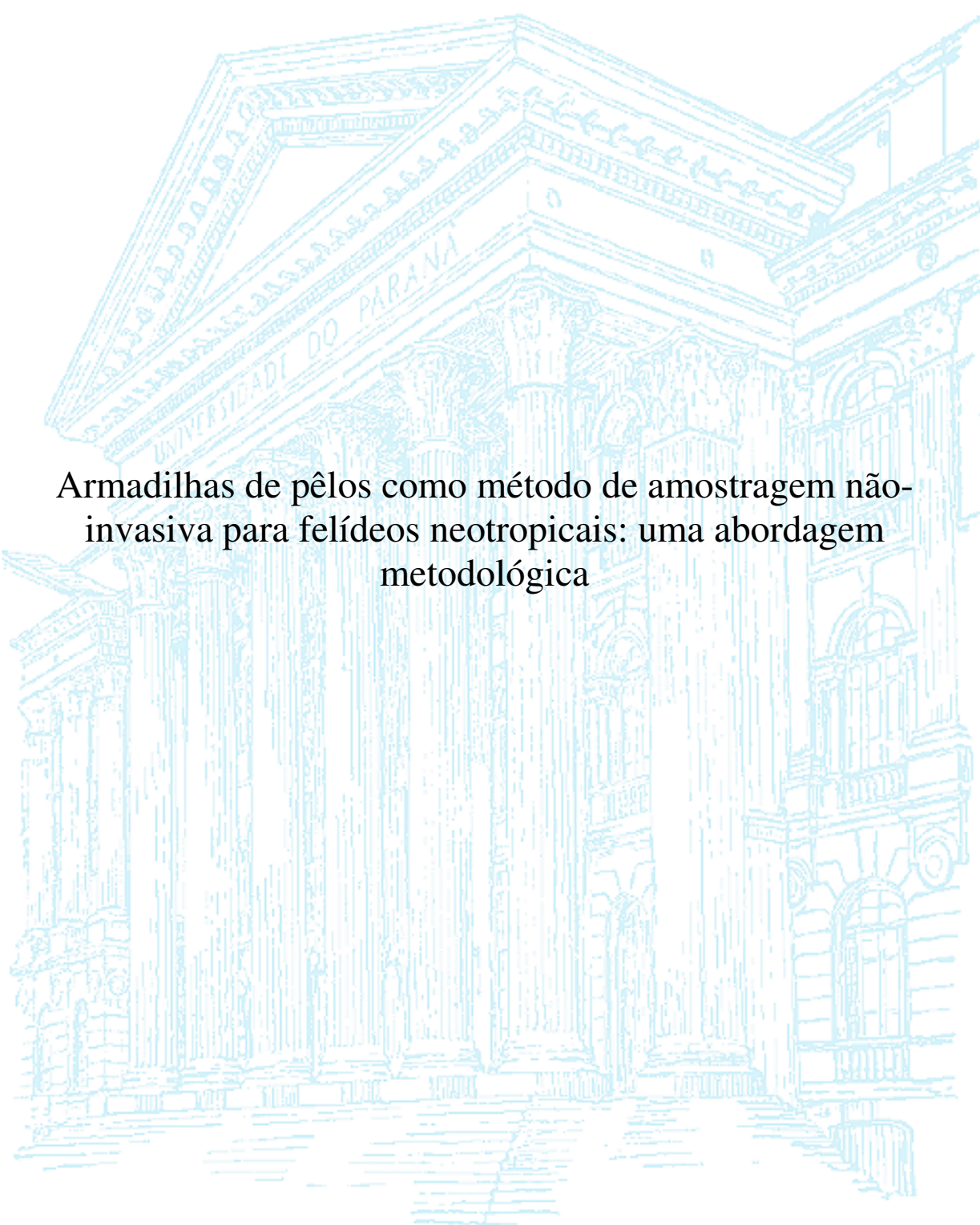


Universidade Federal do Paraná

Tatiana Pineda Portella



Armadilhas de pêlos como método de amostragem não-invasiva para felídeos neotropicais: uma abordagem metodológica

CURITIBA

2011

Tatiana Pineda Portella

Armadilhas de pêlos como método de amostragem não-
invasiva para felídeos neotropicais: uma abordagem
metodológica

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcio R. Pie

Curitiba
2011



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Tatiana Pineda Portella** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 15 de março de 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcio Roberto Pie
Orientador e Presidente

Prof.ª. Dra. Renata Alonso Miotto
Membro

Prof. Dr. Emygdio L. de A. Monteiro Filho
Membro

Visto:

Prof.ª. Dra. Lucélia Donatti
Coordenadora do PPG-ECO

Descobri que a leitura é uma forma servil de sonhar.
Se tenho de sonhar, porque não sonhar os meus próprios sonhos?

(Fernando Pessoa)

Dedico essa dissertação a minha Tia Isabel (*In memoriam*).
Minha maior conselheira e amiga.
Por toda admiração e amor que eu tenho por você.

Agradecimentos

Ao Prof. Marcio Pie pela oportunidade, orientação e por todo aprendizado que eu tive nesses dois anos. Muito obrigada por tudo.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao Prof. Fernando Passos pela grande ajuda e conselhos ao longo do projeto.

Ao Marcel Tschá pelo IMENSO apoio no laboratório de molecular. Por ficar até altas horas no laboratório (algumas vezes nos sábados e feriados) me ajudando a extrair o DNA dos pêlos, ou me esperando terminar só pra poder fechar o laboratório. Não sei o que seria desse experimento sem o seu apoio e paciência! Obrigada mesmo!

Ao Diego Bilski pela revisão do manuscrito, discussões metodológicas, confecção das armadilhas e ajuda nas observações em cativeiro. Muito obrigada!

Ao Zoológico de Curitiba, Criadouro Onça-Pintada e Associação Mata-Ciliar por permitirem que eu realizasse parte desse estudo com os seus animais. Em especial a Tereza Margarido, Paulo Mangini, Cristina Adania, Nancy Banevinicius, Henrique, Jairo Pereira e Tarzan. Obrigada por todo apoio!

Ao IAP, em especial ao Kiko e a Calina, por autorizarem minha pesquisa no Parque Estadual do Marumbi e ao tão importante apoio logístico!

Ao Carlinhos pelos valiosos conselhos, discussões e ajuda nos últimos meses de campo!

Ao Thiago Lecheta, Talita Batista, Patricia e Henrique por toda a ajuda no campo.

Ao Prof. Emygdio Leite de Araujo Monteiro Filho por me ajudar a identificar os pêlos coletados.

Ao José Pereira e a Renata Miotto pela revisão do manuscrito e valiosas sugestões.

Ao Kauê Cachuba por ter sido tão acessível e disposto a ajudar.

A Niara Martins por dividir sua experiência com as armadilhas de pêlos e pelo envio da sua monografia.

A Paula Borges por toda paciência e por permitir que eu ficasse com a chave do laboratório de imagem em alguns feriados e finais de semana.

Ao Marcelo Borges por revisar alguns dos meus textos e me socorrer em um dia que eu tanto precisei. Obrigada mesmo!

A Stela e a Dani por toda conversa jogada fora e boas risadas.

Ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Conservação por todo o apoio.

A todos os meus colegas do Pielab.

A todos também mestrandos e doutorados que dividiram a pensão da Dona Silvia comigo em 2009. Pelos almoços coletivos de domingo, filminhos, festinhas e amizade. Em especial a Juju, Marlene, Heve, Saimon e Ricardo.

Ao Mauricio Zenker, pelos conselhos, revisões de texto e o mais importante, por todo apoio, amor, carinho e paciência nesses dois importantes anos.

A minha família que sempre me apóia, em especial aos meus avós Catib e Gabriel que sempre torcem por mim. A minha avó Eunice (fofa de mais!) por todo apoio, amor, mimo, e conselhos preciosos de vida! E a minha mãe pelo suporte e por sempre me incentivar a ir atrás dos meus sonhos.

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução geral	9
Objetivos Gerais	14
Referências bibliográficas	15
Capítulo 1 - Avaliando a degradação do DNA de pêlos de felídeos neotropicais obtidos por armadilhas de pêlos	
Resumo	22
Introdução	24
Material e Métodos	25
Resultados.....	28
Discussão	30
Referências bibliográficas	32
Capítulo 2 - Testando diferentes estímulos olfativos para detectar felídeos neotropicais em armadilhas de pêlos	
Resumo	35
Introdução	36
Material e Métodos	37
Resultados	40
Discussão	42
Referências bibliográficas	44
Considerações Finais	49
Referências bibliográficas	51

Resumo

O uso das armadilhas de pêlos como método de amostragem não invasiva tem sido amplamente utilizado em estudos de ecologia molecular com mamíferos de vida livre. Porém, para o método ser eficaz é importante garantir um delineamento amostral que garanta tanto a captura dos pêlos da espécie desejada como a obtenção de um material genético de boa qualidade. Com a finalidade de delinear um estudo com felídeos neotropicais por meio de armadilhas de pêlos, o presente estudo teve os seguintes objetivos: (1) mensurar o tempo de degradação do DNA contido nos pêlos de felídeos quando expostos no ambiente (2) avaliar diferenças na quantidade de DNA extraído entre diferentes classes de pêlo de acordo com suas fases de crescimento; (3) testar a eficácia de três estímulos olfativos: Catnip, Canela (ambos já testados com sucesso em outros estudos) e baunilha em detectar seis espécies de felídeos nas armadilhas de pêlos : *Panthera onca*, *Leopardus pardalis*, *L.wiedii*, *L.tigrinus*, *Puma concolor* e *P.yagouaroundi*. . Para as análises de degradação de DNA realizamos um experimento utilizando-se pêlos de duas espécies de felídeos mantidos em cativeiro. A eficácia dos estímulos olfativos em detectar cada espécie de felídeo foi realizada por meio de testes comportamentais em cativeiro e nas detecções em campo. Não houve diferença na concentração de DNA em pêlos de diferentes classes. A degradação do DNA contido nos pêlos quando expostos no ambiente foi extremamente rápida, com a concentração de DNA caindo consideravelmente no segundo dia de exposição ambiental. Dos estímulos testados, a baunilha e a canela foram as que respectivamente geraram maior resposta em todas as espécies analisadas em cativeiro. No campo foram encontrados cinco diferentes táxons, porém nenhuma amostra de felino. A extrema rapidez na degradação do DNA associado ao insucesso de captura nos levou a concluir que programas de amostragem não-invasiva de felinos por armadilhas de pêlos em regiões subtropicais apresentam dificuldades consideravelmente maiores do que estudos semelhantes em ambientes temperados.

Palavras-chave: degradação de DNA, isca olfativa, taxa de detecção, região subtropical.

Abstract

The use of hair snares as a method of noninvasive sampling has been widely used in studies on the molecular ecology of wild mammals. However, in order for this method to be efficient, it is crucial to delineate an experimental design that ensures both the capture of hairs of the focus species and genetic material of good quality. With the goal of designing a study on neotropical felids using hair snares, the present study has the following objectives: (1) to measure the time for degradation of DNA of felid hairs exposed to environmental conditions; (2) to assess differences in DNA quantities extracted from hairs of different growth classes; (3) to test the efficiency of three olfactory stimuli: catnip, cinnamon (both already tested in previous studies) and vanilla to obtain hairs of six felid species using hair snares: *Panthera onca*, *Leopardus pardalis*, *L. wiedii*, *L. tigrinus*, *Puma concolor* and *P. yagouaroundi*. The assessment of DNA degradation was carried out using hairs of two captive felid species. The efficiency of olfactory stimuli in detecting each felid species was carried out using behavioral tests in captivity and by using hair snares in the field. There were no differences in DNA concentration of hairs of distinct classes. In addition, the degradation of DNA in hairs exposed to environmental conditions was very fast, with the concentration of DNA decreasing considerably starting on the second day. Of the tested stimuli, cinnamon and vanilla elicited the strongest responses from the species in captivity. Field collections obtained samples from five different taxa, none of which were felines. The high velocity of DNA degradation, in combination with the lack of success in field samplings, led us to conclude that feline noninvasive sampling programs in subtropical regions provide considerably more difficulties than similar studies in temperate environments.

