

Uso de técnica de DNA ambiental (eDNA) para descrever potenciais relações ecológicas entre vetores de importância médica e predadores em regiões de Mata Atlântica e de fitofisionomias de restinga

Introdução: O Brasil possui, em seu vasto território, diferentes tipos de biomas, que abrangem um quantitativo amplo de macro e micro-organismos. Esta característica territorial implica em diferentes tipos de relações estabelecidas entre a população humana, animais domésticos e silvestres além de micro-organismos presentes no ecossistema. Uma das principais relações que ocasionam graves problemas de saúde pública é a interação de humanos com mosquitos vetores. A crescente urbanização, em áreas antes conservadas, pode desestabilizar a homeostase do ecossistema, aumentando o contato de humanos com mosquitos, bem como diminuindo a interação destes insetos com possíveis predadores, como anfíbios anuros. A identificação de espécies, sejam plantas, mamíferos, anfíbios, répteis ou insetos sempre foi um desafio para a comunidade científica, havendo a necessidade de metodologias que possam contornar limitações associadas as técnicas de identificação atuais. **Objetivo:** Identificar a presença de mosquitos do gênero *Aedes* sp. e de espécies de anuros em amostras de DNA ambiental, provenientes de bromélias em fragmentos de Mata Atlântica e fitofisionomias de restinga nas regiões de Salvador e Camaçari, Bahia Brasil. **Material e Métodos:** Este é um estudo de corte transversal, que incluiu amostras de eDNA e de mosquitos coletadas em três pontos da cidade de Salvador e um ponto localizado no município de Camaçari. Foram feitas quatro coletas em cada local, uma por estação do ano, e foi realizado um levantamento do quantitativo e das espécies de mosquitos coletadas em cada região. Além disto, foi usado o eDNA de água de bromélia para investigação por PCR para mosquitos do gênero *Aedes* sp. e espécies de anuros. Para a investigação dos anuros, foi padronizado um protocolo de PCR e sequenciamento usando fragmentos de tecido de anuros e comparadas com sequencias disponibilizadas no *Genbank* para confirmação da espécie. **Resultados:** O presente estudo realizou a padronização de um protocolo de PCR para identificação de anuros e mosquitos com base no genoma destes indivíduos. Contudo, a técnica não detectou a presença de mosquitos e anuros em amostras ambientais de bromélias coletadas. A caracterização dos ambientes investigados, bem como dos mosquitos coletados, possibilitou mensurar a abundância e riqueza de espécies de mosquitos em cada região, verificando a presença

de espécies exclusivas em ambientes contendo bromélias, como exemplares do gênero *Wyeomyia* (*Phoniomyia*) sp. e associando a captura de indivíduos, como mosquitos do gênero *Culex* sp., encontrados exclusivamente no período noturno. **Conclusões:** Este trabalho demonstrou que o método de identificação padronizado é eficaz e consegue identificar espécies, contornando os vieses associados a morfologia de organismos. Contudo, a eficácia da aplicação deste método em amostras ambientais depende da taxa de material genético do organismo investigado na amostra, bem como da metodologia de obtenção desse material para realização das análises posteriores.

Palavras-chave: 1. DNA ambiental; 2. Mosquitos; 3. Sequenciamento; 4. Anuros; 5. Bromélias.

Using environmental DNA (eDNA) techniques to describe potential ecological relationships between medically important vectors and predators in regions of Atlantic Forest and restinga phytophysionomies

Background: Brazil has, in its vast territory, different types of biomes that cover a wide range of macro and microorganisms. This territorial characteristic implies different types of relationships established between the human population, domestic and wild animals, and microorganisms present in the ecosystem. One of the main relationships that cause serious public health problems is the interaction of humans with mosquito vectors. The growing urbanization, in areas that were once preserved, can destabilize the homeostasis of the ecosystem, increasing the contact of humans with mosquitoes, as well as decreasing the interaction of these insects with possible predators such as amphibian anurans. The identification of species, whether plants, mammals, amphibians, reptiles, or insects, has always been a challenge for the scientific community, with the need for methodologies that can overcome limitations associated with current identification techniques. **Objective:** Identify the presence of mosquitoes of the genus *Aedes* sp. and anuran species in environmental DNA samples from bromeliads in fragments of Atlantic Forest and Restinga vegetation in the regions of Salvador and Camaçari, Bahia Brazil. **Material and Methods:** This is a cross-sectional study that included eDNA and mosquitoes samples collected at three points in the city of Salvador and one point located in the municipality of Camaçari. One collection per season were made in each location, a total of four per year, and a survey was carried out of the number and species of mosquitoes collected in each region. In addition, eDNA from bromeliad water was used for PCR investigation for mosquitoes of the genus *Aedes* sp. and species of Anuran. For the investigation of Anuran, a PCR and sequencing protocol was standardized using tissue fragments from Anurans and compared with sequences available in Genbank for confirmation of the species. **Results:** The present study performed the standardization of a PCR protocol to identify anurans and mosquitoes based on the genome of these individuals. However, the technique did not detect the presence of mosquitoes and anurans in environmental samples of bromeliads. The characterization of the environments investigated, as well as of the mosquitoes collected, made it possible to measure the abundance and richness of

