UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

Identificação de carnívoros ibéricos com recurso a dejetos: critérios morfológicos vs moleculares

Marta Monteiro Sena da Fonseca

Orientador: Margarida Santos-Reis, PhD
Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

Co-orientador: Wanda Viegas, PhD
Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Gestão e Conservação de Recursos Naturais

Lisboa, 2017

UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

Identificação de carnívoros ibéricos com recurso a dejetos: critérios morfológicos vs moleculares

Marta Monteiro Sena da Fonseca

Orientador: Margarida Santos-Reis, PhD
Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

Co-orientador: Wanda Viegas, PhD
Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Gestão e Conservação de Recursos Naturais

Lisboa, 2017

Identificação de carnívoros ibéricos com recurso a dejetos: critérios morfológicos vs moleculares

Copyright © Marta Monteiro Sena da Fonseca, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora e Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.

A Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora e Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação não teria sido possível de concretizar sem todas as ajudas que tive ao longo deste processo e por isso não posso deixar passar em claro os agradecimentos a todos aqueles que o tornaram possível.

A realização desta dissertação foi não só um trabalho, mas sim um processo em que aprendi muito tanto a nível profissional como a nível pessoal e que considero que me fez crescer como pessoa.

Em primeiro lugar quero agradecer muito à Professora Margarida Santos-Reis por ter aceite tão prontamente orientar-me sem sequer me conhecer ou alguma vez me ter lecionado qualquer aula. Agradeço a confiança que depositou em mim e toda a ajuda que me deu ao longo desta dissertação. Sei que fiz a melhor escolha a nível de orientação e até a nível do tema pois permitiu-me desenvolver e aprender técnicas quer em laboratório quer em campo, que de outra forma não teria acontecido.

Agradeço igualmente à Professora Wanda Viegas, que também não me conhecia, mas aceitou ser minha coorientadora interna.

O meu obrigado à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e ao Centro de Ecologia, Evolução e Alterações Ambientais (cE3c) da Universidade de Lisboa por terem acolhido a minha dissertação e por me cederem o laboratório de genética e as instalações da Herdade da Ribeira Abaixo, Estação de Campo do cE3c, para realizar o presente estudo. Este obrigada estende-se também à Companhia das Lezírias que cedeu quer as instalações como a área de estudo e ainda um veículo para me poder deslocar na área.

Quero agradecer ao Doutor Carlos Fernandes por se responsabilizar pelo meu trabalho no laboratório, assim como toda a sua disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas e pela sua rapidez na resposta a todos os emails.

Estou sobretudo grata à Luciana Simões por me ter ensinado tudo o que aprendi no laboratório, sem esses ensinamentos seria impossível realizar todo o trabalho laboratorial deste estudo. Agradeço toda a sua paciência, exigência, disponibilidade e por nunca me deixar desamparada no laboratório. Sem dúvida que o que sei fazer a nível de genética e a precisão e cuidado com que trabalho a ela o devo. Obrigada!

Neste percurso de aprendizagem com a Luciana esteve também a Yasaman e a Federica, a quem eu desejo o melhor para o futuro e que também me ensinaram muito, ajudando-me no tratamento de algumas amostras.

Não posso deixar de agradecer a todas as equipas que trabalhavam ao mesmo tempo no laboratório de genética assim como à responsável pelo mesmo Marta Palma, que me receberam muito bem.

Um muito obrigada à Mónica Silva por me ir dando algumas "dicas" de como melhorar o meu trabalho no laboratório e à Mónica Rodrigues por também me ajudar com alguns problemas com que me ia deparando e me esclarecer sem hesitar a todas as dúvidas que tive.

Quanto ao trabalho de campo também tive muitas ajudas essenciais e indispensáveis. Um grande obrigada ao Duarte Gomes e ao Guilherme Aparício por me ajudarem ao longo de toda a tese quer no campo, quer no laboratório na análise das dietas quer simplesmente por todo o apoio que me deram em todo o processo. Estou-lhes grata por tudo o que me

ensinaram, como a distinguir os dejetos no campo, pegadas, a fazer "track-plates" e "camera tracking", que apesar de não serem técnicas usadas neste estudo, considero que é um conhecimento importante e interessante, uma mais valia. Obrigada por garantirem sempre as amostragens na Herdade da Ribeira Abaixo mesmo quando não me era possível estar presente.

Na Companhia das Lezírias tive a sorte de várias pessoas que me ajudarem e acompanharem.

Começando pela Paula Gonçalves que me ajudou com o planeamento dos transectos e pela Sandra Alcobia que dispensou parte do seu tempo para me mostrar todos os transectos e ainda me ajudou na amostragem, muito obrigada.

Outros amigos e familiares ajudaram-me na amostragem de campo, nomeadamente a Diana Fonseca, Leonor Melo, Margarida Silva, Ana Rato e ainda o meu irmão e cunhada, Bruno Fonseca e Andreia Vilão, o meu pai e a minha mãe, José Sena da Fonseca e Cristina Fonseca e por fim o meu namorado que sempre me ajudou e apoiou, Miguel Serafim. Todas estas pessoas foram essenciais na concretização desta dissertação. Todos os dias de amostragem foram aventuras com momentos divertidos no meio de tanto quilómetro percorrido. O meu obrigada ainda à Sara Moreira por todo apoio e incentivo.

Quero ainda agradecer ao Nuno Pedroso e ao Miguel Rosalino por terem aceitado identificarem os dejetos.

Quero por fim agradecer mais uma vez à minha família, fazendo referência à minha avô Olímpia que durante este meu percurso nos deixou mas que ficaria feliz por ver o meu trabalho concluído, e namorado a quem eu dedico esta dissertação, que além de me terem ajudado no trabalho de campo, foram um grande apoio moral e esse apoio também tem de ser referido pois sem ele não teria concluído a dissertação.

RESUMO

Identificação de carnívoros ibéricos com recurso a dejetos: critérios morfológicos vs moleculares

Muitos mamíferos carnívoros estão em declínio e a sua monitorização é fundamental para uma conservação efetiva. Os dejetos são um recurso comumente utilizado no seu estudo e a identificação específica dos mesmos baseia-se tradicionalmente em critérios morfológicos. Reconhecendo-se a incerteza associada a este método, a genotipagem molecular têm ganho relevância conferindo mais segurança aos resultados. Foi objetivo deste estudo comparar os dois métodos e avaliar o efeito da dieta na taxa de sucesso de identificação.
Das 269 amostras analisadas obteve-se um sucesso de 75,1% por genotipagem e apenas 42,4% (±10,6%) usando critérios morfológicos, variando com a espécie o sucesso dos observadores. O consenso entre a identificação morfológica pelos observadores não correspondeu a maior probabilidade de identificação correta. A composição dos dejetos variou espacial e temporalmente e influenciou a identificação genética e morfológica. Os resultados suportam a necessidade do uso de métodos moleculares para estudos de monitorização de mamíferos carnívoros.

Palavras-chave:
Identificação genética; mesocarnívoros; amostragem não-invasiva; dejetos; monitorização

ABSTRACT

Iberian carnivores identification using scats: morphological criteria vs molecular criteria

Many mammalian carnivores are declining and its monitoring is fundamental for an effective conservation. Faeces are frequently used as a source of information because of its abundance and conspicuousness. Researchers used to rely on morphological criteria for identification. However associated uncertainty is acknowledged and genotyping has gained relevance providing higher accuracy. The objective of this study was to compare the two methods and to evaluate the diet effect on the respective success rate.
From the 269 analysed samples 75,1% were successfully genotyped and only 42,4% (±10,6%) were correctly identified by morphological criteria. The observer success was species-dependent and identification consensus among observers based on morphological criteria did not implied a higher probability of success rate. Food resources in faeces revealed spatial and temporal variation and influenced both the morphological and molecular identification. In conclusion, results support the need of using molecular methods in the monitoring of mesocarnivores.

