

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Departamento de Ciências Biológicas

Tais Cavallaro Martins

Identificação de mamíferos carnívoros em remanescentes de Mata Atlântica por
meio de análise molecular

Monografia

Piracicaba - SP

2016

Tais Cavallaro Martins

Identificação de mamíferos carnívoros em remanescentes de Mata Atlântica por meio de análise molecular

Orientador(a): Katia M. P. M. B. Ferraz

Monografia apresentado ao Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Piracicaba – SP

2016

“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados.”

Mahatma Gandhi

A minha família

Dedico

Agradecimentos

A Deus porque tudo vem Dele e a Ele pertence;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela valiosa formação e anos de ensinamento e oportunidades;

À minha orientadora Professora Dra. Katia M. P. M. B. Ferraz pela confiança e pronta disponibilidade em me orientar e auxiliar no meu processo de aprendizado;

À doutora Renata Miotto por ter me aceitado para co-orientar, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto em todo tempo, pela paciência e dedicação nos ensinamentos e pela amizade;

Ao doutorando Bruno Saranholi pela atenção, pelo tempo que me dedicou e também pela paciência nos ensinamentos diários;

Ao doutorando Marcelo Magioli por ter cedido suas amostras, por também acreditar em mim, pelo auxílio na redação desta monografia e pelos ensinamentos em campo;

A todos do LEMAC pelo convívio, por sempre se importarem e me auxiliarem;

Ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior pela parceria e colaboração, sem a qual esse trabalho não se realizaria.

A todos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação, pelo convívio e pela paciência em me ensinar a dinâmica do laboratório. Em especial, à Rosane e a Cármen por me acolherem em suas casas, por dividirem suas camas, comidas, e pelas boas conversas e cervejas geladas;

A Fundação Grupo Boticário de Proteção à Natureza pelo apoio e auxílio financeiros através do projeto (Processo No. 1001-20141).

A FAPESP pelo apoio e auxílio financeiro através dos projetos (Processo No. 2014/10192-7) e (Processo No. 2014/09300-0).

Aos projetos e bolsas que direta ou indiretamente deram suporte a realização desse trabalho: FAPESP (Processo No. 2013/24453-4) e FAPESP (Processo No. 2016/13897-3);

Ao CENAP-ICMBio por disponibilizarem as amostras de sangue;

Ao IDEA WILD pelo fornecimento da licença do *software* Geneious;

Aos meus pais Alessandra e Sérgio, e a minha tia Tânia que sempre me apoiaram, estiveram ao meu lado em todos os momentos e investiram na minha formação;

As minhas amigas e companheiras de república, pelo convívio, pelas risadas, e até mesmo pelas brigas, porque me aguentar não é fácil;

Ao meu namorado por estar comigo em todos os momentos e me apoiar até nas piores ideias, pelos puxões de orelhas e principalmente pela paciência e conselhos;

À minha sogra pelo carinho e pelos diversos almoços e jantares maravilhosos, naqueles momentos que eu tinha apenas macarrão ou miojo para comer;

A todos os amigos que conquistei durante meus anos de graduação na Gloriosa pelas risadas e conversas e por estarem comigo durante todos esses anos;

A todos os amigos da Associação Piracicaba Rugby, e principalmente as Encarnadas (“As mina PIRA!!”) por me ajudarem a tirar todo o estresse desse final de ano, pelos treinos, jogos e claro, pelos nossos terceiros tempos;

A todos que direta ou indiretamente me auxiliaram durante esse processo de desenvolvimento pessoal e profissional.

Sumário

Resumo	8
Abstract	9
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Análises genéticas não invasivas em carnívoros	12
2.2 Marcadores moleculares	13
2.3 DNA mitocondrial (DNAmt)	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Objetivo	14
3.2 Caracterização da área de estudo	14
3.2.1 Parque Estadual Carlos Botelho (PECB)	15
3.2.2 Parque Estadual Intervales (PEI)	15
3.2.3 Parque Estadual da Serra do Mar (PESM)	16
3.3 Obtenção das amostras fecais	16
3.4 Extração de DNA de fezes	17
3.5 Diagnóstico das espécies	19
4. RESULTADOS	20
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	34

Resumo

A identificação de espécies por meio do DNA fecal é um método não invasivo, complementar à análise morfológica (e.g. cutícula de pelos guarda) e eficiente, já que espécies distintas possuem variação em algumas regiões do DNA mitocondrial permitindo que as amostras possam ser diferenciadas dentre os diversos *taxa*. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo identificar espécies de mamíferos carnívoros a partir da identificação molecular em amostras fecais. Foram coletadas 27 amostras em remanescentes florestais do bioma Mata Atlântica, em três Parques Estaduais no estado de São Paulo, Brasil: o Núcleo Santa Virgínia - base da sede (NSV-I) e Vargem Grande (NSV-VG) do Parque Estadual Serra do Mar, Parque Estadual Carlos Botelho (PECB) e Parque Estadual Intervales (PEI). Duas regiões do DNA mitocondrial foram amplificadas, uma do gene Citocromo b e outra do gene ATP6, e esses fragmentos foram comparados à sequências de referência de carnívoros presentes na região. Por meio do gene Citocromo b foi possível identificar ao nível de espécie todas as 27 amostras coletadas, todas pertencentes à família Felidae (*Puma concolor*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus guttulus* e *Leopardus wiedii*). Já para o gene ATP6, apenas seis amostras puderam ser diferenciadas, provavelmente em decorrência da alta fragmentação do DNA para esse loco específico. A alta similaridade entre as sequências obtidas a partir de fezes e as sequências de referência reduz a possibilidade de amplificação do DNA de presas presente no bolo fecal, demonstrando a eficiência dos marcadores empregados, em especial do Citocromo b, para identificação das espécies depositoras.

Paravras-chaves: análise não invasiva, ATP6, Citocromo b, DNA fecal, DNA mitocondrial, identificação de espécies.

Abstract

The identification of species through the faecal DNA is a method non-invasive, complementary to morphological analysis (e.g. cuticle guard hairs) and efficient. As distinct species have variation in some region of the mitochondrial DNA, this assessment allow the samples to be differentiated among the several *taxa*. Thus, this work aimed to identify species of carnivorous mammals through molecular analysis of faecal samples. Twenty-seven samples were collected in forest remnants of the Atlantic Forest biome, in three Conservation Units in the state of São Paulo, Brazil: Santa Virgínia Nucleus – Parque Estadual Serra do Mar (NSV-I) and Vargem Grande (NSV-VG), Parque Estadual Carlos Botelho (PECB) and Parque Estadual Intervales (PEI). Two region of mitochondrial DNA were amplified, one from the Cytochrome b gene and another from the ATP6 gene, these fragments were compared with fragments of referencial sequences from other carnivores present in the region. By means of the Cytochrome b gene, it was possible to diagnose the species in all the 27 samples collected, it showed that all of that belong to the Felidae family (*Puma concolor*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus guttulus* and *Leopardus wiedii*). For the ATP6 gene, only six samples could be differentiated, probably due to the high fragmentation of DNA for this specific locus. The high similarity between the obtained faeces sequences and the referencial sequences reduce the possibility of the amplification of the DNA's prey present in the stool bulk. It demonstrates the efficiency of the markers used, in particular of Cytochrome b, to identify the depositor species.

Keywords: non-invasive analysis, ATP6, Cytochrome b, fecal DNA, mitochondrial DNA, identification of species.

1.INTRODUÇÃO

Diante da transformação dos ambientes naturais em ritmo acelerado e das altas taxas de perda de biodiversidade observadas ao redor do mundo (Cardillo *et al.* 2005; Ripple *et al.* 2014; Dirzo *et al.* 2014), a Biologia da Conservação surgiu como ciência multidisciplinar e tem como objetivo estabelecer princípios e ferramentas para preservar a biodiversidade e seus processos evolutivos (Soulé 1985). Nesse sentido, torna-se cada vez mais importante, e necessário, o desenvolvimento de programas de conservação, que se baseiem em estudos científicos sobre as espécies e o ambiente em que vivem, afim de elaborar estratégias e ações eficazes para a conservação e manejo dos recursos naturais (Soulé 1985; DeSalle e Amato 2004).

Para a conservação da biodiversidade, a manutenção da diversidade genética é considerada um fator fundamental (Frankham *et al.* 2002). A Genética da Conservação surgiu dentro da ampla área da Biologia da Conservação, voltada para a preservação de espécies como entidades dinâmicas capazes de evoluir e lidar com mudanças ambientais, minimizando assim, o risco de extinção das mesmas (Frankham *et al.* 2002). A disciplina se utiliza das ferramentas da genética molecular e dos conceitos da genética de populações para aplicá-los aos desafios da conservação biológica (Frankham *et al.* 2002). Mais especificamente, a Genética da Conservação tem como principal objetivo entender as relações entre a diversidade genética e a viabilidade das populações em ambientes sob interferência antrópica, utilizando ferramentas moleculares, com o intuito de propor medidas para minimizar efeitos da redução do fluxo gênico, do endocruzamento e da perda de diversidade genética, além de identificar populações e áreas prioritárias para a conservação (Beebee e Rowe 2008).

O emprego de métodos moleculares na conservação da biodiversidade tem aumentado consideravelmente ao longo dos anos à medida que se descobrem mais e melhores marcadores, juntamente com o grande avanço das técnicas laboratoriais e dos métodos de análise de dados (DeSalle e Amato 2004; DeYoung e Honeycutt 2005). As técnicas moleculares podem fornecer dados com extrema precisão e contribuir significativamente para o entendimento de diversos aspectos da ecologia das espécies, além de permitir a identificação de espécies, indivíduos e seus sexos (Miotto *et al.* 2007, 2012). Adicionalmente, fornece informações sobre fluxo gênico,

tamanho efetivo da população, viabilidade populacional e padrões de dispersão das mesmas (Miotto *et al.* 2007, 2014). Os dados também podem ser usados para estudar questões relacionadas à distribuição geográfica de espécies, investigação de hábitos alimentares, uso de habitat, parasitismo, relações simbióticas, sistemas reprodutivos e seleção sexual (DeYoung e Honeycutt 2005; Beebee e Rowe 2008; Magioli *et al.* 2014, 2016).

No caso de carnívoros, um dos impedimentos à condução de estudos dessa natureza é a dificuldade de se obter amostras biológicas suficientes que representem de forma adequada a população de interesse. Espécies de carnívoros em geral possuem características que dificultam ainda mais a obtenção dessas amostras, pois muitas são raras e/ou ameaçadas, têm comportamento arredo e hábito noturno/crepuscular. Além disso, carnívoros comumente ocorrem em baixas densidades na natureza e ocupam grandes áreas de vida, muitas vezes inacessíveis, tornando o esforço menos eficiente na obtenção de amostras através de métodos tradicionais de captura (Johndon *et al.* 2001).

Nesse contexto, surgiram novos métodos e tecnologias voltadas para obtenção de DNA através de amostras como fezes e pelos, considerados amostras não invasivas, pois não necessitam da captura do indivíduo (Morin e Woodruff 1996; Wayne e Morin 2004). O método tem se mostrado mais efetivo, mais viável e rentável do que capturas ou censos para obtenção de dados populacionais, demográficos e ecológicos de diversas espécies, contribuindo assim para gerar informações para elaboração de políticas públicas eficientes em prol da conservação e manejo de vida silvestre (Beebee e Rowe 2008).

