

Identificação do predador através do DNA-mitocondrial das células epiteliais encontradas nas fezes de felinos de grande porte na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo.

Rogério Martins¹, Beatriz de Mello Beiseigel², Andiara Silos M. C. Souza³ & Pedro M. Galetti Junior³

- 1- Projeto Jaguar: Rua Erasmo Pinheiro Ribas, 346, Centro, 11.750-000, Peruíbe, São Paulo, Brasil. E-mail projetojaguar@hotmail.com
- 2- CENAP - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros. Estrada Municipal Hisaichi Takebayashi, 860, Bairro da Usina, 12952-011, Atibaia, São Paulo.
- 3- UFSCAR – Universidade Federal de São Carlos – Departamento de Genética e Evolução. Rodovia Washington Luiz, km 235, 13.560-970, São Carlos, São Paulo.

Resumo: Populações de felinos de grande porte estão ameaçadas em todos os fragmentos florestais de Mata Atlântica devido principalmente a fragmentação de seu habitat e caça ilegal. Em razão dos hábitos furtivos destes felinos a extração do DNA mitocondrial a partir de suas fezes é uma ferramenta genética que pode identificar, avaliar a condição genética da população e, deste modo, proporcionar subsídios para a criação de estratégias de conservação e manejo.

Palavras chaves: *Puma concolor*, *Panthera onca*, Dna fecal, Mata Atlântica

Identification of the predator through the mitochondrial DNA of epithelial cells found in the feces of large cats in Juréia-Itatins, São Paulo.

Abstract: Populations of big cats are threatened in all of the Atlantic forest fragments mainly due to habitat fragmentation and illegal hunting. Because of their stealthy habits, extraction of mitochondrial DNA from feces is a genetic tool that can identify, evaluate the genetic status of the population and thus, provide grants for the creation of strategies for conservation and management.

Keywords: *Puma concolor*, *Panthera onca*, fecal Dna, Atlantic forest

Introdução

O sul do estado de São Paulo e o norte do Paraná abrigam uma das últimas grandes populações de onças pintadas *Panthera onca* da Mata Atlântica, além de importante população de onças pardas *Puma concolor*, mas dados concretos sobre estas espécies na região são ainda escassos, impossibilitando a tomada de decisões conservacionistas bem fundamentadas. A Estação Ecológica de Juréia-Itatins (E.E.J.I.), está situada no litoral sul do Estado de São Paulo e em abril de 2013 tornou-se um mosaico de unidades de conservação. É uma das maiores áreas protegidas no Domínio da Mata Atlântica e se destaca pela diversidade da vegetação, influência marinha e grandes variações altitudinais.

Estudos com mamíferos neotropicais em sua maioria, são feitos através de vestígios indiretos por possuírem hábitos noturnos, evasivos e terem baixa densidade populacional. Um dos indícios que proporcionam mais informações na atualidade são as fezes destes mamíferos encontradas em seu ambiente natural. O reconhecimento dos autores da deposição pode ser elucidado pela presença de rastros associados às fezes, mas isso não ocorre na maioria dos casos (Martins et. al. 2008 a) e dependem muito de o quão fresca as fezes são e quanto o substrato é naturalmente favorável à impressão de rastros.

Métodos não invasivos como o estudo do DNA fecal são fontes confiáveis de informação sem a necessidade de capturar ou mesmo observar o animal (Taberlet et. al., 1999), tornando-se assim um método mais adequado para identificar, caracterizar e monitorar populações de determinadas espécies (Foran et. al., 1997). O DNA das fezes tem sido usado recentemente para identificar espécies carnívoras (Graeff, 2008), e também para otimização de métodos que diferenciem onça-pintada de onça-parda (Haag et. al., 2009).

Neste trabalho O DNA mitocondrial (DNA mt) foi usado para identificação de carnívoros autores das fezes e trará informações para estudos filogenéticos que define populações parcialmente diferenciadas geneticamente e filogeográficos que identifica áreas importantes para conservação dos felinos neotropicais.

