



FACULDADE DE CIÊNCIAS | UNIVERSIDADE DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL.

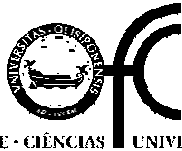


Plano de erradicação de *Xenopus laevis* (Daudin 1802) em Portugal: Avaliação da primeira fase e pesquisa da presença do fungo patogénico *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore, Pessier & Nichols 1999)

Priscila Aparecida da Silva do Vale

Mestrado em Biologia da Conservação

2010



FACULDADE DE CIÊNCIAS | UNIVERSIDADE DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL

Plano de erradicação de *Xenopus laevis* (Daudin 1802) em Portugal: Avaliação da primeira fase e pesquisa da presença do fungo patogénico *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore, Pessier & Nichols 1999)

Priscila Aparecida da Silva do Vale

Dissertação orientada pelo Prof. Dr. Rui Rebelo
e pela Prof.^a Dr.^a Maria Filomena R. A. S. T. Caeiro

Mestrado em Biologia da Conservação

2010

AGRADECIMENTOS

A todos os que de uma forma directa ou indirecta estiveram presentes na concretização desta Dissertação de Mestrado:

ao Financiamento Plurianual da FCT a Rui Rebelo e à Filomena Caeiro, pelo financiamento desta tese,

às instituições que participaram no programa de erradicação de *Xenopus laevis* em Portugal, sendo elas, o Instituto Nacional para a Conservação da Natureza e da Biodiversidade (coordenador do programa), a Câmara Municipal de Oeiras (que forneceu transporte e apoio técnico no terreno) e o Instituto Gulbenkian de Ciência (que cedeu instalações). Esta tese beneficiou dos trabalhos conduzidos no âmbito desse programa,

ao Museu de História Natural, por ter permitido o acesso aos *Xenopus laevis* ali guardados e também por ter cedido espaço e materiais para os primeiros tratamentos das amostras recolhidas.

Manifesto um especial agradecimento:

a Deus pela presença constante em todos os momentos da minha vida e por proporcionar o encontro com pessoas tão especiais que fizeram toda a diferença neste trabalho,

ao meu orientador, Prof. Dr. Rui Rebelo, cujo apoio e orientações foram essenciais. Sua disponibilidade e acessibilidade são admiráveis,

à minha co-orientadora, Prof. Dra. Maria Filomena Caeiro, por me receber tão bem no laboratório de genética, onde estava sempre muito bem-disposta e disponível em me ajudar,

à minha amiga Fabiane Carrijo, pela ajuda e apoio prestados, os quais foram essenciais no trabalho de laboratório,

às minhas colegas de laboratório, Egídia Azevedo e Alexandra Carvalho, por estarem sempre por perto na detecção de problemas e tentativas de soluções,

à Filipa Martins, pela simpatia e prontidão em ajudar-me,

à toda a minha família que sempre me apoio e acreditou que eu conseguiria chegar até o fim.

ao meu marido, Marcos Vale, de uma forma especial quero agradecer por tudo, dentro e fora deste trabalho. Pelo apoio, o interesse, a pressão, a paciência e as horas dispensadas comigo na resolução de problemas,

a todos os colegas de curso e amigos de todas as ocasiões, que de uma forma ou outra me ajudaram neste trabalho.

A todos, o meu mais sincero agradecimento!

ÍNDICE

RESUMO	7
ABSTRACT	9
CAPÍTULO I	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJECTIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Área de estudo e pontos de amostragem	18
3.2. Remoção de adultos	21
3.3. Prospecção de posturas e girinos	23
3.4. Tratamento estatístico	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Capturas do ano de 2010	24
4.1.1. Prospecção de posturas e girinos	24
4.1.2. Remoção de adultos	25
4.1.3. Sex ratio	29
4.1.4. Estrutura de tamanhos na população	30
4.2. Comparação das capturas de 2007 com as de 2010	33
4.2.1. Comparação da estrutura de tamanhos	34
4.2.2. Comparação de sex-ratio dos dois anos	35
5. DISCUSSÃO	36
5.1. Capturas do ano de 2010	36
5.1.1. Estabelecimento da espécie nas duas ribeiras	36
5.1.2. Métodos de captura	37
5.1.3. Estrutura de tamanhos	37
5.1.4. Sex-ratio	38
5.2. Comparação das capturas de 2007 com as de 2010	39
5.2.1. Comparação da estrutura de tamanhos	39

5.2.2. Comparação de sex-ratio dos dois anos.....	39
CAPÍTULO II.....	40
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. OBJETIVO.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1. Obtenção de DNA.....	44
3.2. <i>Primers</i> utilizados.....	46
3.3. Optimização da PCR.....	46
3.4. Análise electroforética dos produtos de PCR.....	48
3.5. Purificação dos produtos da PCR e de bandas excisadas de gel de agarose.....	49
3.6. Sequenciação.....	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1. Avaliação da eficácia do método de obtenção de DNA.....	50
4.2. Detecção do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	50
5. DISCUSSÃO.....	55
5.1. Avaliação da eficácia do método de obtenção de DNA.....	55
5.2. Detecção do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS.....	70

RESUMO

A perda da biodiversidade mundial tem como uma das principais causas a introdução de espécies exóticas. O controlo e a erradicação dessas espécies geram tanto mais benefício quanto mais cedo são utilizados. Em Portugal foi constatada recentemente a presença de um anuro endémico de África, *Xenopus laevis*, em duas ribeiras no concelho de Oeiras – Lage e Barcarena. Esta espécie possui uma elevada capacidade de dispersão, causou impactos ecológicos noutros locais onde foi introduzida, e pode ser vector de *Batrachochytrium dendrobatidis*, um fungo responsável pelo declínio de muitas espécies de anfíbios. Assim, torna-se importante o controlo e erradicação desta espécie, antes que esta se consiga propagar por outros locais do país. Em 2010 foi iniciado o programa de erradicação de *X. laevis* em Portugal. Um dos principais objectivos desta tese é avaliar o sucesso do primeiro ano do plano; o outro é tentar detectar a presença de *B. dendrobatidis* nos indivíduos de *X. laevis*.

Na primeira fase do plano de erradicação foi feita a prospecção de posturas e de girinos, bem como sessões de captura de adultos utilizando armadilhas de garrafa iscadas e pesca eléctrica. Capturou-se no total 102 *X. laevis*, 86 na Lage e 16 em Barcarena. Não houve correlação entre o número de animais capturados e o número de sessões de captura. O sex-ratio foi de 0,5 fêmeas por macho. O comprimento focinho-uróstilo das fêmeas foi $94,69 \pm 9,31$ mm, e o dos machos $73,51 \pm 4,72$ mm. Os animais capturados por métodos diferentes não diferiram em tamanho.

Aparentemente o programa de erradicação ainda não teve efeitos mensuráveis na população de *X. laevis*. As capturas crescentes ao longo da época podem indicar que há animais escondidos ou em locais não visitados nas duas ribeiras, que podem recolonizar os locais de remoção. É importante a continuação do plano de erradicação e a expansão da campanha às regiões ainda não visitadas das ribeiras.

Foram escolhidas amostras de alguns indivíduos de ambas as ribeiras para ensaios para a detecção do fungo. Seguiu-se um protocolo para obtenção de DNA e foram desenvolvidos e aplicados perfis de amplificação por PCR com diferentes pares de *primers* que amplificavam regiões ribossomais. Algumas amostras de *X. laevis* foram amplificadas em reacções de PCR com *primers* específicos para *B. dendrobatidis*. Os produtos de PCR obtidos foram sequenciados, mas as sequências obtidas não revelaram alguma identidade com as sequências deste fungo.

A continuidade da pesquisa da presença de *B. dendrobatidis* nas populações de *X. laevis* existentes em Portugal ainda é importante, visto que se este fungo provoca uma patologia mortal em anfíbios de outras espécies, podendo conduzi-los até mesmo à extinção.

Palavras-chave: *Xenopus laevis*, erradicação, espécies exóticas, monitorização, *Batrachytrium dendrobatidis*.

ABSTRACT

The introduction of exotic species is one of the main causes for the current global biodiversity loss. The success of control and eradication actions increases with the promptness of response after the introduction. *Xenopus laevis*, an invasive anuran originating from Africa was recently found in Portugal in two streams at Oeiras county – Lage and Barcarena. This species has high dispersal abilities, has caused impacts in other world regions where it was introduced, and is a known vector of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus responsible for the decline and extinction of several amphibian species. Therefore, the control and eradication of this species is urgent. The eradication program for *X. laevis* in Portugal started in 2010. One of the main goals of this thesis is to evaluate the success of this program; the other is to check for the presence of *B. dendrobatidis* in the individuals of *X. laevis*.

The first phase of the eradication program consisted in the prospection of egg masses and tadpoles along the streams, as well as in the capture of adults using baited funnel traps and electrofishing. A total of 102 *X. laevis* adults was captured, 86 at Lage and 16 at Barcarena. There was no correlation between the number of captured animals and the capture session number. Sex-ratio was 0,5 females per male. Snout-urostyle length was $94,69 \pm 9,31$ mm for females and $73,51 \pm 4,72$ mm for males. There were no differences in body size between animals captured by each method.

Apparently the eradication program had yet no effect on the local population of *X. laevis*. The number of captured animals increased along the capture sessions, implying that there are more animals hidden in non-visited sites of the stream that may recolonize the removal sites. It is important to guarantee the follow up of the eradication program and to expand it to the non visited sections of the streams.

Samples of individuals from both streams were selected to perform *B. dendrobatidis* detection essays, following a DNA extraction protocol. PCR amplification profiles were used with different primer pairs that amplify ribosomal regions. Some samples of *X. laevis* were PCR amplified with *B. dendrobatidis* specific primers. The PCR products were sequenced, but the sequences did not reveal full identity with *B. dendrobatidis* sequences.

The absence of *B. dendrobatidis* in Portuguese *X. laevis* populations is not yet conclusive and further studies should be carried out, as this fungus causes severe pathologies in non-resistant amphibians, and may even extinguish local populations and species.

Keywords: *Xenopus laevis*, eradication, invasive species, monitoring, *Batrachochytrium dendrobatidis*.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A seguir à destruição directa dos *habitats*, a introdução de espécies exóticas constitui a segunda maior ameaça à biodiversidade mundial [1]. O declínio de espécies nativas por acção directa de espécies invasoras pode dever-se à competição, predação, transmissão de doenças e/ou alterações de processos nos ecossistemas [2]. O processo de invasão biológica pode ser dividido em quatro fases distintas: a chegada (ou introdução) da espécie, o seu estabelecimento (ou fixação), a sua expansão e finalmente o estabelecimento de um equilíbrio da espécie na comunidade [3]. As espécies exóticas invasoras têm geralmente uma alta capacidade reprodutiva e de dispersão e apesar de inicialmente não ameaçarem as espécies nativas, podendo permanecer durante muitos anos com efectivos populacionais reduzidos, podem mais tarde aumentar muito rapidamente e criar sérios problemas para a conservação das espécies nativas [4]. Entre as espécies nativas mais afectadas encontram-se as espécies de rios ou lagos de água doce, pois são mais susceptíveis aos impactos das espécies invasoras, possivelmente devido ao facto de viverem num ambiente confinado, sendo incapazes de se deslocar para outro lugar [5].

A grande maioria das invasões biológicas modernas é causada pelo Homem que, accidental ou propositadamente, transporta espécies de um local para outro, introduzindo-as no novo ambiente. Um dos exemplos mais conhecidos em ecossistemas de água doce é o do “mexilhão-zebra” *Dreissena polymorpha*, accidentalmente levado para os Grandes Lagos dos Estados Unidos e Canadá em cascos de navios, e que se tornou uma grande ameaça à fauna nativa [6]. Em Portugal, a introdução de *Procambarus clarkii*, crustáceo originário da América do Norte, tem causado diversos impactos nos ecossistemas aquáticos, sendo um deles a predação sobre anfíbios [7].

Devido aos problemas provocados pelas espécies exóticas invasoras, muitos países estabeleceram estratégias conjuntas de protecção de ecossistemas e medidas para a erradicação, controlo e monitorização de invasões [8]. A erradicação de muitas espécies exóticas invasoras em diversos lugares do mundo pretende evitar os impactos causados a nível da diversidade biológica, da economia e do bem-estar humano (Simberloff, 2002 *in* [9]). A Convenção sobre Diversidade Biológica apela para uma abordagem hierarquizada,

principalmente baseada na prevenção de introduções indesejadas, mas considerando a erradicação como a melhor alternativa quando a prevenção falha, pois é uma das principais ferramentas da conservação para mitigar os impactos causados por invasões biológicas [9]. Os custos dos programas de erradicação muitas vezes são elevados, o que acaba por se tornar um factor condicionante no desenvolvimento e sucesso dos mesmos, pois o dinheiro investido na erradicação deverá ter um retorno positivo [10].

Em particular as ilhas são locais mais sensíveis aos impactos causados por introduções de espécies exóticas [11] e nos últimos anos a erradicação tornou-se uma ferramenta de gestão de rotina, tendo sido muitas espécies introduzidas removidas com sucesso [9]. Por exemplo, a Nova Zelândia, já realizou 156 erradicações de espécies exóticas (Veitch *in* [9]; [12]; Ebbert & Sowls *in* [13]). No noroeste do México, um programa de conservação conseguiu em 6 anos erradicar 9 populações de mamíferos exóticos em 23 ilhas, protegendo da extinção mais de 70 *taxa* de vertebrados e plantas endémicas e dezenas de colónias de aves marinhas (Donlan *et al* 2000 e Tershy *et al* 2002 *in* [13]). No oeste australiano, a erradicação de mamíferos tem sido conduzida em 45 ilhas desde a década de 1960. Foram utilizadas técnicas como iscos envenenados, armadilhas e até mesmo helicópteros para caçar espécies maiores como as cabras, devido à sua capacidade de esconder-se na vegetação [14]. Em alguns (poucos) casos, foi possível erradicar organismos marinhos quando a invasão ainda era localizada, tais como o mexilhão (*Mytilopsis sp.*) introduzido em Cullen Bay na Austrália [15].

Em relação à herpetofauna exótica e invasora, são muito poucos os exemplos de erradicação ou controle com sucesso, sendo escassos os esforços para avaliar os impactos ecológicos causados por estes animais. Os répteis e anfíbios exóticos raramente afectam directamente os seres humanos e por consequência a estas espécies não é dada importância. Na sua maioria, são animais inconspícuos e que raramente se revelam como pragas. No entanto a alta capacidade de reprodução e a elevada densidade populacional caracterizam muitas espécies da herpetofauna invasora, o que dificulta o sucesso das erradicações [16].

Os impactos causados pela herpetofauna exótica até agora documentados incluem envenenamento de predadores, predação de espécies nativas [2, 17, 18 e 19] competição com anfíbios e/ou répteis nativos, transmissão de parasitas ou agentes patogénicos [20] e contaminação genética por hibridação, provocando alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais nas populações de espécies nativas [16]. Os efeitos directos sobre os seres humanos incluem perdas económicas para a agricultura, produção e distribuição energia

(Fritts et al., 1987 *in* [21]; Fritts et al., 1992 *in* [22]) e outras actividades (Fritts et al., 1987 *in* [21]); impactos na saúde devido a envenenamentos [16, 22], contaminações das águas, transmissão de doenças, perda do conhecimento científico em biogeografia, taxonomia e ecologia [16].

No Havai foi introduzida acidentalmente, por importações de plantas para horticultura e paisagismo provenientes de Porto Rico, a rã-arborícola *Eleutherodactylus coqui* (Kraus, et al 1999 *in* [20]). O epíteto específico desta espécie evoca o som que emite, o qual provoca uma elevada poluição sonora, tendo também impactos negativos sobre os insectos e sobre outros animais nativos [23]. Apesar do esforço para a sua erradicação através de capturas e de aplicação por pulverização de produtos químicos, o extermínio desta espécie invasora não foi possível, pois as entidades responsáveis demoraram em intervir com um plano de erradicação, e a população desta rã-arborícola tem agora uma grande expansão em todo o arquipélago [16, 24].

Em 1935, o sapo *Bufo marinus* foi introduzido na Austrália (Beurden & Grigg, 1980 *in* [25]), na tentativa de controlar o besouro *Dermolepida albobirtum* que constituía uma praga para os campos de cana-de-açúcar. O sapo, no entanto, não somente não foi eficaz no controlo dos besouros, como ele próprio se tornou uma praga, levando ao declínio várias populações de muitas espécies nativas de anfíbios e répteis e também de mamíferos predadores. Estes declínios deveram-se à predação, competição e às secreções tóxicas produzidas pelo sapo, que levam ao envenenamento dos potenciais predadores [26]. Algumas medidas de erradicação foram tentadas, porém sem êxito pois esta espécie tem uma alta capacidade de reprodução e dispersão [27].

Uma outra espécie de anuro amplamente distribuída pelo mundo é *Xenopus laevis* (Daudin 1802). Durante as décadas de 1940 e 1950 estes animais foram importados por laboratórios para serem usados em diagnósticos de gravidez humana, após a descoberta que a urina de uma mulher grávida, quando injectada numa fêmea de *X. laevis*, induzia a sua produção de ovos [28, 29]. Assim, esta espécie começou a ser distribuída para muitos países, através do aumento do comércio internacional [30].

Xenopus laevis, vulgarmente chamado de rã-de-unhas, é um anfíbio da família *Pipidae*, endémico de África, das regiões subsarianas mais frias. Encontra-se distribuído naturalmente entre o Cabo da Boa Esperança e o planalto dos Camarões e da Nigéria. Não ocorre na bacia do Zaire e nas terras quentes e áridas do Este da África. Está presente nos biomas temperados, subtropicais e tropicais, distribuindo-se aparentemente por todos os tipos de corpos de água

doce [31]. Possui uma pele muito lisa (=laevis) e viscosa e apresenta coloração castanho-olivácea com manchas mais escuras na região dorsal e branca na região ventral. Não possui língua, dentes, pálpebras e ouvido externo [32]. Nos membros anteriores não há membrana interdigital, enquanto que nos membros posteriores, além da membrana interdigital, possuem garras nos três dedos mais externos [33]. O seu sistema sensorial localizado lateralmente na superfície da pele tem as mesmas funções que a linha lateral dos peixes [34]. Neste género, os adultos são quase inteiramente aquáticos e possuem diversas adaptações morfológicas e sensoriais a este modo de vida, sendo o que o período de actividade máxima é nocturno [35]. As fêmeas da espécie são consideravelmente maiores que os machos, podendo medir de 110 a 130 mm de comprimento, e os machos são entre 10% e 30% menores [36].

É uma espécie ecologicamente distinta em comparação com outras espécies de anfíbios: pode sobreviver por longos períodos sem água, pode fazer migrações sobre a terra, alimenta-se debaixo da água detectando as presas através do olfacto e pode alimentar-se inclusive dos seus próprios girinos filtradores de plâncton. Tem também a capacidade de sobreviver longos períodos sem se alimentar. Possui grande tolerância a variações de temperatura e uma extensa época de reprodução, o que facilita a sua elevada fertilidade, e a sua longevidade pode ultrapassar os 20 anos [28]. Todas estas características facilitam as pesquisas em laboratórios e o comércio como animal de estimação, mas têm também conferido importantes vantagens para a sobrevivência das populações introduzidas em novos ambientes.

A distribuição actual de *X. laevis* engloba quatro das cinco regiões com clima mediterrânico do mundo, incluindo a África do Sul, o sudoeste da Califórnia, o Chile e agora Portugal; e ainda o Reino Unido, 10 estados dos Estados Unidos, França, Indonésia, México [37], Alemanha, Holanda, Ilha da Ascensão (Atlântico sul) [28], Israel [38], Venezuela [39] e recentemente foi conhecida a sua presença no Brasil [40].

Uma diferença entre as introduções de *X. laevis* e as de outros anuros mais ruidosos é que as populações de *Xenopus* passam geralmente despercebidas, já que são quase exclusivamente aquáticos e de actividade nocturna. É provável que existam mais populações introduzidas noutras regiões das quais não se tenha conhecimento. Vários estudos têm demonstrado o aumento da dimensão das populações de *X. laevis* em vários locais do mundo e os seus impactos [28, 41 e 42]. *X. laevis* depreda macroinvertebrados, pequenos peixes e anfíbios [43], além de causar impactos secundários como o aumento da turbidez da água e a liberação de nutrientes, ocasionada pela perturbação do sedimento, o que pode originar mudanças na dinâmica dos próprios ecossistemas aquáticos. [42]. Para além desses impactos,

um outro de extrema importância é que *X. laevis* é um vector da quitridiomiose, uma doença causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore, Pessier & Nichols 1999), a qual é fatal para muitos anfíbios fora do continente africano. *X. laevis* e outras espécies africanas parecem ser imunes à doença [30, 44].

Foram feitos alguns esforços para a erradicação de populações de *X. laevis*; porém a maioria das tentativas fracassou [45]. Há registo de uma pequena população isolada que habitava um lago artificial, na Universidade da Califórnia, no qual se aplicou veneno, tendo a erradicação alcançado sucesso [28]. Na Carolina do Norte a erradicação foi feita através da drenagem das lagoas no Outono, tendo-se completado com o congelamento durante o Inverno [28].

