
ECOLOGIA

Vinicius Marciano de Godoy

**DOS FRUTOS ÀS FEZES: DETECTANDO DNA
VEGETAL EM AMOSTRAS FECAIS DE AVES
FRUGÍVORAS**



Rio Claro - SP
2024

Vinicius Marciano de Godoy

**DOS FRUTOS ÀS FEZES: DETECTANDO DNA VEGETAL EM
AMOSTRAS FECAIS DE AVES FRUGÍVORAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Ecólogo

Orientador(a): Marina Corrêa Côrtes

Coorientador(a): Carina Isabella Motta

Rio Claro - SP
2024

G589f

Godoy, Vinicius Marciano de

Dos Frutos às fezes: Detectando DNA vegetal em amostras fecais de aves frugívoras /
Vinicius Marciano de Godoy. -- Rio Claro, 2024
39 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ecologia) - Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Marina Corrêa Côrtes

Coorientadora: Carina Isabella Motta

1. Ecologia Molecular. 2. Marcador Microsatélite. I. Título.

VINICIUS MARCIANO DE GODOY

DOS FRUTOS ÀS FEZES: DETECTANDO DNA VEGETAL EM AMOSTRAS FECAIS DE AVES FRUGÍVORAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Ecólogo

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Marina Corrêa Côrtes

Prof. Dr. Marco Aurélio Pizo Ferreira

Dra. Natacha Silva

Aprovado em: 21 de Novembro de 2024

Documento assinado digitalmente
 VINICIUS MARCIANO DE GODOY
Data: 11/12/2024 19:40:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do discente

Documento assinado digitalmente
 MARINA CORREA CORTES
Data: 11/12/2024 16:50:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do(a) orientador(a)

Documento assinado digitalmente
 CARINA ISABELLA MOTTA
Data: 11/12/2024 11:33:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do(a) coorientador(a)

*Dedico esse manuscrito a todos aqueles que, de alguma
forma, cruzaram o meu caminho e deixaram em mim
marcas que o tempo não me fez esquecer.*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Sem esse financiamento essa pesquisa não teria a robustez e impacto que teve. **processo nº 2023/08800-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**

Como aluno de uma universidade pública, mantida pelo dinheiro do contribuinte, e futuro ecólogo, comprometido com o propósito de proteger o equilíbrio dos ecossistemas do nosso planeta, este trabalho representa mais do que uma simples conquista acadêmica — é um reflexo de uma vontade coletiva e dedicação partilhada.

Primeiramente, agradeço minhas mentoras, Marina Corrêa Côrtes e Carina Motta, que, à semelhança dos grandes naturalistas do passado, iluminaram meu caminho com orientações precisas, gentis e essenciais. Marina expandiu meus horizontes com suas possibilidades e sempre foi paciente comigo, mesmo em momentos de pouca celeridade minha para entregar pendências. Carina, por sua vez, me ensinou tudo que sei sobre práticas laboratoriais, com uma generosidade ímpar, pavimentando os caminhos que tornaram este trabalho possível ao ceder parte de sua própria pesquisa para que eu pudesse aprofundar. Sem elas, esta monografia não teria sido concretizada.

Aos meus colegas de jornada, companheiros fiéis que ao meu lado dentro e fora das salas de aula, agradeço pela camaradagem, pelas trocas de ideias, e pelo apoio constante. Nominalmente cito Beatriz Saraiva, Juliana Ângelo, Mariana Machado, Ícaro Gilbert, Luiz Henrique Laverdi e Rodrigo Valim como rede de apoio para minha vida acadêmica. Em especial agradeço Gio Andrade como colega de laboratório e melhor competidor que alavancou meu desempenho na universidade. Minha veterana Jacqueline Bunilha que me abrigou na fase inicial e conturbada da faculdade. Assim como enfrentamos juntos os perigos do campo, navegamos juntos pelos mares da incerteza acadêmica sempre com um objetivo em comum: o avanço do saber.

Meus agradecimentos também contemplam todos os professores, titulares ou bolsistas, que lecionaram para mim durante todos esses anos. Profissionais incríveis, que se dedicaram a transmitir conhecimento mesmo em momentos de maiores

adversidades. Agradeço principalmente ao pós-doc Augusto Batisteli que permitiu o uso de suas aves de cativeiro para a realização de meus experimentos.

À minha família, o meu porto seguro entre as estrelas, cujo apoio incondicional e amor me manteve firme, mesmo quando as tempestades pareciam impossíveis de ultrapassar. Sou grato a minha Vó Lourdes por todo carinho e suporte que me proporcionou. Sou grato a minha mãe Rosiana pela ajuda e superação de todos os perrengues. Sou grato ao meu pai José Francisco pelo cuidado e auxílio em todas as minhas fases.

E, por fim, à Evolução, que, além de possibilitar o desenvolvimento do córtex cerebral — permitindo à nossa espécie ter consciência e perceber o que está além dos sentidos — também nos deu a capacidade de diferenciar as sequências dos ácidos nucleicos, detectadas em testes genéticos e moleculares. Este trabalho é dedicado a todos aqueles que, em sua breve passagem por este planeta, tiveram o privilégio de reconhecer a beleza intrínseca da vida.

Que nossas ações continuem a ecoar pelas galáxias, inspirando futuros imaginadores a buscar propósitos ainda maiores.

“Nós podemos acelerar ou postergar a chegada da morte, mas a vida sempre definhará. Ainda que um dia venhamos a ser reduzidos a partículas, nós ainda podemos alçar voos mais altos.” (MEI, 2023)

RESUMO

A dispersão de sementes por animais é um processo crucial para a manutenção de populações e comunidades florestais, contribuindo para a regeneração e diversidade das florestas. Esse processo permite que as sementes sejam transportadas para áreas distantes, favorecendo a colonização de novos territórios e a sobrevivência de diversas espécies vegetais. A análise de amostras fecais é uma abordagem promissora para investigar esse processo ecológico, seja por meio de métodos tradicionais de triagem ou através de técnicas moleculares. As ferramentas moleculares possibilitam a detecção de espécies e indivíduos, além de descrever comunidades e interações ecológicas em amostras com quantidades limitadas e baixa qualidade de DNA. No entanto, ao analisar a dieta de dispersores de sementes, a interpretação dos resultados depende de fatores como o tempo decorrido entre a alimentação e a defecação, além da quantidade de alimento consumido, ambos potencialmente influenciando o sucesso na detecção do DNA. Este projeto teve como objetivo otimizar os protocolos de extração e amplificação de DNA de frutos em amostras fecais de aves frugívoras. Para isso, foi realizado um estudo experimental em cativeiro com 30 Sabiás-barranco (*Turdus leucomelas*) alimentadas com goiaba (*Psidium guajava*). Investigamos como a taxa de detecção de DNA dos frutos varia em função do tempo transcorrido desde a alimentação e da quantidade de frutos consumidos. Os resultados mostraram que o tempo desde o consumo do fruto é um preditor significativo para a amplificação de DNA vegetal nas fezes das aves, enquanto a quantidade consumida não apresentou efeito relevante. Esses achados têm implicações para estudos de campo, indicando que, embora as técnicas moleculares sejam eficazes em detectar DNA vegetal mesmo em pequenas quantidades de fruto consumido, a probabilidade de sucesso é maior em amostras de fezes coletadas mais cedo, principalmente nas primeiras duas horas após a ingestão do fruto.

Palavras-chave: Aves frugívoras; Análise de dieta; Ecologia molecular; *Turdus leucomelas*; Marcadores microssatélite; *Psidium guajava*. Tempo de transição intestinal.

ABSTRACT

The study of animal diets is essential for understanding ecosystems and monitoring environmental changes, as it investigates feeding patterns and resource use by animals in natural environments. Seed dispersal by animals is a crucial process for the maintenance of forest populations and communities, contributing to forest regeneration and biodiversity. This process allows seeds to be transported to distant areas, promoting the colonization of new territories and the survival of various plant species. Fecal sample analysis is a promising approach to studying this ecological process, either through traditional screening methods or molecular techniques. Molecular tools enable the detection of species and individuals, as well as the description of communities and ecological interactions, even in samples with limited quantities and low-quality DNA. However, when studying the diet of seed dispersers, the interpretation of fecal sample analysis depends on factors such as the time elapsed between feeding and defecation, as well as the amount of food consumed, both of which influence DNA detection success. This project aimed to optimize protocols for DNA extraction and amplification of fruit from fecal samples of frugivorous birds. An experimental study was conducted in captivity with 30 Palebreasted Thrushes (*Turdus leucomelas*) fed guava (*Psidium guajava*). We investigated how the detection rate of fruit DNA varies according to the time elapsed since feeding and the amount of fruit consumed. The results showed that the time since fruit consumption is a significant predictor of plant DNA amplification in bird feces, while the amount of fruit consumed had no relevant effect. These findings have implications for field studies, indicating that although molecular approaches can detect plant DNA even in minimal amounts of consumed fruit, the likelihood of successful detection is higher in fresh fecal samples, especially within the first two hours after feeding.

Keywords: Frugivorous Birds; Diet Analysis; Molecular Ecology; *Turdus leucomelas*; Microsatellite Markers; *Psidium guajava*; Intestinal Transit Time.