Diante disso, a Mata Atlântica considerada um hotspot para a biodiversidade e conservação dos carnívoros neotropicais (Mittermeier *et al.* 2005; Loyola *et al.* 2008) é atualmente uma das florestas mais ameaçadas do planeta por conta de ser altamente fragmentada, com apenas 7% -16% de sua cobertura original restante (Mittermeier *et al.* 2005; Ribeiro *et al.* 2009). Alterações antrópicas severas como a perda e fragmentação de habitat, a superexploração, propagação de espécies invasoras e o tráfico e comércio ilegal de animais são impactos que contribuem significativamente para o declínio e isolamento de populações selvagens, aumentando o risco de extinção (Frankham *et al.* 2002; Schipper *et al.* 2008).

Apesar de altamente fragmentada, a Mata Atlântica ainda possui importantes remanescentes contínuos de floresta (Ribeiro *et al.* 2011). Esses grandes contínuos florestais contribuem para a persistência de predadores de topo (*Panthera onca*), além da manutenção das funções ecológicas essenciais desempenhadas por eles (Jorge *et al.* 2013). A defaunação é mais evidente em ambientes modificados e fragmentados, mas também afeta áreas protegidas (Laurance *et al.* 2012). E por esse motivo, a Mata Atlântica brasileira se apresenta como um bom estudo de caso.

E os grandes carnívoros são um dos grupos mais sensíveis à grandes alterações de habitat (Gittleman *et al.* 2001, Chiarello *et al.* 2008), pois necessitam de grandes áreas de vida. São considerados ainda, espécies chave para os ecossistemas sendo importantes reguladores de populações de herbívoros, e consequentemente, de produtores primários mantendo o equilíbrio tanto das comunidades animais como vegetais (Silveira 1999; Reis *et al.* 2006).

O uso de análises moleculares a partir de amostras fecais para a identificação de carnívoros é crescente, especialmente por evitar a captura e o estresse dos animais (Miotto *et al.* 2007). Amostras de DNA fecal podem fornecer informações sobre as espécies depositoras e as presas consumidas por elas (Magioli *et al.* 2016). A correta identificação dessas amostras serve de subsídio para os estudos de ocorrência, reconstrução de dietas, caracterização de relações tróficas, construção de cadeias alimentares e mudanças no uso dos recursos e habitat (Magioli *et al.* 2014; Galetti *et al.* 2016).

Este projeto se insere no Projeto Regular de Auxílio à Pesquisa da FAPESP "*Ecologia trófica, diversidade funcional e ocorrência de mamíferos terrestres na Mata Atlântica*" (Processo FAPESP No. 2014/09300-0), coordenado pela Profa. Dra. Katia M.P.M.B. Ferraz, e ao projeto de doutorado "*Ecologia Trófica de carnívoros da Mata Atlântica: utilização da análise de isótopos estáveis e da diversidade funcional para a conservação*" (Processo FAPESP No. 2014/10192-7) do doutorando Marcelo Magioli (PPGI-EA).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Análises genéticas não invasivas em carnívoros

Amostras não invasivas caracterizam-se por serem amostras biológicas coletadas sem a necessidade de captura do animal (Morin e Woodruff 1996; Wayne e Morin 2004).

Com os recentes avanços na área da Biologia Molecular, tem-se empregado o uso de amostras não invasivas como importante fonte de DNA para espécies de mamíferos (Taberlet *et al.* 1999; Palomares *et al.* 2002). Nesse novo campo de pesquisa, foram descritos diferentes tipos de amostras não invasivas, como pelos (Taberlet e Bouvet 1992), fezes (Höss *et al.* 1992), urina (Valière e Taberlet 2000) e regurgitos (Valière *et al.* 2003). No caso de espécies selvagens de comportamento arredio e difícil detecção, que é o caso da maioria dos carnívoros, as fezes e pelos são as amostras não invasivas mais frequentemente empregadas (Waits e Paetkau 2005).

Dentre os carnívoros, análises de DNA fecal têm sido usadas para estudar os mustelídeos (Frantz *et al.* 2003; Katz *et al.* 2006), felinos (Ernest *et al.* 2000; Janečka *et al.* 2008; Miotto *et al.* 2011) e canídeos (Kohn *et al.* 1999; Prugy *et al.* 2005) sem a necessidade de visualização direta ou captura do animal.

A obtenção de DNA a partir de amostras fecais tem se mostrado um método efetivo para identificar a espécie (Farrell *et al.* 2000; Kurose *et al.* 2005), pois espécies distintas possuem variações de algumas regiões do DNA mitocondrial (DNAMt), permitindo assim, que as amostras possam ser diferenciadas dentre os diversos *taxa* (Farrell *et al.* 2000; Chavez *et al.* 2012).

Há, porém, desafios importantes a serem superados no emprego desse método, como a baixa quantidade e qualidade do DNA obtidos nas fezes e a presença de inibidores de PCR (Taberlet *et al.* 1999). Como consequência desses problemas ocorre um baixo sucesso de amplificação, principalmente devido à alta fragmentação do DNA contido no bolo fecal, como ele é encontrado nas fezes, além de um alto potencial de contaminação (Taberlet *et al.* 1996; Palomares *et al.* 2002).

No caso dos carnívoros, existe ainda a dificuldade de discernir entre o DNA da espécie e o de suas presas (Ernest *et al.* 2000), porém, através de amplificações espécie-específicas de sequências de DNA relativamente curtas (Farrell *et al.* 2000, Chavez *et al.* 2012; Palomares *et al.* 2002) alguns desses problemas podem ser

resolvidos (Frantsen *et al.* 1998; Broquet *et al.* 2007). Em termos gerais, o que ocorre é uma “pesca” do DNA da espécie alvo em meio a todos os DNA's encontrados na amostra de fezes.

2.2 Marcadores moleculares

A determinação da sequência de bases de algumas porções do DNAMt torna evidente a variação genética que existe entre espécies (Parker *et al.* 1998), ou seja, possibilita a identificação das espécies depositoras das amostras fecais (Farrell *et al.* 2000, Chavez *et al.* 2012). Essa determinação se dá pelo isolamento do DNA, posterior amplificação da porção de interesse através da Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) e a resolução da reação de sequenciamento em um sequenciador automático (Perez-Sweeney *et al.* 2003). A tecnologia de PCR (Mullis e Faloona 1987; Saiki *et al.* 1988) possibilita a obtenção de material genético suficiente para análise através da síntese enzimática *in vitro* de milhares de cópias de uma sequência específica de DNA (Perez-Sweeney *et al.* 2003).

Cada marcador genético apresenta características próprias (Perez-Sweeney *et al.* 2003) e pode ter taxas de evolução diferentes. Assim, a escolha correta do marcador pode permitir a resolução de diferentes tipos de questões (Parker *et al.* 1998, Solé-Cava 2001). Marcadores que evoluem mais rapidamente são os mais utilizados no estudo ao nível específico de espécies (Solé-Cava 2001). Dentre os marcadores moleculares mais utilizados atualmente, destaca-se as sequências de DNA mitocondrial.

2.3 DNA mitocondrial (DNAMt)

O DNA mitocondrial (DNAMt) tem sido um marcador molecular amplamente utilizado na avaliação de níveis de diversidade genética, no estudo das relações filogenéticas entre diferentes *taxa* e na identificação de subdivisão evolutiva entre unidades populacionais geográficas (Bermingham e Morits 1998; Avise 2000).

Menor do que o DNA nuclear, haplóide e de morfologia circular, o DNA mitocondrial (15-17 kb) pode propiciar o diagnóstico de um determinado táxon (Sunnucks 2000; Ferreira 2001). O DNAMt é o marcador ideal para se analisar e diferenciar espécies intimamente relacionadas, pois algumas de suas regiões tem alto grau de polimorfismo mesmo em pequenos fragmentos, além de possuir alta

taxa de evolução e ausência de recombinação (Hedrick e Miler 1992; Perez-Sweeney *et al.* 2003).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Objetivo

O trabalho aqui apresentado teve o objetivo de identificar espécies de mamíferos carnívoros por meio da análise molecular de amostras fecais, visando complementar os dados gerados sobre os hábitos alimentares pelos projetos de pesquisa a que essa proposta se vincula.

3.2 Caracterização da área de estudo

Esse trabalho foi realizado em áreas inseridas no maior contínuo florestal do bioma Mata Atlântica, situado entre a Serra do Mar e a Serra de Paranapiacaba. As áreas de estudo são: Núcleo Santa Virgínia - base da sede (NSV-I) e de Vargem Grande (NSV-VG) do Parque Estadual Serra do Mar, Parque Estadual Carlos Botelho (PECB) e Parque Estadual Intervales (PEI) (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1. Identificação das áreas de estudo, coordenadas geográficas, tamanho e localização.

Identificação	Coordenadas	Área (ha)	Localização (municípios)
Parque Estadual da Serra do Mar (PESM) - Núcleo Santa Virgínia – Itamambuca (NSV-I) e Vargem Grande (NSV-VG)	23°17'-23°24'S e 45°03'-40°11'O	17.000	São Luiz do Paraitinga e Natividade da Serra
Parque Estadual Carlos Botelho (PECB)	24°00'-24°15'S e 47°45'-48°10'O	37.794	São Miguel Arcanjo, Sete Barras, Tapiraí e Capão Bonito
Parque Estadual Intervales (PEI)	24°12'-24°32'S e 48°03'-48°32'O	41.705	Ribeirão Grande

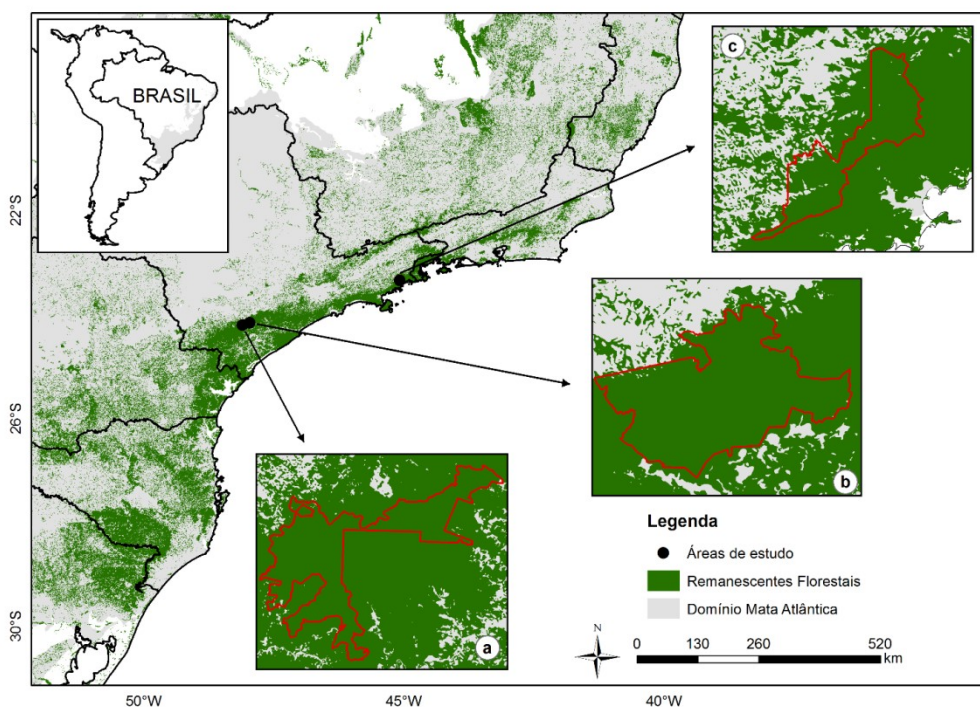


Figura 1. Localização das áreas de estudo no contínuo florestal entre Serra do Mar e Serra de Paranapiacaba. a. Parque Estadual Intervales (PEI); b. Parque Estadual Carlos Botelho (PECB); c. Parque Estadual da Serra do Mar (PESM) – Núcleo Santa Virgínia – base Sede (NSV-I) e Vargem Grande (NSV-VG).