A prevenção da introdução, o controle e, quando possível, a erradicação de espécies exóticas invasoras vêm aumentar as suas hipóteses de sucesso quanto mais cedo são iniciadas [46]. O número de indivíduos da população e o conseqüente impacto são pouco perceptíveis no início, mas com o passar do tempo aumentam, até que a invasão se torna irreversível e os custos de erradicação são proporcionalmente mais elevados. Por isso o uso combinado e específico de métodos mecânicos, químicos e biológicos pode resolver invasões em diferentes contextos e tempos [47]. Entretanto, em qualquer programa de erradicação é fundamental que se inicie um programa de monitorização durante e após a acção de erradicação, o que constitui um factor essencial para determinar o sucesso do programa [44].

Nos planos de erradicação de anfíbios são usados vários métodos de captura. O uso de armadilhas de funil (Moller 1994 *in* [48]) e os *pitfalls* colocados ao longo das vedações servem para capturar os animais que andam em terra firme (Moller 1994 *in* [48]; [49]). Na tentativa de erradicar *Bufo marinus* na Austrália foram usadas armadilhas com atractivos acústicos variados para aumentar o número de indivíduos adultos capturados [50]. O controlo das posturas é um método bastante específico. Na Nova Zelândia, recolhem-se as posturas de *Limnodynastes dumerilii* como acção de erradicação. Nos casos em que existam espécies autóctones de anfíbios, o conhecimento das diferentes épocas de postura das espécies existentes pode facilitar um atempado tratamento de todo o charco, servindo para controlar a espécie alvo antes que as espécies nativas comecem a fazer as suas posturas [48]. A drenagem dos charcos quando o volume de água é reduzido pode servir para eliminar as posturas e girinos [51]. Os camaroeiros e as nassas (Negovetic et al 2001 *in* [48]) são usados na captura dos girinos.

Os métodos químicos, como por exemplo a aplicação de produtos tóxicos, ou físicos como a fumigação com água quente durante algum tempo, podem ser usados para aumentar a taxa de mortalidade dos anfíbios [48, 49]. No controlo das pequenas rãs arborícolas no Havai, o método mais eficaz foi a fumigação com uma solução de cafeína em água (Campbell et al., 2001 *in* [48], Raloff, 2003 *in* [48]). Os métodos de controlo biológico através da introdução de peixes predadores [51] também se mostraram eficazes na diminuição da população de espécies invasoras. Relativamente às tentativas de erradicação de *X. laevis* são também utilizadas técnicas de armadilhagem, captura com redes, pesca eléctrica, drenagem dos corpos de água e introdução de peixes predadores [51].

De acordo com os estudos já realizados em Portugal, a população de introduzida de *X. laevis* encontra-se distribuída pelas ribeiras da Lage e de Barcarena, no concelho de Oeiras, concentrada na parte mais a jusante, a qual se localiza numa área densamente urbanizada, podendo dificultar a migração dos indivíduos por terra até outros ambientes aquáticos [52]. A população da Ribeira de Barcarena foi recentemente descoberta (em 2008), sendo essa ribeira imediatamente vizinha à Ribeira da Lage.

As informações sobre a biologia e ecologia de *X. laevis*, indicam que o mesmo possui uma elevada capacidade de dispersão, principalmente onde encontra condições ambientais favoráveis, como em Portugal. Sendo assim, torna-se importante o controlo e erradicação dessa espécie antes que esta se consiga propagar por outros locais do país. Assim foi iniciado, em 2010, o programa de erradicação de *Xenopus laevis* em Portugal, programa esse resultante de um protocolo entre as seguintes entidades: Instituto para a Conservação da Natureza e da Biodiversidade (coordenador), Câmara Municipal de Oeiras, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e Instituto Gulbenkian de Ciência.

2. OBJECTIVOS

Neste trabalho tentámos avaliar o sucesso do primeiro ano do plano de erradicação de *Xenopus laevis* nas ribeiras da Lage e de Barcarena, bem como obter estimativas sobre:

- a) A distribuição da espécie nas 2 ribeiras;
- b) O sucesso de captura com dois tipos de metodologia: armadilhas de funil e pesca eléctrica;
- c) A variação das taxas de captura ao longo de 3 sessões de erradicação;
- d) A estrutura de tamanhos e o sex-ratio dos animais capturados;

Finalmente, comparámos também a estrutura de tamanhos e o sex-ratio dos animais capturados com os de uma amostra de 70 animais capturados na ribeira da Lage em 2007.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de estudo e pontos de amostragem

As Ribeira da Lage e de Barcarena nascem a leste da Serra de Sintra e desaguam no estuário do Tejo, nas praias de Santo Amaro e Caxias, respectivamente. A ribeira da Lage percorre um total de 15.8 km, enquanto que a ribeira de Barcarena é mais comprida, percorrendo 19,2 km. A distância média entre as duas ribeiras é de aproximadamente 5 km. Ambas têm bacias hidrográficas muito pequenas e isoladas de outras bacias, com excepção da porção em que atravessam o concelho de Sintra, na qual as margens ainda estão num estado relativamente natural. No concelho de Oeiras, a área envolvente às ribeiras é urbana e as margens estão regularizadas. Entre estas duas ribeiras está a ribeira de Porto Salvo, com aproximadamente 3 km e um carácter muito temporário (fig.1).

Para a ribeira da Lage, foram considerados para o plano de erradicação todos os locais para os quais em trabalhos anteriores [53] foi detectada a presença de *Xenopus laevis*. Sendo assim, foram definidos 7 pontos de amostragem com uma distância entre si de no máximo 1 km, onde foram também medidas as profundidades médias (fig. 2). De montante para jusante, são eles: Ponte Talaíde (PT), Bairro dos Navegadores (BN), Hortas da Lage (HL), Bairro da Lage (BL), Estação Agronómica Nacional (EA), Jardim do Palácio do Marquês de Pombal (JM) e Parque Municipal de Oeiras (PM).

Na ribeira de Barcarena foram também seleccionados 7 pontos de amostragem, sendo eles: Ponte de São Marcos (SM), Lugar do Bico (LB), Fábrica da Pólvora (FP), Ribeira-abaixo (RA), Quinta Nossa Senhora da Conceição (NS), Pedreira Italiana (PI) e Murganhal (MU). As profundidades médias dos pontos de amostragem estão indicadas na figura 3.

As distâncias percorridas em cada um dos pontos de amostragem de cada ribeira estão indicadas na tabela 1.



Figura 1. Mapa de localização dos locais de amostragem no concelho de Oeiras.

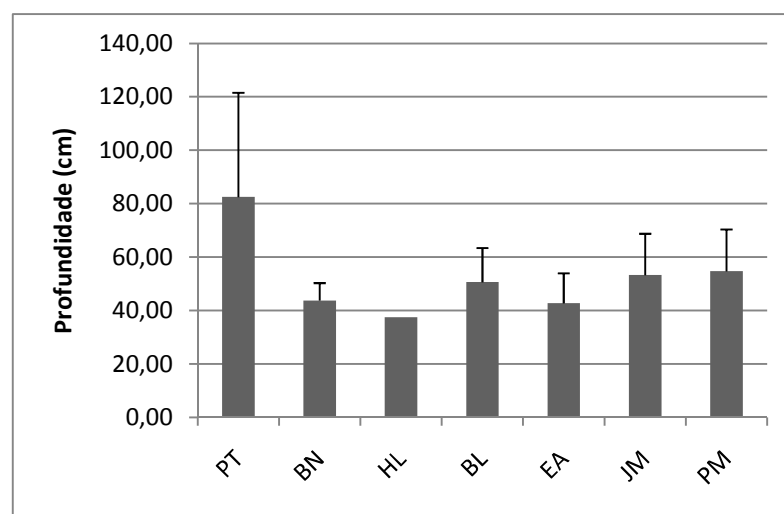


Figura 2. Profundidade média dos locais amostrados na ribeira da Lage. Indicação dos pontos amostrados de montante para jusante: PT - Ponte Talaíde; BN - Bairro dos Navegadores; HL - Hortas da Lage; BL - Bairro da Lage; EA - Estação Agronómica Nacional; JM - Jardim do Palácio do Marquês de Pombal; PM - Parque Municipal de Oeiras. As barras de erro representam 1 desvio-padrão.

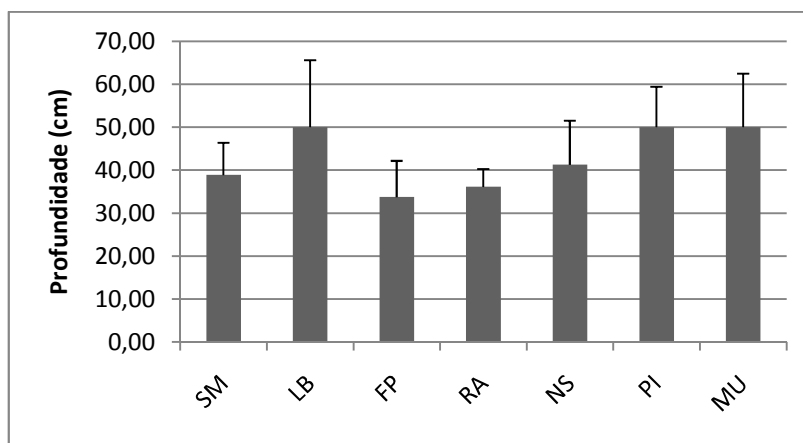


Figura 3. Profundidade média dos locais amostrados na ribeira de Barcarena. Indicação dos pontos amostrados de montante para jusante: SM - Ponte de São Marcos; LB - Lugar do Bico; FP - Fábrica da Pólvora; RA - Ribeira-abaixo; NS - Quinta Nossa Senhora da Conceição; PI - Pedreira Italiana; MU - Murganhal. As barras de erro representam 1 desvio-padrão.

Tabela 1. Distância percorrida, em metros, nos locais amostrados das ribeiras da Lage e de Barcarena.

Ribeira	Local	Distância (metros)
Lage	PT	50
	BN	200
	HL	100
	BL	500
	EA	300
	JM	350
	PM	150
	Total	1650
Barcarena	SM	250
	LB	100
	FP	150
	RA	250
	NS	150
	PI	100
	MU	100
Total	1100	

Durante o trabalho foi também feita a prospecção da ribeira de Porto Salvo; porém a mesma apenas apresentava algum caudal em dois locais (“montante” e “jusante” na figura 1).

3.2. Remoção de adultos

O primeiro ano do plano de erradicação envolveu 3 etapas, decorrendo entre os meses de Maio e Setembro, e sobrepondo-se assim à época do ano em que a espécie está mais activa (Abril a Julho) [53].

O registo das coordenadas rectangulares de cada um dos locais de amostragem foi realizado através do Sistema de Posicionamento Global (GPS) eTrex da Garmin, encontrando-se as mesmas listadas no anexo I para a projecção Datum WGS 1984 Zone 29N.

Nas duas primeiras etapas, cada uma com a duração de 2 semanas, recorreu-se a armadilhas de funil iscadas com comida enlatada para gato para a captura de adultos de *Xenopus laevis*. As armadilhas foram construídas a partir de garrações de água de 5 litros de capacidade, aos quais se cortou e inverteu o topo, encaixando-o depois na base. Cada armadilha foi atada a uma estrutura fixa na margem e imersa no corpo de água, de preferência até ao fundo, em zonas com pouca corrente (pegos) e com a abertura orientada para o sentido contrário à corrente de água. O número de armadilhas utilizadas variou consoante as características do local, nomeadamente as dimensões dos pegos de cada ribeira (Tabela 2).

Tabela 2. Número de armadilhas utilizadas, nos locais de amostragem, nas duas primeiras etapas do plano de erradicação, nas ribeiras da Lage e de Barcarena.

		1ª Etapa (17-Mai a 01-Jun)	2ª Etapa (28-Jun a 09-Jul)
Lage	PT	2	5
	BN	10	10
	HL	8	5
	BL	18	20
	EA	20	20
	JM	25	20
	PM	10	10
	Total	93	90
Barcarena	SM	-	10
	LB	-	11
	FP	-	12
	RA	-	13
	NS	-	14
	PI	-	15
	UM	-	16
	Total	-	70

Durante o período de trabalho as ribeiras foram visitadas alternadamente, excepto no Jardim do Marquês de Pombal (ribeira da Lage), cujas armadilhas foram verificadas todos os dias durante a primeira etapa.

Na segunda etapa, a captura de adultos de *X. laevis* foi complementada com realização de pesca eléctrica no dia 5 de Julho no Bairro dos Navegadores, durante 15 minutos, e no dia 07 de Julho no Jardim do Marquês de Pombal, durante 70 minutos.

Foram utilizados dois tipos diferentes de equipamento de pesca eléctrica: um aparelho fixo GX 140 (EL62, 5,0HP), com gerador a operar na margem e um aparelho de transporte dorsal SAMUS-725GN (PDC) com bateria. Com ambos os aparelhos foi utilizada corrente contínua a uma frequência de 30Hz.

A terceira etapa foi realizada apenas durante uma semana no início de Setembro, somente com recurso à pesca eléctrica, e só em alguns dos locais anteriormente visitados (aqueles onde tinham sido encontrados adultos de *X. laevis* nas duas primeiras etapas).

Tabela 3. Duração, em minutos ('), da pesca eléctrica nos locais amostrados, na terceira etapa do plano de erradicação, nas ribeiras da Lage e de Barcarena.

	Local	30-Ago	31-Ago	01-Set	02-Set	03-Set	
Lage	PT	-	-	-	-	17'	17'
	BN	-	25'	-	-	-	25'
	BL	-	-	32'	-	-	32'
	JM	8'	-	48'	-	23'	79'
	EA	-	-	-	-	36'	36'
Barcarena	SM	-	-	-	2'	-	2'
	LB	-	25'	-	-	-	25'
	RA	-	-	-	30'	-	29'
	NS	-	-	-	20'	-	20'
	PI	-	-	-	19'	-	19'

Todos os indivíduos de *X. laevis* capturados foram colocados em sacos individuais devidamente identificados, transportados em geleiras e sacrificados por congelamento em arcas frigoríficas no período máximo de uma noite após a sua captura. A cada animal foi de seguida medido o comprimento entre o focinho e o uróstilo (SUL) até aos 0,01 mm, fazendo uso de uma craveira electrónica (INSIZE) e posteriormente os animais foram armazenados em álcool a 75%.

O sexo foi determinado pela existência de caracteres sexuais secundários nos machos, tais como almofadas nupciais, apresentando-se como uma coloração mais escura na zona

interna dos membros anteriores [53]. Observou-se também que as fêmeas apresentavam extensões da cloaca, tal como descrito por Measey (2001)[54]. Os juvenis, sem caracteres sexuais secundários foram dissecados para identificação do sexo.

3.3. Prospecção de posturas e girinos

As posturas de *X. laevis* foram identificadas de acordo com as suas características: ovos claros, com um diâmetro aproximado de 1,3 mm [36] e revestidos por gelatina transparente, dispostos individualmente ou em pequenos grupos.

Todas as posturas e girinos de *X. laevis* detectados foram removidos do leite para a margem, com o auxílio de camaroeiro, de modo a impedir a possibilidade de sobrevivência. Alguns girinos foram levados para o laboratório para identificação dos estádios de desenvolvimento.

3.4. Tratamento estatístico

Ao longo dos resultados os valores são apresentados como média \pm 1 desvio padrão. O sex-ratio foi calculado utilizando a fórmula: n° de fêmeas/n° de machos.

Utilizou-se o teste qui-quadrado para verificar a existência de diferenças no número de capturas entre ribeiras, bem como entre o número de capturas obtidas com diferentes métodos. O índice de abundância foi calculado com a fórmula: n° de capturas/unidade de esforço.

Para a comparação dos tamanhos corporais (SUL) entre os dois sexos e entre os locais de captura foi utilizado o teste t. A aplicação deste teste foi precedida por uma análise aos pressupostos de normalidade na distribuição dos dados e de homogeneidade das variâncias. Este último pressuposto foi testado com o teste de Levene, ao passo que a normalidade foi testada com o teste de Kolmogorov-Smirnov.

A análise de correlação (Pearson) foi utilizada para avaliar a relação entre o número de animais capturados e o número de sessões de captura em cada ribeira.

Em todos estes testes o valor crítico foi definido para um nível de significância de 0,05. Os cálculos foram efectuados com os programas Excel (Microsoft Office 2007) e STATISTICA (StatSoft ver. 9.0).

4. RESULTADOS

4.1. Capturas do ano de 2010

4.1.1. Prospecção de posturas e girinos

Neste primeiro ano do programa de erradicação foram observadas posturas e girinos de *Xenopus laevis* em alguns dos locais amostrados (tabela 4 e fig. 4). No entanto, só foram encontrados girinos em estádios mais avançados (39 e 43), segundo Gosner (1960)[55], no ponto JM.

Tabela 4. Observação de posturas e girinos de *Xenopus laevis* nos locais amostrados das ribeiras da Lage e de Barcarena (Ribeira da Lage: PT - Ponte Talaíde; BN - Bairro dos Navegadores, HL - Hortas da Lage; BL - Bairro da Lage; EA - Estação Agronómica Nacional; JM - Jardim do Palácio do Marquês de Pombal; PM - Parque Municipal de Oeiras; Ribeira de Barcarena: SM Ponte de São Marcos; LB - Lugar do Bico; FP - Fábrica da Pólvora; RA - Ribeira abaixo; NS - Quinta Nossa Senhora da Conceição; PI - Pedreira Italiana; MU - Murganhal).

Ribeira da Lage	Local:	PT	BN	HL	BL	EA	JM	PM
	Posturas:	0	0	2	> 10	> 10	> 10	1
	Girinos:	0	0	0	> 100	0	> 100	0
Ribeira de Barcarena	Local:	SM	LB	FP	RA	NS	PI	MU
	Posturas:	0	0	0	1	10	1	0
	Girinos:	>100	> 100	0	0	0	3	0

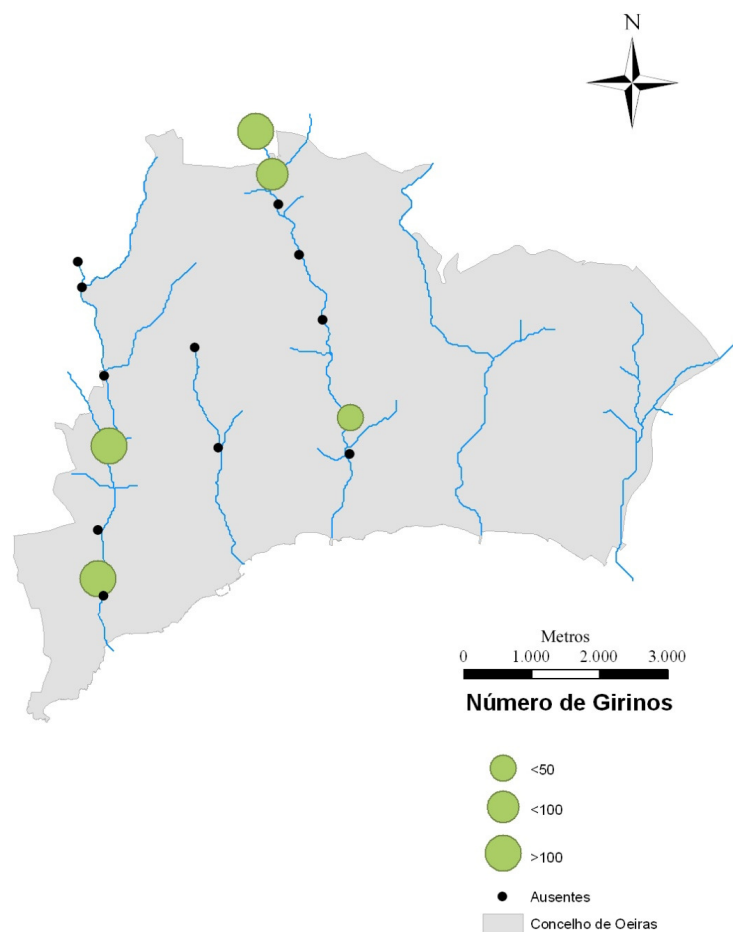


Figura 4. Classes de abundância dos girinos capturados em cada local amostrado das ribeiras da Lage e de Barcarena.

4.1.2. Remoção de adultos

Em 2010, foram capturados no total 102 *Xenopus laevis*, 86 na ribeira da Lage (28 fêmeas e 58 machos) e 16 na ribeira de Barcarena (6 fêmeas e 10 machos) (tabela 5).

Tabela 5. Animais capturados na Ribeira da Lage e de Barcarena por diferentes métodos de captura nas 5 semanas do plano de erradicação; “-” indica que, por várias razões, não houve sessão de captura (ver discussão).

Ribeira	Método	1ª semana (Maio)	2ª semana (Maio)	3ª semana (Julho)	4ª semana (Julho)	5ª semana (Setembro)	Total
Lage	Armadilhas	10	19	14	9	-	52
	Pesca eléctrica	-	-	-	21	13	34
Barcarena	Armadilhas	-	-	4	10	-	14
	Pesca eléctrica	-	-	-	-	2	2
		10	19	18	40	15	102

Na ribeira da Lage, foi no local JM que se registou o maior número de capturas de *X. laevis* (63). A distribuição das capturas por local foi muito mais equilibrada na ribeira de

Barcarena. Aqui o número maior de capturas deu-se em RA e SM (5 adultos em cada local). Foram capturados indivíduos adultos em todos os locais onde estes foram observados, com excepção de PM (na Lage), onde durante as campanhas foi observado um indivíduo adulto, sem no entanto ter sido capturado nenhum animal neste local (tabela 6).