Key-words:
Genetic identification; mesocarnivores; non-invasive sampling; faeces; monitoring.

RESUMO ALARGADO

Os mamíferos carnívoros são na sua maioria espécies noturnas, secretivas, tendo elevada mobilidade e vastas áreas vitais. Estas características dificultam o seu estudo, que está muito limitado pelos métodos de estudo tradicionais, em particular em regiões habitadas por comunidades diversas.

Muitas espécies deste grupo desempenham funções essenciais na estrutura e funcionamento dos ecossistemas e, no entanto, estão em declínio. Devido à sua importância e situação atual, uma rigorosa monitorização populacional é fundamental para o desenho de planos de conservação eficazes.

O recurso mais comumente utilizado no estudo de mamíferos carnívoros são os seus indícios de presença, em particular os dejetos, por estes serem abundantes e se localizarem em locais conspícuos ou proeminentes.

Tradicionalmente, os dejetos eram identificados através de critérios exclusivamente morfológicos. Hoje reconhece-se a incerteza associada a estes critérios, podendo-se fazer recurso a métodos moleculares para a sua identificação, conferindo estes mais segurança nos resultados e uma monitorização mais rigorosa, ainda que envolvendo custos muito mais elevados.

O presente estudo teve como objetivo comparar estes dois métodos de monitorização não-invasiva e avaliar o efeito da dieta no sucesso de ambos.

O estudo foi realizado em duas áreas de montado distintas (Herdade da Ribeira Abaixo - Grândola, Alentejo, e Companhia das Lezírias – Charneca do Infantado, Ribatejo) permitindo averiguar se os resultados podem ser generalizados espacial (diferentes comunidades e características fisiográficas das áreas de estudo) e temporalmente (variação no consumo de recursos alimentares). O estudo abrangeu três estações (outono, inverno e primavera) e a recolha de amostras fez-se ao longo de transetos com uma extensão de aproximadamente 20 Km em cada área de estudo, sendo fotografados *in loco*, georeferenciados e recolhidos todos dejetos dos carnívoros encontrados.

Em laboratório procedeu-se à extração do ADN fecal e identificação genética da espécie produtora, com recurso a primers específicos (ADN mitocondrial). Paralelamente recorreu-se ao método "expert-knowledge" para identificação dos mesmos dejetos com base na respetiva morfologia. Para tal solicitou-se a 5 observadores independentes, com reconhecida experiência prévia no estudo de carnívoros, que identificassem os dejetos através do seu registo fotográfico com escala. Analisou-se ainda o conteúdo alimentar dos dejetos através da triagem dos diferentes componentes alimentares.

No total foram analisadas 269 amostras, tendo-se obtido um sucesso de 75,1% (202 amostras) nas identificações moleculares (Herdade da Ribeira Abaixo - 60,7% e 86,1%, Companhia das Lezírias - 71,7% a 78,8%); o maior sucesso alcançou-se no outono por oposição à primavera em que este foi o menor.

Dos 202 dejetos identificados geneticamente, apenas 42,4% (±10,6%) foram corretamente identificados pelos observadores com base na respetiva morfologia. Estes resultados revela uma reduzida taxa de sucesso em relação ao método molecular.

O local e a estação do ano não mostraram influenciar dos resultados obtidos na identificação morfológica, bem como a experiência dos observadores num determinado local.

A nível específico os observadores tiveram menos dificuldade em identificar os dejetos de lontra (67% de sucesso), texugo (58%) e raposa (50%) e uma maior dificuldade em identificar os de geneta (22%) e gato (0%). Constatou-se ainda que o facto de haver

consenso entre os observadores no que se referiu à identificação de uma determinada amostra tal não significou que aquela tivesse uma maior probabilidade de estar correta.
Já o conteúdo alimentar dos dejetos, que mostrou variar espacial e temporalmente, influenciou quer a identificação genética, pela inibição da Taq polimerase, quer a morfológica do dejeto e consequentemente o sucesso de identificação.
Concluindo, os resultados suportam a necessidade do uso de métodos moleculares para estudos de monitorização e ecologia de mamíferos carnívoros mais rigorosos.

Palavras-chave:
Identificação genética; mesocarnívoros; amostragem não-invasiva; dejetos; monitorização

EXTENDED ABSTRACT

Most mammalian carnivore species are nocturnal, elusive, and have a high mobility and vast home-ranges. In view of such traits, the study of the ecology and the monitoring of these species are quite difficult, particularly in areas holding diverse communities.

Many species of carnivores have an important role in the structure and function of ecosystems and are endangered. Because of its importance and current status, population monitoring is fundamental for the design of efficient conservation plans.

Signs of presence, faeces in particularly, are frequently used as a source of information to confirm species presence and trends because of its abundance and location in conspicuous or prominent locals.

Traditionally, researchers used morphological criteria to identify the faeces; however nowadays uncertainty in such identification is acknowledged and molecular methods are increasingly used as an alternative identification method providing a more rigorous and accurate monitoring, in spite of the major drawback of its high cost.

The objective of this study was to compare these two non-invasive monitoring methods and to evaluate the diet effect on the accuracy of both methods.

The study focused two different areas of *montado* landscape (Herdade da Ribeira Abaixo - Grândola, Alentejo and Companhia das Lezírias - Charneca do Infantado, Ribatejo) to verify the spatial (different communities and physiographic characteristics of the study area) and temporal (seasonal variation in food resources consumption) effects.

Faeces sampling was conducted in three seasons (autumn, winter and spring) along walking transects with approximately 20 Km of length per area. All faeces found were photographed *in loco*, georeferred and collected for laboratorial analysis.

In laboratory, the faecal DNA was extracted and amplified by PCR with specific primers for the different species of Iberian carnivores in order to achieve species identification.

In parallel, an expert-knowledge method was used to identify the same samples on the basis of their morphology. To achieve this, five observers with recognized experience in the study of carnivores, identified the faeces by photograph with scale.

In addition, the food content was analysed by screening the different resources found in each sample.

A total of 269 scat samples were genotyped and 75,1% (202 samples) were successfully identified (Herdade da Ribeira Abaixo - 60,7% to 86,1% success rate, Companhia das Lezírias - 71,7% to 78,8%). The best results were obtained from the faeces collected in autumn inversely to what was found in spring.

Only 42,4% (±10,6%) of the 202 genotyped samples were correctly identified by the observers. These results reveal a lower success of the morphological identification when compared to the genotyping results.

The local and season showed no influence in the morphological identification and the same applies to the observers experience in a particular local.

The observers had more success in identifying otter (67% of success), badger (58%) and fox (50%) faeces and more difficulty in identifying the genet (22%) and cat (0%) faeces.

Results further showed that the success of identification was not higher when the observers had a consensus in the identification based on morphological criteria.

Food resources identified from the faeces revealed spatial and temporal variation of the diet and, by inhibiting the Taq polymerase, this variation influenced the genotype success. The diet also influenced the faeces morphology and, consequently, and the success of identification on the basis of morphological traits.

Concluding, the results indicate the need to use molecular methods in monitoring and ecological studies of mesocarnivores, being these more rigorous and less uncertain that traditional identification methods.

Key-words:

Genetic identification; mesocarnivores; non-invasive sampling; faeces; monitoring.