Title in english: From Fruits to Feces: Detecting Plant DNA in Fecal Samples of Frugivorous Birds

LISTA DE ABREVIATURAS

GLMM	Modelo Generalizado Misto
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
AIC	Critério de Informação Akaike

SUMÁRIO

SUMÁRIO	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Organismos Modelo.....	15
3.1.1 <i>Turdus leucomelas</i>	15
3.1.2 <i>Psidium guajava</i>	16
3.2 Amostragem das fezes	17
3.2.1 <i>Animais em cativeiro</i>	17
3.2.2 <i>Oferecimento de fruto e coleta das fezes</i>	18
3.3 Análises de Laboratório.....	20
3.3.1 <i>Extração de DNA</i>	20
3.3.2 <i>PCR e visualização dos resultados</i>	21
3.3.3 <i>Eletroforese em Gel</i>	22
3.4 Análise de Dados	23
3.4.1 <i>Variáveis e Modelos</i>	23
3.4.2 <i>Comparação de Modelos</i>	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Seleção de Modelos.....	26
4.1.1 <i>A Relação entre Quantidade de Fruto Consumido e Detecção de DNA Vegetal</i> 26	
4.1.2 <i>Efeito do Tempo Após o Consumo na Amplificação de DNA</i>	27
5 DISCUSSÃO	28
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30

1 INTRODUÇÃO

O estudo da dieta animal consiste na investigação dos padrões de alimentação de animais em ambientes naturais, compreendendo as preferências alimentares, seleção de presas e a utilização de recursos dentro das comunidades biológicas (NIELSEN et al., 2018). Essa área de pesquisa é fundamental para a compreensão do funcionamento de um ecossistema, tendo implicações diretas na caracterização e composição de uma comunidade, fluxo de energia e estrutura de rede trófica (BOLNICK et al., 2011; REUM et al., 2019). Mudanças na composição da dieta animal podem refletir mudanças na disponibilidade de recursos e espécies de determinada paisagem (DUFFY et al., 2007). Sendo assim, a dieta animal é um indicador sensível das mudanças ambientais e pode ser utilizada como um importante instrumento de monitoramento ecológico (CRAMPTON et al., 2011).

Um tipo de dieta que é resultante de interações mutualísticas é a frugivoria. Se por um lado a frugivoria permite a alimentação e nutrição de animais, por outro pode desencadear um processo fundamental para o funcionamento de um ecossistema: a dispersão de sementes (GONZÁLEZ-VARO; ARROYO; JORDANO, 2014). Esse processo é responsável pela colonização, manutenção e expansão populacional de plantas, influenciando diretamente na demografia, distribuição espacial, estrutura genética e composição de comunidades em ambientes naturais ou modificados pelo homem (CÔRTEZ; URIARTE, 2013; JORDANO et al., 2007).

Para se investigar a dieta de animais frugívoros pode-se observar diretamente ou remotamente (i.e., por meio de armadilhas fotográficas) o forrageamento de espécies em ambientes naturais (PIZO, 2004) ou fazer análise de amostras fecais (ou conteúdo estomacal) (ANDO et al., 2020). A constatação das espécies consumidas a partir de amostras fecais pode ser feita de duas principais maneiras: 1) triagem e identificação visual de fragmentos dos itens alimentares (NIELSEN et al., 2018) e 2) análise do DNA dos remanescentes biológicos nas fezes (ANDO et al., 2020). Os métodos tradicionais permitem apenas uma identificação macroscópica dos restos não digeridos (por exemplo, partes de ossos, pelos, sementes) (LAYMAN et al., 2015). Já abordagem molecular apresenta inúmeras vantagens se comparada aos métodos tradicionais, além de possuir maior sensibilidade e precisão na identificação de espécies, ela é capaz de fornecer maior abrangência das espécies que compõem a dieta de um animal, mesmo sem que as estruturas da presa estejam preservadas nas

amostras (ANDO et al., 2020). Dentre as abordagens moleculares destaca-se o DNA *metabarcoding*, uma técnica molecular que utiliza marcadores universais cujas sequências curtas de DNA são altamente conservadas em organismos da mesma espécie, mas variáveis entre espécies distintas (SHUTT; TRIVEDI; NICHOLLS, 2021). Outros marcadores mais polimórficos, como microssatélites, podem ser utilizados para a identificação de gêneros e espécies de forma precisa. O marcador código de barra é usado em uma abordagem de sequenciamento de nova geração para identificar e distinguir simultaneamente múltiplas espécies presentes em uma amostra ambiental (como fezes)

As ferramentas moleculares são particularmente interessantes para caracterizar a biodiversidade em ambientes megadiversos e ricos em interações ecológicas. Porém, a aplicação dessas técnicas em regiões tropicais ainda enfrenta algumas dificuldades. Primeiramente, grande parte da alta diversidade de espécies ainda não é catalogada em repositórios genéticos (CARVALHO; CÔRTEZ, 2023), reduzindo a chance de identificação taxonômica de sequências de DNA encontradas. Além disso, os maiores níveis de umidade, temperatura e incidência de raios UV nos trópicos aceleram as taxas de degradação do DNA, dificultando a obtenção de sequências de qualidade (LUCAS et al., 2019). Todos esses fatores fazem com que essas técnicas sejam ainda pouco exploradas. Assim, raros são os estudos que utilizam ferramentas moleculares para caracterizar itens alimentares em fezes (GONZÁLEZ-VARO; ARROYO; JORDANO, 2014), especialmente nos neotrópicos (BAUS; MIÑO; MONGE, 2019). Surge assim, a necessidade de se padronizar esses métodos. Já existem alguns trabalhos que fazem isso com a detecção de DNA de insetos em fezes de aves para estudos em insetívoros (OEHM et al., 2011), mas ainda se conhece pouco sobre os fatores que influenciam a detecção de DNA vegetal em estudos de frugivoria.

Para poder interpretar os dados de composição de frutos nas amostras fecais, caracterizar a dieta dos frugívoros e discutir as implicações para a dispersão de sementes, é interessante termos outras informações sobre o uso das ferramentas moleculares na análise da dieta de animais frugívoros: 1) O DNA encontrado nas fezes reflete itens alimentares consumidos há quanto tempo? - O tempo é uma variável fundamental para a técnica forense, afinal, a cronologia interfere diretamente no tempo de passagem do item alimentar e degradação do mesmo no trato digestório dos

animais. Em estudos feitos com aves de cativeiro alimentadas com insetos a detecção de DNA de insetos aconteceu de 30 minutos até 4 horas depois da alimentação (OEHM et al., 2011). - Mas e para frutos, até quanto tempo após a ingestão é possível detectar o DNA em amostras fecais frescas? 2) A quantidade consumida do item alimentar pode influenciar na detecção de espécies em amostras fecais? - Em estudos feitos com aves insetívoras, a detecção via qPCR em fezes de predadores correlacionou positivamente ao peso úmido consumido pelo animal, além da proporção da espécie alvo com relação ao total das fezes (WEBER; LUNDGREN, 2009).

Esse presente trabalho, portanto, tem o intuito de avaliar o potencial de detecção de DNA vegetal em amostras fecais de aves frugívoras considerando o tempo e a quantidade de alimento ingerido. Por meio de um estudo experimental que simula um sistema simples de interação animal-planta, investigamos como tempo de transição intestinal e a quantidade de fruto consumido influenciam na detecção de DNA para pesquisas em ecologia (BOWLES et al., 2011). Entender os fatores que interferem na detecção de DNA em amostras fecais fornecerá conhecimento para outros estudos já em andamento no grupo de pesquisa com o objetivo de caracterizar a dieta de aves frugívoras e potencial de dispersão de sementes em ambientes sob restauração natural de mata atlântica. Além disso servirá para a otimização dos protocolos de extração já existentes, e ampliação da sua aplicação nos neotrópicos.

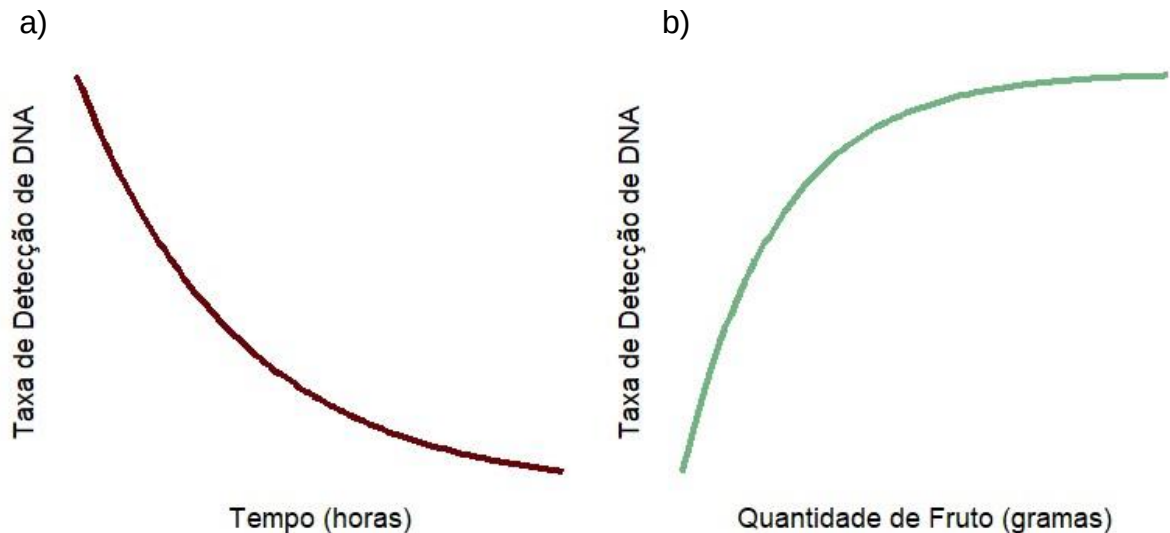
2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar a taxa de detecção de DNA vegetal em amostras de fezes de aves frugívoras, visando compreender como essa detecção é influenciada por dois fatores principais: 1) o tempo de transição intestinal e 2) a quantidade de fruto consumido pelas aves. Especificamente, buscamos responder às seguintes perguntas:

- a) **Como o tempo entre a alimentação e a evacuação das fezes afeta a taxa de detecção de DNA vegetal?** Hipotetizamos que a taxa de detecção de DNA vegetal nas fezes das aves frugívoras diminui à medida que o tempo entre a ingestão do fruto e a evacuação aumenta (Figura 1A). Isso se deve ao processo natural de degradação do DNA ao longo do tempo durante a passagem pelo trato digestivo e também pelo aumento da probabilidade dos resíduos do fruto já terem sido eliminados pelo sistema, o que reduziria a probabilidade de amplificação bem-sucedida.