Tabela 6. Número de indivíduos de *X. laevis* capturados em cada local, com distinção entre sexos (Ribeira da Lage: PT - Ponte Talaíde; BN - Bairro dos Navegadores, HL - Hortas da Lage; BL - Bairro da Lage; EA - Estação Agronómica Nacional; JM - Jardim do Palácio do Marquês de Pombal; PM - Parque Municipal de Oeiras; Ribeira de Barcarena: SM Ponte de São Marcos; LB - Lugar do Bico; FP - Fábrica da Pólvora; RA - Ribeira abaixo; NS - Quinta Nossa Senhora da Conceição; PI - Pedreira Italiana; MU – Murganhal).

	Local:	PT	BN	HL	BL	EA	JM	PM
Ribeira da Lage	Machos:	0	8	0	8	0	42	0
	Fêmeas:	0	2	0	4	1	21	0
		0	10	0	12	1	63	0
	Local:	SM	LB	FP	RA	NS	PI	MU
Ribeira de Barcarena	Machos:	1	3	1	4	1	0	0
	Fêmeas:	4	1	0	1	0	0	0
		5	4	1	5	1	0	0

No total das duas ribeiras o número de capturas obtido através de armadilhagem (66) foi superior ao obtido com pesca eléctrica (36). No entanto, o número de animais capturados por dia com armadilhas (4,1) foi semelhante ao obtido com pesca eléctrica (4,5).

Na ribeira da Lage o número de capturas com armadilhas (52) foi superior ao número de capturas com pesca eléctrica (34). Nesta ribeira, o número de animais capturados por dia com pesca eléctrica (5,7) foi superior ao dos capturados por armadilhagem (4,0).

Na ribeira de Barcarena o padrão foi o inverso da Lage - o número de capturas com armadilhas (14) também foi superior a pesca eléctrica (2), mas aqui o número de capturas por dia com armadilhas (4,7) foi superior ao obtido com pesca eléctrica (1,0) (tabela 7).

Tabela 7 Capturas de adultos de *Xenopus laevis* nas ribeiras da Lage e Barcarena utilizando dois métodos de capturas, armadilha e pesca eléctrica, com indicação dos respectivos números de dias de amostragem.

Ribeira	Método	Nº Capturas	Nº dias	Capturas/dia
Lage	Armadilha	52	13	4,0
	Pesca eléctrica	34	6	5,7
Barcarena	Armadilha	14	3	4,7
	Pesca eléctrica	2	2	1,0
Lage e Barcarena	Armadilha	66	16	4,1
	Pesca eléctrica	36	8	4,5

O número de animais capturados diferiu significativamente entre as duas ribeiras ($\chi^2=4,32$; $df=2$; $p<0,05$), tanto para as capturas realizadas com armadilhas ($\chi^2=11,93$; $df=2$; $p<0,05$) como para as realizadas com pesca eléctrica ($\chi^2<0,001$; $df=2$; $p<0,001$).

O índice de abundância de capturas com pesca eléctrica foi maior na ribeira da Lage, especialmente na EA e JM (fig. 5). O índice de abundância calculado a partir das capturas em armadilhas foi semelhante nas duas ribeiras (fig. 6).

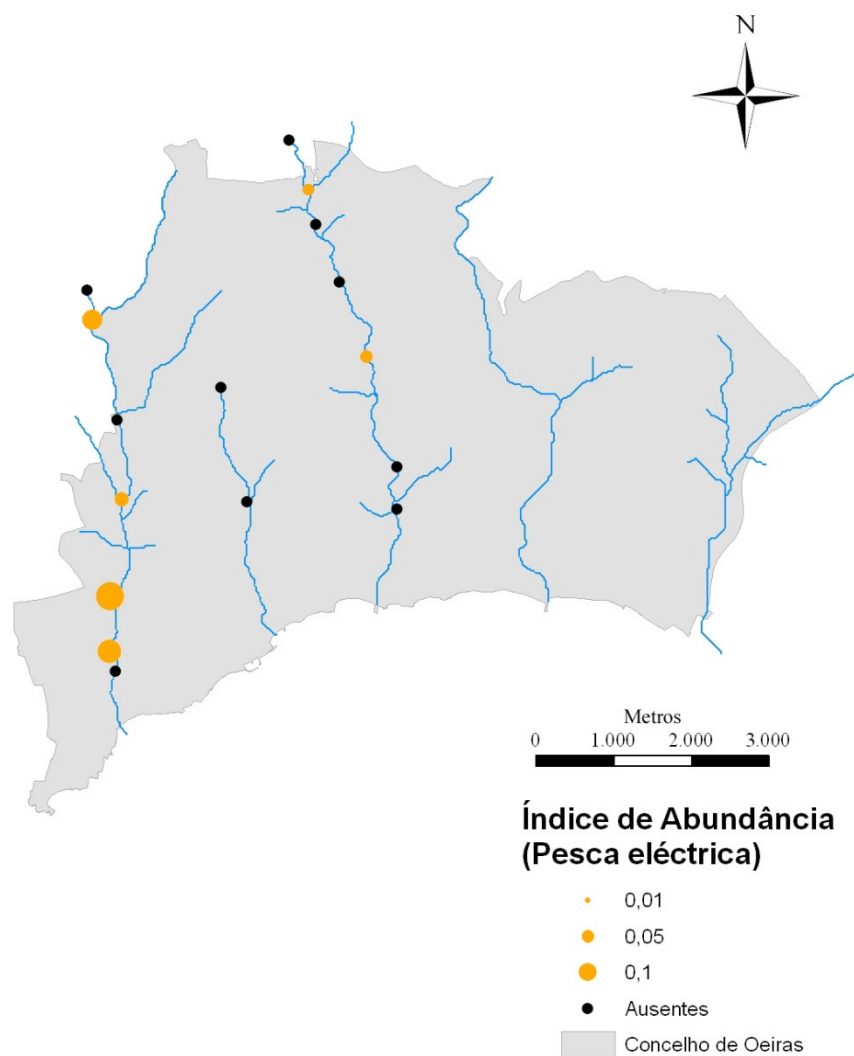


Figura 5. Índices de abundâncias de adultos calculados a partir das capturas com pesca eléctrica em cada local amostrado das ribeiras da Lage e de Barcarena.

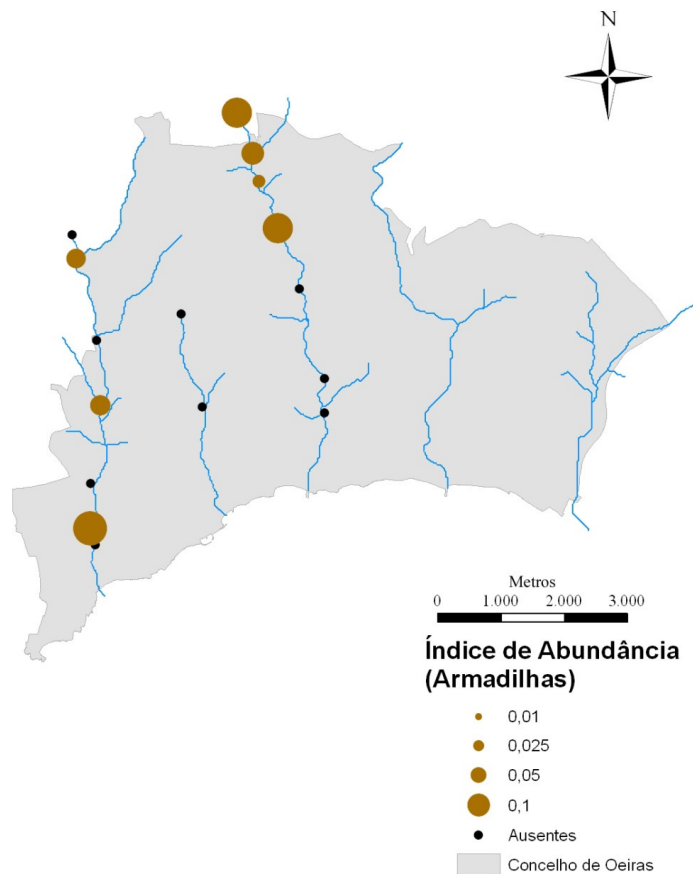


Figura 6. Índices de abundâncias de adultos, calculados a partir das capturas com armadilhas em cada local amostrado das ribeiras da Lage e de Barcarena.

Não houve correlação significativa entre o número de animais capturados e o número de sessões de captura no total das 2 ribeiras ($r=0,19659$; $p>0,05$) (fig. 7).

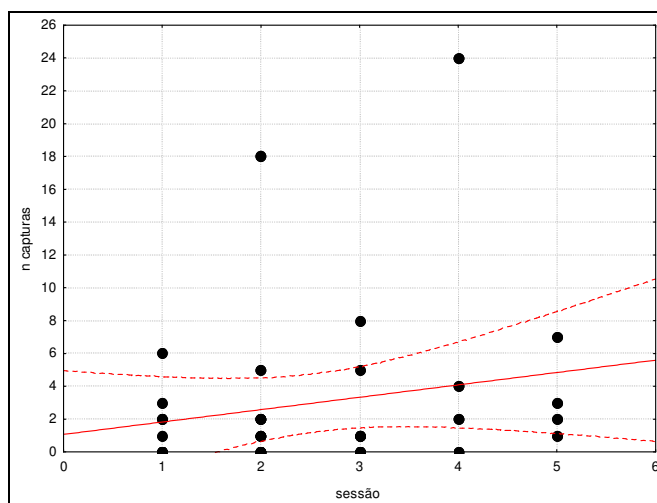


Figura 7. Relação entre o número de capturas e o índice de ordem das sessões de captura. A relação não é significativa ($r=0,19659$; $p>0,05$).

4.1.3. Sex ratio

O sex-ratio do total da amostra não foi equilibrado, correspondendo a 0,5 fêmeas por macho. Houve diferenças entre o sex-ratio dos animais capturados com armadilhas (0,5 fêmeas por macho) e dos capturados com pesca eléctrica (0,4). Este padrão foi essencialmente devido às capturas realizadas na Lage, onde o sex-ratio total foi de 0,5 fêmeas por macho, com o sex-ratio dos animais capturados com armadilhagem (0,5) superior ao dos animais capturados com pesca eléctrica (0,4). Na ribeira de Barcarena o sex-ratio foi de 0,6 fêmeas por macho. Nesta ribeira o sex-ratio dos animais capturados com armadilhagem (0,6) foi inferior ao das capturas com pesca eléctrica (1,0) (tabela 8). A figura 8 mostra o sex-ratio em cada ponto amostrado das duas ribeiras.

Tabela 8. Número de indivíduos de *X. laevis* capturados nas ribeiras da Lage e de Barcarena, através de armadilha e pesca eléctrica, com distinção entre sexos e indicação do sex-ratio.

	Método	Fêmeas	Machos	Sex-ratio
Lage	Armadilha	18	34	0,5
	Pesca Eléctrica	10	24	0,4
	Total Lage	28	58	0,5
Barcarena	Armadilha	5	9	0,6
	Pesca Eléctrica	1	1	1,0
	Total Barcarena	6	10	0,6
Lage e Barcarena	Armadilha	23	43	0,5
	Pesca Eléctrica	11	25	0,4
	Total	34	68	0,5

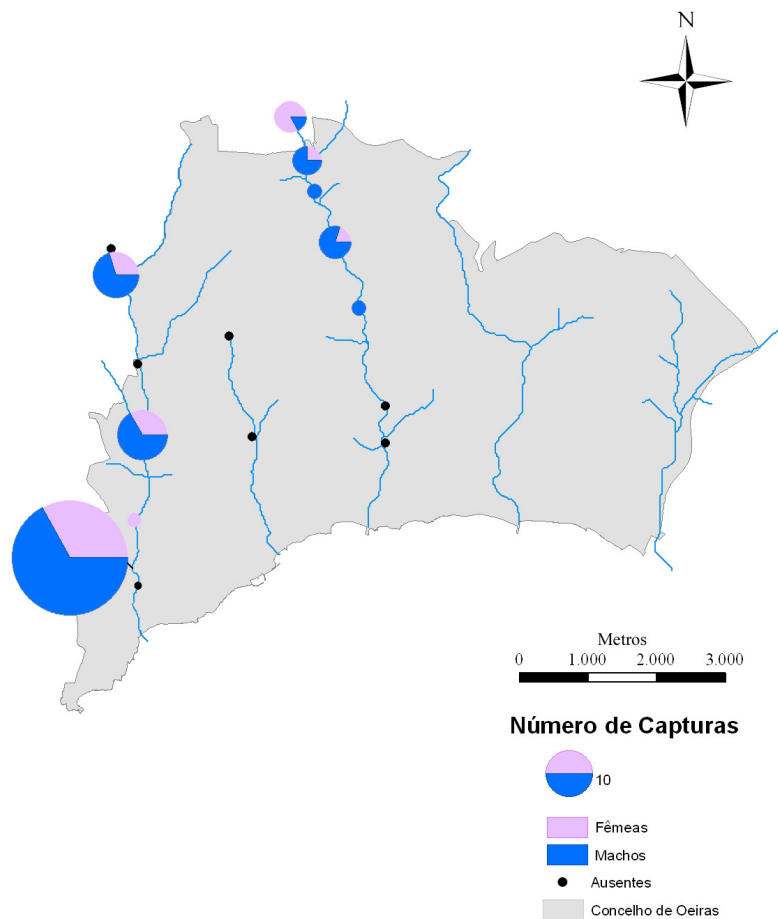


Figura 8. Sex-ratio do conjunto de adultos capturados em cada ponto amostrado nas ribeiras da Lage e de Barcarena, utilizando ambos os métodos de captura.

4.1.4. Estrutura de tamanhos na população

Não foi possível medir o comprimento focinho-uróstilo (SUL) de todos os indivíduos adultos capturados, pois dado o estado avançado de putrefacção em que alguns se encontravam, estes foram enterrados no local. Para os cálculos seguintes também não foram contabilizadas as medições do SUL dos indivíduos juvenis de *X. laevis* - 1 macho com 56,8 mm e 2 fêmeas (70,28 e 70,68 mm). Assim, considerando apenas a população que mostrava caracteres sexuais secundários, o SUL médio total das fêmeas capturadas foi $94,69 \pm 9,31$ mm (N=23), variando entre 80,00 e 118,01mm; enquanto o dos machos foi $73,51 \pm 4,72$ mm (N=59), variando entre 64,37e 81,00 mm.

Na ribeira da Lage o SUL médio das fêmeas ($94,83 \pm 9,74$ mm; N=21), variou entre 80,00 a 118,01 mm, sendo maior que o dos machos ($73,87 \pm 4,72$ mm; N=53) com variação entre 64,37 a 81,00 mm. Na ribeira de Barcarena, também as fêmeas tiveram um SUL médio superior ($93,20 \pm 1,83$ mm; N=2, variando de 91,90 a 94,49 mm), em relação aos machos ($70,36 \pm 3,77$ mm; N=6, com variação entre 66,56 a 76,66 mm).

A distribuição do SUL por classes, mostrou que em ambos os sexos há uma distribuição normal em torno da média (machos: K-S $d=0,103$; $p>0,05$; fêmeas: K-S $d=0,132$; $p>0,05$) (fig. 9).

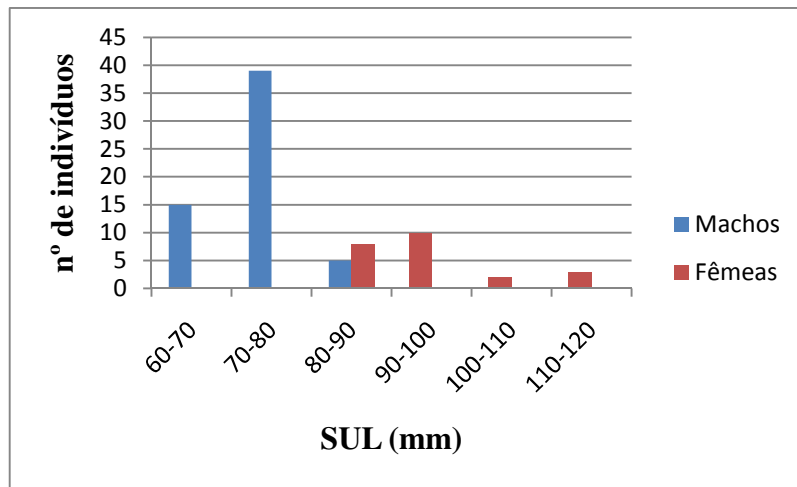


Figura 9. Distribuição do SUL (mm) dos animais capturados nas ribeiras da Lage e de Barcarena (sexos separados).

Verificou-se que os animais capturados por métodos diferentes (armadilha e pesca eléctrica), não diferiram em tamanho, tanto os machos ($t_{57}=0.407$; $p>0.05$) (fig. 10), como as fêmeas ($t_{21}=0.571$; $p>0.05$) (fig. 11). Os animais capturados com armadilhas tiveram uma variação no comprimento focinho-uróstilo (machos: 64,37 a 81,00 mm; fêmeas: 82,05 a 110,61 mm), muito semelhante aos capturados com pesca eléctrica (machos: 66,54 a 80,50; fêmeas: 80,00 a 118,01 mm). Este padrão foi também encontrado separadamente para cada uma das ribeiras - os dois métodos capturaram animais com tamanhos corporais muito semelhantes, distinguindo-se facilmente os sexos (figs. 12 e 13).

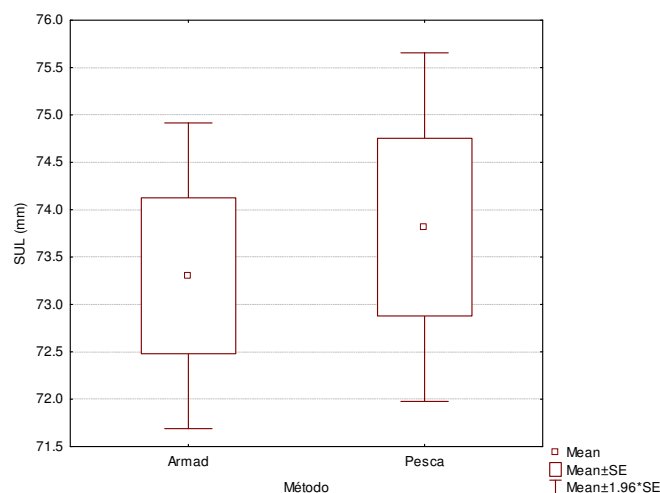


Figura 10. Tamanho corporal (SUL, mm) dos machos capturados em 2010 nas ribeiras da Lage e de Barcarena utilizando armadilhas e pesca eléctrica. As barras representam os intervalos de confiança de 95%. A diferença não é significativa.

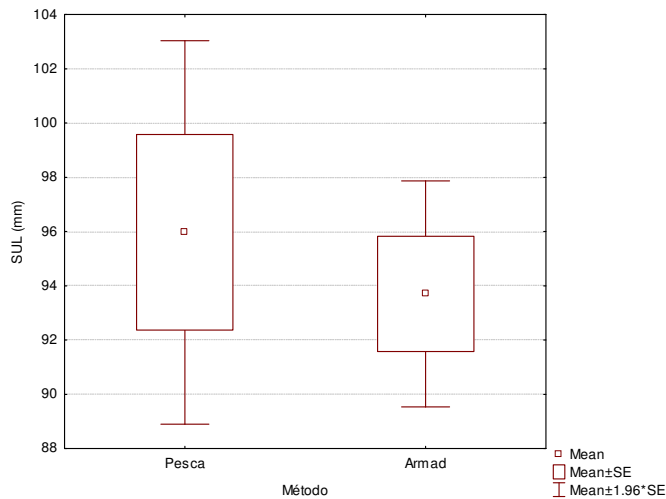


Figura 11. Tamanho corporal (SUL, mm) das fêmeas capturadas em 2010 nas ribeiras da Lage e de Barcarena utilizando armadilhas e pesca eléctrica. As barras representam os intervalos de confiança de 95%. A diferença não é significativa.

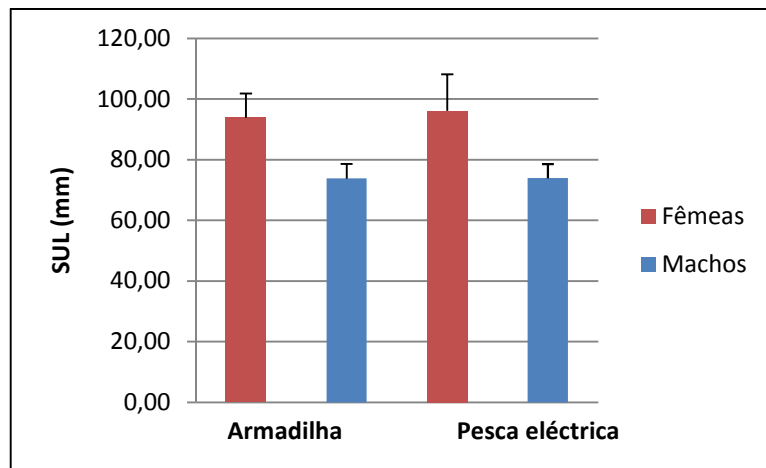


Figura 12. Tamanhos corporais (SUL, mm) do total dos animais capturados na ribeira da Lage, utilizando armadilhas e pesca eléctrica, com distinção entre os sexos. As barras de erro indicam 1 desvio-padrão.

