

## USO DO DNA BARCODING NA IDENTIFICAÇÃO DE MAMÍFEROS FRUGÍVOROS DE UMA RESTINGA NO SUL DO BRASIL ATRAVÉS DE AMOSTRAS FECAIS

**GABRIEL SILVA DOS SANTOS<sup>1</sup>; VICTOR KENZO FERNANDES TANAKA<sup>2</sup>;**  
**JULIANA CORDEIRO<sup>3</sup>; JEFERSON VIZENTIN-BUGONI<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [gabrieldeval@hotmail.com](mailto:gabrieldeval@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - [vkenzoff@gmail.com](mailto:vkenzoff@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [jlncdr@gmail.com](mailto:jlncdr@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [jbugoni@yahoo.com.br](mailto:jbugoni@yahoo.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

O estudo das interações dos mamíferos frugívoros com as plantas permite obter uma maior compreensão dos hábitos alimentares dos animais frugívoros, da evolução das características dos frutos e da dinâmica de regeneração de comunidades de plantas (Encinas-Viso et al., 2014). As interações ecológicas podem ser definidas como relações entre indivíduos de diferentes espécies, as quais podem gerar efeitos positivos, neutros ou negativos na aptidão dos organismos envolvidos. As interações são frequentemente identificadas em campo através de métodos fitocêntricos ou zoocêntricos. A abordagem zoocêntrica consiste em determinar as interações através da coleta de material depositado por animais no ambiente, por exemplo, a identificação de sementes presentes em amostras fecais coletadas em campo (Vitorino et al., 2022). O animal que produziu estas amostras pode então ser identificado através de, por exemplo, análises de pêlos presente nas fezes (Porto & Rui 2019) ou por análises de DNA (Hebert et al., 2003).

O método DNA Barcoding utiliza fragmentos de genes do DNA mitocondrial como fonte para as análises de identificação de espécies (Hebert et al., 2003). Os genes mitocondriais apresentam uma maior taxa de substituições nucleotídicas (taxa de mutação) que os genes nucleares. Por exemplo, as mutações adquiridas pelo gene COI são cumulativas e mantêm uma alta taxa de conservação (Fonseca et al., 2008). Outra vantagem do DNA mitocondrial é que cada célula contém centenas de cópias deste genoma. Esta abundância de cópias facilita a amplificação de fragmentos de interesse por meio da técnica de PCR, mesmo em amostras degradadas. Essas peculiaridades do DNA mitocondrial tornam seus genes marcadores moleculares ideais para usar como ferramenta em estudos de identificação de espécies (Hebert et al., 2003).

O uso de técnicas forenses para identificação de espécies de mamíferos por meio de pêlos, apesar de muito utilizada, possui limitações. A maior limitação é a ocorrência de mamíferos de diferentes espécies em uma determinada área, tornando difícil a identificação ao nível de espécie. Embora estudos tenham se dedicado ao aprimoramento do método *DNA barcoding* para mamíferos no Brasil (Chaves et al., 2012), poucos deles avaliaram o uso desta técnica em estudos relacionados à dispersão de sementes por mamíferos frugívoros, inclusive no Bioma Pampa (Oliveira et al., 2024). Esta avaliação é particularmente importante considerando que mamíferos frugívoros ocorrem na maioria das comunidades na América do Sul e são dispersores de sementes frequentes (Mammal Diversity Database 2025). Neste sentido, desenvolver um protocolo eficiente para a

identificação molecular utilizando fezes de mamíferos, será de grande importância para futuros estudos que aprofundem na investigação dos itens alimentares consumidos por mamíferos bem como a compreensão de sua ecologia e conservação.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivos: (a) aplicar e aprimorar protocolos de *DNA Barcoding* utilizando amostras fecais de mamíferos que contém sementes; e (b) descrever a diversidade de mamíferos que consumiram frutos em uma comunidade de restinga na planície costeira do sul do Brasil.

## 2. METODOLOGIA

A coleta das amostras ocorreu na Fundação Tupahue, no município de Pelotas, no Rio Grande do Sul. Uma transecção de aproximadamente 8 km abrangendo todos os ambientes da Fundação Tupahue foi delimitada. Um mês antes do início das coletas, todas as amostras fecais ao longo da trilha foram descartadas para garantir que as fezes no dia da coleta fossem referentes àquele mês de coleta. As coletas foram realizadas mensalmente no período de maio de 2023 até maio de 2025. Das 452 amostras coletadas em campo, utilizamos 50 amostras para o método de DNA Barcoding.

Para cada amostra de fezes foi realizada a extração de DNA seguindo o protocolo QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Após a extração, o passo seguinte foi a amplificação. Considerando que o DNA isolado de amostra fecal deve estar mais degradado, foi amplificada a região considerada “mini barcode”, no qual é amplificado um fragmento de aproximadamente 200 pb do gene COI. Foi utilizado o *primer forward* BCF2 (Chaves et al., 2011) e o *primer reverse* HCO2018 (Folmer, et al 1994).