Material e métodos

Uma busca ativa por fezes de onças foi realizada a partir do início de janeiro de 2012 durante a instalação e vistoria das armadilhas fotográficas utilizadas para identificação individual de onças e também em outras ocasiões oportunas na Estação Ecológica de Juréia-Itatins (E.E.J.I.), São Paulo, entre as coordenadas 24°18'-24°32'S e 47°00'-47°30'W. Para ampliar o esforço amostral, foram escolhidos três moradores experientes de regiões distintas

na E.E.J.I. e que já haviam participado de projetos com felinos anteriormente. Eles receberam orientações dos procedimentos de coleta, registro e armazenamento, e foi estabelecido um acordo de pagar R\$ 20,00 por amostras de grandes felinos.

Registrou-se a posição com auxílio de GPS quando encontrada uma amostra no momento da vistoria ou posteriormente quando coletado pelos moradores. Quando encontrada as fezes de carnívoro, retirou-se aproximadamente 5 cm (cerca de seis gramas) de sua porção externa e acondicionou-se em tubos de propileno de 15 ml em álcool 96% como o sugerido por Graeff, (2008). Foram transportados em caixa de isopor e armazenados em freezer a – 20°C antes da extração do DNA.

Para a extração de DNA das fezes utilizou-se o kit comercial *PSP Spin Stool DNA* (Invitek) próprio para este tipo de material e que tem apresentado bons resultados tanto para Martins (2011) como para Miotto e colaboradores (2011). Para identificação as espécies foi utilizado um par de *primers* que amplificam um fragmento do citocromo b de 146 pb, específico para felinos (Farrel *et al.*, 2000). Os fragmentos obtidos por PCR (Reação em cadeia da polimerase) foram purificados por meio do método de precipitação de polietileno glicol (PEG), separados por eletroforese em gel de agarose 2% e posteriormente, enviados para sequenciamento à empresa MacroGen Inc (Coréia do Sul).

Resultados

Após vinte meses de coleta obtivemos 28 amostras de fezes de carnívoros que evidenciavam morfologicamente serem de felinos de grande porte. Deste total, dez já foram para análise genética até o presente momento, sendo que oito amplificaram com sucesso, revelando que duas eram de *Panthera onca*, três de *Puma concolor*, duas de *Leopardus pardalis* e uma de *Leopardus wiedii* (Tab.I). As dezoito amostras restantes, assim como todas as que forem coletadas posteriormente, serão submetidas ao processo de identificação da espécie até o final do primeiro semestre de 2014. As duas que não amplificaram na primeira tentativa, serão refeitas com outra parte da amostra que está armazenada.

A coleta do material escatológico feita pelos autores desta pesquisa representaram 25% (7) do total da amostragem até agora e o restante 75% (21), foram de responsabilidade dos três moradores instruídos para este fim. Todas as fezes coletadas pelos moradores já analisadas (4) tiveram êxito na amplificação dos segmentos do DNA mitocondrial e em sua identificação.

Discussão

A E.E.J.I possui seis espécies de felinos residentes e a identificação de quatro espécies autoras das fezes encontradas e analisadas até o momento mostrou que o uso do marcador molecular “citocromo b” encontrado no DNA- mitocondrial das células epiteliais provenientes do cólon dos felinos, foi eficaz em seu propósito. A comparação de sequências de mtDNA permitiu distinguir, com exceção de duas, cada uma das amostras coletadas em campo de acordo com a espécie.

Tabela I. Amostras de fezes coletadas de acordo com a data, região, estado da amostra e espécie carnívora identificada como autora na Estação Ecológica de Juréia-Itatins,

Amostras	Data	Macrorregião	Estado da amostra	Espécie
EJI8	17/05/2012	Guilherme	Recente	<i>Puma concolor</i>
EJI9	17/05/2012	Rio Carvalho	Intermediária	?
EJI7	16/06/2012	Vitor	Recente	<i>Puma concolor</i>
EJI6	24/07/2012	Palhal	Recente	<i>Leopardus pardalis</i>
EJI10	24/07/2012	Palhal	Recente	<i>Leopardus wiedii</i>
EJI5	28/07/2012	Vitor	Intermediária	?
EJI1	16/11/2012	Cica	Recente	<i>Panthera onca</i>
EJI2	18/11/2012	Cica	Recente	<i>Leopardus pardalis</i>
EJI3	21/11/2012	Cica	Recente	<i>Panthera onca</i>
EJI4	25/11/2012	Cica	Recente	<i>Puma concolor</i>