3.2.1 Parque Estadual Carlos Botelho (PECB)

A área do parque é de 37.644,36 ha e abrange os municípios de Capão Bonito, São Miguel Arcanjo, Sete Barras e Tapiraí (24°00'-24°15'S e 47°45'-48°10'O). O PECB foi criado em 10/09/1982 pelo Decreto 19.499 (Plano de Manejo do PECB, 2008). Sua composição é de Floresta Ombrófila Densa, de montana, submontana e de terras baixas (Plano de Manejo do PECB, 2008).

3.2.2 Parque Estadual Intervales (PEI)

A área do parque é de 41.987,81 ha e abrange os municípios de Guapiara, Eldorado Paulista, Iporanga, Ribeirão Grande e Sete Barras (24°12'-24°32'S e 48°03'-48°32'O). O PEI foi criado em 08/06/1995 pelo Decreto 40.135 e até recentemente (2006) era o único parque estadual gerido pela Fundação Florestal (Plano de Manejo do PEI, 2009). Sua composição é de Floresta Ombrófila Densa. Na zona de amortecimento ocorrem a Floresta Estacional Semidecidual e elementos de Floresta Ombrófila Mista.

3.2.3 Parque Estadual da Serra do Mar (PESM)

A área do parque é de 315.390,69 há e abrange parte de 23 municípios, desde Ubatuba, na divisa do Estado do Rio de Janeiro, até Pedro de Toledo no litoral sul do Estado. Já no planalto abriga cabeceiras formadoras dos Rios Paraíba do Sul, Tietê e Ribeira de Iguape até São Paulo, Mogi das Cruzes e Cunha. Desta forma, pode-se concluir que o PESM constitui um verdadeiro corredor ecológico, conectando os mais significativos remanescentes de Mata Atlântica do país (Plano de Manejo do PESM, 2006).

O parque foi criado pelo Decreto 10.251, de 30/08/77. Originalmente sua área era composta da junção de diversas reservas e outras unidades de conservação já existentes. Com o Decreto 13.313, de 06/03/79a área foi ampliada através da incorporação da Fazenda Picinguaba, situada no município de Ubatuba (Plano de Manejo do PESM, 2006).

Dos oito núcleos administrativos, três sedes estão no planalto: Cunha, Santa Virgínia e Curucutu, e cinco na região litorânea: Picinguaba, Caraguatatuba, São Sebastião, Cubatão e Pedro de Toledo (Plano de Manejo do PESM, 2006). O núcleo amostrado nesse estudo é o de Santa Virgínia (NSV), que abrange os municípios de São Luiz do Paraitinga e Natividade da Serra (23°17'-23°24'S e 45°03'-40°11'O) com 17.500,00 ha, divididos em Itamambuca (SVN - I) e Vargem Grande (SVN - SV). Sua fitofisionomia principal é floresta ombrófila densa. Por conta da altitude, os tipos de florestas ombrófilas densa variam, desde a floresta de terras baixas (até 50m de altitude), com árvores de até 40 m de altura, até as florestas alta montana em altitudes mais elevadas (entre 1000 e 1200m) (Plano de Manejo do PESM, 2006).

3.3 Obtenção das amostras fecais

As amostras foram coletadas pelo método de busca ativa (Voss e Emmons 1996), que consiste em percorrer estradas de terra e trilhas já existentes nas áreas de estudo em busca da evidências da presença de mamíferos. O período de coleta no qual foram analisadas as amostras fecais foi de novembro/2015 a julho/2016 (Tabela 2).

Das amostras coletadas foram retirados aproximadamente 5 cm da extremidade das fezes (Figura 2a) e estes foram colocados em tubos de polipropileno (falcon) com adição de álcool 100%. Os tubos foram identificados com

o local de coleta (área de estudo e trilha) e a data (Figura 2b). Em laboratório, as amostras foram armazenadas no freezer a - 20 °C até a extração do DNA.

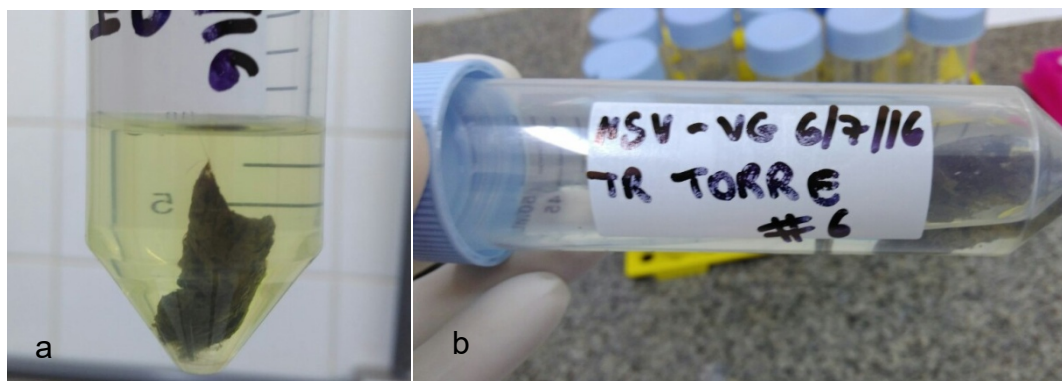


Figura 2. (a) Morfologia das extremidades das fezes coletadas; (b) Identificação dos tubos com as amostras.

3.4 Extração de DNA de fezes

Para a extração do DNA das amostras de fezes, foi utilizado o kit de extração “QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit” (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. O kit é utilizado para retirar o excesso de inibidores de PCR e para manter o DNA mais puro.

As etapas seguidas foram às seguintes:

1. Em um tubo de 2ml foram colocados 350µl de álcool + um fragmento pequeno de fase sólida;
2. A) Foi adicionado 1ml do tampão 'InhibitEX Buffer' em cada amostra e em seguida elas foram vortexadas por 1 min;
B) As amostras foram incubadas a 70°C por 5 min;
C) As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 50 min;
3. As amostras foram vortexadas rapidamente;
4. As amostras foram centrifugadas a 14.000rpm por 2min para a formação do pellet;
5. A) Foram transferidos 600µl do sobrenadante para um novo tubo de 2ml e o pellet foi descartado;
B) Foram adicionados 25µl de Proteinase K para digestão das proteínas;

- C) Foram adicionados 600µl do tampão 'Buffer AL' e as amostras foram vortexadas por 15 segundos;
- D) As amostras foram incubadas a 70°C por 30 min;
6. Foram adicionados 600µl de etanol 100% para a lise e as amostras foram vortexadas;
7. A) Em um tubo com filtro, foram adicionados 600µl do produto da lise (1ª alíquota) sem tocar o filtro;
- B) Os tubos foram centrifugados a 14.000rpm por 1 min.
8. A) O tubo coletor foi retirado, o filtrado foi descartado e um novo tubo coletor foi reacoplado à coluna;
- B) Foram adicionados 600µl do produto da lise (2ª alíquota);
- C) Os tubos foram centrifugados a 14.000rpm por 1 min;
9. A) O tubo coletor foi retirado, o filtrado foi descartado e um novo tubo coletor foi reacoplado à coluna;
- B) Foram adicionados 600µl do produto da lise (3ª alíquota);
- C) Os tubos foram centrifugados a 14.000rpm por 1 min;
10. A) O tampão 'Buffer AW1' foi agitado fortemente para homogeneização;
- B) A cada tubo foram adicionados 500µl de Buffer AW1;
- C) Os tubos foram centrifugado à 14.000rpm por 1 min;
11. A) O tubo coletor foi retirado, o filtrado foi descartado e um novo tubo coletor foi reacoplado à coluna
- B) Foram adicionados 500µl do tampão 'Buffer AW2';
- C) Os tubos foram centrifugados a 14.000rpm por 3 min;
12. A) O tubo coletor foi retirado, o filtrado foi descartado e um novo tubo coletor foi reacoplado à coluna.
- B) Os tubos foram centrifugados a 14.000rpm por 3 min;
13. A) As colunas foram transferidas para novos tubos de 1,5mL;
- B) Foram adicionados 200µl do tampão 'Buffer ATE';
- C) Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 30 min;
14. Os tubos foram centrifugado a 14.000rpm por 1 min para eluir o DNA;

3.5 Diagnóstico das espécies

Com o intuito de identificar as espécies depositoras foram amplificados: um fragmento específico do gene Citocromo b, de 146 pb, utilizando um par de primers (5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3', 5'-TATTCTTTATCTGCCTATACATRCACG-3') descrito por Farrell *et al.* (2000), e um fragmento específico do gene ATP6, de 126 pb utilizando um par de primers (5'-AACGAAAATCTATTTCGCCTCT-3', 5'-TGGATGGACAGTATTTGTTTTGAT-3') descrito por Chaves *et al.* (2012).

O DNA foi amplificado em uma reação de PCR com volume final de 15µL, no qual se utilizou 1x de tampão *Buffer TM* (Invitrogen), 4,0mM de MgCl₂, 0,5pmol de *primer forward* e *reverse*, 0,2µg/ml de BSA (BioLabs), 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 0,16mM de dNTPs, 5µL de DNA e H₂O deionizada para completar o volume final da reação.

As reações de amplificação foram feitas em um termociclador Veriti 96 WELL Thermal Cycler (Applied BioSystems). Para o gene Citocromo b, a programação do termociclador foi à seguinte: inicialmente o DNA foi desnaturado a 95°C por cinco minutos; em seguida foram realizados 40 ciclos, cada um consistindo de 45 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 50°C e um minuto de extensão a 72°C; por fim, uma extensão final a 72°C por 20 minutos. Para o gene ATP6, a programação do termociclador foi: uma desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 minutos, seguida de 10 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C de anelamento por 45 segundos (*touchdown* - 1°C) e 72°C por um minuto e meio de extensão, até atingir a temperatura de anelamento de 50°C. Em seguida foram realizados 30 ciclos consistindo de: 45 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 50°C e um minuto e meio de extensão a 72°C. Por fim, foi feita uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A fim de controlar o processo de amplificação e evitar contaminações, foram incluídos em cada reação controles positivos (amostra de tecido de *Puma concolor*) e controles negativos.