Key-words: DNA degradation, scent lure, detection rate, subtropical region.

INTRODUÇÃO GERAL

A Região Neotropical abriga 10 das 37 espécies existentes de felídeos, as quais são divididas em três clados distintos: a linhagem das jaguatiricas [*Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758)] que compreende todas as nove espécies do gênero *Leopardus*; a linhagem dos pumas [*Puma concolor* (Linnaeus, 1771)] que compreende a duas espécies do gênero *Puma* e a linhagem *Panthera* que é representada no Neotrópico apenas pela onça-pintada [*Panthera onca* (Linnaeus, 1758)] (Johnson *et al.*, 2006). Dessas espécies, oito são encontradas no Brasil: jaguatirica, gato maracajá (*Leopardus wiedii*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), gato palheiro (*Leopardus colocolo*), gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*), onça-parda (*Puma concolor*) e onça-pintada (*Panthera onca*); e todas estão ameaçadas em algum nível, seja em listas locais (Marques *et al.*, 2002; Bressan, *et al.*, 2009; Braga & Vidolin, 2010), nacional (Machado *et al.*, 2008) e/ou internacional (IUCN, 2010).

Das espécies de carnívoros neotropicais, os felídeos são os que têm despertado maior interesse de estudo pelos pesquisadores, e mesmo assim, dados da biologia dessas espécies ainda são pouco conhecidos (Oliveira, 2006). A maioria dos estudos realizados com esses animais são voltados para a dieta e área de vida, porém, grande parte dão enfoque apenas a algumas espécies como onça-pintada, onça-parda e jaguatirica. Ainda existem muitas lacunas no nosso conhecimento como distribuição, tamanho populacional e comportamento desses animais (Oliveira, 2006). A ausência desse tipo de informação é um empecilho grande para ações conservacionistas que precisam de dados da biologia e comportamento da espécie para tomar atitudes voltadas para a preservação (Knight, 2001).

As principais dificuldades em estudar esses animais se devem aos seus próprios hábitos de vida e local onde vivem. Por se tratarem de animais de hábitos solitários e que são, quase em totalidade, predominantemente noturnos, observações em campo são escassas o que torna custoso os estudos comportamentais (Oliveira & Cassaro, 2005; Aguiar & Moro-Rios, 2010). Além disso, eles são animais que ocorrem em baixa densidade, e a captura de alguma dessas espécies pode ser bastante dificultosa e cara (Tomas *et al.*, 2006).

Uma técnica, entretanto, que tem sido promissora com mamíferos que até então eram difíceis de serem estudados são as técnicas de amostragem não-invasiva aplicadas em estudos de ecologia molecular (Piggot & Taylor, 2003; Schwartz, *et al.*, 2007; Schwartz & Monfort, 2008; Beja-Pereira *et al.*, 2009). Mesmo de difícil observação, a maioria dos felídeos costumam andar em trilhas (o que facilita a captura de presas e o patrulhamento do território) e assim, costumam deixar marcas e rastros por onde passam (Crawshaw, 1997). Indícios como pêlos, fezes e urina que são deixados no ambiente contém material genético desses animais. Com esse material e por meio de diferentes marcadores moleculares é possível saber o sexo (Pilgrin, *et al.*, 2005), o indivíduo (Reed *et al.*, 1997; Ernest *et al.*, 2000; Miotto *et al.*, 2007), relações de parentesco (Schenk & Kovacs, 1995; Soares *et al.*, 2006) e novas técnicas ainda pouco desenvolvidas prometem até mesmo no futuro estimar a idade dos animais (Nakagawa *et al.*, 2004). Com essas ferramentas é possível fazer estudos de marcação-recaptura (Boulanger *et al.*, 2008), comportamento reprodutivo (Schenk & Kovacs, 1995; Wagner *et al.*, 2007), dispersão e deslocamento (Gooper, *et al.*, 2002; Costello *et al.*, 2008), testes de paternidade (Soares *et al.*, 2006) e dieta (Farrel *et al.*, 2000; Pilgrin, *et al.*, 2005). Essas técnicas são bastante utilizadas em países Europeus e da América do Norte e com a acessibilidade e barateamento dos métodos, pesquisadores da Região Neotropical

estão cada vez mais recorrendo a esses meios para entender melhor a biologia dessas espécies (Soares *et al.*, 2006; Miotto *et al.*, 2007; Trigo *et al.*, 2008).

Armadilhas de pêlos

Para estudar carnívoros um dos materiais genéticos mais utilizados são os pêlos (Kendall & McKelvey, 2008, Beja-Pereira *et al.* 2009). Eles podem ser encontrados em tocas e trilhas (McKelvey *et al.* 2006), mas o mais comum é utilizar armadilhas não invasivas para obter esse material. Existem diversos modelos de armadilhas e geralmente eles são espécie específico. Em estudos com ursos, por exemplo, um método bastante utilizado são arames dispostos entre árvores delimitando certa área. Ao entrar nesse espaço o animal precisa passar por cima ou por baixo dessa estrutura e acaba tendo seus pêlos presos e arrancados nas farpas do arame (Kendall & McKelvey, 2008). Para espécies que costumam subir em árvores, é comum utilizar estacas de madeira revestida de arame ou fita adesiva com um pedaço de comida no topo (Kendall & McKelvey, 2008). No caso dos felídeos as armadilhas mais comumente utilizadas são as chamadas *rub pads* ou *hair snares* que consistem de uma base vertical, revestida de carpete ou velcro com pregos ou farpas de arame acopladas em sua estrutura. Elas servem de substrato para o comportamento de marcação de cabeça dos felinos que ao realizarem deixam seus pêlos presos nessa estrutura (McDaniel *et al.*, 2000; Weaver *et al.*, 2005; Kendall & McKelvey, 2008).

Para que as armadilhas com felídeos funcionem, é bastante importante utilizar um estímulo olfativo que seja eficaz em atrair e estimular o comportamento de marcação dos animais. Contudo, sabe-se que diferentes espécies podem responder de forma desigual a um determinado tipo de estímulo (Mellen, 1993). Em função disso, existem muitos estudos que testam diferentes tipos de odores a fim de avaliar qual é

mais eficaz em instigar esse comportamento na espécie de interesse (Harrison, 1997; McDaniel *et al.* 2000; Thomas *et al.*, 2005; Castro-Arelano, *et al.*2008).

A maioria dos estímulos utilizados são sintéticos e imitam secreções e hormônios das espécies estudadas (Schlexer, 2008). Porém, esses atrativos são comercializados apenas em países da América do Norte e são de difícil acesso aos pesquisadores de outras regiões. Um atrativo, porém que é de boa acessibilidade e tem sido utilizado em diversos estudos é o extrato de *catnip* (Harrison, 1997; Mc Daniel, *et al.*, 2000; Castro-Arelano, *et al.*, 2008; Schlexer, 2008). Existem também alguns trabalhos que utilizam perfumes, como Castro-Arelano *et al.* (2008) que usaram o perfume da Calvin Klein - Obsession for Men para atrair carnívoros em *hair snares* no México. Outro atrativo que se mostrou eficaz em detectar onças-pardas, e que além de fácil acesso é barato, foi a canela, utilizada por Martins (2009) na Estação Ecológica do Jataí, SP, Brasil.

Embora sejam muitos os trabalhos que utilizam armadilhas de pêlos e/ou testam a eficácia dos estímulos olfativos, a maioria deles são concentrado na Região Neártica (Weaver *et al.*, 2005; Bertrand *et al.* , 2006; McKelvey *et al.*, 2006; Long, *et al.*, 2007; Ruell & Crooks, 2007; Thompson, 2010) e os trabalhos com felídeos neotropicais apenas concentrados na América Central (Harrison, 1997; Downey *et al.*, 2007; Castro-Arelano, *et al.*, 2008). Atualmente existe apenas um trabalho nesse âmbito na América latina realizado por Martins (2009). Desta forma, pouco se sabe sobre a eficácia das armadilhas de pêlo e de diferentes estímulos olfativos na detecção dos animais da região.

Degradação do DNA em amostras não invasivas

Mesmo com diversas vantagens, o uso de amostras de origem não invasiva requer muita cautela. Materiais como fezes e pêlos muitas vezes contém pouca quantidade de DNA além de estarem sujeitos a fatores que degradam e/ou contaminam a amostra (Taberlet *et al.* 1996; Piggott & Taylor, 2003; Gilbert *et al.*, 2006). Extratos de baixa qualidade ou concentração de DNA geram falhas na amplificação e erros genotípicos que podem acarretar falsas inferências em estudos populacionais (Taberlet *et al.* 1996, Broquet *et al.*, 2007)

De acordo com Morin *et al.* (2001) e Beja-Pereira *et al.* (2009) uma maneira de evitar esses tipos de erros é selecionar previamente as amostras que são potencialmente boas, ou seja, que possuem DNA em quantidade e qualidade adequadas. É recomendado, por exemplo, que estudos que utilizam fezes colem amostras aparentemente frescas e de preferência na estação seca. Isso porque estudos prévios mostram que amostras que estão expostas há muito tempo no ambiente, principalmente em locais úmidos, tem seu sucesso de amplificação reduzido além de aumentar significativamente o aparecimento de erros genotípicos (Farrel *et al.*, 2000; Murphy *et al.* 2007; Brikman, *et al.*, 2010).

Embora exista bastante esclarecimento em relação a degradação do DNA contido nas fezes, são poucos os trabalhos que investigam os fatores que podem degradar o material genético dos pêlos. A maioria dos estudos nesse âmbito são voltados para material humano. Como cabelos e pêlos são uma das principais evidências da cena de um crime são muitos os estudos que investigam a influência da cor, tinturas de cabelo, comprimento, grossura, fase de crescimento dos pêlos e até mesmo pêlos de diversas regiões do corpo no sucesso de amplificação do DNA (Linch, *et al.*, 1998;

Pfeiffer *et al.*, 1999 Roberts *et al.*, 2007, Roberts & Calloway, 2007). O único estudo que temos conhecimento que avaliou a influência de alguns fatores, inclusive exposição ambiental, na degradação do DNA de pêlos de animais silvestres, foi realizado por Jeffery *et al.* (2007) com pêlos de gorilas (*Gorilla gorilla gorilla*) na África Central.

Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi contribuir com informações ainda escassas, e que podem ajudar pesquisadores da Região Neotropical a delinear uma boa amostragem de campo com armadilhas de pêlos. Nosso principal foco de estudo foram os felídeos neotropicais, mas alguns dos resultados obtidos também poderão ser estendidos a outras espécies de carnívoros.

Para isso avaliamos:

- 1- O tempo de degradação do DNA contido nos pêlos quando expostos no ambiente. Assim será possível inferir sobre um intervalo ideal de amostragem das armadilhas de pêlos.
- 2- Classificar tipos de pêlos de acordo com sua fase de crescimento e avaliar se existem diferenças na concentração de DNA entre eles. Se constatada, essa classificação pode auxiliar os pesquisadores a selecionarem os tipos de pêlos com maior concentração de DNA antes das análises.
- 3- A eficácia de três atrativos (dois deles já utilizados em outros estudos) no sucesso de detecção dos felídeos neotropicais em campo.

Os resultados desse trabalho estão apresentados em dois capítulos, sendo que um deles já está em formato de artigo para publicação.