- b) **Como a quantidade de fruto ingerido influencia a taxa de detecção de DNA nas fezes das aves?** Hipotetizamos que a taxa de detecção de DNA aumenta com a ingestão de maiores quantidades de fruto (Figura 1B). Isso se deve à maior disponibilidade de DNA do fruto nas fezes, aumentando o sucesso de amplificação dos marcadores moleculares.

Figura 1. Hipóteses gráficas acerca da detecção de DNA vegetal nas fezes em função do A) tempo de transição entre ingestão e defecação e B) quantidade de fruto ingerido.



Relação entre a taxa de detecção de DNA vegetal em fezes de aves frugívoras e duas variáveis explicativas. À esquerda, a curva mostra que a taxa de detecção de DNA diminui com o aumento do tempo entre ingestão e evacuação. À direita, a curva indica que a taxa de detecção aumenta com a quantidade de fruto consumido. (Elaborado pelo autor)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Organismos Modelo

Nesta pesquisa, foram utilizados **Sabiás-Barranco** (*Turdus leucomelas*) e **Goiaba** (*Psidium guajava*) para realizar experimentos controlados. O sabiá-barranco foi escolhido devido ao seu papel como dispersor de sementes e sua alimentação generalista, enquanto a goiaba foi selecionada como fruto modelo devido às suas características genéticas bem documentadas e facilidade de amplificação do DNA, além de ser um fruto amplamente consumido por aves e mamíferos.

3.1.1 *Turdus leucomelas*

Popularmente conhecido como sabiá-barranco, *Turdus leucomelas* Vieillot, 1818 (Aves: Turdidae) possui uma ampla distribuição por toda América do Sul e no

Brasil se encontra bem dispersa em todo território, possuindo sua maior densidade populacional na região Sudeste e Sul (NICOLÁS LUCIANO RUIZ et al., 2017). É uma espécie que se adapta bem a ambientes artificiais e criados de forma antrópica, além de ser frequentemente encontrada em matas ciliares, matas secas e cerradões, (NICOLÁS LUCIANO RUIZ et al., 2017) Devido sua abundância, distribuição e tendências generalistas, esta ave comumente é selecionada para testes e aplicação de modelos em estudos de variação reprodutiva, climática e de habitat, bem como pesquisas referentes a comportamento animal, dieta e dispersão de sementes (DAVANÇO et al., 2013). O comprimento desses pássaros é de aproximadamente 22-23 cm e o peso médio varia de $69,1 \pm 43.3$ g para ambos os sexos (FLORESTE; FLORISVALDO BATISTELI; PIZO, 2021). O canto é a única característica que diferencia o sexo, sendo exclusivamente realizado pelos machos (NICOLÁS LUCIANO RUIZ et al., 2017).

3.1.2 *Psidium guajava*

A goiabeira, *Psidium guajava* Lineu, 1753 (Magnoliopsida: Myrtaceae) foi introduzida e naturalizada em várias florestas de sucessão secundária e fragmentos de restauração natural (J. V. KAMATH et al., 2014). Embora a história evolutiva e de domesticação da espécie não esteja totalmente descrita, há indícios de que a disseminação extensiva de *P. guajava* está relacionada à movimentação dos povos pré-colombianos (ARÉVALO-MARÍN et al., 2021). Atualmente, a espécie está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do continente americano, abrangendo desde o México e as ilhas do Caribe até a Argentina e o Uruguai (ARÉVALO-MARÍN et al., 2021). A goiabeira (*Psidium guajava*) é uma árvore de cultivo que atinge cerca de 10 metros de altura e floresce em torno dos 4 anos. Em áreas remanescentes e de regeneração natural, pode chegar a 20 metros de altura e possui ramificação acentuada (DA SILVA et al., 2021). A época de frutificação da goiabeira varia de acordo com a região e as condições climáticas, mas geralmente ocorre no verão e outono, com seu pico de produção nos meses de dezembro à março (J. V. KAMATH et al., 2014). Cada fruto contém de 100 a 500 sementes de aproximadamente 3 a 5 mm de diâmetro (J. V. KAMATH et al., 2014). A dispersão da semente de *P. guajava* é predominantemente feita por zoocoria e antropocoria

(ARÉVALO-MARÍN et al., 2021; BARBOSA DA SILVA et al., 2013). Além disso, a variedade de habitats das aves dispersoras, potencializa o alcance da goiabeira, sendo dispersa por aves tanto de ambientes florestais quanto também de áreas abertas (BARBOSA DA SILVA et al., 2013).

Figura 2. Macho adulto de Saíra-amarelo (*Stilpnia cayana*) se alimentando do fruto de goiaba (*Psidium guajava*) QUENÓ, Laurent (2011). [WA307343 *Stilpnia cayana* (Linnaeus, 1766)]. Wiki Aves - A Enciclopédia de Aves do Brasil.



Direito de uso de imagem garantido pelo autor [Laurent Roger Marie Quenó](#) em 08/09/2022

3.2 Amostragem das fezes

3.2.1 Animais em cativeiro

Foi utilizada uma coleção com 30 indivíduos de *T. leucomelas* cativos no departamento de Herpetologia da UNESP câmpus de Rio Claro, localizados no Jacarezário, dentro do Prédio de Herpetologia. O responsável pela coleção e colaborador do nosso projeto é o pesquisador Dr. Augusto Florisvaldo Bastistelli, supervisionado pelo professor Marco Aurélio Pizo. A manutenção e cuidado com as aves ocorreu diariamente, sendo que as gaiolas possuíam a parte inferior removível para facilitar a coleta das fezes e são compostas por metal esterilizado. Cada gaiola tinha uma haste de ferro na lateral para a fácil manipulação do alimento oferecido a cada pássaro. A certificação para o uso desses animais em nossa pesquisa foi obtida no comitê de ética no uso de animais de vida livre - CEUA IB UNESP CRC 05/2022.

Todos os procedimentos de pesquisa serão realizados na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), no Campus de Rio Claro. Cada indivíduo da coleção possui uma cabine individual com descrição de identificação, sexo, tamanho do tarso, peso e origem de captura (rural ou urbano), informações que serão consideradas na análise de resultados.

Esse trabalho fez parte de um projeto financiado pela FAPESP/NWO ReSeed (Restoration of Seed Dispersal): “The contribution of plant-animal interactions to biodiversity and ecosystem restoration of the Atlantic Forest” (FAPESP-NWO # 2018/19011-6) e está associado ao projeto de mestrado de Carina Motta “Seed dispersal and plant diet of fruit-eating birds in secondary forest fragments” (FAPESP # 2021/03467-3).

Figura 3. Exemplar de ave capturada (*Turdus leucomelas*) dentro da gaiola se alimentando de goiaba (*Psidium guajava*)



GODOY, Vinicius (2022). Fotografia tirada sob autorização do pesquisador Augusto Batisteli.

3.2.2 Oferecimento de fruto e coleta das fezes

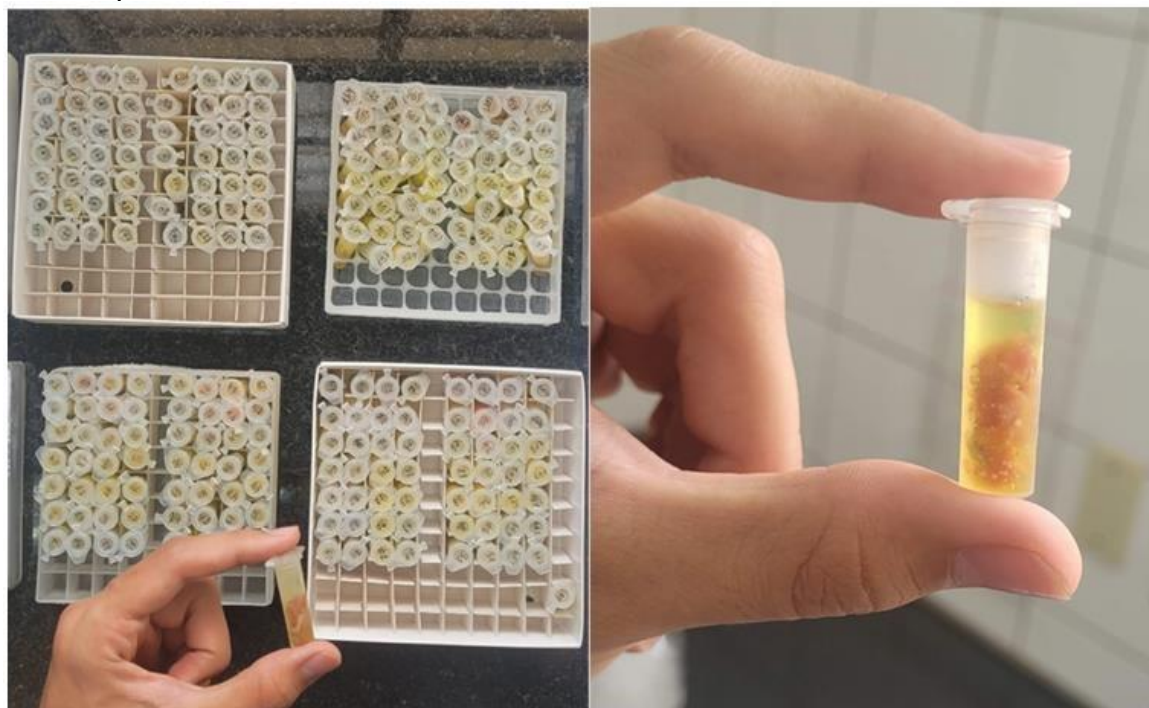
Os frutos de goiaba foram obtidos em supermercado e também coletados *in situ* nas áreas de estudo do projeto ReSeeD localizadas na bacia do rio Corumbataí no Estado de São Paulo, em suas devidas épocas de frutificação. O oferecimento de