Após as reações de PCR, os produtos da amplificação foram visualizados por meio de uma eletroforese em gel de agarose 1%, conduzida em tampão TBE 1X por 50 minutos a 90 volts. As amostras foram coradas com GelRed (Uniciencia) afim de serem visualizadas em luz UV e o tamanho dos fragmentos obtidos com as

amplificações foi estimado por comparação com o padrão ladder 1kb Plus (Invitrogen).

Posteriormente, as amostras que apresentavam apenas o fragmento amplificado foram purificadas com o kit ExoSAP - IT (Affinetrax), para a retirada do excedente de *primers*. No termociclador a temperatura de ação da enzima foi de 37°C por 15 minutos e num segundo momento 80°C por 15 minutos para degradar a enzima.

Os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento em sequenciador automático ABI3730XL (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas e editadas nos software Geneious v. 7.1.7 (Kearse *et al.* 2012) e Bioedit (Hall 2011). Após a edição e o alinhamento das sequências, foram calculadas as distâncias genéticas entre as sequências obtidas e sequências de referência através do software MEGA v.5.03 (Tamura *et al.* 2011), utilizando o Modelo de Dois Parâmetros de Kimura (1980). Por meio de uma análise de Neighbor-Joining (Saitou e Nei 1987) foram construídas duas árvores de similaridade, uma para o gene ATP6 e outra para o Citocromo b. A significância estatística foi avaliada pelo método de *bootstrap* com 1000 replicações. Com a finalidade de comparar as sequências das amostras fecais com sequências de referência, foram utilizadas sequências provenientes do próprio Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação da UFSCar, cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos (CENAP - ICMBio), além de sequências de carnívoros obtidas junto aos bancos mundiais de dados GENBANK e BOLD Systems (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> e <http://www.boldsystems.org/>, respectivamente).

4. RESULTADOS

Do total de 27 amostras coletadas, o sucesso na extração do DNA foi de 100% (houve amplificação de DNA para todas as amostras). Para as amostras identificadas positivamente ao nível de espécie, ou seja, que geraram sequências satisfatórias, o sucesso foi de 20% para o gene ATP6 e de 100% para o gene Citocromo b.

Todas as amostras pertenciam à família Felidae. Seis amostras identificadas como: Num 8, Num 18, Num 23, Num 24, Num 25 e Num 26 (Tabela 2ab) foram

identificadas quanto a espécie de origem para o gene ATP6 com base na similaridade das sequências obtidas com as sequências de referência de *Puma concolor* obtidas no GenBank (acesso: FJ596287.1), BOLD (acesso: CAR064-11); de *Phantera onca* obtidas no GenBank (acesso: FJ596284.1), BOLD (acesso: CAR217-11) e de *Puma Yagouaroundi* obtida no BOLD (acesso: CAR263-11). As seis amostras foram identificadas como *P. concolor* (Figura 3a) como pode ser visto pelos sítios polimórficos, característicos de cada espécie (Figura 3b). Houve baixa similaridade entre as sequências de referências de outros felinos presentes no bioma, como *Leopardus pardalis* (acesso: CAR208-1) e *Leopardus wiedii* (acesso: CART017-11).

Para o gene citocromo b, as 27 amostras foram identificadas quanto à espécie de origem com base na similaridade das sequências obtidas com as sequências de referência de *Leopardus pardalis* obtida no GenBank (acesso: DQ469953.1), de *Puma concolor* obtidas no GenBank (acesso: DQ469950.1) e com as amostras de sangue do CENAP-ICMBio. Foram identificadas duas amostra de *Leopardus wiedii*, nove de *Leopardus pardalis*, dez de *Leopardus guttulus* e seis de *Puma concolor* (Tabela 2ab; Figura 4a). Os sítios polimórficos que diferenciam cada espécie podem ser observados na Figura 4b.

As amostras que foram coletados os dados georreferenciados pode ser visualizadas nos mapas dos parques (Figura 5 a 8), já as amostras que não tiveram seus dados georreferenciados coletados estão descritas nas tabelas 3, 4, 5 e 6, conforme trilha que foram coletadas.

Tabela 2a. Informações sobre a origem das amostras/seqüências utilizadas como referência e das amostras de fezes coletadas, data da coleta, trilhas em que foram coletadas, e identificação das espécies a partir dos dois diferentes genes analisados. (PE) Parque Estadual, (^a) identificação pelo gene ATP6; (^b) identificação pelo gene Citocromo b.

Amostra	Material	PE	Data	Trilha	Identificação
1	fezes	PEI	29/04/2016	Tr. Trop 1	<i>L.guttulus</i> ^b
2	fezes	PEI	29/04/2016	Tr. Mirante	<i>L.guttulus</i> ^b
3	fezes	PEI	20/04/2016	Tr. Trop 1	<i>L.guttulus</i> ^b
4	fezes	PEI	29/04/2016	Tr. Trop 1	<i>L.wiedii</i> ^b
5	fezes	PEI	24/06/2016	Tr. Rest	<i>L.pardalis</i> ^b
6	fezes	PEI	20/06/2016	Sede Pesquisa	<i>L.guttulus</i> ^b
7	fezes	PEI	26/11/2015	Tr. Rest	<i>L.guttulus</i> ^b
8	fezes	NSV - VG	20/01/2016	Tr. Boneca	<i>P. concolor</i> ^{a,b}
9	fezes	NSV - I	31/05/2016	Tr. Itamambuca	<i>L.pardalis</i> ^b
10	fezes	NSV - I	31/05/2016	Tr. Ipiranga	<i>L.guttulus</i> ^b
11	fezes	NSV - I	31/05/2016	Tr. Itamambuca	<i>L.pardalis</i> ^b
12	fezes	NSV - I	31/05/2016	Tr. Itamambuca	<i>L.pardalis</i> ^b
13	fezes	NSV - VG	06/07/2016	Tr. Torre	<i>L.pardalis</i> ^b
14	fezes	NSV - VG	06/07/2016	Tr. Torre	<i>L.pardalis</i> ^b
15	fezes	NSV - VG	06/07/2016	Tr. Torre	<i>L.pardalis</i> ^b
16	fezes	NSV - VG	06/07/2016	Tr. Torre	<i>L.pardalis</i> ^b
17	fezes	PEI	24/06/2016	Tr. Rest	<i>L.pardalis</i> ^b
18	fezes	PEI	24/06/2016	Tr. Rest	<i>P. concolor</i> ^{a,b}
19	fezes	PEI	24/06/2016	Tr. Rest	<i>L.pardalis</i> ^b
20	fezes	PEI	24/06/2016	Tr. Rest	<i>L.guttulus</i> ^b
21	fezes	PEI	24/06/2016	Tr. Rest	<i>L.guttulus</i> ^b
22	fezes	PEI	21/06/2016	Tr. Trop 1	<i>L.guttulus</i> ^b
23	fezes	PECB	28/07/2016	Tr. Serviço	<i>P. concolor</i> ^{a,b}
24	fezes	PECB	28/07/2016	Tr. Taquaral	<i>P. concolor</i> ^{a,b}
25	fezes	PECB	26/06/2016	Tr. Serviço	<i>P. concolor</i> ^{a,b}
26	fezes	PECB	26/06/2016	Tr. Serviço	<i>P. concolor</i> ^{a,b}
27	fezes	PECB	28/06/2016	Tr. Aceiro Bacural	<i>L.guttulus</i> ^b
Pc-BR	sangue	CENAP	-	-	<i>P. concolor</i>
Pc-C	sangue	CENAP	-	-	<i>P. concolor</i>
Lp-BR	sangue	CENAP	-	-	<i>L. pardalis</i>
Lp-C	sangue	CENAP	-	-	<i>L. pardalis</i>
Lw-s	sangue	CENAP	-	-	<i>L. wiedii</i>
Lg-s	sangue	CENAP	-	-	<i>L.guttulus</i>
Lc-BR	sangue	CENAP	-	-	<i>L. colocolo</i>
Po-s	sangue	CENAP	-	-	<i>P. onca</i>

Tabela 2b. Informações sobre a origem das amostras de fezes coletadas, trilhas em que foram coletadas, identificação das espécies a partir dos dois diferentes genes analisados e coordenadas geográficas em graus decimais. (PE) Parque Estadual, (^a) identificação pelo gene ATP6; (^b) identificação pelo gene Citocromo b.

Amostra	PE	Trilha	Identificação	Latitude	Longitude
6	PEI	Sede Pesquisa	<i>L.guttulus</i> ^b	-24.273365	-48.416197
13	NSV - VG	Tr. Torre	<i>L.pardalis</i> ^b	-23.440666	-45.245808
14	NSV - VG	Tr. Torre	<i>L.pardalis</i> ^b	-23.440666	-45.245808
15	NSV - VG	Tr. Torre	<i>L.pardalis</i> ^b	-23.440666	-45.245808
16	NSV - VG	Tr. Torre	<i>L.pardalis</i> ^b	-23.440666	-45.245808
27	PECB	Tr. Aceiro Bacural	<i>L.guttulus</i> ^b	-24.056723	-47.975455

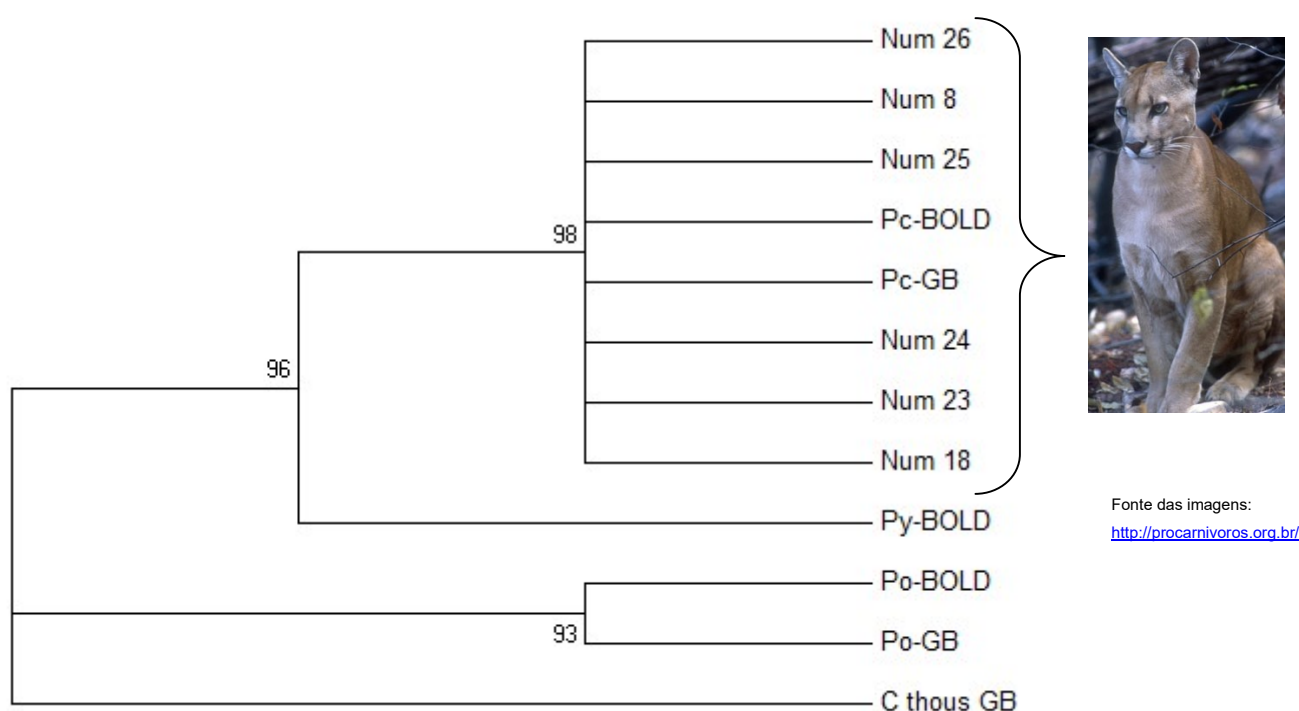


Figura 3a. Árvore neighbor-joining do fragmento de 126 pb do gene ATP6 com base em seqüências de referência (finais GB e BOLD) e seqüências obtidas a partir de amostras fecais coletadas na Mata Atlântica (Num; Tabela 2), com *Cerdocyon thous* como grupo externo. Os valores de *bootstrap*, baseados em 1000 replicações, são mostrados sobre os braços. (Pc) *Puma concolor*, (Py) *Puma yagouaroundi*, (Po) *Panthera onca*.