Referências Bibliográficas

- Aguiar, L.M. & Moro-Rios, R.F. (2009) The direct observational method and possibilities for Neotropical Carnivores: an invitation for the rescue of a classical method spread over the Primatology. *Zoologia* **26** (4), 587–593.
- Beja-Pereira, A., Oliveira, R., Alves, P. C., Schwartz, M. K. & Luikart, G. (2009) Advancing ecological understandings through technological transformation in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1279-1301.
- Bertrand, A.-S.; Kenn S., Gallant D., Tremblay E., Vasseur L. & Wissink R. (2006). MtDNA analyses on hair samples confirm cougar, *Puma concolor*, presence in southern New Brunswick, Eastern Canada. *Canadian Field-Naturalist* **120** (4), 438–442.
- Boulangier, J., Kendall, K.C., Stetz, J.B., Roon, D.A., Waits, L.P. & Paetkau, D. (2008) Multiple data sources improve DNA-based mark-recapture population estimates of grizzly bears. *Ecological Applications*. **18** (3), 577-589.
- Braga, F.G., Vidolin, G.P. (Org.). (2010) *Mamíferos Ameaçados no Paraná*. Curitiba: IAP.
- Bressan, M., Kierulff, M.C.M.K., Sugieda, A.M. (2009). *Fauna Ameaçada de Extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados*. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente.
- Brinkman T.J., Schwartz M.K., Person D.K., Pilgrim K.L., Hundertmark K.J. (2010) Effects of time and rainfall on PCR success using DNA extracted from deer fecal pellets. *Conservation Genetics* **11**, 1547–1552.

- 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.
- Castro-Arelano, I., Madrid-Luna, C., Lacher, T. E., León-Paniagua, L. (2008). Hair-Trap efficacy for detecting mammalian carnivores in the tropics. *The Journal of Wildlife Management* **72**, 1405-1412.
- Costello, C.M., Creel, S.R., Kalinowski, S.T., Vu, N.V., Quigley, H.B. (2008). Sex-biased natal dispersal and inbreeding avoidance in American black bears as revealed by spatial genetic analyses. *Molecular Ecology*. **17**, 4713–4723
- Crawshaw J.R., (1997) Recomendações para um modelo de pesquisa sobre felídeos neotropicais. In: Vallares-Pádua, C. & Bodner, R.E. (Eds). *Manejo e conservação de vida silvestre no Brasil*. 70-94 Belém, MCT, CNPq, Sociedade Civil Mamirauá.
- Downey P. J., Hellgren, E.C., Caso, A., Carvajal S., Frangioso, K. (2007). Hair Snares for Noninvasive Sampling of Felids in North America: Do Gray Foxes Affect Success? *Journal of Wildlife Management* **71** (6), 2090-2094.
- Ernest H, Penedo M, May B, Syvanen M, Boyce W (2000) Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology*, **9**, 433–442.
- Farrell L.E., Roman J., Sunquist M.E. (2000) Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* **9**, 1583–1590.
- Gilbert, M.T., Bandelt, H-J, Hofreiter, M., Barnes, I. (2005) Assessing ancient DNA studies. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 541– 544.

- Gompper, M.E., Gittleman, J.L., Wayne, R.K. (1998) Dispersal, philopatry, and genetic relatedness in a social carnivore: comparing males and females. *Molecular Ecology*. **7** (2), 157–163.
- Harrison, R. L. (1997). Chemical attractants for Central American felids. *Wildlife Society Bulletin* **25**, 93–97
- IUCN- *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*. (2010). Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 12 novembro 2010
- Johnson, W. E., Eizirik, E., Pecon-Slattery, J., Murphy W. J., Antunes, A., Teeling, E., O'Brien. S. J. (2006). The Late Miocene Radiation of Modern Felidae: A Genetic Assessment. *Science* **311**, 73-77.
- Jeffery KJ, Abernethy KA, Tutin CEG, Bruford MW (2007) Biological and environmental degradation of gorilla hair and microsatellite amplification success. *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**, 281–294.
- Kendall, K. C. & Mckelvey, K. S. (2008). Hair collection. In: Long, R. A.; Mackay, P. Zielinski, W. J.; Ray, J. C. *Noninvasive survey methods for carnivores*. 135-176. Washington, D.C., USA :Island Press.
- Knight. J.(2001). If they could talk to the animals...*Nature* **414**, 246-247.
- Linch C.A., Smith S.L., Prahlow J.A. (1998).Evaluation of the human hair root for DNA typing subsequent to microscopic comparison. *Journal of Forensic Sciences* **43**, 305–314.
- Machado, A.B.M., Drummond, G.M., Paglia, A.P. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. (Ed.) (2008). Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas.

- Marques, A.A.B., Fontana, C.S., Vélez, E., Bencke, G.A., Schneider, M., Reis, R. E . (2002). *Lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: FZB/MCTU-PURS/PANGEA.
- Martins, N. (2009) Padronização de um protocolo para a extração de DNA a partir de pêlos e individualização de amostras de pêlos de onça-parda (*Puma concolor*) obtidos por meio de armadilhas não invasivas. Monografia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.
- McDaniel, G. W., McKelvey, K. S., Squires, J. R., Ruggiero, L. F. (2000) Efficacy of lures and hair snares to detect lynx. *Wildlife Society Bulletin* **28** (1), 119-123.
- Mellen, J. D. (1993). A Comparative Analysis of Scent-Marking, Social and Reproductive Behavior in 20 Species of Small Cats (*Felis*). *Integrative and comparative biology* **3** (2), 1551-166
- Miotto, R. A., Rodrigues F.P., Ciocheti G., Galetti Junior, P.M. (2007) Determination of the minimum population size of pumas (*Puma concolor*) through fecal DNA analysis in two protected Cerrado areas in the Brazilian Southeast. *Biotropica*. **39**, 647-654.
- Morin P.A, Chambers K.E., Boesch C., Vigilant L. (2001). Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* **10**, 1835–1844.
- Murphy M.A., Kendall K.C., Robinson A., Waits L.P. (2007) The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification. *Conservation Genetics* **8**, 1219–1224.
- Oliveira, T.G. (2006) Research in terrestrial Carnivora from Brazil: current knowledge and priorities for the new Millennium. In: Morato, R.G.; Rodrigues, F.H.G.; Eizirik,

- E.; Mangini, E. Manejo e Conservação de Carnívoros Neotropicais. São Paulo: Ibama. Cap. 2, p. 39-45.
- Oliveira, T.G. & Cassaro, K. (2005) *Guia de campo dos felinos do Brasil*. São Paulo: Instituto pró - carnívoros, Fundação parque zoológico de São Paulo, Sociedade de zoológicos do Brasil, Pró vida Brasil.
- Pfeiffer H., Hühne J., Ortmann C., Waterkamp K., Brinkmann B. (1999). Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts – success rates and sequence comparisons. *International Journal of Legal Medicine* **112**, 287–290.
- Piggott, M. P. & A. C. Taylor. (2003). Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. *Wildlife Research* **30**, 1-13.
- Pilgrim, K.L., McKelvey, K.S., Riddle, A.E., Schwartz, M.K. (2005) Felid sex identification based on noninvasive genetic samples *Molecular Ecology Notes*. **5**, 60-61
- Reed, J.Z., Tollit, D.J., Thompson, P.M. & Amos, W. (1997) Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to Seal faeces. *Molecular Ecology*. **6**, 225-234
- Roberts, K. A. & Calloway, C. (2007). Mitochondrial DNA amplification success rate as a function of hair morphology. *Journal of Forensic Sciences* **56**, 46-60.
- Schenk, A & Kovacs, K.M. (1995) Multiple mating between black bears revealed by DNA fingerprinting. *Animal Behaviour*. **50** (6), 1483-1490.
- Schlexer, F. V. (2008) Attracting Animals to Detection Devices. In: Long, R. A.; Mackay, P. Zielinski, W. J.; Ray, J. C. *Noninvasive survey methods for carnivores*. 263-292. Washington, D.C., USA: Island Press.

- Schwartz MK, Luikart G, and Waples RS. (2007). Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 25-33.
- Schwartz M. K. and Monfort S. L. (2008). Genetic and Endocrine Tools for Carnivore Surveys. In: Long RA, MacKay P, Ray JC, Zielinski WJ (eds) *Noninvasive survey methods for North American carnivores*. 238-262 Washington D.C.: Island Press.
- Soares, T.N., Telles, M.P.C., Resende, L.V., Silveira, L. Jácomo, A.T., Morato, R.G., Diniz-Filho, J.A.F., Eizirik, E., Brondani, R.P.V., Brondani, C. (2006) Paternity testing and behavioral ecology: A case study of jaguars (*Panthera onca*) in Emas National Park, Central Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **29** (4) 735-740.
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questlau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P., Bouvet J. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* **24**, 3189–3194.
- Thomas, P. Balme, G. Hunter, L. McCabe-Parodi, J. (2005) Using scent attractants to non-invasively collect hair samples from cheetahs, leopards and lions. *Animal Keeper's Forum* **7** (8), 342-384.
- Thompson, D. M. (2010) Noninvasive approaches to reduce human-cougar conflict in protected areas on the west coast of Vancouver island. Master thesis. University of Victoria.
- Tomas, W.M., Rodrigues, F.H.G., Fusco-Costa, R. (2006). Levantamento e monitoramento de populações de carnívoros. In: Morato, R.G., Rodrigues, F.H.G., Eizirik, E., Mangini, P.R., Azevedo, F.C.C., Marinho-Filho, J. (Org.). *Manejo e Conservação de Carnívoros Neotropicais*. 145-167. Brasília: IBAMA.
- Trigo, T.C., Freitas, T.R.O., Kunzler, G., Cardoso, L., Silva, J.C.R., Johnson, W.E., O'Brien, S.J., Bonatto, S.L., Eizirik, E. (2008). Inter-species hybridization among

Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Molecular Ecology* **17** (19), 4317–4333.

Wagner, A.P., Creel S., Frank, L.G., Kalinowski, S.T. (2007) Patterns of relatedness and parentage in an asocial, polyandrous striped hyena population. *Molecular Ecology*. **16**, 4356-4369.

Capítulo 1

Avaliando a degradação do DNA de pêlos de felídeos neotropicais obtidos por armadilhas de pêlos

Tatiana P. Portella, Marcel K. Tschá, Marcio R. Pie

Laboratório de Dinâmica Evolutiva e Sistemas Complexos

Departamento de Zoologia

Universidade Federal do Paraná

C.P. 19020

81531-990 Curitiba, PR

Brazil

Phone: +55(41)3361-1558

*e-mail: pie@ufpr.br

Sumário

- 1- O uso das armadilhas de pêlos como método de amostragem não-invasiva tem se tornado uma ferramenta importante nos estudos com genética molecular de mamíferos selvagens. Porém, qualquer tipo de material de origem não-invasiva pode conter pouquíssima quantidade de DNA, o que pode prejudicar as análises moleculares. Existem alguns fatores capazes de influenciar na quantidade e qualidade do material genético contido nos pêlos como fatores ambientais e a fase de crescimento em que o pêlo se encontra. Mesmo assim, são poucos os estudos que avaliam a consequência dessas variáveis no DNA de pêlos de

mamíferos carnívoros, que são um dos principais alvos dos estudos genéticos não-invasivos.

- 2- Nesse estudo nós capturamos pêlos de duas espécies de felídeos mantidos em cativeiro através de uma armadilha do tipo rub-pad. Em seguida, realizamos um experimento onde avaliamos o tempo de degradação do DNA das amostras quando expostas no ambiente. Através de uma análise microscópica de cada material, verificamos também a proporção de pêlos obtidos em cada fase de crescimento (anágeno/catágeno, telógeno com tecido associado e telógeno sem tecido associado) e conferimos se existe diferença na concentração de DNA em cada uma das fases.
- 3- A fase telógeno sem tecido associado foi a classe mais encontrada nas armadilhas de pêlos em ambas as espécies, seguida da telógeno com tecido associado e anágeno/catágeno. Não houve diferença na concentração de DNA entre as fases encontradas.
- 4- Os pêlos capturados e expostos ao longo da estação úmida tiveram significativamente maior concentração de DNA do que os da estação seca. Além disso, houve uma considerável queda na concentração de DNA em apenas dois dias de exposição ambiental. Desta forma, estudos moleculares que utilizam armadilhas de pêlos em condições de clima tropical e sub-tropical devem monitorar suas armadilhas com frequência para evitar a degradação excessiva do material genético.