Estas duas amostras não tiveram êxito em sua identificação possivelmente por serem as fezes menos frescas de todas. Embora o sucesso da distinção específica das amostras genéticas dependa em partes do estado de degradação do material (Palomares et. al., 2002), o reconhecimento dos aspectos morfológicos das fezes, quando não estão associados ao rastro independe da experiência de campo do pesquisador por não proporcionarem indícios suficientes para uma discriminação eficiente. Existe sobreposição do diâmetro e do comprimento das fezes dos felinos de médio e grande porte (Farrel et al, 2000), portanto, não é possível se ter segurança na identificação da espécie através da morfologia das fezes e tampouco do gênero. Todas fezes foram coletadas na expectativa de que fossem de onça-parda, mesmo as que posteriormente identificaram-se como de onça-pintada. Estas duas fezes foram os únicos registros de onça-pintada desde o ano 2000, quando um macho foi abatido dentro da E.E.J.I. (Martins, 2008). Das oito fezes, cinco eram de grandes felinos e três de felinos de médio e pequeno porte. A ferramenta

genética foi imprescindível para a confirmação da espécie, evitando os erros de análise morfológica ou o descarte de amostras não associadas à rastros, além de permitir o aumento do esforço amostral incluindo pessoas que não tem vínculo com a academia científica.

Referências bibliográficas

FARREL, L.E.; ROMAN, J.; SUNQUIST, M.E. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. **Molecular Ecology**, 9: 1583-1590, 2000

FORAN, D. R.; A. CROOKS & A. C. MINTA. Species identification from scat: an unambiguous genetic method. **Wildl. Soc. Bu ll.** 25, 835-839. 13, 1997.

GRAEFF, V. **Identificação de espécies de carnívoros brasileiros (mammalia: Carnívora) a partir de amostras de fezes utilizando sequências de DNA e microscopia óptica de pelos.** Dissertação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2008.

HAAG, T.; A. S. SANTOS; C. ANGELO; A. C. SRBEK-ARAÚJO; D. A. SANA; F. M. SALZANO; E. EIZIRIK, & R.G. MORATO. Development and testing of an optimized method for DNA-based identification of jaguar *Panthera onca* and *Puma concolor* faecal samples for use in ecological and genetic studies. **Genética**, 136, p. 505-512, 2009.

MARTINS, R., J. QUADROS & M. MAZZOLLI. Hábito alimentar e interferência antrópica na atividade de marcação territorial do *Puma concolor* e *Leopardus pardalis* (Carnívora: Felidae) e outros carnívoros da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 25, p. 427-435. 14, 2008 (a).

MARTINS, R.; & A. BORINI. Distribuição espacial de grandes felinos e abundância relativa de mamíferos em uma área de Mata-Atlântica costeira do Brasil. In: IV Congresso Brasileiro de Mastozoologia.2008, São Lourenço. **Anais do IV Congresso Brasileiro de Mastozoologia.** 2008 (b).

MARTINS, N. **Tamanho populacional mínimo e diversidade genética de onça-parda (*Puma concolor*) no núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo.** Trabalho de Dissertação pela Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. São Paulo. 59 p., 2011.

MIOTTO, R.A.; CERVINI, M.; BEGOTTI, R.A.; GALETTI-JR .P.M. Monitoring a puma (*Puma concolor*) population in a fragmented landscape in the Brazilian southeast. *Biotropica*, doi:10.1111/j.1744-7429.2011.00772.x. TABERLET, P.; L. P.WAITS & G.

LUIKART. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. **Trends Ecol Evol** 14 :323–327, 2011.

PALOMARES, F; GODOI; J. A.; PIRIZ, A; O'BRIEN, S. J.; JOHNSON, W. E. Fecal genetic analysis to determinate the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian Lynx. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2171-2182, 2002