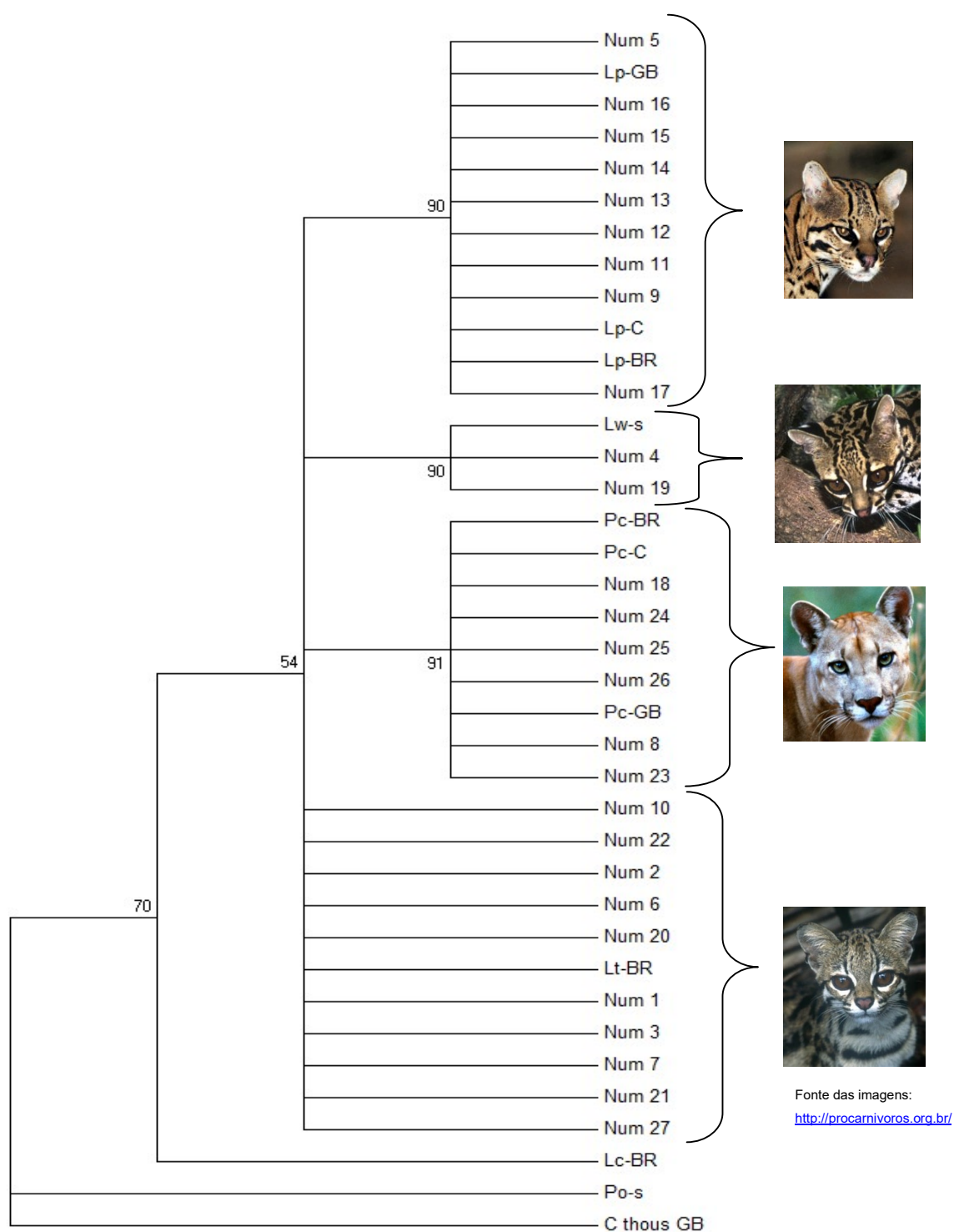


Figura 4a. Árvore *neighbor-joining* das seqüências do gene Citocromo b de referência e das amostras de fezes coletadas na Mata Atlântica, com *Cerdocyon thous* como grupo externo. Os valores de *bootstrap*, baseados em 1000 replicações, são mostrados sobre os braços. A nomenclatura GB refere-se às seqüências obtidas no GenBank; BOLD refere-se as seqüências do BOLD Systems; Num refere-se às amostras de fezes e os outros estão descritos na Tabela 2. (Pc) *Puma concolor*, (Lt) *Leopardus tigrinus* (lê-se *Leopardus guttulus*), (Lw) *Leopardus wiedii*, (Lp) *Leopardus pardalis*, (Lc) *Leopardus colocolo*.

<i>P. onca</i> -BOLD	ATT GTC ATA CTA ATT ATT ATA TTC CCC AGT ATT CTA TTC CCC TCG CCC AGT CGA CTA ATT AAC AAT CGT CTA ATC
<i>P. onca</i> -GB
<i>P. yagouaroundi</i> -BOLD	..CT T..A ..CA ..AACGT ..C ..C
Num 18	..C ..T ..C T.. ... G..A ..CA ..AACT ..C ..C ..G ...
Num 23	..C ..T ..C T.. ... G..A ..CA ..AACT ..C ..C ..G ...
Num 24	..C ..T ..C T.. ... G..A ..CA ..AACT ..C ..C ..G ...
<i>P. concolor</i> -GB	..C ..T ..C T.. ... G..A ..CA ..AACT ..C ..C ..G ...
<i>P. concolor</i> -BOLD	..C ..T ..C T.. ... G..A ..CA ..AACT ..C ..C ..G ...
Num 25	..C ..T ..C T.. ... G..A ..CA ..AACT ..C ..C ..G ...
Num 26	..C ..T ..C T.. ... G..A ..CA ..AACT ..C ..C ..G ...
Num 8	..C ..T ..C T.. ... G..A ..CA ..AACT ..C ..C ..G ...
<i>C. thous</i> -GBA ..CCA TCCT ..A ..A T.T .A. ..TCA T.. ...

Figura 3b. Fragmento de DNAmT do gene ATP6 com 75 pares de bases evidenciando os sítios de polimorfismo entre *P. concolor*, *P. yagouaroundi* e *P. onca*. *C. thous* é o grupo externo. Num – amostras de fezes; GB – GenBank; BOLD – BOLD Systems.

<i>L. pardalis</i> -C	GGC	TAT	AAC	TGC	GAA	TAG	CAG	TAT	GAT	ICC	GAT	GTT	TCA	TGT	TTC	TGA	GAA	GGT	GTA	GGA	GCC
Num 9
Num 5G
<i>L. pardalis</i> -GB
<i>L. tigrinus</i> -BR	G..	..T	A..	..A	T..	...	A..
Num 1	G..	..T	A..	..A	T..	...	A..
Num 2	G..	..T	A..	..A	T..	...	A..	A..
<i>L. wiedii</i> -s	A..	..A	A..	A..
Num 4	A..	..A	A..	A..
Num 19	A..	..A	A..	A..
<i>P. concolor</i> -C	G..	C..	A..	...	T..	A..	A..	C..	A..
Num 8	G..	C..	A..	...	T..	A..	A..	C..	A..	...	A..
Num 24	G..	C..	A..	...	T..	A..	A..	C..	A..
<i>P. concolor</i> -GB	G..	C..	A..	...	T..	A..	A..	C..	A..
<i>C. thous</i> -GBGT	.CGA	T..	..C	..C	.A.	A..	A..AT	...	TAC	A..

Figura 4b. Fragmento de DNAm_t do gene citocromo b com 63 pares de bases evidenciando os sítios de polimorfismo entre *P. concolor*, *L. pardalis*, *L. tigrinus* (lê-se *L. guttulus*) e *L. wiedii*. *C. thous* é o grupo externo. Num – amostras de fezes; GB – GenBank; o restante são amostras de sangue.

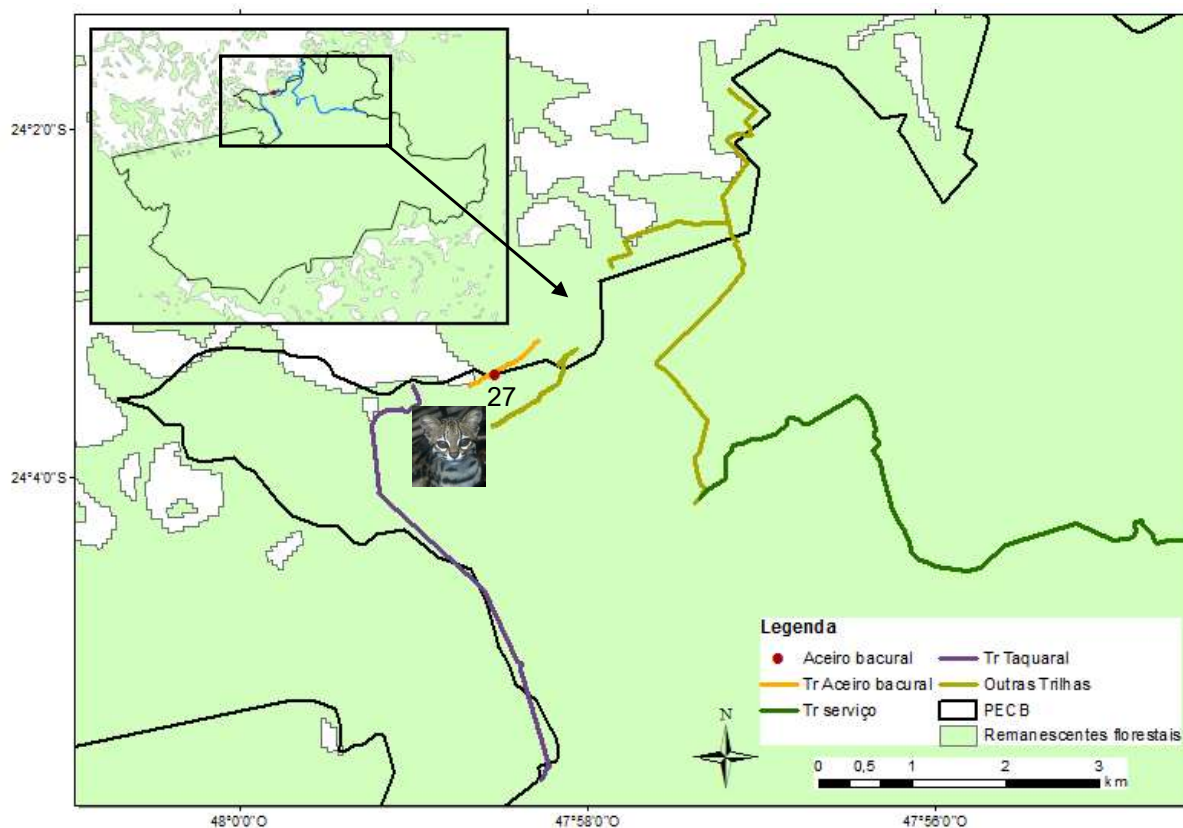


Figura 5. Localização das trilhas do Parque Estadual Carlos Botelho (PECB) e da amostra 27 identificada como *L. guttulus*.