Palavras-chaves: Concentração de DNA, efeitos da exposição ambiental, ciclo de crescimento do pêlo

Introdução

O uso das armadilhas de pêlo como técnica de amostragem não-invasiva tem se tornado uma ferramenta importante nos estudos de ecologia molecular com mamíferos de vida livre (Morin & Woodruff 1996; Taberlet *et al.* 1997). Os benefícios da técnica são diversos, entre eles estão a facilidade em transportar as armadilhas para áreas remotas, seu baixo custo, e a não necessidade de capturar ou perturbar os animais em campo (Castro-Arelano *et al.*, 2008). Por outro lado, estudos moleculares que utilizam pêlos, ou qualquer outro tipo de material não invasivo, a quantidade de DNA disponível para a tipagem genética pode ser muito baixa, sendo muitas vezes na faixa de picogramas, o que leva a uma maior frequência de erros genotípicos (Taberlet *et al.* 1996).

A literatura já descreve alguns fatores que podem influenciar na quantidade e qualidade do material genético presente nos pêlos. Pêlos obtidos por arrancamento, por exemplo, contém quantidades maiores de DNA do que pêlos caídos naturalmente (Morin, *et al.*, 2001). Isso se deve ao seu ciclo de crescimento e degeneração. Pêlos no início da sua fase de crescimento denominada anágeno, contém grandes quantidades de células em estado mitótico na região do bulbo, e por isso, contém grande quantidade de DNA. A medida que o pêlo cresce, o bulbo vai entrando na fase catágeno, caracterizado pelo início do processo de degradação e morte celular. Em seguida, o bulbo fica queratinizado e entra em estado de latência caracterizado pela fase telógeno, até ser forçado para fora do folículo por um pêlo em crescimento (Kligman 1959). A maioria dos pêlos que caem naturalmente são oriundos da fase telógeno, e alguns trabalhos com primaras mostram que eles possuem pouco (Jeffery, *et al.*, 2007) ou nenhum sucesso de amplificação (Linch, *et al.*, 1998).

Outro fator que interfere na quantidade e qualidade do DNA é a exposição ambiental do pêlo, o qual fica sujeito aos efeitos degradantes da umidade, temperatura e ação microbiana (Jeffery, *et al.*, 2007). Contudo, são poucos os trabalhos que fornecem dados sobre os efeitos da exposição ambiental na concentração e sucesso de amplificação de DNA, exceto Jeffery *et al.* (2007) que avaliou um desses fatores em pêlos caídos de gorilas (*Gorilla gorilla gorilla*) em uma região de clima tropical.

De acordo com Beja-Pereira *et al.* (2009) avaliar e assegurar a integridade do material genético é um dos primeiros passos para evitar artefatos e viabilizar estudos com amostras não-invasivas. Estudos que investigam os fatores que degradam o DNA contido nos pêlos ainda são escassos na literatura, principalmente com animais da ordem carnívora que são os principais alvos dos estudos não-invasivos (Kendall & McKelvey, 2008). Desta forma esse trabalho tem o objetivo de avaliar (1) o tempo de degradação dos pêlos de duas espécies de felídeos obtidos através de armadilhas de pêlos quando expostos no ambiente; (2) a proporção de pêlos em cada fase de crescimento encontradas nas armadilhas e (3) se existe uma relação entre fase de crescimento do pêlo e a concentração de DNA presente em seu extrato. Com os resultados dessa pesquisa faremos recomendações para os estudos de campo com armadilhas de pêlos que envolvam não só felinos, mas também outras espécies de carnívoros.

Material e métodos

Área de estudo

O estudo foi conduzido na cidade de Curitiba, localizada no Estado do Paraná, sul do Brasil. A região possui altitude média de 934,6m e um clima subtropical úmido

mesotérmico (IAPAR, 2007). Quanto à vegetação, Curitiba situa-se na região de ocorrência da floresta ombrófila mista e da estepe gramíneo-lenhosa (Veloso-Filho *et al.*, 1991). O experimento foi realizado de Junho a Agosto de 2009 (estação seca) e de Janeiro a Março de 2010 (estação úmida) A temperatura média e a chuva acumulada registradas nesse período foram de 13,6 °C e 121,1 mm, e 21,4 °C e 214 mm para as respectivas estações (SIMEPAR - <http://www.simepar.br/>).

Para o experimento foram utilizados pêlos de dois exemplares de fêmeas adultas de *Leopardus pardalis* e três de *Leopardus tigrinus* mantidos no Zoológico de Curitiba, PR, Brasil. Para a coleta do material utilizamos armadilhas do tipo “ rub pads” (Figura 1) as quais foram instaladas no período da manhã e retiradas após uma hora de exposição (período de tempo suficiente para obter um grande numero de pêlos). Em seguida, as armadilhas foram etiquetadas e levadas imediatamente ao laboratório.

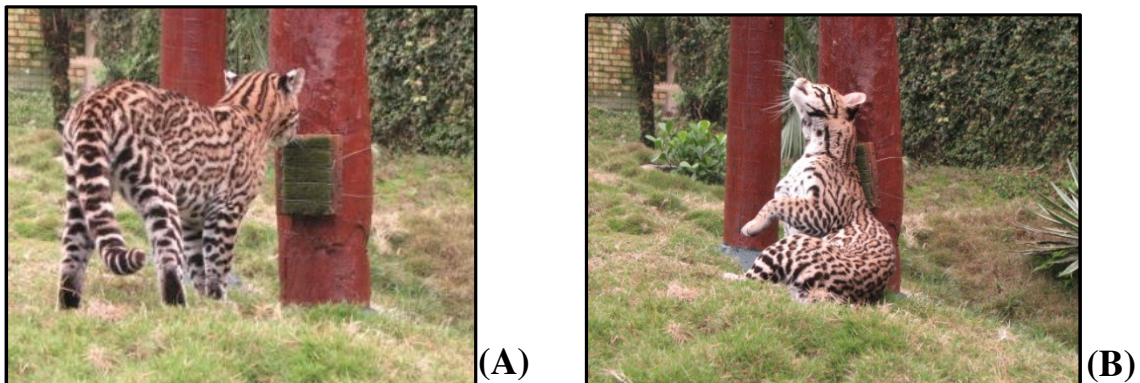


Figura 1: *L. pardalis* se aproximando da armadilha de pêlo do tipo *rub pad* (A) e se esfregando na armadilha (B).

Identificação da fase de crescimento do bulbo

Para a identificação das fases de crescimento dos bulbos foram selecionados ao acaso em média de 10 a 20 pêlos por espécie. Em seguida, foram montadas lâminas individuais com água esterilizada de acordo com a metodologia de Jeffery *et al.* (2007),

e analisadas através de um microscópio de luz. A análise microscópica foi realizada rapidamente para que a luz e a água alterassem o mínimo possível o DNA contido no pêlo. Os pêlos foram separados em três fases de crescimento conforme a morfologia do bulbo de acordo com Linch *et al.*, (1998) e Jeffery *et al.* (2007) com algumas modificações. As fases classificadas foram: telógeno sem tecido associado, telógeno com tecido associado e anágeno/catágeno.

Experimento da degradação do DNA

Terminado as análises morfológicas, cada amostra foi armazenada individualmente em um tubo de polipropileno e encaminhada para o laboratório de ecologia molecular. A extração do DNA contido em cada pêlo foi realizada pelo kit EZ-DNA (Biosystems) e a concentração do material genético contido no extrato foi medida através do espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000. Após a conclusão dessas etapas, as armadilhas que ainda continham dezenas de pêlos foram encaminhadas para um fragmento de floresta secundária localizado próximo ao laboratório para avaliar a degradação do DNA sob condições ambientais. As armadilhas foram instaladas dentro de gaiolas de grade de aço para evitar que outros animais se esfregassem e misturassem seus pêlos com os das armadilhas. Para avaliar o tempo de degradação, as análises morfológicas e de concentração de DNA foram repetidas durante o 1º, 2º, 4º, 8º e 16º dia de exposição. Foram realizadas três réplicas do experimento em cada estação do ano avaliando-se um total de 1062 pêlos. Os dados obtidos foram convertidos para logaritmo neperiano (ln) para se ajustar a normalidade e analisados através de um modelo linear generalizado, tendo como variável resposta a concentração de DNA e as demais variáveis como independentes.

Resultados

As fases de crescimento identificadas estão representadas na Figura 2. Foi constatada uma predominância dos pêlos da fase telógeno sem tecido associado com 86.8% e 74.8 % nas armadilhas da jaguatirica e do gato-do-mato-pequeno. A segunda classe mais encontrada foi a telógeno com tecido associado com 12.4% e 23.5% seguida da classe anágeno/catágeno com 0.8% e 1.7 % respectivamente (Figura 3). Não houve diferença significativa na concentração de DNA entre os tipos morfológicos dos bulbos encontrados ($p= 0,498$, Tabela 1).

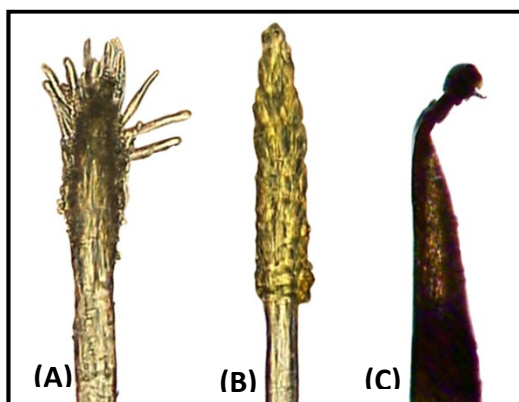


Figura 2: Microscopia de luz dos tipos morfológicos de bulbo. Fase Telógeno sem tecido associado (A), Telógeno com tecido associado (B) e Anágeno/Catágeno (C). Aumento de 200 x (A e B) e 100 x (C).

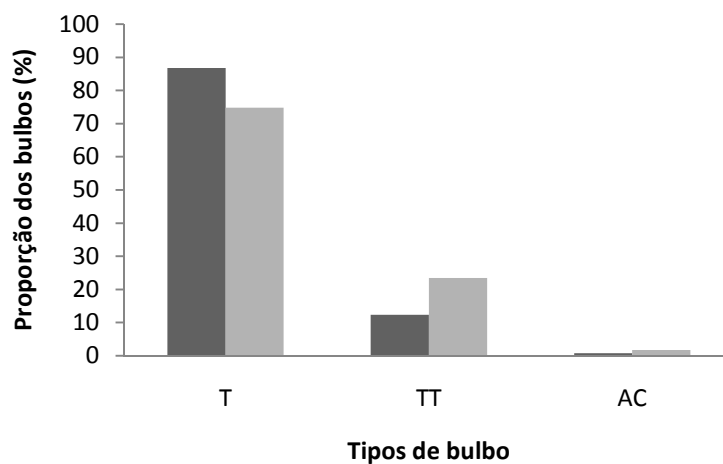


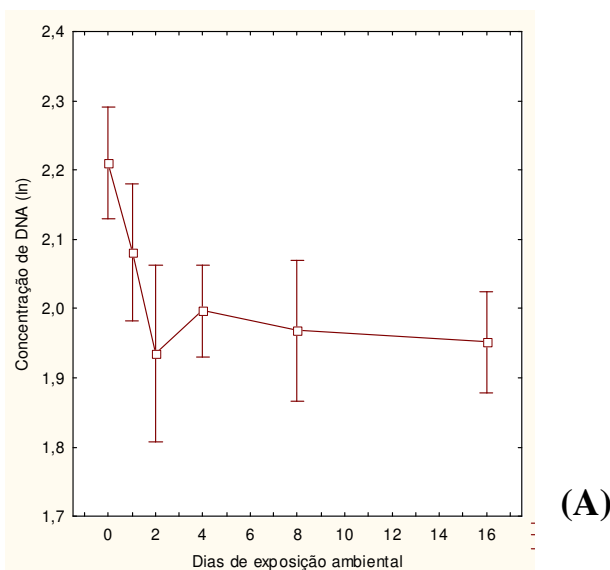
Figura 3: Proporção das classes de bulbo encontradas nas armadilhas de pêlos em *L. pardalis* (Barra escura) e *L. tigrinus* (barra clara). (T, telógeno sem tecido germinativo; TT, telógeno com tecido germinativo; AC,anágeno/catágeno)

Houve uma diferença significativa na concentração de DNA ao longo do tempo ($p = 0,032$, Tabela 1), e a concentração obtida na estação quente foi maior que a estação fria ($p < 0,01$) (Tabela 1).