ÍNDICE

Abreviaturas XVII
I. Introdução 1
1. Métodos de monitorização de populações animais 1
1.1. Limitações da técnica 9
2. A Ordem Carnívora enquanto modelo biológico 11
2.1. Monitorização de Carnívoros 13
3. Dieta dos carnívoros e sua importância na identificação dos excrementos 15
4. Objetivos do estudo 16
II. Metodologia 17
1. Áreas de estudo 17
1.1. Herdade da Ribeira Abaixo 19
1.2. Companhia das Lezírias 20
2. Metodologia de amostragem 21
3. Seleção das amostras e subamostragem 24
4. Extração e identificação genética das amostras 26
4.1 Problemas e soluções encontradas 30
4.1.1. Inespecíficidade na ligação dos primers 31
4.1.2. Verificação do tamanho das bandas 31
4.1.3. Inibição da Taq Polimerase 32
4.1.4. Contaminações 32
5.Conteúdo em alimento dos dejetos 33
III. Apresentação e discussão dos resultados 35
1. Amostras recolhidas e análise genética 35
2. Sucesso de identificação dos observadores 39
2.1 Sucesso na identificação da comunidade de carnívoros 39
2.2. Diferenças no sucesso de identificação entre locais 40
2.3. Diferenças no sucesso de identificação entre estações do ano 41
2.5. Identificação das espécies 42
3. Concordância nas identificações 43
3.1. Análise por local 44
3.2. Análise por estação 44
3.3. Análise observador 45
4. Conteúdo em alimento nos dejetos e sua influência na identificação genética 46
4.1. Variação na dieta dos carnívoros por local e estação 46
4.2. Influência do conteúdo alimentar na identificação genética 47
5. Fatores indutores de erro na identificação dos dejetos com base em critérios morfológicos 51

5.1. Caraterísticas dos dejetos identificados corretamente por todos os observadores 51
5.2. Caraterísticas dos dejetos identificados erradamente por todos os observadores 52
6. Erros mais frequentes associados à identificação dos dejetos 53
6.1. Influência dos locais na identificação errônea da raposa e da fuinha 54
6.2. Influência das estações na identificação errônea da raposa e da fuinha 55
6.3. Identificação errônea da raposa e da fuinha....56
7. Variabilidade de dejetos pertencentes à mesma espécie....57
7.1. Raposa....58
7.2. Fuinha 60
7.3. Texugo 62
7.4. Lontra....63
7.5. Geneta 64
7.6. Sacarrabos....66
IV. Considerações finais....68
V. Bibliografia 71
VI. Anexos....79
Anexo 1 - Folha de registo dos dejetos amostrados. Foram registados as características dos dejetos assim como os locais e dias de amostragem....70
Anexo 2 - Mamíferos carnívoros de Portugal e as suas características....80
Anexo 3 - Protocolo de extracção de DNA de dejetos utilizado no presente estudo. PSP® Spin Stool DNA Kit. 88
Anexo 4 - Dimensões dos dejetos dos mamíferos carnívoros segundo referências bibliográficas....90
Anexo 5 - Características dos dejetos identificados corretamente por todos os observadores 91
Anexo 6 - Características dos dejetos identificados erradamente por todos os observadores 91

ÍNDICE DE FIGURAS

I. Introdução 1

I.1 - Esquema ilustrador das etapas do PCR dentro do termociclador às diferentes temperaturas. É possível visualizar como a amplificação é exponencial ao longo dos ciclos. (http://www.neb.com) 8

I.2 - Raposa (© Laurent Geslin / naturepl.com), fuinha (© M. Watson / www.ardea.com) e texugo (© Stephen Dalton / www.photoshot.com) a alimentarem-se. 15

II. Metodologia 17

II.1 - Localização das duas áreas de amostragem. As linhas brancas assinalam os limites da Charneca do Infantado (CL) da Companhia das Lezírias, à esquerda, e da Herdade da Ribeira Abaixo (HRA), à direita 17

II.2 - Sistema de montado de sobreiro português e a atividade de pastoreio típica do sistema. Foto de cerca de 1948 a 1955 do fotografo Charles Fenno Jacobs (catalog.archives.gov) 18

II.3 - Herdade da Ribeira Abaixo 20

II.4 - Caminhos da Charneca da CL 21

II.5 - Paisagem da Companhia das Lezírias 21

II.6 - Gado a pastar no montado 21

II.7 - Limites da Herdade da Ribeira Abaixo a branco, ribeira dos castelhanos a azul e percursos definidos como transectos a laranja (Google Earth) 22

II.8 - Limites da Companhia das Lezírias a branco e percursos definidos como transectos a laranja (com maior detalhe na imagem da direita – fonte Google Earth) 22

II.9 - Dejecto de raposa fotografado com escala 23

II.10 - Registo dos dados do dejeto 24

II.11 - Registo das coordenadas de localização do dejeto 24

II.12 - Recolha de dejetos: pulverização com álcool e colheita com uma luva limpa para um tubo falcon esterilizado e identificado. 24

II.13 - Esterilização do material entre subamostragens 25

II.14 - Tubos eppendorf com as subamostras A e B de algumas amostras da CL 25

II.15 - Processo de subamostragem dos dejetos: limpeza da bancada com lixívia, colocação de papel para evitar contaminações e uma maior contaminação da bancada, subamostragem com o auxílio de pinças, colocação dos fragmentos em eppendorfs e reserva dos mesmos 26

II.16 - Material preparado para a realização de uma extração na hotte 27

II.17 - a) material para o carregamento dos géis com as amostras. b) voltagem usada para a migração do material genético e elétrodos negativo e positivo. c) Gel de agarose com amostras e ladders carregadas. A verde visualiza-se o loading dye que permite o acompanhamento da migração 30

II.18 - Equipamento utilizado para a visualização das bandas no gel 30

II.19 - Tamanho das bandas da NZY DNA Ladder I (esquerda) e da NZY DNA Ladder V (direita) (nzytech.com) 31

II.20 - Amostras colocadas na estufa a 50ºC para a secagem dos dejetos 33

II.21 - Separação em caixas de petri dos componentes alimentares presentes nos dejectos 34

III. Apresentação e discussão dos resultados 35

III.1 – Sucesso de identificação genética dos dejetos por locais (HRA e CL) e por estações. 37

III.2 - Precipitação média mensal em Portugal Continental entre julho de 2014 e junho de 2015, e os respetivos valores médios referentes ao período 1971-2000 (ipma.pt). 38

III.3 – Dejeto de raposa identificado geneticamente, porém muito destruído pelas chuvas (CL – outono)....38

III.4 – Concordância dos observadores nas identificações corretas - Percentagens dos dejetos identificados por 100%, mais de 50%, menos de 50% e 0% dos observadores....45

III.5 - Fotografias de dejetos de raposa utilizados no estudo e identificados corretamente pela morfologia.....58

III.6 - Fotografias de dejetos de raposa utilizados no estudo e identificados erradamente pela morfologia.....59

III.7 - Fotografias de dejetos de fuinha utilizados no estudo e identificados corretamente pela morfologia.....60

III.8 - Fotografias de dejetos de fuinha utilizados no estudo e identificados erradamente pela morfologia.....61

III.9 - Fotografias de dejetos de texugo utilizados no estudo e identificados corretamente pela morfologia.....62

III.10 - Fotografias de dejetos de texugo utilizados no estudo e identificados erradamente pela morfologia.....63

III.11 - Fotografias de dejetos de lontra utilizados no estudo e identificados corretamente pela morfologia.....63

III.12 - Fotografias de dejetos de lontra utilizados no estudo e identificados erradamente pela morfologia.....64

III.13 - Fotografias de dejeto de geneta utilizados no estudo e identificados corretamente pela morfologia.....64

