

VI-003 - DISTRIBUIÇÃO DO MEXILHÃO DOURADO (*Limnoperna fortunei*) NO ESTADO DO PARANÁ: DETECÇÃO ATRAVÉS DE DNA AMBIENTAL

Patricia Dammski Borges de Andrade⁽¹⁾

Bióloga pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Especialista em Conservação da Natureza e Educação Ambiental pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Mestre em Zoologia pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Pesquisadora do Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento (LACTEC).

Luciana Patella de Azambuja⁽²⁾

Bióloga pelo Centro Universitário Campos de Andrade Uniandrade. Mestre e Doutora em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Possui Pós-Doutorado em Parasitologia.

Antônio Gil Fernandes Gameiro⁽³⁾

Engenheiro Civil pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Mestre em Engenharia de Edificações e Saneamento pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Possui aperfeiçoamento em Capacitação Gerencial - CAGE (PUC-PR). Gerente da Gerência Industrial de Londrina (GIDLD) da Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR).

Júlio Kazuhiro Tino⁽⁴⁾

Engenheiro Civil pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Mestre em Engenharia de Edificações e Saneamento pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Possui aperfeiçoamento em Capacitação Gerencial - CAGE (PUC-PR). Engenheiro de Desenvolvimento Operacional da Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR). Docente dos cursos de Engenharia da Faculdade Pitágoras de Londrina-PR.

Endereço⁽¹⁾: Avenida BR 116, km 98, nº 8813 - Jardim das Américas - Curitiba - PR - CEP: 81531-980 - Brasil - Tel: (41) 3361-6874 - e-mail: patricia.borges@lactec.org.br

RESUMO

O mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) é uma espécie invasora no Brasil, que se fixa a estruturas naturais e artificiais atingindo altíssimas densidades. Além dos impactos ao meio ambiente, traz prejuízos a setores como o de energia elétrica, setores industriais e de saneamento. No Paraná, a espécie ocorre desde 2001, e é especialmente problemática para usinas hidrelétricas nas bacias do rio Iguaçu e Tibagi. Métodos de monitoramento e detecção precoce da espécie têm sido alvo de estudos. Neste trabalho, 58 amostras de água coletadas pela SANEPAR em diferentes regiões do estado foram analisadas utilizando marcadores moleculares capazes de detectar o material genético da espécie no ambiente, sem a necessidade da coleta de indivíduos (DNA ambiental). Houve registro da espécie em 36 dos 58 pontos analisados. Destaca-se a ocorrência do mexilhão dourado na planície costeira e na região noroeste do estado, onde não havia registros prévios. Estes pontos merecem atenção especial, uma vez que existe a translocação de organismos por vetores para estas regiões. Os dados deste trabalho confirmam a expansão rápida da distribuição do mexilhão dourado no estado do Paraná, e reiteram a importância do monitoramento da espécie e sua detecção precoce para ações de prevenção de impactos, gestão e manejo.

PALAVRAS-CHAVE: Mexilhão Dourado, Espécie invasora, Molusco Bivalve, Detecção Precoce, DNA ambiental.

INTRODUÇÃO

O mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), é um bivalve de água doce originário da Ásia que hoje se encontra amplamente distribuído na América do Sul e em diversas bacias hidrográficas no Brasil (1, 2, 3). A espécie é considerada de grande potencial de impacto devido às suas características biológicas, sendo capaz de colonizar uma grande variedade de habitats (4). A incrustação e proliferação descontrolada de *L. fortunei* se enquadram a um evento conhecido como *macrofouling*. Este problema tem afetado sistemas de tratamento de água, usinas térmicas, fábricas de óleo e usinas hidrelétricas (5, 6). Nestes ambientes, o mexilhão dourado pode atingir cerca de 240.000 ind./m² (3).