Na tabela 3 estão as outras amostras encontradas no PECB que não tiveram seu ponto de coleta georreferenciado.

Tabela 3. Identificação das amostras nas trilhas do PECB. ^(a) identificação pelo gene ATP6; ^(b) identificação pelo gene Citocromo b.

Amostra	Data	Trilha	Identificação
23	28/07/2016	Tr. Serviço	<i>P. concolor</i> ^{a b}
24	28/07/2016	Tr. Taquaral	<i>P. concolor</i> ^{a b}
25	26/06/2016	Tr. Serviço	<i>P. concolor</i> ^{a b}
26	26/06/2016	Tr. Serviço	<i>P. concolor</i> ^{a b}
27	28/06/2016	Tr. Aceiro Bacural	<i>L. guttulus</i> ^b

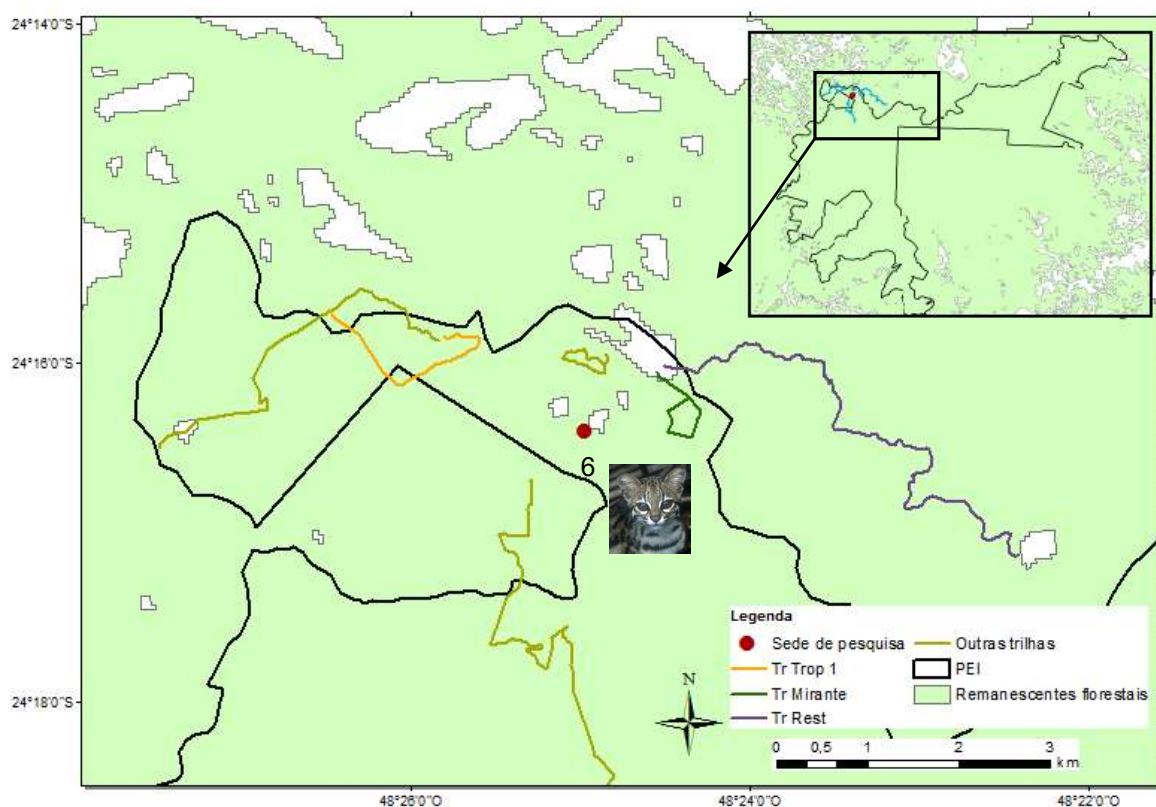


Figura 6. Localização das trilhas do Parque Estadual Intervales (PEI) e da amostra 6 identificada como *L. guttulus*.

Na tabela 4 estão as outras amostras encontradas no PEI que não tiveram seu ponto de coleta georreferenciado.

Tabela 4. Identificação das amostras nas trilhas no PEI. ^(a) identificação pelo gene ATP6; ^(b) identificação pelo gene Citocromo b.

Amostra	Data	Trilha	Identificação
1	29/04/2016	Tr. Trop 1	<i>L.guttulus</i> ^b
2	29/04/2016	Tr. Mirante	<i>L.guttulus</i> ^b
3	20/04/2016	Tr. Trop 1	<i>L.guttulus</i> ^b
4	29/04/2016	Tr. Trop 1	<i>L.wiedii</i> ^b
5	24/06/2016	Tr. Rest	<i>L.pardalis</i> ^b
6	20/06/2016	Sede Pesquisa	<i>L.guttulus</i> ^b
7	26/11/2015	Tr. Rest	<i>L.guttulus</i> ^b
17	24/06/2016	Tr. Rest	<i>L.pardalis</i> ^b
18	24/06/2016	Tr. Rest	<i>P. concolor</i> ^{a,b}
19	24/06/2016	Tr. Rest	<i>L.pardalis</i> ^b
20	24/06/2016	Tr. Rest	<i>L.guttulus</i> ^b
21	24/06/2016	Tr. Rest	<i>L.guttulus</i> ^b
22	21/06/2016	Tr. Trop 1	<i>L.guttulus</i> ^b

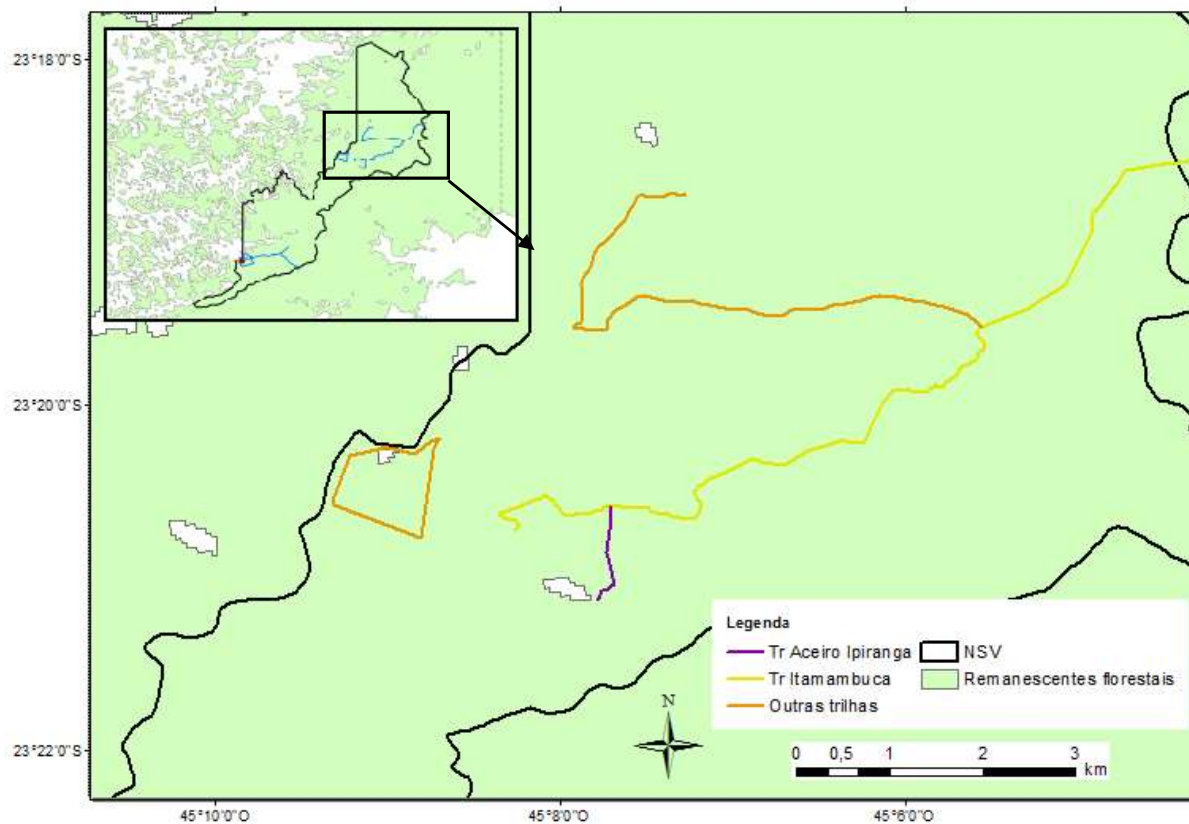


Figura 7. Localização das trilhas do Parque Estadual Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia – base sede – Itamambuca (NSV-I).

Na tabela 5 estão as amostras encontradas no PESM – NSV-I que não tiveram seu ponto de coleta georreferenciado.

Tabela 5. Identificação das amostras nas trilhas no PESM – NSV-I. ^(a) identificação pelo gene ATP6; ^(b) identificação pelo gene Citocromo b.

