento de *Prochilodus argenteus*”

ORIENTADA: Camila Guimarães Dergam

ORIENTADOR: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

BELO HORIZONTE

Fevereiro de 2016



**Camila Guimarães Dergam**

**“Condições de uso do eDNA (environmental DNA) no  
monitoramento de *Prochilodus argenteus*”**

Dissertação apresentada ao curso de  
Mestrado em Genética do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais como requisito  
parcial para obtenção de título de Mestre  
em Genética

Orientador: Prof. Dr. Evanguedes  
Kalapothakis

Co-orientador: Anderson do Carmo

BELO HORIZONTE

Fevereiro de 2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço o Professor Evanguedes Kalapothakis por confiar no meu trabalho e por me receber no LBMM de uma forma tão compreensiva e amigável. Obrigada por me orientar e incentivar.

Ao meu co-orientador Anderson do Carmo pela educação, carinho e paciência, por me ajudar na dissertação e me apresentar ao Crossfit;

À Nazaré, um anjo. Carinhosa, dedicada, atenciosa: as tardes no LBMM e as corridas no Mineirão são inesquecíveis, você é uma pessoa maravilhosa, o mundo precisa de mais pessoas como você;

A todos do LBMM, agradeço de coração, vocês me mostraram que a convivência dentro de um laboratório pode ser leve, engraçada, carinhosa e sem perder o foco. É muito bom trabalhar em um ambiente tranquilo onde as pessoas se respeitam e são unidas;

À CAPES, pela oportunidade de fazer o mestrado com auxílio da bolsa.

À CEMIG, pelo apoio financeiro, extremamente necessário para a realização desse projeto.

Ao diretor da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, Carlyle Mendes Coelho e ao Biólogo Thiago da Motta Carvalho pela oportunidade de trabalhar com os aquários da bacia do rio São Francisco.

Aos membros da banca Flávia Mesquita e Paula Eterovick pela disponibilidade e tirarem um tempo para lerem e contribuírem com minha dissertação;

À Jéssica Eichmiller e o professor Peter Sorensen por me receberem tão bem na Universidade de Minnesota, por me ajudarem e incentivarem.

Ao meu marido Alex pelo apoio, carinho, amor, respeito e companheirismo que sempre sonhei ter em um companheiro, obrigada por realizar meus sonhos e me fazer ansiar envelhecer dia após dia ao seu lado.

Agradeço mais que tudo o apoio da minha família inteira, principalmente minha mãe Lígia e meu pai Jorge, que são meus alicerces para sempre, meu maior orgulho é ser filha de vocês.

Vou sentir saudades de todos!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
1 Introdução.....	1
1.1 O DNA ambiental (eDNA) .....	1
1.2 Fatores que influenciam na obtenção de informações através de amostras de eDNA .....	3
1.2.1 Principais Inibidores da PCR .....	3
1.2.2 Degradação do eDNA.....	6
1.2.3 Captura de DNA na água .....	9
1.2.4 Alguns purificadores de DNA e seu sistema de ação .....	9
1.2.5 Alguns facilitadores da PCR e seus mecanismos de ação .....	10
1.3 Aquário da Bacia do Rio São Francisco - FZB-BH .....	11
1.4 <i>Prochilodus argenteus</i> .....	11
1.5 DNA mitocondrial e Marcadores moleculares.....	12
2 Justificativa .....	14
3 OBJETIVOS .....	16
3.1 Objetivo Geral .....	16
3.2 Objetivos específicos .....	16
3.2.1 Testar a presença de inibidores de PCR em águas de diferentes origens;	16
3.2.2 Testar os efeitos de reagentes purificadores e de um facilitador de PCR em águas de diferentes origens; .....	16
3.2.3 Determinar a especificidade e sensibilidade dos <i>primers</i> disponíveis para <i>P. argenteus</i> ; 16	
3.2.4 Testar outros métodos de extração de DNA mais econômicos do que os kits comerciais de extração.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1 Padronização da PCR.....	17

4.2	Escolha dos <i>primers</i> espécie-específicos e teste de sensibilidade das reações de PCR.....	18
4.3	Teste com água do rio Pandeiros e do aquário 18 com PCR simples. ....	19
4.4	Obtenção de amostras de água .....	19
4.5	Extração da amostras controle número 2 de <i>P. argenteus</i> . ....	20
4.6	Teste da presença de inibidores de PCR em águas de diferentes procedências.....	21
4.7	Teste do efeito de purificadores de DNA e do facilitador de PCR (BSA 1%) em três tipos de águas. ....	21
4.8	Padronização de volume de amostra para a captura de DNA ambiental. ....	22
4.9	Extração do DNA ambiental .....	22
5	RESULTADOS .....	23
5.1	Padronização da PCR.....	23
5.2	Testes de especificidade dos <i>primers</i> .....	24
5.3	Testes de sensibilidade dos <i>primers</i> .....	29
5.4	Extração de DNA .....	35
5.5	Testes de inibidores .....	39
5.6	Testes com alguns purificadores.....	46
6	DISCUSSÃO .....	54
7	CONCLUSÃO .....	56
7.1	Perspectivas .....	56
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFAS .....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Degradação do eDNA em diferentes temperaturas.....	7
Figura 2: Degradação do eDNA em diferentes tipos de águas.....	8
Figura 3: Espécime de <i>Prochilodus argenteus</i> .....	12
Figura 4: DNA mitocondrial de <i>P. argenteus</i> .....	13
Figura 5:: Coleta de eDNA no aquário 19 da FZB-BH (MG).....	20
Figura 6: Padronização de PCR em relação ao tipo de tampão.....	23
Figura 7: Posição dos primers que foram testados.....	24
Figura 8: PCR para avaliação da especificidade dos primers.....	25
Figura 9: Confirmação da especificidade dos primers.....	27
Figura 10: PCR simples de fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os primers Pcal 09, Pcal 12, Pcal 13, Pcal14 (Forward) e Pcal04R02 (Reverse).....	28
Figura 11: Teste de sensibilidade de alguns primers.....	30
Figura 12: Teste de sensibilidade dos primers na reação de PCR Nested.....	31
Figura 13: Teste de sensibilidade 2 dos primers na reação de PCR Nested.....	32
Figura 14: Teste de sensibilidade 3 dos primers na reação de PCR Nested.....	33
Figura 15: Teste de sensibilidade 4 dos primers na reação de PCR Nested.....	34
Figura 16: Eletroforese do DNA extraído.....	35
Figura 17: PCR teste com o DNA extraído.....	36
Figura 18: PCR Nested teste com o DNA extraído.....	37
Figura 19: Produtos de amplificação da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial de <i>P. argenteus</i> .....	38
Figura 20: Teste de inibidores com a água ultrapura.....	39
Figura 21: Teste de inibidores com a água da torneira do ICB.....	40
Figura 22: Teste de inibidores com a água do aquário 18.....	41
Figura 23: Teste de inibidores com a água do aquário 19.....	42

Figura 24: Teste de inibidores com a água do rio Pandeiros.....	43
Figura 25: Teste de inibidores com a água da lagoa da Pampulha.....	44
Figura 26: Relação entre a quantidade de DNA e amplificação visível em gel de agarose.....	46
Figura 27: Tratamento da água do aquário 18 da FZB-BH com carvão ativado.....	47
Figura 28: Tratamento da água do aquário 18 da FZB-BH com chelex 100.....	48
Figura 29: Tratamento da água do rio Pandeiros com carvão ativado.....	49
Figura 30: Tratamento da água do rio Pandeiros com chelex 100.....	50
Figura 31: Tratamento da água da lagoa da Pampulha com carvão ativado.....	51
Figura 32: Tratamento da água da lagoa da Pampulha com chelex 100.....	52
Figura 33: PCR do filtro GL.....	53

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Quantidade mínima de DNA detectada nas duas reações de PCR testando amostras de água de diferentes origens.....	45
---	----

**LISTA DE ABREVIATURAS**

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxi (nucleotídeo) 5' -trifosfato
eDNA	Environmental DNA (DNA ambiental)
F	<i>Primer tipo forward</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
LBMM	Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mtDNA	DNA mitocondrial
ng	Nanograma
pb	Pares de base
R	<i>Primer tipo reverse</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TAE	Tampão Tris, Ácido acético, EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

tRNA	RNA transportador
UV	Ultra-violeta
FZB-BH	Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte

## 1 **Resumo**

2 O DNA ambiental ou eDNA permite a caracterização e o monitoramento da composição  
3 de espécies em ambientes de difícil coleta, como em ambiente aquáticos. Embora a técnica  
4 seja potencialmente muito informativa, existem questões relacionadas à quantidade e qualidade  
5 de eDNA que pode ser recuperada, envolvendo fatores como a degradação do DNA, inibidores  
6 da reação de PCR, captação de DNA, contaminação, etc. Esse trabalho tem como objetivo  
7 estabelecer um protocolo em um ambiente tropical controlado: aquários com espécimes da  
8 espécie *Prochilodus argenteus*. Fragmentos da região de controle D-loop do DNA mitocondrial  
9 foram amplificados com primers desenhados especificamente para espécies de *Prochilodus* em  
10 duas fases: uma primeira reação simples e uma segunda reação com *primers* amplificando um  
11 fragmento interno (Nested-PCR). As amostras foram extraídas com o kit *QIAamp Stool Mini Kit*  
12 e DNA foi amplificado através da reação de PCR Nested com primers que amplificam DNA da  
13 região mitocondrial D-loop. Os protocolos utilizados visaram o teste com águas de diferentes  
14 origens para avaliar a ação dos possíveis inibidores na reação de PCR, a eliminação de  
15 inibidores da PCR através do uso de purificadores e o teste de filtragem para capturar eDNA de  
16 água de um aquário. As águas de diferentes origens resultaram em diferentes interações com a  
17 PCR. A PCR feita com 1µl de DNA com água ultrapura amplificou até 0,00015 ng/ µl de DNA  
18 enquanto que as águas dos aquários amplificaram até 0,015 ng/µl de DNA e água da Lagoa da  
19 Pampulha amplificou 15 ng/µl de DNA. Os purificadores usados foram carvão ativado e Chelex  
20 100, porém os resultados não foram consistentes ao longo do experimento. O facilitador de  
21 PCR BSA 1% foi eficiente pois melhorou a amplificação da banda. Com base nesses  
22 resultados, conclui-se que o kit de extração de DNA *QIAamp Stool mini kit*, desenvolvido para  
23 extrair DNA de fezes, foi eficiente na recuperação de eDNA de *P. argenteus* em condições de  
24 aquário e que os inibidores são fatores importantes e devem ser eliminados para evitar uma  
25 subdetecção de eDNA. A metodologia de captura de DNA por filtragem aliada à extração feita  
26 pelo *QIAamp Stool Mini Kit* e o uso de primers específicos da região de D-loop de DNA  
27 mitocondrial permitiram detecção específica de eDNA da espécie de curimba *P. argenteus*.

28 **Palavras-chave:** eDNA, *Prochilodus argenteus*, aquário, D-loop

29

30

31

32

**33 Abstract**

34           The environmental DNA or eDNA is a promising tool to detect species in environments  
35 such as aquatic systems, where specimen capture can demand effort and time. Although eDNA  
36 can be substantially informative, many factors may affect the quantity and quality of eDNA. Such  
37 factors involve DNA degradation, DNA contamination, DNA collecting protocols, and PCR  
38 inhibitors, etc. The purpose of this dissertation is to establish a protocol in a controlled tropical  
39 environment: aquariums that contain the target fish *Prochilodus argenteus*. The water from the  
40 aquarium was filtered and the DNA was extracted with the QIAamp DNA Stool Mini Kit and  
41 Species-specific *primers* for *P. argenteus* were tested to amplify fragments of the D-loop region  
42 of the mitochondrial DNA using two reactions: a direct or simple PCR and a Nested PCR with  
43 internal *primers*, using products of the direct reaction as template. Other protocols involved  
44 testing the effect of possible inhibitors from different water sources on the PCR, eliminating PCR  
45 inhibitors through DNA purification protocols and testing DNA yield through filtration. Our results  
46 suggest that the different types of water influence PCR results. The PCR using target DNA and  
47 ultrapure water amplified from 1 $\mu$ L of 15 ng/ $\mu$ L of DNA to 0.00015 ng/ $\mu$ L of DNA while the  
48 reactions tested with water from the tropical aquariums amplified from 15 ng/ $\mu$ L of DNA to 0.015  
49 ng/ $\mu$ L of DNA, whereas water from Pampulha lake amplified successfully only using 15 ng/ $\mu$ L of  
50 DNA. Protocols that included activated charcoal and Chelex 100 for DNA purification gave  
51 inconsistent results and could not be replicated. Our results indicate that BSA is an efficient PCR  
52 inhibitor blocker. We conclude that the water filtration protocol using GL filter allied to DNA  
53 extraction through the QIAamp Stool Mini Kit was efficient to concentrate and eliminate inhibitors  
54 that might cause under detection of eDNA.

55

56

# 1 Introdução

A biodiversidade de águas doces é de extrema importância a nível global, porém, pode ser o ecossistema que esteja correndo maior perigo dentre todos os ecossistemas do mundo. A água doce representa apenas 3% do volume total de água na Terra, aproximadamente 40% (10.000) das 25.000 espécies conhecidas habitam águas doces em algum determinado período da sua vida (Nelson, 1994). Ecossistemas de água fresca são muito ricos e abrigam uma alta diversidade de habitats, porém esses sistemas são sensíveis e podem ser facilmente afetados pela ação antropogênica, por isso, a taxa de perda de biodiversidade destes ambientes é maior quando comparada a ambientes terrestres (Sala *et al*, 2000; Naiman *et al*, 2005). As maiores causas dessa perda de biodiversidade são superexploração, poluição da água, modificação no curso da água, destruição ou degradação de habitat e invasão de espécies exóticas (e.g. Allan & Flecker, 1993, Revenga *et al*, 2005).

A coleta da maior quantidade de informações sobre esses ecossistemas é de extrema importância, porém, muitas vezes, as metodologias para captura de organismos aquáticos podem ser laboriosas, demandar muito tempo e gerar estresse no animal. Muitos estudos estão sendo desenvolvidos para facilitar e agilizar essa demanda de informações, por exemplo, estudos que envolvem a detecção de DNA na água (Minamoto *et al*, 2012).

## 1.1 O DNA ambiental (eDNA)

Durante a vida dos animais, seus organismos passam por renovações celulares em todos os sistemas, as células velhas que sofrem morte celular são eliminadas pela urina, fezes, descamação epidérmica, etc. Uma vez eliminadas, elas são liberadas para o ambiente terrestre ou aquático e podem ser uma fonte de informações sobre estes. O ácido desoxirribonucleico (ADN), ou em inglês: *deoxyribonucleic acid* (DNA) está presente em alguns vírus, dentro das células de todos os organismos vivos (DNA intracelular) e também pode estar presente fora das células, onde não está protegido por uma membrana plasmática (DNA extracelular) (Levy-Booth *et al*, 2007; Pietramellara *et al*, 2009; Taberlet *et al*, 2012), assim, quando o DNA desses tecidos é liberado ao ambiente passa a ser conhecido como *environmental* DNA ou eDNA .

O uso de técnica de análise do DNA ambiental tem como objetivo identificar espécies presentes no ambiente através de amostras coletadas em meios como a água, neve, solo ou sedimentos. O primeiro estudo a referenciar o eDNA foi o de Ogram (1987) com o objetivo de detectar DNA microbiano a partir de sedimentos. O termo “eDNA” passou a ser mais utilizado a partir do século 21, ainda na área de microbiologia (Rondon *et al*, 2000; Handelsman, 2004).

Uma característica do eDNA é a presença de uma mistura de DNA de diferentes organismos advindos de DNA celular (organismos vivos) e DNA extracelular (após a morte celular) (Levy-Booth *et al*, 2007; Petramellara *et al*, 2009), acredita-se que as principais fontes de DNA sejam fezes, urina, gametas e células epidérmicas (Haile *et al*, 2009, Thomsen *et al*, 2012; Mahon *et al*, 2013). Uma vez que esse DNA extracelular é liberado no ambiente ele pode ser degradado por DNases microbianas e usado como nutriente para plantas ou para o crescimento microbiano (Bowman and Cole, 1978; Ceccherini *et al*, 2003); ser incorporado a um genoma microbiano como uma fonte de informação (Khanna and Stotzky, 1992; de Vries and Wackernagel, 2004) ou pode persistir no ambiente se ligando a minerais e substâncias húmicas no solo (Greaves and Wilson, 1969; Crecchio and Stotzky, 1998).

Os dados obtidos através dessas análises moleculares do eDNA podem ser usados para responder questões que envolvem diferentes áreas de estudo como paleontologia, ecologia e biologia da conservação (Thomsen *et al*, 2015). As análises moleculares permitem o diagnóstico de espécies de vida livre (Willerslev *et al*, 2003; Jane, 2014; Rees, 2014) terrestres (Valiere & Taberlet, 2000; Andersen *et al* 2012, Nichols *et al*, 2012) e aquáticas (Ficetola *et al*, 2008; Jerde *et al*, 2011; Lodge *et al*, 2012; Mahon *et al*, 2013) com potenciais aplicações em programas de conservação (Rees, 2014), detecção de espécies criticamente ameaçadas, espécies invasoras (Jerde *et al*, 2011, 2013; Eichmiller *et al*, 2015), e a quantificação de organismos aquáticos (Takahara *et al*, 2012; Thomsen *et al*, 2012; Pilliod *et al*, 2013) principalmente quando métodos tradicionais de coleta são inadequados (Darling, 2011; Jerde, 2011). A promessa do uso do eDNA em detectar espécies aquáticas foi identificada como uma das 15 perspectivas da conservação a nível global no relatório anual de 2013 da Trends in Ecology and Evolution (Sutherland, *et al*, 2013).

As tecnologias usadas para o estudo do eDNA evoluíram nos últimos anos, aumentando a capacidade de detectar pequenas quantidades de DNA e a capacidade de abranger uma maior variedade de ambientes (Bohmann, 2014). Apesar desses avanços, alguns fatores ainda limitam a quantidade de informações obtidas. Dentre esses fatores estão os inibidores enzimáticos, como os inibidores de DNAs polimerases, utilizadas em “*Polymerase Chain*

*Reaction*” (PCR), os quais interferem ou impedem a amplificação satisfatória do DNA (Bessetti, 2007) levando a uma detecção subestimada de DNA presente no ambiente, podendo reduzir a sensibilidade da reação de PCR em até 1000 vezes (Johnson *et al*, 1995). Apesar de serem chamados genericamente de “inibidores de PCR”, eles podem agir de três maneiras distintas: 1 - interferindo na lise celular na extração de DNA (ou na ressuspensão do precipitado de DNA); 2 - acelerando a degradação ou dificultando a captura de ácido nucleico; 3 - inibindo a atividade da DNA polimerase na amplificação do DNA-alvo. De acordo com Rossen (1992), apesar de existirem muitos inibidores descritos na literatura, pouco se sabia sobre seus mecanismos de ação; hoje, porém, a ação de alguns deles já é conhecida e existem formas de se evitar suas respectivas ações (Al-Soud, 2000; Pandey *et al*, 1996; Kim, 2000; Mathesen, 2010). Assim, a seleção e a otimização de métodos de preparação das amostras é parte essencial dos protocolos de eDNA (Lantz, 2000). Muitos protocolos são combinações de diferentes métodos, como por exemplo a combinação do método de pré-enriquecimento, como a extração bioquímica (Dahlenborg, M., Borch, E., and Rådström, P. 2001), e procedimentos que visam concentrar o DNA alvo em quantidade detectável para permitir a reação de PCR e procedimentos que visam a retirada de substâncias que podem inibir a PCR (Sharma, 2000).

Além disso, degradação, a captura e a extração de DNA (e retirada de inibidores) são fatores importantes pois podem influenciar a capacidade de detectar e medir o eDNA com confiabilidade. Dessa maneira, o tipo de captura, de purificação e extração mais eficiente dependerá da amostra em estudo (Deiner *et al*, 2006).

## **1.2 Fatores que influenciam na obtenção de informações através de amostras de eDNA**

### **1.2.1 Principais Inibidores da PCR**

Os principais inibidores da PCR são:

- Hemin (heme):

Esta molécula é um derivado metabólico e está presente em fezes (bilirrubina conjugada, formada por ácido glicurônico e derivados da porção heme da hemoglobina degradada), sangue (hemoglobina), carne e urina (bilirrubina). Estudos sugerem que o composto heme limita a atividade da DNA polimerase. Esse efeito é reversível, pois o heme age inibindo as enzimas (polimerase) e não diretamente no DNA (Byrnes *et al*, 1975). A adição de albumina sérica

bovina (Bovine Serum Albumin, BSA) no mix pode reverter essa ação, já que esta albumina se liga ao composto heme (Al-Soud e Radstorm, 2000).

- Polissacarídeos ácidos

Estão presentes em plantas e na água de rios e lagos. Existem dois tipos de polissacarídeos em plantas: neutros e ácidos. Porém, Pandey *et al*, (1996) demonstraram que apenas os polissacarídeos ácidos inibem a PCR. Os polissacarídeos ácidos se ligam às enzimas, restringindo suas ações. A retirada de polissacarídeos foi possível com o uso da resina Elutip-d (Do N, *et al*, 1991) e através de um método mais econômico descrito por Fang *et al*, (1992) utilizando solução de TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA) e solução concentrada de NaCl (0.5-3.0 M).

- Colágeno

Esta proteína está presente em tecidos (por exemplo, em sangue, músculo e pele) e age restringindo a ação da DNA polimerase. Esse efeito pode ser evitado aumentando a quantidade de  $MgCl_2$  na PCR e, principalmente, fazendo a extração com fenol clorofórmio, pois este age como solvente orgânico degradando proteínas (Kim, 2000).

- Ácidos húmicos e fúlvicos

São considerados matéria orgânica dissolvida (MOD): compostos polifenólicos, produtos da decomposição química e biológica de qualquer material vivo e geralmente estão presentes em solos. A extração direta do DNA total de amostras de solo resulta em uma co-extração dos ácidos húmicos e fúlvicos, os ácidos húmicos são considerados os inibidores mais potentes presentes em solos. Esses produtos agem diretamente na *Taq* DNA polimerase, inibindo-a na concentração de menos de 1 ng em uma reação de PCR (Tebbe & Vahjen, 1993). Para evitar ou diminuir a ação inibitória, é recomendado usar uma *Taq* mais tolerável a enzimas. No trabalho por Matheson *et al* (2010), foi demonstrado que as reações de PCR amplificam mais DNA quando é usada uma *Taq* mais resistente.

- Eumelanina

A melanina está presente em compostos poliméricos derivados da tirosina através da pigmentação da pele, dos olhos e dos pelos de mamíferos. A melanina pode ser classificada em dois grupos: a eumelanina que dá a cor acastanhada ou preta, e a feomelanina, que confere a cor avermelhada ou amarelada (Miot *et al*, 2007). No ambiente, são observadas eumelaninas solúveis e insolúveis em água; as formas solúveis têm a capacidade de se ligar à *Taq* DNA

polimerase e inibir a reação de PCR (Yoshii *et al*, 1993), porém, de acordo com Eckhart *et al* (2000), essa ligação é reversível com a adição de BSA ou leite desidratado na PCR.

- Mioglobina

A mioglobina é uma proteína que se liga a ferro e oxigênio, e está presente no tecido muscular da maioria dos vertebrados. A mioglobina age como potente inibidora da *Taq* polimerase, agindo pela liberação de íons de ferro na reação. O uso de uma DNA polimerase estável como a *Tth* polimerase evita que a liberação desses íons iniba a reação de PCR (Belec *et al*, 1998).

- Proteinases

Enzimas presentes no leite, tecidos e fezes, e substâncias usadas na extração como a Proteinase K agem degradando a *Taq* DNA polimerase. A ação delas é evitada usando BSA e gp32 na reação de PCR (Al-Soud e Radstorm, 2000; Bickley *et al*, 1996)

- Íons de cálcio

Presentes no leite e derivados. Estes íons agem como competidores do magnésio, inibindo-o na reação. O aumento da quantidade de magnésio usado na reação ajuda na otimização da PCR (Bickley *et al*, 1995).

- Uréia

Presente em maiores concentrações na urina de mamíferos jovens e adultos, este composto é o inibidor mais potente no meio aquático. Ainda não se sabe se age diretamente na DNA polimerase ou se impede o anelamento do *primer* na fita simples de DNA. É possível eliminar esse efeito inibidor através da diálise da urina.

- Lactoferrina e imunoglobulina

São proteínas que estão presentes em eritrócitos e leucócitos e são conseqüentemente encontradas em fluidos corporais como leite, suor, secreções nasais, lágrimas e sangue. Essa substância foi indicada como um dos inibidores de PCR mais potentes em sangue humano (Rossen *et al*, 1992). A lactoferrina contém ferro, e inibe a reação de PCR porque a lactoferrina e a imunoglobulina liberam íons de ferro no meio. Os íons de ferro interferem diretamente na síntese de DNA. De acordo com o estudo feito por Al-Soud e Radstrom (2000), os facilitadores usados para aliviar esses inibidores são BSA e gp32, sendo o BSA o mais eficiente.

## 1.2.2 Degradação do eDNA

Amostras de eDNA apresentam, de forma característica, uma significativa porção de DNA degradado ou fragmentado, faltam estudos que se propõem a explicar como acontece a degradação do eDNA, quais as taxas de degradação e como os fatores ambientais influenciam nesse processo. Se não soubermos explicar como a degradação do eDNA acontece quando exposto ao ambiente, será impossível afirmar se o DNA detectado no ambiente representa material genético fresco de um organismo que ocupou uma área recentemente ou se o DNA pertence a outro organismo que esteve na mesma área há mais tempo (Eichmiller *et al*, 2016). Estudos recentes foram conduzidos removendo o organismo alvo de um ambiente aquático controlado e logo após a persistência do DNA alvo foi monitorado ao longo do tempo. As taxas de degradação observadas dependeram em como o experimento foi conduzido. Por exemplo, eDNA de peixes manteve uma probabilidade de detecção acima de 5% por 17 dias em pequenos reservatórios (Dejean, 2011), de acordo com Thomsen *et al* (2012) em um experimento feito com peixes marinhos colocados em um aquário de água salgado, a quantidade de eDNA caiu exponencialmente e foi reduzido abaixo do limite de detecção do qPCR (PCR quantitativa) em menos de 24 horas para a espécie *Platichthys flesus* e para a espécie *Gasterosteus aculeatus* o DNA foi abaixo do detectável após aproximadamente 7 dias.

Em outro experimento com caramujos (*Potamopyrgus antipodarum*) na Nova Zelândia, o eDNA foi detectável durante 21 dias (Goldberg *et al*, 2013). De acordo com Dejean *et al*, (2011) após a remoção do organismo alvo do meio aquático, a concentração de DNA começa a declinar depois de um dia ou dois e se mantém estabilizado por seis dias. Outro estudo feito por Takahara (2012) com DNA alvo viral e o alvo de amplificação com o tamanho do fragmento de 78bp mostrou queda de 70% da concentração de DNA por dia a uma temperatura de 25°C (Thomsen *et al*, 2012). Diante desses estudos, pesquisadores especulam que fatores ambientais como temperatura, ph, condutibilidade, diferentes tipos de água, fungos e composição microbiana do ambiente podem influenciar a degradação de eDNA (Shapiro, 2008). De acordo com Eichmiller *et al*, (2016) a temperatura e o tempo afetam significativamente a degradação de DNA ambiental, para evitar essa degradação, a maneira mais eficiente é filtrar a água a ser estudada e logo após a filtragem o filtro deve ser estocado a -20°C. Portanto, a filtragem da água deve ser feita o mais rápido possível após a coleta.

Diversos estudos mostram que fragmentos entre 300 a 400bp podem ser detectados por filtragem e qPCR em ambientes controlados até uma semana. Fragmentos maiores geralmente

correm maiores riscos de sofrerem degradação devido ao seu comprimento por isso, recomenda-se o uso de fragmentos de até 150bp para detectar eDNA (Deagle, 2006).