Devido ao alto poder de dispersão do mexilhão dourado e os impactos que a espécie causa no ambiente e a setores industriais, métodos de monitoramento e detecção precoce têm sido alvo de estudos há anos. Técnicas que permitam detectar a espécie a nível genético, através de marcadores moleculares, vêm sendo desenvolvidas. O primeiro marcador molecular de *Limnoperna fortunei* desenvolvido tem a capacidade de detectar a presença de larvas da espécie em amostras de plâncton, sendo muito rápido e preciso (7). Esta detecção precoce permite o desenvolvimento de ações para prevenir ou minimizar os impactos da incrustação do mexilhão dourado. Mais recentemente, alguns estudos têm desenvolvido marcadores moleculares capazes de detectar o material genético no ambiente sem que seja necessária a coleta de indivíduos, chamado de DNA ambiental (*Environmental DNA*, ou *eDNA*). A detecção com *eDNA* geralmente produz uma taxa mais alta de detecção se comparado a métodos tradicionais, uma vez que o material genético presente no ambiente é encontrado em fragmentos menores (8, 9, 10). Essa é uma abordagem relativamente nova usada para monitorar a distribuição de espécies. Especificamente para o mexilhão dourado, os marcadores foram desenvolvidos muito recentemente em 2017 (11, 12).

No estado do Paraná, o primeiro registro da espécie ocorreu em 2001, na região da bacia do altíssimo rio Iguaçu, em dois pontos próximos à cidade de Curitiba (13), porém, após este registro, a espécie não foi detectada nesta localidade até bem recentemente (14, 15). Em abril de 2001 foi registrada a ocorrência do mexilhão dourado também na usina hidrelétrica de Itaipu, no rio Paraná, extremo oeste do estado (16). Desde então, a espécie dispersou-se para outros rios da bacia, sendo detectada atualmente em quase toda a extensão do rio Iguaçu (17, 18, 14), rios Piquiri e Tibagi (18).

OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a distribuição do mexilhão dourado em diferentes regiões do estado do Paraná, através da análise de *eDNA* em amostras de água.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de água foram coletadas em entradas de estações de tratamento de água - ETAs e reservatórios de usinas hidrelétricas. As coletas foram realizadas em fevereiro e março de 2018, totalizando 58 amostras.

No laboratório, as amostras foram processadas em uma sala especial, preparada para minimizar contaminação de outras amostras, e subsequentemente congeladas. Cada amostra foi filtrada em um sistema de filtragem de vidro do tipo Kitasato, utilizando filtro de nitrato de celulose com 47 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm. O filtro de cada amostra foi acondicionado em um tubo Eppendorf de 1,5 ml para extração do DNA total. A extração do DNA total de cada amostra foi obtida utilizando kit de extração EZ-DNA (Biosystems, Brasil) adaptado para esse procedimento. Um conjunto de marcadores para a região ribossomal do 18S foi utilizado como controle positivo de DNA. O marcador do controle positivo tem como objetivo avaliar a presença de DNA de qualidade na amostra, evitando “falsos negativos” associados a degradação da molécula de DNA da amostra.

Após a extração do DNA total, a concentração de DNA de cada amostra foi medida para posterior amplificação dos fragmentos do DNA utilizando o conjunto de marcadores desenvolvido por XIA e colaboradores (12). A amplificação do DNA ocorreu através de reações em cadeia da polimerase (PCR), e a visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, e revelado em luz ultravioleta.

Adicionalmente, para amostras duvidosas, a detecção da banda específica foi confirmada através do sequenciamento com iniciador genético marcado com fluorescência (marcado com 5-FAM), em sequenciador automático de DNA ABI 3130.

RESULTADOS

Das 58 amostras de água analisadas, 36 apresentaram resultado positivo para presença de DNA de *Limnoperna fortunei* e sete apresentaram resultado negativo. Quinze amostras apresentaram resultado negativo para a presença de DNA total, não sendo possível indicar presença ou ausência do mexilhão dourado (Tabela 1).

Tabela 1: Pontos amostrais e resultados das análises de detecção do mexilhão dourado utilizando marcador molecular de *eDNA*.

