



MÉTODO NÃO-INVASIVO DE COLETA DE DNA DE FEZES DE JAVALI COMO FERRAMENTA DE MONITORIA E CONTROLE POPULACIONAL ¹

Adriana Mello de Araujo^{*2}, Diego Helcias Cavalcante³, Raquel Soares Juliano², Marcia Furlan Nogueira², Aiesca Pellegrin Oliveira²

¹Parte do projeto “Consolidação da rede de pesquisa e inovação para o manejo e controle adaptativo do javali (*Sus scrofa*) do estado de Mato Grosso do Sul pela chamada FUNDECT N° 28/2016-Javali-MS e a Embrapa, através do projeto SEG código 20.18.03.049.00.00

* Autor para correspondência.

² Pesquisadoras do Laboratório de Virologia e Biologia Molecular, Embrapa Pantanal, Corumbá, MS

³ Professor de Zootecnia UESPI. Teresina, PI

Resumo: O javali (*Sus scrofa*) é uma espécie animal invasora no Brasil, causando prejuízo ao ambiente, fauna selvagem e também aos animais domésticos. A obtenção de amostras de DNA através das fezes é uma maneira eficiente e não-invasiva de conhecer a diversidade genética em populações selvagens. Este trabalho testou estratégias de amostragem a campo de fezes coletadas frescas (úmidas) e secas, submetidas ao armazenamento em caixa de isopor com gelo no estado “in natura” ou em etanol 70%no Mato Grosso do Sul. O DNA foi posteriormente extraído das amostras de fezes pelo *Stool DNA Isolation Kit* (NORGEN BIOTEC). Foram coletadas 12 pelets fecais, sendo apenas dois frescos e úmidos. Foram realizadas 16 reações de extração de DNA. Em média, todas as soluções obtidas tiveram concentração acima de 180 ng/ μ L e absorvância 260/280 (razão) de 1,9, indicando que as amostras de pelet fecal seco, a campo, foram estáveis para procedimento de estudos genéticos. Contudo, o pelet úmido forneceu melhores concentrações de DNA e o uso de tratamento em etanol não mostrou melhora no resultado da extração em pelets secos.

Palavras-chave: espécie invasora, pragas, prejuízos na paisagem agropecuária

Introdução

O javali (*Sus scrofa*) é uma espécie introduzida no Brasil. Devido a sua capacidade de rápida multiplicação populacional e expansão de território, tornou-se um problema para as lavouras e criatórios comerciais de várias espécies domésticas. O javali é responsável por danos ambientais causados por traço de comportamento de escavar mananciais de água e nascentes. É também uma ameaça sanitária, pois frequenta bebedouros e cochos nas áreas silvestres, pecuárias e também as periferias de habitações ou quintais. O Plano Nacional de Controle do Javali busca soluções de conter o aumento populacional e reduzir os prejuízos causados pelo invasor. A estimativa do tamanho populacional de espécies ferais é o principal objetivo da análise denominada captura-marca-recaptura (CMR). A CMR é uma abordagem estatística baseada na genotipagem de DNA e tem sido usada no monitoramento de populações, seja como abordagem principal ou complementar para o monitoramento da vida selvagem (junto com os dados de imagens de câmaras, transmissor radiofrequência, etc.). Os métodos não invasivos de amostragem de DNA incluem materiais biológicos expostos ao ambiente, como fezes, saliva ou pelos - onde a extração da molécula íntegra de DNA alvo pode ser um obstáculo para os resultados da genotipagem, gerando dados imprecisos que necessitam de repetições para aumentar a confiança nas estimativas de tamanho populacional (Moeller et al.,

2021). A atividade desta pesquisa teve o objetivo de padronizar o material e a técnica de coleta para a extração não-invasiva de DNA fecal de javali em vida livre (Lampa et al., 2013), para as condições de temperatura e umidade do Mato Grosso do Sul (MS).

Metodologia

A coleta de fezes de javali foi executada em três áreas de aproximadamente 1,0 km² onde a presença da espécie foi relatada por produtores no Município de Bonito, região Sul do MS. Ao total, foram localizados 12 pelet de fezes de javali durante o período de coleta (maio-junho, 2022) no campo, nos locais monitorados pelo projeto. Foram coletadas no campo amostras de fezes em pelet seco (10) e úmido (2). As amostras secas são endurecidas e fibrosas, mais limitantes ao manuseio laboratorial. A fim de verificar se o pré-tratamento traria melhora na qualidade do material biológico, quatro dessas amostras secas foram imediatamente imersas em álcool etílico 70% por 48 horas. Todas as amostras foram acondicionadas em gelo e transportadas para o laboratório da Embrapa Pantanal.

Para a reação de extração, os pelet de fezes secos foram macerados, inclusive aqueles armazenados imersos em álcool. Aliquotas de 200 mg foram adicionadas em 1,0 mL da solução de extração. (Lim et al., 2020). As alíquotas exatas para cada reação de extração podem ser vistas na Tabela 1. O DNA foi posteriormente extraído seguindo o protocolo *Stool DNA Isolation Kit / Spin Column* (NORGEN BIOTEK). As estimativas de concentração e pureza do DNA extraído foram obtidas por espectrofotômetro (NanoVue™ Plus Spectrophotometer, GE Healthcare). Os testes estatísticos não paramétricos para verificar a diferença entre os métodos foram realizados no R.