III.14 - Fotografias de dejetos de geneta utilizados no estudo e identificados erradamente pela morfologia.....65

III.15 - Fotografia de dejeto de sacarrabos utilizado no estudo e identificado corretamente pela morfologia.....66

III.16 - Fotografias de dejetos de sacarrabos utilizados no estudo e identificados erradamente pela morfologia.....67

IV. Considerações finais....68

V. Bibliografia....71

VI. Anexos....79

VI.1 - Raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) a realizar marcação por dejetos (© Mike Lane / www.photoshot.com)....81

VI.2- Ilustração dejetos de raposa (*Vulpes vulpes*) com mais e menos restos de ossos (*adaptado* de Purroy e Varela 2005)....81

VI.3 - Doninha a alimentar-se (*Mustela nivalis*)(© Martin H. Smith / naturepl.com)....82

VI.4 - Ilustração de um dejeto de doninha (*Mustela nivalis*) (*adaptado* de Bang e Dahlstrom 2011)....82

VI.5 - Toirão a alimentar-se (*Mustela putorius*)(© Mike Birkhead / gettyimages.com)....82

VI.6 - Ilustração dejetos de toirão (*Mustela putorius*) (*adaptado* de Purroy e Varela 2005)....83

VI.7 - Ilustração de um dejeto de toirão (*Meles meles*) (*adaptado* de Bang e Dahlstrom 2011)....83

VI.8 - Fuinha (*Martes foina*) (© Yann Arthus-Bertrand / www.ardea.com)....83

VI.9 - Ilustração dejetos de fuinha (*Martes foina*) (superior - *adaptado* de Bang e Dahlstrom 2011; inferior - *adaptado* de Purroy e Varela 2005)....83

VI.10 - Texugo (*Meles meles*) (© Duncan Usher / www.ardea.com)....84

VI.11 - Ilustração dejetos de texugo (*Meles meles*) (superior - *adaptado* de Purroy e Varela 2005; inferior - *adaptado* de Bang e Dahlstrom 2011)....84

VI.12 - Lontra (*Lutra lutra*) a defecar sobre uma rocha, local típico de deposição de dejetos (©

Solvin Zankl / naturepl.com) 85
VI.13 - Ilustração dejetos de lontra (*Lutra lutra*) (*adaptado* de Purroy e Varela 2005) 85
VI.14 - Geneta (*Genetta genetta*) (© Carlos Sanchez Alonso / gettyimages.com) 85
VI.15 - dejeto de geneta (*Genetta genetta*) (© Chris & Tilde Stuart / www.flpa-images.co.uk) 85
VI.16 - Ilustração dejetos de Geneta (*Genetta genetta*) (*adaptado* de Purroy e Varela 2005) 85
VI.17 - Sacarrabos (*Herpestes ichneumon*) (© Suzi Eszterhas / naturepl.com) 86
VI.18 - Ilustração dejetos de Sacarrabos (*Herpestes icheumon*) (*adaptado* de Purroy e Varela 2005) 86
VI.19 - Gato-bravo (*Felis silvestris)* com uma presa (© Martin H Smith / naturepl.com) 86
VI.20 - dejeto de gato-bravo (*Felis silvestris)* (© Adrian Davies / naturepl.com) 87
VI.21 - Ilustração de um dejeto de gato-bravo (*Felis silvestris*) (*adaptado* de Bang e Dahlstrom 2011) 87

ÍNDICE DE TABELAS

I. Introdução 1

II. Metodologia 17

Tabela II.1 - Primers usados para a identificação dos produtores dos dejetos através de PCR (*adaptado* de Fernandes et al. 2008) 28

Tabela II.2 - Reagentes e quantidades necessárias para a realização do mix e do PCR 29

Tabela II.3 - Ciclos de PCR definidos e utilizados para os primers das diferentes espécies 29

Tabela II.3 - Reagentes e quantidades usadas para o PCR de amostras com componentes inibitórios da Taq 32

III. Apresentação e discussão dos resultados 35

Tabela III.1 – Número de amostras recolhidas, analisadas, identificadas e não identificadas por estação e local de amostragem (HRA e CL). As amostras identificadas e não identificadas apresentam-se em número absoluto e em percentagem em relação aos dejetos analisados. 36

Tabela III.2 – Sucesso de identificação de carnívoros ibéricos dos observadores e média dos mesmos 40

Tabela III.3 – Sucesso de identificação por local e observador. Apresenta-se ainda a diferença entre locais do sucesso, média dos sucessos e desvio padrão 41

Tabela III.4 - Sucesso de identificação por estações e observador. Apresenta-se ainda a diferença entre estações, média dos sucessos por estação e desvio padrão. 41

Tabela III.5 – Sucesso de identificação médio dos observadores por espécies. O rank enumera as espécies por sucesso 42

Tabela III.6 – Percentagens dos dejetos identificados por 100%, mais de 50%, menos de 50% e 0% dos observadores por locais. Apresenta-se ainda a amplitude de diferença para se perceber se os resultados nos dois locais foram muito diferentes ou não. 44

Tabela III.7 – Percentagens dos dejetos identificados por 100%, mais de 50%, menos de 50% e 0% dos observadores por estações 45

Tabela III.8 – Percentagem dos tipos de alimentos presentes nos dejetos de carnívoros, por locais de amostragem (HRA e CL) e por estações 47

Tabela III.9 – Biomassa média presente nos dejetos identificados geneticamente. As médias encontram-se em percentagens e por estações 48

Tabela III.10 – Média dos itens alimentares presente nos dejetos que não se conseguiu obter uma identificação genética. As médias encontram-se por estações 49

Tabela III.11 – Diferença das do conteúdo alimentar dos dejetos não identificados e identificados. Os valores positivos indicam percentagens superiores do item nos dejetos não identificados e valores negativos indicam maiores percentagens nos dejetos identificados. 49

Tabela III.12 – Inibidores de PCR conhecidos e a sua fonte (adaptado de Bessetti 2007) 50

Tabela III.13 - Tabela síntese das espécies com que os dejetos podem ser confundidos e se existiu alguma variação local ou temporal das espécies com as quais são confundidas. 53

Tabela III.14 - Tabela em que é possível comparar a influência espacial na identificação errada dos dejetos 55

Tabela III.15 - Tabela em que é possível comparar a influência temporal na identificação errada dos dejetos de raposa e fuinha 56

Tabela III.16 - A tabela demonstra com que espécies é que os dejetos de raposa e fuinha são confundidos 57

IV. Considerações finais 58

V. Bibliografia 61

VI. Anexos 69

Tabela VI.1 - Espécies de mamíferos carnívoros que ocorrem em Portugal, família e subfamília a que pertencem, a sua origem e o estatuto de ameaça a nível nacional (Ex - Extinto; RE - Regionalmente Extinto; CR - Criticamente em Perigo; EN - Em Perigo; VU - Vulnerável; LC - Pouco Preocupante; DD - Informação Insuficiente; NA - Não aplicável) (*adaptado* de Cabral et al. 2003) 70

Tabela VI.2 - Dimensões dos dejetos das diferentes espécies de carnívoros segundo diferentes fontes bibliográficas 80

Tabela VI.3 – A tabela apresenta os dejetos que foram identificados corretamente por todos os observadores e as caraterísticas dos dejetos individuais 81

Tabela VI.4 - A tabela apresenta os dejetos que não foram identificados corretamente por todos os observadores e as caraterísticas dos dejetos individuais 81