mosquito species in each region, verifying the presence of exclusive species in environments containing bromeliads, such as specimens of the genus *Wyeomyia* *phoniomyia* and associating the capture of individuals, such as mosquitoes of the genus *Culex*, found exclusively at night. **Conclusions:** This work demonstrated that the standardized identification method is effective and can identify species, overcoming the biases associated with organism morphology. However, the effectiveness of this method application in environmental samples depends on the investigated organism genetic material yield in the sample, as well as the method for extraction of this material to perform the analyses.

Keywords: 1. *environmental DNA*; 2. *mosquitoes*; 3. *sequencing*; 4. *anurans*; 5. *bromeliads*.

Capítulo 1: “*Molecular Method for Anuran’s Species Identification in Tissue Sample*”

Table 1. Comparison of the anuran species identification results. Identification by the Conservation and Ecology Center using morphological taxonomy and sequence BLAST analysis.

Sample Record	Specimens book - ECOA	Sequence BLAST	Genetic Region	Result Matching
257	<i>Pleurodema diplolister</i>	<i>Pleurodema diplolister</i>	16S	Match
245	<i>Pleurodema diplolister</i>	<i>Pleurodema diplolister</i>	16S	Match
256	<i>Pleurodema diplolister</i>	<i>Pleurodema diplolister</i>	16S	Match
261	<i>Pleurodema diplolister</i>	<i>Pleurodema diplolister</i>	16S	Match
263	<i>Pleurodema diplolister</i>	<i>Pleurodema diplolister</i>	16S	Match
729	<i>Pleurodema diplolister</i>	<i>Pleurodema diplolister</i>	16S	Match
3234	<i>Boana faber*</i>	<i>Pleurodema diplolister</i>	16S	Mismatch
3379	<i>Scinax agilis*</i>	<i>Pleurodema diplolister</i>	16S	Mismatch
3842	<i>Rhinella granulosa</i>	<i>Rhinella granulosa</i>	16S	Match
3843	<i>Leptodactylus fuscus</i>	<i>Leptodactylus fuscus</i>	16S	Match
3844	<i>Leptodactylus fuscus</i>	<i>Leptodactylus fuscus</i>	16S	Match
3845	<i>Leptodactylus fuscus</i>	<i>Leptodactylus fuscus</i>	16S	Match

*The individuals 3234 and 3379 obtained a mismatch in the results. These samples were submitted to a re-evaluation of the physical specimen and later the error in the identification of the species by the taxonomic key method was verified. With the new evaluation the same species identified by sequencing was found.