	MUNICÍPIO	PONTOS DE COLETA	LAT	LONG	BACIA
Presença de <i>Limnoperna fortunei</i>					
1	Guaratuba	Rio do Melo	-716417	-7133695	Litorânea
2	Curitiba	ETA Passaúna	-665603	-7177280	Alto Iguaçu
3	Pinhais	Reservatório do Irai	-689806	-7186663	Alto Iguaçu
4	Curitiba	Reservatório do Passaúna	-663848	-7177295	Alto Iguaçu
5	Piraquara	Reservatório Piraquara 2	-691858	-7179765	Alto Iguaçu
6	Guarapuava	Rio das Pedras	-456084	-7190715	Médio Iguaçu
7	Reserva do Iguaçu	Rio Jordão	-390892	-7149771	Médio Iguaçu
8	Mangueirinha	Rio Vila Nova	-381169	-7130627	Médio Iguaçu
9	Foz do Jordão	Rio Passo da Cachoeira	-388388	-7151361	Médio Iguaçu
10	Paulo Frontin	Rio Santana	-515622	-7118960	Médio Iguaçu
11	General Carneiro	Rio Avestruz	-466117	-7077045	Médio Iguaçu
12	Boa Vista da Aparecida	Rio Jacutinga	-254842	-7184598	Baixo Iguaçu
13	Medianeira	Rio Alegria	-189897	-7199305	Baixo Iguaçu
14	Cruzeiro do Iguaçu	Rio Divisor	-286958	-7164325	Baixo Iguaçu
15	Foz do Iguaçu	Rio Paraná / Lago de Itaipu	-142964	-7181055	Paraná
16	Santa Terezinha do Itaipu	Rio Paraná / Lago de Itaipu	-159206	-7184248	Paraná
17	Ramilândia	Rio São Domingos	-1965933	-7218430	Paraná
18	Foz do Iguaçu	Rio Tamandua	146508	-7167375	Paraná
19	Vera Cruz do Oeste	Rio São Pedro	208772	-7223666	Paraná
20	Cascavel	Rio Cascavel	-251267	-7229518	Paraná
21	Cascavel	Rio Peroba	-250119	-7228273	Paraná
22	Toledo	Rio Toledo	-226959	-7262164	Paraná
23	Campina da Lagoa	Ribeirão Água da Campina	-318517	-7278413	Piquiri
24	Assis Chateaubriand	Rio Alívio	-247027	-7297329	Piquiri
25	Bituruna	Rio Herval	-445130	-7105188	Ribeira
26	Carlópolis	Rio Jaboticabal	-629701	-7408806	Itararé
27	Curiúva	Ribeirão Curiúva	-555638	-7343085	Tibagi
28	Piraí do Sul	Córrego das Brotas	-611987	-7283214	Tibagi
29	Piraí do Sul	Rio Piraizinho	-610581	-7285602	Tibagi
30	Telêmaco Borba	Rio Tibagi	-540439	-7308412	Tibagi
31	Tibagi	Rio Tibagi	-560063	-7286009	Tibagi
32	Ortigueira	Reservatório de Mauá	-529549	-7337604	Tibagi
33	Castro	Rio São Cristovão	-599557	-7255378	Tibagi
34	Londrina	Rio Tibagi	-499996	-7415162	Tibagi
35	Ortigueira	Represa Boava	-510379	-7340609	Tibagi
36	Reserva	Rio Maromba	-514040	-7274456	Tibagi
Ausência de <i>Limnoperna fortunei</i>					
37	Matinhos	Rio Cambará	-741608	-7152223	Litorânea
38	São Mateus do Sul	Rio Taquaral	-562361	-7138275	Alto Iguaçu
39	Piraquara	Reservatório Piraquara 1	-698151	-7177610	Alto Iguaçu
40	Santa Tereza do Oeste	Rio Gonçalves Dias	-237362	-7225537	Paraná
41	Ortigueira	Reservatório de Mauá	-529487	-7337572	Tibagi
42	Ortigueira	Reservatório de Mauá	-529615	-7338869	Tibagi
43	Londrina	Rio Cafezal	-480232	-7416893	Tibagi