ABREVIATURAS

BM	**Biomassa**
BSA	**Bovine Serum Albumin / Albumina Sérica Bovina**
CL	**Companhia das Lezírias**
CR	**Em perigo crítico**
DD	**Informação Insuficiente**
ddH2O	**Água bidestilada**
DNA	**Deoxyribonucleic acid / ácido desoxirribonucleico**
dNTP	**Desoxirribonucleotídeos trifosfatos**
EN	**Em perigo**
Ex	**Extinto**
FO	**Frequência de Ocorrência**
HRA	**Herda da Ribeira Abaixo**
LC	**Pouco preocupante**
MgCl2	**Cloreto de Magnésio**
NA	**Não aplicável**
NI	**Não identificável**
PCR	**Polymerase chain reaction / Reação em cadeia da polimerase**
RE	**Regionalmente extinto**
Taq	***Thermus aquaticus***
TBE	**Tris/Ácido bórico/EDTA**
UV	**Radiação Ultra-Violeta**
VU	**Vulnerável**

I. Introdução

1. Métodos de monitorização de populações animais

Existem muitas razões para os gestores de recursos naturais necessitarem de monitorizar populações silvestres (Caughley 1997). Documentar a presença e a abundância destas populações, é uma ferramenta essencial e é o primeiro passo para o planeamento de estratégias de conservação de espécies ameaçadas (Palomares et al. 2002; Birks et al. 2004), pois estes planos baseiam-se nas estimativas demográficas (Piggott e Taylor 2003).

A informação sobre as espécies e populações podem obter-se por diferentes vias, e muitos métodos têm sido desenvolvidos com este propósito (Seber 1982; Lancia et al. 1994; Thompson et al. 1998; Schwartz e Seber 1999; Seber 1986 e 1992 in Witmer 2005). Estes métodos têm evoluído muito ao longo do tempo, no sentido de cada vez menos perturbar os indivíduos e alterar a dinâmica das suas populações.

As primeiras documentações da diversidade de vertebrados envolviam a recolha de espécimes para estudos posteriores. Estas coleções eram estudadas nos domínios da sistemática, biogeografia e biologia evolutiva (Morin e Woodruff 1996).

As capturas, permanência dos indivíduos em cativeiro e sacrifício dos mesmos eram justificadas com o fundamento de que só dessa forma era possível conhecer e compreender a natureza, levando à existência de conflitos entre a necessidade de obter informação científica e a necessidade de conservar. Atualmente esta via de obtenção de informação é completamente injustificável, sobretudo quando se trata de espécies ameaçadas (Morin e Woodruff 1996).

Hoje em dia, a conservação tem por base informação ecológica e genética obtida *in vivo* e já não é recolhida via coleções nem através do sacrifício dos espécimes (Morin e Woodruff 1996; Taberlet et al.1999). Esta amostragem destrutiva era praticada sobretudo antes de alguns avanços tecnológicos, que vieram oferecer alternativas à forma dos investigadores obterem informação (Taberlet et al.1999).

A informação essencial para a conservação, como a distribuição e abundância das espécies, a sua estrutura populacional e ecologia pode ser obtida através de métodos diretos ou indiretos.

Os métodos diretos incluem, por exemplo, a observação direta dos indivíduos e a captura (e.g., armadilhagem) entre outras técnicas. A obtenção de material genético é feito de forma não destrutiva mas invasiva, em que o animal é capturado para realização de biopsias ou obtenção de amostras de sangue (Taberlet et al.1999).

Para muitas espécies, quer pela sua reduzida densidade, pelos seus hábitos ou pela sua sensibilidade à perturbação, são métodos pouco viáveis (Morin e Woodruff 1996; Taberlet et al. 1999). Qualquer método que envolva a captura e a manipulação pode ser stressante para o animal e ser potencialmente perigoso quer para o animal quer, dependendo da espécie, para o investigador (Kelly et al. 2012).

À exceção da observação direta, estes métodos, normalmente, são logisticamente difíceis por serem requeridas licenças muito específicas para a captura e transporte de indivíduos (Piggott e Taylor 2003; Kelly et al. 2012).

A precisão dos resultados obtidos, por métodos de captura, depende do número de indivíduos da população que é capturado e muitas vezes é difícil de obter robustez nos resultados, pelo frequente reduzido número de amostras (Greenwood 1996; Kohn et al. 1999; Kelly et al. 2012). A esta limitação soma-se ainda a limitação de serem normalmente impraticáveis em estudos que abordam questões em largas escalas geográficas (Gompper et al. 2006).

Quando se trata de espécies ameaçadas (que são mais difíceis de observar e capturar) são métodos moralmente reprovados por muitos investigadores por poderem ser prejudiciais e não benéficos para a espécie (Greenwood 1996; Kohn et al. 1999), para além de serem espécies para as quais existe maior dificuldade logística de os por em prática.

Além destes problemas, os métodos invasivos, inevitavelmente, irão alterar a dinâmica da população sendo difícil prever as alterações consequentes (Harrison et al. 1991; Taberlet et al. 1999). Estas alterações poderão interferir nos resultados obtidos e poderão comprometer as populações pela subestimativa ou sobrestimativa do tamanho populacional (Kohn e Wayne 1997).

A amostragem não invasiva e os métodos indiretos baseiam-se na recolha de informação sem captura, manipulação ou qualquer outro contacto e restrição física do animal (Morin e Woodruff 1996; Taberlet et al. 1999; Waits e Paetkau 2005; Gompper et al. 2006; Kelly et al. 2012). Normalmente não implicam a observação dos indivíduos e por isso, presumivelmente, o animal não é afetado (Kelly et al. 2012). Estes métodos incluem, por exemplo, a análise da dieta através de dejetos, as estimativas de abundância através de "camera trapping", "track-plates", estações de cheiro, "snowtrancking" e variados indícios deixados pelos animais, tais como pegadas, dejetos e pêlos (Morin e Woodruff 1996; Taberlet et al.1999; Waits e Paetkau 2005; Gompper et al. 2006; Kelly et al. 2012).

Este tipo de amostragem é ideal para espécies ameaçadas, sensíveis ou com hábitos noturnos e com grande mobilidade (Kohn et al. 1999).

Tradicionalmente, os indícios de presença de carnívoros eram (e ainda são em muitos estudos) identificados através de critérios exclusivamente morfológicos (Foran et al 1997; Kohn and Wayne 1997). Nos dejetos estes critérios incluem o tamanho (comprimento e

diâmetro), forma (segmentado, forma das extremidades, etc), cor (preto, castanho, etc), pH ou odor e, adicionalmente, a coocorrência de outros indícios (Laguardia et al. 2015). No entanto, estes podem ser critérios subjetivos e podem levar a identificações erróneas sobretudo em espécies simpátricas e filogeneticamente próximas (Foran et al 1997). Este facto é particularmente verdade quando se trata de dejetos: diferentes espécies simpátricas podem ter tamanhos semelhantes (Laguardia et al. 2015) e partilhar recursos alimentares (Foran et al 1997), produzindo assim dejetos confundíveis entre si. Mesmo dentro da mesma espécie a dimensão do animal pode variar muito e afetar a dimensão do dejeto (entre juvenil e adulto e fêmea e macho) (Laguardia et al. 2015). Além disso, o tamanho do dejeto também se relaciona com a quantidade de alimento ingerido (Scoot 1941,1943 in Reed et al. 2004) e o seu diâmetro com a composição da dieta (Weaver e Fritts 1979 in Reed et al. 2004).