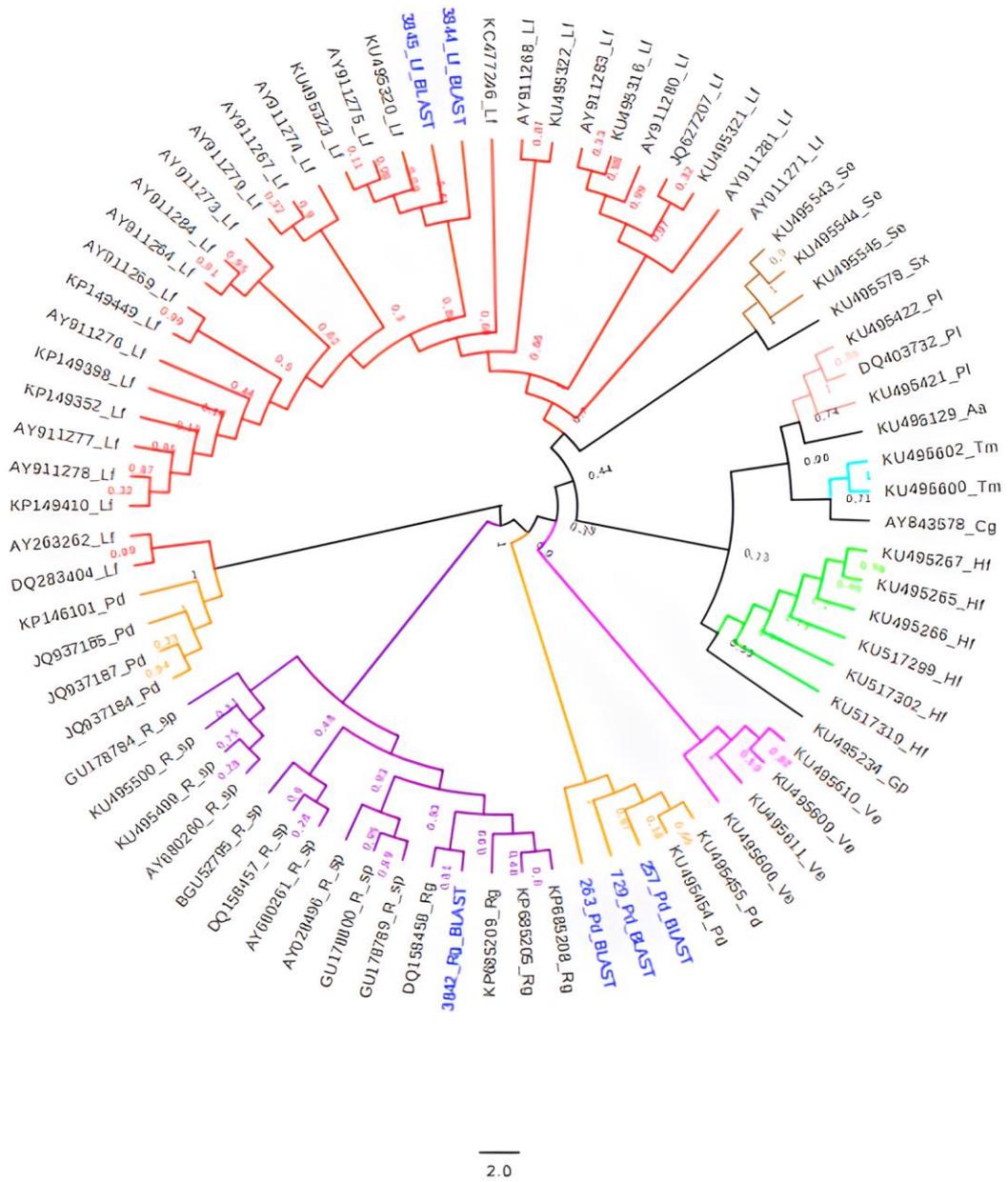


Figure 2. Phylogenetic tree of 71 reference sequences from GenBank with the six anurans sequences generated by this study (blue). The clades colors represent the species of anurans: in purple, *Rhinella granulosa*; in orange, *Pleurodema diplolister*; in red, *Leptodactylus fuscus*; in lilac, *Vitreorana eurygnatha*; in green, *Boana faber*; in light blue, *Trachycephalus mesophaeus*; in pink, *Phyllodytes luteolus*; in brown, *Scinax eurydice*; in black, *Gastrotheca pulchra*, *Corythomantis greeningi*, *Scinax x-signatus*.

Capítulo 2: Caracterização da diversidade de mosquitos e investigação da presença de anuros e mosquitos em amostras de fitotelmo em áreas de bromélias

Tabela 1. Espécies de mosquitos culicídeos coletados de 2021 – 2022 em quatro pontos do estado da Bahia, Brasil.