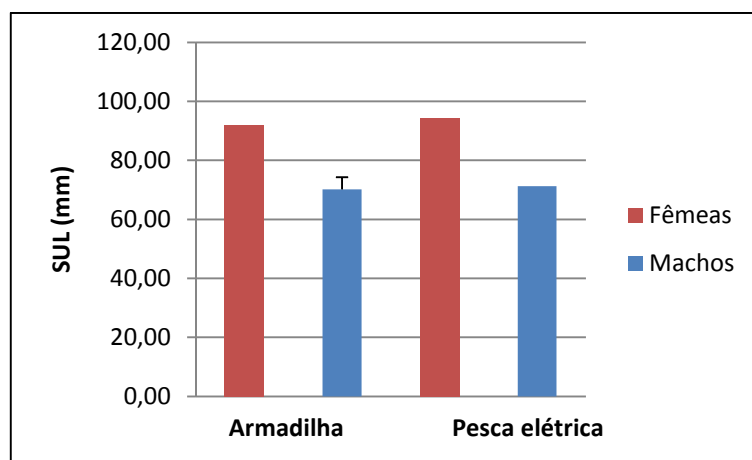


Figura 13. Tamanhos corporais (SUL, mm) do total dos animais capturados na ribeira de Barcarena, utilizando armadilhas e pesca eléctrica, com distinção entre os sexos. As barras de erro indicam 1 desvio-padrão.

Usando o total das capturas, não houve diferenças significativas no SUL dos machos entre as duas ribeiras amostradas ($t_{57}=1.753$; $p>0.05$), assim como para as fêmeas ($t_{21}=0.232$; $p>0.05$). Houve uma maior variação do tamanho corporal nos machos da ribeira de Barcarena (fig. 14) e nas fêmeas da ribeira da Lage (fig. 15).

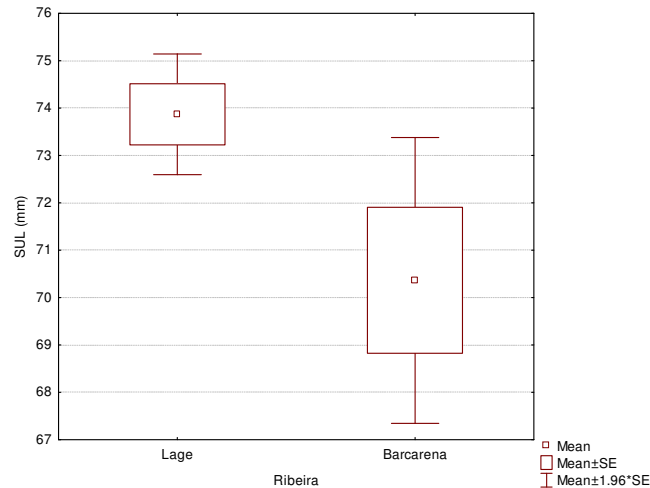


Figura 14. Tamanho corporal (SUL, mm) dos machos capturados em 2010 nas ribeiras da Lage e de Barcarena utilizando armadilhas e pesca eléctrica. As barras representam os intervalos de confiança de 95%. A diferença não é significativa.

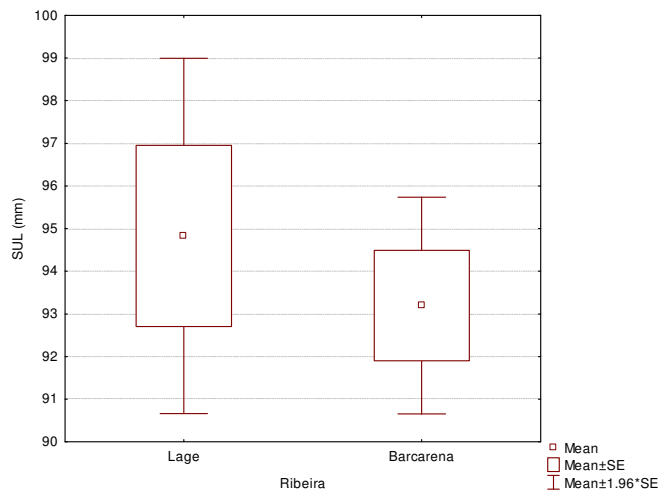


Figura 15. Tamanho corporal (SUL, mm) das fêmeas capturadas em 2010 nas ribeiras da Lage e de Barcarena utilizando armadilhas e pesca eléctrica. As barras representam os intervalos de confiança de 95%. A diferença não é significativa.

4.2. Comparação das capturas de 2007 com as de 2010

No ano de 2007 foram capturados 70 animais na ribeira da Lage; porém para as análises seguintes apenas foram considerados os animais capturados nos pontos “Jardim do Marquês

de Pombal” (JM) e “Bairro da Lage” (BL), devido serem esses os únicos locais em que houve capturas de vários animais nos dois anos (2007 e 2010).

4.2.1. Comparação da estrutura de tamanhos

Não houve diferenças no SUL dos machos capturados em BL ($t_{23}=0.587$; $p>0.05$) (fig. 16) e JM ($t_{54}=0.85$; $p>0.05$) (fig. 17) em 2007 e 2010. O mesmo aconteceu para as fêmeas, quer em BL ($t_3=0.485$; $p>0.05$) (fig. 18), quer em JM ($t_{35}=0.37$; $p>0.05$) (fig. 19).

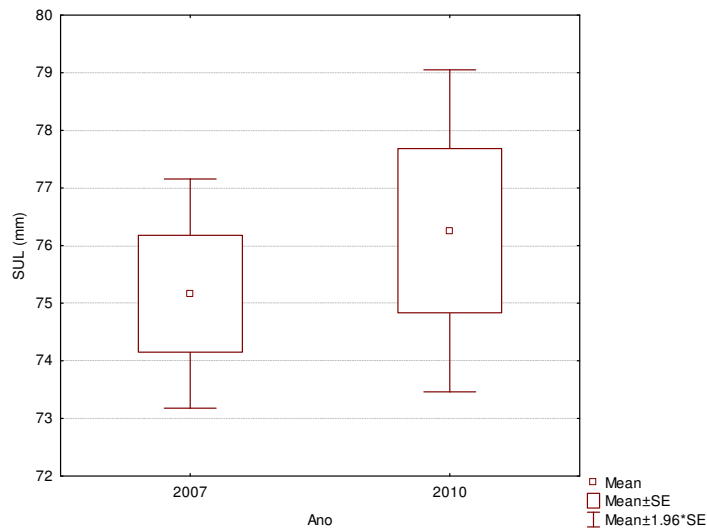


Figura 16. Tamanho corporal (SUL, mm) dos machos capturados nos dois anos no Bairro da Lage. As barras representam os intervalos de confiança de 95%. A diferença não é significativa.

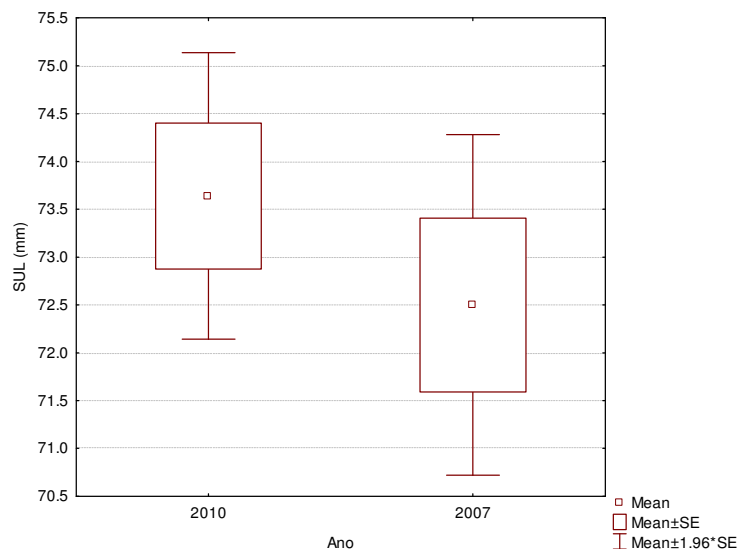


Figura 17. Tamanho corporal (SUL, mm) dos machos capturados nos dois anos no Jardim do Marquês de Pombal. As barras representam os intervalos de confiança de 95%. A diferença não é significativa.

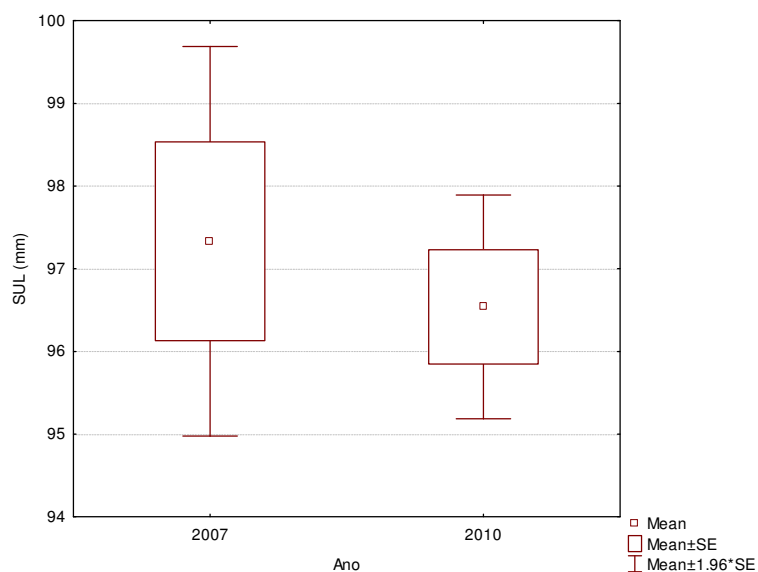


Figura 18. Tamanho corporal (SUL, mm) das fêmeas capturadas nos dois anos no Bairro da Lage. As barras representam os intervalos de confiança de 95%. A diferença não é significativa.

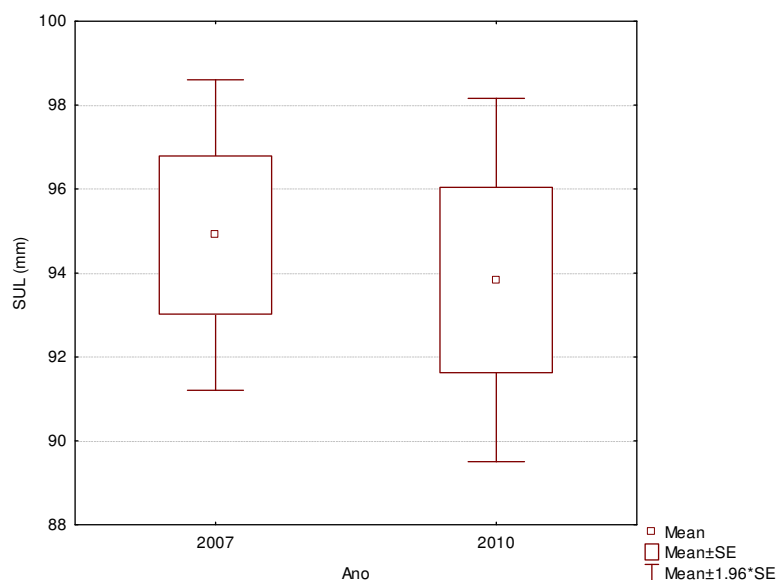


Figura 19. Tamanho corporal (SUL, mm) das fêmeas capturadas em 2010 no Jardim do Marquês de Pombal. As barras representam os intervalos de confiança de 95%. A diferença não é significativa.

4.2.2. Comparação de sex-ratio dos dois anos

Verificou-se que o número de machos capturados em JM em 2010 (42) foi maior que no ano de 2007 (16). Em relação as fêmeas, as capturas foram iguais nos dois anos para JM (21). Em JM, o sex-ratio foi de 1,31 fêmeas por macho em 2007 e de 0,5 em 2010. Em relação a BL o sex-ratio foi de 0,17 em 2007 e de 0,25 em 2010 e. Houve assim nos dois locais um desvio do sex-ratio para uma maior proporção de machos entre os dois anos.

5. DISCUSSÃO

Uma vez comprovada a presença das populações de *Xenopus laevis* nas ribeiras da Lage e de Barcarena, este trabalho constitui a avaliação da primeira fase do plano de erradicação da espécie nestas ribeiras. Foram obtidas indicações sobre a estrutura de tamanho e sex-ratio da população de cada ribeira e pudemos avaliar a eficácia das capturas com os dois tipos de métodos utilizados. Foi também possível fazer comparações entre as capturas de 2007e de 2010, em duas regiões da ribeira da Lage.

5.1. Capturas do ano de 2010

5.1.1. Estabelecimento da espécie nas duas ribeiras

A partir do número total de *Xenopus laevis* capturados na ribeira da Lage (86) e na ribeira de Barcarena (16), não podemos deduzir a dimensão da população nessas ribeiras. No entanto, nesta primeira fase do plano de erradicação, verificou-se que não houve qualquer tendência para a diminuição no número de capturas ao longo das várias sessões, o que indica que provavelmente a remoção destes animais ainda não terá tido um impacto significativo no total da população. O melhor indicador sobre o impacto deste programa de erradicação só poderá ser obtido na Primavera de 2011, quando recomeçar o programa de erradicação, pois o padrão crescente de capturas ao longo das sessões de amostragem registado em 2010 pode ser devido à consecutiva entrada em actividade de animais que tenham permanecido escondidos durante parte da Primavera/Verão de 2010.

Apesar de nas duas primeiras semanas de trabalho não terem sido realizadas sessões de capturas na ribeira de Barcarena, considerando apenas as semanas seguintes, nas quais ocorreram amostragens nas duas ribeiras, o número de indivíduos capturados em Barcarena (16) foi muito inferior ao da ribeira da Lage (57).

Nota-se assim que a espécie parece estar bem estabelecida na ribeira da Lage, porém muito concentrada no Jardim do Marquês de Pombal (JM), possível local de introdução da espécie no final da década de 1970 [52]. Foi no JM que se capturou o maior número de indivíduos, o que pode ser um indício de bom estabelecimento da espécie neste local. A presença de alguns pegos mais delimitados e não muito profundos (aproximadamente 75 cm) neste local, também facilitou as capturas.

Relativamente à população presente na ribeira de Barcarena a espécie mostrou-se bastante rara e mais espalhada pelos diferentes locais amostrados. Essa dispersão da espécie nesta ribeira pode estar relacionada com a ausência de condições óptima na ribeira de Barcarena, o que impossibilita a manutenção de grandes populações e/ou leva os animais a maiores deslocamentos ao longo da ribeira. Outro possível factor explicativo deste padrão é a possibilidade de não haver um único local de introdução da espécie, ao contrário do que terá ocorrido na ribeira da Lage.

5.1.2. Métodos de captura

Utilizou-se dois métodos de captura, armadilha e pesca eléctrica, com o intuito de se conseguir capturar o maior número de animais possível e com diferentes dimensões corporais.

Verificou-se que o número de indivíduos capturados com armadilhas foi muito superior ao dos capturados com pesca eléctrica. A diferença no número de capturas entre os dois métodos pode ser devida ao facto de que nem todos os locais amostrados com armadilhas apresentam condições propícias à captura com pesca eléctrica. Alguns factores, como a presença de pegos delimitados que facilitam a captura dos animais pelo camaroeiro, a baixa intensidade da corrente, bem como a impossibilidade de amostrar todos os locais das duas ribeiras, podem assim ter contribuído para esta diferença.

Os garrafões de plástico utilizados como armadilhas, tinham o diâmetro da entrada (gargalo) inferior à largura abdominal de algumas fêmeas, o que constitui mais uma razão para a utilização da pesca eléctrica, na tentativa de capturar as fêmeas de maiores dimensões. No entanto, os resultados mostram que os dois métodos utilizados são eficazes na remoção de fêmeas, como de machos, não tendo sido encontradas diferenças significativas entre os tamanhos dos animais apanhados com cada um dos métodos. A explicação para termos conseguido capturar fêmeas de grandes dimensões nas armadilhas pode dever-se ao facto dos animais serem atraídos pelo isco [31], e assim comprimirem-se, entrando na armadilha, o que é também facilitado pela grande viscosidade da pele.

5.1.3. Estrutura de tamanhos

Relativamente ao SUL dos adultos, verificou-se que as fêmeas são significativamente maiores que os machos, comprovando uma das características do dimorfismo sexual da espécie [36].

Comparando a estrutura de tamanhos entre as duas ribeiras, não foram encontradas diferenças, quer nos machos, quer nas fêmeas. No entanto, quando comparamos os maiores

indivíduos capturados em cada ribeira, é notório que tanto os animais de maiores dimensões como os de menores dimensões foram capturados na ribeira da Lage, o que é uma indicação de que esta população está provavelmente a conseguir manter um maior sucesso de reprodução que a de Barcarena, produzindo assim uma estrutura de tamanhos mais equilibrada.

Sabendo que *Xenopus laevis*, uma espécie de anfíbio totalmente aquático [32] e que se adapta a diversas condições ambientais [28, 56, 57], pode ter um maior e melhor desenvolvimento e sucesso reprodutor quando encontra habitats mais favoráveis [58], ou seja, ribeiras com locais de águas paradas ou de fraca corrente, maiores profundidades, mais perenes e com melhor qualidade da água, supomos que estas condições favoráveis a *X. laevis* podem encontrar-se mais facilmente na ribeira da Lage. De facto as profundidades média e máxima registadas em Barcarena são um pouco menores que as da Lage, e além disso, a ribeira de Barcarena apresentou maior grau de eutrofização da água em comparação com a ribeira da Lage (*obs. pess.*).

5.1.4. Sex-ratio

O sex-ratio da amostra capturada foi desequilibrado (0,5 fêmeas para cada macho), havendo pouca diferença entre o sex-ratio das capturas com armadilhas (0,5) e com pesca eléctrica (0,4).

De um modo geral, uma possível explicação para a desigualdade no número de capturas entre machos e fêmeas poderá estar relacionada com a fisiologia ou com o comportamento de cada um dos sexos [59]. Poderá ainda existir uma diferença na longevidade entre os dois sexos, com fêmeas de menor longevidade que os machos. O grande investimento reprodutor por parte das fêmeas pode levá-las a uma menor longevidade, obrigando-as a gastarem uma grande quantidade de energia na produção de ovos. Este gasto de energia depende do consumo de reservas de gordura e afecta directamente a sua condição física e a sua probabilidade de sobrevivência. Se os machos tiverem uma longevidade maior que as fêmeas, independentemente das condições ambientais que afectam o sucesso reprodutivo deste sexo [60], então a capacidade reprodutiva desta população não está no seu máximo, pois a proporção entre os sexos não é equilibrada. Esta desproporção entre o número de animais de cada sexo pode trazer vantagens no controlo de espécies introduzidas, como no caso de *X. laevis*, uma vez que afecta o potencial reprodutor, acarretando dificuldades na capacidade de adaptação da espécie. Contudo, o enorme potencial reprodutor desta espécie pode fazer com que seja possível que este valor não tenha consequências significativas na sobrevivência da

população. A futura realização de estudos de esqueletocronologia [54] permitirá avaliar qual a estrutura etária e a longevidade de cada um dos sexos e destas populações.

5.2. Comparação das capturas de 2007 com as de 2010

5.2.1. Comparação da estrutura de tamanhos

Ao analisar a estrutura de tamanho das fêmeas de JM e compará-la a BL, verificamos que em JM as fêmeas mostram-se mais variáveis e mais pequenas, tal como aconteceu no ano de 2007. Há uma diferença clara entre JM e BL, com machos menores no JM, o que também aconteceu em 2007 [53]. Pressupondo que a distribuição dos tamanhos mais pequenos é um indicador dos locais onde a reprodução ocorre com sucesso, então a reprodução sucederá preferencialmente em JM (jusante da ribeira). Uma vez que o tamanho dos animais aumenta de JM para BL, esta pode ser uma indicação que os indivíduos mais velhos ou maiores se estão a dispersar e a deslocar para outros locais mais a montante da ribeira.

5.2.2. Comparação de sex-ratio dos dois anos

Em ambos os locais houve um aparente desvio do sex-ratio no sentido de uma maior proporção de machos. Em JM houve até uma inversão do sex-ratio, tendo a dominância por fêmeas registada em 2007 passado a uma dominância por machos. O maior número de machos nas regiões mais a montante (BL) poderá estar relacionado com o facto de ser este o sexo de maior responsabilidade pela dispersão da espécie, decorrendo esta dispersão no sentido de jusante para montante da ribeira. Desconhecem-se as razões para a diminuição da proporção de fêmeas em JM, mas é tentador pensar que os animais maiores (todos eles fêmeas) poderão ter sido capturados em 2007, não tendo havido ainda tempo para a população local voltar a reequilibrar o seu sex-ratio.