Assim sendo, os critérios de diâmetro e comprimento podem não fornecer um diagnóstico correto da espécie que deu origem ao dejeto, comprometendo as conclusões. Por exemplo, muitos estudos baseiam-se na contagem de dejetos para estimar o tamanho populacional (parâmetro biológico fundamental – e.g., Ruell et al. 2009), mas se a identificação não for a correta, pode incluir-se amostras de espécies não alvo, podendo ter como consequência uma estimativa superior à realidade, o que pode ter implicações graves na conservação das espécies, tornado os planos ineficientes (Kohn et al. 1999; Piggott and Taylor 2003).

A deficiente identificação é relatada como um problema recorrente (Davison et al. 2002; Dalén et al. 2004; Birks et al. 2004), não havendo, segundo Bulinski e McArthur (2000), diferenças significativas entre os erros de observadores experientes e não experientes. Esta é uma preocupação para os investigadores pela incerteza que causa nos resultados (Bulinski e McArthur 2000; Davison et al. 2002; Dalén et al. 2004; Birks et al. 2004).

São vários os estudos que documentam este tipo de problemas. Num estudo sobre a distinção entre o lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) e o coiote (*Canis latrans*), de 45 dejetos identificados como sendo de lobos mexicanos, na verdade 19 (42%) foram produzidos por coiotes e dos 41 dejetos identificados como sendo de coiotes, 20 (49%) eram de lobos mexicanos (Reed et al. 2004).

Outro estudo demonstrou que a identificação da marta (*Martes martes*) baseada na morfologia dos dejetos não é fiável. Na Escócia 18% dos dejetos identificados como de marta eram na verdade de raposa (*Vulpes vulpes*) e em Inglaterra e País de Gales apenas um dos dejeto era de marta (3%), sendo os restantes (97%) de raposa e toirão (Davison et al. 2002). Estes resultados foram justificados pela dificuldade em encontrar dejetos quando a população se encontra em reduzida densidade e não efetua marcação de território,

aumentando a incerteza por parte dos investigadores. Segundo este estudo, quanto mais reduzida é a população maior é o erro de identificação e por isso a metodologia terá que ser mais rigorosa (Davison et al. 2002). Segundo Prugh e Ritland (2005), os dejetos de lobo, raposa, lince (*Lynx canadensis*) e cães podem ser confundidos com os dejetos de coiotes.

Apesar destes problemas, os dejetos representam a fonte de informação mais prontamente disponível já que são facilmente amostrados, conservados e transportados com reduzida tecnologia ou custos (Kohn e Wayne 1997; Taberlet et al. 1999), podendo ser úteis para monitorizar populações, sobretudo populações de espécies ameaçadas por serem de difícil observação e por outros métodos não serem viáveis (Foran et al. 1997; Kohn e Wayne 1997; Birks et al. 2004); além destes factos, pode significar um maior número de animais amostrados e consequentemente estimativas populacionais mais próximas à realidade (Taberlet et al. 1999; Kelly et al. 2012).

Quando corretamente identificados, os dejetos podem fornecer informação vital sobre a presença da espécie, a sua distribuição, abundância, e movimentos espácio-temporais, e adicionalmente ainda podem dar informações sobre a dieta do animal (Stoner 1996; Kohn e Wayne 1997; Waits e Paetkau 2005). A correta identificação das espécies é um fator chave em biologia da conservação e é a base para qualquer estudo dedicado à conservação de vida selvagem (Frankham et al. 2002).

Como verificado, os métodos de estudo da vida selvagem são muitos e variados, tendo cada um deles as suas vantagens e desvantagens. Por os métodos selecionados influenciarem a exatidão da informação obtida, a escolha dos mesmos deve ser criteriosa tendo em conta vários fatores como os objetivos do estudo, os recursos disponíveis e adequados, a praticabilidade e validade do método e, sempre que possível, deve-se antecipar os problemas (Witmer 2005). No caso de espécies diurnas, comuns e bastante conspícuas, os censos podem ser relativamente fáceis de concretizar. No entanto se as espécies forem noturnas, em reduzida abundância e difíceis de detetar (tal como acontece com os mesocarnívoros), a realização de censos é um problema (Palomares et al. 2002; Krebs 2006), sendo que a utilidade, viabilidade e fiabilidade dos métodos se torna limitativa. O mesmo sucede quando aplicados a espécies ameaçadas (Hoss et al. 1992) ou sensíveis (Palomares et al. 2002) . Os métodos a usar também dependerão do propósito do estudo e do nível de precisão necessário (Krebs 2006), sendo que para a realização de planos de conservação o nível de precisão deverá ser o máximo.

Como referido anteriormente, aplicar métodos diretos (destrutivos ou invasivos) pode ser logisticamente difícil, além dos efeitos que poderá ter sobre a espécie. Por outro lado, ao aplicar métodos indiretos (não invasivos) corre-se o risco da errada identificação interferir e alterar os resultados (Palomares et al. 2002; Piggott e Taylor 2003).

A solução para os problemas dos métodos não invasivos surgiu recentemente com o desenvolvimento das tecnologias moleculares que permitiram aumentar a fiabilidade e utilidade destes métodos (Morin e Woodruff 1996; Piggott e Taylor 2003).

Os pêlos possuem nos seus folículos ADN do indivíduo a que pertenciam, assim como os dejetos possuem na sua superfície células epiteliais (as quais contém ADN) das paredes do intestino do indivíduo que o produziu (Hoss et al. 1992; Foran et al. 1997; Kohn e Wayne 1997; Reed et al. 2004; Kelly et al. 2012).

Apesar deste facto, para o estudo genético das populações era necessária uma grande quantidade de tecido fresco, para obter ADN de qualidade e em quantidade (Taberlet and Luikart 1999), não sendo possível usar amostras não invasivas devido a estas possuírem pequenas quantidades de ADN e este ser de reduzida qualidade (Kohn et al. 1995; Taberlet et al. 1996).

Só foi possível usar amostras não invasivas para estudos genéticos após Kary B. Mullis, em 1985, ter descoberto a Reação da Cadeia Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) de amplificação de sequências de ADN (Saiki et al. 1985; Morin e Woodruff 1996; Arnheim et al. 1999) que veio a tornar a vida dos biólogos moleculares mais simples (Mullis 1990; Powledge 2004) e a ser aplicada em diversos domínios científicos como o desenvolvimento, ecologia, evolução, comportamento e conservação (Fernando et al. 2003).

Estes avanços, chave na genética molecular, tem tido um grande impacto positivo no estudo genético de populações (Sunnucks 2000), sendo uma ferramenta de obtenção de informação que tem revelado um grande potencial (Waits e Paetkau 2005). Tornou o estudo do material genético presente em dejetos uma técnica praticável por se tornar possível isolar e amplificar pequenas quantidades, degradadas e impuras de ADN, permitindo assim a obtenção de informação vital sobre as populações, tais como a identificação da espécie, indivíduos, género, patologias, hábitos alimentares, tamanho da população, relações de parentesco, permitindo ainda estimar a sua área vital (Mullis e Fallona 1987; Kohn et al. 1995; Kohn e Wayne 1997).

Em 1992, os métodos não invasivos foram introduzidos para obter amostras genéticas de *Ursus arctos,* espécie rara e elusiva na Europa (Hoss et al. 1992, Taberlet e Bouver 1992 in Waits e Paetkau 2005) e para estudar a estrutura social de chimpanzés (*Pan troglodytes*) (Morin e Woodruff 1992).

As técnicas já foram aplicadas ao reconhecimento dos dejetos de uma grande variedade de espécies simpátricas (Mills et al. 2011 in Laguardia et al. 2015), para a distinção de uma comunidade de carnívoros (Fernandes et al. 2008), para detetar híbridos (Adams et al. 2003 in Laguardia et al. 2015) e ainda identificar casos de parasitismo no produtor do dejeto (Gompper et al. 2003).