Quando os dados de ambas as estações foram analisados juntos, foi constatada uma queda marcante na concentração do DNA até o segundo dia de exposição ambiental (Figura 4a). Contudo, os dados das diferentes estações foram analisados separadamente, os resultados variaram substancialmente. Na estação seca, a concentração de DNA caiu no segundo dia e aumentou depois do quarto dia (Figura 4 b). Na estação úmida a concentração de DNA variou consideravelmente ao longo do tempo, sem mostrar um padrão definido (Figura 4c)

Tabela 1: Resultado do Modelo Linear Generalizado.

Tratamento	SS	DL	MS	F	p
Dias de Exposição	1,80	1	1,80	4,6	0,032*
Espécie	0,42	1	0,42	1,08	0,300
Morfologia	0,18	1	0,18	0,46	0,498
Estação do ano	12,66	1	12,66	32,23	0,000*
Espécie*Morfologia	0,66	1	0,66	1,69	0,194
Espécie*Estação do ano	1,19	1	1,19	3,04	0,081
Morfologia*Estação do ano	0,98	1	0,98	2,50	0,114



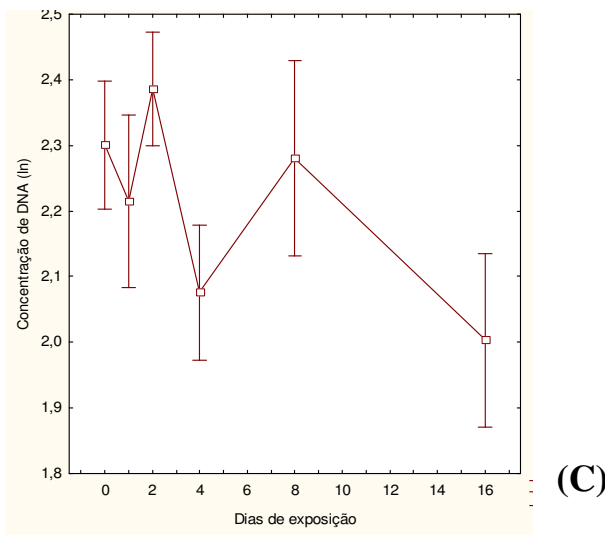
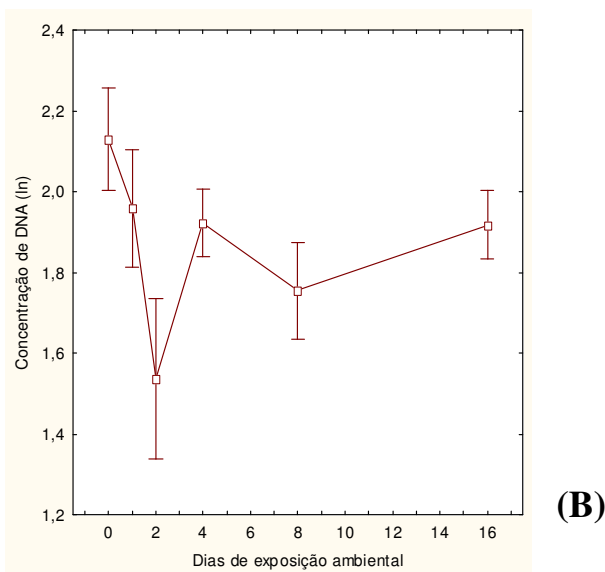


Figura 4: Concentração do DNA ao longo dos dias de exposição ambiental. (A), todas as estações; (B), estação seca; (C), estação úmida.

Discussão

A amostragem realizada por meio das armadilhas de pêlos provavelmente não representa a proporção de bulbos encontrados *in-situ* já que ela pode conter pêlos arrancados e caídos naturalmente. Em gorilas, 48% dos pêlos arrancados estão na fase anágeno/catágeno e 52% telógeno, enquanto que os pêlos caídos naturalmente 99% estão na fase telógeno (Jeffery *et al.*, 2007). Nesse contexto, a amostragem realizada nesse estudo é bastante semelhante a amostragem de pêlos caídos naturalmente já que

99 % de pêlos analisados de ambas as espécies também estavam na fase telógeno. Isso pode ser uma evidência de que o modelo de armadilha utilizada não é eficaz em obter pêlos arrancados. Entretanto, para testar essa hipótese é preciso avaliar a proporção de bulbos arrancados manualmente e as obtidas por armadilhas de pêlos para as espécies estudadas.

Estudos realizados com marcadores nucleares mostram que pêlos na fase telógeno contêm pouco ou nenhum DNA em sua estrutura (Higuchi *et al.* 1988; Allen *et al.* 1998; Linch *et al.*, 1998 e Jeffery *et al.* 2007). Já outros trabalhos, mostram que o DNA mitocondrial é abundante em pêlos na fase tardia do crescimento e até mesmo em pêlos sem bulbo (Pfeifer *et al.* , 1999; Roberts & Calloway, 2009). Desta forma, a similaridade na concentração de DNA encontrada em todas as fases nesse estudo pode ter ocorrido devido à alta concentração de DNA mitocondrial, mascarando uma possível redução na concentração do DNA nuclear ao longo do desenvolvimento do pêlo.

A maior concentração de DNA encontrada nos pêlos expostos ao longo da estação úmida foi inesperada, já que estudos mostram que a chuva aumenta significativamente as taxas de degradação do DNA contido em fezes (Farrel *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2007; Brikman, *et al.*, 2009). A ausência de um padrão óbvio nas concentrações de DNA ao longo do tempo nas diferentes estações também foi inesperada e difícil de explicar. Porém, o resultado consistente obtido quando todas as amostras foram analisadas juntas pode ser uma evidência de que o esforço amostral por estação não tenha sido suficiente para avaliá-las separadamente.

A diminuição da concentração de DNA a partir do segundo dia de exposição ambiental foi ainda mais rápida do que a encontrada por Jeffery *et al.*, (2007). Em seu estudo com pêlos de gorilas na região tropical, a degradação do DNA ocorreu até o terceiro dia de exposição ambiental. Embora esses autores tenham analisado o sucesso

de amplificação e não a concentração de DNA, ambos os estudos reforçam o quão rápido o DNA contido nos pêlos degrada em ambientes tropicais e subtropicais úmidos. Diversos estudos mostram que materiais degradados ou com quantidade de DNA muito reduzida provocam erros genotípicos, encarecem consideravelmente as análises ou podem até ser inviáveis para estudos moleculares (Taberlet, *et al.*, 1996; Tarbelet, *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 2001; Brinkman *et al.*, 2009). Desta forma, devido a rápida taxa de degradação encontrada em pêlos de felídeos e primatas (Jeffery, *et al.*, 2007), recomendamos que os pesquisadores de campo revisem suas armadilhas a cada um ou dois dias de amostragem evitando possíveis complicações em suas análises moleculares.

Referências Bibliográficas

- Allen M, Engström A.S. (1998). Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *Journal of Forensic Sciences* **43**, 453–464.
- Beja-Pereira, A., Oliveira, R., Alves, P. C., Schwartz, M. K. & Luikart, G. (2009) Advancing ecological understandings through technological transformation in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1279-1301.
- Brinkman T.J., Schwartz M.K., Person D.K., Pilgrim K.L., Hundertmark K.J. (2010) Effects of time and rainfall on PCR success using DNA extracted from deer fecal pellets. *Conservation Genetics* **11**, 1547–1552.
- Castro-Arelano, I., Madrid-Luna, C., Lacher, T. E., León-Paniagua, L. (2008). Hair-Trap efficacy for detecting mammalian carnivores in the tropics. *The Journal of Wildlife Management* **72**, 1405-1412, 2008.
- Farrell L.E., Roman J., Sunquist M.E. (2000) Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* **9**, 1583–1590.

- Higuchi R., von Beroldingen C.H., Sensabaugh G.F., Erlich H.A. (1988). DNA typing from single hairs. *Nature* **332**, 543–546.
- IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná. 2009. Cartas climáticas do Paraná. Disponível em: http://200.201.27.14/Site/Sma/Cartas_Climáticas.htm. Acesso em Agosto 2009.
- Jeffery KJ, Abernethy KA, Tutin CEG, Bruford MW (2007) Biological and environmental degradation of gorilla hair and microsatellite amplification success. *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**, 281–294.
- Kendall, K. C., Mckelvey, K. S. (2008). Hair collection. In: Long, R. A.; Mackay, P. Zielinski, W. J.; Ray, J. C. Noninvasive survey methods for carnivores. 135-176. Island Press.
- Kligman, A.M. (1959) The human hair cycle. *Journal of Investigative Dermatology* **33**, 307-316.
- Linch C.A., Smith S.L., Prahlow J.A. (1998). Evaluation of the human hair root for DNA typing subsequent to microscopic comparison. *Journal of Forensic Sciences* **43**, 305–314.
- Morin PA, Chambers KE, Boesch C, Vigilant L. (2001). Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* **10**, 1835–1844.
- Morin P.A., Woodruff D.S. (1996). Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. 298-313. Smith, T. B., Wayne R. K. (Ed.) New York: Oxford University Press.

- Murphy M.A., Kendall K.C., Robinson A., Waits L.P. (2007) The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification. *Conservation Genetics* **8**, 1219–1224.
- Pfeiffer H., Hühne J., Ortmann C., Waterkamp K., Brinkmann B. (1999). Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts – success rates and sequence comparisons. *International Journal of Legal Medicine* **112**, 287–290.
- Roberts, K. A. & Calloway, C.(2007). Mitochondrial DNA amplification success rate as a function of hair morphology. *Journal of Forensic Sciences* **56**, 46-60.
- Taberlet P., Camarra J.J., Griffin S., Uhrès E., Hanotte O., Waits L.P., Dubois-Paganon C., Burke T., Bouvet J. (1997). Non-invasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* **6**, 869–876.
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questlau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P., Bouvet J. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* **24**, 3189–3194.
- Taberlet P., Waits L.P., Luikart G. (1999) Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* **14**, 321–325.
- Veloso-Filho, H. P., Rangel, A. L. R., Lima, J. C. A. (1991) Classificação da Vegetação Brasileira Adaptada a um Sistema Universal. Rio de Janeiro: IBGE.

Capítulo 2

Testando diferentes estímulos olfativos para detectar felídeos neotropicais em armadilhas de pêlos

*Esse trabalho ainda não está em formato para publicação. Ele teve colaboração do Biol. Diego R. Bilski e co-orientação do Prof. Dr. Fernando Passos do Laboratório de Biodiversidade, Conservação e Ecologia de Animais Silvestres/UFPR.