Resultados inconclusivos					
44	Lapa	Rio Stinglen	-629018	-7146537	Alto Iguaçu
45	Campo Largo	Rio Verde	-655239	-7186262	Alto Iguaçu
46	Curitiba	ETA Iguaçu	-680558	-7180916	Alto Iguaçu
47	Pinhais	ETA Irai	-685859	-7184643	Alto Iguaçu
48	São José dos Pinhais	Rio Pequeno	-688645	-7172262	Alto Iguaçu
49	União da Vitória	Rio Iguaçu	-495181	-7097599	Médio Iguaçu
50	Cascavel	Rio Saltinho	-250459	-7224511	Paraná
51	Maringá	Rio Pirapó	-413744	-7419912	Pirapó
52	Imbituva	Rio Ribeira	-537205	-7208200	Tibagi
53	Ponta Grossa	Rio Pitangui	-588073	-7230960	Tibagi
54	Ponta Grossa	Reservatório de Alagados	-594649	-7232627	Tibagi
55	Ivaí	Arroio Barreiro	-514281	-7233347	Tibagi
56	Imbaú	Rio Furneiros	-524087	-7294439	Tibagi
57	Carambeí	Rio São João	-586492	-7244921	Tibagi
58	Castro	Rio Iapó	-600956	-7259351	Tibagi

Na Figura 1 é possível visualizar o mapa indicando a distribuição do mexilhão dourado no estado do Paraná, contendo pontos de ocorrência publicados previamente (pontos azuis) e que podem ser consultados na Tabela 2 (13, 16, 17, 18, 19, 20), pontos de detecção do *eDNA* de mexilhão dourado neste estudo (pontos vermelhos), além de locais onde a espécie não foi detectada nas análises realizadas (pontos verdes), e pontos com resultados inconclusivos (pontos amarelos).