Em matéria de conservação, a falta de informação sobre as espécies tem sido um problema notório que as técnicas não invasivas podem eliminar (Hohn e Wayne 1997).

O método de inventariação de espécies tendo por base apenas a morfologia dos dejetos não deve ser utilizado na ausência de uma verificação genética da identidade da espécie produtora dos dejetos, por estes resultados serem definitivos e não subjetivos (Foran et al. 1997) em especial quando se trata de espécies que ocorrem em reduzidas densidades (Birks et al. 2004) e em comunidades diversificadas. Apesar dos alertas lançados, pouca atenção tem sido dada à confiança e utilidade que as técnicas moleculares podem constituir para estudos não invasivos e programas de conservação (Taberlet et al. 1999).

Para o uso destas técnicas moleculares é contudo preciso ter em conta múltiplos fatores que, no campo e no laboratório, podem contribuir para a qualidade e quantidade do ADN presente no dejeto (Murphy et al. 2007).

Os dejetos amostrados no campo, devem ser colhidos usando instrumentos limpos, assim como deve ser o local de armazenamento dos dejetos (Foran et al. 1997). Deve-se ainda procurar recolher as amostras o mais frescas possíveis, pois aumenta a probabilidade de sucesso de identificação por métodos moleculares (Kohn et al. 1995; Foran et al. 1997; Taberlet et al. 1997).

Uma vez que as células que contêm ADN que se pretende extrair se encontram na superfície do dejeto, deve-se realizar subamostras retirando partes superficiais do dejeto, aumentando a probabilidade de obtenção de células epiteliais e reduzindo a potencial contaminação pela matéria não digerida, e não alvo, presente nos dejetos que será co extraída (Reed et al. 2004). De cada dejeto deve ser realizada mais do que uma subamostra, pois as células epiteliais normalmente não se distribuem uniformemente por todo o dejeto (Kohn et al. 1995; Stenglein et al. 2010) por razões fisiológicas, pela dieta (Fernando et al. 2003) ou pela influência ambiental que leva a diferenças de degradação entre os decompositores no solo (Santini et al. 2007) e a exposição aos raios UV, podendo-se assim subamostrar uma área com muitas células ou sem quaisquer células (Kohn et al. 1995). O contacto direto do dejeto com o solo facilita a invasão por micro-organismos decompositores, o que acelera a taxa de degradação de ADN. Em contraste dejetos depositados em rochas são mais lentamente invadidos por decompositores (Santini et al. 2007). Incluir o material interno do dejeto ou homogeneizar reduz a qualidade e/ou quantidade de ADN (Stenglein et al. 2010).

Por os dejetos se encontrarem expostos a vários fatores, possuem muitas vezes ADN em pequenas quantidades, na gama de picogramas (1 picograma = 0,001 nanograma), degradados e por isso de reduzida qualidade (Kohn et al, 1995; Taberlet et al. 1996; Taberlet and Luikart 1999).

O ADN mitocondrial (ADNmt) é um genoma que não sofre recombinação, é extracelular e haploide. Este encontra-se nas células em maior quantidade (entre 10 a 25000 cópias numa célula) que no caso do ADN nuclear (ADNn), com apenas uma cópia, tornando-se mais fácil de trabalhar e obter resultados (Kohn e Wayne 1997; Reed et al. 1997 in Reed et al. 2004).

Por o ADN se encontrar degradado obtêm-se resultados mais consistentes quando se amplificam pequenos fragmentos de ADNmt em relação a longos fragmentos, pois corre-se um maior risco de não se obter resultados pelas cadeias poderem estar fragmentadas (Kohn et al. 1995; Kelly et al. 2012).

Os resultados e amplificação do ADN recorrendo a primers, são conseguidos usando a técnica de PCR. O PCR é um processo enzimático em que uma região específica da cadeia de ADN é replicada repetidamente, gerando milhões de cópias de uma sequência particular, tornando o ADN a concentrações utilizáveis (Arnheim et al. 1990; Taberlet et al.1996; Sunnucks 2000; Piggott e Taylor 2003; Powledge 2004). Este ADN pode ser obtido a partir de amostras pequenas, degradadas e impuras (Arnheim et al. 1990), tais como as amostras de dejetos.

As sequências de ADN codificam a informação genética e são compostas por quatro deoxinucleotídeos (dNTP): dATP (desoxiAdenosina Trifosfatada), dCTP (desoxiCitidina Trifosfatada), dGTP (desoxiGuanosina Trifosfatada) e dTTP (desoxiTimidina Trifosfatada). Estas ligam-se em dupla cadeia em sequências complementares (Adenina liga-se à Timina e a Guanina à Citocina) (Mullis 1990). Além destes compostos a reação necessita de um ADN template e ainda de dois "primers" ou oligonucleotideos que são pequenas cadeias simples de sequência específica de bases (Powledge 2004), normalmente desenhadas para zonas evolutivamente conservadas (Sunnucks 2000).

Este processo consiste em repetidos ciclos de desnaturação (separação das cadeias) pela temperatura, hibridação dos primers (*anneling*) e extensões (adição de dNTPs ao primer de forma complementar ao ADN template (Mullis 1990)) pelo ADN polimerase (Mullis et al. 1986; Mullis 1990; Powledge 2004) (enzima descoberta em 1955 por Arthur Kornberg) que tem várias funções nas células incluindo a reparação e replicação de ADN (Mullis 1990; Powledge 2004) (Figura I.1). A ADN polimerase, presente em todos os seres vivos (Powledge 2004) requer sempre um primer para iniciar a reacção e a polimerase utilizada nos PCR é produzida por uma bactéria termofilica (*Thermus aquaticus* - *Taq*) que pela sua resistência à temperatura de desnaturação permite que toda a reação tenha lugar a temperaturas suficientemente elevadas para que os primers se liguem especificamente às sequências alvo (Morin e Woodruff 1999; Powledge 2004). Os fragmentos amplificados são determinados pelos primers por estes corresponderem às extremidades do fragmento (Mullis et al. 1986) e a temperatura de hibridação está dependente do conteúdo de G/C

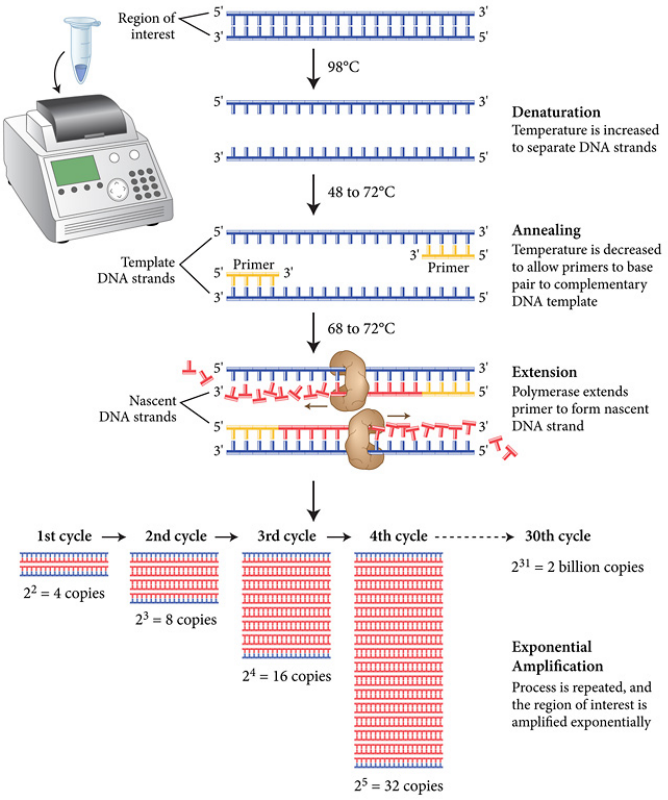
presente nos primers usados (Kohn et al. 1995), sendo o ideal entre 40 e 60% G/C de conteúdo e podendo calcular-se aproximadamente a temperatura de anneling segundo: (G+C)4+(A+T)2 (Roux 1995).