Resultados e Discussão

A metodologia CMR de estudo populacional através de DNA não-invasivo é apontada por especialistas como um método eficaz de monitorar o controle populacional da fauna (Flasko et al., 2017). Entretanto, o DNA-alvo obtido através de amostras de fezes encontra-se no ambiente já deteriorado e contaminado, gerando erros e dificultando as etapas seguintes de genotipagem (Lampas et al, 2015).

A trilha inicial deste trabalho percorreu cerca de 1,0 km² em três áreas previamente sinalizadas pelo avistamento de javalis (Lopo et al, 2022). A época de junho foi escolhida por ser uma época de temperaturas amenas (14-25°C) e baixa probabilidade de chuvas no Mato Grosso do Sul. Baixas temperaturas e fezes de animais em estado congelado são ideais para trabalhos de DNA-não invasivo, por aumentar a integridade do DNA extraído (Flasko et al, 2017). O número de pelet de fezes encontrados no campo (12) foi abaixo do esperado, talvez devido ao comportamento de grande deslocamento dos javalis no campo aberto e lavouras. A obtenção de amostras úmidas e recentes foi mínima (somente 2) e só foi localizada próximo à mata bem ao amanhecer. Os pelet de fezes secos foram proporcionalmente mais abundantes a campo e a imersão do material em álcool foi uma tentativa de melhorar a eficiência de armazenamento antes do processo de extração de DNA (Lampas et al. 2015). Entretanto, observou-se na condição do ambiente que o pelet fecal não solubilizou e permaneceu sólido e fibroso nas amostras imersas em etanol PA 70%.

As leituras do espectrofotômetro revelou estimativas de soluções finais com concentração média de 183 ng/ µl e razão de pureza 1,9 (**Tabela 1**). As alíquotas úmidas foram mais pesadas ($p < 0,05$) do que as secas e tratadas com etanol. Pelo

teste estatístico não-paramétrico, não houve diferença ($p > 0.05$) na concentração e razão 260/280 entre os tratamentos. Entretanto, o pelet úmido resultou numa tendência numérica de maiores concentrações de DNA na solução, mas não comprovada estatisticamente e pode ainda ser correspondente ao aumento de peso da alíquota na reação. O pelet úmido também foi considerado como material de coleta mais raro, representando menos de 20% dos acessos. As etapas posteriores de amplificação por PCR indicarão a usabilidade de amostras de DNA obtidas de fezes de javali no MS para estudos de controle e monitoramento populacional.

Tabela 1 – Peso médio de alíquota por reação (mg), concentração de DNA (ng/μl) e pureza (A260/A280) de DNA extraído de fezes de javali em pelet seco (S) e úmido (U). Amostras secas em solução de álcool etanol-48hs (E).

AMOSTRA	N	ALÍQUOTA FEZES (MG)	CONCENTRAÇÃO (NG/ ML)	ABSORBÂNCIA 260/280
S	10	183,50 ^a	148,78 ^a	1,96 ^a
E	4	185,68 ^a	140,00 ^a	1,97 ^a
U	4	256,38 ^b	262,76 ^{a*}	1,98 ^a
Média		-	183,85	1,97

As diferentes letras demonstram diferenças significativas entre os tratamentos utilizando o teste Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

* p-value = 0.0646

Conclusões

O método de coleta de fezes para obtenção não-invasiva de DNA em javalis de vida livre no Mato Grosso de Sul é uma oportunidade para os estudos na genética populacional da espécie invasora, fornecendo amostras de DNA com concentração e pureza compatíveis para estudos genéticos futuros.

Agradecimentos

A FUNDECT pelo apoio financeiro ao Projeto. Ao Med. Vet. Carlos Palhares pela recepção e rede de contato local.

Literatura citada

FLASKO, A., M. MANSEAU, G. MASTROMONACO, M. et al. Fecal DNA, hormones, and pellet morphometrics as a noninvasive method to estimate age class: an application to wild populations of Central Mountain and Boreal woodland caribou (*Rangifer tarandus caribou*). *Canadian Journal of Zoology*, v.95, p311–321, 2017. <https://doi.org/10.1139/cjz-2016-0070>

LAMPA,S., HENLE, K., KLENK, R. et al. Genotyping Errors in CMR—A Review. *The Journal of Wildlife Management* v.77, n.08, p.1490–1511; 2015. <https://doi.org/10.1002/jwmg.604>

LOPO, L. C. P.; OLIVEIRA, M. da R.; MOREIRA, T. de A.; PORTALETE, L. C.; SOUZA, T. A. de; PELLEGRIN, A. O. Avaliação preliminar do impacto causado pelo javali em lavouras de milho no Mato Grosso do Sul. Corumbá: Embrapa

Pantanal, 2022. 10 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 124). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1148617/1/CT124-Avaliacao-Javali2022.pdf>

LIM, M., PARK, YS., KIM, JH. et al. Evaluation of fecal DNA extraction protocols for human gut microbiome studies. *BMC Microbiol* v.20, n.212, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01894-5>

MOELLER A. K., J. J. NOWAK, L. NEUFELD, M. et al.. 2021. Integrating counts, telemetry, and non-invasive DNA data to improve demographic monitoring of an endangered species. *Ecosphere.*, v. 12, n.5, 2021. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3443>