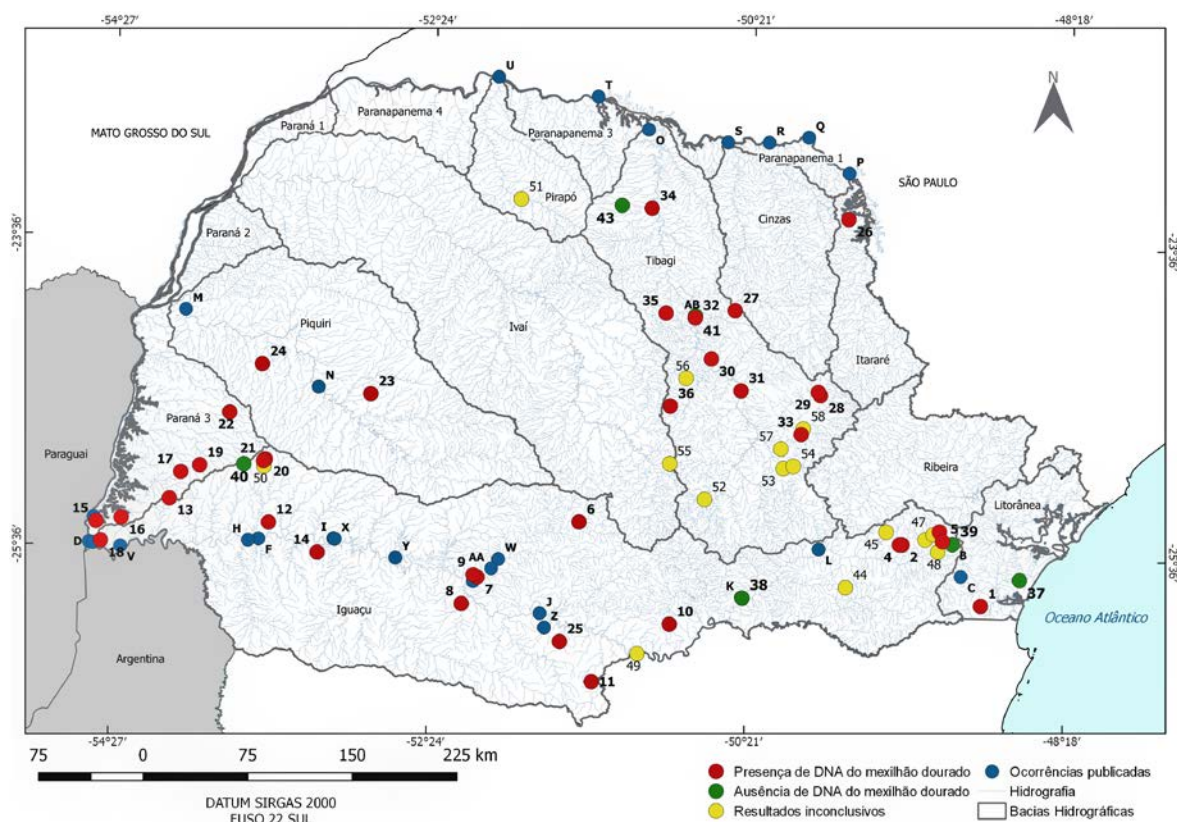


Figura 1: Distribuição do mexilhão dourado no estado do Paraná a partir de dados publicados e resultados de análises de *eDNA* obtidos nesse estudo.

Tabela 2: Lista de pontos com ocorrências publicadas do mexilhão dourado, data de detecção e referência bibliográfica.

	PONTO	LAT	LONG	CITAÇÃO	ANO	BACIA
A	UHE Itaipu	-25,416193	-54,56615	16	2001	Paraná
B	Reservatório Piraquara I	-25,505488	-49,028456	13	2001	Alto Iguaçu
C	Reservatório Guaricana	-25,711855	-48,971108	13	2001	Alto Iguaçu
D	Jusante da UHE Itaipu	-25,577836	-54,592359	17	2005	Paraná
E	Jusante das Cataratas do Iguaçu	-25,582859	-54,56615	17	2005	Baixo Iguaçu
F	UHE Salto Caxias	-25,542018	-53,501454	19	2006	Baixo Iguaçu
G	UHE Segredo	-25,792778	-52,113721	20	2007	Médio Iguaçu
H	Marmelândia	-25,552319	-53,568244	18	2007	Baixo Iguaçu
I	Quedas do Iguaçu	-25,532667	-53,017833	18	2007	Baixo Iguaçu
J	Faxinal do Céu	-25,991694	-51,680583	18	2007	Médio Iguaçu
K	São Mateus do Sul	-25,868848	-50,384149	18	2007	Alto Iguaçu
L	Porto Amazonas	-25,550861	-49,889306	18	2007	Alto Iguaçu
M	Francisco Alves	-24,072633	-53,992833	18	2007	Piquiri
N	Ubiratã	-24,5585	-53,129	18	2007	Piquiri
O	Primeiro de Maio	-22,867167	-51,029306	18	2007	Tibagi
P	UHE Chavantes	-23,128889	-49,731667	20	2007	Paranapanema
Q	UHE Salto Grande	-22,901667	-49,996667	20	2007	Paranapanema
R	UHE Capivara	-22,938333	-50,250833	20	2007	Paranapanema
S	UHE Canoas I	-22,941111	-50,517222	20	2007	Paranapanema
T	UHE Canoas II	-22,660278	-51,358056	20	2007	Paranapanema
U	UHE Taquaruçu	-22,544444	-52,000556	20	2007	Paranapanema
V	ParNa Iguaçu - montante das cataratas	-25,602564	-54,390751	20	2011	Baixo Iguaçu
X	UHE Salto Osório	-25,535586	-53,009253	20	2011	Baixo Iguaçu
W	UHE Santa Clara	-25,647778	-51,953611	20	2011	Médio Iguaçu
Y	UHE Salto Santiago	-25,65	-52,616667	20	2013	Baixo Iguaçu
Z	UHE Foz do Areia	-26,083333	-51,65	20	2013	Médio Iguaçu
AA	UHE Fundão	-25,708611	-51,998056	20	2013	Médio Iguaçu
AB	UHE Mauá	-24,06222	-50,70639	20	2013	Tibagi

Dos locais de conhecida ocorrência do mexilhão dourado, a bacia do rio Paraná, Iguaçu, Piquiri e Tibagi apresentaram a detecção de *eDNA* de *Limnoperna fortunei*. A bacia do rio Tibagi possuía registro prévio de ocorrência do mexilhão dourado, porém, restrito a poucos locais (17, 20). Neste estudo foi detectada a presença da espécie em 9 pontos entre o alto e baixo Tibagi.