Recentemente, Eichmiller *et al*, (2016) publicaram um estudo que contempla dois experimentos: o primeiro avaliou a interferência da temperatura em águas coletadas em zonas limnéticas de um lago eutrófico e o segundo estudo avaliou o efeito dos estados tróficos na degradação do eDNA. Foram selecionados quatro locais onde não existiam carpas (*Cyprinus carpio*): um lago eutrófico (lago com alta concentração de nutrientes, principalmente polissacarídeos), um lago oligotrófico (lago com baixa concentração de nutrientes) um lago distrófico (lago com alta concentração de nutrientes, principalmente ácidos húmicos) e um poço artesiano como controle negativo. Testaram essas águas previamente para garantirem a ausência de DNA do organismo alvo. Retiraram 50 litros de cada lago, condicionaram as amostras de água em aquários aerados e então introduziram 10 carpas de aproximadamente 25 gramas cada durante 1 a 2 horas.

A água do experimento 1 (Figura 1) (lago eutrófico) foi separada em “microcosmos” de 50mL cada, os microcosmos foram colocados em ambientes com temperaturas diferentes e protegidos da luz. As águas do experimento 2 foram todas mantidas a temperatura de 15°C. Foi retirada uma alíquota da amostra por dia até que não houvesse mais DNA detectável na água. Eles constataram que o DNA presente nas amostras de água eutrófica mantidas a 5°C era detectável até o 24º dia após a coleta, e as amostras mantidas às temperaturas 15°C, 25°C e 35°C eram detectáveis somente até o 3º dia.

<b>Experimento 1 (água eutrófica):</b>										
<b>Temperatura</b>	<b>Dias</b>									
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
5°C										
15°C										
25°C										
35°C										

**Figura 1. Degradação do eDNA em diferentes temperaturas.** Resultados do trabalho feito por Eichmiller *et al*, (2016), (primeiro experimento). Os quadrados preenchidos pela cor verde

mostram até qual dia o DNA foi detectável na a água do lago eutrófico a 5°C, 15°C, 25°C e 35°C.

No segundo experimento (Figura 2), onde as águas ficaram todas a 15° C, a persistência do DNA na água do poço artesiano foi mais de 27 dias, assim como no lago eutrófico. Já no lago oligotrófico, o DNA foi detectado até cerca de 10 dias.

Experimento 2:										
Tipos de águas	Dias									
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
Poço										
Eutrófico										
Distrófico										
Oligotrófico										

**Figura 2. Degradação do eDNA em diferentes tipos de ambientes aquáticos.** Resultados do trabalho feito por Eichmiller *et al*, (2016), (segundo experimento). Os quadrados preenchidos pela cor roxa mostram até qual dia o DNA foi detectável na a água do poço artesiano, lago eutrófico, lago distrófico, oligotrófico.

O estudo conclui que a temperatura influencia significativamente na degradação do eDNA mas é preciso mais estudos que caracterizem a ação dos ácidos húmicos (produto da degradação de matéria orgânica) na estabilidade do DNA. Os resultados indicam que a temperatura e o tempo são fatores relevantes na preservação do eDNA ao longo do tempo.

### 1.2.3 Captura de DNA na água

Para que o eDNA seja detectável, as estratégias descritas na literatura visam a concentração do DNA presente na água. Existem dois métodos de captura de DNA, o *primeiro*, descrito por Ficetola *et al* (2008) é através da precipitação usando etanol e acetato de sódio e logo em seguida a centrifugação da amostra, o segundo método desenvolvido por Wilcox *et al* (2013), é através da filtração da água. Recentemente, estes métodos foram comparados por Eichmiller *et al*, (2015) usando como espécie alvo a carpa comum, além de avaliarem o método de captura, também avaliaram qual tamanho de poro de filtração é mais útil para estimar a biomassa ou para detectar DNA, e qual material retém mais DNA no poro (policarbonato ou fibra de vidro). Os resultados demonstraram que o método de captura mais eficiente é por filtração usando fibra de vidro e os tamanhos de poros mais eficientes foram 1.5  $\mu\text{m}$ ; seguido pela fibra de policarbonato com poro de 1.0  $\mu\text{m}$  e 0.6  $\mu\text{m}$  de tamanho, provavelmente por conseguirem filtrar maior quantidade de água do que filtros com poros menores.

### 1.2.4 Alguns purificadores de DNA e seu sistema de ação

A purificação do DNA é feita durante ou após a extração de DNA; ela consiste em remover substâncias que podem agir como inibidores e é feita através de precipitações com o uso compostos orgânicos ou resinas. Podemos citar como purificadores:

- **Carvão Ativado:** Carvões ativados estão entre os adsorventes mais antigos usados na indústria. Eles são usados nos tratamentos de água residencial e de efluentes industriais e também servem como catalisadores e suporte de catalisadores (Rodriguez-Reinoso, 1995). Industrialmente, são aplicados em diversos casos, como no tratamento de poluentes atmosféricos e adsorção de compostos orgânicos. Além disso, podem ser utilizados na remoção de pesticidas e compostos orgânicos dissolvidos, e metais pesados (Legrouri *et al*, 2005).

- **Chelex 100:** É uma resina quelante de troca iônica, se liga preferencialmente a cobre, ferro e outros metais pesados e cátions monovalentes como sódio e potássio. Sua seletividade por íons divalentes comparado a íons monovalentes é de aproximadamente 5.000 para 1. Tem uma atração muito forte por metais de transição, mesmo em soluções muito concentradas de sal (BioRad Manual).

### 1.2.5 Alguns facilitadores da PCR e seus mecanismos de ação

Os facilitadores

#### - Bovine Serum Albumin (BSA):

É uma das proteínas mais usadas como facilitadores da reação de PCR; sua eficiência foi demonstrada na amplificação de DNA presente em sangue, carne, fezes (Al-Soud, 2000), compostos contendo a substância heme (Akane *et al*, 1994) e compostos fenólicos (Kreader, 1996). Na presença de proteinases e de compostos fenólicos o BSA atua como alvo e também age como estabilizador da DNA polimerase (Jordan *et al*, 1992).

#### - Gp32

Proteína codificada pelo gene 32 do bacteriófago T4 (Kreader, 1996; Al-Soud 2000). Sua ação é semelhante à BSA, portanto, na presença de proteinases, o gp32 atua como alvo preferencial; na presença de compostos fenólicos, ele se liga a estes e também age como estabilizador da DNA polimerase (Jordan *et al*, 1992). Além da ação semelhante ao BSA, o gp32 também age em fita simples de DNA, protegendo-o contra a digestão de possíveis nucleases (Wu, 1973). Panaccio (1993) sugere ainda, que o gp32 pode melhorar a acessibilidade da DNA polimerase quando há grande quantidade de sangue coagulado na amostra.

#### - Dimetilsufóxido (DMSO)

O DMSO é um composto orgânico com elevada capacidade higroscópica (capacidade de absorver água) devido à sua intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes que as que ocorrem entre moléculas e água. Esse composto é um agente desnaturante, ou seja, ajuda na separação das fitas de DNA, na especificidade da reação e na amplificação da região desejada (Hiller, 1996); A concentração usada desse composto pode variar de 0,1 a 10%. Concentrações acima de 10% da reação inibem drasticamente a atividade da *Taq* DNA Polimerase, pois o DMSO é um solvente orgânico que em altas concentrações destrói as ligações desta enzima (Frackman *et al*, 1998).

### 1.3 Aquário da Bacia do Rio São Francisco - FZB-BH

Em 2010, Belo Horizonte foi inaugurado uma série de aquários com o objetivo de simular o ambiente natural da bacia do rio São Francisco. Esse projeto é resultado de uma parceria entre a Prefeitura de Belo Horizonte e o Ministério do Meio Ambiente, o Aquário ocupa uma área de aproximadamente 3000m<sup>2</sup>, composta por 22 recintos. Nestes recintos estão presentes espécimes da ictiofauna como surubins, dourados, curimatãs, matrinxãs, piaus, pacamãs, cascudos, lambaris, mandis, piranhas, pacus, curimbas, piabas e pirambebas, dentre outros, essas espécies foram selecionadas a partir de critérios como interesse popular e científico, facilidade de aquisição da espécie, representatividade na ictiofauna, entre outros (Katta, 2010).

Os aquários foram feitos estrategicamente pensando no bem estar dos animais como oferecer um ambiente com o mínimo de estresse, com áreas de escape (esconderijos), boa qualidade da água e espécies que podem conviver pacificamente (Katta, 2010).

O rio São Francisco é o terceiro maior rio do Brasil, com 2.780 km de comprimento em uma área de 645 mil km<sup>2</sup> (7,6% do território nacional), faz a drenagem de 450 municípios pertencentes a sete estados (Franco de Camargo & Petreire 2001; Godinho & Godinho 2003), está localizado em uma área habitada por aproximadamente 13 milhões de pessoas (Cappio *et al*, 1995). Aproximadamente 70% da sua água é proveniente dos rios de Minas Gerais (PLANVASF 1989).

### 1.4 *Prochilodus argenteus*.

A família Prochilodontidae é amplamente distribuída pelas principais bacias hidrográficas na região neotropical e constitui uma das famílias mais importantes para o recurso pesqueiro local tanto para a modalidade comercial como para a recreativa (Castro *et al*, 2003). O gênero mais representativo dessa família é *Prochilodus*, que tem como característica a presença de dentes, lábios, maxilas altamente estruturados (Castro e Vari, 2003), alta taxa migratória a longas distâncias (Godoy, 1967; Godinho *et al*, 2006) e hábitos detritívoros por isso é considerada espécie-chave nos ecossistemas aquáticos onde ocorrem (Flecker, 1996). Esse gênero é composto por 13 espécies: *P. brevis*, *P. britskii*, *P. hartii*, *P. lacustris*, *P. lineatus*, *P. magdalenae*, *P. mariae*, *P. nigricans*, *P. reticulatus*, *P. rubrotaeniatus*, *P. vimboides*, *P. costatus* e *P. argenteus* (Figura 3); sendo a última é objeto de estudo desta dissertação.

A curimba-verdadeira, *Prochilodus argenteus* (Agassiz, 1829) é endêmica do Rio São Francisco (Castro *et al.*, 2003) e possivelmente é uma das espécies de maior porte dentro da família Prochilodontidae, podendo alcançar mais de 15kg (Sato & Godinho, 2003) além disso, devido ao seu alto grau de fecundidade, valor de mercado e por responder facilmente à desova induzida, esta espécie tem grande potencial para a aquicultura (Sato *et al.*, 1987). *P. argenteus* e *P. costatus* (curimatá-pioa) são simpátricas e representam aproximadamente 50% do total da captura de pescado na região de Três Marias (Sato e Godinho 2003) Essas espécies podem ser diferenciadas pela quantidade de fileiras transversais de escamas, contadas a partir da base da nadadeira dorsal até a lateral. A espécie *P. argenteus* possui de 10 a 11 fileiras enquanto que a espécie *P. costatus* (Castro e Vari 2003) tem de 8 a 9 fileiras de escamas.



**Figura 3: Espécime de *P. argenteus*.** Os pontos vermelhos indicam a quantidade de linhas transversais de escamas entre a origem da nadadeira dorsal e a linha lateral no espécime coletado. Foto cedida pelo biólogo Tobias A. Barroso.

## 1.5 DNA mitocondrial e Marcadores moleculares

As mitocôndrias são estruturas presentes em células que transformam energia advinda de nutrientes (açúcares e oxigênio) em energia (ATP) através da fosforilação oxidativa para a célula utilizar em seus processos metabólicos. Cada célula contém centenas de mitocôndrias e estão presentes no citoplasma das células. Cada DNA mitocondrial (mtDNA) contém 37 genes, todos essenciais para o funcionamento normal das células. Treze genes são responsáveis pela

fosforilação oxidativa (codificam proteínas) e os outros são RNAs estruturais, 22 RNAs transportadores e 2 RNAs ribossomais.

O DNA mitocondrial é uma pequena molécula circular e composta por aproximadamente 16 a 20 kilobases (Figura 4). De acordo com Avise (1998) e Rubinoff (2006), esta molécula possui características (herança materna, alta taxa de mutação de alguns genes e a ausência de recombinação) que permitem que mesmo espécies geneticamente muito similares, sejam discriminadas. O DNA presente na mitocôndria acumula mudanças nas suas bases a uma taxa de 5 a 10 vezes mais alta do que a do DNA presente no núcleo das células (Brown *et al.*, 1979; Ferris *et al.*, 1981).

A região do mtDNA que sofre alterações mais rapidamente é a região controle (D-loop) (Aquadro & Greenberg, 1983)(Figura 4). Como descrito por Avise e Nelson (1988), sistemas de identificação molecular se aprimoram com os avanços e desenvolvimento de novas ferramentas moleculares.

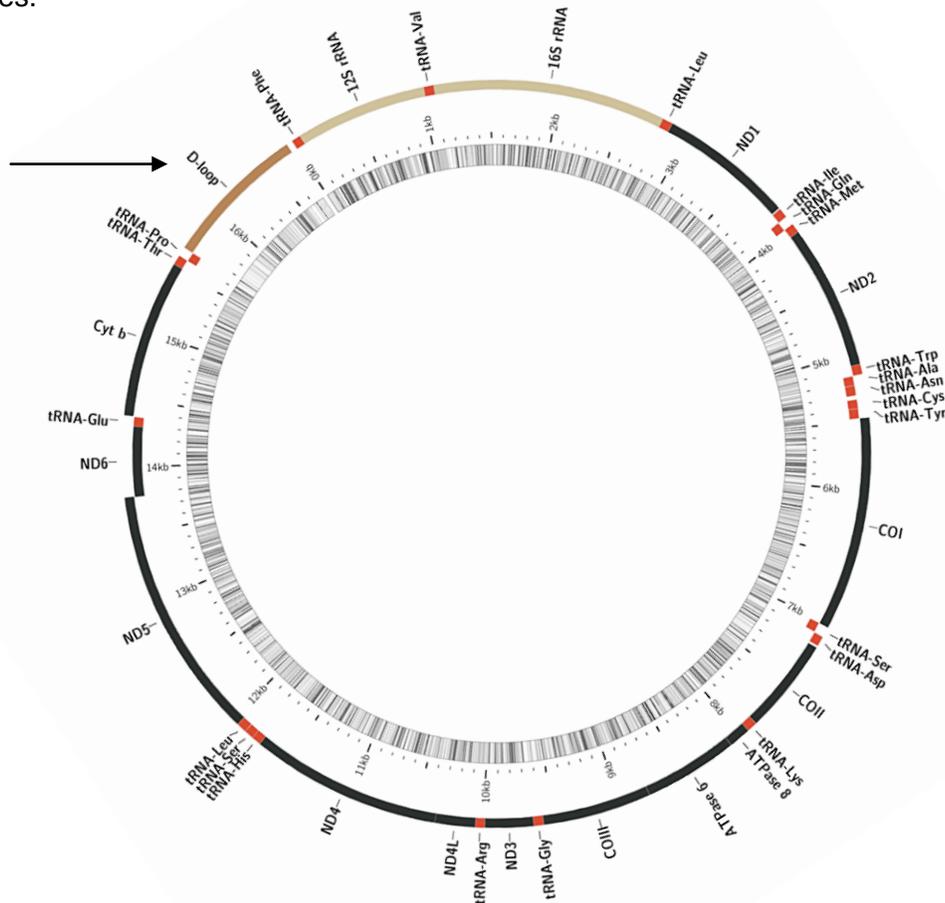


Figura 4: **DNA mitocondrial de *P. argenteus*.** Os genes codificadores de proteínas estão representados em preto, os genes de rRNA estão em bege, os genes de tRNA estão vermelho e a região D-loop está em marrom. O anel externo mostra os genes, os genes codificados na fita pesada são

representados em posição mais externa em relação aos genes codificados na fita leve. O comprimento do genoma mitocondrial está representado pela linha pontilhada. O anel interno mostra o conteúdo GC para cada 5 pb, sendo que linhas mais escuras denotam maior conteúdo GC. (Figura retirada do trabalho de Chagas *et al*, 2015).

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Milach (1998a) descreve que marcadores moleculares são caracteres no DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Os marcadores moleculares apresentam vantagens quando comparados aos marcadores morfológicos convencionais pois exibem neutralidade fenotípica, geralmente são herdados co-dominantemente, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas e podem ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos.

Marcadores moleculares têm se mostrado bastante efetivos na diagnose de espécies, principalmente genes do DNA mitocondrial. Por isso, essa região é muito utilizada em estudos populacionais e evolutivos, assim como estudos forenses onde é necessário usar uma sequência nucleotídica única para identificar uma determinada espécie (Teletchea 2009, Tobe e Linacre 2010).

## 2 Justificativa

O projeto intitulado “Desenvolvimento de tecnologia aplicada à manutenção do estoque pesqueiro de populações nativas de espécies migradoras na região de influência da UHE Três Marias: estudo genético e de migrações reprodutivas” no qual se insere a justificativa desta dissertação, foi criado para atender as necessidades do setor elétrico, da política ambiental e da CEMIG, a fim de gerar dados ambientais com relação à conservação da ictiofauna afetada pela UHE de Três Marias. O aumento da população mundial e o crescimento industrial demandam maior produção de energia elétrica, conseqüentemente, há um aumento na construção de hidrelétricas no mundo. Devido ao aumento da quantidade de rios represados, a necessidade de levantar dados sobre a ictiofauna é de extrema importância, pois as represas causam impacto negativo sobre as populações de peixes locais, como por exemplo, alterações nas características físico-químicas da água, redução na oferta de alimentos, isolamento dos sítios de desova (que interrompe o processo reprodutivo) e redução da diversidade genética

(Godinho e Godinho 1994). Conseqüentemente, a implantação de barragens nos rios tem sido uma das principais causas da diminuição de peixes em diversas partes do mundo (Godinho & Godinho, 1994).

A coleta de grande quantidade de informações sobre esses ecossistemas é extremamente importante pois muitas vezes as metodologias para captura de organismos aquáticos podem ser laboriosas, demandar muito tempo e gerar estresse no animal (Minamoto *et al*, 2012). Este estudo foi desenvolvido para facilitar e agilizar essa demanda de informações através da coleta de DNA na água de ambientes controlados para depois serem aplicados em rios e lagos.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral otimizar as formas de detecção de eDNA proveniente da espécie *Prochilodus argenteus* a partir de amostras de água do Aquário 18 da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte (FZB-BH), desenvolvendo um método que possa se tornar um modelo para ser aplicado em amostras de águas coletadas em rios.

### 3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Testar a presença de inibidores de PCR em águas de diferentes origens;
- 3.2.2 Testar os efeitos de reagentes purificadores e de um facilitador de PCR em águas de diferentes origens;
- 3.2.3 Determinar a especificidade e sensibilidade dos *primers* disponíveis para *P. argenteus*;
- 3.2.4 Testar outros métodos de extração de DNA mais econômicos do que os kits comerciais de extração.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Padronização da PCR

Foram usadas duas amostras de DNA de *Prochilodus argenteus*: a amostra número 1 (um) foi usada no início dos experimentos e foi adquirida nos estoques do Laboratório de Marcadores Moleculares (LBMM) da Universidade Federal de Minas Gerais e 5 ng de DNA a amostra número 2 (dois) foi usada no final dos experimentos e foi extraída no mesmo laboratório porém contém 150 ng de DNA ambos foram extraídos do mesmo indivíduo e as amostras de tecidos estão depositadas no banco UFMG-BDT da UFMG (*voucher* UFMG-BDT-PP000001 para *P. argenteus*). A quantificação das amostras 1 (um) e 2 (dois) foram com o fluorímetro Qubit 2.0 (Life). Com as concentração iniciais de 5 ng/ $\mu$ L e 150 ng/ $\mu$ L foi diluído em uma série de 8 diluições seriadas de 1:10 (até 80 vezes a concentração inicial, chegando a 0,00000005 e 0,00000015 ng/ $\mu$ L). De acordo com os testes feitos para sensibilidade e especificidade dos *primers*, selecionamos três diluições do estoque 2 para dar continuação aos experimentos:  $10^{-1}$  (15 ng de DNA),  $10^{-4}$  (0,0015 ng de DNA) e  $10^{-5}$  (0,00015 de DNA) da concentração inicial.

Foram testados dois tipos de tampões nas reações de PCR, estes se diferenciam entre si pela quantidade de magnésio. O tampão IC (Phoneutria) que contém 20 MgCl<sub>2</sub> (mM)<sup>3</sup> de magnésio e o tampão IVB (presente no Pré-mix IVB) (Phoneutria) que contém no máximo 3,5 mM de magnésio precipitado por reação.

Os *primers* foram testados em reações de PCR simples (a partir do DNA genômico extraído) e PCR Nested (utilizando uma amostra de DNA da PCR simples). As reações de PCR foram preparadas com o volume final de 25  $\mu$ L por tubo, contendo 12,5  $\mu$ L de Pré-Mix IVB (Phoneutria), 9,25  $\mu$ L de água ultrapura, 0,25  $\mu$ L de DMSO (1%), 1  $\mu$ L de *Primer Forward*, 1  $\mu$ L de *Primer Reverse* e 1  $\mu$ L de DNA-molde. A amplificação do DNA nos primeiros experimentos foi realizada com PCR simples e com o seguinte programa: 94 °C por 2 minutos, seguido de 45 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos e 5 minutos de extensão final a 72 °C, para as demais reações de PCR Nested o mesmo programa foi usado 2 vezes, todos no termociclador da Applied Biosystems® Veriti® Thermal Cycler.

Após os testes nas reações de PCR, foram coletados 5 litros de água do aquário 18 do FZB-BH para ser filtrada com o filtro de fibra de vidro (GL).

## 4.2 Escolha dos *primers* espécie-específicos e teste de sensibilidade das reações de PCR

*Primers* mitocondriais da região controle ou D-loop específicos para espécies *Prochilodus argenteus*, *P. lineatus* e *P. costatus* foram desenhados por Chagas *et al* (2015) através da construção da biblioteca genômica. Para cada espécie, são gerados mapas circulares com as regiões codificadoras e as tabelas de anotação. Os genomas mitocondriais das duas espécies foram comparados entre si e também comparados com o mitogenoma de *Prochilodus lineatus* (Carmo *et al.*, 2014) através da ferramenta CGView Comparison Tool. Essa ferramenta compara as sequências circulares com uma sequência referência utilizando o BLAST e o resultado é apresentado em forma de mapas onde as regiões de alinhamento entre as sequências são destacadas, dependendo dos diferentes graus de identidade entre as sequências comparadas (Grant *et al*, 2012).

Foram desenhados *primers* utilizando a ferramenta *primer*-BLAST, que permite o desenho de *primers* alvo-específicos (Ye *et al.*, 2012). Para o desenho de tais *primers* utiliza-se os seguintes parâmetros: temperatura de anelamento entre 57 e 63° C e tamanho ótimo de amplicon entre 300 e 1000 pb. Os *primers* gênero-específicos desenhados para o gênero *Prochilodus* são testados quanto à sua especificidade em outros gêneros de peixes para certificar que não há amplificação em outros gêneros que não *Prochilodus*. Após o alinhamento das sequências completas do DNA mitocondrial das espécies *P. argenteus*, *P. costatus* e *P. lineatus*, Chagas *et al* (2015) selecionaram manualmente *primers* espécie-específicos e *primers* que gerassem *amplicons* de tamanhos diferentes que permitissem a identificação das diferentes espécies em um gel de eletroforese.

Após a identificação e seleção dos *primers*, foram padronizadas as PCR considerando as temperaturas de anelamento, número de ciclos, concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) e dois tipos de tampão fornecidos pela empresa Phoneutria® (tampões IC e o Pré-mix IVB). Os *primers* espécie-específicos gerados por esse estudo foram os *primers forward* Pcal05F, Pcal06F, Pcal07F, Pcal08F Pcal 09F, Pcal10F, Pcal11F (feito a partir da substituição de uma sequência de AAA por GGT a partir do *primer* Pcal09), Pcal12F, Pcal 13F, Pcal14F e Pcal15F e os *primers reverse* gênero-específico Pcal 04R 01 e Pcal 04 R02 (Anexo).

### **4.3 Teste com água do rio Pandeiros e do aquário 18 com PCR simples.**

Para fins comparativos de técnicas de captura de eDNA foram feitos testes de PCR com a água sem filtragem e sem extração do rio Pandeiros coletada previamente e com água do aquário 18.

### **4.4 Obtenção de amostras de água**

Foram coletadas amostras do Pandeiros (coletadas previamente na região de Felixlândia), da água da Lagoa da Pampulha de Belo Horizonte (cerca de 15 ml); água da torneira do ICB-UFMG e água dos aquários 18 e 19 do Zoológico de Belo Horizonte (FZB-BH) (Figura 5) (o Aquário 18 tinha quatro espécimes de *Prochilodus argenteus* com cerca de 60 cm de comprimento em 114.000 litros de água; o Aquário 19 tinha 157 *Prochilodus argenteus* com cerca de 15 cm de comprimento em 26.400 litros de água(coletadas em galões previamente desinfetados com hipoclorito 15%). O DNA foi obtido por filtragem da água com filtros GL (filtros de fibra de vidro) (Whatman®) de trinta minutos a 3 horas após a coleta.



Figura 5: Coleta de eDNA no aquário 19 da FZB-BH (MG). Foto: Camila Dergam.

#### 4.5 Extração da amostras controle número 2 de *P. argenteus*.

A extração do DNA de *Prochilodus argenteus* (amostra controle número 2) foi realizada com o método de proteinase K e fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989) que consiste na digestão enzimática de células e tecidos (pela proteinase K), solubilização de membranas e desnaturação de proteínas com detergente SDS e a purificação dos ácidos nucleicos utilizando solventes orgânicos (fenol-clorofórmio).

Com o uso de gral, pistilo e gelo seco, macerou-se três gramas de tecido muscular. Em um tubo de 15 mL adicionou-se o tecido macerado e 1,5 mL de TEN 9 (50 mM Tris-HCl, pH 9, 100 mM EDTA, 200 mM NaCl) agitou-se o tubo até formar uma mistura homogênea. Adicionou-se 150  $\mu$ L de SDS 20% e 150  $\mu$ L de Proteinase K (10 mg/mL). Após a homogeneização, a solução foi incubada a 56 °C durante 10 horas. O DNA extraído foi purificado pelo método fenol-clorofórmio e álcool 70%. A primeira etapa da purificação foi feita utilizando um volume de 500  $\mu$ L de fenol tamponado pH 7,4 – 8 (Phoneutria) agitando-o durante 15 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 16.000 x g e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A segunda etapa da purificação foi feita num volume de 500  $\mu$ L de clorofórmio e a solução foi agitada durante 15 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com solução de precipitação (Phoneutria), centrifugado a 16.000 x

g por 15 minutos; finalmente, a solução de precipitação foi descartada e a lavagem do *pellet* foi realizada duas vezes com álcool 70% resfriado a -20 °C.

#### **4.6 Teste da presença de inibidores de PCR em águas de diferentes procedências.**

Na reação de PCR, a presença de possíveis inibidores foi testada substituindo a água ultrapura por água de diferentes procedências (do rio Pandeiros, dos aquários 18 e 19 do FZB-BH, água da torneira, água ultrapura e água da lagoa da Pampulha).

#### **4.7 Teste do efeito de purificadores de DNA e do facilitador de PCR (BSA 1%) em três tipos de águas.**

Com o objetivo de eliminar os efeitos dos inibidores de PCR, foram testados dois produtos considerados de efeito purificador do DNA: carvão ativado e Chelex 100<sup>®</sup>. O teste com carvão ativado foi realizado adicionando 5 µg de carvão ativado em 150 µl de uma solução contendo 15 ng/µl de DNA. Esta solução foi vortexada durante 2 minutos e centrifugada durante 10 minutos a 16.000g.

O protocolo com Chelex 100<sup>®</sup> foi baseado no método descrito por Coombs *et al*, (1999). Em cada tubo foi adicionado 100 µl de Chelex 100<sup>®</sup>; os tubos foram aquecidos a 99°C durante 10 minutos e agitados suavemente após o aquecimento. O facilitador de PCR foi adicionado ao Mix de PCR na concentração de 1% do volume total final (20µL).

Para testar a ação de purificadores e do facilitador BSA foi feito com o intuito de diminuir o custo da extração de DNA por amostra. Geralmente as extrações de eDNA dos filtros são feitas com kits (Eichmiller, 2015, 2016) porém o custo pode chegar a 30 reais por amostra enquanto que outras substâncias como carvão ativado custaria menos de 0,10 centavos por amostra e o Chelex 100 custaria menos de 1,00 real por amostra.