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO

As espécies de anfíbios estão a diminuir a um ritmo alarmante numa escala global. Ao redor do mundo um terço das 6000 espécies são agora consideradas ameaçadas, e até 122 espécies podem ser extintas [61]. Os anfíbios apresentam 2 aspectos da sua biologia que os tornam importantes como bioindicadores ambientais a nível global: a função cutânea e a colonização de dois habitats distintos (dulçaquícola e terrestre). Alguns declínios são claramente devido a destruição do habitat, introdução de predadores ou concorrentes, aumento da irradiação ultravioleta, chuva ácida, condições climáticas adversas, poluição ambiental, doenças infecciosas ou uma combinação destes [62]. Apesar de em algumas áreas o impacto humano como a destruição de habitat, poluição e introdução de predadores não ter sido constatado, houve declínio de populações de anfíbios, não resultantes de extinções locais nem de flutuações populacionais ou dinâmica de metapopulações. A primeira grande morte em massa de anfíbios adultos ocorreu na Austrália e no Panamá (1993-1998) onde a causa detectada foi uma doença: a quitridiomiose [62, 63]. Estudos posteriores indicaram a quitridiomiose como sendo uma das maiores ameaças para a sobrevivência dos anfíbios em quase todo o mundo [30, 61, 63, 64, 65, 66 e 67].

A quitridiomiose é causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore, Pessier & Nichols 1999) que pertence à ordem *Chytridiales* [63]. Os quitrídios são fungos que se desenvolvem sem hifas e são encontrados em habitats aquáticos e solos húmidos, onde degradam a celulose, quitina e queratina. Infectam principalmente plantas, algas protistas e invertebrados [62]. Os anfíbios parecem ser os únicos vertebrados parasitados pelo quitrídio [63]. *Batrachochytrium. dendrobatidis* desenvolve-se na camada externa da pele de anfíbios adultos e no aparelho bucal dos girinos [66, 68, 69 e 70]. Ao contrário da maioria dos patógenos da vida selvagem, *B. dendrobatidis* parece ser capaz de conduzir as populações à extinção pois tem uma ampla gama de vectores, infectando anfíbios tanto na forma larvar, como em adultos, além de poderem subsistir no ambiente várias semanas sem um hospedeiro [64, 67]. Após a metamorfose dos indivíduos infectados é que ocorre a maior taxa de mortalidade [63], ainda que esta também ocorra em estádios larvares [71]. A facilitação da

propagação deste fungo, tem sido acompanhada pelas alterações climáticas, nomeadamente pelo aumento da temperatura ambiental [67] e também pelo comércio mundial de anfíbios infectados, implicando o surgimento de quitridiomycose em muitas populações nativas saudáveis [30, 72].

Os sinais clínicos de quitridiomycose, observados em anfíbios, incluem postura anormal, letargia, falta de reflexo dos membros, extensa descamação e manchas de descoloração da pele, anorexia e (raramente) úlceras na epiderme, hemorragias na pele, músculos ou olhos; hiperemia da membrana digital e abdominal, e congestão das vísceras [65, 74]. A sua ocorrência apenas no tecido queratinizado sugere que o fungo usa a queratina dos anfíbios como nutriente. A morte provocada, nos anfíbios, pela quitridiomycose pode estar relacionada com a hiperplasia da epiderme, que afecta a respiração cutânea ou osmorregulação; uma toxina fúngica absorvida sistemicamente [63, 73] e o impedimento do fluxo de sódio e outros electrólitos através da pele dos anfíbios, provocando a redução do ritmo cardíaco e eventual paragem do coração [74].

Há registos da existência de *Batrachochytrium dendrobatidis* nos anfíbios de todos os continentes [30, 65, 66, 67, 75 e 76], mas supõe-se que a sua procedência seja de África, através de *Xenopus laevis*, um vector assintomático de *B. dendrobatidis*, que a partir da década de 1930 começou a ser comercializado para todo o mundo, pois esta espécie de anfíbio estava a ser muito utilizada em pesquisas científicas. Os primeiros casos da presença de *Batrachochytrium dendrobatidis* em *X. laevis* foram datados em 1938. As pesquisas realizaram-se em espécimes arquivadas em museu que foram recolhidas no período de 1879 a 1999 na África do Sul, onde analisaram características histológicas da membrana interdigital dos indivíduos [30].

Na detecção de *B. dendrobatidis*, além da análise microscópica em cortes histológicos, é também usada a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) [77], em português, reacção de polimerização em cadeia. Esta técnica baseia-se na capacidade da enzima polimerase de DNA replicar sequências de DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) em certas condições laboratoriais, a partir de um par de pequenos fragmentos iniciadores (*primers*) que flanqueiam a sequência da cadeia molde que se deseja amplificar. Por meio de variações alternadas e cíclicas de temperatura, que permitem a desnaturação da dupla cadeia de DNA, o emparelhamento dos *primers* e a extensão da sequência de DNA que é amplificada, ciclo após ciclo, ocorre um

aumento exponencial de DNA, tornando-se possível a sua visualização num gel de agarose, após a sua resolução por eletroforese ([78]; Ferreira e Grattapaglia 1998 *in* [79]). A região de DNA amplificada faz parte da unidade de DNA ribossomal (rDNA) nuclear, que é constituída por uma série repetitiva (tandem) de três regiões génicas (18S, 5.8S e 28S) e duas regiões espaçadoras intergénicas (ITS e IGS). O ITS é dividido em ITS1, localizado entre os genes 18S e o 5.8S, e o ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S [80]. Enquanto as regiões dos genes ribossomais são altamente conservadas dentro de cada espécie, as regiões dos espaçadores ITS, por evoluírem mais rapidamente, podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento (Gerbi, 1985 *in* [81]), sendo muito utilizadas para taxonomia de espécies e géneros [81, 82 e 83]. As amostras de DNA do fungo, conseguidas a partir de indivíduos infectados, são obtidas geralmente por banhos aplicados aos animais, esfregaços da superfície da pele e remoção de pequenos pedaços de tecidos da membrana interdigital, região inguinal e manchas, além de parte do aparelho bucal dos girinos [70, 71, 75, 76, 84, 85, 86 e 87].

Com estudos moleculares, foi possível constatar a presença de *B. dendrobatidis* em algumas espécies de anfíbios, em diferentes regiões do mundo [67, 88 e 89]. Na Europa já foram descobertos vários casos de de *B. dendrobatidis* em anfíbios, porém o número de mortes causadas por quitridiomycose são raramente descritas [65, 66]. Em Portugal, foi constatado um caso de infecção por *B. dendrobatidis*, porém a espécie animal e o local onde a mesma foi colectada não são identificados [66].

Face ao reduzido estudo sobre a presença de *Batrachochytrium dendrobatidis* em Portugal, e visto que no país existe uma população de *Xenopus laevis*, espécie exótica invasora, habitando duas ribeiras na região de Oeiras [52], a pesquisa do fungo em indivíduos dessas populações torna-se de suma importância, visto que esta população coabita com espécies nativas da região, tornando-se um problema de grande importância para a biologia da conservação.

2. OBJETIVO

O objectivo deste trabalho foi a pesquisa da presença do fungo patogénico *Batrachochytrium dendrobatidis* nas populações de *Xenopus laevis* existentes nas ribeiras da Lage e de Barcarena, no concelho de Oeiras, Portugal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção de DNA

Numa primeira abordagem foram utilizados 5 indivíduos capturados no ano de 2007 que estavam armazenadas em álcool a 70% no Museu de História Natural de Lisboa (tabela 2.1).

Na recolha das amostras foram utilizadas luvas descartáveis que eram trocadas entre o manuseio de cada animal. Depois de cada amostra ser recolhida, todos os instrumentos utilizados eram bem lavados, passados em seguida por água ultra pura e etanol a 96%, para evitar contaminações das amostras de um indivíduo para o outro. De cada animal foi retirado um pedaço de tecido com aproximadamente 2-5 mm, nomeadamente membrana interdigital, zona inguinal e eventuais manchas escuras [66, 76, 84, 87, 88 e 89], os quais foram colocados em microtubos de 1,5 ml e deixados expostos ao ar até a evaporação do álcool.

Dos animais capturados em 2010, foram utilizados 19 indivíduos da ribeira da Lage e 10 da ribeira de Barcarena (tabela 9). Para além da membrana interdigital e ocasionais manchas, cada indivíduo sofreu um esfregaço para recolha do “muco” superficial do corpo (zaragatoa) [72, 85, 86, 89 e 90] as quais foram colocadas em microtubos. Nestes microtubos foram acrescentados 250 µl de água ultra pura e efectuaram-se sucessivas agitações com vórtex durante 10 minutos, sendo após esse tempo centrifugados por 5 minutos a 14.000 xg com recolha do sobrenadante. Paralelamente os animais eram lavados com água ultra pura (“banho”) [89], que era recolhida para um tubo Falcon de 50 ml. Estes, por sua vez, centrifugados a 4.500 xg a 4°C por 1 hora, sendo descartado o sobrenadante, mas deixando aproximadamente 400 µl para ressuspensão do sedimento com o vórtex. A suspensão foi então novamente centrifugada a 1.000 xg por 1 minuto a 4°C e o seu sobrenadante recolhido para um microtubo. Todas as amostras recolhidas foram guardadas a -20°C.

A obtenção de DNA foi efectuada a partir do tratamento das amostras adaptando um protocolo desenvolvido por Azevedo e Caeiro (não publicado) para PCR semi-directo de fungos marinhos. Nesta metodologia as amostras são incubadas sequencialmente com quitinase e proteinase K, antes de serem submetidas a PCR.

Os volumes de reacções, bem como as temperaturas e tempos de incubação foram ensaiados para optimização do protocolo. O protocolo final consistiu em adicionar a cada amostra 50 µl de tampão Phire 1x e 1 µl de quitinase (Nyztech, Portugal) a 0,05 unidades/ml com incubação em banho seco a 65°C durante uma hora, ocasionalmente submetendo a

agitação no vórtex. Em seguida foi adicionado a cada tubo 0,5 µl de proteinase K a 20 mg/ml, agitando no vórtex e colocados novamente a incubar à mesma temperatura por mais 1 hora. Finalmente para a inativação da proteinase k, as amostras foram colocadas num banho seco a 98°C durante 10 minutos, seguindo-se uma centrifugação de 3 minutos a 14.000 xg. Recolheu-se o sobrenadante para um novo microtubo, que se guardou a -20°C.

Tabela 9. Indivíduos utilizados na pesquisa do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, bem como os respectivos sexos, ribeira onde foram capturados e o ano (“G” – Girino).

Indivíduo	Sexo	Ribeira	Ano
408	Macho	Lage	2007
409	Macho	Lage	2007
410	Macho	Lage	2007
411	Macho	Lage	2007
412	Macho	Lage	2007
F1	Fêmea	Lage	2010
F10	Fêmea	Lage	2010
F11	Fêmea	Lage	2010
F12	Fêmea	Lage	2010
F14	Fêmea	Lage	2010
F15	Fêmea	Lage	2010
F2	Fêmea	Lage	2010
F6	Fêmea	Lage	2010
F8	Fêmea	Lage	2010
M10	Macho	Lage	2010
M10	Macho	Lage	2010
M22	Macho	Lage	2010
M24	Macho	Lage	2010
M37	Macho	Lage	2010
M38	Macho	Lage	2010
M40	Macho	Lage	2010
M49	Macho	Lage	2010
M7	Macho	Lage	2010
M8	Macho	Lage	2010
F9	Fêmea	Barcarena	2010
M15	Macho	Barcarena	2010
M16	Macho	Barcarena	2010
M17	Macho	Barcarena	2010
M18	Macho	Barcarena	2010
M19	Macho	Barcarena	2010
G1	-	Barcarena	2010
G2	-	Barcarena	2010
G3	-	Barcarena	2010
G4	-	Barcarena	2010

3.2. Primers utilizados

No intuito de confirmar o sucesso na obtenção de DNA, foram utilizados primeiramente os *primers* universais LROR e LR5, que amplificam a região LSU de DNA ribossomal da maioria dos fungos, mas também de outros organismos [91]

Para a detecção de *Batrachochytrium dendrobatidis* utilizaram-se os pares de *primers* Bd1a e Bd2a, NS1 e Bd2a, BOB5 e BOB6 (tabela 10 e fig. 20).

Tabela 10. Sequências de *primers* utilizados nas reacções de amplificação por PCR (*Primers forward (F)* e *reverse (R)*); “~”dimensão aproximada do produto de PCR esperado ,em pares de bases (pb)).

<i>Primers</i>	Sequência (5' -> 3')	Região de emparelhamento	Produto de PCR esperado (pb)	Referência
LROR (F)	ACCCGCTGAACTTAAGC	LSU	~ 800	Binder & Hibbett 2002
LR5 (R)	TCCTGAGGGGAACTTCG	LSU		
Bd1a (F)	CAGTGTGCCATATGTCACG	ITS1	~ 300	Annis et al 2004
Bd2a (R)	CATGGTTCATATCTGTCCAG	ITS2		
NS1 (F)	GTAGTCATATGCTTGTCTC	SSU	~ 1750	White et al 1990
Bd2a (R)	CATGGTTCATATCTGTCCAG	ITS2		Annis et al 2004
BOB5 (F)	ATGCTTAAGTTCAGCGGG	SSU	~ 740	Boyle et al 2004
BOB6 (R)	CCGATTGAATGGCTTAGTGAGACC	LSU		

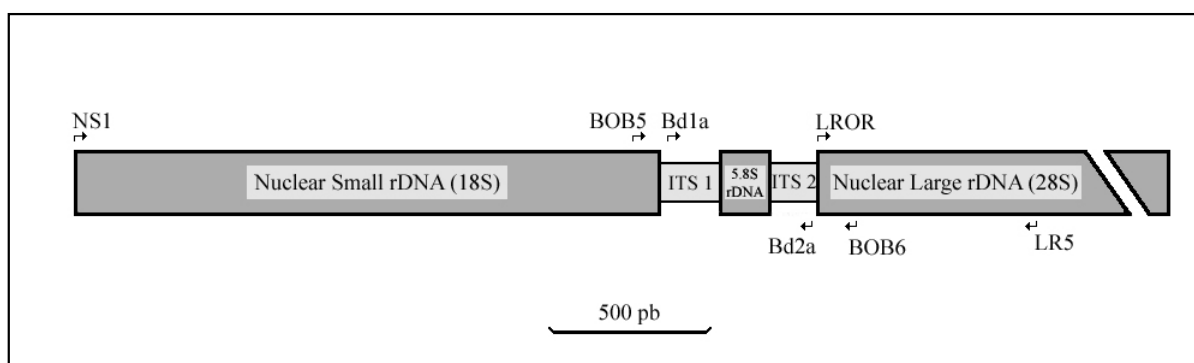


Figura 20. Localização, no DNA ribossomal nuclear, dos *primers* apresentados na Tabela 10. As setas indicam a extremidade 5' de cada *primer*. A subunidade maior do DNA ribossomal nuclear está seccionada nesta figura. Figura adaptada de White et al 1990.

3.3. Optimização da PCR

Para a técnica de PCR utilizou-se um termociclador (Biometra T personal) e o sistema comercial Phire® Hot Start DNA Polymerase. A mistura de reacção, bem como as condições de amplificação, foram realizadas segundo as instruções do fabricante (http://www.finnzymes.fi/pdf/f540sl_phusion_hotstart_highfidelity_dna_polymerase_datashe

et_1_9_low.pdf). No que concerne às temperaturas de *annealing* dos *primers* usados, essas foram calculadas através do programa *Tm calculator* disponível no site da Finnzymes (http://www.finnzymes.fi/tm_determination.html). A constituição das misturas de reacção de amplificação foi idêntica para todas as amostras (tabela 11).

Tabela 11. Mistura de reacção de amplificação por PCR.

Reagentes	Volume na Reacção/Concentração
H2O	Até 20 µl
Tampão Phire	0,4 µM /1x
Cada dNTP	0,4 µM
<i>Primer Forward</i>	0,5 µM
<i>Primer Reverse</i>	0,5 µM
Enzima Phire	0,4 µl
DNA	1 µl

As amostras foram amplificadas com os diferentes pares de *primers*, aplicando perfis de amplificação adequados (tabela 12).

Tabela 12. Perfis de amplificação aplicados nas diversas PCRs

Perfil	Par de <i>Primers</i>	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
1	LROR e LR5	98°C	3 minutos	30
		98°C	5 segundos	
		58,5°C	5 segundos	
		72°C	20 segundos	
		72°C	1 minuto	
2	Bd1a e Bd2a	98°C	3 minutos	40
		98°C	20 segundos	
		55°C	20 segundos	
		72°C	30 segundos	
		72°C	2 minutos	
3	NS1 e Bd2a (1ª PCR)	98°C	3 minutos	20
		98°C	20 segundos	
		49°C	20 segundos	
		72°C	50 segundos	
		72°C	2 minutos	
	Bd1a e Bd2a (2ª PCR)	98°C	3 minutos	40
		98°C	20 segundos	
		55°C	10 segundos	
		72°C	20 segundos	
		72°C	2 minutos	
4	BOB5 e BOB6 (1ª PCR)	98°C	3 minutos	30
		98°C	5 segundos	
		64°C	5 segundos	
		72°C	20 segundos	
		72°C	2 minutos	
	BOB5 e BOB6 (2ª PCR)	98°C	3 minutos	40
		98°C	5 segundos	
		60°C	5 segundos	
		72°C	20 segundos	
	Bd1a e Bd2a (3ª PCR)	72°C	1 minuto	40
		98°C	3 minutos	
		98°C	5 segundos	
		60°C	5 segundos	
72°C		20 segundos		
72°C	1 minuto			

3.4. Análise electroforética dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram analisados electroforeticamente em gel de agarose (Invitrogen life technologies Agarose Eletrophoresis) a 2% com brometo de etídio (EtBr) a 0,5 µg/ml e foram visualizados com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta. O

tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com os marcadores de massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), Hypper Ladder I (Bioline) ou 1 KbPlus DNA Ladder (Invitrogen). As fotografias dos géis foram feitas utilizando o sistema Kodak Digital Science (Eletrophoresis Documanrarion and Analysis System 120).

3.5. Purificação dos produtos da PCR e de bandas excisadas de gel de agarose

Para a purificação dos produtos provenientes da amplificação por PCR foi utilizado o sistema comercial JETquick Spin Column Technique PCR Purification (Genomed, EUA), de acordo com as instruções do fabricante que se encontram em anexo. Foram também purificados produtos obtidos a partir de bandas excisadas de géis de agarose, utilizando o sistema comercial Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (<http://www.zymoresearch.com/zrc/pdf/D4001d.pdf>).

3.6. Sequenciação

Os produtos purificados foram enviados para sequenciação na empresa Stabvida (<http://www.stabvida.net/frontpage/por/index.php>).

Os resultados da sequenciação foram analisados através do software BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.5.3 e as sequências obtidas comparadas com sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) recorrendo à ferramenta “Nucleotide blast” (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da eficácia do método de obtenção de DNA

Com a realização de um primeiro ensaio utilizando os *primers* LROR e LR5, visualizou-se fragmentos de DNA amplificado por PCR com as amostras retiradas dos indivíduos capturados em 2007 (408, 409, 410, 411 e 412) (tabela 4), verificando-se, assim, êxito com o uso da técnica adotada (com tratamento com quitinase e proteinase k) para obtenção de DNA (fig. 21).

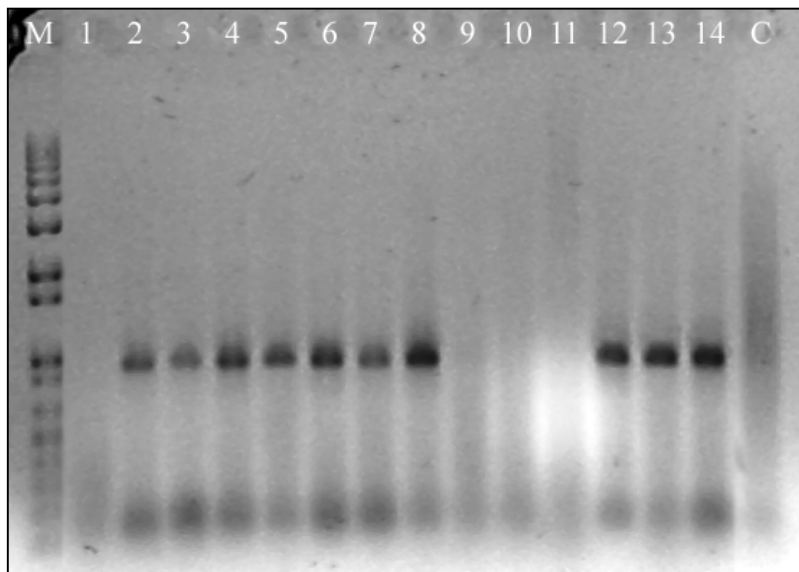


Figura 21. Produtos de PCR amplificados com os *primers* LROR e LR5 (M - Marcador molecular 1 KbPlus DNA Ladder (Invitrogen). 1 a 14 - Amostras dos indivíduos, sendo: 1 a 3 - 408; 4 a 6 - 409; 7 e 8 - 410; 9, 10 e 12 - 411; 11, 13 e 14 - 412. C - Controle negativo).