Para a bacia do rio Iguaçu, apenas duas amostras apresentaram resultado negativo para a ocorrência do *eDNA* de mexilhão dourado. Cabe destacar que para a região do alto Iguaçu houve a detecção do mexilhão dourado em quatro pontos, em locais onde não havia registro prévio (pontos número 2, 3, 4 e 5). Há um registro do mexilhão dourado próximo a estes locais, no reservatório de Piraquara 1 em 2001, sendo que desde então não há ocorrência da espécie nesse local (15). O resultado encontrado nesse estudo também foi negativo (ponto número 39 no mapa, Figura 1). Os dados obtidos para a bacia do rio Iguaçu confirmam a dispersão da espécie e a ampliação de sua distribuição.

O ponto localizado em Carlópolis, noroeste do estado, ponto número 26 no mapa (Figura 1), é o primeiro registro de ocorrência da espécie na bacia do rio Itararé. Esse ponto está localizado próximo de outras ocorrências no rio Paranapanema, no qual já há registro da espécie há anos.

O ponto localizado em Guaratuba, ponto número 1 no mapa (Figura 1), é o primeiro registro para a bacia litorânea do estado, com exceção da ocorrência publicada para o reservatório de Guaricana, ponto letra C do mapa. Essa ocorrência foi registrada em 2001 (13), porém não houve registros subsequentes da espécie nas proximidades até esse estudo.

Os pontos de novos registros de *Limnoperna fortunei*, especialmente aqueles em localidades onde não havia ocorrência prévia, merecem atenção especial, uma vez que existem vetores que transportaram ou vêm transportando a espécie para estes locais. Além disso, para as bacias hidrográficas dos rios Iguaçu e Tibagi, os resultados mostram a ampliação da distribuição do mexilhão dourado, regiões onde a espécie já vem causando prejuízos especialmente às usinas hidrelétricas há vários anos (20).

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os dados deste trabalho confirmam que o mexilhão dourado está expandindo rapidamente sua distribuição no estado do Paraná. Sugere-se um monitoramento contínuo para acompanhar e detectar precocemente o processo de invasão da espécie, especialmente nos locais de novas ocorrências.

A detecção precoce é um componente essencial para a gestão e manejo desta espécie invasora. A metodologia de detecção aplicada no presente estudo comprovou a eficácia do método, sendo um ótimo marcador de monitoramento ambiental, preciso, rápido, exigindo menor esforço amostral (volume de água) e de baixo custo quando comparado a métodos prévios.

Apesar da eficácia do método utilizado, os procedimentos de coleta de *eDNA* e a interpretação dos resultados devem ser realizados com cautela e deve-se considerar inúmeros fatores que listamos abaixo, de forma a garantir um resultado seguro:

1. Número de subamostras: sugere-se que a amostragem de cada ponto de interesse seja realizada em pelo menos 3 pontos distintos para maximizar a probabilidade de detecção da espécie alvo e como controle de possíveis artefatos do método e contaminação.
2. Local da amostragem: a amostragem de *eDNA* de mexilhão dourado deve ser realizada na coluna de água, próximo ao fundo, após resuspensão de material sedimentado. Isso maximiza o poder de detecção o *eDNA* tende a se concentrar próximo ao fundo (12).
3. Confidência da localização das populações alvo: O *eDNA* de invertebrados pode prevalecer a longas distâncias do local onde foi liberado do organismo vivo. Alguns autores indicam que o *eDNA* de invertebrados pode ser detectado mesmo a 10 km do local de origem (e.g. 21). Assim, a localização exata das populações da espécie alvo através desse método é de difícil definição. Essa é uma das vantagens do método de detecção molecular de larvas. Propágulos são detectados diretamente com confirmação através da amostragem de zooplâncton.
4. Características do ambiente amostrado: O método de coleta de *eDNA* apresenta um desempenho melhor em rios pequenos e água paradas (e.g. lagos, reservatórios) do que em rios grandes, com forte fluxo. Isso ocorre porque há aumento da diluição de *eDNA* em rios grandes e caudalosos, o que diminui a chance de detecção de espécies (22).
5. Presença de inibidores: Inibidores presentes nas amostras de *eDNA* também podem impedir a detecção de espécies (23). Nesse estudo isso foi controlado pelo uso de marcadores universais (e.g. 18S rDNA).