#### **4.8 Padronização de volume de amostra para a captura de DNA ambiental.**

O método de captura de DNA ambiental foi realizado conforme Eichmiller (2014). Foram coletados 5 litros de água do Aquário 18 e do Aquário 19. A padronização da quantidade de água filtrada das duas amostras foi estabelecida a partir da quantidade necessária para promover o entupimento do filtro de fibra de vidro (GF), utilizando a amostra de água com maior turbidez. Os filtros utilizados foram condicionados dentro de uma placa de petri estéril e armazenados a -20°C.

#### **4.9 Extração do DNA ambiental**

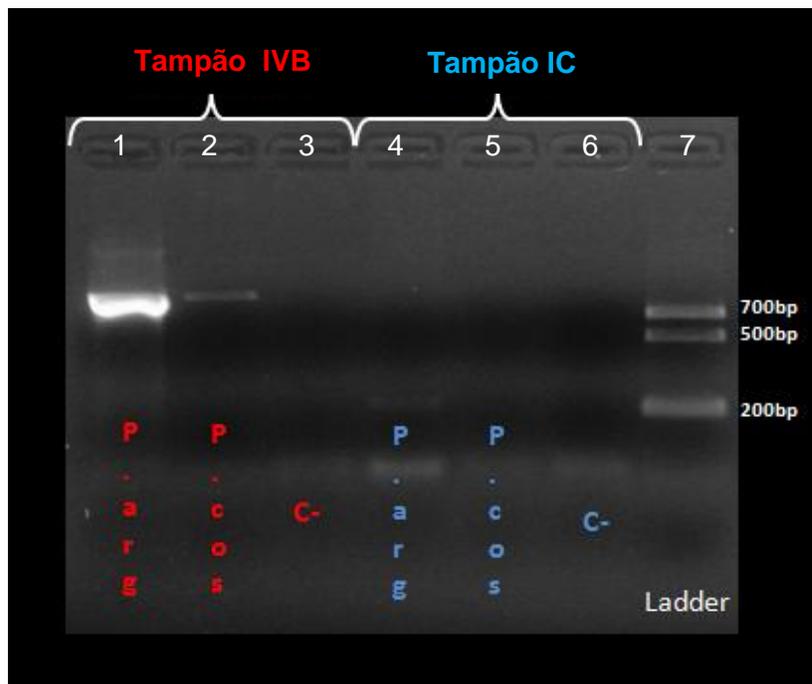
Os filtros com material obtido a partir da filtração das amostras de águas coletadas nos aquários 18 e 19 foram processados com o kit *QIAamp DNA Stool* (Qiagen, Hilden, Germany) usando o protocolo para análise de DNA humano. Esse kit foi selecionado por conter resinas que promovem a remoção de inibidores, além de ser um protocolo eficiente na extração do DNA de células eucariotas (Persson, 2010; Eichmiller, 2014). A extração foi feita com 1cm<sup>2</sup> do filtro congelado, cortado com estiletes previamente desinfetados com hipoclorito 15%.

## 5 RESULTADOS

Todas as reações demonstradas nesse trabalho foram repetidas no mínimo duas vezes, com temperatura de anelamento a 53°C. A eletroforese foi feita em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídio. O marcador molecular utilizado em todas as corridas foi o Ladder 752 da Phoneutria que marca as bandas de tamanho 700 bp, 500 bp e 200 bp.

### 5.1 Padronização da PCR

Foram testados dois tipos de tampão de PCR (IVB e IC) que se diferenciam pela quantidade de magnésio. O tampão IVB foi selecionado por ter amplificado a região desejada (Dloop) com maior sucesso, levando a um aparecimento de uma banda forte no gel de agarose, portanto nossos experimentos foram conduzidos com o Tampão IVB.



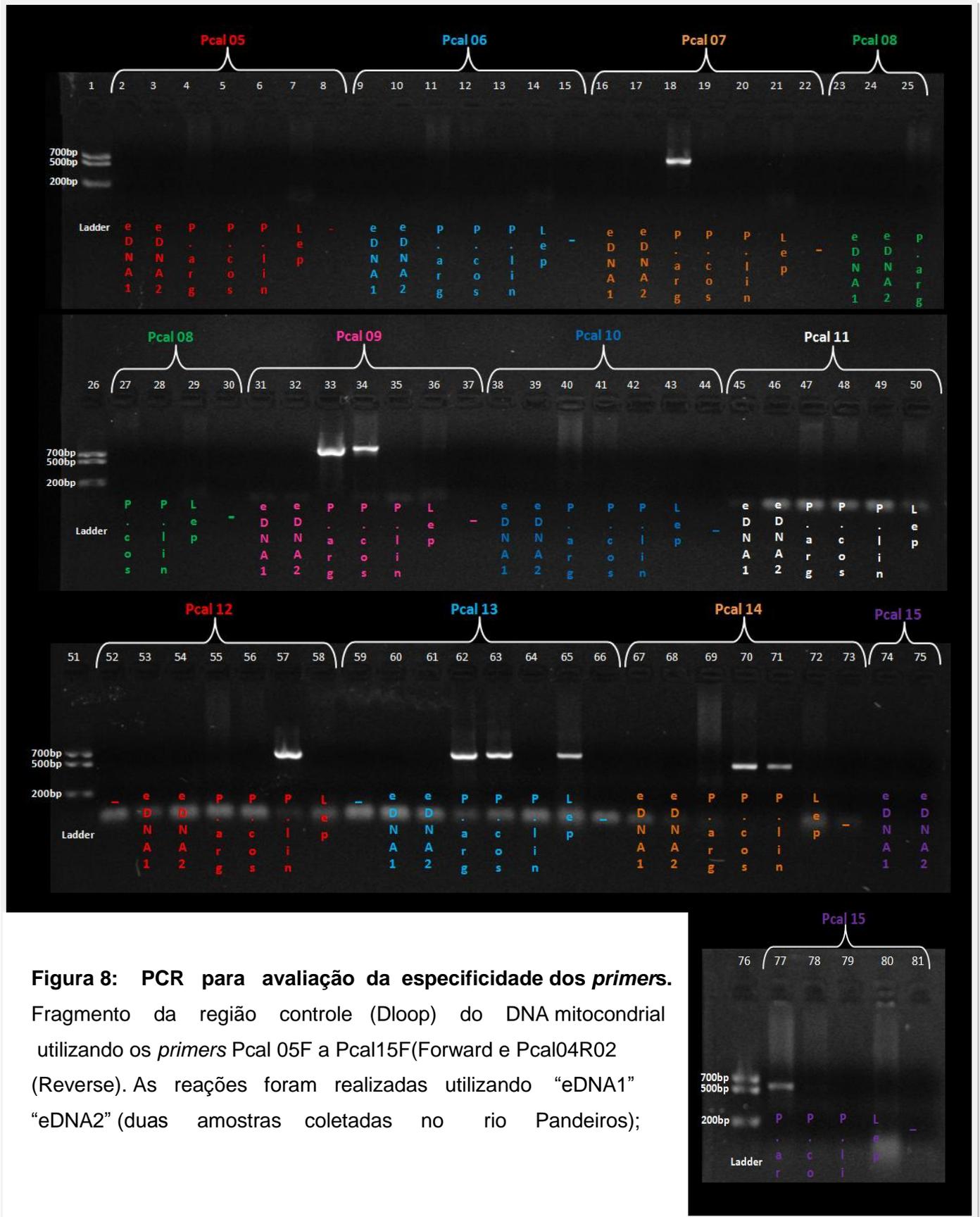
**Figura 6: Foto do gel de agarose.** Eletroforese dos produtos de amplificação da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial feita para testar a eficiência de duas reações com dois diferentes tipos de tampões. Foram testados o pré-mix IVB (Phoneutria) e o Tampão IC (Phoneutria) com o par de *primers* Pcal 09F(Forward) e Pcal04R02 (Reverse). “C-” são os controles negativos, “Ladder” é o marcador molecular. Tamanho de banda esperado: 600bp a 700bp.

## 5.2 Testes de especificidade dos *primers*

A especificidade dos conjuntos de *primers* desenvolvidos por Chagas *et al*, (2015) (Figura 7) para testar a especificidade de cada conjunto de *primers*. As figuras 8 e 9 mostram os resultados dos testes. Foram eliminados os *primers* Pcal05F, Pcal06F, Pcal08F, Pcal11F devido à ausência de amplificação nas amostras de *P. argenteus* e *P. costatus*.



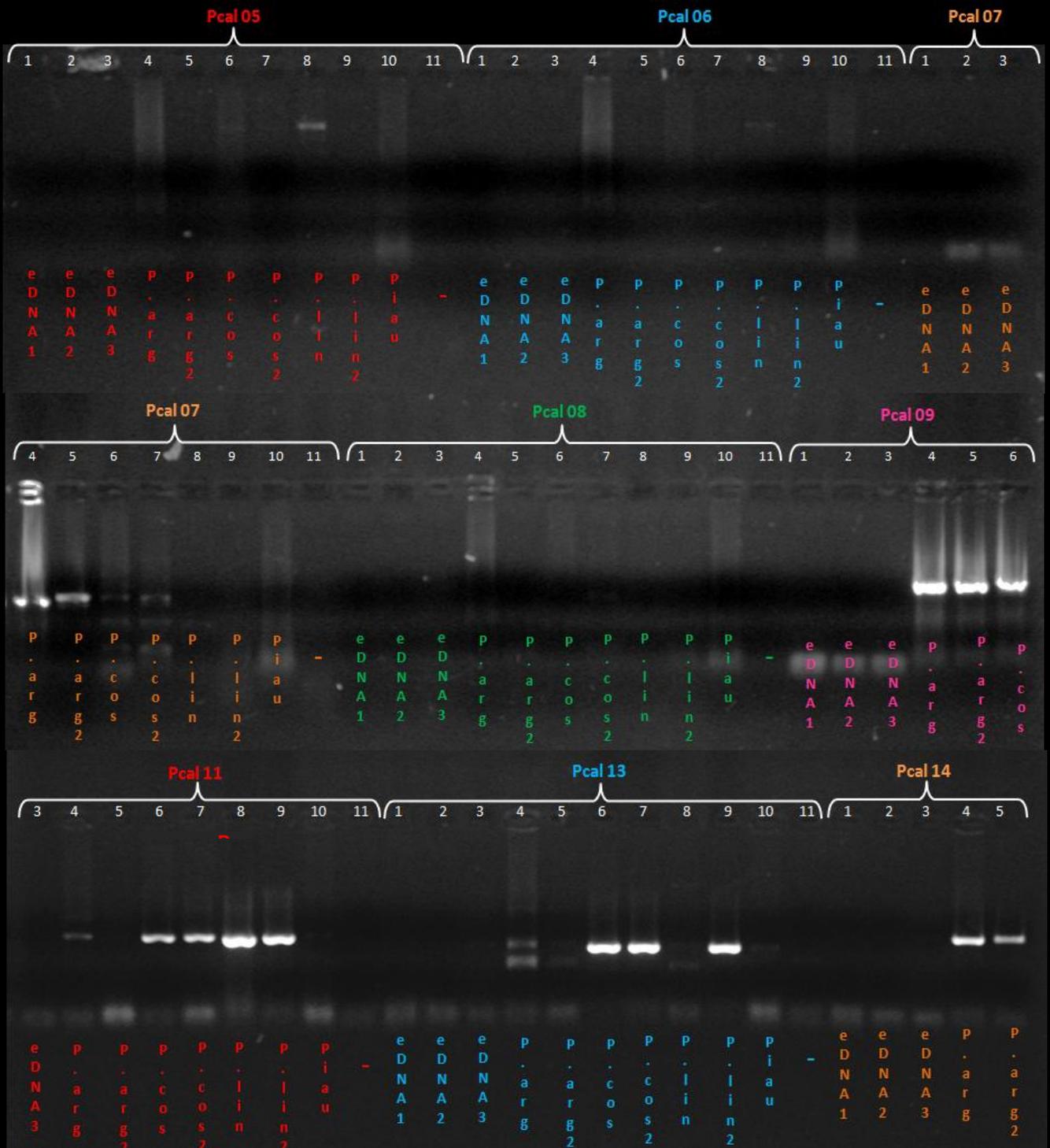
**Figura 7: Posição dos *primers* que foram testados.** De acordo com Chagas *et al*, (2015) o comprimento dos amplicons de A a R é de 793 bp, de B a R é de 643 bp, de C a R é de 615 bp, D a R é de 606 bp e E a R é 511 bp. A linha destacada em verde representa a região D-loop do DNA mitocondrial.



**Figura 8: PCR para avaliação da especificidade dos primers.**

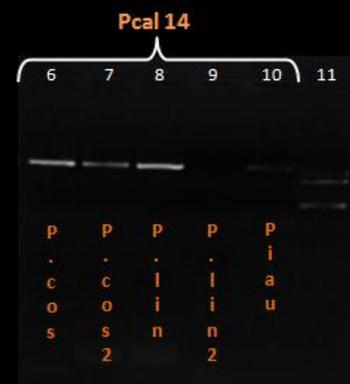
Fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os primers Pcal 05F a Pcal15F(Forward e Pcal04R02 (Reverse). As reações foram realizadas utilizando “eDNA1” “eDNA2” (duas amostras coletadas no rio Pandeiros);

“P.arg”, (*Prochilodus argenteus*); “P.cos” (*Prochilodus costatus*); “P.lin” (*Prochilodus lineatus*); “Lep” (*Leporinus elongatus*), “-” (controle negativo) e marcador molecular. Tamanho de banda esperado: 500bp a 700bp.



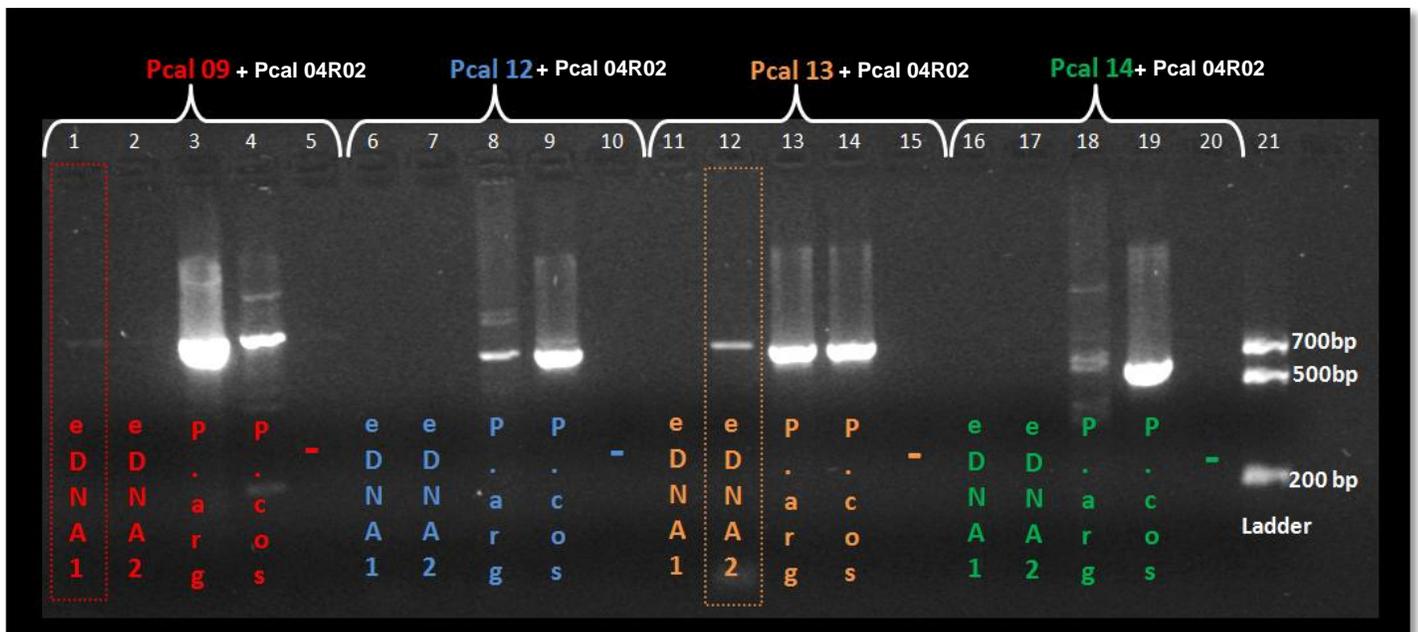
**Figura 9: Confirmação da especificidade dos *primers*.**

Fragmentos da região controle (D-Loop) do DNA mitocondrial utilizando os *primers* Pcal 05F a Pcal14F(Forward) e Pcal04R02



(Reverse). As reações foram realizadas utilizando “eDNA1”, “eDNA2”, “eDNA3” (amostras coletadas no rio Pandeiros); “P.arg”, “P.arg2” (dois DNAs controle diferentes do mesmo espécime de *Prochilodus argenteus*); “P.cos”, “P.cos2” (dois DNAs controle diferentes do mesmo espécime de *Prochilodus costatus*); “P.lin”, “P.lin2” (dois DNAs controle diferentes do mesmo espécime de *Prochilodus lineatus*); “Lep” (*Leporinus elongatus*), “-” (controle negativo) e o ladder 752 (marcador molecular). Tamanho de banda esperado: 500bp a 700bp.

Os *primers* Pcal09F, Pcal12F, Pcal13F e Pcal 14F também foram novamente testados em DNA de *P.argenteus* e *P.costatus* e com amostras coletadas diretamente da água do rio Pandeiros; a amostra proveniente do rio Pandeiros foi amplificada (Figura 10). Essas reações foram testadas quatro vezes com mais de quatro amostras diferentes do rio Pandeiros, porém esse resultado se mostrou muito variável e as amostras do rio Pandeiros não foram incluídas nas análises posteriores. Percebe-se no gel que houve amplificação de uma das amostras do Rio Pandeiros, porém esse resultado não se repetiu em outras reações, não mostrando confiabilidade.

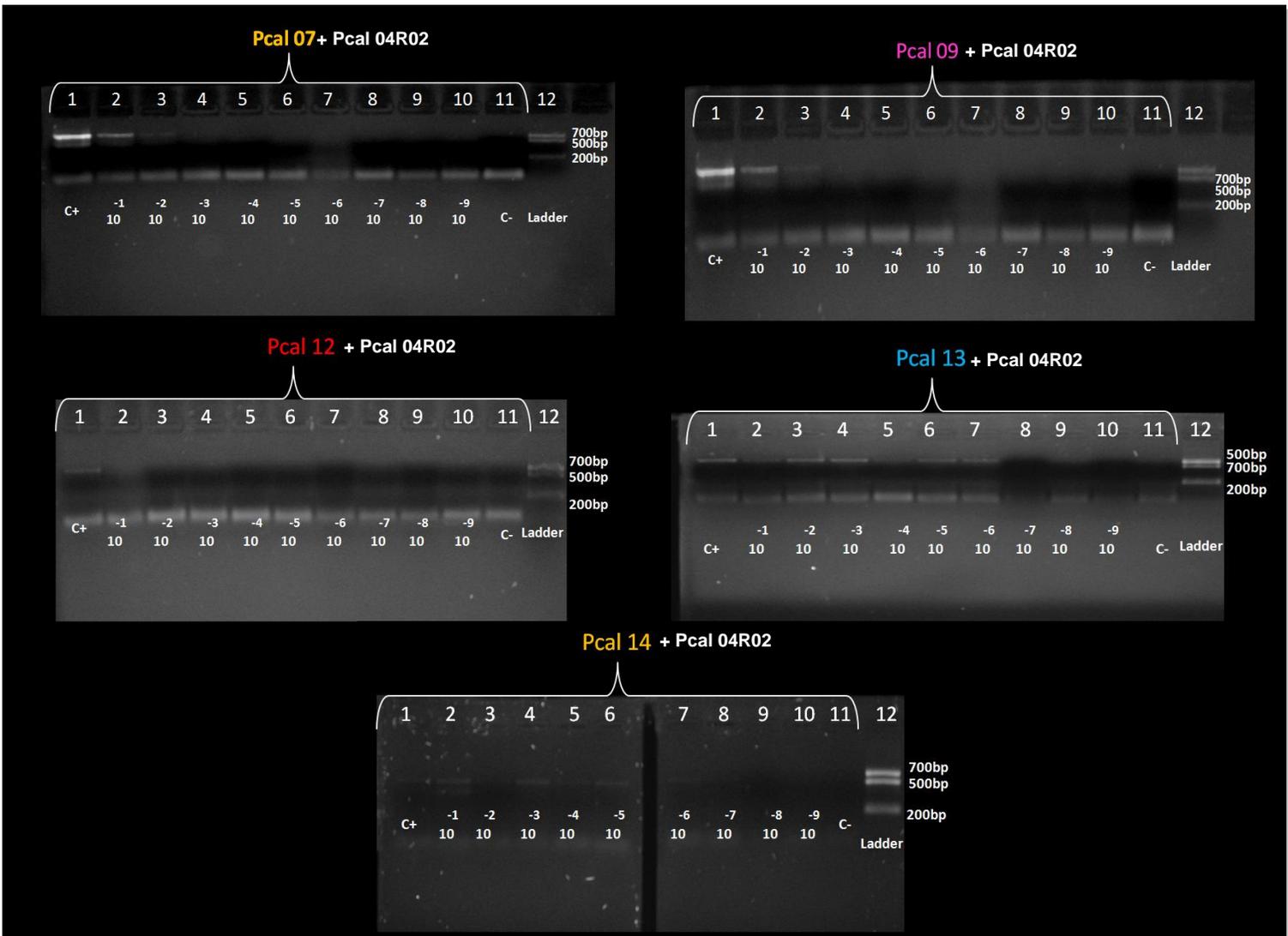


**Figura 10: PCR simples de fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os *primers* Pcal 09F, Pcal 12, Pcal 13, Pcal14F(Forward) e Pcal04R02 (Reverse). As reações foram realizadas utilizando “eDNA1” e “eDNA2” (duas**

amostras coletadas no rio Pandeiros); "P.arg", (*P. argenteus*); "P.cos" (*P. costatus*); "-" (controle negativo) e o ladder 752 (marcador molecular). As amostras sinalizadas no gel demonstram DNA que foi amplificado a partir da água do Rio Pandeiros. Tamanho de banda esperado: 600 bp a 700 bp.

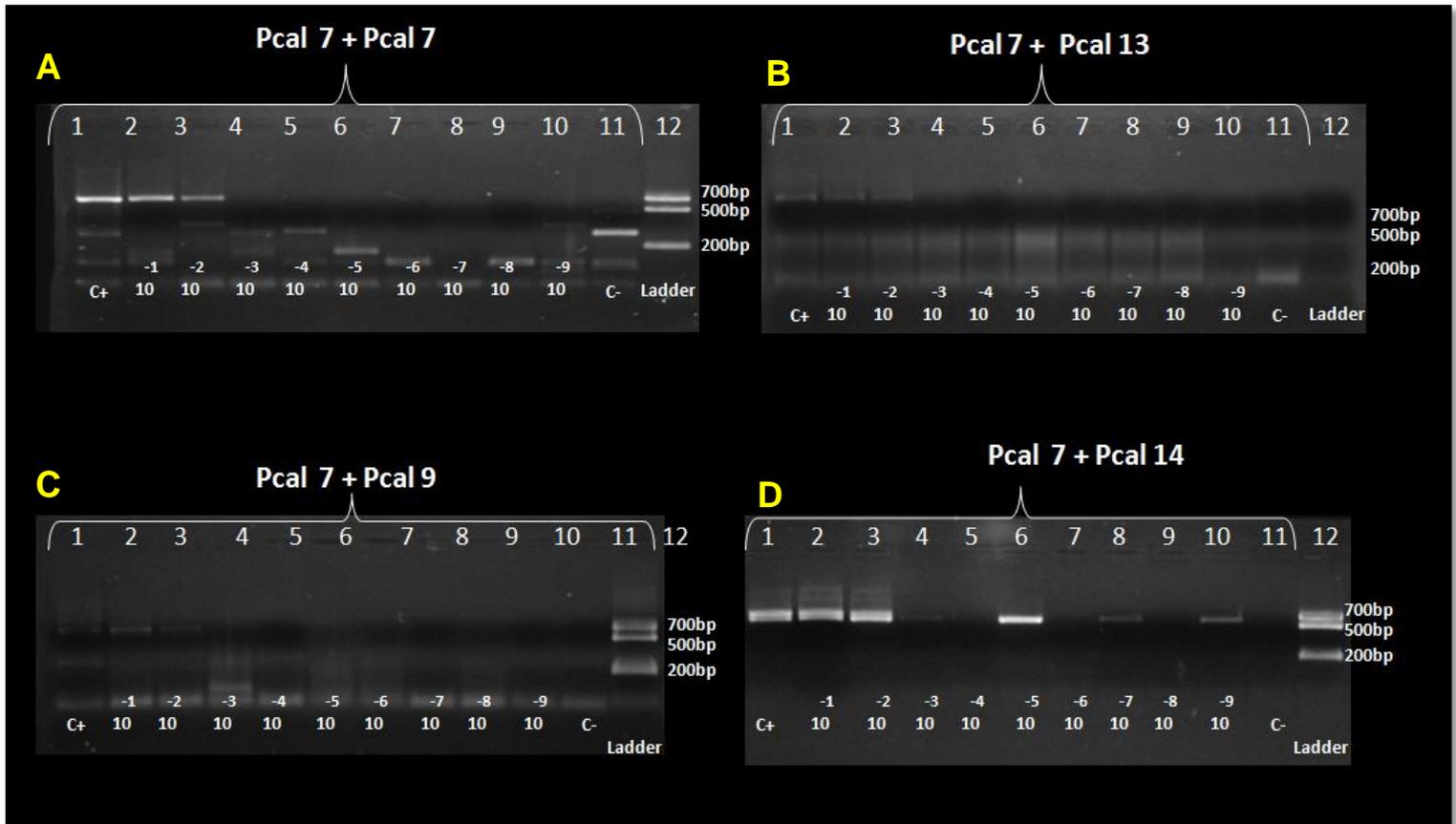
### **5.3 Testes de sensibilidade dos *primers***

Após a fase de testes de especificidade, os ensaios foram restritos à espécie *P. argenteus*. Diluímos o DNA controle de *P. argenteus* (5 ng/μL) em oito alíquotas com valores decrescentes de diluições a  $10^{-1}$ , (diluição até 80x) para realizar o teste de sensibilidade dos *primers* escolhidos. Após os resultados demonstrados na Figura 11, eliminamos o *primer* forward Pcal12F, por apresentar baixa especificidade, pois obtivemos uma banda somente no controle positivo, com 5 ng de DNA.