Resumo

O uso de rub-pads como método de amostragem não-invasiva tem se tornado uma ferramenta importante nos estudos de ecologia molecular de mamíferos de vida-livre. Contudo, para o método funcionar é preciso identificar um estímulo olfativo que seja eficaz em atrair e estimular o comportamento de marcação de cabeça dos animais nas armadilhas. Com objetivo de estudar as populações de felídeos que ocorrem no Parque Estadual do Marumbi testamos a eficácia de três atrativos: Catnip, Canela (ambas com a eficácia comprovada em outros estudos) e Baunilha em detectar seis espécies de felídeos ocorrentes na região: *Leopardus pardalis*, *Leopardus tigrinus*, *Leopardus wiedii*, *Puma concolor*, *Puma yagouaroundi* e *Panthera onca*. Foram realizados testes comportamentais com animais de cativeiro para verificar possíveis diferenças na resposta entre estímulos e espécies. Em seguida, foram realizadas amostragens de campo para avaliar se essas diferenças também são encontradas em campo. Em cativeiro a onça-parda foi o único animal que não se esfregou em nenhum dos estímulos, e dos animais que interagiram, a baunilha e a canela foram as que respectivamente geraram maior resposta. No campo foram detectados cinco táxons: *Cebus nigritus*, *Cerdocyon thous*, *Lontra longicaudis*, *Procyon cancrivorus* e uma espécie não identificada, porém nenhuma espécie alvo foi detectada. Esse estudo aponta

a incerteza da eficácia do método e a necessidade de se avaliar outros fatores e não só os estímulos como determinantes para o sucesso ou insucesso do método.

Introdução

Uma técnica que tem revolucionado a pesquisa com animais silvestres, principalmente as que envolvem espécies crípticas, tem sido a técnica de genética molecular por métodos não invasivos. Através da coleta e extração do DNA de fezes, pêlos, urina e saliva, muitos pesquisadores tem elucidado questões importantes como estrutura genética, padrão de movimentação, abundância, conectividade entre populações e relações sociais, que são bastante difíceis ou até impossíveis de se obter através de métodos indiretos tradicionais (Haig, 1998; Piggot & Taylor, 2003; Schwartz, *et al.*, 2006; Schwartz & Monfort, 2008; Beja-Pereira *et al.*, 2009).

Um dos materiais genéticos mais utilizados com carnívoros são os pêlos (Kendall & McKelvey, 2008, Beja-Pereira *et al.* 2009). Ao contrário das fezes que são encontradas naturalmente no ambiente, os pêlos na maioria das vezes requerem o uso de armadilhas específicas. Para felídeos, as armadilhas mais utilizadas são os “rub pads”, que consistem de uma superfície revestida de carpete ou velcro, com farpas de arames ou até mesmo pregos acoplados em sua estrutura. Essa base serve de substrato para o comportamento de esfregação dos felinos, que ao fazê-lo, tem seus pêlos arrancados e presos no dispositivo (Kendall & McKelvey, 2008).

Para o método funcionar é importante escolher um estímulo olfativo que seja eficaz em atrair e estimular o comportamento de esfregação dos felinos. A resposta frente a um estímulo pode variar entre espécies e indivíduos (Mellen, 1993), e segundo Harrison (1997) é de extrema importância a aplicação de testes em cativeiro e no campo para avaliar a eficácia do método antes de iniciar um estudo. A identificação de

estímulos cientificamente válidos também pode poupar verbas e auxiliar o delineamento de amostragem de futuras pesquisas (Schlexer, 2008).

Na região neotropical são poucos os trabalhos que utilizam armadilhas de pêlos, sendo a maioria deles concentrados no México (Harrison, 1997; Downey *et al.*, 2007; Castro-Arelano, *et al.*, 2008) podendo se citar apenas um trabalho realizado na América do Sul (Martins, 2009). Em contraste com as diversas publicações existentes na região neártica (Weaver *et al.*, 2005; Bertrand *et al.*, 2006; McKelvey *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2007; Ruell & Crooks, 2007; Thompson, 2010), essa escassez mostra o quanto é precário o nosso conhecimento a respeito da efetividade do método com os animais da região.

Com a finalidade de estudar felídeos neotropicais, fizemos um estudo avaliando a eficácia de três estímulos olfativos na detecção das seis espécies ocorrentes na região sul do Brasil: onça-pintada (*Panthera onca*), onça-parda (*Puma concolor*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*). Para tal avaliamos (1) a resposta comportamental das espécies diante dos estímulos em cativeiro (2) a eficácia dos estímulos em detectar as seis espécies de felídeos no campo (3) se existe relação entre as respostas comportamentais em cativeiro e o sucesso de detecção no campo para os diferentes estímulos e espécies.

Material e Métodos

Os estímulos olfativos escolhidos foram catnip®, canela e baunilha. O catnip é amplamente utilizado em diversos estudos com armadilhas de pêlos (Harrison, 1997; Mc Daniel, *et al.*, 2000; Castro-Arelano, *et al.*, 2008; Schlexer, 2008; Martins, 2009) e a canela foi utilizada com sucesso por Martins (2009) em detectar onças-pardas em uma

região de cerrado na Estação Ecológica de Jataí, SP, Brasil. A baunilha nunca foi utilizada em estudos anteriores, mas ela se mostrou eficaz em estimular o comportamento de esfregação dos felinos cativos em testes preliminares. Nesse estudo buscou-se utilizar estímulos fáceis de serem encontrados, principalmente por pesquisadores da região neotropical.

Foram realizados testes comportamentais com dez exemplares cativos de jaguatirica, sete de gato-maracajá, seis de gato-do-mato-pequeno, seis de onça-parda, cinco de gato-mourisco e cinco de onça-pintada mantidos no Zoológico de Curitiba, (PR), no Criadouro Conservacionista Onça-Pintada (Curitiba, PR) e na Associação Mata Ciliar (Jundiaí, SP). Foi disposto em cada recinto um bloco de madeira por animal embebido com um dos estímulos olfativos. Em seguida, foram realizadas observações de uma hora onde foram registrados possíveis comportamentos de esfregação na madeira e o tempo de duração do comportamento. Todos os indivíduos receberam os três estímulos em dias diferentes e a ordem de apresentação de cada um foi realizada por sorteio. Como controle negativo, os testes comportamentais foram repetidos com a madeira sem nenhum estímulo. Foi utilizada análise de variância não-paramétrica de Friedman para avaliar se houve diferença nas interações entre os estímulos por espécie. Quando houve resultados significativos foi utilizado o teste de Wilcoxon para analisar os dados por pares.

Os testes em campo foram realizados no Parque Estadual do Pico do Marumbi, localizado na cidade de Morretes, Paraná. O Parque possui uma área de mais de 8.000 hectares e está inserido no domínio da Floresta Onbrófila Densa, apresentando sub-formações sub-montana, montana e alto-montana (Struminski, 2001). O clima do PEPM, de acordo com a classificação climática de Köppen, é Cfb – com verões frescos, geadas frequentes e sem estação seca, com a média de temperatura do mês mais quente

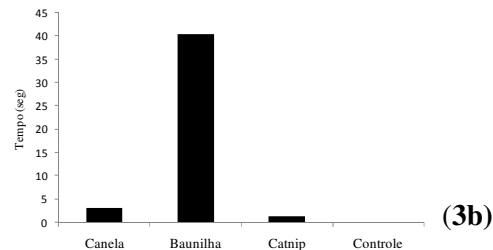
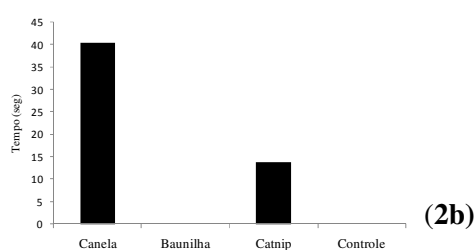
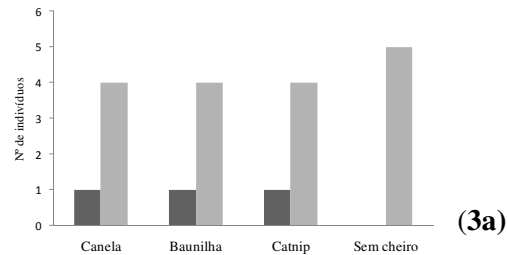
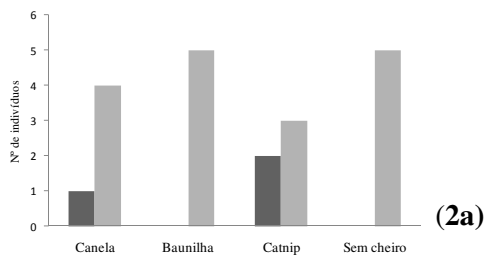
inferior a 22 °C e do mês mais frio inferior a 18 °C, sem deficiência hídrica (SEMA-IAP,1996). As amostragens foram realizadas durante os meses de julho e agosto de 2009 e abril, maio, junho e julho de 2010. Durante esse período foram dispostas armadilhas (figura 1) em estações móveis como as descritas por Downey *et al.* (2007). Foram amostrados sete transectos, cada um com um número variável de armadilha. As armadilhas com cada um dos estímulos foram intercaladas ao longo da trilha, de modo que cada uma contivesse o mesmo número de armadilhas com os três estímulos. O esforço amostral foi calculado de acordo com Castro-Arelano, *et al.* (2008) sendo de 1551 armadilhas-noite. A identificação dos pêlos obtidos foi realizada por comparações microscópicas dos padrões cuticulares e medulares presentes na chave de identificação de Quadros (2002). A preparação das lâminas com os pêlos foi realizada de acordo com a metodologia de Quadros & Monteiro-Filho (2006).

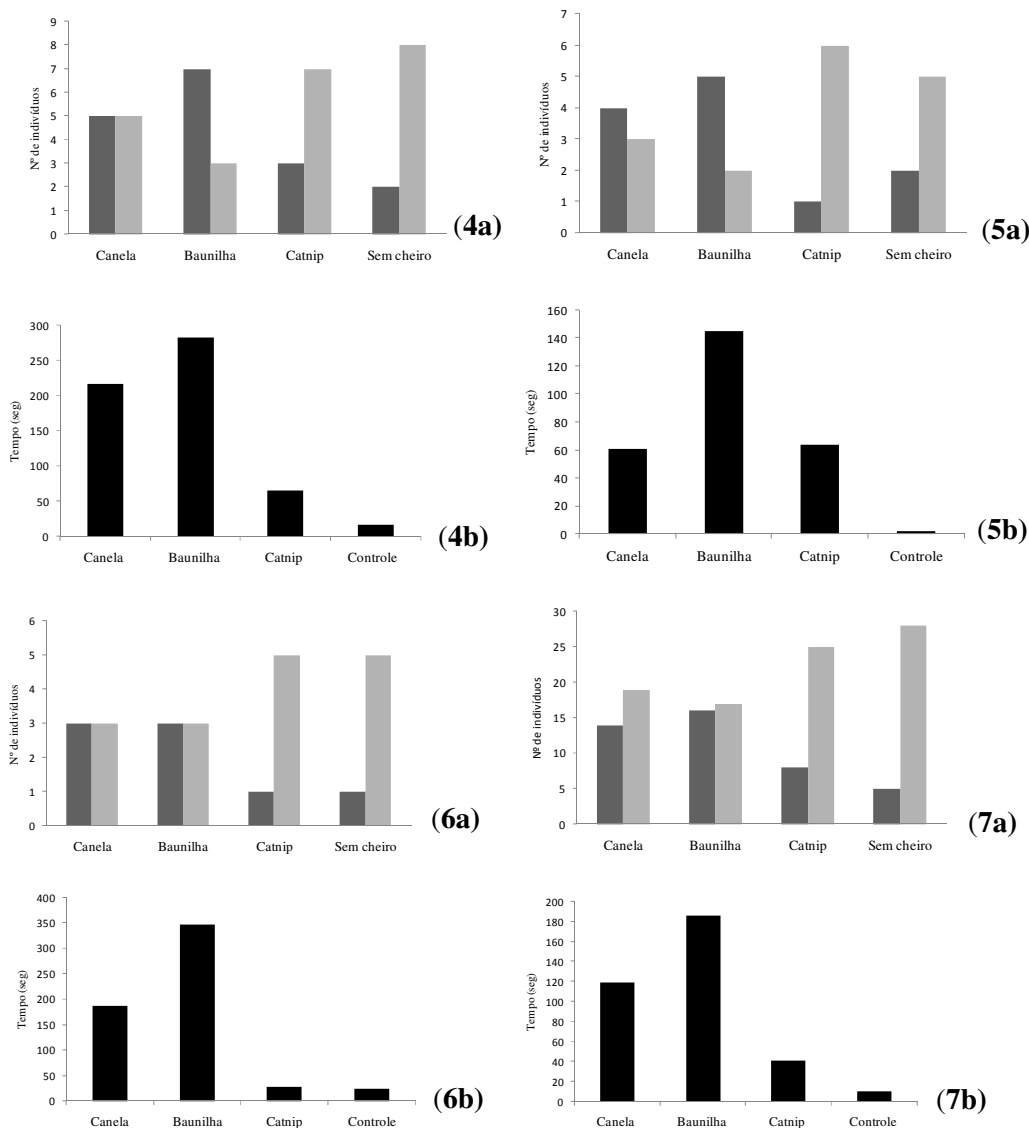


Figura 1: Armadilha de pêlo utilizada no Parque Estadual do Marumbi.