Por fim, é necessário compreender que os marcadores de *eDNA* e de larvas de *L. fortunei* frequentemente se complementam no processo de prospecção da espécie e permitem acompanhar seu processo de colonização de novas regiões. Por exemplo:

1. A detecção de *eDNA* da espécie em um local apenas permite detectar que indivíduos dessa espécie estiveram ou estão em alguma área próxima ao ponto de detecção. Esse resultado aponta para o perigo geral de invasão ou para a presença de populações estabelecidas ou de larvas no local. Não existe precisão em postular o processo ecológico ao qual o local está submetido no momento.
2. A detecção de larvas acompanhada de confirmação microscópica, por outro lado, foca no agente dispersor (propágulo) da espécie e aponta para risco imediato de invasão. No caso de locais onde a população encontra-se presente, os resultados desse método permitem reconhecer períodos de expansão e colonização. Nesse

momento específico, a espécie pode promover danos mais significativos através da colonização de novos substratos (e.g. ductos do sistema de captação de água). Medidas mitigadoras podem ser estabelecidas para minimizar o impacto dessa expansão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DARRIGRAN, G., EZCURRA DE DRAGO, I. Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (DUNKER, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in South America. *The Nautilus*, v.114, n.2, p. 69-73, 2000.
2. BOLTOVSKOY, D., CORREA, N., CATALDO, D., SYLVESTER, F. Dispersion and ecological impact of the invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in the Rio de la Plata watershed and beyond. *Biological Invasions*, v.8, p. 947-963, 2006.
3. DARRIGRAN, G., DREHER MANSUR, M.C. Introdução e dispersão do *Limnoperna fortunei*. In "Introdução a Biologia das Invasões. O Mexilhão Dourado na América do Sul: biologia, dispersão, impacto, prevenção e controle" Ed. G DARRIGRAN, C DAMBORENEA, Cubo Editora, São Carlos, p. 89-110, 2009.
4. DARRIGRAN, G., DAMBORENEA, C. Ecosystem engineering impacts of *Limnoperna fortunei* in South America. *Zoolog. Sci*, v.28, p. 1-7, 2011.
5. DARRIGRAN, G. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland fresh water environments. *Biological Invasions* v.4, p. 145-156, 2002.
6. DARRIGRAN, G., DAMBORENEA, C. A South American bioinvasion case history: *Limnoperna fortunei* (DUNKER, 1857), the golden mussel. *Amer. Malac. Bull.*, v.20, p. 105-112, 2005.
7. PIE, M.R., BOEGER, W.A., PATELLA, L., FALLEIROS, R.M. A fast and accurate molecular method for the detection of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Mytilidae) in plankton samples. *J. Mollus. Stud* v.72, p. 218- 219, 2006.
8. DEAGLE, B.E., EVESON, J.P., JARMAN, S.N. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples - a case study on DNA in faeces. *Front. Zool.*, v.3, n.11, p. 1-10 2006.
9. FICETOLA, G.F., MIAUD, C., POMPANON, F., TABERLET, P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.*, v.4, p. 423-425, 2008.
10. DEJEAN, T., VALENTINI, A., DUPARC, A., PELLIER-CUIT, S., POMPANON, F., TABERLET, P., MIAUD, C. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE*, v.6, n.8, p. 1-4 2011.