Tribo	Gênero	Espécie
Sabethini	<i>Wyeomyia</i>	<i>Wyeomyia (Pho) sp.</i>
		<i>Wyeomyia sp.</i>
		<i>Wyeomyia (Pho) edwardsi</i>
		<i>Wyeomyia (Pho) fuscipedes</i>
		<i>Wyeomyia (Pho) lassalli</i>
Culicini	<i>Culex</i>	<i>Limatus durhamii</i>
		<i>Cu. quinquefasciatus</i>
		<i>Culex sp.</i>
		<i>Culex (Mel) sp</i>
		<i>Culex (Cul) sp</i>
Aedeomyiini	<i>Aedeomyia</i>	<i>Culex (Microculex) sp.</i>
		<i>Aedeomyia squamipennis</i>
		<i>Aedes albopictus</i>
		<i>Aedes aegypti</i>
		<i>Aedes scapularis</i>
Aedini	<i>Aedes</i>	<i>Aedes sp</i>
		<i>Aedes fluviatilis</i>
		<i>Mansonia titillans</i>
		<i>Mansonia indubitans</i>
		<i>Cq. venezuelensis</i>
Mansoniini	<i>Mansonia</i>	<i>Cq. chrysonotum</i>
	<i>Coquiletidea</i>	<i>Coquiletidea sp</i>