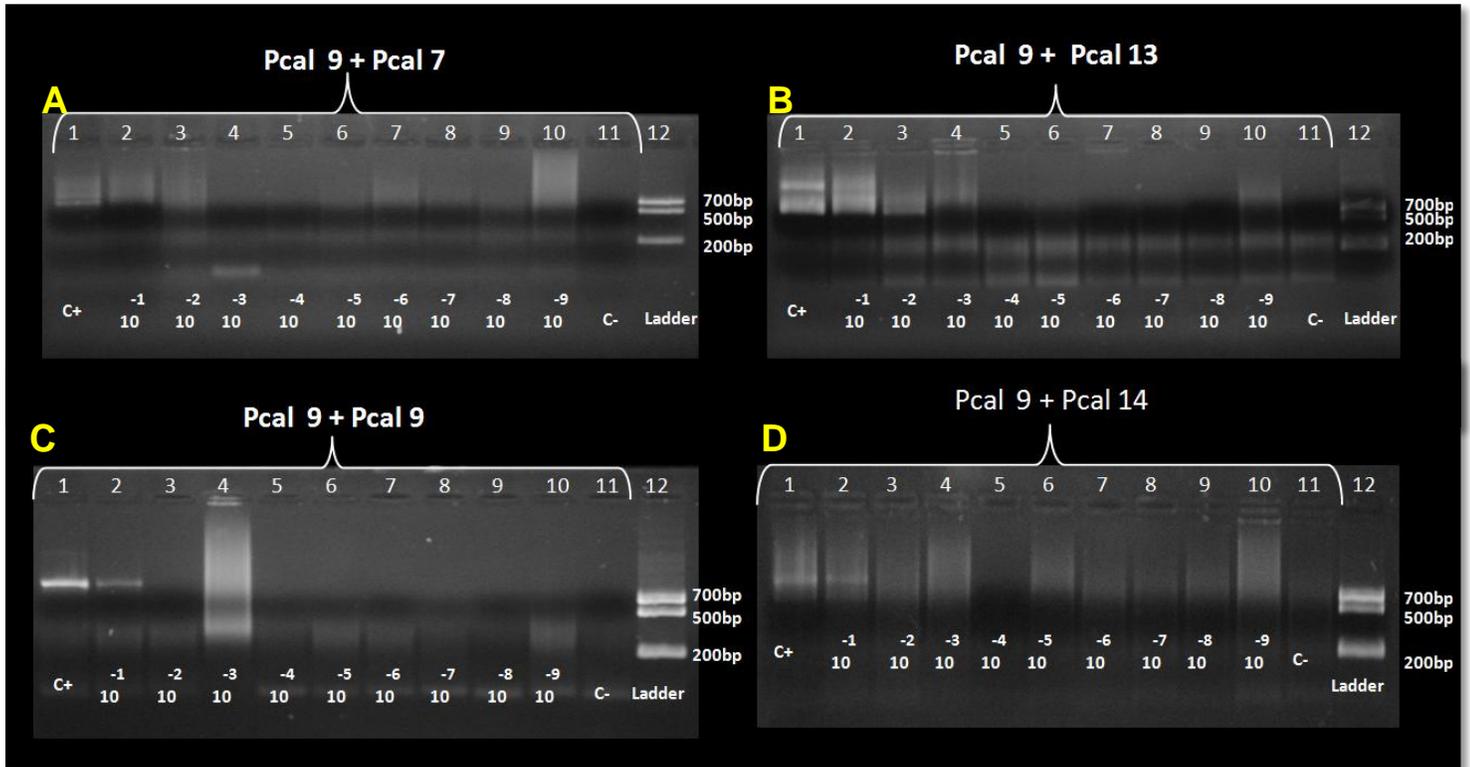


**Figura 11: Teste de sensibilidade de alguns *primers*.** Fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 07, Pcal 09, Pcal 12, Pcal 13, Pcal14 e Pcal04R02 (Reverse). Cada gel representa um conjunto de *primer* diferente. As amostras com 5 ng de DNA estão representados nas colunas 1 e suas diluições nas colunas 2,3,4,5,6,7,8,9 e 10. “C-” controles negativo; “Ladder” representa os marcadores moleculares. Tamanho de banda esperado: 600bp a 700bp.

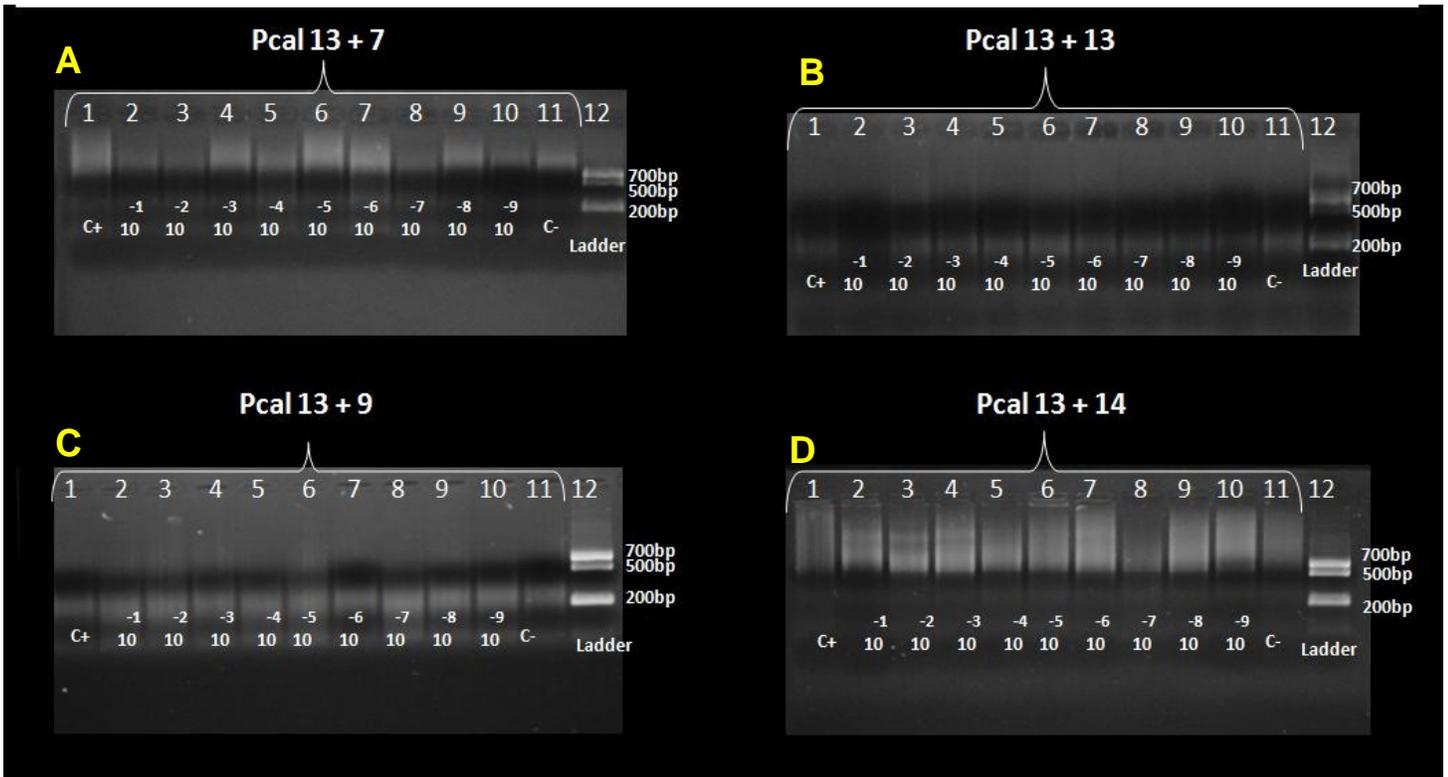
Os próximos testes foram feitos utilizando o produto da reação da figura 11 para fazer o PCR Nested de cada *primer* (Figuras 12 a 15). Com base na amplificação de cada par de *primers*, foi selecionado o par de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na reação de PCR, enquanto que o par de *primers* Pcal14F e Pcal04R02 foi selecionado para a reação de PCR Nested.



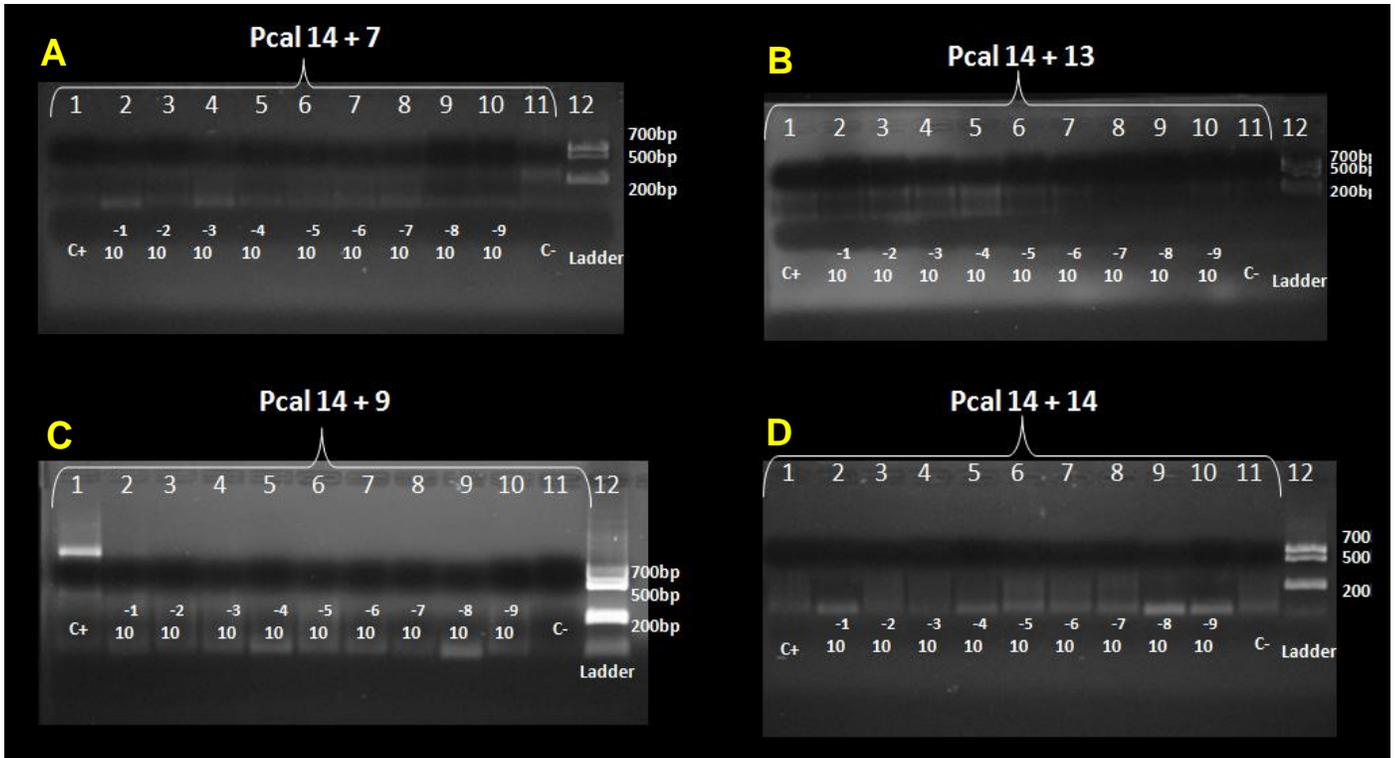
**Figura 12: Teste de sensibilidade dos *primers* na reação de PCR Nested.** Fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 (Reverse) na primeira reação e Pcal 07F, Pcal 09F, Pcal 12, Pcal 13, Pcal14F(Forward) e Pcal04R02 (Reverse) na reação Nested. As letras “A”, “B”, “C” e “D” representam *primers* diferentes usados na reação de PCR Nested. As amostras com 5 ng de DNA estão representados nas colunas 1 e suas diluições nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, “C-” controle negativo; “Ladder” representa o marcador molecular. Tamanho de banda esperado: 600bp a 700bp.



**Figura 13: Teste de sensibilidade 2 dos *primers* na reação de PCR Nested.** PCR do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 09F e Pcal04R02 na primeira reação e os *primers* Forward Pcal 07, Pcal 09, Pcal 12, Pcal 13, Pcal14 com o *primer* reverse Pcal04R02 na reação Nested. Cada gel representa um *primer* diferente na reação de PCR Nested. As amostras com 5ng de DNA estão representados nas colunas 1 e suas diluições nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, “C-” controle negativo; “Ladder” representa o marcadores moleculares. Tamanho de banda esperado: 600bp a 700bp.



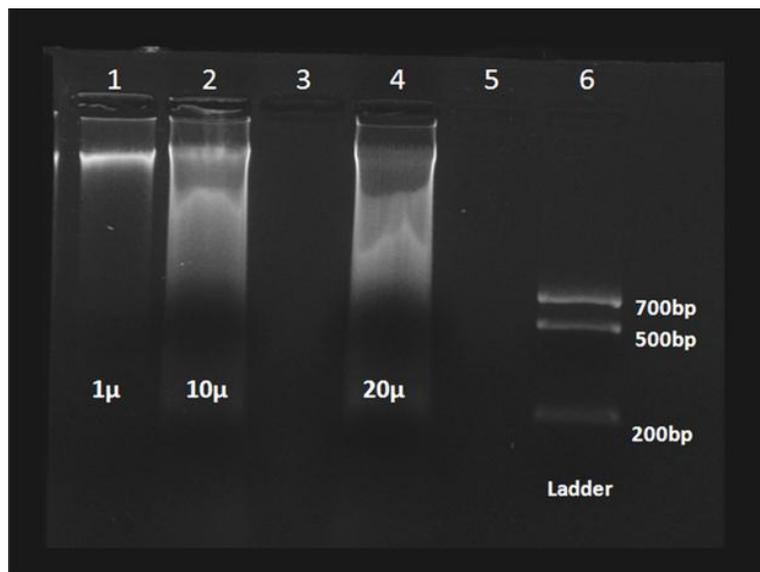
**Figura 14: Teste de sensibilidade 3 dos *primers* na reação de PCR Nested.** PCR do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 13 e Pcal04R02 na primeira reação e os *primers* forward Pcal 07, Pcal 09, Pcal 12, Pcal 13, Pcal14 e o *primer* reverse Pcal04R02 na reação Nested. Cada gel representa um conjunto de *primer* diferente na reação de PCR Nested. As amostras com 5ng de DNA estão representados nas colunas 1 e suas diluições nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, “C-” são os controles negativos e “Ladder” representa os marcadores moleculares. Tamanho de banda esperado: 600bp a 700bp.



**Figura 15: Teste de sensibilidade 4 dos *primers* na reação de PCR Nested.** PCR do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 14 e Pcal04R02 na primeira reação e Pcal 07, Pcal 09, Pcal 12, Pcal 13, Pcal14 e Pcal04R02 na reação Nested. Cada gel representa um conjunto de *primer* diferente na reação de PCR Nested. As amostras com 5ng de DNA estão representados nas colunas 1 e suas diluições nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, “C-” controle negativo; “Ladder” marcador molecular. Tamanho de banda esperado: 600bp a 700bp.

## 5.4 Extração de DNA

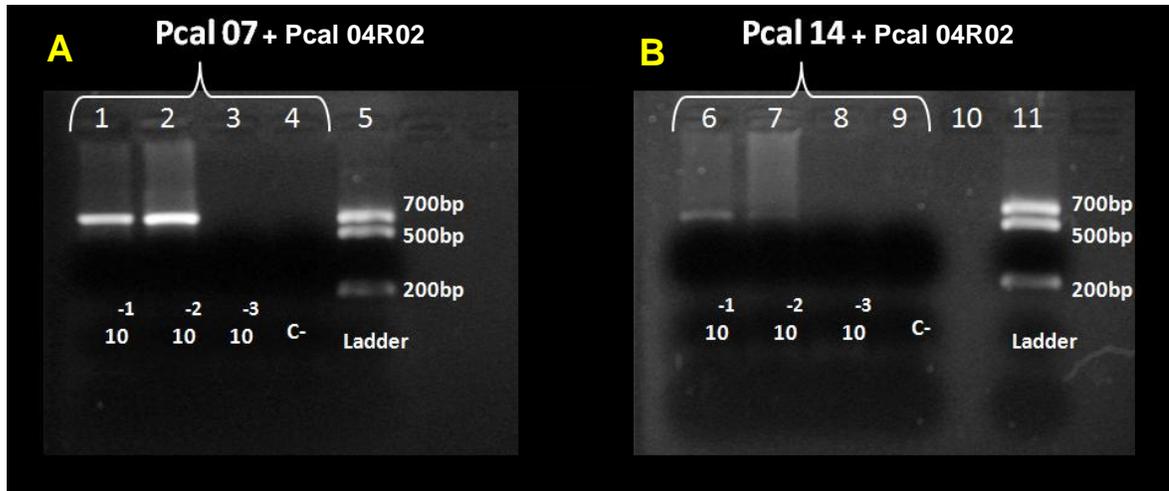
Devido à inconstância em nossos resultados até mesmo com os *primers*, tomou-se a decisão de extrair novamente o DNA do *P. argenteus* (150 ng) (figura 16). Foi aplicado 1 $\mu$ l do produto da extração em uma canaleta e em outras duas canaletas foram aplicados 10 e 20 $\mu$ l do produto da extração para avaliarmos como a quantidade de DNA afeta a interpretação ao visualizarmos no gel de agarose, percebe-se que se aplicarmos muito DNA há aparecimento de arraste na canaleta.



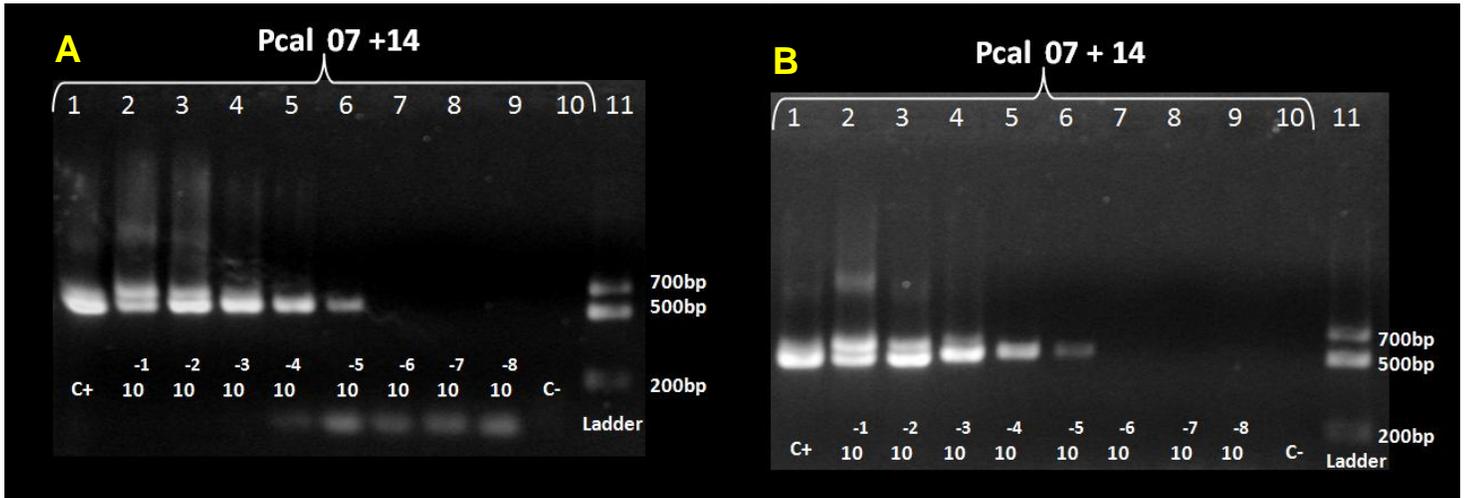
**Figura 16: Eletroforese do DNA extraído.** As amostras de DNA foram aplicadas no gel em diferentes quantidades: 150 ng de DNA (1  $\mu$ L) na canaleta de número 1, 1500ng (10  $\mu$ L) na canaleta de número 2, e 3000ng de DNA (20 $\mu$ L) na canaleta de número 4.

Repetimos o PCR com o par de *primers* Pcal07F/Pcal04R02 e Pcal14F/Pcal04R02 (figura 17 e o Nested figura 18). Percebemos duas bandas no resultado do Nested e para termos certeza que não era contaminação e provar que pode ser excesso de *primer* da primeira reação, foi feito um PCR Nested com os *primers* Pcal14F, Pcal04R02 e um Nested sem *primers* (figura 19), provando dessa forma que a banda mais pesada foi produto carregado da primeira

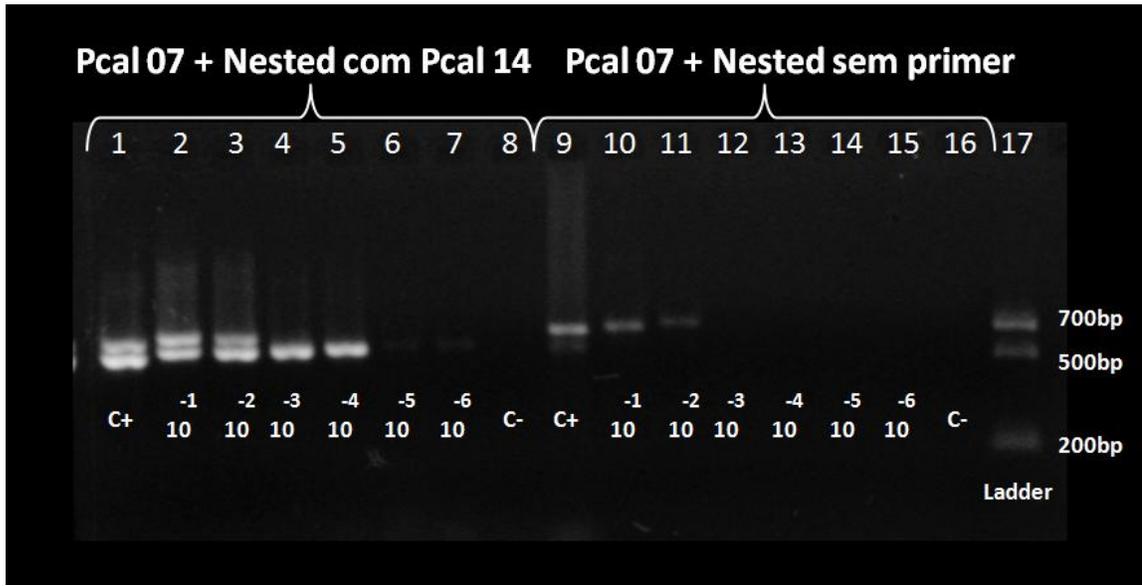
reação (com os *primers* Pcal07F, Pcal04R02). Essa interpretação é consistente, pois o tamanho da sequência de DNA a ser replicada no primeiro PCR é maior do que no PCR Nested.



**Figura 17: PCR teste com o DNA extraído.** Fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 07F, Pcal04R02 e Pcal 14F, Pcal04R02 e o DNA recém extraído de *P. argenteus*. A foto “A” representa os *primers* Pcal 07F e Pcal 04R02, a foto “B” representa os *primers* Pcal 14F e Pcal 04R02. As diluições do DNA (1:  $10^{-1}$  com 15 ng/ $\mu$ L de DNA; 2:  $10^{-2}$  = 1,5 ng/ $\mu$ L e 3:  $10^{-3}$  = 0,15 ng/ $\mu$ L), “C-” é o controle negativo e “Ladder” representa o marcador molecular. Tamanho de banda esperado: 600 bp a 700 bp.



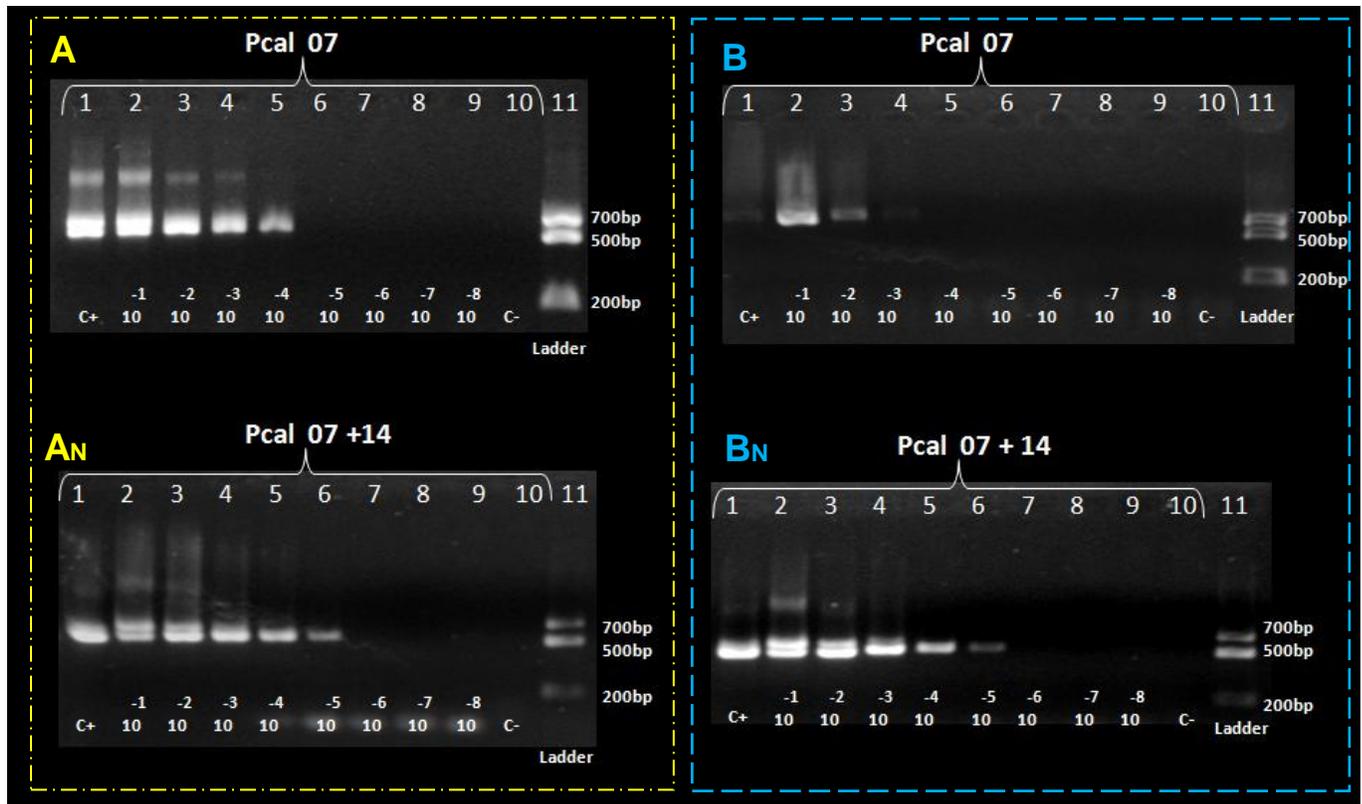
**Figura 18: PCR Nested do DNA extraído.** Fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação e Pcal14F e Pcal04R02 na reação de PCR Nested. O gel “B” é replicata do gel “A”. As reações foram realizadas utilizando “C+” (DNAs estoques com 150 ng), diluições do DNA estoque nas canaletas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, “C-” (controles negativos) e “Ladder” (marcador molecular). Tamanho de banda esperado: 600bp a 700bp.



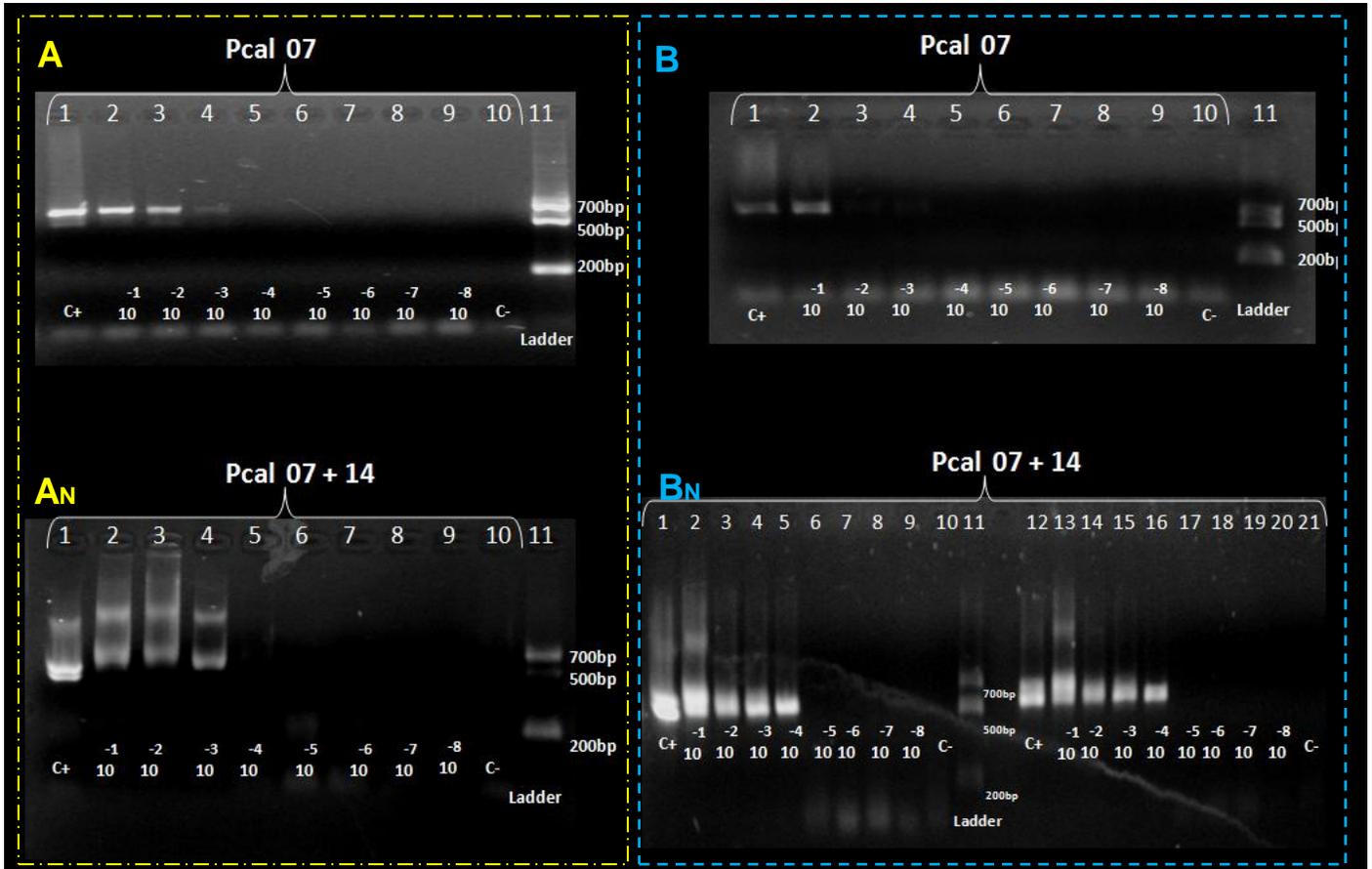
**Figura 19: Produtos de amplificação da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial de *P. argenteus*.** Foram utilizados os pares de primers Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação e Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested os primers Pcal 07F e Pcal04R02 (1 a 8) na primeira reação de PCR e na reação Nested não foi aplicado nenhum primer (9 a 16). As reações foram realizadas utilizando “C+” (150ng de DNA), suas diluições nas colunas 2 a 7 e 9 a 15, “C-” (controle negativo) e “Ladder” (marcador molecular). Tamanho de banda esperado: 600 bp a 700 bp.