fruto e coleta de fezes foi feito para um total de 32 aves a partir do seguinte procedimento durante novembro de 2023 e janeiro de 2024:

- a) Oito indivíduos foram selecionados por dia para realizar a amostragem. O experimento durou um total de 5 horas por dia para cada um dos oito sabiás. Ao início do experimento a bandeja da gaiola foi esterilizada com o uso de hipoclorito;
- b) O fruto de *P. guajava* foi cortado em pedaços de aproximadamente 40g que foram precisamente pesados antes de serem oferecidos para os indivíduos de *T. leucomelas*;
- c) O pedaço do fruto foi ofertado sozinho, no início da manhã, com as aves ainda em jejum (70 minutos). Além da porção de goiaba, as aves tiveram acesso à água *ad libitum*;
- d) A partir da primeira bicada, cronometramos cada nova atividade de ingestão ou fezes.
- e) Após 1 hora da primeira ingestão, o fruto restante foi retirado do experimento e pesado novamente para cálculo da **quantidade de fruto consumida**. O fruto não retornou para a gaiola;
- f) As massas fecais evacuadas nas bandejas da gaiola foram coletadas e preservadas em álcool 99%. Os conteúdos coletados dentro de cada intervalo de 1 hora a partir da primeira ingestão foram colocados no mesmo tubo de 2 ml. Obtendo assim uma amostra combinada a cada hora a partir do primeiro consumo. Cada intervalo de hora, portanto, indica o **tempo de transição intestinal**. Ao final de cada intervalo de uma hora, as bandejas foram esterilizadas;
- g) As coletas de fezes ocorreram a cada hora até 6 horas depois do primeiro consumo. Além disso, fizemos uma única coleta após 24h e outra após 48h da primeira bicada.

Sendo assim o tamanho amostral foi igual a **224** (32 indivíduos por 7 intervalos de tempo). Além disso, incluímos uma amostra de controle negativo coletado de uma ave que não consumiu goiaba durante os experimentos.

Figura 4. As 225 amostras de fezes de *Turdus leucomelas*, comportadas em frascos de 2 ml, conservadas em álcool absoluto e armazenadas no congelador a uma temperatura de -20°C.



Elaborado pelo autor

3.3 Análises de Laboratório

3.3.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA vegetal utilizamos um protocolo modificado do método CTAB (clorofórmio + buffer)(ABOUL-MAATY; ORABY, 2019; SCHENK et al., 2023). Após a extração inicial do DNA foi realizada uma análise quantitativa do DNA genômico através do gel de agarose de concentração 1,5% (Biotium) submetido ao processo de eletroforese, utilizando 2uL de amostra do DNA extraído e 2uL de buffer (gel red + loading dye). O gel foi visualizado contra um transluminador UV e a integridade do DNA genômico foi avaliada a partir da comparação com as bandas do Ladder Promega® de 100 pb a 1000 pb. Ao se atingir a quantidade suficiente de DNA nas amostras, o DNA foi diluído a uma concentração de aproximadamente 5ng/μl e encaminhado para uma reação polimerase em cadeia (PCR) para amplificar a região específica do DNA vegetal para *Psidium guajava* (ver marcador molecular na seção abaixo). Ao decorrer da pesquisa, foi necessário otimizar o protocolo de extração de DNA, testando varias metodologias e reagentes, esses dados podem ser encontrados no material suplementar ao fim do trabalho.

3.3.2 PCR e visualização dos resultados

As análises moleculares buscaram utilizar um marcador microssatélite (SSR) específico para *Psidium guajava*, priorizando assim otimizar os protocolos e testar a eficácia dessa metodologia para identificação da interação entre uma ave frugívora e uma espécie (ou gênero) vegetal.

Marcador Microssatélite (SSR) o locus mPgCIR03 com aproximadamente 158 pb (RAI; PHULWARIA; SHEKHAWAT, 2013)

O objetivo desse marcador é fazer uma identificação mais precisa para *Psidium guajava*. Esse marcador tem a vantagem de ser altamente polimórfico, codominante e fácil de amplificar por PCR. Ele também permite a identificação de híbridos e a estimativa de parâmetros genéticos como heterozigosidade, diversidade e fluxo gênico (RISTERUCCI et al., 2005). Os primers a serem utilizados para amplificar a região mPgCIR03 são *forward*: 5' TTGTGGCTTGATTTC 3' e *reverse*: 5' TCGTTTAGAGGACATTCT

3'(RISTERUCCI et al., 2005). Os reagentes da PCR estão descritos na Tabela 1. As amostras foram submetidas a PCR por 35 ciclos [94 °C (30 s), 52 °C (45 s), 72 °C (1 min 30 s); e um alongamento final a 72 °C (8 min)].

Os equipamentos e utensílios necessários para análise molecular tais como termociclador, freezers, cubas para eletroforese em gel, incubadora, centrífuga, pipetas, balanças e materiais descartáveis de laboratório foram os disponíveis no Departamento de Biodiversidade, mais especificamente no Laboratório de Ecologia Molecular – Coordenado pela Professora Marina Côrtes.

Tabela 1 – Lista de Reagentes para PCR para amplificação do Marcador microssatélite (SSR)

soluções	µL
tampão 10X	1,25
MgCl ₂ 25 mM	1,25
dNTP 10 mM	0,8
Primer F 10 mM	0,5
Primer R 10 mM	0,5

Taq Platinum	0,2
BSA	0,2
DNA	3
Água MilliQ	4,8
volume total	12,5

Elaborado pelo Autor (2024)

3.3.3 Eletroforese em Gel

Também foi estimado o tamanho do fragmento de DNA através do Low DNA Mass Ladder da Invitrogen®. Os procedimentos foram os mesmos realizados para a quantificação: gel de agarose de concentração 1,5% (Biotium) submetido ao processo de eletroforese, utilizando 2uL de amostra do DNA extraído e 2uL de buffer (gel red + loading dye). O gel foi visualizado contra um transluminador UV e a integridade do DNA genômico foi avaliada a partir da comparação com as bandas do Low DNA Ladder. O sucesso da amplificação foi considerado quando visualizou-se a banda no gel, gerando dados de presença e ausência de amplificação para cada unidade amostral.

Figura 5. Espaçamento do Ladder Low Mass da Invitrogen, refletindo tanto peso molecular quanto o tamanho em pares de bases dos fragmentos de DNA.

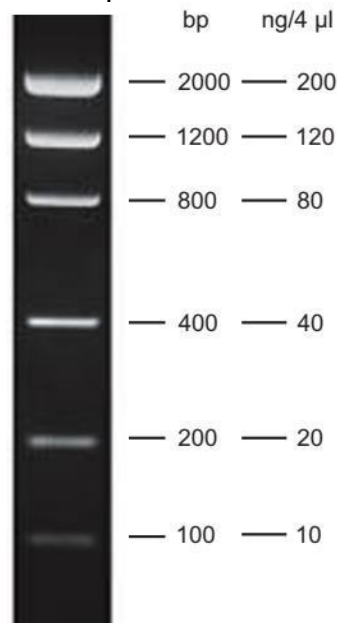


Imagem gerada pela empresa responsável Invitrogen (2016)

3.4 Análise de Dados

3.4.1 Variáveis e Modelos

Após a coleta de dados, foi realizada uma avaliação quantitativa acerca da probabilidade de detectar DNA vegetal em fezes de aves em função das seguintes variáveis preditoras: 1) tempo de transição intestinal por intervalo de hora (1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 e 48h) e da 2) quantidade de fruto consumido durante 1 hora de oferecimento. A presença ou ausência de bandas no gel após a eletroforese resultou em uma distribuição binomial e, para tanto, foi utilizado um modelo generalizado misto (GLMM) usando a família binomial de distribuição de erros (JOHNSON et al., 2015). Os indivíduos (repetidos em dias distintos) foram incluídos como efeito aleatório no modelo. Assim leva-se em conta e controla-se o efeito da aleatoriedade individual de cada ave.