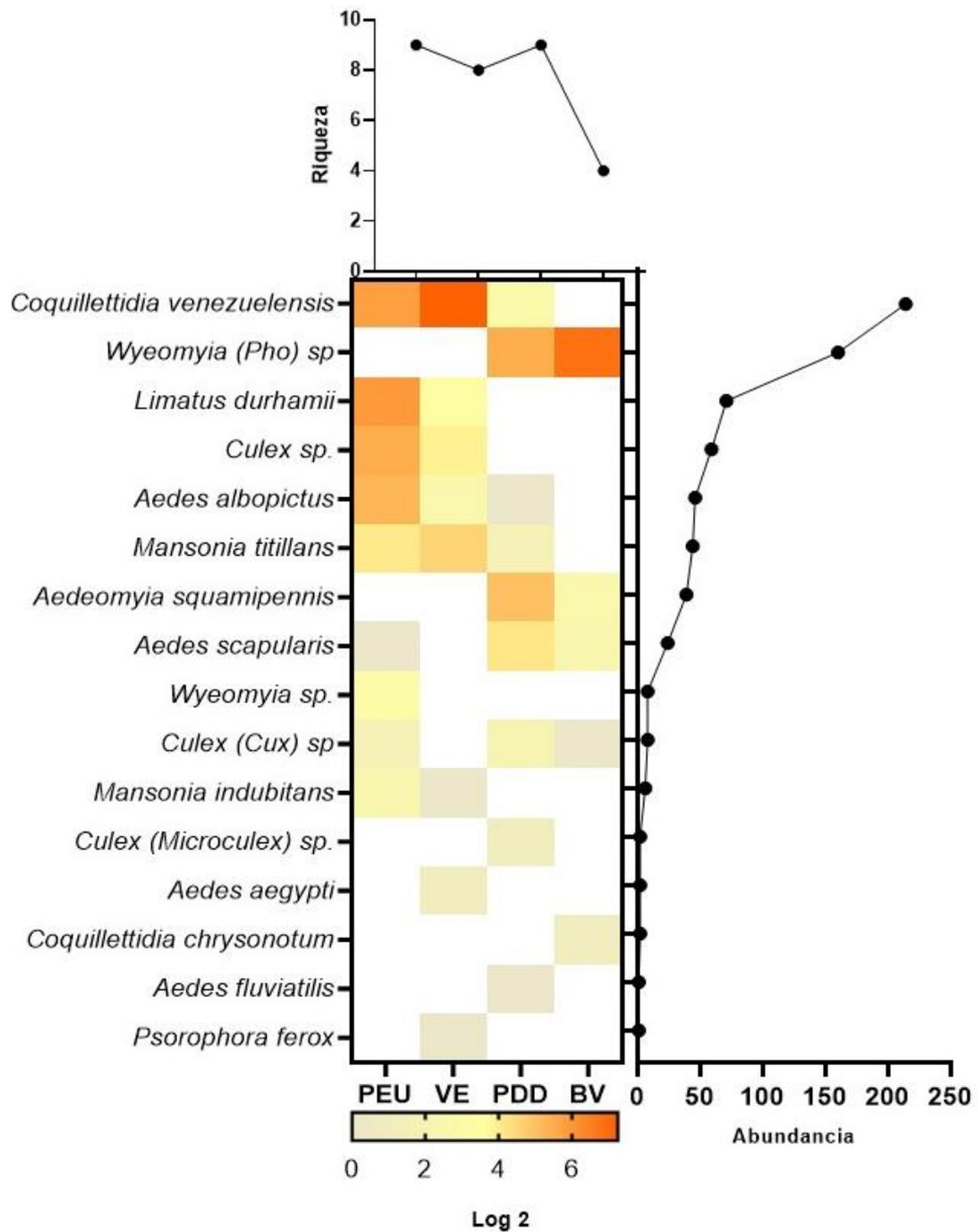


Figura 1. Gráfico de riqueza e abundância de espécies encontradas em diferentes pontos contendo locais de bromélias. Parque Ecológico Universitário, PEU; Vale Encantado, VE; Parque das Dunas, PDD; Reserva Busca Vida, BV.

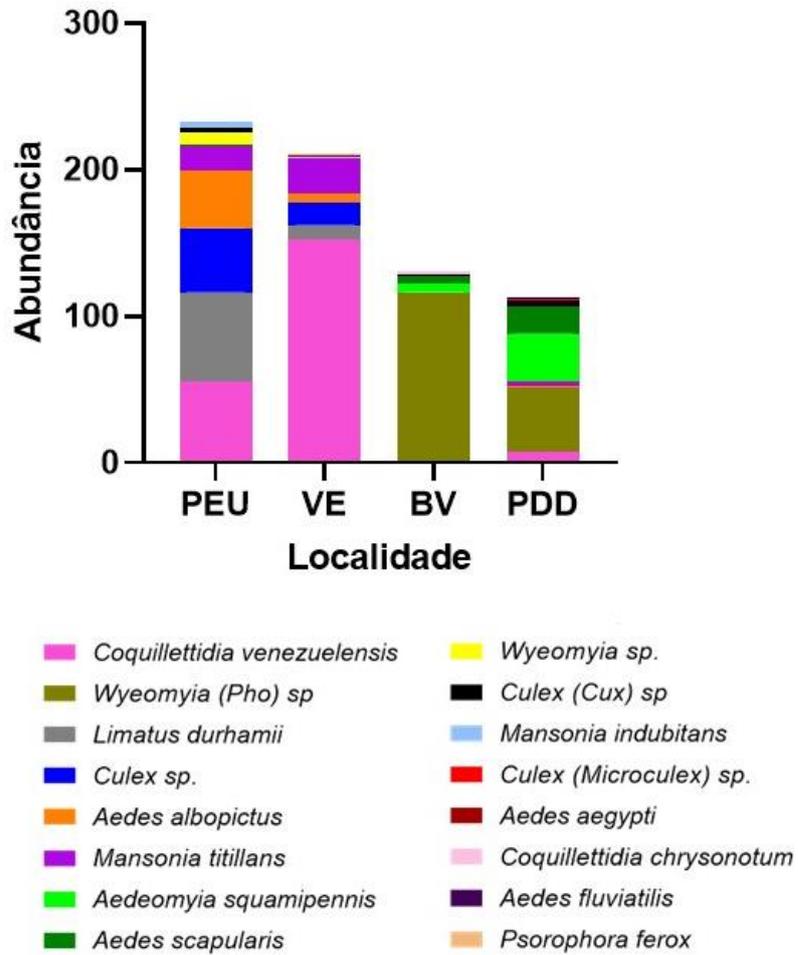


Figura 2. Abundância de espécies de mosquitos por localidade coletada. Parque Ecológico Universitário, PEU; Vale Encantado, VE; Parque das Dunas, PDD; Reserva Busca Vida, BV.