Resultados

O número de indivíduos por espécie que interagiram e a média do tempo que os animais se esfregaram em cada estímulo estão representados nas figuras 2-7. Das espécies estudadas a onça-parda foi a única que não se esfregou em nenhum dos tratamentos. A jaguatirica, gato-maracajá e o gato-do-mato-pequeno apresentaram diferenças significativas na interação entre os estímulos e o controle negativo (Friedman: $\chi^2 = 16.9$, $p = 0.0007$ para jaguatirica; $\chi^2 = 9.76$, $p = 0.020$ para maracajá e $\chi^2 = 8.37$, $p = 0.038$ para gato-do-mato-pequeno). Os resultados do teste de Wilcoxon apresentados na tabela 1 mostraram que a jaguatirica interagiu significativamente mais com a canela e a baunilha do que o catnip e o controle, e o gato maracajá interagiu mais com a baunilha do que o catnip e o controle, não havendo diferença entre os outros estímulos. Não houve resultado significativo quando os dados foram avaliados por pares para gato-do-mato-pequeno. Analisando-se todas as espécies que interagiram a pelo menos um estímulo, a baunilha foi o estímulo que gerou maior resposta.





Figuras 2-7. Número de indivíduos que interagiram aos estímulos (barra cinza escuro) e os que não interagiram (barra cinza claro). Média em segundos do comportamento de esfregação dos animais para cada estímulo (barra preta). *P. onca* (2a-b), *P. yagouaroundi* (3a-b), *L. paradalis* (4a-b), *L. wiedii* (5a-b), *L. tigrinus* (6a-b), todas as espécies excluindo *P. concolor* (7a-b).

Tabela 1: Resultados por pares do teste Wilcoxon para as espécies que apresentaram diferenças nas respostas entre os estímulos. Os estímulos avaliados foram: Canela (Can), Baunilha (Bau), Catnip (Cat), Controle (Ctr). n= número de indivíduos analisados, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

	n	Can/Bau		Can/Cat		Can/Ctr		Bau/Cat		Bau/Ctr		Cat/Ctr	
		Z	p	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
Jaguaritica	10	1.35	0.176	2.02	0.043*	2.02	0.043*	2.36	0.017*	2.36	0.017*	-	-
Maracajá	7	1.21	0.224	0.67	0.500	1.48	0.138	2.02	0.043*	2.02	0.043*	-	-
Gato-do-mato-pequeno	6	1.60	0.108	1.60	0.108	1.60	0.108	1.60	0.108	1.60	0.108	-	-
Todas as espécies ¹	33	2.10	0.035*	2.53	0.011*	3.29	0.0009**	3.54	0.0003**	3.51	0.0004**	1.27	0.202

¹ todas as espécies excluindo *P. concolor*

Nenhum felino foi detectado nos testes em campo. Entre as poucas espécies detectadas estavam *Lontra longicaudis*, *Cerdocyon thous*, *Procyon cancrivorus* e *Cebus nigrinus*. Não foi possível identificar uma das amostras de pêlos, pois ela apresentou um padrão micro estrutural diferente do encontrado na chave de identificação. O estímulo que mais detectou os animais em campo foi catnip seguido da canela (tabela 2).

Tabela 2: Espécies detectadas pelas armadilhas de pêlos com Canela (Can), Baunilha (Bau) e Catnip (Cat).

Espécie	Nome popular	Nº de capturas		
		Can	Bau	Cat
Primates				
Cebidae				
<i>Cebus nigrinus</i>	Macaco-prego	-	-	1
Carnivora				
Canidae				
<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	-	-	1
Mustelidae				
<i>Lontra longicaudis</i>	Lontra	1	-	-
Procyonidae				
<i>Procyon cancrivorus</i>	Mão-pelada	1	-	-
Espécie não identificada		-	-	1
Total		2	-	3

Discussão

Embora o catnip seja amplamente utilizado em atrair felídeos nas armadilhas de pêlos (Harrison, 1997; Mc Daniel, *et al*, 2000; Castro-Arelano, *et al*, 2008; Schlexer, 2008; Martins, 2009) ele foi o estímulo que em cativeiro gerou menor resposta entre as espécies. A canela foi utilizada apenas uma vez, com sucesso, em detectar vários indivíduos de puma na região de cerrado (Martins, 2009), entretanto, nesse estudo nenhum exemplar dessa espécie interagiu a esse estímulo. Mesmo assim ele foi responsável pela interação de todas as outras espécies tornando-se um atrativo em

potencial para detectar felinos no campo, junto com a baunilha, que gerou maior resposta entre todos os animais testados.

Devido a não-detecção dos felinos, não foi possível fazer relações entre a taxa de detecção no campo e a resposta comportamental dos animais em cativeiro. No trabalho de Harrison (1997), essa relação também não foi realizada devido à baixa detecção desses animais em campo. Porém, quando foram avaliadas as capturas de todos os carnívoros e de outros táxons, os estímulos que mais detectaram foram os que também geraram maior resposta nos felinos cativos. Nesse estudo, porém, se levarmos em conta todas as capturas, um dos estímulos que gerou maior resposta nos felinos, a baunilha, surpreendentemente não detectou nenhuma espécie em campo.

Embora sejam muitos os trabalhos que tiveram sucesso em atrair felinos nas armadilhas de pêlos (McDaniel *et al.* 2000, Weaver *et al.* 2005, Castro-Arelano, *et al.* 2008 e Martins 2009), não são poucos os estudos, que assim como este, não alcançaram o mesmo resultado. Harrison (1997) e Thomas *et al.* (2005), por exemplo, detectaram algumas espécies de felinos como gato-mourisco, gato-maracajá, jaguatirica, e leões (*Panthera leo*) e leopardos (*Panthera pardus*) respectivamente, mas o número de amostras foi muito pequeno, o que tornou o método de amostragem por armadilhas de pêlos inviável para o estudo dessas populações. Já Downey *et al.* (2007) e Thompson (2010), que pretendiam estudar gato-maracajá e puma respectivamente, assim como este trabalho, conseguiram amostras de diversas espécies generalistas ocorrentes na região, porém nenhuma das espécies alvos.

Existem algumas hipóteses na literatura que tentam explicar a falta de sucesso em alguns trabalhos. Através de uma revisão bibliográfica, Downey *et al.* (2007) não encontrou uma relação entre os estímulos utilizados e os trabalhos que tiveram ou não sucesso. Isso pode ser constatado nesse estudo, já que dois dos estímulos empregados

foram eficazes em detectar uma das espécies alvos em outro trabalho (Martins, 2009). De acordo com Gu & Swihart (2003) baixas taxas de detecção estão relacionadas a espécies que ocorrem em baixa densidade e que possuem grandes territórios. Esse é o caso dos felinos, principalmente os de grande porte como onças-pintadas e onças-pardas que podem ter um território de até mais de 100 Km² (Silveira, 2004, Cullen Jr. 2006). Existem outros fatores que podem interferir no sucesso do método como o habitat onde o estudo é conduzido, pressão de caça (Castro-Arelano *et al.*, 2008) e regiões onde os felinos ocorrem em simpatria com Gray Foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) (Downey *et al.*, 2007) porém foram poucos os trabalhos que os testaram devidamente.

Devido a muitos fatores que levam a incerteza da eficácia do método recomendamos que futuros estudos com felídeos busquem outras fontes de material genético como os contidos nas fezes. Embora elas tenham a desvantagem de poder conter material inibidor de amplificação (Waits & Peatkau, 2006) e DNA dos animais predados (Piggott & Taylor, 2003) elas podem ser facilmente encontradas por busca ativa (Heinemeyer, *et al.*, 2008) ou com o auxílio de cães farejadores (Harrison, 2006, Long *et al.*, 2007, MacKay *et al.*, 2008). No entanto, recomendamos que futuros estudos com armadilhas de pêlos não foquem apenas na eficácia dos estímulos, mas também em diversos outros fatores que podem determinar o sucesso do método. Estudos com esse enfoque poderão auxiliar futuros pesquisadores a planejarem seus trabalhos de campo, e a não perderem tempo nem dinheiro com uma metodologia que em determinadas condições possui grandes chances de falhar.

Referências Bibliográficas

- Bertrand, A.-S.; S. Kenn, D. Gallant, E. Tremblay, L. Vasseur & R. Wissink. (2006). MtDNA analyses on hair samples confirm cougar, *Puma concolor*, presence in southern New Brunswick, Eastern Canada. *Canadian Field-Naturalist* **120** (4), 438–442.
- Beja-Pereira, A., Oliveira, R., Alves, P. C., Schwartz, M. K. & Luikart, G. (2009) Advancing ecological understandings through technological transformation in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1279-1301.
- Castro-Arelano, I., Madrid-Luna, C., Lacher, T. E., León-Paniagua, L. (2008). Hair-Trap efficacy for detecting mammalian carnivores in the tropics. *The Journal of Wildlife Management* **72**, 1405-1412.
- Cullen Jr. L. (2006). Jaguar as landscape detectives for the conservation in the Atlantic Forest of Brazil. Doctoral Thesis. University of Kent, United Kingdom.
- Downey P. J.; E. C. Hellgren; A. Caso; S. Carvajal; K. Frangioso. (2007). Hair Snares for Noninvasive Sampling of Felids in North America: Do Gray Foxes Affect Success? *Journal of Wildlife Management* **71** (6), 2090-2094.
- Gu, W., and R. K. Swihart. 2003. Absent or undetected? Effects of non-detection of species occurrence on wildlife-habitat models. *Biological Conservation* **116** (2), 195-203. 116
- Haig, S. (1998). Molecular contributions to conservation. *Ecology* **79**:413–425.
- Harrison, R. L. (1997). Chemical attractants for Central American felids. *Wildlife Society Bulletin* **25**, 93–97
- Harrison, R. L. (2006) A Comparison of Survey Methods for Detecting Bobcats. *Wildlife Society Bulletin* **34** (2): 548–552.