3.4.2 Comparação de Modelos

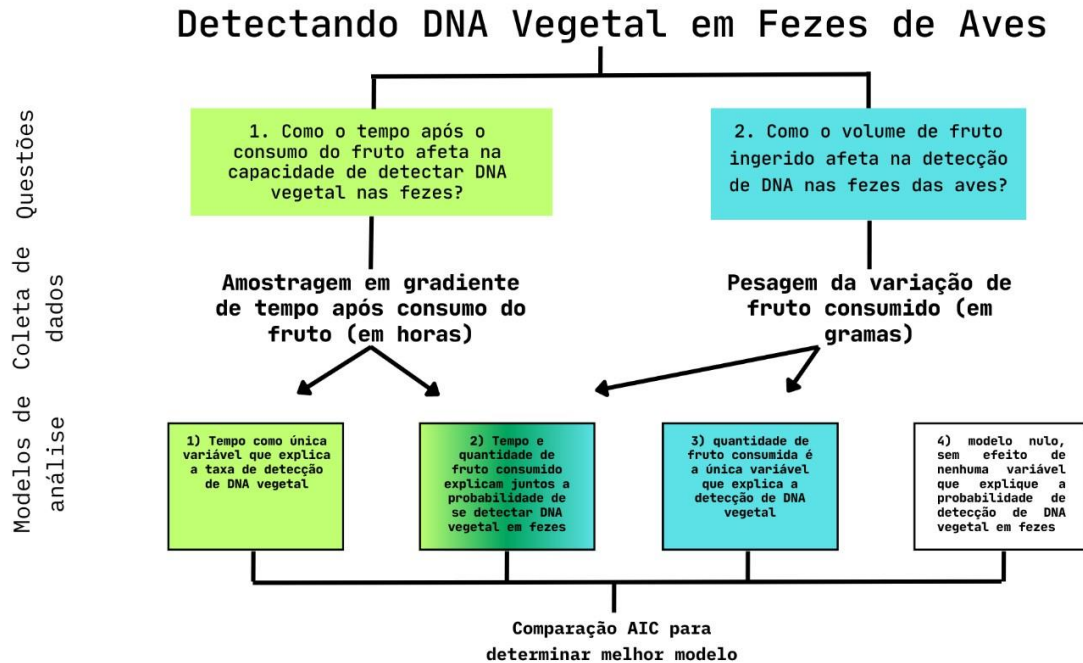
Usando GLMMs foram construídos quatro hipóteses estatísticas para explicar a variável resposta (probabilidade de detecção de DNA vegetal):

1. **Modelo Completo:** Este modelo inclui todas as variáveis preditoras relevantes, considerando tanto o tempo após o consumo quanto a quantidade de fruto consumido. Este modelo permite avaliar a interação e o impacto conjunto de ambas as variáveis na taxa de detecção.
2. **Modelo Tempo:** Este modelo considera apenas o tempo após o consumo como preditor da taxa de detecção.
3. **Modelo Quantidade:** Este modelo utiliza apenas a quantidade de fruto consumido como variável preditora.
4. **Modelo Nulo:** Este modelo não inclui nenhuma variável preditora, servindo como referência para avaliar o poder explicativo dos outros modelos. Ele assume que a taxa de detecção não é explicada pelas variáveis analisadas.

Ao fim, portanto, foi selecionado o melhor modelo utilizando uma comparação de AICc (critério de informação de Akaike corrigido para pequenas amostras)

(BURNHAM; ANDERSON; HUYVAERT, 2011). Modelos foram ranqueados a partir dos menores valores de AICc sendo que modelos com Delta AICc menor do que 2 foram considerados igualmente plausíveis.

Figura 6. Panorama do desenho experimental, com respectivas questões, amostragem de dados e modelos estatísticos.

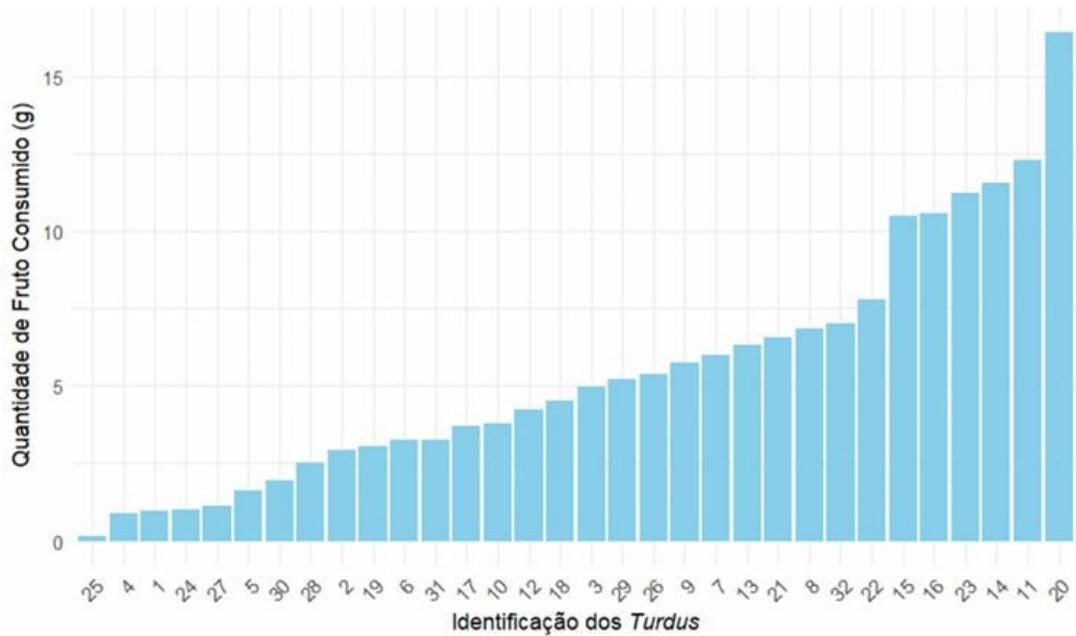


Elaborado pelo autor.

4 RESULTADOS

Durante o experimento, foram coletadas amostras de fezes de sabiá barranco (*Turdus leucomelas*) em intervalos de tempo predefinidos após a alimentação com goiabas (*Psidium guajava*). As coletas ocorreram como planejado, abrangendo todos os intervalos de tempo estipulados: 1, 2, 3, 4, 5, 24 e 48 horas após o consumo. Todas as amostras foram devidamente processadas, garantindo uma cobertura completa do período pós-consumo. A Figura 7 ilustra a variação na quantidade de fruto consumido por cada ave, com valores variando de 0,13 até 16,45 gramas. A distribuição das amostras foi consistente ao longo dos intervalos de tempo, permitindo uma avaliação robusta dos efeitos do tempo e da quantidade de fruto sobre a detecção de DNA vegetal.

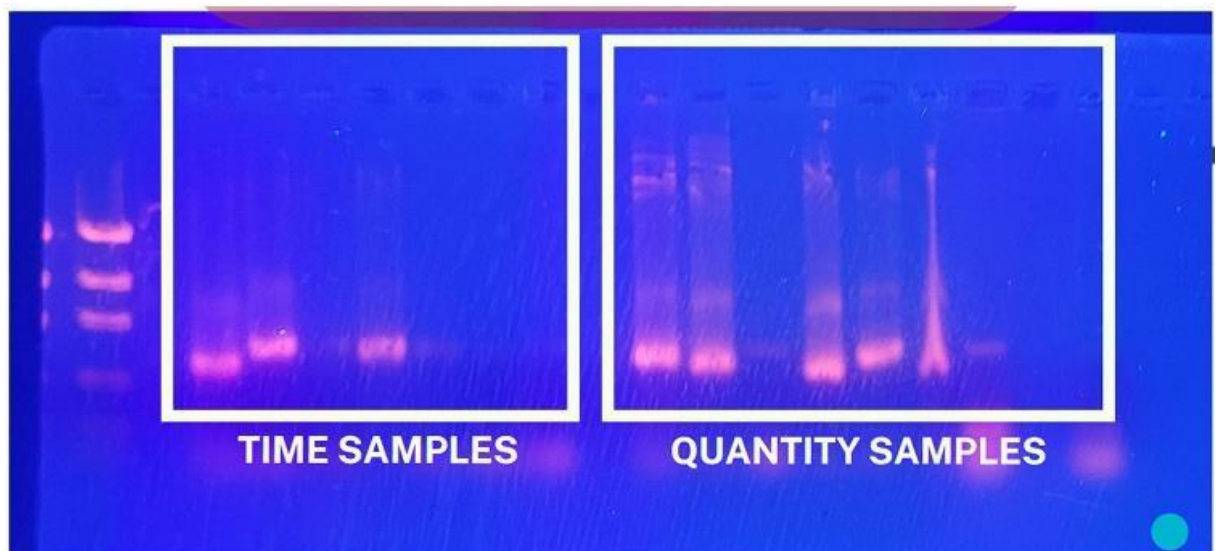
Figura 7. Consumo total de goiaba (*Psidium guajava*) para cada indivíduo testado de Sabiá-barranco (*Turdus leucomelas*) em cativeiro. Os indivíduos estão ordenados de maneira crescente de acordo com quantidade consumida de polpa.



Elaborado pelo autor

Além disso, a eficácia da extração e amplificação do DNA vegetal foi verificada por meio de gel de eletroforese. A Figura 8 apresenta um exemplo de gel, demonstrando o sucesso da amplificação de microssatélites. A nítida presença de bandas em múltiplas amostras confirma a qualidade do DNA extraído, assim como a amplificação eficiente utilizando primers específicos para loci microssatélites.