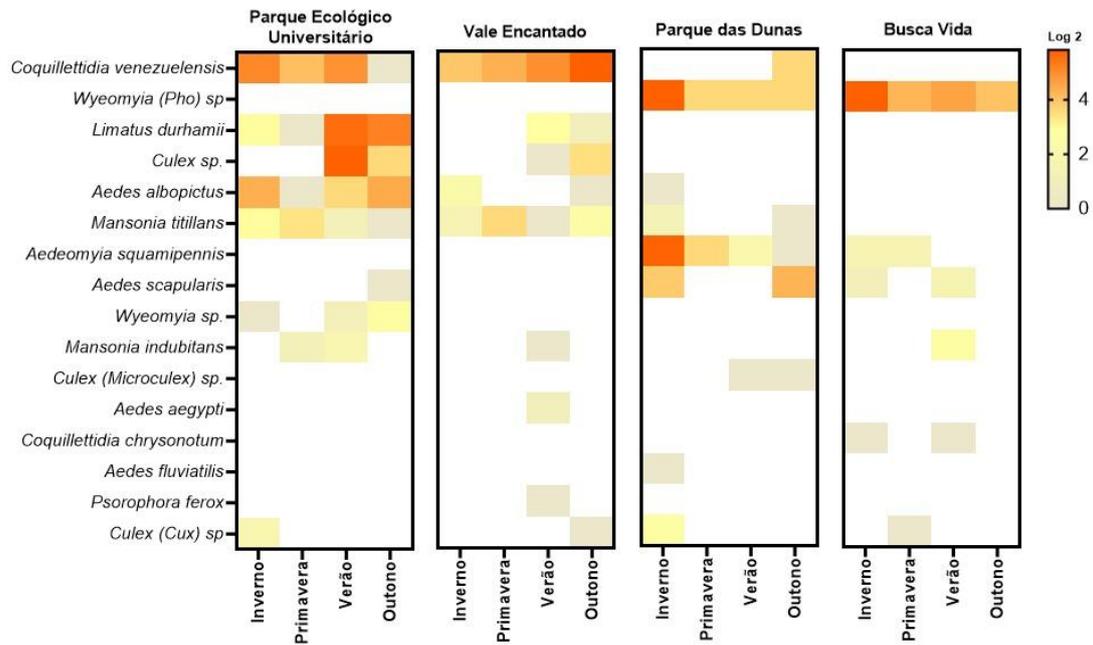


Figura 3. Distribuição da abundância de mosquitos por estação de coleta.

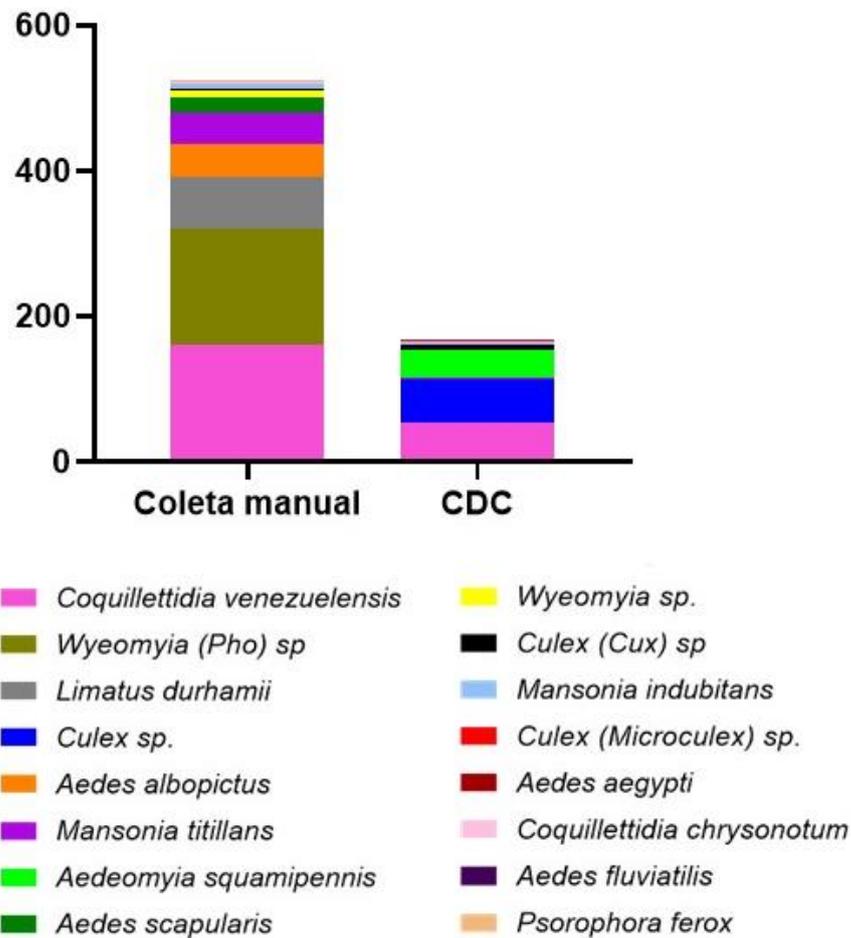


Figura 4. Abundância de capturas realizadas através de diferentes metodologias.