As amostras de PCR com resultado positivo de amplificação tiveram seus *amplicons* purificados por meio da enzima ExoSap-it (Thermo Fisher Scientific®). O sequenciamento foi realizado para ambas as fitas *forward* e *reverse* pela empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul) ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

Com a finalidade de identificar as espécies, as sequências consenso foram montadas por dois programas, Prep4 e Gap4 do pacote Stadem (Staden, 1996). Para identificação molecular das espécies, foi realizada a estratégia de busca de sequências homólogas nos bancos de dados, GenBank e BOLD, por meio da ferramenta BLAST, com o algoritmo BlastN.

As análises de comparação das sequências dos bancos de dados e das amostras fecais, com objetivo de identificar as espécies, foram feitas de duas formas. Primeira, foi comparada as sequências obtidas com as presentes no GenBank/BOLD e, segunda, foi realizada a análise de monofilia recíproca entre as sequências obtidas e as sequências de espécies identificadas por trabalhos prévios e presentes no GenBank/BOLD.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar os resultados do BLASTN (Tabela 1) e os resultados da análise de monofilia recíproca, para as seis amostras para as quais o sequenciamento foi bem sucedido, foi possível identificar que pertenciam a duas espécies de mamíferos. Uma das amostras fecais pertencia a *Procyon cancrivorus* e as demais pertenciam a *Cerdocyon thous*.

Tabela 1- Informações sobre as sequências obtidas neste trabalho. Dados de cobertura, valor-E, percentual de identidade e espécies foram obtidos das análises por BLASTN

Código de coleta	Tamanho (pb)	+/-	Cobertura	Valor-E	Percentual de identidade	Espécie identificada
TUP075 FR	149	-	99%	2e-70	99%	<i>Cerdocyon thous</i>
TUP124 F	149	+	97%	2e-65	99%	<i>Cerdocyon thous</i>
TUP125 F	149	+	93%	2e-66	99%	<i>Cerdocyon thous</i>
TUP166 F	149	+	95%	6e-66	99%	<i>Cerdocyon thous</i>
TUP171 R	149	+	24%	1e-74	97%	<i>Cerdocyon thous</i>
TUP180 F	298	+	8%	1e-84	95%	<i>Procyon cancrivorus</i>

Fonte: Autor.

Para as amostras que não obtiveram boas amplificações, presume-se que as possíveis causas envolvam: (I) a influência da umidade, calor e incidência direta de radiação solar sobre as amostras em campo, que pode ter causado a degradação do DNA; (II) possível ação que inibidores que tenham afetado as amplificações, uma vez que inibições podem estar relacionadas aos vários ciclos de PC;; (III) a maior parte do DNA contido nas fezes ser exógena, sendo que a maior parte do DNA endógeno (i.e. do organismo-alvo) encontra-se na parte superficial das fezes, embora em baixa quantidade (Fernando et al., 2003).

Neste sentido, recomendamos que futuros estudos diminuam o intervalo de tempo entre coletas, que seja raspada superficialmente as amostras no momento da coleta para maximizar coleta de células e que se utilize *primers* mais específicos. Estas iniciativas podem aumentar a chance de obter maior quantidade de DNA do consumidor.

#### 4. CONCLUSÕES

Apesar de demonstrar diversas vantagens, como diminuição do tempo relacionado a observações em campo, a técnica de DNA barcoding também apresenta desafios relacionados ao estabelecimento de um protocolo eficiente para a identificação de espécies com base em amostras fecais. Nossa estudo demonstra que o DNA barcoding pode ser utilizado como uma ferramenta complementar para a identificação de mamíferos frugívoros, o que pode ser especialmente valioso em estudos sobre interações que envolvem animais inconspicuos ou arredios que são, portanto, difíceis de visualizar em campo e as plantas que consomem e dispersam.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAVES, Paulo B.; GRAEFF, Vanessa G.; LION, Marília B.; *et al.* DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 1, p. 18–35, 2011.
- ENCINAS-VISO, Francisco; MELIÁN, Carlos J.; ETIENNE, Rampal S. **The emergence of network structure, complementarity and convergence from basic ecological and genetic processes**. [s.l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 2014.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.
- FONSECA, Rute R. da; JOHNSON, Wesley C.; JOHNSON, Warren E.; GILBERT, M. Thomas P.; O'BRIEN, Stephen J. The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. **BMC Genomics**, Londres, v. 9, n. 119, p. 1-22, mar. 2008.
- HEBERT, Paul D. N.; PENTON, Erin H.; BURNS, John M.; *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 41, p. 14812–14817, 2004.
- OLIVEIRA, Hiorama F. M.; VILELA, Filipe A. N.; DE-CARVALHO, Gisele L.; DE FREITAS, Thales R. O.; REDONDO, Rodrigo A. F.; O'DWYER, Ana C. C. Barcoding Brazilian mammals to monitor biological diversity and threats: Trends, perspectives, and knowledge gaps. **Environmental Research**, v. 258, p. 119374, 2024.
- PORTO, L.; RUI, A. M. Diet and habitat use by two sympatric canids in the Pampas of South America. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 11 abr. 2019a.
- VITORINO, Breno Dias; FROTA, Angélica Vilas Boas da; MARUYAMA, Pietro Kiyoshi; *et al.* Influence of sampling methods on the description of a Neotropical seed dispersal network. **Acta Oecologica**, v. 114, p. 103805, 2022.