Amostra	Data	Trilha	Identificação
9	31/05/2016	Tr. Itamambuca	<i>L.pardalis</i> ^b
10	31/05/2016	Tr. Ipiranga	<i>L.guttulus</i> ^b
11	31/05/2016	Tr. Itamambuca	<i>L.pardalis</i> ^b
12	31/05/2016	Tr. Itamambuca	<i>L.pardalis</i> ^b

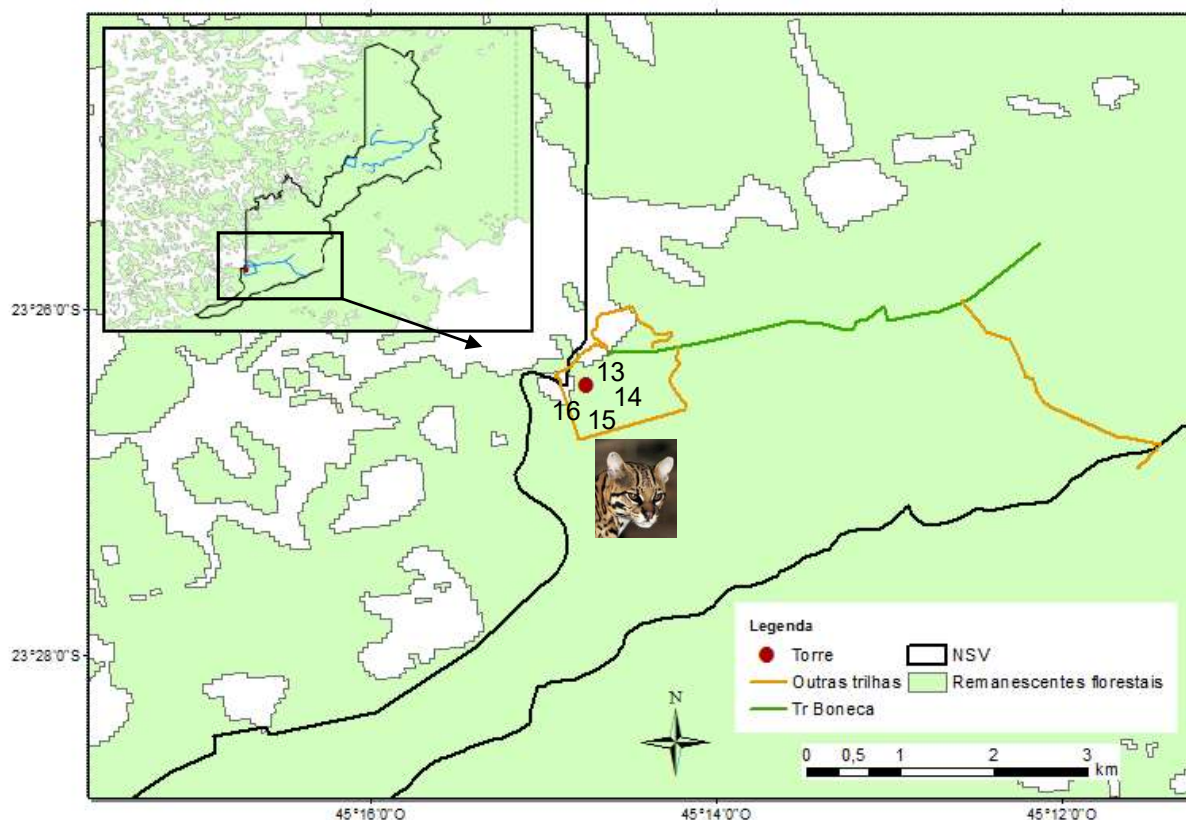


Figura 8. Localização das trilhas do Parque Estadual Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia – Vargem Grande (NSV-VG) e das amostras 13, 14, 15 e 16, todas identificadas como *L. pardalis*.

Na tabela 6 estão as outras amostras encontradas no PESH – NSV-VG que não tiveram seu ponto de coleta georreferenciado.

Tabela 6. Identificação das amostras nas trilhas no PESH – NSV-VG. ^(a) identificação pelo gene ATP6; ^(b) identificação pelo gene Citocromo b.

Amostra	Material	PE	Data	Trilha	Identificação
8	fezes	NSV - VG	20/01/2016	Tr. Boneca	<i>P. concolor</i> ^{a,b}
13	fezes	NSV - VG	06/07/2016	Tr. Torre	<i>L.pardalis</i> ^b
14	fezes	NSV - VG	06/07/2016	Tr. Torre	<i>L.pardalis</i> ^b
15	fezes	NSV - VG	06/07/2016	Tr. Torre	<i>L.pardalis</i> ^b
16	fezes	NSV - VG	06/07/2016	Tr. Torre	<i>L.pardalis</i> ^b

5. DISCUSSÃO

Identificar a espécie de origem da amostra fecal é um desafio devido a baixa quantidade e qualidade do DNA obtidos nas fezes (Taberlet *et al.* 1999), o alto potencial de contaminação (Taberlet *et al.* 1996, Palomares *et al.* 2002) e a dificuldade de discernir entre o DNA da espécie e o de suas presas (Ernest *et al.* 2000).

Este trabalho mostrou que é possível discernir e diferenciar espécies através da análise de sequências de DNAMt, pois apenas o uso do tamanho e morfologia das fezes podem gerar resultados enviesados, como descreve Miotto *et al.* 2007.

Uma vantagem em se utilizar fragmentos de DNAMt é a de que ele está presente nas amostras em um número muito maior de cópias do que o DNA nuclear, já que ele está presente em milhares de cópias em cada célula, enquanto o DNA nuclear possui uma única cópia por célula (Broquet *et al.* 2007; Chavez *et al.* 2012). Além disso, pequenos fragmentos estão mais susceptíveis a um sucesso de amplificação em amostras com DNA degradado, como ocorre em amostras fecais (Broquet *et al.* 2007; Kohn *et al.* 1995; Taberlet *et al.* 1999). Frantzen *et al.* (1998) relataram altas taxas de sucesso de amplificação de fragmentos de DNAMt de 190 pb a partir do material fecal, mas esse sucesso decrescia significativamente para fragmentos maiores.

Todas as espécies aqui identificadas pertencem à família Felidae. O fato de terem sido encontradas apenas amostras de felinos pode ser explicado pelo hábito desses animais em usar continuamente estradas de terras e trilhas para deslocamento marcando com frequência seus territórios nesses locais (Miotto *et al.* 2007, 2012; Ruell *et al.* 2009).

O sucesso de amplificação utilizando os marcadores DNAMt aqui selecionados foi de 100%, e aqueles identificados positivamente a nível de espécie, ou seja, que geraram sequências satisfatórias foram de 20% para o gene ATP6 e de 100% para o gene Citocromo b. Segundo Rodgers e Janečka (2013), aproximadamente 80% das amostras de fezes coletadas irá fornecer DNA adequado para a identificação de espécies quando são utilizados marcadores de DNAMt.

Chaves *et al.* (2012) testaram e compararam três diferentes fragmentos de DNAMt para a identificação de carnívoros Neotropicais: genes ATP6, citocromo b, e

citocromo oxidase I (COI). Os autores concluíram que o gene ATP6 tem o maior poder discriminatório entre os carnívoros e o maior sucesso de amplificação a partir de amostras não-invasivas, além de não amplificar DNA de possíveis presas. Entretanto, neste trabalho, notamos que o sucesso de sequenciamento para o gene ATP6 foi muito inferior ao do Citocromo b. Esse fato pode estar relacionado a dois fatores: é possível que uma melhor padronização da reação de PCR para o gene ATP6 seja necessária, o que poderia resultar em melhores produtos de amplificação para sequenciamento; ou, devido ao acaso, o DNA das amostras de fezes estava mais degradado justamente nesse loco gênico, o que gerou sequências pouco satisfatórias para edição/interpretação. Outros trabalhos já indicaram que o gene mitocondrial Citocromo b distingui de forma confiável as espécies de felinos Neotropicais (Farrell *et al.* 2000 ; Miotto *et al.* 2007; Janečka *et al.* 2008), e a alta similaridade encontrada nesse trabalho entre as sequências de referência e as sequências obtidas a partir das fezes exclui a possibilidade de amplificação de sequências oriundas de presas, principal crítica apontada por Chaves *et al.* (2012) para o emprego desse gene na identificação de amostras não invasivas.

A análise filogenética utilizando um segmento de 146 pb do citocromo b e 126 pb do ATP6 produziu duas árvores consistentes (valores de *bootstrap* superiores à 60%).

A partir das amostras aqui precisamente identificadas quanto à espécie, poderão ser realizadas as análises subsequentes a cerca dos hábitos alimentares e das relações tróficas dessas espécies nos remanescentes florestais de Mata Atlântica de forma confiável.

6. CONCLUSÕES

- O diagnóstico molecular para a confirmação da espécie de origem das fezes se mostrou eficiente e importante, podendo contribuir com os trabalhos de conservação.
- As técnicas não invasivas, utilizando o DNA de fezes são uma ferramenta complementar aos métodos de captura e telemetria tradicionais

utilizados em trabalhos com carnívoros, e têm se mostrado cada vez mais essenciais para a obtenção de dados para esse grupo.

- O fragmento de DNAm do gene citocromo b utilizado se mostrou eficiente para distinguir os felinos, em especial os felinos de pequeno porte (gênero *Leopardus*).

- Necessidade de continuidade e aprofundamento do estudo, para gerar dados de identificação a nível de indivíduo, para análise de população.

REFERÊNCIAS

Avise, J. C. (2000). *Phylogeography - The history and formation the species*. Harvard University Press, Cambridge, pp. 447.

Azevedo, F. C. C. (2008). Food Habits and Livestock Depredation of Sympatric Jaguars and Pumas in the Iguaçu National Park Area, South Brazil. *Biotropica*, 40: 494–500.

Beebee, T. J. C; Rowe, G. (2008). *An introduction to molecular ecology*. Second Edition. Oxford University Press, New York.

Bermingham, E.; Moritz, C. (1998). Comparative phylogeography - concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7: 367-369.

Broquet, T.; Menard, N.; Petit, E. (2007). Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics*, 8, 249–260.

Cardillo, M. *et al.* (2005). Multiple causes of high extinction risk in large mammal species. *Science*, 309, 1239–1241.

Chame, M. (2003). Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(1): 71-94.

Chaves, P. B.; Graeff, V. G.; Lion, M. B.; Ovileira, L. R.; Eizirik, E. (2012). DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignement of carnivore noninvasive samples. *Molecular Ecology Resources*, 12(1): 18-35.

Chiarello, A. G.; Aguiar, L. M. S.; Cerqueira, R.; Melo, F. R.; Rodrigues, F. H. G.; Silva, V. M. (2008). Mamíferos ameaçados de extinção do Brasil; p. 681-702. In Machado, A. B. M.; Drommond, G. M.; Paglia, A. P. (org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Belo Horizonte: Ministério do Meio Ambiente - Fundação Biodiversitas.

DeYoung, R. W e Honeycutt, R. L. (2005). The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *The Journal of Wildlife Management*, 69:1362-1384.

DeSalle, R e Amato, G. (2004). The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, 5: 702-712.

Dirzo, R.; Young, H. S.; Galletti, M.; Ceballos, G.; Nick, J. B.; Collen, B. (2014). Defaunation in the Anthropocene. *Science*, 345, 401–406.

Ernest, H. B.; Penedo, M. C. T.; May, B. P.; Syvanen, M. S.; Boyce, W. M. (2000). Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology*, 9: 433-441

Farrel, L. E.; Roman, J.; Sunquist, M. E. (2000). Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology*, 9: 1583-1590.

Ferreira, M. E. 2001. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. Em: Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais (eds) Garay, I., Dias, B. Editora Vozes, Rio de Janeiro, pp. 223-267.