Tabela 2. Amostras de eDNA coletadas e suas concentrações. Locais de coleta: BV, Busca Vida; PDD, Parque das Dunas; PEU, Parque Ecológico Universitário; VE, Vale Encantado.

ID Amostras	Ponto de Coleta	Concentração ng/μL	Data coleta	Estação do Ano
eDNA 1	BV	4,9	09/11/2021	Primavera
*eDNA 2	PDD	-	18/11/2021	Primavera
*eDNA 3	PEU	-	04/11/2021	Primavera
*eDNA 4	VE	-	16/11/2021	Primavera
eDNA 5	BV	8,1	11/02/2022	Verão
eDNA 6	PDD	26,5	18/02/2022	Verão
eDNA 7	PEU	8,5	24/02/2022	Verão
eDNA 8	VE	1,1	04/03/2022	Verão
eDNA 9	BV	17,8	20/05/2022	Outono
eDNA 10	PDD	22,3	13/05/2022	Outono
eDNA 11	PEU	3,6	27/05/2022	Outono
*eDNA 12	VE	-	06/05/2022	Outono
eDNA 13	BV	32,5	23/09/2022	Inverno
eDNA 14	PDD	35,1	19/09/2022	Inverno
eDNA 15	PEU	-	05/09/2022	Inverno
eDNA 16	VE	10,3	12/09/2022	Inverno

*Amostras inviabilizadas de prosseguir para extração.

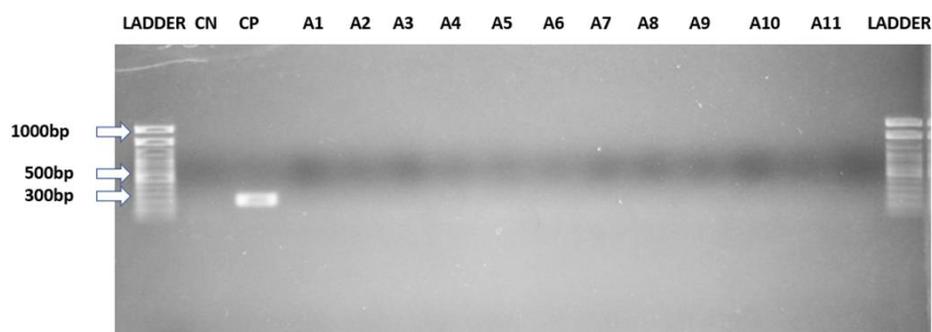


Figura 6. Reação em cadeia da polimerase para detecção de anuros em amostras ambientais em gel de agarose. CN, controle negativo; CP, controle positivo; A1, eDNA1; A2, eDNA 5; A3, eDNA 6; A4, eDNA 7; A5, eDNA 8; A6, eDNA 9; A7, eDNA 10; A8, eDNA 11; A9, eDNA 13; A10, eDNA 14; A11, eDNA 16; A12, repetição do eDNA 16.

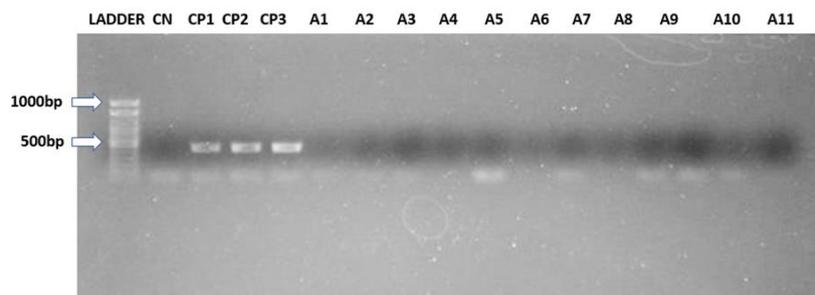


Figura 7. Reação em cadeia da polimerase para detecção de mosquitos em amostras ambientais em gel de agarose. CN, controle negativo; CP1, controle positivo *Ae. aegypti*; CP2, controle positivo *Ae. albopictus*; CP3, controle positivo *Ae. scapularis*; A1, eDNA1; A2, eDNA 5; A3, eDNA 6; A4, eDNA 7; A5, eDNA 8; A6, eDNA 9; A7, eDNA 10; A8, eDNA 11; A9, eDNA 13; A10, eDNA 14; A11, eDNA 16; A12, repetição do eDNA 16.