## 5.5 Testes de inibidores

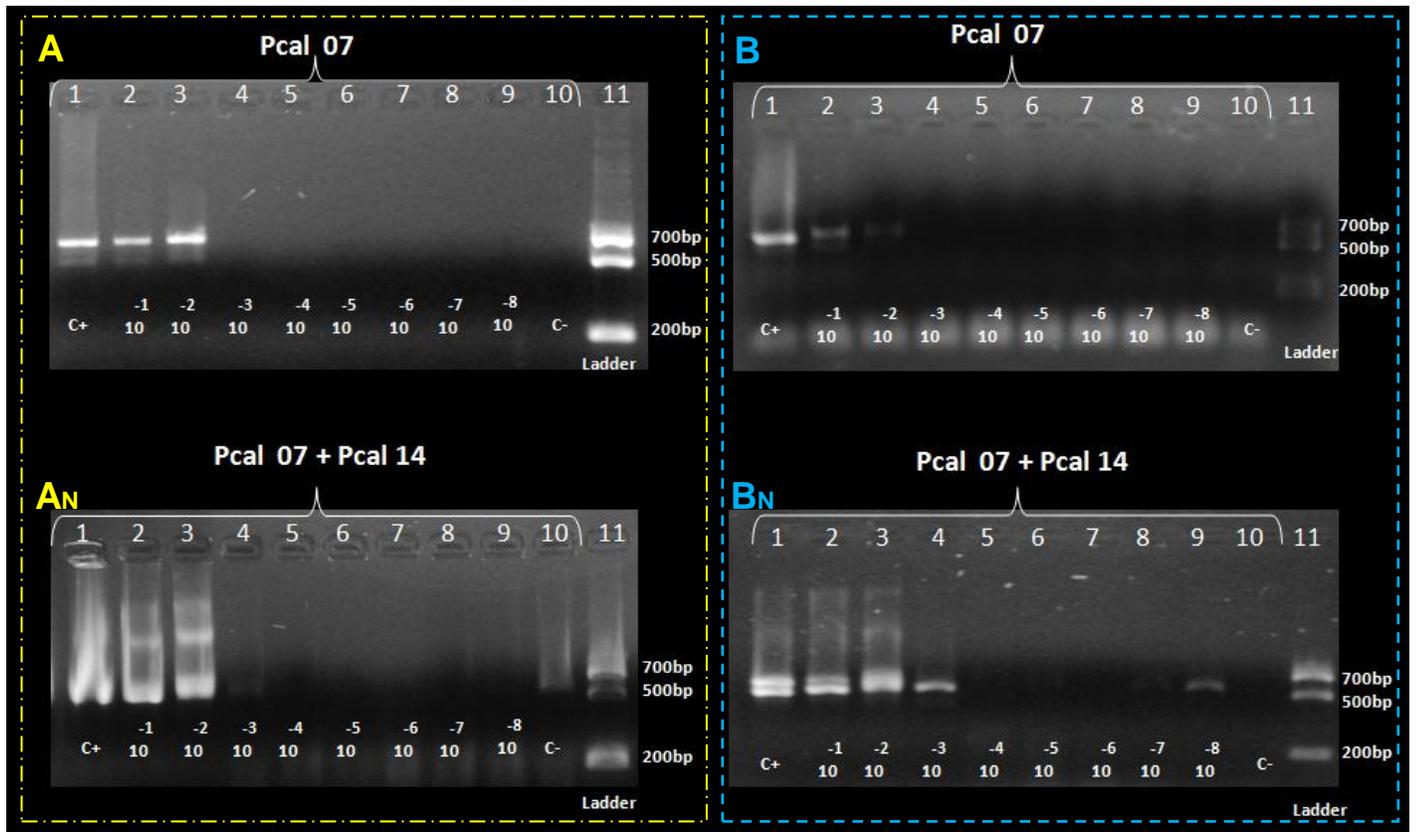
Com o intuito de caracterizar os possíveis efeitos da presença de inibidores nas reações de PCR, a água ultrapura foi substituída por águas de diferentes origens. Foram utilizadas a água ultrapura (mantida apenas como controle positivo) (Figura 20), água da torneira do ICB (Figura 21), água do aquário 18 do FZB-BH (Figura 22), água do aquário 19 do FZB-BH (Figura 23), água do rio Pandeiros (Figura 24) e água da Lagoa da Pampulha de Belo Horizonte (Figura 25).



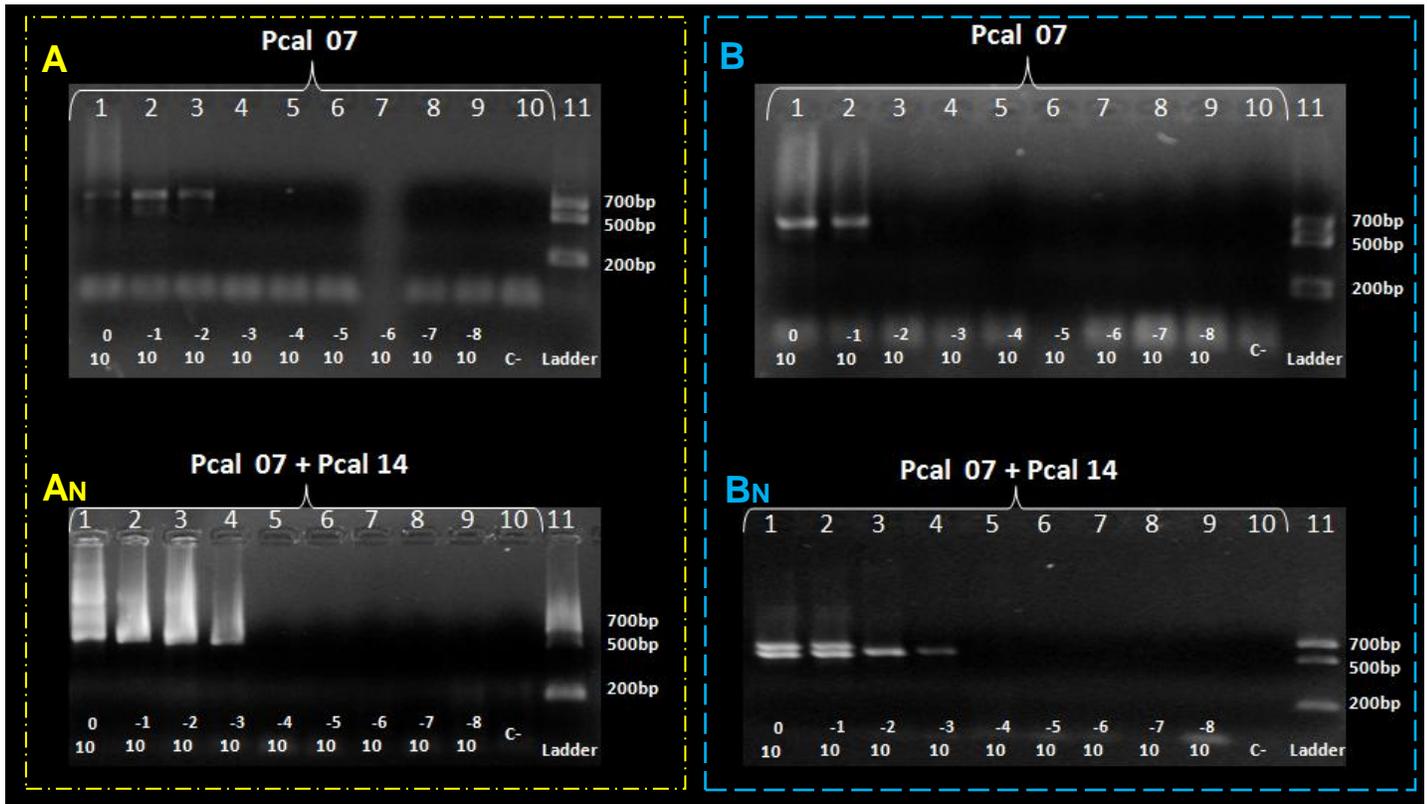
**Figura 20: Teste de inibidores com água ultrapura.** Produtos das reações de duas PCRs do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação “A” e na sua duplicata “B” e Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested “AN” e sua duplicata “BN”. As duas reações foram conduzidas utilizando os controles com 150 ng de DNA “C+”, suas diluições nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, os controles negativos “C+” e o marcador molecular “Ladder”. Tamanho de banda esperado: 500bp a 700bp.



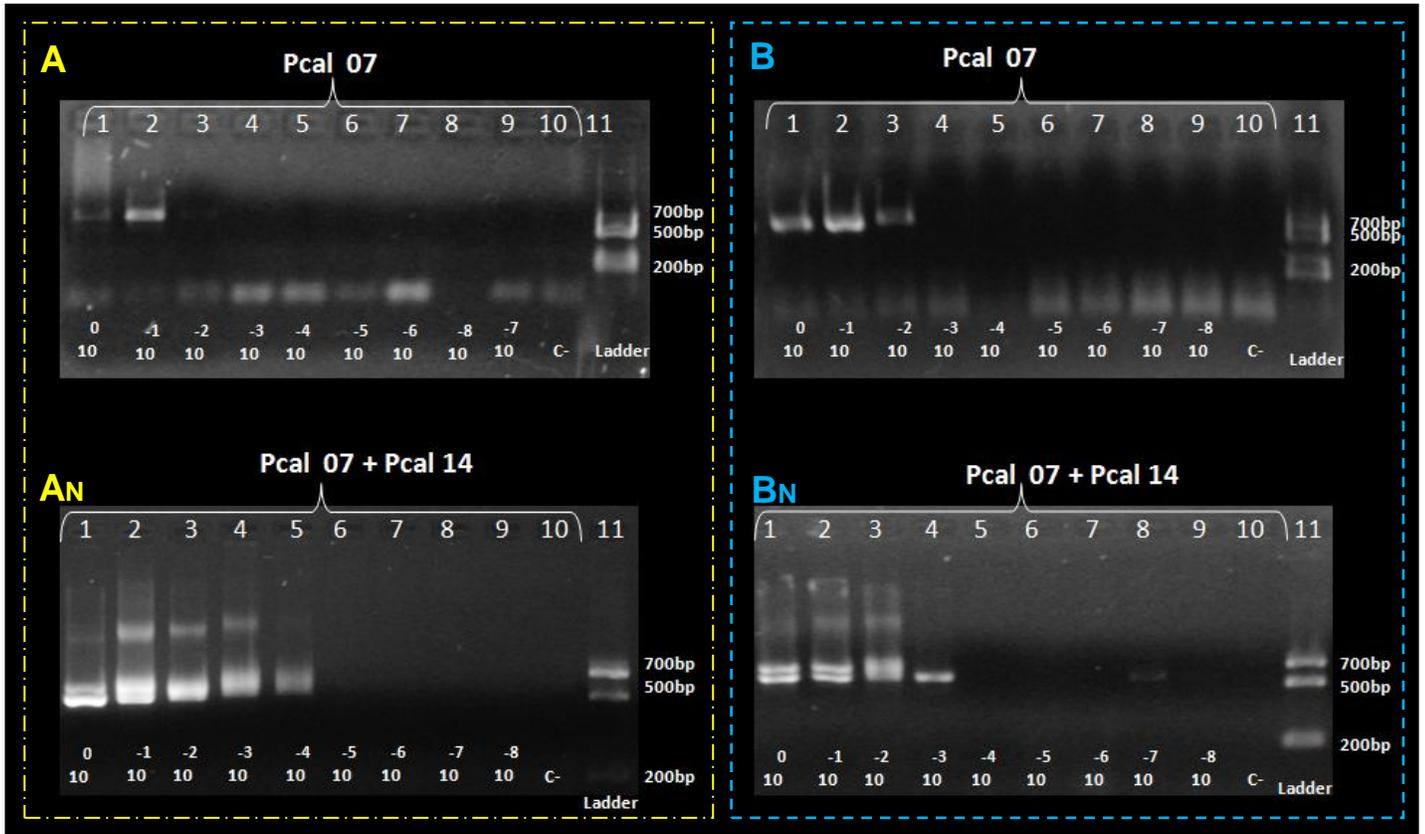
**Figura 21: Teste de inibidores com água da torneira do ICB.** Produtos das reações de duas PCRs do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação nomeada “A” e sua duplicata “B”. Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested “AN” e sua duplicata “BN”. As duas reações foram conduzidas utilizando os controles com 150ng de DNA “C+”, suas diluições nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, os controles negativos “C-” e o marcador molecular “Ladder”. Tamanho de banda esperado: 500bp a 700bp.



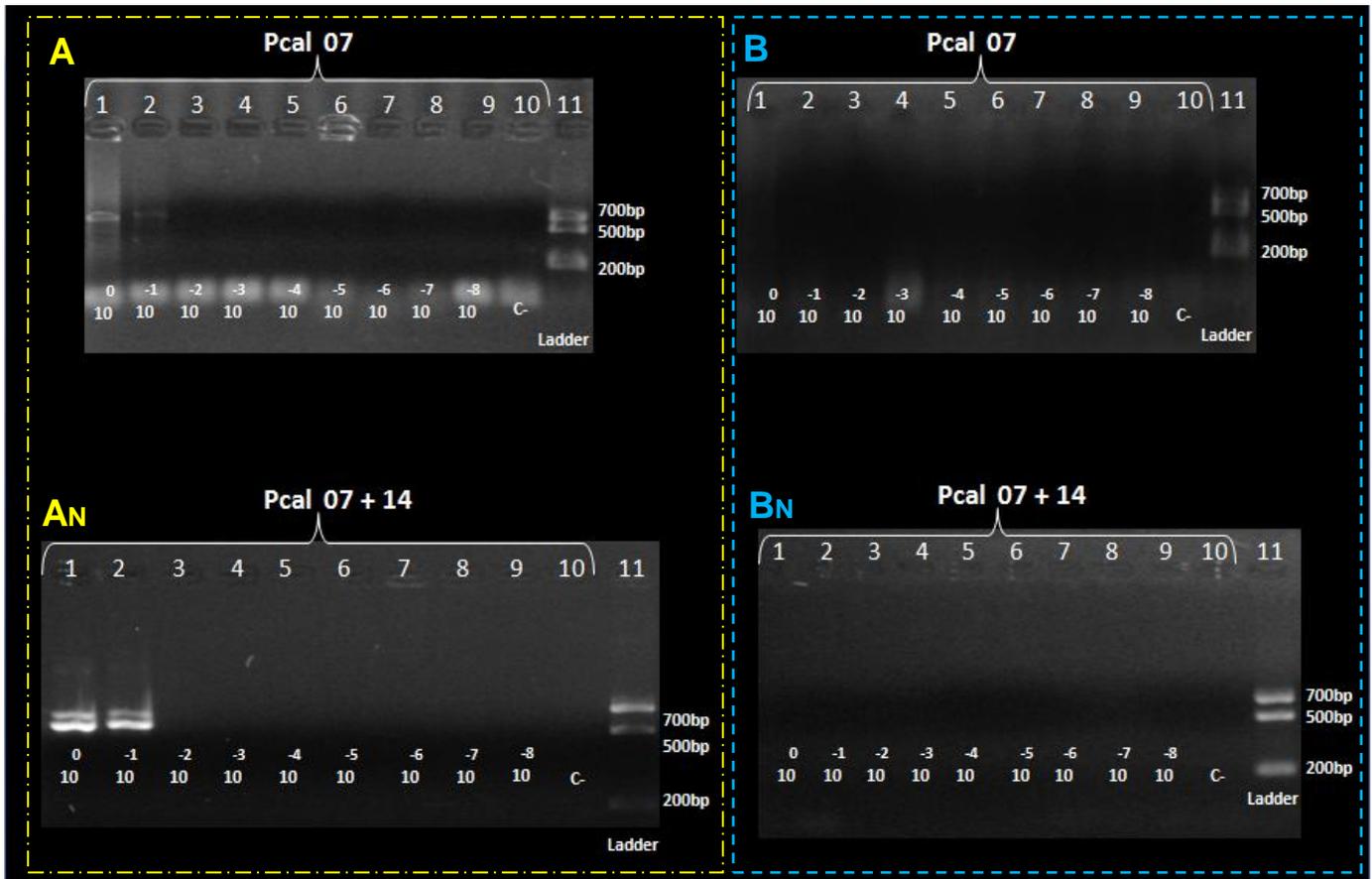
**Figura 22: Teste de inibidores com água do aquário 18 da FZB-BH.** Produtos das reações de duas PCRs do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação nomeada “A” e sua duplicata “B”. Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested nomeada “A<sub>N</sub>” e sua duplicata “B<sub>N</sub>”. As duas reações foram conduzidas utilizando os controles com 150ng de DNA “C+”, suas diluições nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, os controles negativos “C+” é o marcador molecular “Ladder”. Tamanho de banda esperado: 500bp a 700bp.



**Figura 23: Teste de inibidores com água do aquário 19 da FZB-BH.** Produtos das reações de duas PCRs do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação nomeada “A” e sua duplicata “B”. Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested nomeada “A<sub>N</sub>” e sua duplicata “B<sub>N</sub>”. As duas reações foram conduzidas utilizando os controles com 150ng de DNA “C+”, suas diluições nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, os controles negativos “C+” e o marcador molecular “Ladder”. Tamanho de banda esperado: 500bp a 700bp.



**Figura 24: Teste de inibidores com água do rio Pandeiros.** Produtos das reações de duas PCRs do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de primers Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação nomeada “A” e sua duplicata “B”. Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested nomeada “A<sub>N</sub>” e sua duplicata “B<sub>N</sub>”. As duas reações foram conduzidas utilizando os controles com 150ng de DNA “C+”, suas diluições nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, os controles negativos “C-” e o marcador molecular “Ladder”. Tamanho de banda esperado: 500bp a 700bp.

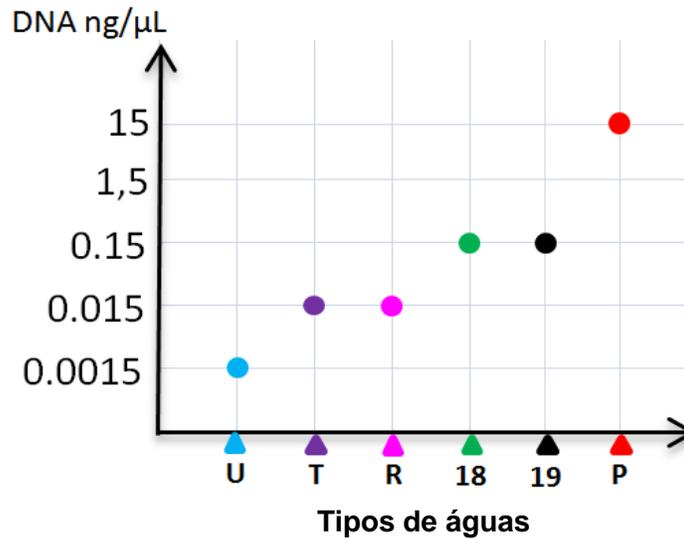


**Figura 25: Teste de inibidores com água da Lagoa da Pampulha.** Produtos das reações de duas PCRs do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação nomeada “A” e sua duplicata “B”. Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested nomeada “A<sub>N</sub>” e sua duplicata “B<sub>N</sub>”. As duas reações foram conduzidas utilizando os controles com 150ng de DNA “C+”, suas diluições nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, os controles negativos “C+” e o marcador molecular “Ladder”. Tamanho de banda esperado: 500bp a 700bp.

A Tabela 1 e a Figura 26 mostram que a reação de PCR foi mais inibida em meios em que suspeita-se ter maior quantidade de matéria orgânica. Os resultados obtidos das diferentes amplificações de água deram origem à tabela 1.

**Tabela 1: Quantidade mínima de DNA detectada nas duas reações de PCR testando amostras de água de diferentes origens.**

<b>Tipos de água</b>	<b>Concentração mínima necessária (reação 1)</b>	<b>Concentração mínima necessária (reação 2)</b>
Água ultrapura	$10^{-5} = 0,0015$ ng de DNA	$10^{-5} = 0,0015$ ng de DNA
Água da torneira	$10^{-3} = 0,15$ ng de DNA	$10^{-4} = 0,015$ ng de DNA
Água do Aquário 18	$10^{-2} = 1,5$ ng de DNA	$10^{-3} = 0,15$ ng de DNA
Água do Aquário 19	$10^{-3} = 0,15$ ng de DNA	$10^{-3} = 0,15$ ng de DNA
Água do Rio Pandeiros	$10^{-4} = 0,015$ ng de DNA	$10^{-3} = 0,15$ ng de DNA
Água da Lagoa da Pampulha	$10^{-1} = 15$ ng de DNA	Sem amplificação

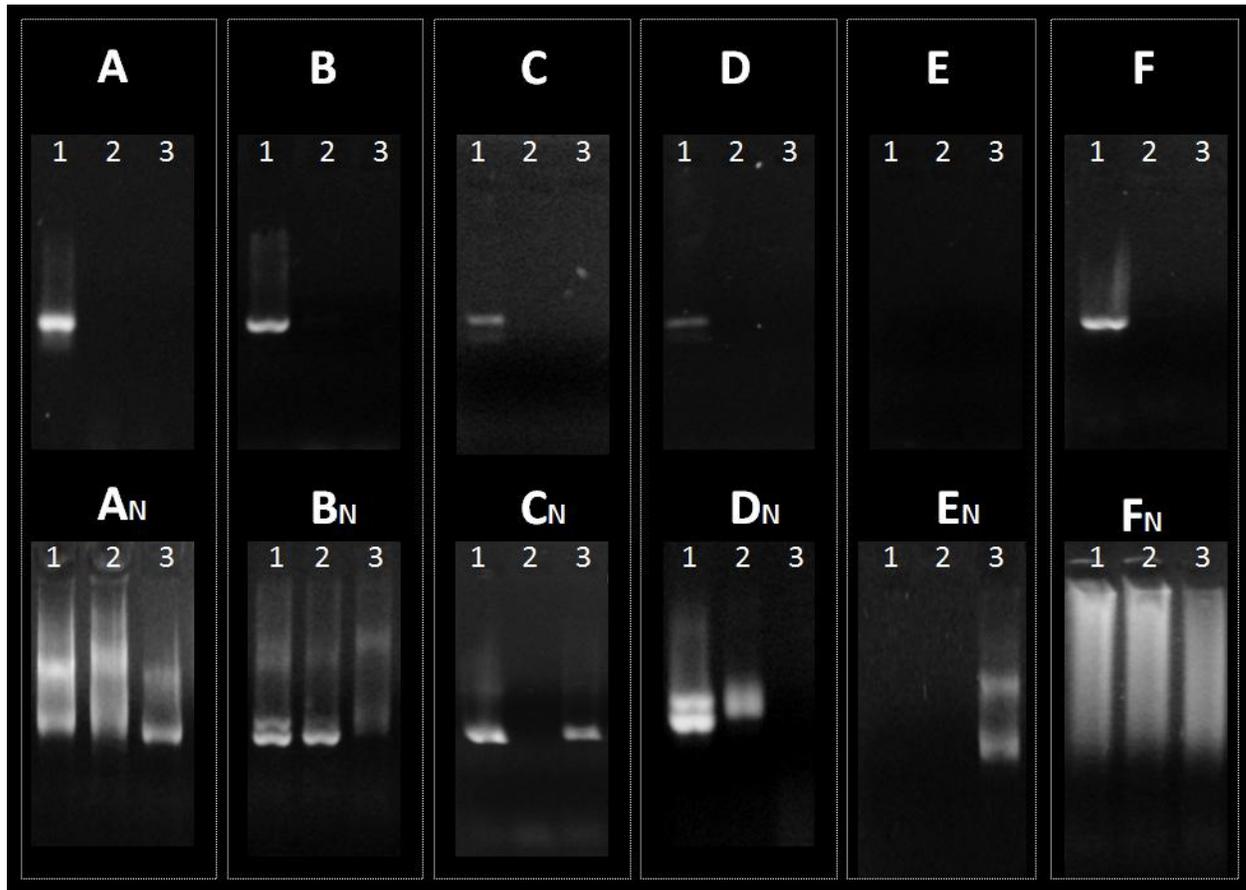


**Figura 26: Relação entre a quantidade de DNA e amplificação visível em gel de agarose.** No eixo x, “U” representa água ultrapura, “T” água da torneira, “R” água do rio Pandeiros, “18” água do aquário 18, “19” água do aquário 19 e “P” água da lagoa da Pampulha.

## 5.6 Testes com alguns purificadores

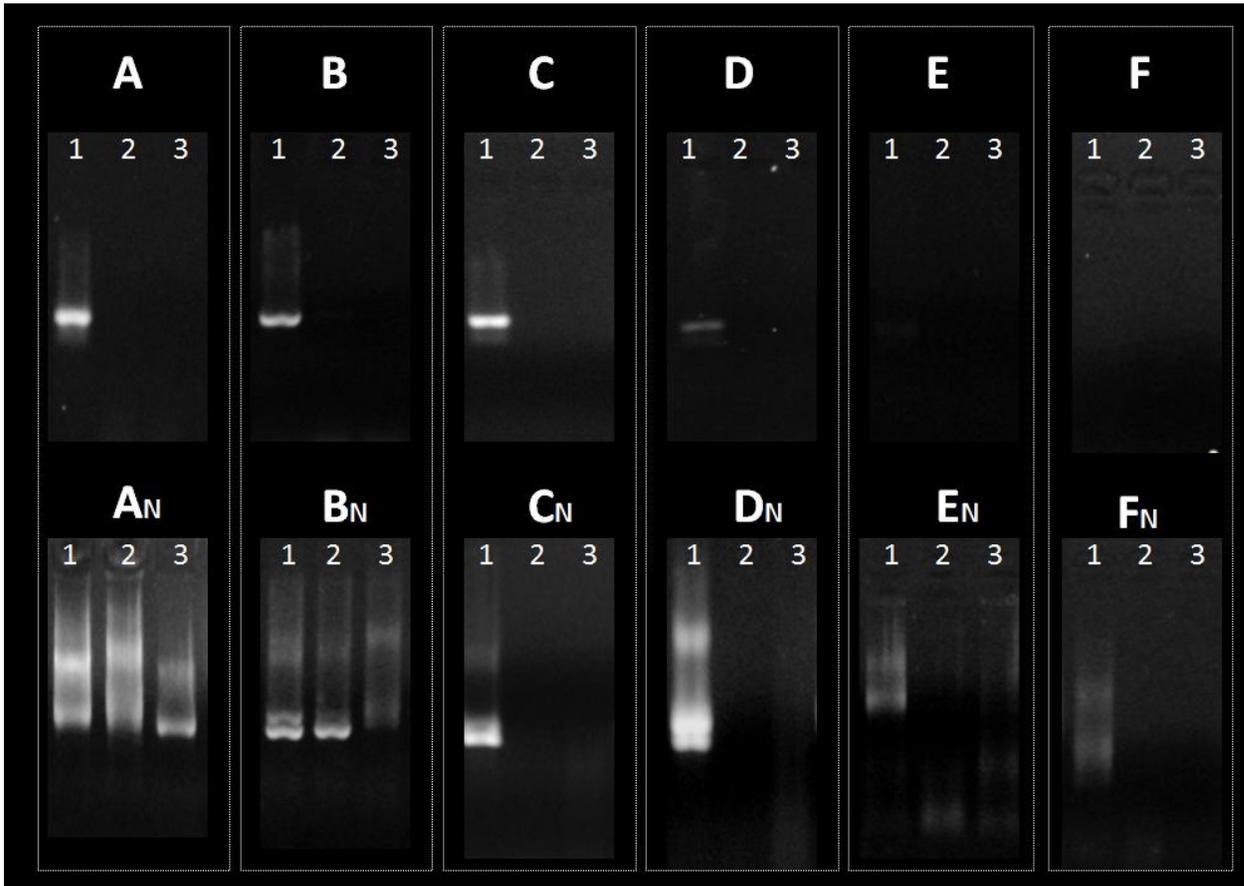
Após os resultados das reações inibitórias de PCR, foram selecionados 3 amostras de águas que obtiveram diferentes resultados nos testes com inibidores para submetê-las a tratamentos de purificação e de um facilitador. As amostras selecionadas foram: aquário 18 do FZB-BH (0.15 ng) (Figura 26 e 27) água do rio Pandeiros (0.015 ng) (Figura 28 e 29), água da lagoa da Pampulha (15 ng) (Figura 30 e 31). Observou-se que o BSA (1%) aliado ao carvão ativado obteve resultados melhores comparados com a água sem tratamento. Devido ao grande número de ciclagens, foi identificado um grande número de amplicons levando a um arrasto no gel de agarose.