4.2. Detecção do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

Mediante visualização em gel de agarose, os resultados obtidos mostraram que nem todas as amostras retiradas de *Xenopus laevis* e utilizadas na pesquisa do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, por técnica de PCR, apresentaram amplificação de DNA. Os resultados mais relevantes (em que se obtiveram produtos de PCR) estão descritos na tabela 13.

Tabela 13. Indivíduos analisados e respectivas amostras, perfis de amplificação aplicados e dimensão aproximada “~” do/dos produtos de PCR em pares de base (pb). *Indivíduos amostrados: 408, 409, 410, 411 e 412 – animais capturados em 2007 e guardados em álcool a 70% no Museu de História Natural; F1e F2 – animais capturados em 2010. **Amostras: MI – Membrana Interdigital; I – Região Inguinal; Z – Zaragatoa; B – “Banho”. ***Perfis das diferentes condições de amplificação por PCR descritos anteriormente na tabela 12.

*Indivíduo	**Amostra					***Perfil de Amplificação por PCR				Tamanho do Produto de PCR (pb)
	MI	I	M	Z	B	1	2	3	4	
408		✓	✓			✓				~ 850
409	✓	✓	✓			✓				~ 850
410	✓	✓				✓				~ 850
411			✓			✓				~ 850
412		✓	✓			✓				~ 850
F1					✓		✓			~ 300; ~700; ~800; ~1200
F1					✓			✓		~1000
411			✓					✓		~ 1000; ~ 1650
F1					✓				✓	~ 260
F2					✓				✓	~ 700
410	✓								✓	~ 300
411			✓						✓	~ 600

Com os *primers* específicos Bd1a e Bd2a, e aplicando o perfil 2 (tabela 13), foram ensaiadas as amostras já anteriormente amplificadas com o perfil 1 (tabela 13), bem como as primeiras amostras oriundas dos indivíduos capturados em 2010 (F1, M1, M2). Relativamente a estes indivíduos, o material biológico que serviu para as reacções de amplificação consistiu em amostras resultantes de “banho” e zaragatoa. Obteve-se 3 fragmentos de DNA de tamanhos diferentes para a amostra proveniente do “banho” de F1 (fig. 22).

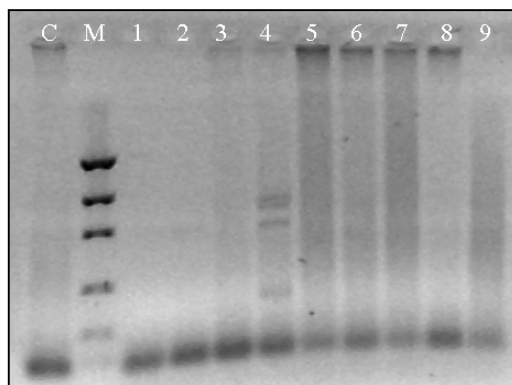


Figura 22. Produtos de PCR amplificados com os *primers* Bd1a e Bd2a (M- Marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). 1 a 9 - Amostras dos indivíduos, sendo: 1, 4 e 7 - F1; 2, 5 e 8 - M1; 3, 6 e 9 - M2. C - Controle negativo.).

Já de posse de mais amostras de outros indivíduos de *X. laevis*, escolhidos aleatoriamente, estas foram também submetidas a ensaios seguindo o perfil 2 (tabela 12). Visto que os resultados foram negativos, fez-se um novo ensaio, desta vez com duas PCR consecutivas (perfil 3), e com amostras dos seguintes indivíduos: F1, M8, 409, 411, 412. Na primeira reacção de amplificação por PCR utilizou-se os *primers* NS1 e Bd2a e na segunda reacção (*nested*), os *primers* Bd1a e Bd2a. Apenas as amostras F1 e 411, foram amplificadas, tendo sido observados produtos de PCR de aproximadamente 1000 a 1650 pb, sendo que com a amostra 411 foram amplificadas duas bandas (fig. 23). Foi feita a sequenciação destes dois produtos de PCR e a sequencia resultante foi submetida a um *blast* cujo resultado revelou não haver identidade entre as sequências nucleotídicas destas amostras e a região ITS do DNA ribossomal de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

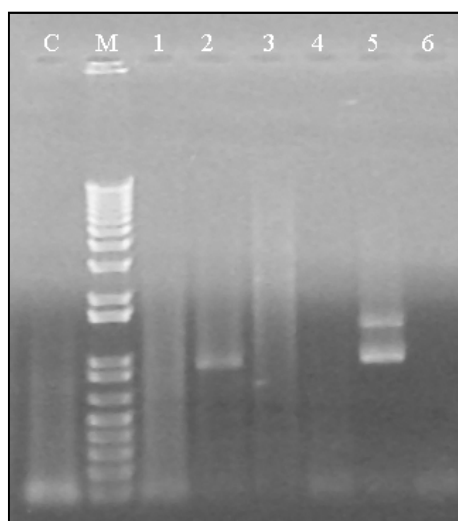


Figura 23. Produtos resultantes de duas amplificações por PCR consecutivas, utilizando primeiramente os *primers* NS1 e Bd2a e seguidamente os *primers* Bd1a e Bd2a (C - Controle negativo. M- Marcador molecular 1 KbPlus DNA Ladder (Invitrogen). 1 a 6 - Amostras dos indivíduos, sendo: 1 e 2- F1; 3- M8; 4- 409; 5 - 411; 6 - 412).

Em mais uma tentativa de detecção de DNA *B. dendrobatidis* nestas amostras, optou-se pela utilização de outros *primers*, BOB5 e BOB6 [88], igualmente descritos para a amplificação de uma região ribossomal deste fungo, na qual está contida a região a amplificar com o par Bd1a/Bd2a (fig. 20). Assim, foram realizadas três amplificações sucessivas por PCR, a primeira utilizando os pares de *primers* BOB5 e BOB6, uma segunda ainda com estes mesmos *primers* e a terceira, uma *nested* PCR, com os *primers* Bd1a e Bd2a (perfil 4, tabela 12). Com algumas amostras, foi possível visualizar-se a presença de produtos de PCR, no final quer da segunda, quer da terceira etapa do perfil 4, observando-se fragmentos com

tamanhos compreendidos entre os 260 a 700 pb aproximadamente. Os produtos de PCR das diferentes amostras tinham dimensões distintas, sendo no entanto idênticos em ambas as etapas anteriormente referidas. Estes produtos de PCR foram purificados (fig. 24) e enviados para sequenciação, tendo sido obtidas seqüências de boa qualidade apenas para os produtos de PCR obtidos por amplificação das amostras dos indivíduos 410 e 411 (fig. 25 e 26). As seqüências *forward* e *reverse* obtidas destes produtos de PCR (fig. 25 e 26) foram alinhadas e as respectivas seqüências *consensus* foram sujeitas a um *blast* aberto utilizando a ferramenta disponível no site do NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) O resultado obtido foi o emparelhamento com duas pequenas seqüências nucleotídicas de *Homo sapiens*: a primeira com *Homo sapiens anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase* (cromossoma 2) [Score de 44.6 bits (48), Identities = 45/57 (79%), Gaps = 4/57 (7%)] e a segunda com *Homo sapiens BAC clone RP11-56A1 from 2, complete sequence* [Score = 44.6 bits (48), Identities = 45/57 (79%), Gaps = 4/57 (7%)].

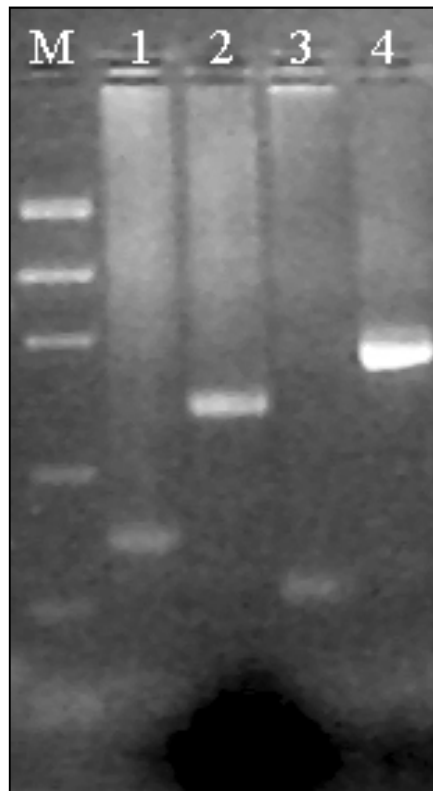


Figura 24. Produtos de PCR purificados, resultantes de três amplificações por PCR consecutivas, utilizando respectivamente os seguintes *primers*: BOB5 e BOB6; BOB5 e BOB6; Bd1a e Bd2a (M- Marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). 1 a 5 - Amostras dos indivíduos, sendo: 1 - 410; 2- 411; 3- F1; 4 – F2).

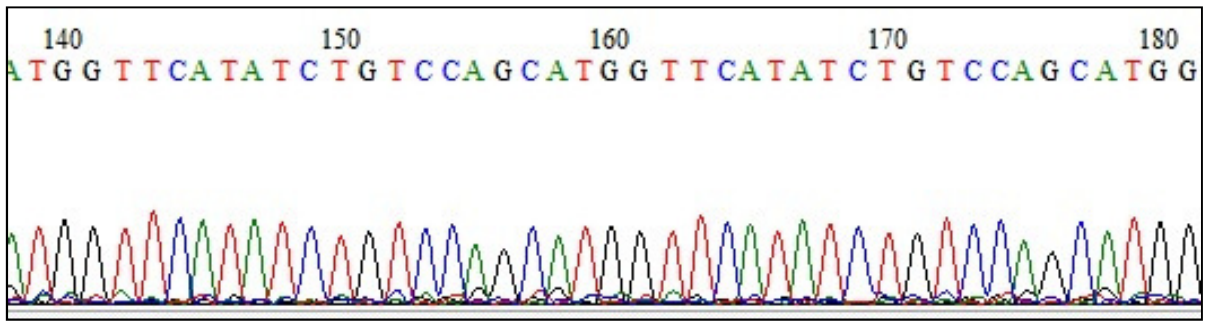


Figura 25. Aspecto parcial do cromatograma obtido para a sequência *forward* do produto de PCR resultante da amplificação de uma amostra do indivíduo 410, com o *primer* Bd2a.

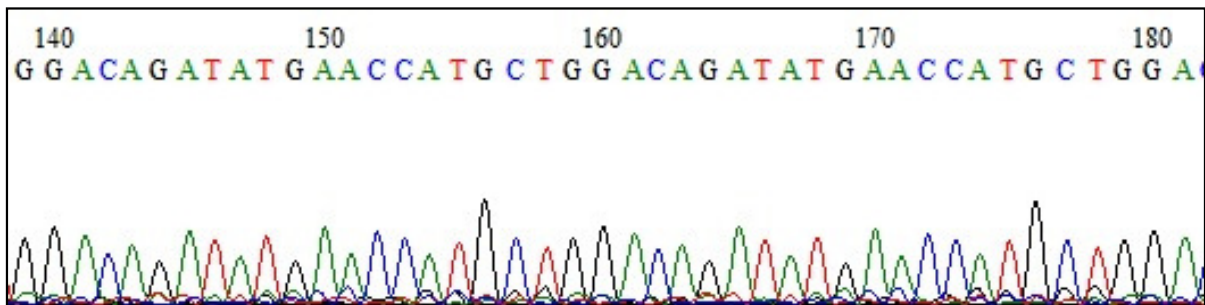


Figura 26. Aspecto parcial do cromatograma obtido para a sequência *forward* do produto de PCR resultante da amplificação de uma amostra do indivíduo 410, com o *primer* Bd1a.

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da eficácia do método de obtenção de DNA

Verificamos que o método de tratamento das amostras de *X. laevis*, a partir de duas incubações sucessivas, a primeira com quitinase e a segunda com proteinase K, permitiu obter DNA susceptível de ser amplificado por PCR. Esta técnica pode diminuir o tempo, os custos e o esforço nesta primeira fase, pois a obtenção de DNA amplificável é crucial nesta abordagem. Este método implicava a escolha da enzima Phire (Finnzymes) e respectivo tampão de reacção, para as reacções de amplificação, e baseou-se nas características desta enzima pois esta amplifica o DNA molde mesmo na presença de inibidores, o que nos permitiu fazer uma PCR “semi-directa”.

Para verificar se conseguíamos amplificação de DNA a partir destas amostras utilizamos *primers* menos específicos (LROR e LR5) os quais amplificam a subunidade ribossomal maior (28S) de muitos fungos e também de outros organismos, daí serem designados por *primers* universais. A visualização de bandas em gel de agarose, mostrou que houve amplificação por PCR a partir das amostras provenientes dos indivíduos capturados em 2007 e guardados em álcool no museu. Isto também nos ajudou a perceber que poderíamos continuar a investir esforços para amplificação de DNA das amostras obtidas dos indivíduos capturados em 2010.

5.2. Detecção do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

Para detectar o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* optámos por utilizar nas amplificações por PCR, os *primers* Bd1a e Bd2a, por terem sido descritos por Annis et al (2004) como sendo eficazes (amplificaram todos os genomas deste fungo ensaiados por estes autores) e específicos (não amplificaram outros DNAs, por exemplo o dos animais hospedeiros)

Nos primeiros ensaios com os *primers* Bd1a e Bd2a não conseguimos obter amplificação para a maioria das amostras analisadas, além de que a única amostra que amplificou, “banho” de F1, mostrou que estes *primers* não pareciam revelar especificidade, visto que o tamanho do fragmento de DNA esperado era de aproximadamente 300 pb [75, 84] e foram obtidos 3 fragmentos de tamanhos distintos.

Devido ao facto de não estarmos a obter resultados positivos nas amplificações das amostras com os *primers* Bd1a e Bd2a, optou-se por se fazer uma *nested* PCR utilizando na primeira reacção de amplificação o *primer* NS1 juntamente com o *primer* Bd2a, com o objectivo de conseguir assim a amplificação de uma região maior, onde estaria inserida a região ITS. Caso a amostra contivesse DNA de *B. Dendrobatidis*, este seria em seguida amplificado pelos *primers* Bd1a e Bd2a. Também através da *nested* PCR conseguiríamos fazer uma diluição dos reagentes da primeira PCR, especialmente do DNA utilizado e de potenciais inibidores que pudessem estar a impedir a amplificação destas amostras. No final da segunda PCR (*nested*) observou-se que duas amostras, “banho” de F1 e mancha de 411, tinham amplificado, observando-se fragmentos de DNA com 1000 e 1650 pb aproximadamente (tabela 13), sendo que para o indivíduo 411 se observaram duas bandas distintas (fig. 23). A análise das sequências obtidas a partir desses produtos de PCR, revelou não haver identidade entre estes fragmentos e a região ITS do DNA ribossomal de *B. dendrobatidis*. Este resultado revelou não ter havido uma amplificação da região pretendida e aponta para uma inespecificidade dos *primers* Bd1a e Bd2a, ao contrário do sugerido por Annis et al (2004).

Nos ensaios realizados com as três PCRs consecutivas, para além de conseguirmos uma maior diluição do DNA (e simultaneamente de possíveis inibidores), outro objectivo foi tentarmos obter maior especificidade na amplificação, caso esta se viesse a verificar. A utilização dos *primers* BOB5 e BOB6, numa primeira PCR, possibilitaria a amplificação de uma região maior do DNA ribossomal, sendo que esta mesma região abrange as regiões ITS, utilizadas para identificação de espécies [80, 82 e 83]. A escolha destes *primers* tinha a vantagem adicional de também terem sido utilizados para a amplificação de DNA de *B. Dendrobatidis* [88]. No final de uma segunda PCR com estes mesmos *primers* pode-se visualizar bandas com tamanhos distintos entre si a partir de quatro amostras (tabela 13). Para mais uma vez tentar amplificar a região descrita como conservada neste fungo, com os *primers* Bd1a e Bd2a foi feita uma terceira PCR, desta vez com este último par de *primers*. Neste *nested* PCR, obteve-se para cada uma das amostras, produtos de amplificação com os tamanhos observados anteriormente, na segunda PCR realizada com os *primers* BOB5 e BOB6. A possível explicação para este resultado é que os *primers* BOB5 e BOB6 ainda que diluídos, estejam em quantidade suficiente na mistura de reacção, para que possam ter sido os responsáveis (e não Bd1a e Bd2a) pelos produtos de PCR obtidos. A sequenciação destes produtos, nomeadamente do relativo à amostra do indivíduo 410, foi realizada somente com

os pares de *primers* Bd1a e Bd2a, e o resultado do *blast* aberto revelou uma certa identidade com sequências nucleotídicas de *Homo sapiens*. Porém a região de emparelhamento foi pequena e a máxima identidade reduzida, pelo que não podemos afirmar que tivesse havido contaminação da amostra com DNA humano. No entanto, uma vez que se admitiu que não tenham sido estes os *primers* envolvidos na amplificação destes produtos, valerá a pena fazer futuramente a sua sequenciação com os *primers* BOB 5 e BOB 6.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Caso a introdução de *Xenopus laevis* na ribeira da Lage tenha originalmente ocorrido no Jardim do Marquês de Pombal, a não detecção da espécie ao longo de 30 anos, poderá ser explicada pela reduzida densidade e pelas características ecológicas da espécie: totalmente aquática, vivendo grande parte da sua vida no fundo dos corpos de água, em combinação com o número reduzido de visitas à ribeira por humanos devido ao seu difícil acesso e, particularmente, à degradação ambiental do curso de água [52].

O possível local (ou locais) de introdução desta espécie na ribeira de Barcarena ainda permanece desconhecido. A área entre a ribeira da Lage e de Barcarena é, desde a década de 1970, completamente urbanizada e com diversas rodovias e não existe até à data referência à espécie na ribeira temporária de Paço de Arcos (Porto Salvo), localizada entre as duas ribeiras [52]. Assim, a passagem de indivíduos da ribeira da Lage para a ribeira de Barcarena por via terrestre apresenta-se como pouco provável. No entanto, a concentração das populações de Barcarena nos pontos mais a montante pode ser uma indicação de que a colonização se poderá ter dado via um dos afluentes mais a montante da Lage. Outras vias de introdução poderão ter sido o arrastamento ao longo da costa em período de preia-mar (Rebelo *com. pess.*) ou a libertação na natureza de espécimes comercializados em lojas de animais de companhia ou translocados da ribeira da Lage. Trata-se de hipóteses que apenas estudos pormenorizados de genética poderão esclarecer, investigando a origem, comum ou não, das duas populações.

Aparentemente o programa de erradicação ainda não teve efeitos claramente mensuráveis na população de *Xenopus laevis*. As capturas crescentes ao longo da época de 2010 podem querer dizer que há muitos mais animais escondidos ou situados em locais não visitados nas ribeiras da Lage e Barcarena, e que podem recolonizar rapidamente os locais de remoção. Torna-se, assim, importante a continuidade do plano de erradicação, a fim de poder verificar se houve ou não uma diminuição dos efectivos, assim como a expansão do plano de capturas a todas as regiões das ribeiras entre as quais a espécie foi detectada neste primeiro ano.

Relativamente à pesquisa sobre *Batrachochytrium dendrobatidis*, a hipótese de que o mesmo não esteja presente nas populações de *X. laevis* estudadas pode ser uma realidade. A população introduzida de *X. laevis* amostrada é possivelmente descendente de animais que estiveram durante algum tempo em laboratórios do Instituto Gulbenkian de Ciência [52],

podendo aí ter perdido o fungo de que presumivelmente seria portadora. Nesse caso quando posteriormente alguns animais passaram do laboratório para a ribeira vizinha, já não seriam portadores de *B. dendrobatidis*. Uma outra hipótese é a simples ausência do fungo entre os animais que foram usados como fundadores da população em cativeiro.

No entanto, a ausência de um resultado positivo nesta pesquisa de *Batrachochytrium dendrobatidis* pode vir a ser contrariada por posteriores estudos realizados nas populações de *X. laevis* presentes nas ribeiras da Lage e de Barcarena, pois outras técnicas na detecção de *B. dendrobatidis* poderão ser ensaiadas. Um controle positivo de *B. dendrobatidis*, para poder ser comparado com os resultados dos produtos de PCR amplificados com estas amostras, facilitaria a optimização da detecção do fungo.

Quanto aos *primers* que utilizámos e descritos como sendo específicos para a detecção de *B. dendrobatidis*, podemos afirmar que deverão ser utilizados com cautela, principalmente porque são propostos e utilizados em abordagens de PCR quantitativo. Neste caso, é apenas detectada a amplificação de DNA, não sendo os produtos de amplificação sujeitos a visualização por electroforese ou a sequenciação. No nosso caso houve amplificação, mas o tamanho dos produtos de PCR não era o esperado, e as sequências obtidas não revelaram ser idênticas às de *B. dendrobatidis* presentes nas bases de dados. Contudo, sem ter em conta estes dois últimos dados, poderíamos ter concluído que estávamos a detectar este fungo nas nossas amostras.