Frankham, R.; Briscoe, D. A.; e Ballou, J. D. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press.

Frantz, A. C.; Pope, L. C.; Carpenter, P. J.; Roper, T. J.; Wilson, G. J.; Delahay, R. J.; Burke, T. (2003). Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Melesmeles*) using faecal DNA. *Molecular Ecology*, 12, 1649–1661.

Frantzen, M. A. J.; Silk, J. B.; Ferguson, J. W. H.; Wayne, R. K.; Kohn, M. H. (1998), Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, 7: 1423–1428.

Fundação Florestal, Secretaria Estadual do Meio Ambiente. (2008). Plano de Manejo do Parque Estadual Carlos Botelho.

Fundação Florestal, Secretaria Estadual do Meio Ambiente. (2009). Plano de Manejo do Parque Estadual de Intervales.

Fundação Florestal, Secretaria Estadual do Meio Ambiente. (2006). Plano de Manejo do Parque Estadual Serra do Mar.

Galetti, M.; Brocardo, C. R.; Begotti, R. A.; Hortenci, L.; Rocha-Mendes, F.; Bernardo, C. S. S.; Bueno, R. S.; Nobre, R.; Bovendorp, R. S.; Marques, R. M.; Meirelles, F.; Gobbo, S. K.; Beca, G.; Schmaedecke, G.; Siqueira, T. (2016). Defaunation and biomass collapse of mammals in the largest Atlantic forest remnant. *Animal Conservation*, 1469-1795.

Gittleman, J.L.; Funk, S.M.; Macdonald, D.; Wayne, R.K. (2001). Carnivore Conservation. Cambridge University Press.

Hall, T. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *Gerf Bulletin of Bioscience* 2.1:6.

Hedrick, P.W.; Miller, O.S. (1992). Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecological Applications*, 2(1): 30-46.

Hoss, M. *et al.* (1992). Excrement analysis by PCR. *Nature*, 359, p. 199.

Janečka, J. E.; Jackson, R.; Yuquang, Z.; Diqiang, L.; Munkhtsog, B.; Buckley-Beason, V.; Murphy, W.J. (2008) Population monitoring of snow leopards using noninvasive collection of scat samples: a pilot study. *Animal Conservation*, 11:401–411.

Johnson, E. A.; Miyanishi, K.; Bridge, S. R. J. (2001). Wildfire regime in the boreal forest and the idea of suppression and fuel buildup. *Conservation Biology*, 15: 1554–1557.

Jorge, M. S. P.; Ferraz, K.; Ribeiro, M. C.; Galetti, M. (2013). Mammal defaunation as surrogate of trophic cascades in a biodiversity hotspot. *Biological Conservation*, 163:49–57.

Katz, E. T.; Boger-Nagjar, E.; Frenkel, Z.; Katsperovski, I.; Kemeny, S.; Nevo, E.; Korol, A. B.; Kashi, Y. (2006). Molecular-Genetic Biodiversity in a Natural Population of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* From "Evolution Canyon": Microsatellite Polymorphism, Ploidy and Controversial Sexual Status. *Genetics*, 174(3):1455-68

Kohn, M.; Knauer, F.; Stoffella, A.; Schuroder, W.; Paabo, S. (1995), Conservation genetics of the European brown bear - a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Ecology*, 4: 95–104

Kohn, L. T.; Corrigan, J. M.; Donaldson, M. S. (1999). *To Err is Human: Building a Safer Health System*. Washington, D.C: National Academy Press.

Kurose, N.; Masuda, R.; Tatara, M. (2005). Fecal DNA analysis for identifying species and sex of sympatric carnivores: a noninvasive method for conservation on the Tsushima Islands, Japan. *Journal of Heredity*, 96:688–697.

Laurance, W. F. (2012). Averting biodiversity collapse in tropical forest protected areas. *Nature*, 489, 290–294.

Loyola, R. D.; Becker, C. G.; Kubota, U.; Haddad, C. F. B.; Fonseca, C. R. et al. (2008). Hung out to dry: choice of priority ecoregions for conserving threatened Neotropical anurans depends on life-history traits. *PLOS ONE* 3(5):2120.

Magioli, M.; Moreira, M. Z.; Ferraz, K.M.P.M.B.; Miotto, R.A.; Camargo, P.B.; Rodrigues, M.G.; Canhoto, M.C.; Setz, E.F. (2014). Stable Isotope Evidence of *Puma concolor* (Felidae) Feeding Patterns in Agricultural Landscapes in Southeastern Brazil. *Biotropica*, 46(4): 451-460.

Magioli, M.; Ferraz, K. M. P. M. B.; Setz, E. Z. F.; Percequillo, A. R.; Rondon, M. V. S. S.; Kuhnen, V. V.; Canhoto, M. C. S.; Santos, K. E. A.; Kanda, C. K.; Fregonezi, G. L.; Prado, H. A.; Ferreira, M. K.; Ribeiro, M. C.; Villela, P. M. S.; Coutinho, L. L.; Rodrigues, M. G. (2016). Connectivity maintain mammal assemblages functional diversity within agricultural and fragmented landscapes. *European Journal of Wildlife Research*, 62:431-446.

Miotto, R. A.; Rodrigues, F. P.; Ciochetti, G.; Galetti Jr, P. M. (2007). Determination of the minimum population size of puma (*Puma concolor*) through fecal DNA analysis in two protected cerrado areas in the Brazilian Southeast. *Biotropica*, 39: 647-654.

Miotto, R. A.; Ciochetti, G.; Rodrigues, F. P. e Galetti Jr, P. M. (2007). Identification of pumas (*Puma concolor* (Linnaeus, 1771)) through faeces: a comparison between morphological and molecular methods. *Brazilian Journal of Biology*. 67:963-965.

Miotto, R. A.; Cervini, M.; Begotti, R. A.; Galetti Jr, P. M. (2011). Genetic diversity and population structure of pumas (*Puma concolor*) in southeastern Brazil: implications for conservation in a human-dominated landscape. *Conservation Genetics*, 12(6): 1447-1455.

Miotto, R. A.; Cervini, M.; Begotti, R. A.; Galetti Jr, P. M. (2012). Monitoring a puma (*Puma concolor*) population in a fragmented landscape in southeast Brazil. *Biotropica*, 44:98-104

Mittermeier, R. A.; Gil, R. P.; Hoffman, M.; Pilgrim, J.; Brooks, T.; Mittermeier, C. G.; Lamoreux, J.; Fonseca, G. A. B. (2005). Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions, 2. ed. University of Chicago Press, Boston.

Morin, P. A.; Woodruff, D. S. (1996). Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. In *Molecular Approaches to Conservation*, ed. Smith, T.B.; Wayne, R.K. Oxford: Oxford Univ. Press. In press.

Mullis, K. B.; Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350.

Palomares, F.; Godoi, J. A.; Piriz, A.; O'Brien, S. J.; Johnson, W. E. (2002). Fecal genetic analysis to determinate the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology*, 11: 2171-2182

Parker, P. G.; Snow, A. A.; Schug, M. D.; Booton, G. C.; Fuerst, P. A. (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79(2): 361-382.

Perez-Sweeney, B. M.; Rodrigues, F. P.; Melnick, D. J. (2003). Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. Em: *Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre* (eds) Cullen, Jr. L., Rudran, R., Valladares-Padua, C.), Editora UFPR, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Paraná, pp. 343-380.

Prugh, L. R.; Ritland, C. E., Arthur, M. A.; Krebs, C. J. (2005). Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology*, vol. 14, p. 1585-1596.

Reis N. R.; Shibata, A. O.; Peracchi, A. L.; Pedro, W. A.; Lima, I. P. (2006). Sobre os mamíferos do Brasil. In Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. (Ed.) Mamíferos do Brasil, Londrina.

Ribeiro, M. C.; Metzger, J. P.; Martensen, A. C.; Ponzoni, F.; Hirota, M. M. (2009). Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142, 1141–1153.

Ribeiro, M. C.; Martensen, A. C.; Metzger, J. P.; Tabarelli, M.; Scarano, F.; Fortin, M. J. (2011). The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. In: Zachos, F.E.; Habel, J.C. (Ed). Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas. Heidelberg: Springer.

Ripple, W. J.; Estes, J. A.; Beschta, R. L.; Wilmers, C. C.; Ritchie, E. G.; Hebblewhite, M.; Schmitz, O. J. (2014). Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science*, 343(6167), 1241484.

Rodgers, T.; Janečka, J. (2013). Applications and techniques for non-invasive faecal genetics research in felid conservation. *Europeau Journal of Wildlife Research*, 59(1):1–16.

Ruell, E. W.; Riley, S. P. D.; Douglas, M. R.; Pollinger, J. P.; Crooks, K. R. (2009). Estimating Bobcat Population Sizes and Densities in a Fragmented Urban Landscape Using Noninvasive Capture–Recapture Sampling. *Journal of Mammalog.*, 129-135.

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.

Saitou, N.; Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406-425.

Sato, M.; Kashiwara, M.; Kimura, T.; Oshima, T. (1980). Micro-local analysis of prehomogeneous vector spaces. *Inventiones Mathematicae*, 62: 117.

Schipper, J. (2008). The status of the world's land and marine mammals: diversity, threat and knowledge. *Science*, 322:225-230.

Silveira, L. (1999). Ecologia e conservação dos mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas, Goiás. 117f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Solé-Cava, M. (2001). Biodiversidade molecular e genética da conservação. Em: *Biologia Molecular e Evolução*, Matioli SR (ed.). Editora Holos, Ribeirão Preto, pp. 171-192.

Soulé, M. E. (1985). What is Conservation Biology? *Bioscience*, 35:727-724.

Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15(5): 199-203.

Taberlet, P.; Bouvet, J. (1991). A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *The Auk*, 108:959-960.

Taberlet, P.; Meyer, J.; Bouvet, J. (1992). Usually large mitochondrial variation in populations of the blue tit, *Parus caeruleus*. *Molecular Ecology*, 1:27-36.

Taberlet, P., S. Griffin, B. Goossens, S. Questiau, V. Manceau, N. Escaravage, L. P. Waits, and J. Bouvet. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 24:3189–3194.

Taberlet, P. et al. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution*, 14 pp. 323–327.

Tamura, K.; Petersom, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum like hood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731-2739.

Valiere, N.; P, Taberlet. (2000). Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Molecular Ecology*, 9:2150–2154.

Valiere, N.; Fumagalli, L.; Gielly, L.; Miquel, C.; Lequette, B.; Poulle, M. L.; Weber, J.M.; Arlettaz, R.; Taberlet, P. (2003). Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from noninvasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal Conservation*, 6:83–92.

Voss, R.S.; Emmons, L.H. 1996. Mammalian diversity in Neotropical lowland reforests: A preliminary assessment. *Bulletin American Museum of Natural History*, 230: 1-115.

Waits, L. P.; Paetkau, D. (2005). Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *The Journal of Wildlife Management*, 69:1419–1433

Wayne, R. K.; Morin, P. A. (2004), Conservation genetics in the new molecular age. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2: 89–97.

Weber, W.; Rabinowitz, A. (1996). A Global Perspective on Large Carnivore Conservation. *Conservation Biology*, 10: 1046–1054.