Figura 8. Fotodocumentação exemplo do resultado das amplificações por PCR.



A imagem mostra um gel de agarose a 1,5% corado com Gel Red. Na extremidade esquerda, encontra-se o Low Mass Ladder, utilizado como referência para estimativa da concentração de DNA. O quadrado à esquerda exibe as amostras de DNA referentes à variação temporal de um único indivíduo, destacando as diferenças na amplificação do DNA ao longo do tempo. Já o quadrado à direita apresenta as amostras da primeira hora pós-

consumo de diferentes indivíduos, os quais ingeriram quantidades variadas de *Psidium guajava*. (elaborado pelo autor)

4.1 Seleção de Modelos

A comparação entre os modelos indicou que o tempo após o consumo é o preditor mais significativo da taxa de detecção de DNA, como visto em trabalhos que utilizaram aves insetívoras como modelo (OEHM et al., 2011). A quantidade de fruto consumido, por outro lado, não contribuiu de forma significativa para a explicação da variabilidade na detecção de DNA quando analisada isoladamente ou em conjunto com o tempo (**Tabela 2**). Essas análises confirmam a importância do tempo como um fator crítico na detecção de DNA e reforçam a necessidade de considerar cuidadosamente a temporalidade na coleta de amostras em estudos ecológicos.

Tabela 2 – Resultados da Seleção de Modelos Baseada no Critério de Informação Akaike Corrigido (AICc)

	Variável	K	AIC	Delta_AIC	AICcWt
Modelo 2	Tempo	3	282,10	0,00	0,71
Modelo 1	Tempo + Quantidade	4	283,31	1,80	0,29
Modelo 3	Quantidade de Fruto	3	306.24	24,14	0,00
Modelo 4	Nulo	2	304.35	22,25	0,00

A tabela apresenta os resultados da seleção de modelos utilizando o AICc. O Modelo 2, que considera apenas o tempo como variável explicativa para amplificação de DNA, foi selecionado como o mais parcimonioso, com o menor valor de Delta AICc e o maior peso (AICcWt = 0,71). O Modelo 3 considera a quantidade de fruto consumido, enquanto o Modelo 4 é o nulo (somente efeitos aleatórios). O Modelo 1 é o completo, com todas as variáveis. Valores menores de Delta AICc indicam melhor ajuste ao conjunto de dados

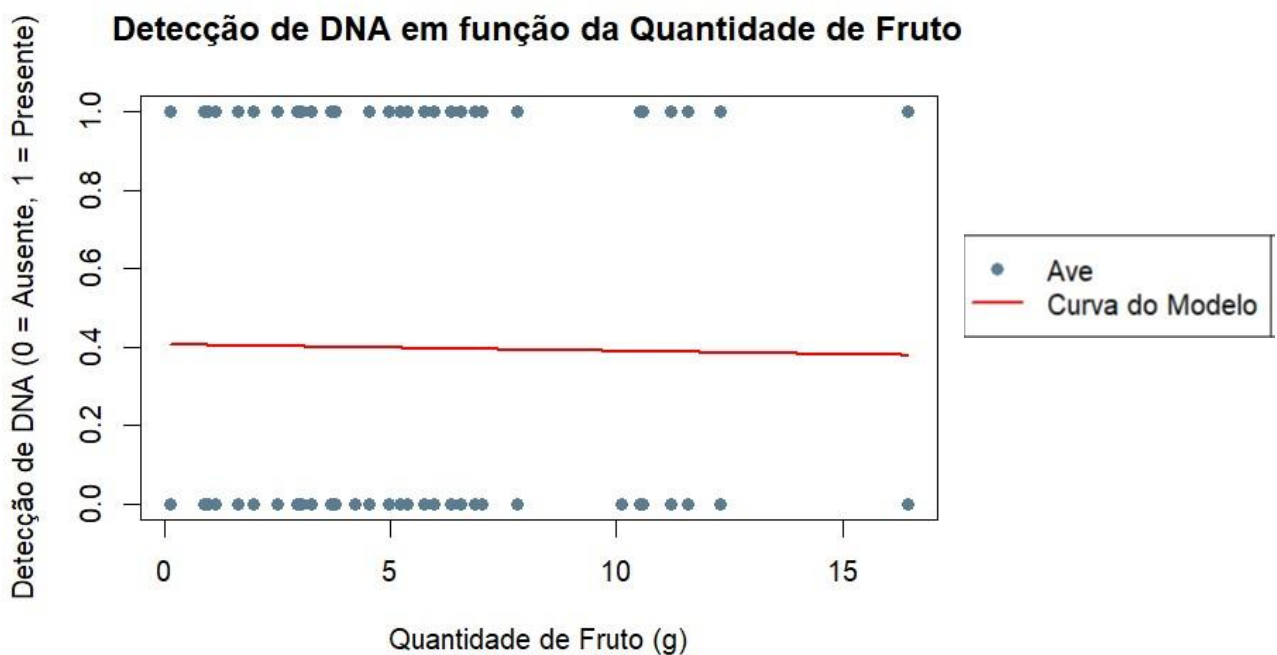
Fonte: Elaborado pelo autor

4.1.1 A Relação entre Quantidade de Fruto Consumido e Detecção de DNA Vegetal

Um dos principais objetivos deste estudo foi avaliar se a quantidade de fruto consumido influenciava a probabilidade de detecção de DNA vegetal nas fezes das aves frugívoras. Os resultados indicaram que a taxa de detecção de DNA não

apresentou uma relação linear clara com a quantidade de fruto consumido (Figura 9). A inconsistência nos padrões de detecção sugere que a quantidade de fruto consumido não é um fator determinante para a probabilidade de detecção de DNA vegetal nas fezes das aves.

Figura 9. Gráfico de distribuição entre quantidade de fruto consumido e Taxa de detecção de DNA. Os dados de quantidade de fruto consumido refletem a ingestão durante a primeira hora após a primeira bicada na goiaba.

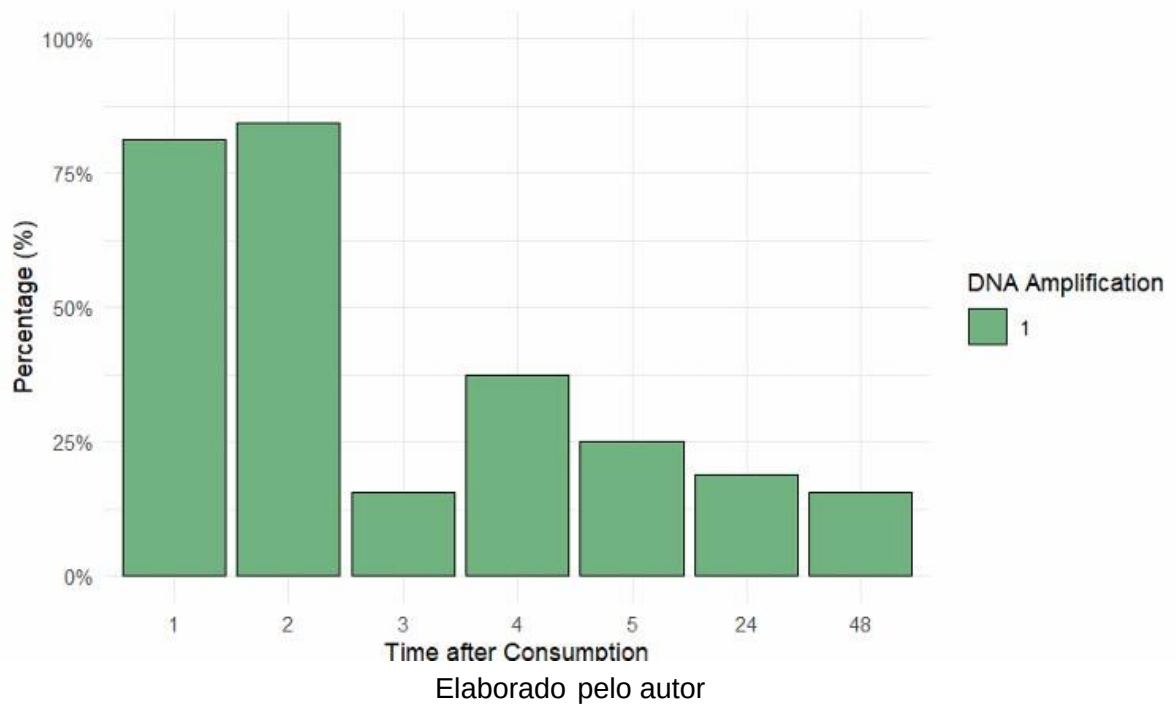


Elaborado pelo Autor

4.1.2 Efeito do Tempo Após o Consumo na Amplificação de DNA

Outro aspecto importante investigado foi o impacto do tempo decorrido após o consumo do fruto na detecção de DNA vegetal. A análise foi realizada para intervalos de tempo específicos: 1, 2, 3, 4, 5, 24, e 48 horas após o consumo. Os resultados, mostraram uma clara diminuição na taxa de amplificação de DNA vegetal com o aumento do tempo após o consumo (Figura 10). A maior taxa de amplificação foi observada nas primeiras duas horas (acima de 75%), após as quais a taxa de detecção caiu drasticamente. A partir de 3 horas, a taxa de amplificação caiu para 25%, e continuou a diminuir até atingir aproximadamente 15% após 24 e 48 horas

Figura 10. Gráfico de distribuição entre tempo após consumo dos frutos em horas e a Taxa de detecção de DNA em %. Os valores após as 2 primeiras horas caem acentuadamente.