A continuidade da pesquisa da presença do fungo *B. dendrobatidis* nas populações de *X. laevis* existentes em Portugal continua a ser importante, visto que este fungo provoca uma patologia mortal em anfíbios de outras espécies, podendo conduzi-los até mesmo a extinção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Genovesi, P. & Shine, C. (2003). *European strategy on invasive alien species*. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats; Strasbourg 5th December.
- [2] Platenberg, R. J. (2007). Impacts of introduced species on an island ecosystem: non-native reptiles and amphibians in the US Virgin Islands. Pp. 168-174. *In* Witmer, G. W., Pitt, W. C. & Fagerstone, K. A. (Eds.). *Managing vertebrate invasive species: proceedings of an international symposium*. USDA/APHIS/WS, National Wildlife Research Center, Fort Collins, CO.
- [3] Williamson, M. (1996). *Biological invasions*. Chapman & Hall, London, UK.
- [4] Crooks, J. A. & Soule, M. E. (1999). Lag times in population explosions of invasive species: Causes and implications. Pp 103-125. *In* Sandlund, P. J. & Viken, A. (Eds.). *Invasive Species and Biodiversity Management*. New York: Kluwer Academic Publishers.
- [5] McKinney, M. L. & Schoch, R. M. (2003). *Environmental Science, systems and solutions*, 3rd edition. Pp 265-268. Massachusetts, U.S.A: Jones and Bartlett Pub.
- [6] Birnbaum, C. (2006). NOBANIS. Invasive Alien Species Fact Sheet. *Dreissena polymorpha*. From: Online Database of the North European and Baltic Network on Invasive Alien Species. <www.nobanis.org>. Acedido a 12/10/2010.
- [7] Cruz, M. J. & Rebelo, R. (2006). Vulnerability of Southwest Iberian amphibians to an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*. *Amphibia-Reptilia* **26**: 293-304.
- [8] CBD, Convention on Biological Diversity (1992). <<http://www.cbd.int/biosafety/protocol.shtml>>. Acedido a 19/05/2009.
- [9] Genovesi, P. (2004). Eradications of invasive alien species in Europe: a review. *Biological Invasions* **7**(1): 127-133.
- [10] Donlan, C. J. & Wilcox C. (2007). Complexities of costing eradications. *Animal Conservation* **10**: 154-156.

- [11] Sax, D. F. & Gaines, S. D. (2008). Species invasions and extinction: The future of native biodiversity on islands. *The National Academy of Sciences*. <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0802290105 PNAS _ August 12, 2008 _ vol. 105 _ suppl. 1>. Acedido a 14/08/2010.
- [12] Ebbert, S. E. & Byrd, G. V. (2002). Eradications of invasive species to restore natural biological diversity on Alaska Maritime National Wildlife Refuge. In Veitch, D. & Clout, M. (Eds.), *Turning the Tide: the Eradication of Invasive Species*, Pp 102-109. IUCN SSC Invasive Species Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland & Cambridge, UK.
- [13] Donlan, C. J. & Wilcox, C. (2007). Complexities of costing eradications. *Animal Conservation* **10**: 154-156.
- [14] Burbridge, A. A. & Morris, K. D. (2002). Introduced mammal eradications for nature conservation on Western Australian islands: a review. In Veitch, D. & Clout M (Eds.). *Turning the Tide: the Eradication of Invasive Species*. Pp 64-70. IUCN SSC Invasive Species Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland & Cambridge, UK.
- [15] Bax, N., Hewitt, C., Campbell, M. & Thresher, R. (2002). Man-made marinas as sheltered islands for alien marine organisms: Establishment and eradication of an alien invasive marine species. Pp 26-39. In Veitch, D. & Clout, M. (Eds.). *Turning the tide: the eradication of invasive species*. IUCN SSC Invasive Species Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland & Cambridge, UK.
- [16] Kraus, F. (2007). Using pathway analysis to inform prevention strategies for alien reptiles and amphibians. Pp 94-103. In Witmer, G. W., Pitt, W. C. & Fagerstone, K. A. (Eds.). *Managing vertebrate invasive species: proceedings of an international symposium*. USDA/APHIS/WS, National Wildlife Research Center, Fort Collins, CO.
- [17] Engeman, R. M., Sayama, S. & Linnell, M. A. (1998a). Operational utility of perimeter trapping for removing brown tree snakes (*Boiga irregularis*) from a defined area. *The Snake* **28**: 19-22.
- [18] Engeman, R. M., Vice, D. S., Nelson, G. & Muña, E. (2000). Brown tree snakes effectively removed from a large plot of land on Guam by perimeter trapping. *International Biodeterioration & Biodegradation* **45**: 139-142.

- [19] Engeman, R. M., Vice, D. S., Rodriguez, D. V., Gruver, K. S., Santos, W. S. & Pitzler, M. E. (1998b). Effectiveness of the detector dogs used for deterring the dispersal of brown tree snakes. *Pacific Conservation Biology* **4**:256-260.
- [20] Beard, K. H. & O'Neill, E. M. (2005). Infection of an invasive frog *Eleutherodactylus coqui* by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hawaii. *Biological Conservation* **126**: 591-595.
- [21] Engeman, M. R., Linnell, A. M., Aguon, P., Manibusan, A., Sayama, S. & Techaria, A. (1999). *Wildlife Research* **26**: 111-116.
- [22] Savarie, P. J., Mathies, T. C. & Fagerstone, K. A. (2007). Flotation Materials For Aerial Delivery Of Acetaminophen Toxic Baits To Brown Treesnakes. Pp 218-223. In Witmer, G. W., Pitt, W. C. & Fagerstone, K. A. (Eds.). *Managing vertebrate invasive species: proceedings of an international symposium*. USDA/APHIS/WS, National Wildlife Research Center, Fort Collins, CO.
- [23] Somma, L. A. (2009). *Eleutherodactylus coqui*. USGS Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL. <<http://nas.er.usgs.gov/queries/FactSheet.asp?speciesID=60>>. Acedido a 20/05/2009.
- [24] Sin, H. & Radford, A. (2007). Coqui frog research and management efforts in Hawaii. Pp 157-167. In Witmer, G. W., Pitt, W. C. & Fagerstone, K. A. (Ed.). *Managing vertebrate invasive species: proceedings of an international symposium*. USDA/APHIS/WS, National Wildlife Research Center, Fort Collins, CO.
- [25] Seabrook, W. (1991). Range expansion of the introduced cane toad *Bufo marinus* in New South Wales. *Australian Zoologist* **27**(3/4): 58-62.
- [26] Hayes, R. A., Barrett, A., Alewood, P. F., Grigg, G. C. & Capon R. J. (2008). Use of Chemical Ecology for Control of the Cane Toad? *Chemical Signals in Vertebrates* **11**: 409-417.
- [27] Urban, M. C., Phillips, B. L., Skelly, D. k. & Shine, R. (2007). The cane toad's (*Chaunus* [*Bufo*] *marinus*) increasing ability to invade Australia is revealed by a dynamically updated range model. *Proceedings of the Royal Society B* **274**: 1413-1419.

- [28] Tinsley, R. C. & McCoid, M. J. (1996). Feral populations of *Xenopus* outside Africa. Pp 81-94. In Tinsley, R. C. & Kobel, H. R. (Eds.). *The Biology of Xenopus*. Oxford: Clarendon Press.
- [29] Gurdon, J. B. (1996). Introductory comments: *Xenopus* as a laboratory animal. Pp 3-5. In Tinsley, R. C. & Kobel, H. R. (Eds.), *The Biology of Xenopus*. Oxford: Clarendon Press.
- [30] Weldon, C., du Preez L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., & Speare R. (2004). Origin of the Amphibian Chytrid Fungus. *Emerging Infectious Diseases* **10**(12): 2100-2105.
- [31] Tinsley, R. C., Loumont, C. & Kobel, H. R. (1996). Geographical distribution and ecology. Pp 35-59. In Tinsley, R. C. & Kobel, H. R. (Eds.), *The Biology of Xenopus*. Oxford: Clarendon Press.
- [32] Stebbins, R. C. (2003). *A Field Guide to Western Reptiles and Amphibians*, 3rd edition. Pp 533. Boston: Houghton Mifflin Company.
- [33] Channing, A. (2001). *Amphibians of Central and Southern Africa*. Pp 470. Ithaca: Cornell University Press.
- [34] Munoz, R. S., Villalobos, G. L. & Walton, A. I. (2004). *Antecedentes sobre la Biología de Xenopus laevis y su introducción en Chile*. <http://boletindeproren.sag.gob.cl/marzo_abril2005/pdf_mayo/presentacion_xenopus_lalael.pdf>. Acedido a 30/05/2010.
- [35] Harada, Y., Goto, M., Ebihara, S., Fujisawa, H., Kegasawa, K. & Oishi, T. (1998). Circadian locomotor activity rhythms in the african clawed frog, *Xenopus laevis*: the role of the eye and the hypothalamus. *Biological Rhythm Research* **29**(1): 30-48.
- [36] Kobel, H. R., Loumont, C. & Tinsley, R. C. (1996). The extant species. Pp 9-33. In Tinsley, R. C. & Kobel, H. R. (Eds.). *The Biology of Xenopus*. Oxford: Clarendon Press.
- [37] IUCN, International Union for Conservation of Nature (2006). *Conservation International, and Nature Serve, 2006_ Global Amphibian Assessment*. <www.globalamphibians.org>. Acedido a 19/05/2009.
- [38] Hatzofe, O. (2006). *Invasive Species in Israel*. Israel Nature & Parks Authority internal report.

- [39] Royero, R. & Hernandez, O. (1996). Presencia de *Pipa parva* (Anura: Pipidae) en la cuenca del lago de Valencia, Venezuela: un problema de introducción de especies. *Biollania* **11**: 57-62.
- [40] RAN, Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios (2009). *Espécies exóticas invasoras – O caso dos anfíbios*. IBAMA. <http://www.icmbio.gov.br/ran/index.php?id_menu=143&id_arq=3>. Acedido a 23/07/2009.
- [41] Measey, G. J. (1998). Diet of feral *Xenopus laevis* (Daudin) in South Wales, U.K. *J. Zool. (Lond.)* **246**: 287-298.
- [42] Lobos, G. & Measey, G. J. (2002). Invasive Populations of *Xenopus laevis* (Daudin) in Chile. *Herpetological Journal* **12**: 163-168.
- [43] Lafferty, K. D. & Page, C. J. (1997). Predation on the endangered tidewater goby, *Eucyclogobius newberryi*, by the introduced African clawed frog, *Xenopus laevis*, with notes on the frog's parasites. *Copeia* **3**: 589-592.
- [44] Ramsey, D. S. L., Parkes, J. & Morrison, S. A. (2009). Quantifying Eradication Success: the Removal of Feral Pigs from Santa Cruz Island, California. *Conservation Biology* **23**(2): 449-459.
- [45] St. Amant, J. A. (1975). Exotic visitor becomes permanent resident. *Terra* **13**: 22-23.
- [46] Stanford, J. W. & Rodda, G. H. (2007). The brown treesnake rapid response team. Pp 175-187. In Witmer, G. W., Pitt, W. C. & Fagerstone, K. A. (Eds.). *Managing vertebrate invasive species: proceedings of an international symposium*. USDA/APHIS/WS, National Wildlife Research Center, Fort Collins, CO.
- [47] Rejmánek, M. & Pitcairn, M. J. (2002). When is eradication of exotic pest plants a realistic goal? Pp 249–253. In Veitch, C. R. & Clout, M. N. (Eds.). *Turning the tide: the eradication of invasive species*. IUCN SSC Invasive Species Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland & Cambridge, UK.
- [48] Orueta, J. F. (2002). *Manual práctico para o manejo de vertebrados invasores nas Ilhas de Espanha e Portugal*. Projecto LIFE2002NAT/CP/E/000014.

- [49] Shannon, M. F. & Bayliss, P. (2008). *Review of the CSIRO Biological Control of Cane Toad Program to April 2008*. Australian Government Department of Environment, Water, Heritage and the Arts.
- [50] Schwarzkopf L & Alford R. A. (2007). Acoustic attractants enhance trapping success for cane toads. *Wildlife Research* **34**: 366-370.
- [51] Prinsloo, J. F., Schoonbee, H. J. & Nxiweni, J. G. (1981). Some observations on biological and other control measures of the African clawed frog, *Xenopus laevis* (Daudin) (Pipidae, Amphibia) in fish ponds in Transkei. *Water South Africa* **7**: 88-96.
- [52] Rebelo, R., Amaral, P., Bernardes, M., Oliveira, J., Pinheiro, P. & Leitão, D. (2010). *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), a new exotic amphibian in Portugal. *Biological Invasions*.
- [53] Bernardes, M. (2008). *Avaliação da população de uma nova espécie exótica em Portugal – Xenopus laevis (Daudin 1802): Biologia populacional e Fenologia*. Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa, Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências.
- [54] Measey, G. J. (2001). Growth and ageing of feral *Xenopus laevis* (Daudin) in South Wales, U.K. *J. Zool. (Lond.)* **254**: 547-555.
- [55] Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**: 183-190.
- [56] McCoid, M. J. & Fritts, T. H. (1980). Observations of feral populations of *Xenopus laevis* (Pipidae) in southern California. *Bull. Sth. Calif. Acad. Sci.* **79**: 82-86.
- [57] Wager, V. A. (1965). *The frogs of South Africa*. Cape Town, South Africa: Purnell and Sons.
- [58] Measey, G. J. (2004). Species accounts: *Xenopus laevis* (Daudin). Pp 264-266. In Minter, L. R., Burger, M., Harrison, J. A., Braach, H. H., Bishop, P. J., Kloepfer, D. (Eds.). *Atlas and Red Data Book of the Frogs of South Africa, Lesotho and Swaziland*. Washinton, DC.:SI/MAB Series #9.
- [59] Hickman, C. P., Roberts, L. S. & Larson, A. (2001). *Zoology: integrated principles*, 11th edition. Pp: 824-25. New York: McGraw-Hill.

- [60] (Trivers, R. L. & Willard, D. E. (1973). *Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring*. In : Sieff, D. - Explaining biased sex ratios in human populations: a critique of recent studies. *Current Anthropology* **31**(1): 25-48.
- [61] Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues A. S. L., Fischman, D. L. & Waller, R. W. (2004). Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* **306**(5702): 1783 – 1786.
- [62] Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., Green, D. E. & Speare, R. (1999). Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. *Emerging Infectious Diseases* **5**(6): 735–748.
- [63] Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. A., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli, G., and Parkes, H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 9031-9036.
- [64] Mitchell, K. M., Churcher, T. S., Garner, T. W. J. & Fisher, M. C. (2008). Persistence of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* outside the amphibian host greatly increases the probability of host extinction. *Royal Society–B* **275**: 329-334.
- [65] Bovero, S., Sotgiu, G., Angelini, C., Doglio, S., Gazzaniga, E., Cunningham, A. A. & Garner, T. W. J. (2008). Detection of Chytridiomycosis Caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Endangered Sardinian Newt (*Euproctus platycephalus*) in Southern Sardinia, Italy. *Journal of Wildlife Diseases* **44**(3): 712–715.
- [66] Garner T. W. J., Walker S., Bosch, J., Hyatt, A., Cunningham, A. & Fisher M. C. (2005). Chytrid fungus in Europe. *Emerging Infectious Diseases* **11**: 1639-41.
- [67] Murray, K. A., Skerratt, L. F., R., Speare, R. & H. McCallum. 2009. Impact and dynamics of disease in species threatened by the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology* **23**:1242–1252.
- [68] Berger, L., Speare, R., Hyatt, A. (1999). Chytrid fungi and amphibian declines: Overview, implications and future directions. Pp. 23-33. *In Declines and Disappearances of Australian Frogs*. A. Campbell (Eds.). *Environment Australia*. Canberra-Australia.

- [69] Marantelli, G., Berger L., Speare R. & Keegan, L. (2004). Distribution of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. *Pacific Conservation Biology* **10**: 173-179.
- [70] Padgett-Flohr, G. E. & Goble, M. E. (2007). Evaluation of tadpole mouthpart depigmentation as a diagnostic test for infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* for four California anurans. *Journal of Wildlife Diseases* **43**:690-699.
- [71] Blaustein, A. R., Romansic, J. R., Scheessele, E. A., Han, B. A., Pessier, A. P. & Longcore, J. E. (2005). Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology* **19**:1460-1468.
- [72] Schloegel, L. M., Picco, A. M., Kilpatrick, A. M., Davies, A.J., Hyatt, A. D. & Daszak, P. (2009). Magnitude of the US trade in amphibians and the presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biological Conservation* **142**:1420-1426.
- [73] Pessier, A. P., Nichols, D. K., Longcore, J. E. & Fuller, M. S. (1999). Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **11**:194-199.
- [74] Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, Ross, A., Skerratt, L. F. & Speare, R. (2009). Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. *Science* **326**(5952): 582.
- [75] Toledo, L.F., Haddad, C.F.B., Carnaval, A.O.C.Q. & BRITTO, F.B. (2006). A Brazilian anuran (*Hylodes magalhaesi*: Leptodactylidae) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*: a conservation concern. *Amphibian and Reptile Conservation* **4**(1): 17-21.
- [76] Yang, H., Baek, H., Speare, R., Webb, R., Park, S., Kim, T., Lasater, K. C., Shin, S., Son, S., Park J., Min, M., Kim, Y., Na, K., Lee, H. & Park S. (2009). First detection of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in free-ranging populations of amphibians on mainland Asia: survey in South Korea. *Diseases of Aquatic Organisms* **86**: 9-13.

- [77] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988.) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- [78] Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad W.G. & Hodgkin, T. (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- [79] Faleiro, F. G. (2007). Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos. P. 21. Planaltina, DF: *Embrapa Cerrados* 21.
- [80] Schliitterer, C., Hauser, M., Haeseler, A.& Tautz, D. (1994). Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Regions in Drosophila. *Mol. Biol. Evol.* **11**(3): 513-522.
- [81] Drouin, Guy., Sbvigny, Jean-Marie., McLaren, I. A., Hofman J. D. & Doolittle W. F. (1992). Variable Arrangement of 5s Ribosomal Genes within the Ribosomal DNA Repeats of Arthropods. *Mol. Biol. Evol.* **9**(5): 826-835.
- [82] Gomes, E. A., Kasuya, M. C. M., Barros, E. G., Borges, A. C. & Araújo E. F. (2002). Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology* **25**(4): 477-483
- [83] Menezes J. P., Lupatini, M., Antonioli, Z. I., Blume, Elena., Junges, E. & Manzoni C. G. (2010). Variabilidade genética na região its do rdna de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Chrysanthemi*. *Ciênc. agrotec.* Lavras **34**(1): 132-139.
- [84] Annis, S. L., Dastoor, F. P., Ziel, H., Daszak, P. & Longcore, J. E. (2004). A Dna-Based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibians. *Journal of Wildlife Diseases* **40**(3): 420-428.
- [85] Woodhams, D. C., Voyles, J., Lips, K. R., Carey, C. and Rollins-Smith, L. A. (2006). Predicted disease susceptibility in a panamanian amphibian assemblage based on skin peptide defenses. *Journal of Wildlife Diseases* **42**(2): 207–218.
- [86] Soto-Azat, C., Clarke, B. T., Poynton J. C. & Cunningham, A. A. (2010). Widespread historical presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in African pipid frogs. Diversity and Distributions, *Diversity Distrib.* **16**: 126-131.

- [87] Solís, R., Lobos, G., Walker, S. F., Fisher, M. & Bosch, Jaime. (2010). Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in feral populations of *Xenopus laevis* in Chile. *Biol. Invasions* **12**: 1641-1646.
- [88] Boyle, D. G., Olsen, V., Morgan, J. A. T. & Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* **60**: 141-148.
- [89] Hyatt, A. D., Boyle, D. G., Olsen, V., Boyle, D. B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F. & Colling, A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* **73**: 175-192.
- [90] Kriger, K. M., Hero, J. & Ashton, K. J. (2006) Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* **71**: 149-154.
- [91] Binder, M & Hibbett, D. S. (2002). Higher-level phylogenetic relationships of Homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Mol Phyl Evol* **22**: 76-90.
- [92] White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Pp. 315-322. Academic Press, Inc.

ANEXOS

Tabela I. Registo das coordenadas rectangulares de cada um dos locais de amostragem.

Local	WGS 1984 Zone 29N	
	Coord_XX	Coord_YY
Ribeira da Lage		
Ponte Talaíde	472243	4287316
Bairro dos Navegadores	472303	4286941
Hortas da Lage	472643	4285649
Bairro da Lage	472709	4284624
Estação Agronómica Nacional	472573	4283378
Jardim Marquês de Pombal	472569	4282673
Parque Municipal	472656	4282415
Ribeira de Barcarena		
Ponte de S. Marcos	474815	4289263
Lugar do Bico	475072	4288632
Fábrica da Pólvora	475177	4288188
Ribeira-abaixo	475486	4287448
Qta. N. Sra. Da Conceição	475840	4286495
Pedreira Italiana	476245	4285073
Murganhal	476253	4284536
Ribeira de Porto Salvo		
"montante"	473970	4286073
"jusante"	474320	4284608



Figura I. *Xenopus laevis* adulto. (Fotografia de Marta Bernardes)



Figura II. (A) Remoção de girinos de *Xenopus laevis*; (B) Girino no estágio 43. (Fotografias da autora)



Figura III. Colocação das armadilhas na ribeira da Lage. (Fotografia de Mónica Sousa)



Figura IV. Dimensão do diâmetro abdominal de uma fêmea em relação à abertura (gargalo) da armadilha.
(Fotografia de Mónica de Sousa)



Figura V. Capturas com pesca eléctrica.