Como pode-se ver na figura 26, nas reações C,D e E a amplificação de DNA variou significativamente, amplificando com 15ng de DNA e 0,0015ng de DNA ou 15ng e 0,015ng de DNA ou ainda somente 0,0015ng de DNA, mostrando não ser um resultado confiável. Porém, com o uso do BSA houve uma significativa melhora das bandas que apareceram.



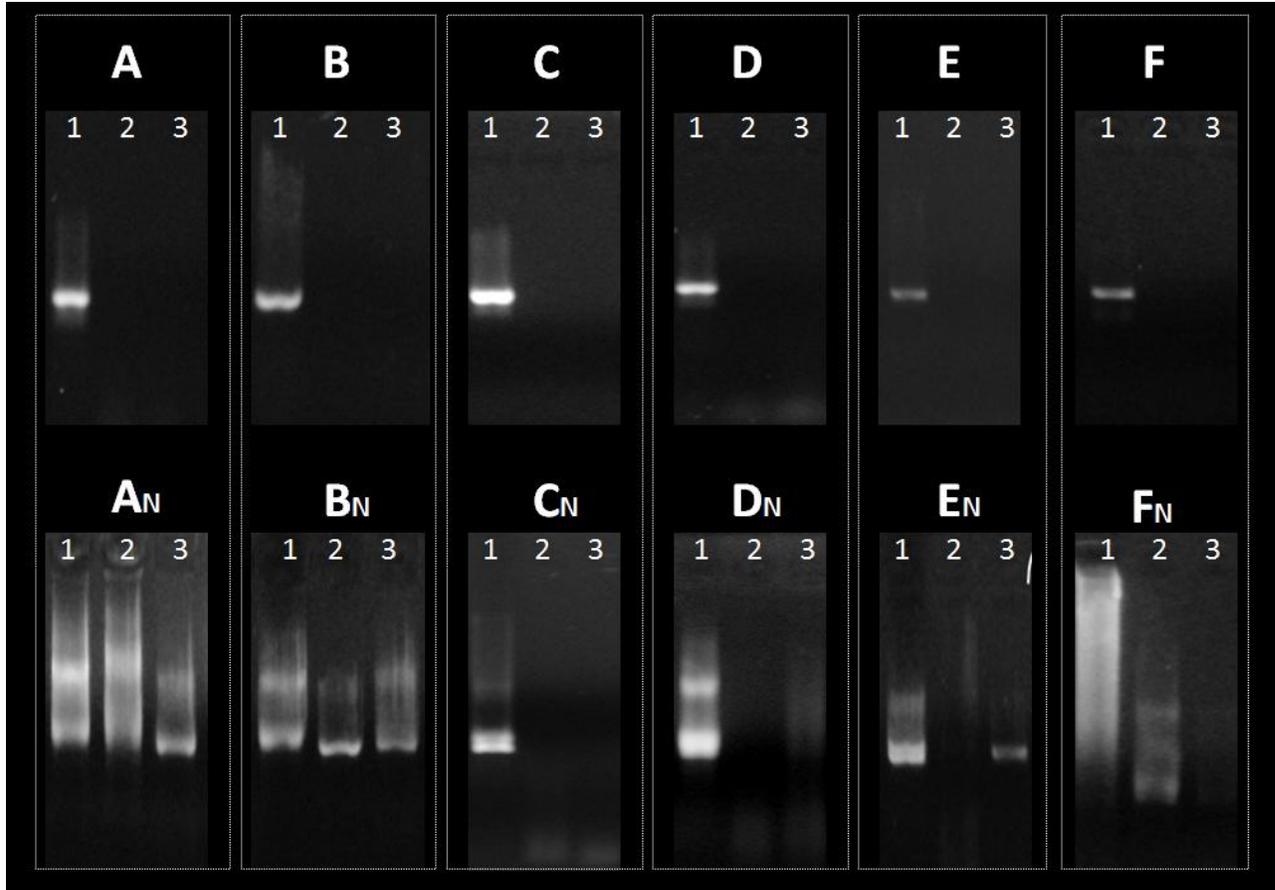
**Figura 27: Tratamento da água do aquário 18 da FZB-BH com carvão ativado.** Produtos das reações de PCR do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial de *P. argenteus* utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação (A-F) e Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested (A<sub>N</sub>-F<sub>N</sub>). As canaletas 1, 2 e 3 representam amostras com 15 ng, 0,015ng e 0,0015ng de DNA respectivamente. A/A<sub>N</sub> PCR controle com água ultrapura e sem tratamento; B/B<sub>N</sub> PCR com água do aquário 18, sem tratamento; C/C<sub>N</sub>, D/D<sub>N</sub> e E/E<sub>N</sub>, PCR com amostras de água do aquário 18 tratadas com carvão ativado; F/F<sub>N</sub> PCR com água do aquário 18 tratada com carvão ativado e adição de BSA (1%) ao mix de PCR.

Na figura 27, pode-se ver que as reações C,D e E não obtiveram melhoras significativas na amplificação de DNA quando comparadas com as reações amplificando somente com 15ng de DNA.



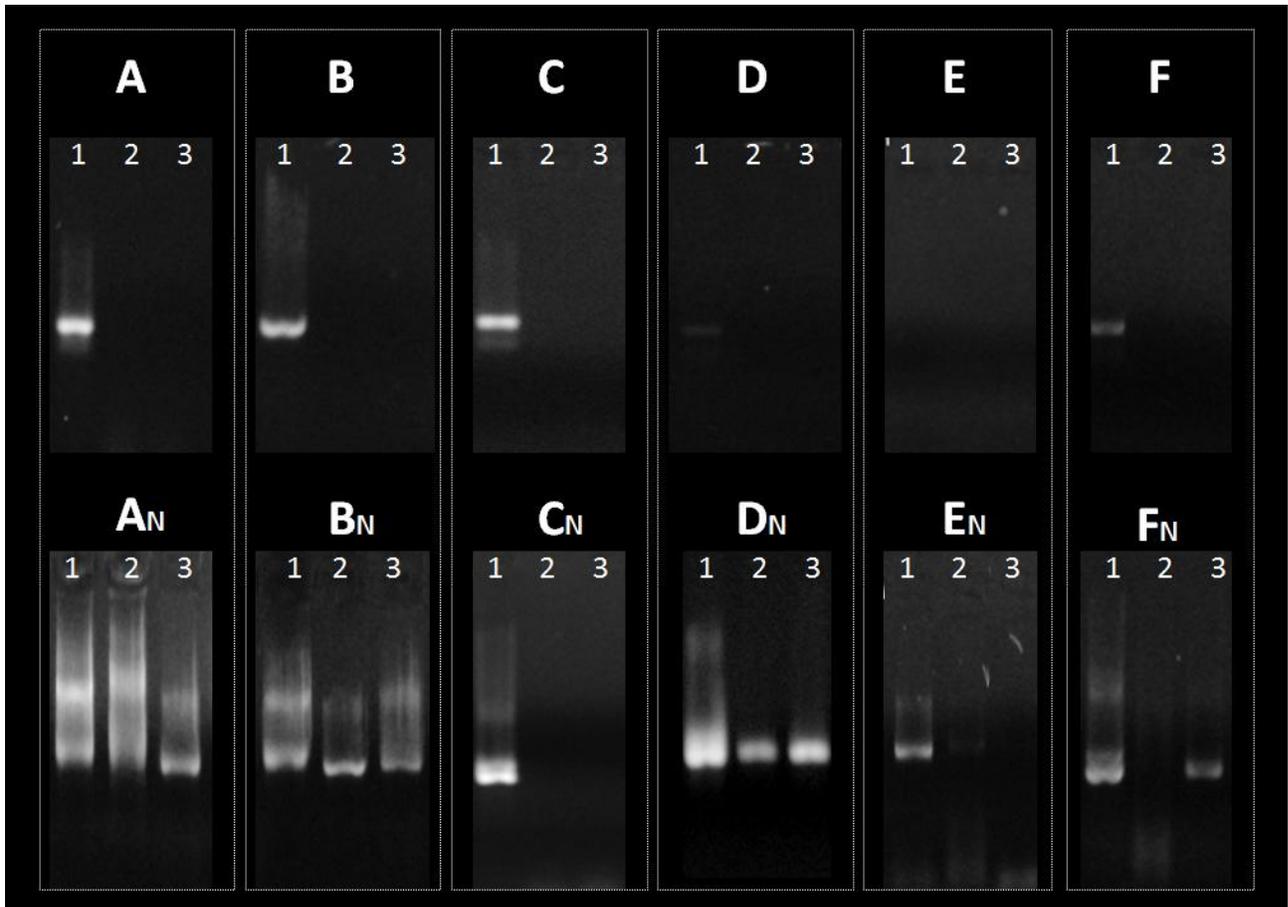
**Figura 28: Tratamento da água do aquário 18 da FZB-BH com Chelex 100.** Produtos das reações de PCR do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial de *P. argenteus* utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação (A-F) e Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested (A<sub>N</sub>-F<sub>N</sub>) usando água do aquário 18 do FZB-BH antes e após tratamento com Chelex 100 e BSA(1%). As canaletas 1, 2 e 3 representam amostras com 15 ng, 0,015ng e 0,0015ng de DNA respectivamente. A/A<sub>N</sub> PCR controle com água ultrapura e sem tratamento; B/B<sub>N</sub> PCR com água do aquário 18, sem tratamento; C/C<sub>N</sub>, D/D<sub>N</sub> e E/E<sub>N</sub>, PCR com amostras de água do aquário 18 tratadas com Chelex 100; F/F<sub>N</sub> PCR com água do aquário 18 tratada com Chelex 100 e adição de BSA (1%) ao mix de PCR.

As figuras 29 e 30 demonstram os resultados das amostras de água do rio Pandeiros que passaram pelos tratamentos com purificadores e facilitador BSA (1%), percebe-se que um dos tratamentos com Chelex 100 obteve resultado melhor do que a água do rio Pandeiros sem tratamento, porém esse resultado não se manteve nas PCRs 1,3 e 4.



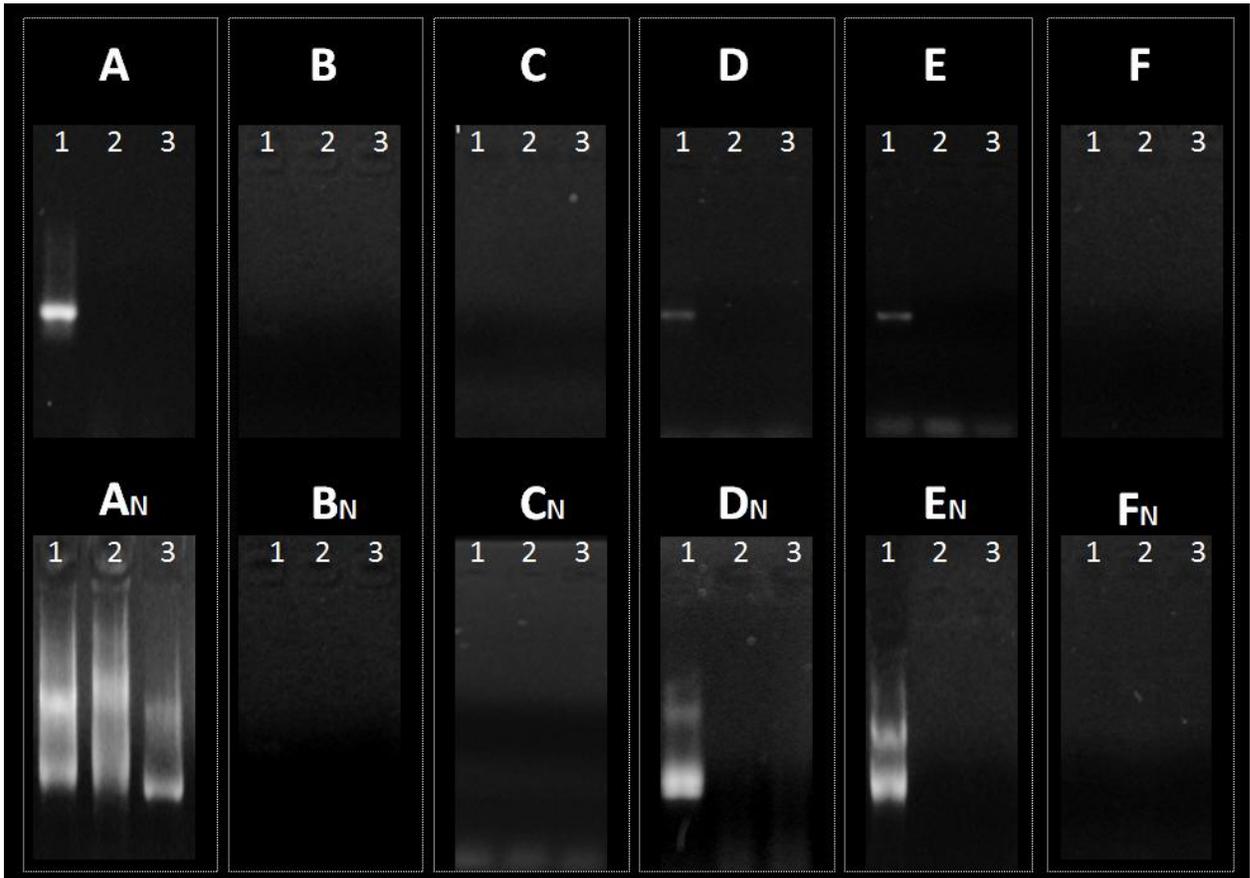
**Figura 29: Água do rio Pandeiros tratada com Carvão ativado.** Produtos das reações de PCR do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial de *P. argenteus* utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação (A-F) e Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested (A<sub>N</sub>-F<sub>N</sub>) usando água do rio Pandeiros antes e após tratamento com Carvão ativado e BSA(1%). As canaletas 1, 2 e 3 representam amostras com 15 ng, 0,015ng e 0,0015ng de DNA respectivamente. A/A<sub>N</sub> PCR controle com água ultrapura e sem tratamento; B/B<sub>N</sub> PCR com água do rio Pandeiros, sem tratamento; C/C<sub>N</sub>, D/D<sub>N</sub> e E/E<sub>N</sub>, PCR

com amostras de água do rio Pandeiros tratadas com carvão ativado; F/F<sub>N</sub> PCR com água do rio Pandeiros tratada com carvão ativado e adição de BSA (1%) ao mix de PCR.



**Figura 30: Água do rio Pandeiros tratada com Chelex 100.** Produtos das reações de PCR do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial de *P. argenteus* utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação (A-F) e Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested (A<sub>N</sub>-F<sub>N</sub>) usando água do rio Pandeiros antes e após tratamento com Chelex 100 e BSA(1%). As canaletas 1, 2 e 3 representam amostras com 15 ng, 0,015ng e 0,0015ng de DNA respectivamente. A/A<sub>N</sub> PCR controle com água ultrapura e sem tratamento; B/B<sub>N</sub> PCR com água do rio Pandeiros, sem tratamento; C/C<sub>N</sub>, D/D<sub>N</sub> e E/E<sub>N</sub>, PCR com amostras de água do rio Pandeiros tratadas com Chelex 100; F/F<sub>N</sub> PCR com água do rio Pandeiros tratada com Chelex 100 e adição de BSA (1%) ao mix de PCR.

As figuras 31 e 32 mostram os resultados das amostras de água da lagoa da Pampulha que passaram pelos tratamentos com purificadores e facilitador BSA(1%), percebe-se houve uma melhora nas bandas no tratamento com carvão ativado (Letras D e E) mas este resultado não se repetiu nas PCRs C e F.



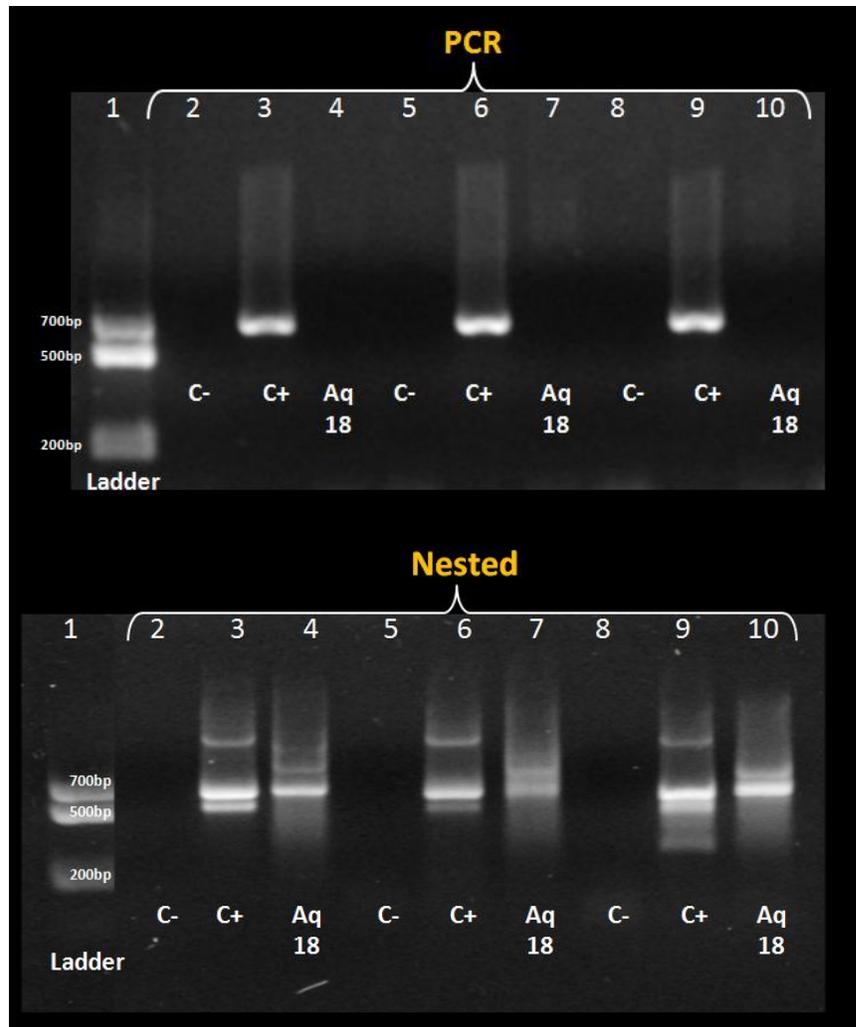
**Figura 31: Água da lagoa da Pampulha tratada com carvão ativado.** Produtos das reações de PCR do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial de *P. argenteus* utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação (A-F) e Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested (A<sub>N</sub>-F<sub>N</sub>) usando água da lagoa da Pampulha antes e após tratamento com carvão ativado e BSA (1%). As canaletas 1, 2 e 3 representam amostras com 15 ng, 0,015 ng e 0,0015 ng de DNA respectivamente. A/A<sub>N</sub> PCR controle com água ultrapura e sem tratamento; B/B<sub>N</sub> PCR com água da lagoa da Pampulha 18, sem tratamento; C/C<sub>N</sub>, D/D<sub>N</sub> e E/E<sub>N</sub>, PCR com amostras de água da lagoa da Pampulha tratadas com carvão ativado; F/F<sub>N</sub> PCR com água da lagoa da Pampulha tratada com carvão ativado e adição de BSA (1%) ao mix de PCR.



**Figura 32: Água da lagoa da Pampulha tratada com Chelex 100.** Produtos das reações de PCR do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial de *P. argenteus* utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação (A-F) e Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested (A<sub>N</sub>-F<sub>N</sub>) usando água da lagoa da Pampulha antes e após tratamento com Chelex 100 e BSA(1%). As canaletas 1, 2 e 3 representam amostras com 15 ng, 0,015ng e 0,0015ng de DNA respectivamente. A/A<sub>N</sub> PCR controle com água ultrapura e sem tratamento; B/B<sub>N</sub> PCR com água da lagoa da Pampulha, sem tratamento; C/C<sub>N</sub>, D/D<sub>N</sub> e E/E<sub>N</sub>, PCR com amostras de água do rio Pandeiros tratadas com Chelex 100; F/F<sub>N</sub> PCR com água da lagoa da Pampulha tratada com Chelex 100 e adição de BSA (1%) ao mix de PCR.

No fim do experimento, foram filtrados 3,375 Litros do aquário 18 do FZB-BH e logo em seguida realizado o PCR do filtro (GF), onde podemos ver na figura 33, as primeiras PCRs

simples não apresentaram bandas do filtro como esperado mas na reação de PCR Nested apareceram bandas fortes nas três reações, o que demonstra ser um resultado confiável.



**Figura 33: Resultado do PCR do filtro GL.** Produtos das reações de 6 PCRs do fragmento da região controle (Dloop) do DNA mitocondrial utilizando os pares de *primers* Pcal 07F e Pcal04R02 na primeira reação de PCR e Pcal14F e Pcal04R02 na reação Nested usando DNA extraído do filtro (GF) do aquário 18 do FZB-BH. Os controles negativos estão representados por “C-“ nas canaletas enumeradas 2, 5 e 8. Os controles positivos com 150ng de DNA estão nas canaletas 3,6 e 9 e o DNA extraído dos filtros (GF) estão representados nas canaletas 4,7 e 10. Houve adição de BSA (1%) ao mix de PCR como recomendado pelo fabricante do Kit de extração. Para marcar as bandas foi utilizado o Ladder 752, representado nos géis pelo número 1. Tamanho de banda esperado: 500bp a 700bp.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho foram muito interessantes, pois conseguiu-se demonstrar que o efeito de inibidores é um fator que deve ser considerado, apesar de existirem kits de extração capazes de reverter a ação dos inibidores, seu custo é muito alto (cerca de 30 reais por extração), sendo importante o estudo mais aprofundado de outras substâncias mais econômicas.

O desempenho dos conjuntos de primers específicos com alta sensibilidade (até 0,00015 ng de DNA) foi satisfatório na PCR primária e Nested PCR. Também seria possível adotar o método de metabarcoding usando *primers* genéricos ou universais (Ward *et al*, 2005; Taberlet *et al*, 2012), mas em condições em que procura-se identificar uma espécie rara ou outras espécies presentes em baixa quantidade estas podem permanecer não detectáveis (Taberlet *et al*, 2007; Jorgensen *et al*. 2012; Murray *et al* 2012). De acordo com Wilcox *et al*, (2013) é de extrema importância o uso de *primers* espécie-específicos em trabalhos envolvendo eDNA para evitar falso-negativos, assim como foi feito em outros trabalhos com as espécies: rã-touro (*Rana catesbeiana*) em lagos na França (Ficetola *et al*, 2008), carpa asiática (*Hypophthalmichthys molitrix*) e a carpa cabeçuda (*H. nobilis*), que foram introduzidas no rio Mississippi na América do Norte (Kolar *et al*, 2007) e a água-viva africana (*Hemichromis letourneuxi*) (Moyer *et al* 2014).

O carvão ativado e o Chelex 100 foram escolhidos por serem purificadores de água conhecidos, porém existem outros que poderão ser testados como PVP, DEEA, fenol clorofórmio, etc. Nossos testes feitos com os purificadores carvão ativado e Chelex 100 não obtiveram resultados reprodutíveis que possam ser prontamente incorporados a protocolos envolvendo eDNA. De fato, Diédhiou *et al*, (2014) demonstraram que há perda de DNA quando usa-se carvão ativado para purificar, embora o DNA purificado com carvão ativado seja mais puro. Nas condições do nosso experimento a quantidade de DNA era muito baixa e portanto, é incompatível com o uso deste purificador. O BSA obteve resultados satisfatórios quando comparado aos resultados sem o BSA. Um resultado curioso foi o aparecimento de uma banda no tratamento da água da Lagoa da Pampulha. Sabe-se que a água da Lagoa da Pampulha é rica em material orgânico (Lamas, 2007) isso inclui os maiores responsáveis por inibir a PCR, os ácidos húmicos e o BSA tem como propriedade a retirada de compostos fenólicos da reação (Al-Soud e Radstrom, 2000), porém, mais testes são necessários.

Obtivemos sucesso em detectar eDNA de *Prochilodus argenteus* através da filtragem com filtros GL, através do kit de extração da QIAamp Stool Mini Kit e da amplificação feita com os *primers* Pcal07F, Pcal04R02 e Pcal14F, Pcal04R02. Os resultados com testes purificadores não demonstraram resultados satisfatórios. Ao conseguirmos detectar DNA no aquário através da filtragem de 3,375 litros de água, provamos que é possível detectar o DNA de peixes mesmo tendo apenas quatro *P. argenteus* adultos em 114.000 litros de água.

De acordo com Turner *et al*, (2014) o DNA se acumula mais nos sedimentos dos rios do que na superfície da água; assim, a maior parte do eDNA da carpa comum se acumula rapidamente no fundo dos tanques, A coleta de água do aquário 18 foi feita sem sedimentos, e mesmo assim, a quantidade de DNA detectado foi satisfatório de acordo com a banda vista no gel na Figura 33. Outro fator importante é o tempo entre coleta e filtragem da água; nossos resultados apontam que DNA está presente na amostra se a água for filtrada em menos de uma hora após a coleta. De acordo com Eichmiller *et al* (2016) coleta da água deve ser feita com utensílios estéreis e a água deve ser filtrada o mais rápido possível para não subestimar a quantidade de eDNA pois a degradação do DNA é dependente da temperatura e como se trata de um ambiente tropical, com temperaturas mais elevadas, a degradação pode ocorrer rapidamente. A quantidade de água filtrada deve ser definida previamente como foi demonstrado no estudo feito por Eichmiller (2015), filtrando primeiramente a amostra de água com maior quantidade visível de matéria orgânica até o entupimento do filtro. A filtragem pode ser feita em campo e estocada em álcool ou gelo (Thomsen *et al*, 2012).

Os resultados indicam que a quantidade de matéria orgânica (polissacarídeos ácidos, ácidos húmicos e fúlvicos) presente em uma solução pode afetar a detecção de eDNA, como analisado por Lamas (2007) a Lagoa da Pampulha apresenta níveis altos de matéria orgânica, porém ainda faltam estudos para entendermos como esses ácidos húmicos presentes na matéria orgânica interagem com o DNA. De acordo com Stotzky, G. (2000) e Saunders *et al*, (2009) o DNA pode se ligar aos ácidos húmicos evitando a sua rápida degradação durando mais tempo em águas com mais matéria orgânica, por exemplo, em lagos distróficos o DNA duraria mais tempo do que em águas eutróficas ou oligotróficas. Para que a reação de PCR não seja prejudicada pela quantidade de ácidos húmicos, existe a possibilidade da retirada dessa matéria orgânica através de kits de extração que contêm resinas que atuam como adsorventes.