5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sobre a detecção de DNA vegetal em fezes de aves frugívoras oferecem novas perspectivas para a compreensão dos processos de dispersão de sementes. A análise revelou que, embora a quantidade de fruto consumido não tenha demonstrado uma relação linear clara com a taxa de detecção de DNA, o tempo decorrido após o consumo emergiu como um preditor significativo da amplificação de DNA. Esses achados estão alinhados com a literatura existente, que destaca a importância da temporalidade na viabilidade do DNA em fezes (GONZÁLEZ-VARO; ARROYO; JORDANO, 2014). Isso indica que o tempo é um fator crítico a ser considerado em estudos que buscam entender e interpretar a dinâmica de dispersão de sementes por frugívoros.

Adicionalmente, a utilização de técnicas de *DNA microssatélite* demonstrou ser uma ferramenta valiosa na identificação das espécies de dispersores envolvidas em eventos de dispersão de sementes. Os protocolos de *DNA microssatélite* aplicados a sementes dispersadas por aves permitem uma quantificação mais precisa das interações entre frugívoros e a dinâmica de dispersão de sementes em diferentes microhabitats. Essa abordagem não invasiva não apenas facilita a identificação das

espécies de frugívoros responsáveis pela dispersão, mas também possibilita a avaliação da eficácia da dispersão de sementes em escala individual, algo que estudos tradicionais muitas vezes não conseguem alcançar(O D O, 2001).

Os frugívoros são componentes críticos para a regeneração da vegetação e, em específico, em programas que visam restaurar ou recuperar ecossistemas degradados, pois atuam como dispersores de sementes. Assim, o conhecimento sobre as relações tróficas entre aves e plantas é essencial na avaliação da eficácia dos processos de restauração. Tradicionalmente, a dieta dos frugívoros é caracterizada pela identificação microscópica de resíduos vegetais nas fezes, o que é demorado, requer conhecimento botânico e não pode ser usado para fragmentos que carecem de características morfológicas detectáveis (por exemplo, sementes e cascas fragmentadas). A pesquisa sobre o uso de *DNA barcoding* como uma ferramenta universal para caracterizar rapidamente a dieta do bispo-eurasiático (*Sylvia atricapilla*) demonstra o potencial da técnica para monitorar a eficácia do plantio em projetos de restauração e avaliar a diversidade de plantas potencialmente dispersas(PAREJO-FARNÉS et al., 2018).

Os próximos passos deste estudo incluem o sequenciamento via metabarcoding das amostras que amplificaram, especialmente aquelas que mostraram amplificação significativa após um período prolongado desde o consumo. Uma limitação desse método está relacionada à estipulação da abundância de alimento disponível e consumido, o que pode impactar a interpretação dos dados. É importante ressaltar que os dados obtidos otimizam os protocolos de extração e indicam que estudos que utilizam essa abordagem devem considerar que os dados refletem melhor os alimentos consumidos nas últimas horas. Por isso, é fundamental coletar amostras próximo ao horário de forrageamento das aves. Além disso, os resultados mostram que, independentemente da quantidade de fruto consumido, a interação entre frugívoros e a dispersão de sementes consegue ser detectada, o que fortalece a validade e a aplicabilidade deste método (WEBER; LUNDGREN, 2009).

As implicações deste estudo para a conservação são significativas. Compreender como diferentes frugívoros contribuem para a dispersão de sementes e como suas preferências alimentares podem afetar a dinâmica da vegetação local é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de conservação. A identificação das espécies dispersoras pode informar práticas de manejo que visem a conservação

de aves frugívoras e seus habitats, especialmente em ecossistemas ameaçados (GALIMBERTI et al., 2016).

Além disso, ao empregar análises genéticas de amostras fecais ambientais, é possível identificar as espécies e indivíduos que atuam como dispersores de sementes, contribuindo para um entendimento mais abrangente das interações entre plantas e frugívoros (PAREJO-FARNÉS et al., 2018). A combinação de *DNA barcoding* e microsátélites permite a avaliação da variabilidade genética das populações de dispersores, facilitando a análise da dinâmica de dispersão e os efeitos de estratégias de restauração.

Por fim, este estudo destaca a relevância das técnicas moleculares na ecologia moderna, fornecendo uma ponte entre frugivoria e padrões de deposição de sementes. A capacidade de relacionar a identidade das espécies dispersoras com características de plantas e fatores ambientais é essencial para uma compreensão mais holística da dinâmica dos ecossistemas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o tempo decorrido após o consumo do fruto é um fator determinante na detecção de DNA vegetal nas fezes das aves, enquanto a quantidade de fruto consumido não mostra uma relação consistente com a taxa de detecção. Além disso, a variação observada entre as diferentes aves (efeitos aleatórios) também deve ser considerada ao interpretar os resultados, pois pode introduzir variações adicionais na detecção de DNA que não são diretamente relacionadas aos fatores analisados.

Essas conclusões têm implicações importantes para estudos ecológicos que utilizam a detecção de DNA por marcadores moleculares em amostras fecais para entender as dietas e padrões de alimentação de aves frugívoras. Recomenda-se que amostras de fezes sejam coletadas o mais rapidamente possível após o consumo de frutos para maximizar a eficiência da detecção de DNA, e que a quantidade de fruto consumido seja considerada um fator menos relevante para este fim. Além disso, a detecção ocorre mesmo em quantidades ínfimas de fruto consumido, o que aponta uma acurácia no uso desses marcadores para estudos ecológicos com abordagem molecular.

REFERÊNCIAS

ABOUL-MAATY, N. A.-F.; ORABY, H. A.-S. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, dez. 2019.

ANDO, H. et al. **Methodological trends and perspectives of animal dietary studies by noninvasive fecal DNA metabarcoding**. **Environmental DNA** Blackwell Publishing Inc., , 1 out. 2020.

ARÉVALO-MARÍN, E. et al. **The Taming of Psidium guajava: Natural and Cultural History of a Neotropical Fruit**. **Frontiers in Plant Science** Frontiers Media S.A., , 28 set. 2021.

BARBOSA DA SILVA, J. C. et al. Dispersão por aves de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) em ambiente ripário na bacia do rio Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 195, 19 dez. 2013.

BAUS, I.; MIÑO, C. I.; MONGE, O. Current trends in the application of non-invasive genetic sampling to study Neotropical birds: Uses, goals, and conservation potential. **Avian Biology Research**, v. 12, n. 4, p. 125–132, 1 nov. 2019.

BOLNICK, D. I. et al. **Why intraspecific trait variation matters in community ecology**. **Trends in Ecology and Evolution**, abr. 2011.

BOWLES, E. et al. Proportion of prey consumed can be determined from faecal DNA using real-time PCR. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 3, p. 530–540, maio 2011.

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R.; HUYVAERT, K. P. **AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: Some background, observations, and comparisons**. **Behavioral Ecology and Sociobiology** Springer Verlag, , 1 jan. 2011.

CARVALHO, C. DA S.; CÔRTEZ, M. C. Chapter 6 Landscape genetics in the Neotropics. In: **Conservation Genetics in Neotropics**. [s.l.] Conservation Genetics in Neotropics, 2023. v. 1.

CÔRTEZ, M. C.; URIARTE, M. Integrating frugivory and animal movement: A review of the evidence and implications for scaling seed dispersal. **Biological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 255–272, maio 2013.

CRAMPTON, L. H. et al. Food abundance determines distribution and density of a frugivorous bird across seasons. **Oikos**, v. 120, n. 1, p. 65–76, jan. 2011.

DA SILVA, C. et al. Can guava monocultures (*Psidium guajava* L.) function as refuge for bird conservation? **Neotropical Biology and Conservation**, v. 16, n. 4, p. 475–491, 2021.

DAVANÇO, P. V et al. **BREEDING LIFE-HISTORY TRAITS OF THE PALE-BREASTED THRUSH (TURDUS LEUCOMELAS) IN SOUTHEASTERN BRAZIL**. [s.l: s.n.].

DUFFY, J. E. et al. **The functional role of biodiversity in ecosystems: Incorporating trophic complexity**. **Ecology Letters**, jun. 2007.

FLORESTE, F. R.; FLORISVALDO BATISTELI, A.; PIZO, M. A. Sex-specific seasonal body mass variation in the Pale-breasted Thrush (*Turdus leucomelas*). **Ornithology Research**, v. 29, p. 84–88, 2021.

GALIMBERTI, A. et al. Evaluating the efficacy of restoration plantings through DNA barcoding of frugivorous bird diets. **Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology**, v. 30, n. 4, p. 763–773, 1 ago. 2016.

GONZÁLEZ-VARO, J. P.; ARROYO, J. M.; JORDANO, P. Who dispersed the seeds? The use of DNA barcoding in frugivory and seed dispersal studies. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 5, n. 8, p. 806–814, 2014.

J. V. KAMATH et al. *Psidium guajava* L: A review. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 2, p. 9–12, 2014.

JOHNSON, P. C. D. et al. Power analysis for generalized linear mixed models in ecology and evolution. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 2, p. 133–142, 1 fev. 2015.

JORDANO, P. et al. **Differential contribution of frugivores to complex seed dispersal patterns**PNAS. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0606793104>.

LAYMAN, C. A. et al. **A primer on the history of food web ecology: Fundamental contributions of fourteen researchers.** **Food Webs**Elsevier Inc., , 1 set. 2015.