Protocolo de purificação dos produtos da PCR:

Product List

Product	Rep.	Contents	Cat.#
JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit 250	25	50 Spin Columns Solutions, Reagents	400250
JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit 1250	250	250 Spin Columns Solutions, Reagents	400250
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit 250	25	50 Spin Columns Solutions, Reagents	400250
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit 1250	250	250 Spin Columns Solutions, Reagents	400250
JETQUICK PCR Purification Spin Kit 250	25	50 Spin Columns Solutions, Reagents	400250
JETQUICK PCR Purification Spin Kit 1250	250	250 Spin Columns Solutions, Reagents	400250

Worldwide Contact:

GENOMED GmbH

Postfach 22

D-32584 Löhne

Tel: +49/ 05732- 90470-0

Fax: +49/ 05732- 90470-10

E-mail: info@genomed-dna.com

Web: www.genomed-dna.com


Protocol

March 2010

JETquick

Spin Column Technique

Plasmid Miniprep
Gel Extraction
PCR Purification



New Version!!!

Contents

JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit

Description	2 - 3
Culture Volumes / Solutions	4
Protocol	5 - 6
Trouble-Shooting	7 - 8

JETQUICK Gel Extraction Spin Kit

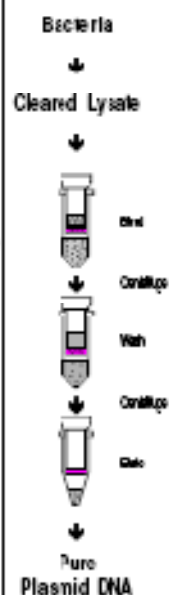
Description	9
Solutions	10
Protocol	11 - 12
Trouble-Shooting	13

JETQUICK PCR Purification Spin Kit

Description	14
Solutions	15
Protocol	16 - 17
Trouble-Shooting	18

Description/ Plasmid Miniprep

Procedure: c. 20 min
DNA Yield: up to 50 µg
DNA Recovery: 80 - 90%
DNA Size: up to 2 kb
DNA Purity: nucleic acid
DNA Elution: buffer or water
Advantage: No phenol
 No chloroform
 42000A250 > 10
 1-5 ml culture volume
 high reproducibility



Description/ Plasmid Miniprep

The JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit provides a very simple and reliable method to isolate highly pure plasmid DNA on the basis of spin columns. The entire procedure is completed in 20 min or less with ready-to-use DNA in TE buffer or water.

IMPORTANT!

The JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit is preferably intended for the preparation of high copy plasmid DNA.

Procedure: The procedure employs a modified alkaline/SDS method to prepare the cleared lysate. After neutralization, the cleared lysate is applied directly onto a JETQUICK Micro-Spin Column and the plasmid DNA is bound to the adsorption matrix.

One wash is usually sufficient to remove RNA, proteins and all other impurities. The purified plasmid DNA is eluted from the spin column in TE buffer or water (no alcohol precipitation).

Plasmid yields: High copy plasmid DNA of sizes up to 20 kb can be prepared from up to 5 ml culture volumes. Yields of up to 50 µg of plasmid DNA can be expected using the JETQUICK columns. Yield depends very much on the type of plasmid DNA, the bacterial strain and the volume of bacterial culture used. The recovery of plasmid DNA is on average between 90% and 95%.

Plasmid purity: The JETQUICK-purified plasmid DNA is highly pure matching CsCl purified plasmid DNA. Its recommended application range is correspondingly extremely wide, including fluorescent and radioactive sequencing, ligation, cloning, amplification, labeling, restriction analysis, and other enzymatic reactions.

- 3 -

Protocol/ Plasmid Miniprep

Very important!

- Before starting the procedure, make sure that buffers GX and G4 are reconstituted, as indicated on the bottle's label.
- Solution G1 contains RNase and should be stored at 4°C.
- All centrifugation steps are carried out at $\geq 12,000 \times g$ in a conventional table-top microfuge.
- Do not overload the spin column. The use of 1-3 ml *E. coli* cultures is recommended. The maximum of culture used should be 5 ml. With higher culture volumes DNA yield and quality may decrease rapidly.

1. **Harvesting Bacterial Cells** *E. coli* cells are pelleted by centrifugation. Remove all traces of medium carefully. Make sure that culture medium back-drains from the tube's wall is removed.

2. **Cell Resuspending** Add 250 µl of solution G1 to the pellet and resuspend the cells (by vortexing or with a pipette) until the suspension is homogeneous.

3. **Cell Lysis** Add 250 µl of solution G2 and mix gently, but thoroughly, by inverting the tube several times. Do not vortex! Incubate at room temperature for 5 min.

4. **Neutralization** Add 350 µl of solution G3 and mix gently but thoroughly, by inverting the tube until a homogeneous suspension is obtained. Do not vortex! Centrifuge the mixture at room temp. and at maximum speed for 10 min.

- 5 -

Culture Volumes and Solutions

Culture Volumes The JETQUICK Plasmid Kit is preferably intended to extract and purify high copy plasmid DNA from *E. coli* cultures.

GENOMED recommends LB medium to grow *E. coli* cells to isolate plasmid DNA with JETQUICK columns. However, the JETQUICK system is compatible with other growth media as well, especially media designed for enhanced plasmid yields. The cell density should be approximately 1×10^8 cells per ml medium (1-1.5 A_{600} units/ml).

Reconstitution of buffers GX and G4

The bottles of buffers GX and G4 contain concentrated buffer solution. Before use, add absolute ethanol (98-100%) as stated on the bottle's label.

Solution G1 (Cell Suspension)	Store at 4°C
50 mM Tris-HCl (pH 8.0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A.	
Solution G2 (Cell Lysis)	Store at RT
200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)	
Solution G3 (Neutralization/Binding)	Store at RT
Contains acetate and guanidine hydrochloride	
Solution GX (Wash, optional)	Store at RT
Contains guanidine hydrochloride	
Solution G4 (Column Wash)	Store at RT
Contains ethanol, NaCl, EDTA and Tris-HCl	

RT = room temperature

- 4 -

Protocol/ Plasmid Miniprep

5. **Column Loading** Place a JETQUICK spin column into a 2 ml receiver tube (provided). Load the supernatant from step 4 into the spin column. Centrifuge at $>12,000 \times g$ for 1 min. Discard the flowthrough.

6. **(Optional)** This additional column wash is recommended, if nuclease-rich bacteria (e.g. endA-strains of *E. coli*) are processed:
After having emptied the receiver tube re-insert the micro-spin column into it. Add 500 µl of reconstituted buffer GX into the spin column and centrifuge at $>12,000 \times g$ for 1 min. Discard flowthrough and place the JETQUICK column back into the same receiver tube. Proceed with step 7.

7. **Column Washing** Empty the receiver tube, and re-insert the spin column into the receiver tube. Add 500 µl of reconstituted buffer G4 and centrifuge at $>12,000 \times g$ for 1 min. Discard flowthrough and place the spin column back into the same receiver tube. Centrifuge again at maximum speed for 1 min. **Important:** Residual solution G4 will not be completely removed unless the flowthrough is discarded before this additional centrifugation.

8. **Plasmid Elution** Place the JETQUICK spin column into a new 1.5 ml microfuge tube and add 75 µl of sterile water (or TE buffer or 10 mM Tris-HCl, pH 8) directly onto the center of the silica matrix of the spin column. Centrifuge at $>12,000 \times g$ for 2 min.

Important: Higher DNA concentrations can be obtained if the elution is carried out in only 50 µl elution buffer volume. In this case, preheat your elution buffer to 65-70 °C, add the buffer onto the center of the silica matrix of the spin column and let stand for 1 min before centrifugation. Preheated elution buffer is generally recommended when plasmids >5 kb are eluted. DNA eluted in water should be stored at -20 °C.

- 6 -

Trouble-Shooting/Plasmid Miniprep

Please note that by not adhering to the protocol unsatisfactory results regarding yield and quality of the plasmid DNA may occur! If problems arise, check the following points:

1. All conditions regarding volumes, temperatures, incubation times and centrifugations were carried out precisely.
2. The solutions were stored at recommended temperatures.
3. JETQUICK columns were not overloaded with *E. coli* culture. The recommended culture volumes and calculated amounts of plasmid DNA have been taken into account.
4. Buffers GX and G4 have been reconstituted with absolute ethanol.

Low yields of plasmid DNA!

1. The total amount of plasmids in *E. coli* cells depends very much on the individual host-plasmid system. Plasmids vary in their copy number per cell (low/medium/high). The range of plasmid DNA per ml culture can vary from 0.2 µg/ml (low copy) to more than 5.0 µg/ml (high copy). Additionally, the size and sequence of specific DNA inserts may influence the copy number of a particular plasmid, and so the yield of plasmid DNA.

2. It is important that the specified volumes of solutions G1-G3 are kept precisely.

Low plasmid contents in bacteria!

If the host cells contain only low amounts of plasmid DNA, it is **not recommended** to increase the culture volume and the amount of bacteria beyond the recommended limits. In such a case a severe decrease of DNA yield may be observed, because of incomplete bacterial lysis.

- 7 -

Trouble-Shooting/Plasmid Miniprep

DNA concentration too low!

If the DNA concentration in the eluate is too low, the volume of elution buffer can be reduced. Smaller elution volumes lead to higher DNA concentrations (µg DNA/ml), but the absolute yield of DNA does decrease. Alternatively, the eluted DNA can be concentrated by a common alcohol precipitation.

Chromosomal DNA contamination!

Chromosomal bacterial DNA is removed from the preparation by precipitation after the addition of solution G3 and the centrifugation that follows. This is only successful if shearing of the chromosomal DNA after cell lysis is kept to a minimum. Shearing of the chromosomal DNA occurs when the sample is vortexed, after the addition of solution G2 or solution G3. Avoid vortexing during steps 3 and 4 of the protocol!

Additional plasmid forms!

An additional plasmid form, running on agarose gels in front of the supercoiled form, is due to irreversible denaturated plasmid DNA. The irreversible denaturation is likely to occur if the cell lysis (protocol, step 3) has been carried out for longer than the recommended 5 min under strongly alkaline conditions.

RNA contamination!

RNAse A digestion was insufficient. Make sure that culture volumes used correspond to those recommended. If solution G1 (contains RNAse) is older than 6 months, add new RNAse.

Ethanol in the eluate!

Centrifugation time was too short (step 7 of the protocol).

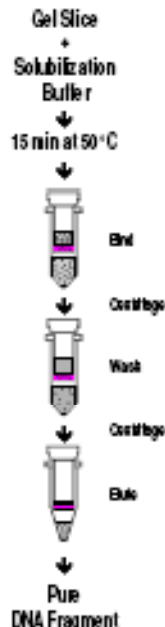
Need more information?

Check out our website www.genomed-dna.com under 'Troubleshooting'.

- 8 -

Description / Gel Extraction

Procedure: 25 min
 DNA Yield: up to 20 µg dsDNA
 DNA Recovery: 85-90%
 DNA Size: 40 bp-10 kb
 DNA Purity: highly pure
 DNA Elution: buffer or water
 Advantage: No phenol
 No chloroform
 No carbon ions
 - high-melt agarose
 - agarose > 2%
 - TAE, TBE, TPE gels



- 9 -

Solutions / Gel Extraction

Reconstitution of buffer L2

The bottle of buffer L2 contains concentrated buffer solution. Before use, add absolute ethanol (96-100%) as stated on the bottle's label.

Solution L3 (Gel Solubilization)	Slow at RT
Contains guanidine isothiocyanate	
Solution L2 (Wash, reconstituted)	Slow at RT
Contains ethanol, NaCl, EDTA and Tris/HCl	

RT = room temperature
 L3 contains guanidine isothiocyanate, use with proper precaution. Wear lab coat, gloves and safety goggles.

- 10 -

Protocol / Gel Extraction

Very important!

- Before starting the procedure, make sure that solution L3 is reconstituted, as indicated on the bottle's label.
- All centrifugation steps are carried out at $\geq 12,000 \times g$ in a conventional table-top microfuge.
- The use of 100 mg agarose gel slices per extraction is recommended (highest DNA purity). The maximum weight of gel slices is 400 mg per extraction.

1. Solubilization of agarose Expose the agarose gel slice (higher or low melting point agarose can be used) and transfer the slice into a suitable tube (don't use glass tubes at this step). For each 100 mg gel slice add 300 μ l of solution L3 and incubate at 60°C for 15 min. Mix every 3 min by flicking or venturing the tube to ensure that the agarose is completely solubilized.

Important: For gel slices with a 2% agarose concentration, add 600 μ l of solution L3 per 100 mg gel weight instead of 300 μ l. Larger gel slices (≥ 300 mg) and gel slices of higher agarose concentrations ($\geq 2\%$) take slightly longer to dissolve. In these cases increase the incubation time to 20 - 30 min. Cutting larger gel slices into small pieces will enhance solubilization. The maximum amount of agarose gel per JETQUICK column is 400 mg. Do not overload the JETQUICK columns.

2. Column loading Place 1 JETQUICK spin column into a 2 ml receiver tube and add the mixture from step 1 into the prepared spin column. Centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 1 min.

Discard the flowthrough. The spin column can be loaded with 600 μ l. For larger sample volumes multiple loadings are necessary.

- 11 -

Trouble-Shooting / Gel Extraction

When yields are low!

The protocol is designed to achieve high yields of more than 80%, depending on the size and amount of the DNA to be extracted. If low yields occur, this might be associated with:

1. Incorrect ratio of gel slice to solution L3:
 - see step 1 of the protocol
2. Incomplete solubilization of the gel slice:
 - see step 1 of the protocol
3. Incomplete DNA elution:
 - see step 4 of the protocol
 - preheat the elution buffer to 65 - 70°C, add the buffer directly onto the center of the silica matrix of the spin column and let stand for 1 min. Centrifuge at maximum speed for 1 min.
4. For large DNA fragments (> 5 kb):
 - preheat the elution buffer to 65 - 70°C, add the buffer directly onto the center of the silica matrix of the spin column and let stand for 1 min. Centrifuge at maximum speed for 1 min.
5. Supercoiled or circular DNA (plasmid DNA):
 - the kit is not designed to extract supercoiled plasmid DNA from agarose gels.

When enzymatic reactions are inhibited!

After elution the DNA is ready-to-use for many applications. Unsatisfactory results can be caused by the following:

1. Residual ethanol in the sample after DNA elution:
 - see step 3 of the protocol
2. Residual salt in the sample after DNA elution:
 - see step 3 of the protocol
 - use water or the following buffer to elute your DNA: (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 with 0.2 EDTA)

- 13 -

Protocol / Gel Extraction

Important: If the weight of the initial agarose gel slice is > 250 mg, it is recommended to insert an additional washing step with solution L3. Therefore, add 500 μ l of solution L3 to the JETQUICK column, let stand for 1 min at room temperature and centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 1 min. This additional step will yield better results if the eluted DNA is subsequently used for direct sequencing, *in vitro* transcription or microfraction.

3. Column washing Re-insert the spin column into the receiver tube and add 500 μ l of the reconstituted solution L3 into the spin column. Centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 1 min. Discard the flowthrough. Place the JETQUICK column back into the same receiver tube, and centrifuge again at maximum speed for 1 min.

Important: Residual solution L3 will not be completely removed unless the flowthrough is discarded before the additional centrifugation. The additional centrifugation step assures that no residual ethanol will be carried over into the next step.

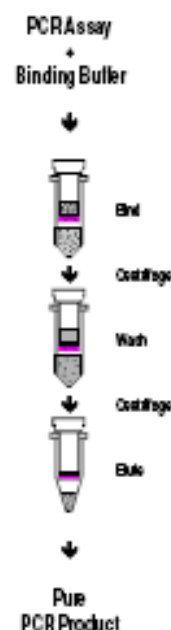
4. DNA Elution Place the JETQUICK spin column into a new 1.5 ml microfuge tube and add 50 μ l of sterile water (or TE buffer or 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) directly onto the center of the silica matrix of the JETQUICK spin column. Centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 1 min.

Important: Higher DNA concentrations can be obtained if the eluates carried out with only 30 μ l of elution buffer. In this case, preheat the elution buffer to 65-70°C, add the buffer directly onto the center of the spin column and let stand for 1 min before centrifugation. Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the silica membrane. Reheated elution buffer is generally recommended to achieve an optimal DNA elution. DNA eluted in water should be stored at -20°C.

- 12 -

Description / PCR Purification

Procedure: 5 min
DNA Yield: up to 20 μ g dsDNA
DNA Recovery: 85-95%
DNA Size: 30 bp-20 kb
DNA Purity: highly pure
DNA Elution: buffer or water
Advantages: No phenol
 No chloroform
 No nitrocellulose removal
 Primer removal >99.9%
 Separates 100bp dsDNA from 40mer primers



- 14 -

Solutions / PCR Purification

Reconstitution of buffer H2

The bottle of buffer H2 contains concentrated buffer solution. Before use, add absolute ethanol (96-100%) as stated on the bottle's label.

Solution H1 (Binding)	Store at RT
Contains guanidine hydrochloride, isopropanol	
Solution H2 (Wash, reconstituted)	Store at RT
Contains ethanol, NaCl, EDTA and TrisHCl	
RT = room temperature	
H1 contains guanidine hydrochloride, use with proper precaution.	

- 15 -

Protocol / PCR Purification

3. **Column Washing** Re-insert the spin column into the empty receiver tube and add 500 μ l of reconstituted solution H2. Centrifuge at $>12,000 \times g$ for 1 min.

Discard flowthrough and place the JETQUICK column back into the same receiver tube. Centrifuge again at maximum speed for 1 min.

Important: Residual solution H2 will not be completely removed unless the flowthrough is discarded before this additional centrifugation. Solution H2 contains ethanol, and residual ethanol may interfere with subsequent reactions. The additional centrifugation assures that no residual ethanol is carried over into the next step of the protocol.

4. **DNA Elution** Place the JETQUICK spin column into a new 1.5 ml microfuge tube and add 50 μ l of sterile water (or TE buffer or 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) directly onto the center of the silica matrix of the JETQUICK spin column. Centrifuge at $>12,000 \times g$ for 2 min.

Important: Higher DNA concentrations can be obtained if the elution is carried out with only 30 μ l of elution buffer. In this case preheat the elution buffer to 65-70°C, add the buffer directly onto the center of the silica matrix of the spin column and let stand for 1 min before centrifugation. Make sure that the elution buffer is dispensed directly onto the silica membrane. Preheated elution buffer is generally recommended when PCR fragments >5 kb are eluted. DNA eluted in water should be stored at -20°C.

- 17 -

Protocol / PCR Purification

Very Important!

- Before starting the procedure, make sure that solution H2 is reconstituted, as indicated on the bottle's label.
- Removal of mineral oil is not required.
- The JETQUICK procedure is not sensitive to detergents (like Triton X-100, NP40) or gelatin in the assay. Nevertheless, concentrations $> 0.1\%$ of Tween 20 should be avoided.
- All centrifugation steps are carried out at $\geq 12,000 \times g$ in a conventional table-top microfuge.

1. **Sample Preparation** Add 400 μ l of solution H1 to 100 μ l PCR assay and mix thoroughly.

Important: Make sure that the volume of your PCR assay does not exceed 100 μ l (not including the mineral oil overlay). When PCR assays $> 100 \mu$ l are used, remove most of the mineral oil with a pipette, and scale up solution H1 proportionally. In this case, multiple loadings of the spin column (step 2 of the protocol) are required.

2. **Column Loading** Place a JETQUICK spin column into a 2 ml receiver tube. Load the mixture from step 1 into the prepared spin column. Centrifuge at $>12,000 \times g$ for 1 min. Discard the flowthrough.

- 16 -

Trouble-Shooting/ PCR Purification

When yields are low!

The protocol is designed to achieve high yields of more than 80%. If low yields occur, they might be associated with:

1. **Insufficient amplification:**
 - Make sure that your PCR assay has worked well. Apply an aliquot of the PCR assay onto an agarose gel and check the amount of the desired PCR product.
2. **Incorrect DNA binding conditions:**
 - Make sure that the ratio of solution H1 (400 μ l) to your PCR assay (up to 100 μ l) was correct.
3. **Incomplete DNA elution:**
 - see step 4 of the protocol
 - preheat your elution buffer to 65 - 70°C, add the buffer directly onto the center of the silica matrix of the spin column and let stand for 1 min. Centrifuge at maximum speed for 1 min.
4. **For large DNA fragments (> 5 kb):**
 - preheat your elution buffer to 65 - 70°C, add the buffer directly onto the center of the silica matrix of the spin column and let stand for 1 min. Centrifuge at maximum speed for 1 min.

When enzymatic reactions are inhibited!

After elution the DNA is ready-to-use for many applications.

Unsatisfactory results can be caused by the following:

1. **Residual ethanol in the sample after DNA elution:**
 - see step 3 of the protocol
2. **Residual salt in the sample after DNA elution:**
 - see step 3 of the protocol
 - use water or the following buffer to elute your DNA: (10 mM Tris/HCl, pH 8.0 with no EDTA)

- 18 -