11. TABERLET, P., COISSAC, E., HAJIBABAEI, M., RIESEBERG, L. H. *Environmental DNA*. *Mol. Ecol.*, v.21, p. 1789-1793, 2012.
12. PIE, M.R., STROHER, P.R., AGOSTINIS, A.O., BELMONTE-LOPES, R., TADRA-SFEIR, M.Z., OSTRENSKY, A. Development of a real-time PCR assay for the detection of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*, Mytilidae) in environmental samples. *Academia Brasileira de Ciências*, v.89, p. 1041-1045, 2017.
13. XIA, Z., ZHAN, A., GAO, Y. ZHANG, L., HAFFERNER, D., MACISAAC, H. J. Early detection of a highly invasive bivalve based on environmental DNA (eDNA). *Biological Invasions*, v.20, n.2, p. 437-447, 2017.
14. TAKEDA, A.M., MANSUR, M.C.D., FUJITA, D.S., BIBIAN, J.P.R. Ocorrência da espécie invasora de Mexilhão Dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) em dois pequenos reservatórios próximos a Curitiba, PR. *Acta Biológica Leopoldensia*, v.25, n.2, 2003.
15. BORGES, P.D., LUDWIG, S., BOEGER, W.P. Testing hypotheses on the origin and dispersion of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) in the Iguassu River (Paraná, Brazil): molecular markers in larvae and adults. *Limnology*, v.18, p. 31-39, 2017.
16. FREHSE, F.A., DE ANDRADE, P.D., VITULE, J.S. Absence of the invasive golden mussel in a reservoir near Curitiba, Brazil: A possible case of invasion failure. *Neotropical Biology and Conservation*, v.13, n.1, p. 86-89, 2018.
17. ZANELLA, O., MARENDIA, L.D. Ocorrência de *Limnoperna fortunei* na Central Hidrelétrica de Itaipu. In: 5 Congresso Latinoamericano de Malacologia, São Paulo. Resumos. Instituto Butantan/Instituto de Biociências, USP, São Paulo, 2002.
18. PESTANA, D., PIE, M.R., OSTRENSKY, A., BOEGER, W.A., ANDREOLI, C., FRANCESCHI, F., LAGOS, P. *Seasonal Variation in Larval Density of Limnoperna fortunei (Bivalvia, Mytilidae) in the Iguaçu and Paraná Rivers, in the Region of Foz do Iguaçu, Paraná, Southern Brazil*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.51, n.3, p. 607-612, 2008.

18. PESTANA, D., OSTRENSKY, A., TSCHÁ, M.K., BOEGER, W.A. *Prospecção do molusco invasor Limnoperna fortunei (Dunker, 1857) nos principais corpos hídricos do estado do Paraná, Brasil. Pap. Avulsos Zool.*, v.50, n.34, p. 553-559, 2010.
19. BELZ, C.E., DARRIGRAN, G., NETTO, O.S.M., BOEGER, W.A., JUNIOR, P.J.R. *Analysis of four dispersion vectors in Inland Waters: the case of the invading bivalves in South America. Journal of Shellfish Research*, v.31, p. 777-784, 2012.
20. BORGES, P.D. *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) e o Setor Elétrico Brasileiro: Distribuição, Impactos, Estudo de Caso da Dispersão no Rio Iguaçu e Teste de Protocolo de uso de larvas na Caracterização do Perfil Genético de Populações. Curitiba, 2014. Dissertação de Mestrado-Departamento de Zoologia-Universidade Federal do Paraná, 2014.
21. DEINER, K., ALTERMATT, F. *Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. PloS one*, v.9, n.2, 2014.
22. HERDER, J.E., VALENTINI, A., BELLEMAIN, E., DEJEAN, T., VAN DELFT, J.J.C.W., THOMSEN P.F., Taberlet P. 2014. Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. Stichting RAVON, Nijmegen. Report 2013-104.
23. MCKEE, M.M., SPEAR, S.F., PIERSON, T.W. *The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples. Biol Conserv.*, v.183, p. 70-76, 2015.