LUCAS, M. S. et al. Optimized protocol to isolate high quality genomic DNA from different tissues of a palm species. **Hoehnea**, v. 46, n. 2, 2019.

MEI, R. **Honkai Star Rail**. miHoYo, , 2023.

NICOLÁS LUCIANO RUIZ et al. **Breeding biology of Pale-breasted Thrush *Turdus leucomelas*** Ruiz et al. [s.l: s.n.].

NIELSEN, J. M. et al. **Diet tracing in ecology: Method comparison and selection.** **Methods in Ecology and Evolution**British Ecological Society, , 1 fev. 2018.

O D O, J. O. S. É. A. G. **Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites**Molecular Ecology. [s.l: s.n.].

OEHM, J. et al. Molecular scatology: How to improve prey DNA detection success in avian faeces? **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 4, p. 620–628, jul. 2011.

PAREJO-FARNÉS, C. et al. From species to individuals: combining barcoding and microsatellite analyses from non-invasive samples in plant ecology studies. **Plant Ecology**, v. 219, n. 10, p. 1151–1158, 1 out. 2018.

PIZO, M. A. **FRUGIVORY AND HABITAT USE BY FRUIT-EATING BIRDS IN A FRAGMENTED LANDSCAPE OF SOUTHEAST BRAZIL**. [s.l: s.n.].

RAI, M. K.; PHULWARIA, M.; SHEKHAWAT, N. S. Transferability of simple sequence repeat (SSR) markers developed in guava (*Psidium guajava* L.) to four Myrtaceae species. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 8, p. 5067–5071, ago. 2013.

REUM, J. C. P. et al. Species-specific ontogenetic diet shifts attenuate trophic cascades and lengthen food chains in exploited ecosystems. **Oikos**, v. 128, n. 7, p. 1051–1064, 1 jul. 2019.

RISTERUCCI, A. M. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 4, p. 745–748, dez. 2005.

SCHENK, J. J. et al. What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. **Applications in Plant Sciences**, v. 11, n. 3, 1 maio 2023.

SHUTT, J. D.; TRIVEDI, U. H.; NICHOLLS, J. A. Faecal metabarcoding reveals pervasive long-distance impacts of garden bird feeding. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 288, n. 1951, 26 maio 2021.

WEBER, D. C.; LUNDGREN, J. G. **Detection of predation using qPCR: Effect of prey quantity, elapsed time, chaser diet, and sample preservation on detectable quantity of prey DNA**Lundgren **Journal of Insect Science** | www.insectscience.org. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.mannlakeltd.net>.

APÊNDICE A – OTIMIZAÇÃO PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

De início estávamos tendo dificuldade para ter uma extração totalmente eficaz do DNA vegetal utilizando o protocolo CTAB original, provavelmente devido a presença de polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários que dificultam a limpeza do DNA. Tendo isso em vista, utilizamos a literatura para buscar aprimoramentos no protocolo, avaliamos então 4 fatores que poderiam alterar os resultados da extração: soluções frescas, a etapa de lavagem, concentração CTAB e a β mercaptoethanol.

Soluções

Até o momento, tínhamos utilizado soluções de CTAB feitas em grande quantidade há 6 meses atrás e armazenadas na geladeira, porém pensamos em testar o uso de soluções feitas em pequenas quantidades no mesmo dia destinado a extração do DNA vegetal das fezes. A literatura indicou a importância de usar soluções frescas.

Lavagem

Diferentes espécies de plantas apresentam níveis variados de polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários, que se combinam com ácidos nucleicos durante o isolamento de DNA e afetam ainda mais a qualidade do DNA extraído. Para remover esses compostos que impedem a precipitação do DNA durante a lavagem, além do uso de isopropanol, foi acrescentado uma concentração de 1.4 M de NaCl (cloreto de sódio) e 3 M de acetato de potássio.

Concentração CTAB

A utilização de uma maior concentração de CTAB (Cetil Trimetil Amônio Brometo) em protocolos de extração de DNA é justificada pela necessidade de romper eficientemente as células e membranas nucleares, expondo os componentes genéticos.³ Tal abordagem pode para garantir uma extração robusta e completa do DNA, especialmente em amostras de plantas que podem apresentar paredes celulares

mais resistentes. Além disso, a presença de uma concentração mais elevada de CTAB contribui para remover efetivamente polifenóis, compostos que podem interferir na qualidade e pureza do DNA isolado. Resolvemos testar a diferença na concentração, utilizando soluções com 2% e 3%.

β- mercaptoethanol

O uso de altas concentrações de CTAB, combinada com a adição de 2-βmercaptoetanol, deveria proporcionar a formação de um pellet de DNA transparente e nítido, pois acentua a eliminação de polifenóis e outros metabólitos secundários, facilitando os processos subsequentes de análise molecular. Testamos para verificar a diferença. Para verificar a acurácia dessas modificações, realizamos o protocolo de extração usando a polpa extraída diretamente do fruto de goiaba (*Psidium guajava*). Ao todo foram 12 amostras com 6 protocolos diferentes (com duplicatas)

Tabela 1 – Testes para modificações no protocolo de extração de DNA vegetal utilizando CTAB. Avaliamos quatro fatores: uso de soluções frescas, etapa de lavagem, concentração de CTAB e β-mercaptoetanol. As alterações foram implementadas para otimizar a eficácia da extração de DNA e foram testadas utilizando polpa de goiaba (*Psidium guajava*).

Tratamento	Poços	Soluções	Lavagem	Concentração CTAB	β- mercaptoethanol
A	1, 2	Antigo	Sem	2%	Ausente
B	3, 4	Fresco	Sem	2%	Ausente
C	5, 6	Fresco	Com	2%	Ausente
D	7, 8	Fresco	Sem	3%	Ausente
E	9, 10	Fresco	Com	3%	Ausente
F	11, 12	Fresco	Com	2%	Presente

Amplificação por PCR

Para testagem desse protocolo de extração foi utilizado o primeiro primer descrito no projeto, o marcador mini barcode para cloroplasto descrito por Shutt em 2009, contendo 184 pares de base dentro da região *rbclA* (550– 650 pares). É um marcador mais abrangente para a maior parte dos organismos fotossintetizantes, incluindo plantas, algas e cianobactéria. Para cada amostra foi inserido 3μL de DNA e

0,5 μ L de cada primer (Forward e Reverse). As amostras foram submetidas a PCR por 40 ciclos [94 °C (30 s), 56 °C (45 s), 72 °C (1 min 30 s); e um alongamento final a 72 °C (8 min)]. A concentração dos primers foi de 10 μ M. Para controle negativo foi utilizado água MiliQ e para controle positivo utilizamos uma extração de DNA de banana realizada anteriormente e já amplificada.

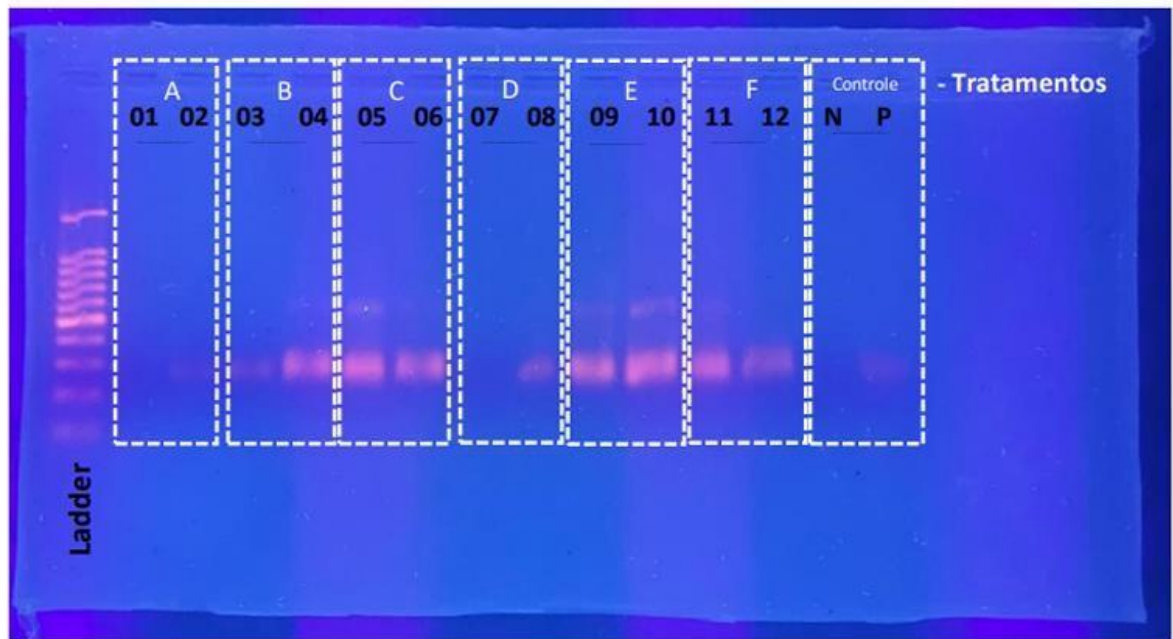


Fig 3. . Gel de Eletroforese de testagem de protocolo de extração de DNA vegetal pós PCR – poços 1 e 7 não amplificaram. Poços 2, 3, 8 e 12 - bandas bem pouco nítidas. Poços 4, 5, 6, 9, 10 e 11 bandas bem marcadas. Controle negativo não amplificou, Controle positivo amplificou. Os primers utilizados para PCR foram o do marcador mini barcode para região *rbclA*,