## 7 CONCLUSÃO

Com o uso dos *primers* Pcal 07F, Pcal 04R02 e Pcal 14F, Pcal 04R02 é possível detectar até 0,00015 ng de DNA em água ultrapura. A presença de inibidores em águas com grande quantidade de matéria orgânica foi indicada como possível causa da ausência de detecção com menos de 15 ng de DNA no ambiente rico em matéria orgânica. Através desses *primers*, também é possível detectar o eDNA da espécie *Prochilodus argenteus* em um aquário com 110.000 litros de água contendo quatro espécimes adultos. Não foi observado a retirada eficiente de substâncias inibidoras de PCR com o uso do carvão ativado ou do Chelex 100. O uso do BSA (1%) pode ajudar na obtenção de uma banda visível por atuar como alvo dos inibidores principalmente heme e compostos fenólicos. Além disso, o kit *QIAamp Stool mini kit* foi eficiente na retirada de inibidores do meio.

### 7.1 Perspectivas

Diante destes resultados, futuramente espera-se:

- Testar outros purificadores a fim de tornar o valor por reação mais econômico e assim, ser possível o teste de vários rios em diversos pontos de estudo.

- Filtrar água recém coletada do rio Pandeiros, a filtragem deve ser feita preferencialmente em um ambiente desinfetado com hipoclorito 15% para evitar contaminação. A coleta dessa água deve ser feita em utensílios estéreis e a água deve ser filtrada o mais rápido possível até a quantidade padrão definida previamente como foi demonstrado no estudo feito por Eichmiller *et al* (2015, 2016). A filtragem pode ser feita a campo e estocadas em álcool ou gelo (Goldberg, 2011; Thomsen 2012).

- Testar outros métodos de extração para futuras comparações.

- Investigar a relação do DNA com os ácidos húmicos em futuros projetos.

É importante salientar que cada espécie interage com o ambiente de uma forma diferente, portanto os métodos de captura de eDNA e extração de eDNA devem ser testados antes em ambientes controlados e específico para a espécie alvo. Assim, os estudos de eDNA podem se tornar mais eficientes e com menor custo.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFAS

- Akane, A., K. Matsubara, H. Nakamura, S. Takahashi, and K. Kimura. 1994. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *Forensic Sci.* 39:362–372.
- Allan, J. D. & Flecker, A. S. 1993. Biodiversity conservation in running waters: identifying the major factors that threaten destruction of riverine species and ecosystems. *BioScience*, 43(1): 32-43.
- Al-Soud, W.A. and Radstrom, P. (2000) Effect of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces and meat. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 4463–4470.
- Alvarez AJ, Yumet GM, Santiago CL, Toranzos GA (1996) Stability of manipulated plasmid DNA in aquatic environments. *Environ Toxicol Water Qual* 11: 129–135.
- Andersen K, Bird KL, Rasmussen M *et al*, (2012) Meta-barcoding of “dirt” DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology*, 21, 1966–1979.
- Aquadro CF, Greenberg BD (1983). Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103(2): 287-312.
- Avise, J. C. E Nelson, W.S. Molecular Genetic Relationships of the Extinct Dusky Seaside Sparrow, *Science*, v.243, p.646-648, 1988.
- Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, Renshaw MA, Chadderton WL, and Lodge DM. 2014. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science & Technology* 48: 1819-1827.
- Belec, L., Authier, J., Eliezer-Vanerot, M.C., Piedouillet, C., Mohamed, A.S. and Gherardi, R.K. (1998) Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from

- skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase. *Muscle Nerve* 21, 1064–1067
- Bessetti J (2007) An Introduction to PCR Inhibitors. Profiles in DNA. Promega Corporation. [http://www.promega.com/profiles/1001/ProfilesinDNA\\_1001\\_09.pdf](http://www.promega.com/profiles/1001/ProfilesinDNA_1001_09.pdf).
- Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HC. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett Appl Microbiol* 22:153–158.
- Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547 LIT200 Rev B.
- Bohmann, K., Monadjem, A., Lehmkuhl Noer, C., Rasmussen, M., Zeale, M.R.K., Clare, E., Jones, G., Willerslev, E., Gilbert, M.T.P., 2011. Molecular Diet Analysis of Two African Free-Tailed Bats (*Molossidae*) Using High Throughput Sequencing. *PLoS ONE* 6, e21441.
- Bowman, R.A., Cole, C.V., 1978. Transformations of organic phosphorus substrates in soils as evaluated by  $\text{NaHCO}_3$  extraction. *Soil Science* 125, 49–54.
- Brown, W. M., George, M. Jr & Wilson, A. C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 76: 1967-1971.
- Byrnes, J., Downey, K., Esserman, L. and So, A. (1975) Mechanism of hemin inhibition of erythroid Cytoplasmic Dna Polymerase. *Biochemistry*, 14, 796–799.
- Cappio, L. F. (Frei Ofm); Martins, A.; Kirchner, R. (Org.) Rio São Francisco: uma caminhada entre vida e morte. Apresentação Nancy Mangabeira Unger. Petrópolis: Vozes, 1995.
- Carmo AO, Brandão-Dias PFP, Martins APV, Bedore AG e Kalapothakis E (2014) Complete mitochondrial genome sequence of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Mitochondrial DNA* 1736: 1–2.
- Castro & Vari (2003) Family Prochilodontidae. In: Reis RE, Kullander SO & Ferraris Jr. CJ. Check List of the Freshwaters of South and Central America, Porto Alegre, EDIPUCRS, p. 65-70
- Castro, R.M.C., Casatti, L., Santos, H.F., Ferreira, K.M., Ribeiro, A.C., Benine, R.C., Dardis, G.Z.P., Melo, A.L.A., Abreu, T.X., Bockmann, F.A., Carvalho, M., Gibran, F.Z. & Lima, F.C.T. 2003. Estrutura E Composição Da Ictiofauna De Riachos Do Rio Paranapanema, Sudeste E Sul Do Brasil. *Biota Neotrop.* 3(1).
- Ceccherini, M., Pote', J., Kay, E., Van, V.T., Marechal, J., Pietramellara, G., Nannipieri, P., Vogel, T.M., Simonet, P., 2003. Degradation and transformability of DNA from transgenic leaves. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 673–678.
- Chagas *et al* (2015) Description and comparison of two economically important fish species mitogenomes: *Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus* (Characiformes,

- Prochilodontidae) Mitochondrial DNA, Early Online: 1–2. 2015 Universidade Federal De Minas Gerais. DOI: 10.3109/19401736.2015.1053125
- Coombs, N.J.; Gough, A.C.; Primrose, J.N. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res*, v. 27, n. 16, p. e12, 1999.
- Couto, G. M. Utilização da serragem de Eucalyptus sp. na preparação de carvões ativados. Dissertação em Ciência e Tecnologia da Madeira. Universidade Federal de Lavras. 115 p. 2009.
- Crecchio, C., Stotzky, G., 1998. Binding of DNA on humic acids: effect on transformation of *Bacillus subtilis* and resistance to DNase. *Soil Biology & Biochemistry* 30, 1060–1067.
- Dahlenborg, M., Borch, E., and Rådström, P. (2001) Development of a combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium botulinum* types B, E and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughter pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4781–4789.
- Darling JA, Mahon AR (2011) From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research*, 111, 978–988.
- de Vries, J., Wackernagel, W., 2004. Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. *Plant and Soil* 266, 91–104.
- Deagle, B.E., Eveson, J.P., Jarman, S.N., 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples - a case study on DNA in faeces. *Front. Zool.* 3, 11.
- Deiner K, Altermatt F (2014) Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS ONE* 9(2): e88786. doi:10.1371/ journal.pone.0088786.
- Dejean T, Valentini A, Duparc A, Pellier-Cuit S, Pompanon F, *et al*, Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE*. 2011;6:e23398.
- Díaz-Ferguson E, Herod J, Galvez J, Moyer G (2014) Development of molecular markers for eDNA detection of the invasive African jewelfish (*Hemichromis letourneuxi*): a new tool for monitoring aquatic invasive species in National Wildlife Refuges. *Manag Biol Invasion.* 5: 121–131.
- Do, N *et al* (1991) A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from NA. *Plant Biotechnology Center, Baylor University, Waco, TX 76798. BioTechniques* [1991, 0(2):162, 164, 166] Type: Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:726–30.
- Eichmiller JE, Bajer PG, Sorensen PW (2014) The relationship between the distribution of

- common carp and their environmental DNA in a small lake. PLoS ONE, 9, e112611.
- Eichmiller JE, Best SE, Sorensen PW (2016) Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. Environ. Sci. Technol., Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/acs.est.5b05672 • Publication Date (Web): 15 Jan 2016
- Eichmiller, J.E, Miller, L.M., Sorensen, P.W.(2015) Optimizing techniques to capture and 518 extract environmental DNA for detection and quantification of fish. Mol. Ecol. Res, 519 16, 56-68.
- Fang *et al* A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques. 1992 Jul;13(1):52-4, 56.
- Ferreira ME, Grattaglia D (1988) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220 p.
- Ferris, S. D., Brown, W. M., Davidson, W. S. & Wilson, A. C., 1981. Extensive polymorphism in the mitochondrial DNA of apes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., 78: 6319-6323.
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P. 2008 Species detection using environmental DNA from water samples. Biol. Lett. 4, 423–425. (doi:10.1098/rsbl.2008.0118).
- Flecker, A. S., 1996. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. Ecology, 77(6): 1845-1854.
- Frackman, S., Kobs, G., Simpson, D., and Storts, D. (1998) Betaine and DMSO: Enhancing agents for PCR. Promega Notes 27
- Franco de Camargo, S.A. and J.R.M. Petrere. 2001. Social and financial aspects of the artisanal fisheries of Middle São Francisco River, Minas Gerais, Brazil. Fisheries Management and Ecology 1(2): 163–171 (doi: 10.1046/j.1365-2400.2001.00246.x).
- Godinho, A. L. ; Kynard, B. ; Godinho, H. P. . Migration And Spawning Of Female Surubim (*Pseudoplatystoma Corruscans*, Pimelodidae) In The São Francisco river, Brazil. Environmental Biology of Fishes, v. 80, p. 433, 2007.
- Godinho, H. P. & Godinho, A. L. Ecology and conservation of fish in Southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. Acta Limnologica Brasiliensia, 5: 187–197. 1994.
- Godinho, H. P. Estratégias Reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, p. 351-360, 2007.
- Godinho, H.P. 1986. Pesquisas ictiológicas no rio Pandeiros, MG. Relatório técnico, CEMIG. 73p.

- Godoy, M. P. Dez anos de observações sobre periodicidade migratória de peixes no rio MogiGuassu. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 27, n. 1, p. 1-12. 1967.
- 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*). *Freshw. Sci.* 32, 792–800.
- Grant JR, Arantes AS, Stothard P (2012) Comparing thousands of circular genomes using the CGView Comparison Tool. *BMC Genomics* 13: 202.
- Greaves, M.P., Wilson, M.J., 1969. The adsorption of nucleic acids by montmorillonite. *Soil Biology & Biochemistry* 1, 317–323.
- Haile, D.G. Froese, R.D. MacPhee, R.G. Roberts, L.J. Arnold, A.V. Reyes, M. Rasmussen, R. Nielsen, B.W. Brook, S. Robinson. Ancient DNA reveals late survival of mammoth and horse in interior Alaska *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106 (2009), pp. 22352-22357.
- Handelsman J (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 669.
- Hiller, T., Snell, L. and Watson, P.H. Dimethyl Sulfoxide Improves RNA Amplification *BioTechniques* 21:44-47 (July 1996) University of Manitoba Winnipeg, MB, Canada.
- Jane, S.F., Wilcox, T.M., McKelvey, K.S., Young, M.K., Schwartz, M.K., Lowe, W.H., Letcher, B.H., Whiteley, A.R., 2014. Distance flow and PCR inhibition, eDNA dynamics in two headwater streams. *Mol. Ecol. Res.*, 11 <http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12285>.
- Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM (2011) “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv Lett.* 4: 150–157.
- Jerde, C.L., Chadderton, W.L., Mahon, A.R., Renshaw, M.A., Corush, J., Budny, M.L., Mysorekar, S., Lodge, D.M., 2013. Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 70, 522–526.
- Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, Misener L, Rose JB. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:3849–55.
- Jordan, S. P., Zugay, J., Darke, P. L. and Kuo, L. C. (1992) Activity and dimerization of human immunodeficiency virus protease as a function of solvent composition and enzyme concentration. *J. Biol. Chem.* 267, 20,028–20,032.
- Jorgensen T *et al*, 2012 Islands in the ice: detecting past vegetation on Greenlandic nunataks using historical records and sedimentary ancient DNA meta-barcoding. *Mol. Ecol.* 21, 1980–1988. (doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05278.x).
- Khanna, M., Stotzky, G., 1992. Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on

- montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Applied Environmental Microbiology* 58, 1930–1939.
- Kim, T. D. (2000). PCR *primer* design: an inquiry-based introduction to bioinformatics on the World Wide Web. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 28, 274 –276.
- Kolar, C.S., Chapman, D.C, Courtenay, W.R., Housel Jr., C.R., Williams, J.D., and Jennings, D.P. 2007. Bigheaded carps: a biological synopsis and environmental risk assessment. American Fisheries Society Special Publication 33. Bethesda. MD.
- Kreader CA. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1102–1106.
- Lamas, Dissertação De Mestrado Em Modelagem Matemática E Computacional. Análise Digital Da Superfície Da Água, Para Monitoramento De Compostos Orgânicos E Inorgânicos, Utilizando Imagens Do Sensor Ccd/ Cbers. CEFET/UFMG, 2007.
- Lantz P-G, Abu Al-Soud W, Knutsson R, Hahn-Hägerdal B, Rådström P. Biotechnical Use Of The Polymerase Chain Reaction For Microbial Analysis Of Biological Samples. In: El-Gewely M R, Editor. *Biotechnology Annual Review*. Vol. 5. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B. V.; 2000. pp. 87–130.
- Legrouri, K.; Khouya, E.; Ezzine M.; Hannache, H.; Denoyel, R.; Pallier, R.; Naslain R. Production of activated carbon from a new precursor molasses by activation with sulphuric acid. *Journal of Hazardous Materials B* 118 p.259 – 263, Agosto 2005.
- Levy-Booth DJ, Campbell RG, Gulden RH *et al*, (2007) Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 2977–2991.
- Lodge, D.M., N.D. 2012, *Biological Invasions: Recommendations For U.S. Policy And Management*.
- Mahon, A.R., Jerde, C.L., Galaska, M., Bergner, J.L., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., Hunter, M.E., Nico, L.G., 2013. Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. *PLoS One* 8, e58316.
- Matheson *et al*, 2010 C.D. Matheson, C. Gurney, N. Esau, R. Lehto Assessing PCR inhibition from humic substances *Open Enzyme Inhib. J.*, 3 (2010).
- Matsui K, Honjo M, Kawabata Z (2001) Estimation of the fate of dissolved DNA in thermally stratified lake water from the stability of exogenous plasmid DNA. *Aquat Microb Ecol* 26: 95–102.
- Milach, S.C.K. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: UFRGS, 1998a.
- Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Honjo, M.N., Kawabata, Z., 2012. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13, 193–197.

- Miot, Luciane Donida Bartoli *et al*, Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. Sociedade Brasileira de Dermatologia, v. 82, n. 6, p. 529-534, 2007. Available at: <<http://hdl.handle.net/11449/29976>>.
- Murray D, Bunce M, Cannell BL, Oliver R, Houston J, White NE, Barrero RA, Bellgard MI, Haile J. 2011 DNA-based faecal dietary analysis: a comparison of qPCR and high throughput sequencing approaches. *PLoS ONE* 6, e25776. (doi:10.1371/journal.pone.0025776).
- Naiman, R. J. & Latterell, J. J. (2005). Principles For Linking Fish Habitat To Fisheries Management And Conservation. *Journal Of Fish Biology*.
- Nelson, J.S., 1994. *Fishes of the world*. Third edition. John Wiley & Sons, Inc., New York. 600 p.
- Nichols, R.V., Königsson, H., Danell, K., Spong, G., 2012. Browsed twig environmental DNA: diagnostic PCR to identify ungulate species. *Mol. Ecol. Resour.* 12, 983–989.
- Ogram A, Sayler GS, Barkay T (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7, 57–66.
- Panaccio, *et al*, 1987 M. Panaccio, J.R. Zalcborg, C.H. Thompson, M.J. Leyden, J.R. Sullivan, M. Lichtenstein, I.F.C. McKenzie Heterogeneity of the human transferrin receptor and use of anti-transferrin receptor antibodies to detect tumors in vivo *Immunol. Cell Biol.*, 65 (1987), pp. 461–472
- Pandey, R. N.; Adams, R. P.; Flournoy, L. E. Inhibition of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, Athens, v. 14, n. 1, p. 17-22, 1996.
- Persson, J., P. Fink, A. Goto, J. M. Hood, J. Jonas, And S. Kato. 2010. To be or not to be what you eat: Regulation of stoichiometric homeostasis among autotrophs and heterotrophs. *Oikos* 119: 741–751, doi:10.1111/j.1600-0706.2009.18545.x
- Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F *et al*, (2009) Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45, 219–235.
- Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P., Richardson, J., 2013. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 70, 1123–1130.
- PLANASV. Programa para desenvolvimento da pesca e da aquicultura. Brasília: Plano diretos para Desenvolvimento do Vale do São Francisco, 1989.
- Rees, Helen C. and Maddison, Ben C. and Middleditch, David J. and Patmore, James R. and Gough, Kevin C. (2014) The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51 . pp. 1450-

1459. ISSN 0021-8901.

- Revenga, C., Campbell, I., Abell, R., De Villiers, P. & Bryer, M. (2005). Prospects For Monitoring Freshwater Ecosystems Towards The 2010 Targets. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B* 360, 397–413.
- Rodriguez-Reinoso, F.; in: W. Patrick Jr. (Ed.), *Porosity in Carbons: Characterization and Applications*, Londres: Edward Arnold 1995, Cap: 10. Rondon et; al. 2000 edna e microbiologia.
- Rondon MR, August PR, Bettermann AD *et al*, (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2541–2547.
- Rossen, L., P. Nøskov, K. Holmstrøm, and O. F. Rasmussen. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnos.
- Rubinoff D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conservation Biology*. p.4-10, 2006.
- Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, R., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L. F., Jackson, R. B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D., Mooney, H. A., Oesterheld, M., Poff, N. L., Sykes, M. T., Walker, B. H., Walker, M. & Wall, D. H. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287, 1770–1774.
- Sambrook J *et al* (2001) *Molecular Cloning*. 3. ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, Y. & Godinho, H.P. 2004. Migratory fishes of the São Francisco river. In: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C. & Baer, A. *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries, and Conservation Status*. 380 p.
- Sato, Y.; Cardoso, E.L. & Amorim, J.C.C. 1987. Peixes das lagoas marginais do São Francisco a montante da represa de Três Marias (Minas Gerais). Brasília, CODEVASF, 42p.
- Saunders, A. M.; Kristiansen, A.; Lund, M. B.; Revsbech, N. P.; Schramm, A. Detection and persistence of fecal Bacteroidales as water quality indicators in unchlorinated drinking water. *Syst. Appl. Microbiol.* 2009, 32, 362–370.
- Schettino Jr, M. A. Ativação química do carvão de casca de arroz utilizando NaOH. Dissertação em Física. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 79 p. 2004
- Shapiro B (2008) Engineered polymerases amplify the potential of ancient DNA. *Trends Biotechnol* 26: 285–287.
- Sharma KK, Lavanya M, Anjaiah V (2000) A method for isolation and purification of peanut genomic DNA suitable for analytical applications. *Plant Mol Biol Rep* 18:393a–393h.

- Stotzky, G. Persistence and Biological Activity in Soil of Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis* and of Bacterial DNA Bound on Clays and Humic Acids. *J. Env. Qual.* **2000**, *29*, 691–705.
- Sutherland, W. J.; Bardsley, S.; Clout, M.; Depledge, M. H.; Dicks, L. V.; Fellman, L.; Fleishman, E.; Gibbons, D. W.; Keim, B.; Lickorish, F.; Margerison, C.; Monk, K. A.; Norris, K.; Peck, L. S.; Prior, S. V.; Scharlemann, J. P. W.; Spalding, M. D.; Watkinson, A. R. A horizon scan of global conservation issues for 2013. *Trends Ecol. Evol.* 2013, *28*, 16–22.
- Taberlet P *et al*, 2012 Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Mol. Ecol.* *21*, 1816–1820. (doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05317.x).
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermat, T., Corthier, G., Brochmann, C., Willerslev, E., 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res.* *35*, e14.
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Zi (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLOS ONE* *7*: e35868. doi: 10.1371/journal.pone.0035868 PMID: 22563411.
- Tebbe, C. C.; Vahjen, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n.8, p.2657-2665, 1993.
- Teletchea F (2009) Molecular identification methods of fish species: Reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* *19*: 265–293.
- Thomsen PF, Kielgast JOS, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MTP, *et al*, (2012) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol Eco.* *21*: 2565–2573.
- Thomsen PF, Willerslev E (2015) Environmental DNA – an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, *183*, 4–18.
- Thomsen, P. F.; Kielgast, J.; Iversen, L. L.; Møller, P. R.; Rasmussen, M.; Willerslev, E. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One* 2012, *7*, e41732.
- Tobe SS, Linacre A (2010) DNA typing in wildlife crime: Recent developments in species identification. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* *6*: 195–206.
- Valiere, N., and P. Taberlet. 2000. Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Molecular Ecology* *9*:2150-2152.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005 DNA barcoding Australia's fish

- species. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360, 1847–1857. (doi:10.1098/rstb.2005.1716) Willerslev *et al*, 2003, diagnóstico de espécies de vida livre.
- Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, Jane SF, Lowe WH, Whiteley AR, *et al*, (2013) Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. *PLoS ONE* 8(3): e59520. doi:10.1371/journal.pone.0059520
- Willerslev, E., Hansen, A.J., Binladen, J., Brand, T.B., Gilbert, M.T.P., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D.A., Cooper, A., 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* 300, 791–795.
- Wu, J. R., and Yeh, Y. C. (1973) Requirement of a functional gene 32 product of bacteriophage T4 in UV.J. *Viol.* 12, 758–765.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S e Madden TL (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.
- Yoshii T, Tamura K, Taniguchi T, Akiyama K, Ishiyama I. 1993. [Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal]. *Nihon Hoigaku Zasshi* 47: 323-329.
- Zhu B (2006) Degradation of plasmid and plant DNA in water microcosms monitored by natural transformation and real-time polymerase chain reaction (PCR). *Water Res* 40: 3231–3238.



*Prochilodus argenteus*– Primer Pcal 05 (Forward) /Primer Pcal 04 R02 (Reverse)

```

5'      -80      -70      -60      -50      -40      -30      -20      -10
TCCTTAATGC CCAGAAAAGA GAGATTTTAA CTCCCACCAC TAACTCCCAA AGCTAGTATT CTAAACTAAA CTATTTTCTG
      10      20      30      40      50      60      70      80
ACTTATATCT TAGTACATAC AAACCCTAGG TGCATATATA TGTATATAGT ACATAATGAT CTCAGTACAT TACATGTATA
      90      100      110      120      130      140      150      160
TAGTACATTA TGGTATAGTA CATTATATGC TTAATCTTAC ATTAATGGTT TAAAACATAC CATTAAATAAT ACTTAACCCA
      170      180      190      200      210      220      230      240
CTTATCAGTA CTATCAACCA TCAACATTAA ATTAAGGTAC ACATACCCAT AAAATAGTTC CCTACAAATA TATTAGTTATA
      250      260      270      280      290      300      310      320
ACCTGATAAC TTGAATATTC CCTATACCTC CATCACAAAT TTTTCTATGC AGAGATTCAA CTAGAATAGG ACCTCAGTAT
      330      340      350      360      370      380      390      400
ATTAATGTAG TAAGAGACCA CCAACTGGTT TATAACTTAA TGTATAAAGT CCTTGATAGG TCAGGGACAA CTATCGTGGG
      410      420      430      440      450      460      470      480
GGTCGCACAA TATGAACAT TACTGGCATC TGGTTCCTAT TTCAGGGCCA TATTAGGTAA ACCTTCCCCC CCGGATAAC
      490      500      510      520      530      540      550      560
TATATCTGGC ATTTGATTAT TGAAGTGAGT ATCGATTGTC CATGACCCAC CATGCCAAGG CGTTCCTTTT AATGCATAGG
      570      580      590      600      610      620      630      640
GTTCTCTTTT TTTTAGGTCT CTTCACCTTG ACATTTGGTC ACTTTCAGGG TAATAGTTGA CAAGGTAGTA CATTTCCTTG
      650      660      670      680      690      700      710      720
ATATAACCGT CCTAGATGTA ATACTTTTAA GACATTATCG AAATAACCCAC ATACTTTTAT ATCAGGTGCA TACTCTCTCG
      730      740      750      760      770      780      790      800
TTTCACCTTC ATTTGTATCT AAGGTGTCCC CCCCCTCTGC CAAACACCGT TTCTGCTCGA CAAACCCCCC TACCCCCCTA
      810      820      830      840      850      860      870      880
CGCCGGACAA CTCATGTTTA ATCCTGTCAA ACCCCAAAAC CAGGCAAGAC TCGACCAGCG TACTTCAACG AGTGGCTTTA
      890      900      910      920      930      940      950      960
TGTGTTGATA TATAGTAATG CATATATAAC ACTATCATTT TATATAACTG TTAGTTATGT TAGGACAAAC ATACCCATAT
      970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
TTAACATGTT CGACCCGGCT TTATTTAACA AACACGCTAT AATACTAACA AAGATATACT GCACATTATA TAGTGTGTGA 3'

```

Anexo 2: Região do DNA mitocondrial onde está localizado o *primer Pcal 05 F* específico para a espécie *Prochilodus argenteus*. A sequência em negrito indica a região controle (Dloop) do DNA mitocondrial. A região destacada em azul se refere ao *primer reverse Pcal 04R1* e em amarelo representa o *primer Pcal 05 F*.