- Heinemeyer, K. S., T. J. Ulizio, and R. L. Harrison. 2008. Natural sign: tracks and scats. In *Noninvasive survey methods for carnivores*, ed. R. Long, P. MacKay, W. Zielinski, and J.C. Ray, 45-74. Washington, D.C., USA: Island Press.
- Kendall, K. C., Mckelvey, K. S. (2008). Hair collection. In: Long, R. A.; Mackay, P. Zielinski, W. J.; Ray, J. C. *Noninvasive survey methods for carnivores*. 135-176. Washington, D.C., USA :Island Press.
- Long, R. A.; T. Donovan; P. Mackay; W. J. Zielinski; J.S. Buzas. (2007). Comparing scat detection dogs, cameras, and hair snares for surveying carnivores. *Journal of Wildlife Management* **71** (6), 2018–2025.
- McDaniel, G. W., McKelvey, K. S., Squires, J. R., Ruggiero, L. F. (2000) Efficacy of lures and hair snares to detect lynx. *Wildlife Society Bulletin* **28** (1), 119-123.
- McKelvey, K.S., Kienast, J. V., Aubry, K. B., Koehler, G. M., Maletzke, B. T., Squires, J. R., Linnquist, E. L., Loch, S. Schwartz, M. K. (2006). DNA analysis of hair and scat collected along snow tracks to document the presence of Canada lynx (*Lynx canadensis*). *Wildlife Society Bulletin* **34**, 451–455.
- MacKay, P., D. A. Smith, R. A. Long, and M. Parker. 2008. Scat detection dogs. In *Noninvasive survey methods for carnivores*, ed. R. Long, P. MacKay, W. Zielinski, and J.C. Ray, 183-222. Washington, D.C., USA: Island Press.
- Martins, N. (2009) Padronização de um protocolo para a extração de DNA a partir de pêlos e individualização de amostras de pêlos de onça-parda (*Puma concolor*) obtidos por meio de armadilhas não invasivas. Monografia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.
- Mellen, J. D. (1993). A Comparative Analysis of Scent-Marking, Social and Reproductive Behavior in 20 Species of Small Cats (*Felis*). *Integrative and comparative biology* **3** (2), 1551-166

- Piggott, M. P. & A. C. Taylor. (2003). Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. *Wildlife Research* **30**, 1-13.
- Quadros, J. (2002). Identificação microscópica de pêlos de mamíferos e suas aplicações no estudo da dieta de carnívoros. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná.
- Quadros, J. & Monteiro-Filho, E.L.A. (2006). Coleta e preparação de pêlos de mamíferos para identificação em microscopia óptica. *Revista Brasileira de Zoologia* **23** (1), 274-278.
- Ruell, W. W., and K. R. Crooks. (2007). Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for felid and canid populations. *Journal of Wildlife Management* **71**, 1690–1694.
- Schlexer, F. V. (2008) Attracting Animals to Detection Devices. In: Long, R. A.; Mackay, P. Zielinski, W. J.; Ray, J. C. Noninvasive survey methods for carnivores. 263-292. Washington, D.C., USA: Island Press.
- Schwartz MK, Luikart G, and Waples RS. (2007). Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 25-33.
- Schwartz M. K. and Monfort S. L. (2008). Genetic and Endocrine Tools for Carnivore Surveys. In: Long RA, MacKay P, Ray JC, Zielinski WJ (eds) *Noninvasive survey methods for North American carnivores*. 238-262 Washington D.C.: Island Press,
- SEMA-IAP.(1996). Plano de Manejo do Parque Estadual do Pico do Marumbi - PR. Secretaria de Estado do Meio Ambiente-Instituto Ambiental do Paraná, Curitiba.

- Silveira, L.(2004). Ecologia comparada e Conservação da Onça-pintada (*Panthera onca*) e Onça-parda (*Puma concolor*), no Cerrado e Pantanal. Tese de Doutorado em Biologia Animal. Universidade de Brasília.
- Struminski, E. (2001) Parque Estadual Pico do Marumbi. Curitiba: Editora UFPR.
- Thomas, P. Balme, G. Hunter, L. McCabe-Parodi, J. (2005) Using scent attractants to non-invasively collect hair samples from cheetahs, leopards and lions. *Animal Keeper's Forum* 7 (8), 342-384.
- Thompson, D. M. (2010) Noninvasive approaches to reduce human-cougar conflict in protected areas on the west coast of Vancouver island. Master thesis. University of Victoria.
- Waits, L. P.; Peatkau, D. (2005). Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*, 69 (4), p. 1419-1433.
- Weaver, J. L., P. Wood, D. Paatkau, and L. L. Laack. (2005). Use of scented hair snares to detect ocelots. *Wildlife Society Bulletin* 33, 1384–1391.

Considerações Finais

A maioria dos trabalhos que utilizam armadilhas de pêlos as deixam em campo por um longo período de tempo, e as revisões são feitas após semanas ou até mesmo depois de um mês de amostragem (McDaniel, *et al.*, 2000; Bertrand *et al.*, 2006; Downey *et al.*, 2006; Castro-Arelano *et al.*, 2008; Martins, 2009). São raros os estudos que as conferem a cada um ou dois dias (Weaver, 2005). Isso ocorre devido a baixa taxa de detecção desses animais, o que é esperado levando em conta as espécies que estão sendo amostradas e que ocorrem naturalmente em menor densidade (MacKay *et al.*, 2008).

Embora o custo-benefício seja maior quando as armadilhas são revisadas em um intervalo grande de tempo, quando levamos em consideração as análises moleculares esse tipo de amostragem não é vantajosa. Nesse estudo (Cap. 1) constatamos que o DNA contido nos pêlos é rapidamente degradado em apenas dois dias de exposição ambiental, e a coleta tardia desse material pode prejudicar seriamente as análises moleculares. Isso talvez explique o baixo número de estudos com felídeos que genotipam os pêlos obtidos por esse método. A maioria dos trabalhos fazem apenas a identificação molecular das espécies através do DNA mitocondrial, que pode ser abundante até mesmo em amostras degradadas (Gilbert *et al.*, 2006; Roberts & Calloway, 2007). Apenas dois estudos utilizaram marcadores de microsatélites em pêlos de felídeos obtidos por *rub pads*. O primeiro foi realizado por Weaver *et al.* (2005) o qual curiosamente também foi o único estudo com felídeos que revisou suas armadilhas diariamente. E outro realizado por Martins (2009), que mesmo revisando suas armadilhas uma vez por mês, conseguiu amplificar seis primers de microsatélites na maioria de suas amostras.

Embora alguns autores enfatizem a importância de testar os estímulos em cativeiro e isso já ter sido feito em outros estudos (Harrison, 1997; McDaniel *et al.*, 2000; Weaver *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2005; Schlexer, 2008) não encontramos relação entre sucesso de interação em cativeiro e sucesso de detecção no campo (cap. 2). Não só pelo fato de não termos detectado nenhum felino em campo, mas também, porque espécies que já foram atraídas por atrativos como catnip e/ou canela em outros trabalhos (Weaver *et al.*, 2005; Castro-Arelano *et al.*, 2008; Martins, 2009) não interagiram ou se interessaram muito pouco por esses estímulos em cativeiro (cap. 2).

Existem algumas hipóteses que podem estar relacionadas com a baixa detecção dos animais na região. Uma delas é a baixa abundância dos animais que ocorrem no local. Além dos felinos ocorrerem em menor densidade populacional, a abundância dos mamíferos de médio e grande porte na floresta ombrófila densa montana e sub-montana costuma ser menor em relação aos outros tipos florestais de Mata Atlântica (Galetti *et al.*, 2009). Outro fator é a grande visitação que o parque recebe e a alta pressão de caça. Durante o período de amostragem, houve momentos em que ouvimos tiros, cachorros latindo durante a noite e houve até um encontro com armadilhas de caça por um funcionário do parque. Segundo Thomas *et al.* (2005) e Castro-Arelano *et al.*, (2008) visitação humana e pressão de caça podem ser fatores que interferem no sucesso de amostragem por armadilhas de pêlos.

Mesmo com alguns autores enfatizando a importância do método (Castro-Weaver *et al.*, 2005; Castro-Arelano *et al.*, 2008; Kendall & McKelvey, 2008) não foram poucos os estudos que não tiveram sucesso (Downey *et al.*, 2007; Thompson 2010) ou que obtiveram uma amostragem baixa de felídeos em *rub pads* (Harrison 1997; Thomas *et al.* 2005). A grande taxa de insucesso do método associada a rapidez da degradação do DNA contido no pêlo (cap 1), nos leva a concluir que a armadilha de

pêlo não é um bom método de amostragem para estudos de ecologia molecular com felídeos neotropicais.

Referências Bibliográficas

Bertrand, A.-S.; S. Kenn, D. Gallant, E. Tremblay, L. Vasseur & R. Wissink. (2006).

MtDNA analyses on hair samples confirm cougar, *Puma concolor*, presence in southern New Brunswick, Eastern Canada. *Canadian Field-Naturalist* **120** (4), 438–442.

Castro-Arelano, I., Madrid-Luna, C., Lacher, T. E., Léon-Paniagua, L. (2008). Hair-

Trap efficacy for detecting mammalian carnivores in the tropics. *The Journal of Wildlife Management* **72**, 1405-1412.

Downey P. J.; E. C. Hellgren; A. Caso; S. Carvajal; K. Frangioso. (2007). Hair Snares

for Noninvasive Sampling of Felids in North America: Do Gray Foxes Affect Success? *Journal of Wildlife Management* **71** (6), 2090-2094.

Galetti, M., H. C. Giacomini, R. S. Bueno, C. S. S. Bernardo, R. M. Marques, R. S.

Bovendorp, C. E. Steffler, P. Rubim, S. K. Gobbo, and C. I. Donatti. 2009. Priority areas for the conservation of Atlantic forest large mammals. *Biological Conservation* **142**, 1229–1241.

Gilbert, M.T.P., Menez, L., Janaway, R.C., Tobin, D.J., Cooper, A., Wilson, A.S.

(2006). Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. *Forensic Science International* **156**, 208-212.

Harrison, R. L. (1997). Chemical attractants for Central American felids. *Wildlife*

Society Bulletin **25**, 93–97

- Kendall, K. C., Mckelvey, K. S. (2008). Hair collection. In: Long, R. A.; Mackay, P. Zielinski, W. J.; Ray, J. C. *Noninvasive survey methods for carnivores*. 135-176. Washington, D.C., USA : Island Press.
- Martins, N. (2009) Padronização de um protocolo para a extração de DNA a partir de pêlos e individualização de amostras de pêlos de onça-parda (*Puma concolor*) obtidos por meio de armadilhas não invasivas. Monografia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.
- Mackay, P., Zielinski, W. J., Long, R. A., Ray, J. C. Noninvasive Research and Carnivore Conservation In: Long, R. A.; Mackay, P. Zielinski, W. J.; Ray, J. C. *Noninvasive survey methods for carnivores*. 1-8. Washington, D.C., USA :Island Press.
- McDaniel, G. W., McKelvey, K. S., Squires, J. R., Ruggiero, L. F. (2000) Efficacy of lures and hair snares to detect lynx. *Wildlife Society Bulletin* **28** (1), 119-123.
- Roberts, K. A. & Calloway, C.(2007). Mitochondrial DNA amplification success rate as a function of hair morphology. *Journal of Forensic Sciences* **56**, 46-60.
- Schlexer, F. V. (2008) Attracting Animals to Detection Devices. In: Long, R. A.; Mackay, P. Zielinski, W. J.; Ray, J. C. *Noninvasive survey methods for carnivores*. 263-292. Washington, D.C., USA: Island Press.
- Thomas, P. Balme, G. Hunter, L. McCabe-Parodi, J. (2005) Using scent attractants to non-invasively collect hair samples from cheetahs, leopards and lions. *Animal Keeper's Forum* **7** (8), 342-384.
- Thompson, D. M. (2010) Noninvasive approaches to reduce human-cougar conflict in protected areas on the west coast of Vancouver island. Master thesis. University of Victoria.

Weaver, J. L., P. Wood, D. Paetkau, and L. L. Laack. (2005). Use of scented hair snares to detect ocelots. *Wildlife Society Bulletin* **33**, 1384–1391.