*Prochilodus costatus* - Primer Pcal 06F/ /Primer Pcal 04 R02 (Reverse)

```

5'      -80      -70      -60      -50      -40      -30      -20      -10
TCCTTAATGC CCAGAAAAGA GAGATTTTAA CTCCCACCAC TAACTCCCAA AGCTAGTATT CTAAACTAAA CTATTTTCTG
      10      20      30      40      50      60      70      80
ACTTATATTT CAGTACATAC AAATTCTAGG TGCATATATA TGTATATAGT ACATAATGGT CTTAGTACAT TATATGTATA
      90      100      110      120      130      140      150      160
TAGTACATTA TGGTATAGTA CATTATATGC TTAATCTTAC ATTAATGGTT TAAAACATAT CATTAAATAA CACTTAACTC
      170      180      190      200      210      220      230      240
ATTTACCAGT ACTACCAACC ATCAACATCA AACTAAAACA TACATACCCA TAAAAGTTC TCCTACAAAT AAATTAGTTT
      250      260      270      280      290      300      310      320
AACCTGATAA CTTGAATATT CCCTATACCT CCATCACAAA TTTTCTATGC CAGGGACTCA ACTAAAATAG GACCTCAGTA
      330      340      350      360      370      380      390      400
TATTAATGTA GTAAGAGACC ACCAAGTGGT TTATAACTTA ATGTATACGG TCCTTGATAG GTCAGGGACA ACTATCGTGG
      410      420      430      440      450      460      470      480
GGGTCGCACA ATATGAACTA TTAGTGGCAT CTGGTTCCTA TTTTCAGGGC ATATTAGGTA AACCTTCCCC CCCCAGATAA
      490      500      510      520      530      540      550      560
CTATATCTGG CATTGATTA TTGAAGTGAG TATCGATTGT CCATGACCCA CCATGCCAAG GCGTTCCTTT AAATGCATAG
      570      580      590      600      610      620      630      640
GGTTCCTTTT TTTTAGGTCT TCTTCCACTT GACATTTGGT CACTTTCAGA GTAATAGTTA ATAAGGTAGT ACATTTCTCT
      650      660      670      680      690      700      710      720
GATATAAATA TTCTAGATGT AATACTTTAA AGACATTATT TAAATAACCA CATACTTCTA TATCAGGTGC ATACACTCTC
      730      740      750      760      770      780      790      800
ATTTTACCCT CATTATATAT TAAGGTGTCC CCCCCTCTGC CAAACACCG TTTCTGCTCG ACAAACCCCC CTACCCCCCT

```

```

Pcal 04R1 810      820      830      840      850      860      870      880
ACGCCGGACA ATTCATGTTT AATCCTGTCA AACCCCAAAA CCAGGCAAGA CTCGACCAGC GTACTTCAAC GAGTGGCTTT
890      900      910      920      930      940      950      960
ATGTGTTGAT ATATAGTAAT GCATGTATAA TACTAACATT TTATATAACT ATTAGTCATG TTAGGACAAA CATACCTATA
970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
TTTAATATAT TCGACCCGGC TTTATCTAAC AAAACAGCTA TAATATTAAC AAAGATATAC TGCACATTAT ATAGTTGTGT 3'

```

**Anexo 3: Região do DNA mitocondrial onde está localizado o *primer* Pcal 06F (região destacada em amarelo) específico para a espécie *Prochilodus costatus*. A sequência em negrito indica a região controle (Dloop) do DNA mitocondrial. A região destacada em azul se refere ao *primer* Pcal 04R02.**

*Prochilodus argenteus* – *Primer* Pcal 07 (Forward) / *Primer* Pcal 04 R02 (Reverse)

```

5'      -80      -70      -60      -50      -40      -30      -20      -10
TCCTTAATGC CCAGAAAAGA GAGATTTTAA CTCCCACCAC TAACTCCCAA AGCTAGTATT CTAACATAAA CTATTTTCTG
10      20      30      40      50      60      70      80
ACTTATATCT TAGTACATAC AAACCCTAGG TGCAATATAA TGTATATAGT ACATAATGAT CTCAGTACAT TACATGTATA
90      100      110      120      130      140      150      160
TAGTACATTA TGGTATAGTA CATTATATGC TTAATCTTAC ATTAATGGTT TAAAACATAC CATTAAATAAT ACTTAACCCA
170      180      190      200      210      220      230      240
CTTATCAGTA CTATCAACCA TCAACATTAA ATTAAGGTAC ACATACCCAT AAAATTAGTT CCTACAAATA TATTAGTTTA
250      260      270      280      290      300      310      320
ACCTGATAAC TTGAATATTC CCTATACCTC CATCACAAAT TTTTCTATGC AGAGATTCAA CTAGAATAGG ACCTCAGTAT
330      340      350      360      370      380      390      400
ATTAATGTAG TAAGAGACCA CCAACTGGTT TATAACTTAA TGTATAAAGT CCTTGATAGG TCAGGGACAA CTATCGTGGG
410      420      430      440      450      460      470      480
GGTCGCACAA TATGAACTAT TACTGGCATC TGTTTCCTAT TTCAGGGCCA TATTAGGTAA ACCTTCCCCC CCCGGATAAC
490      500      510      520      530      540      550      560
TATATCTGGC ATTTGATTAT TGAAGTGAGT ATCGATTGTC CATGACCCAC CATGCCAAGG CGTTCTTTTA AATGCATAGG
570      580      590      600      610      620      630      640
GTTCTCTTTT TTTTAGGTCT CTTCCACTTG ACATTTGGTC ACTTTCAGGG TAATAGTTGA CAAGGTAGTA CATTTCCCTG
650      660      670      680      690      700      710      720
ATATAACGT CCTAGATGTA ATACTTTAAA GACATTATCG AAATAACCAC ATACTTTTAT ATCAGGTGCA TACTCTCTG
730      740      750      760      770      780      790      800
TTTACCTTC ATTTGTATCT AAGGTGTC CCCCCTGTC CAAACACCGT TTCTGCTCGA CAAACCCCCC TACCCCCCTA
Pcal 04R2 810      820      830      840      850      860      870      880
CGCCGGACAA CTCATGTTTA ATCCTGTCAA ACCCCAAAAC CAGGCAAGAC TCGACCAGCG TACTTCAACG AGTGGCTTTA
890      900      910      920      930      940      950      960
TGTGTTGATA TATAGTAATG CATATATAAC ACTATCATTT TATATAACTG TTAGTTATGT TAGGACAAAC ATACCCATAT
970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
TTAACATGTT CGACCCGGCT TTATTTAACA AACAGCTAT AATACTAACA AAGATATACT GCACATTATA TAGTTGTGTA 3'

```

**Anexo 4: Região do DNA mitocondrial onde está localizado o *primer* Pcal 07F (*forward*) (região destacada em amarelo) específico para a espécie *Prochilodus argenteus*. A sequência em negrito indica a região controle (D-loop) do DNA mitocondrial. A região destacada em azul se refere ao *primer reverse* Pcal 04R2.**

*Prochilodus costatus* - Primer Pcal 08 (Forward) /Primer Pcal 04 R02 (Reverse)

5' -80 -70 -60 -50 -40 -30 -20 -10  
 TCCTTAATGC CCAGAAAAGA GAGATTTTAA CTCCCACCAC TAACTCCCAA AGCTAGTATT CTAACATAAA CTATTTTCTG  
 10 20 30 40 50 60 70 80  
 ACTTATATTT CAGTACATAC AAATTCTAGG TGCATATATA TGTATATAGT ACATAATGGT CTTAGTACAT TATATGTATA  
 90 100 110 120 130 140 150 160  
 TAGTACATTA TGGTATAGTA CATTATATGC TTAATCTTAC ATTAATGGTT TAAAACATAT CATTAAATTA CACCTAACCT  
 170 180 190 200 210 220 230 240  
 ATTTACCAGT ACTACCAACC ATCAACATCA **AACATAACA TACATACCCA TAAAACATAGT TCCTACAAAT AAATTAGTTT**  
 250 260 270 280 290 300 310 320  
**AACCTGATAA CTTGAATATT CCCTATACCT CCATCACAAA TTTTCTATG CAGGGACTCA ACTAAAATAG GACCTCAGTA**  
 330 340 350 360 370 380 390 400  
**TATTAATGTA GTAAGAGACC ACCAACTGGT TTATAACTTA ATGTATACGG TCCTTGATAG GTCAGGGACA ACTATCGTGG**  
 410 420 430 440 450 460 470 480  
**GGGTCGCACA ATATGAACATA TTACTGGCAT CTGGTTCCTA TTTTCAGGGCC ATATTAGGTA AACCTTCCCC CCCCGGATAA**  
 490 500 510 520 530 540 550 560  
**CTATATCTGG CATTGATTA TTGAAGTGAG TATCGATTGT CCATGACCCA CCATGCCAAG GCGTCTTTTT AAATGCATAG**  
 570 580 590 600 610 620 630 640  
**GGTTCCTTT TTTTAGGTC TCTCCACTT GACATTTGGT CACTTTCAGA GTAATAGTTA ATAGGTTAGT ACATTTCCCTT**  
 650 660 670 680 690 700 710 720  
**GATATAAATA TTCTAGATGT AATACTTTAA AGACATTATT TAAATAACCA CATACTTCTA TATCAGGTGC ATACACTCTC**  
 730 740 750 760 770 780 790 800  
**ATTTTACCCT CATTATATC TAAGGTGTCC CCCCCTCTG CCAAACACCG TTTCTGCTCG ACAACCCCC CTACCCCCCT**  
**Pcal04R02** 810 820 830 840 850 860 870 880  
**ACGCCGGACA ATTCATGTTT AATCCTGTCA AACCCAAAA CCAGGCAAGA CTCGACCAGC GTACTTCAAC GAGTGGCTTT**  
 890 900 910 920 930 940 950 960  
**ATGTGTGAT ATATAGTAAT GCATGTATAA TACTAACATT TTATATAACT ATTAGTCATG TTAGGACAAA CATACTCTC**  
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040  
**TTTATATAT TCGACCCGGC TTTATCTAAC AAAACAGCTA TAATATTAAC AAAGATATAC TGCACATTAT ATAGTTGTGT** 3'

Anexo 5: Região do DNA mitocondrial onde está localizado o *primer Pcal08F* (região destacada em amarelo) específico para *Prochilodus costatus*. A sequência em negrito indica a região controle (Dloop) do DNA mitocondrial. A região destacada em azul se refere ao *primer Pcal 04R02*.

*Prochilodus argenteus* – Primer Pcal 09F (Forward)/ Primer Pcal 04 R02 (Reverse)

5' -80 -70 -60 -50 -40 -30 -20 -10  
 TCCTTAATGC CCAGAAAAGA GAGATTTTAA CTCCCACCAC TAACTCCCAA AGCTAGTATT CTAACATAAA CTATTTTCTG  
 10 20 30 40 50 60 70 80  
 ACTTATATCT **TAGTACATAC AAACCC**TAGG TGCATATATA TGTATATAGT ACATAATGAT CTCAGTACAT TACATGTATA  
 90 100 110 120 130 140 150 160  
 TAGTACATTA TGGTATAGTA CATTATATGC TTAATCTTAC ATTAATGGTT TAAAACATAC CATTAAATTA ACTTAACCCA  
 170 180 190 200 210 220 230 240  
 CTTATCAGTA CTATCAACCA TCAACATTAA ATTAAGGTAC ACATACCCAT AAAATTAGTT CCTACAAATA TATTAGTTTA  
 250 260 270 280 290 300 310 320  
 ACCTGATAAC TTGAATATTC CCTATACCTC CATCACAAAT TTTTCTATGC AGAGATTCAA CTAGAATAGG ACCTCAGTAT  
 330 340 350 360 370 380 390 400  
 ATTAATGTAG TAAGAGACCA CCAACTGGTT TATAACTTAA TGTATAAAGT CCTTGATAGG TCAGGGACAA CTATCGTGGG  
 410 420 430 440 450 460 470 480  
 GGTCGCACAA TATGAACAT TACTGGCATC TGGTTCCTAT TTCAGGGCCA TATTAGGTAA ACCTTCCCC CCCGATAAC  
 490 500 510 520 530 540 550 560  
 TATATCTGGC ATTTGATTAT TGAAGTGAGT ATCGATTGTC CATGACCCAC CATGCCAAGG CGTCTTTTTA AATGCATAGG  
 570 580 590 600 610 620 630 640  
 GTTCTCTTTT TTTTAGGTCCT CTCCACTTG ACATTTGGTC ACTTTCAGGG TAATAGTTGA CAAGGTAGTA CATTTCCTTG  
 650 660 670 680 690 700 710 720  
 ATATAACGT CCTAGATGTA AACTTTTAA GACATTATCG AAATAACCC ATACTTTTAT ATCAGGTGCA TACACTCTCG  
 730 740 750 760 770 780 790 800  
 TTTACCTTC ATTTGTATCT AAGGTGTCCC CCCCCTCTGC CAAACACCGT TTTCTGCTCGA CAAACCCCC TACCCCCCTA

```

      810      Pcal04R02      820      830      840      850      860      870      880
CGCCGGACAA CTCATGTTTA ATCCTGTCAA ACCCCAAAAC CAGGCAAGAC TCGACCAGCG TACTTCAACG AGTGGCTTTA
      890      900      910      920      930      940      950      960
TGTGTTGATA TATAGTAATG CATATATAAC ACTATCATTT TATATAACTG TTAGTTATGT TAGGACAAAC ATACCCATAT
      970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
TTAACATGTT CGACCCGGCT TTATTTAACA AAACAGCTAT AATACTAACA AAGATATACT GCACATATA TAGTTGTGTA 3'

```

Anexo 6: Região do DNA mitocondrial onde está localizado o *primer* Pcal 09F (região destacada em amarelo) específico para *Prochilodus argenteus*. A sequência em negrito indica a região controle (Dloop) do DNA mitocondrial. A região destacada em azul se refere ao *primer* reverse Pcal 04R2.

*Prochilodus costatus* - Primer Pcal 10 (Forward) /Primer Pcal 04 R02 (Reverse)

```

5'      -80      -70      -60      -50      -40      -30      -20      -10
TCCTTAATGC CCAGAAAAGA GAGATTTTAA CTCCCACCAC TAACTCCCAA AGCTAGTATT CTAAACTAAA CTATTTTCTG
      10      Pcal 10F      20      30      40      50      60      70      80
ACTTATATTT CAGTACATAC AAATTCTAGG TGCATATATA TGTATATAGT ACATAATGGT CTTAGTACAT TATATGTATA
      90      100      110      120      130      140      150      160
TAGTACATTA TGGTATAGTA CATTATATGC TTAATCTTAC ATTAATGGTT TAAAACATAT CATTAAATTAA CACTTAACTC
      170      180      190      200      210      220      230      240
ATTTACCAGT ACTACCAACC ATCAACATCA AACTAAAACA TACATACCCA TAAAACTAGT TCCTACAAAT AAATTAGTTT
      250      260      270      280      290      300      310      320
AACTGATAA CTTGAATATT CCCTATACCT CCATCACAAA TTTTTCTATG CAGGGACTCA ACTAAAATAG GACCTCAGTA
      330      340      350      360      370      380      390      400
TATTAATGTA GTAAGAGACC ACCAACTGGT TTATAACTTA ATGTATACGG TCCTTGATAG GTCAGGGACA ACTATCGTGG
      410      420      430      440      450      460      470      480
GGGTGCACA ATATGAACTA TTACTGGCAT CTGGTTCCTA TTTCAGGGCC ATATTAGGTA AACCTTCCCC CCCCGGATAA
      490      500      510      520      530      540      550      560
CTATATCTGG CATTTGATTA TTGAAGTGAG TATCGATTGT CCATGACCCA CCATGCCAAG GCGTCTCTTT AAATGCATAG
      570      580      590      600      610      620      630      640
GGTCTCTTT TTTTTAGGTC TCTTCCACTT GACATTTGGT CACTTTCAGA GTAATAGTTA ATAAGGTAGT ACATTTCCCTT
      650      660      670      680      690      700      710      720
GATATAAATA TTCTAGATGT AATACTTTAA AGACATTATT TAAATAACCA CATACTTCTA TATCAGGTGC ATACACTCTC
      730      740      750      760      770      780      790      800
ATTTTACCCT CATTTATATC TAAGGTGTCC CCCCCGTCTG CCAACACCCG TTTCTGCTCG ACAAACCCCC CTACCCCCCT
      810      Pcal 04R2      820      830      840      850      860      870      880
ACGCCGGACA ATTCATGTTT AATCCTGTCA AACCCAAAAC CCAGGCAAGA CTCGACCAGC GTACTTCAAC GAGTGGCTTT
      890      900      910      920      930      940      950      960
ATGTGTTGAT ATATAGTAAT GCATGTATAA TACTAACATT TTATATAACT ATTAGTCATG TTAGGACAAA CATACCTATA
      970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
TTTAAATATAT TCGACCCGGC TTTATCTAAC AAAACAGCTA TAATATTAAC AAAGATATAC TGCACATTAT ATAGTTGTGT A 3'

```

Anexo 7: Região do DNA mitocondrial onde está localizado o *primer* Pcal 10F (região destacada em amarelo) específico para *Prochilodus costatus*. A sequência em negrito indica a região controle (Dloop) do DNA mitocondrial. A região destacada em azul se refere ao *primer* reverse Pcal04R02.

*Prochilodus costatus* Primer Pcal 12 (Forward) /Primer Pcal 04 R02 (Reverse)

```

5'          -80          -70          -60          -50          -40          -30          -20          -10
TCCTTAATGC CCAGAAAAGA GAGATTTTAA CTCCCACCAC TAACTCCCAA AGCTAGTATT CTAAACTAAA CTATTTTCTG
          10          20          30          40          50          60          70          80
ACTTATATTT CAGTACATAC AAATTCTAGG TGCATATATA TGTATATAGT ACATAATGGT CTTAGTACAT TATATGTATA
          90          100          110          120          130          140          150          160
TAGTACATTA TGGTATAGTA CATTATATGC TTAATCTTAC ATTAATGGTT TAAAACATAT CATTAATTAA CACTTAACTC
Pcal 12F 170          180          190          200          210          220          230          240
ATTTACCAGT ACTACCAACC ATCAACATCA AACTAAAACA TACATACCCA TAAAACATAG TCCTACAAAT AAATTAGTTT
          250          260          270          280          290          300          310          320
AACCTGATAA CTTGAATATT CCCTATACCT CCATCACAAA TTTTCTTATG CAGGGACTCA ACTAAAATAG GACCTCAGTA
          330          340          350          360          370          380          390          400
TATTAATGTA GTAAGAGACC ACCAACTGGT TTATAACTTA ATGTATACGG TCCTTGATAG GTCAGGGACA ACTATCGTGG
          410          420          430          440          450          460          470          480
GGGTCGCACA ATATGAAC TA TACTGGCAT CTGGTTCCTA TTTCAGGGCC ATATTAGGTA AACCTTCCCC CCCC GGATAA
          490          500          510          520          530          540          550          560
CTATACTGCG CATTGATTA TTGAAGTGAG TATCGATTGT CCATGACCCA CCATGCCAAG GCGTCTTTTT AAATGCATAG
          570          580          590          600          610          620          630          640
GGTTCCTTTT TTTT TAGGTC TCTTCCACTT GACATTTGGT CACTTTCAGA GTAATAGTTA ATAAGGTAGT ACATTTCCCTT
          650          660          670          680          690          700          710          720
GATATAAATA TTCTAGATGT AATACTTTAA AGACATTATT TAAATAACCA CATACTTCTA TATCAGGTGC ATACACTCTC
          730          740          750          760          770          780          790          800
ATTTTACCCT CATTATATC TAAGGTGTCC CCCCCTCTG CCAAACACCG TTTCTGCTCG ACAAACCCC CTACCCCCCT
Pcal 04R2 810          820          830          840          850          860          870          880
ACGCCGGACA ATTCATGTTT AATCCTGTCA AACCCCAAAA CCAGGCAAGA CTCGACCAGC GACTTCAAC GAGTGGCTTT
          890          900          910          920          930          940          950          960
ATGTGTTGAT ATATAGTAAT GCATGTATAA TACTAACATT TTATATAACT ATTAGTCATG TTAGGACAAA CATACTATA
          970          980          990          1000          1010          1020          1030          1040
TTTAATATAT TCGACCCGGC TTTATCTAAC AAAACAGCTA TAATATTAAC AAAGATATAC TGACATTAT ATAGTTGTGT 3'

```

Anexo 8: Região do DNA mitocondrial onde está localizado o *primer* Pcal 12F (região destacada em amarelo) específico para *Prochilodus costatus*. A sequência em negrito indica a região controle (Dloop) do DNA mitocondrial. A região destacada em azul se refere ao *primer* reverse Pcal 04R02.

*Prochilodus lineatus* - Primer Pcal 13 (Forward) /Primer Pcal 04 R02 (Reverse)

```

5'
TCCTTAATGC -80 -70 GAGATTTTAA -60 -50 TAACTCCCAA -40 -30 CTAAACTAAA -20 CTATTTTCTG
ACTTATATTT CAGTACATGC AAATTCTAGG TGCATATATA TGTATATAGT ACATAATGAT CCTAGTACAT TACATGTATA
TAGTACATTA TGGTATAGTA CATTATATGC TTAATCTTAC ATTAATGGTT TAAAACATAT CATTGATTAA TACTTAACCC
Pcal 13 170 180 190 200 210 220 230 240
ACTCATCAGT ACTATCAACC ATCAACATTA AACTAAAACA CACATACCCA TAAAATTAGC TCCTACAAAT AAATTAGTTT
GACCTGATAA CTTGAATATC CCCCATACCT CCATCACAGA TTTTCTATG CAAAGATCCA ACTAAATAG GACCTCAGTA
TATTAATGTA GTAAGAGACC ACCAACTGAT TTATAACTTA ATGCATACGG TCCTTGATAG GTCAGGGACA ACTATTGTGG
GGTTCGCACA ATATGAACTA TTACTGGCAT CTGGTTCCTA TTTCAGGGCC ATATTAGGTA AACTTTCCCC CCCCGGATAA
CTATATCTGG CATTGATTA TTGAAGTGAG TATCGATTGT CCATGACCCA CCATGCCAAG GCGTTCCTTT AAATGCATAG
GGTTCCTTT TTTTAGTCT CTCCATTG ACATTGGTCA CTTTCAGAGT AATAGCTAAC AAGGTGGTAC ATTCCTTGA
ATATAAATAT TTTAAATGTA ATACTTTAAG GACATTATTT AAATAACCAC ATACTTTTAT ATCAGGTGCA TACACTCTCA
TTTACCTTC ATTTATATCT AAGGTGTCCC CCCCGTCTAG CCAAACACCG TTTCTGCTCG ACAAACCCCT CTACCCCTT
Pcal 04R02 810 820
ACGCCGGACA ATTCATGTTT AATCCTGTCA AACCCCAAAA CCAGGCAAGA CTCGACCAGC GTACTTCAAC GAGTGGCTTT
ATGTGTTGAT ATATAGTAAT GCATATATAA TACTAACATT TTATATAACT ATTAGTCATG TTAGGACAAA CATACTATA
TTAATATAT TCGACCGGC CTTACCTAAC AAAACAGCTA TAATGTTAAC AAAGATATAC TGCACATTAT ATAGTTGTGT 3'

```

Anexo 9: Região do DNA mitocondrial onde está localizado o *primer* Pcal 13F (região destacada em amarelo) específico para *Prochilodus lineatus*. A sequência em negrito indica a região controle (Dloop) do DNA mitocondrial. A região destacada em azul se refere ao *primer* reverse Pcal 04R02.

*Prochilodus costatus* - Primer Pcal 14 (Forward) /Primer Pcal 04 R02 (Reverse)

```

5'          -80          -70          -60          -50          -40          -30          -20          -10
TCCTTAATGC CCAGAAAAGA GAGATTTTAA CTCCCACCAC TAACTCCCAA AGCTAGTATT CTAAACTAAA CTATTTTCTG
          10          20          30          40          50          60          70          80
ACTTATATTT CAGTACATAC AAATTCTAGG TGCAATATATA TGTATATAGT ACATAATGGT CTTAGTACAT TATATGTATA
          90          100          110          120          130          140          150          160
TAGTACATTA TGGTATAGTA CATTATATGC TTAATCTTAC ATTAATGGTT TAAAACATAT CATTAAATTA CACTTAACCT
          170          180          190          200          210          220          230          240
ATTTACCAGT ACTACCAACC ATCAACATCA AACTAAAACA TACATACCCA TAAAACATAG TCCTACAAAT AAATTAGTTT
          250          260          270          280          290          300          310          320
AACCTGATAA CTTGAATATT CCCTATACCT CCATCACAAA TTTTCTATG CAGGGACTCA ACTAAAATAG GACCTCAGTA
          330          340          350          360          370          380          390          400
TATTAATGTA GTAAGAGACC ACCAACTGGT TTATAACTTA ATGTATACGG TCCTTGATAG GTCAGGGACA ACTATCGTGG
          410          420          430          440          450          460          470          480
GGGTGCACA ATATGAACCT TTAGTGGCAT CTGGTTCCTA TTTTCAGGGCC ATATTAGGTA AACCTTCCCC CCCCGGATAA
          490          500          510          520          530          540          550          560
CTATATCTGG CATTGATTA TTGAAGTGAG TATCGATTGT CCATGACCCA CCATGCCAAG CGGTCTCTTT AAATGCATAG
          570          580          590          600          610          620          630          640
GGTTCCTTT TTTTAGGTC TCTTCCACTT GACATTTGGT CACTTTCAGA GTAATAGTTA ATAAGGTAGT ACATTTCCCT
          650          660          670          680          690          700          710          720
GATATAAATA TTCTAGATGT AATACTTTAA AGACATTATT TAAATAACCA CATACTTCTA TATCAGGTGC ATACACTCTC
          730          740          750          760          770          780          790          800
ATTTTACCCT CATTATATC TAAGGTGTC CCCCGTCTG CCAACACCG TTTCTGCTCG ACAAACCCCC CTACCCCCCT
          810          820          830          840          850          860          870          880
Pcal 04R02 ACGCCGGACA ATTCATGTTT AATCCTGTCA AACCCAAA CCAGGCAAGA CTCGACCAGC GTACTTCAAC GAGTGGCTTT
          890          900          910          920          930          940          950          960
ATGTGTTGAT ATATAGTAAT GCATGTATAA TACTAACATT TTATATAACT ATTAGTCATG TTAGGACAAA CATACTATA
          970          980          990          1000          1010          1020          1030          1040
TTTAATATAT TCGACCCGGC TTTATCTAAC AAAACAGCTA TAATATTAAC AAAGATATAC TGCACATTAT ATAGTTGTGT 3'

```

Anexo 10: Região do DNA mitocondrial onde está localizado o *primer Pcal 14F* (região destacada em amarelo) específico para *Prochilodus costatus*. A sequência em negrito indica a região controle (D-loop) do DNA mitocondrial. A região destacada em azul se refere ao *primer reverse Pcal 04R02*.

*Prochilodus lineatus* - Primer Pcal 15 (Forward) /Primer Pcal 04 R02 (Reverse)

```

5'          -80          -70          -60          -50          -40          -30          -20          -10
TCCTTAATGC CCAGAAAAGA GAGATTTTAA CTCCCACCAC TAACTCCCAA AGCTAGTATT CTAAACTAAA CTATTTTCTG
          10          20          30          40          50          60          70          80
ACTTATATTT CAGTACATGC AAATTCTAGG TGCAATATATA TGTATATAGT ACATAATGAT CCTAGTACAT TACATGTATA
          90          100          110          120          130          140          150          160
TAGTACATTA TGGTATAGTA CATTATATGC TTAATCTTAC ATTAATGGTT TAAAACATAT CATTGATTAA TACTTAACCC
          170          180          190          200          210          220          230          240
ACTCATCAGT ACTATCAACC ATCAACATTA AACTAAAACA CACATACCCA TAAAATTAGC TCCTACAAAT AAATTAGTTT
          250          260          270          280          290          300          310          320
GACCTGATAA CTTGAATATC CCCATACCT CCATCACAGA TTTTCTATG CAAAGATCCA ACTAAAATAG GACCTCAGTA
          330          340          350          360          370          380          390          400
TATTAATGTA GTAAGAGACC ACCAACTGAT TTATAACTTA ATGCATACGG TCCTTGATAG GTCAGGGACA ACTATTGTGG
          410          420          430          440          450          460          470          480
GGGTGCACA ATATGAACCT TTAGTGGCAT CTGGTTCCTA TTTTCAGGGCC ATATTAGGTA AACCTTCCCC CCCCGGATAA
          490          500          510          520          530          540          550          560
CTATATCTGG CATTGATTA TTGAAGTGAG TATCGATTGT CCATGACCCA CCATGCCAAG CGGTCTCTTT AAATGCATAG
          570          580          590          600          610          620          630          640
GGTTCCTTT TTTTAGGTC CTTCATTG ACATTTGGTC ACTTTCAGAG TAATAGCTAA CAAGGTGGTA CATTTCCTTG
          650          660          670          680          690          700          710          720

```

```

ATATAAATAT TTTAAATGTA ATACTTTAAG GACATTATT AAATAACCAC ATACTTTTAT ATCAGGTGCA TACTCTCTCA
      730          740          750          760          770          780          790          800
TTTTACCTTC ATTTATATCT AAGGTGTCCC CCCCGTCTAG CCAAACACCG TTCTGTCTCG ACAACCCCC CTACCCCCCT
Pcal 04R02 810          820          830          840          850          860          870          880
ACGCCGACA ATTCATGTTT AATCCTGTCA AACCCAAAA CCAGGCAAGA CTCGACCAGC GACTTCAAC GAGTGGCTTT
      890          900          910          920          930          940          950          960
ATGTGTTGAT ATATAGTAAT GCATATATA TACTAACATT TTATATAACT ATTAGTCATG TTAGGACAAA CATACTATA
      970          980          990          1000         1010         1020         1030         1040
TTAATATAT TCGACCGGC CTTACCTAAC AAAACAGCTA TAATGTTAAC AAAGATATAC TGCACATTAT ATAGTTGTGT 3'

```

**Anexo 11: Região do DNA mitocondrial onde está localizado o *primer* Pcal 14F (região destacada em amarelo) específico para *Prochilodus lineatus*. A sequência em negrito indica a região controle (D-loop) do DNA mitocondrial. A região destacada em azul se refere ao *primer* reverse Pcal 04R02.**