O ADN é exponencialmente amplificado (após *n* ciclos são criadas 2^n mais moléculas que inicialmente), aumentando a concentração ao longo dos ciclos (Mullis et al. 1986; Arnheim et al. 1990). Apenas numa tarde consegue-se gerar 100 biliões de moléculas similares a uma molécula de material genético inicial (Mullis 1990) (Figura I.1).

No caso dos dejetos que possuem ADN em apenas alguns nanogramas ou menos que um nanograma, o número de ciclos de PCR deve ser aumentado de modo a que o produto possa ser detetado e analisado (Taberlet e Luikart 1999).

Os produtos obtidos no PCR são separados em géis de agarose/eletroforese os quais separam os oligonucleotideos/primers extendidos (sequências alvo) dos dNTPs residuais visualizando-se os resultados usando luzes UV (Mullis 1990; Zhang et al. 2006).

Caso o ADN se encontre demasiado degradado, e não permita que os primers se liguem, o PCR não irá produzir qualquer resultado, ao contrário de contaminações ou ligações inespecíficas (Foran et al. 1997). Para controlar contaminações e ligações inespecíficas deve-se sempre incluir brancos de extração e de PCR em todas as reações (Kohn et al. 1995).



I.1 - Esquema ilustrador das etapas do PCR dentro do termociclador às diferentes temperaturas. É possível visualizar como a amplificação é exponencial ao longo dos ciclos. (http://www.neb.com)

1.1. Limitações da técnica

Os investigadores, têm destacado potenciais fraquezas nas amostras não invasivas como reduzidas taxas de sucesso, contaminações e um elevado erro na genotipagem (Taberlet et al. 1996, 1999).

As limitações dos métodos não invasivos resultam sobretudo da reduzida quantidade e qualidade de ADN (ADN degradado) presente nos dejetos mas também da reduzida qualidade do extrato (presença de fatores inibitórios) (Kohn et al 1995; Taberlet et al. 1999; Piggott e Taylor 2003).

A qualidade do ADN depende de variáveis biológicas (decompositores como bactérias, fungos, minhocas e insetos) e físicas (raios ultra violeta, humidade, chuva, temperatura, etc) a que os dejetos estão sujeitos após a sua deposição. E apesar da aparência física do dejeto não definir a qualidade do dejeto (por exemplo, um dejeto em ambiente húmido poderá parecer fresco e no entanto ser mais antigo que um dejeto que está num ambiente seco) (Foran et al. 1997), a idade do dejeto é um dos fatores que está diretamente relacionado com o sucesso dos resultados. Quanto mais fresco o dejeto (mais recentemente depositado pelo produtor) for recolhido e preservado, maior o sucesso (Kohn et al. 1995; Foran et al. 1997; Taberlet et al. 1997; Reed e Lucchini 2002 in Reed et al. 2004). Isto porque além dos fatores a que estão expostos no ambiente, o ADN torna-se instável quando separado dos processos celulares normais (Lindahl 1993 in Stenglein et al. 2010; Deagle et al. 2006; Broquet et al. 2007).

A qualidade do ADN também se poderá revelar diferente consoante a estação do ano da colheita (Fernando et al. 2003; Piggott 2004; Murphy et al 2007). Climas frios e secos preservam melhor o ADN do que os que se caracterizam por épocas de chuva, humidade ou os climas quentes (Lucchini et al. 2002 in Santini et al. 2007). O método de preservação também pode ser um fator limitante (Machiels et al 2000). Os métodos de preservação poderão comprometer a análise genética passado semanas ou meses da amostragem (Taberlet e Luikart 1999), sendo importante limitar a degradação do ADN antes da extração (Taberlet et al. 1999) e maximizar a quantidade e qualidade do ADN recolhido (Piggott e Taylor 2003).

A qualidade do extrato é normalmente reduzida pelo facto dos dejetos, além de conterem células do intestino do hospedeiro, possuírem ainda uma mistura complexa de outros componentes (micro-organismos, alimento não digerido, enzimas digestivas, muco, sais biliares e bilirrubina) (Sidransky et al. 1992 in Kohn e Wayne 1997), em que quer o ADN das presas ingeridas (dieta), quer o ADN bacterial são co extraídos com o ADN da espécie alvo (Hoss et al. 1992). Esta reduzida qualidade pode ter como consequência a inibição do ADN Taq Polimerase, o que provoca amplificações pobres ou a não existência de

amplificações (Roux 1995). Estas inibições podem ser diminuídas usando na extração "grânulos absorventes" (método de sílica), que já se encontram incluídos em muitos kits comerciais (Taberlet e Luikart 1999; Taberlet et al. 1999). No PCR as inibições podem ser limitadas adicionando BSA (Albumina Sérica Bovina) (Kohn e Wayne 1997), no entanto não resolve todas as inibições mas aumenta a taxa de sucesso (Paabo et al. 1988).

A especificidade dos primers depende dos mesmos e das condições de PCR utilizadas (Roux 1995). O facto de ser extraído ADN, quer da espécie alvo como dos itens da dieta, e dependendo da similaridade das sequências, pode levar a erros e a ligações incorretas dos primers (Piggott e Taylor 2003). A especificidade aumenta se os primers utilizados forem específicos (Kohn e Wayne 1997; Piggott e Taylor 2003), no entanto se as condições de PCR não forem as ótimas podem ocorrer amplificações não específicas de tamanhos variados (Kohn et al. 1995).

Por isso, se as condições não forem ótimas, podemos por um lado, se forem acima do ótimo, ter uma falha de amplificação e não ter nenhum produto amplificado, ou por outro, se forem abaixo do ótimo, gerar produtos múltiplos, não definidos e não desejados (Roux 1995).

Apesar da reduzida quantidade de ADN normalmente extraído, é possível através do PCR detetar apenas uma molécula alvo, sendo necessário aumentar o número de ciclos. Com a possibilidade de detetar apenas uma molécula alvo, existe também a hipótese de detetar uma molécula contaminante (Taberlet e Luikart 1999) que durante todo o processo pode ser uma potencial fonte de erro, devendo ser incluídos brancos de extração e brancos de PCR em todas as reações (Roux 1995; Kohn e Wayne 1997; Taberlet e Luikart 1999). Além destes brancos, deve existir uma separação física dos locais onde se realiza a fase pré-PCR e a fase pós-PCR, evitando ter extratos de ADN concentrados no local de pré-PCR (Roux 1995; Taberlet e Luikart 1999), pois a melhor maneira de evitar contaminações é prevenindo (Roux 1995).

Para minimizar as consequências negativas da degradação do ADN dos dejetos, as condições de amostragem e os métodos de preservação devem ser otimizados para cada caso de estudo (Piggott 2004; Santini et al. 2007). Assim, mesmo que tenha sido extraído uma grande quantidade de ácidos nucleicos dos dejetos, o ADN poderá estar demasiado degradado ou o extrato conter componentes que inibem a Taq polimerase não permitindo a obtenção de resultados em algumas amostras (Kohn et al. 1995; Taberlet e Luikart 1999; Murphy et al. 2000; Zhang et al. 2006).

Pelas diversas limitações referidas, existem fatores de grande relevância para o produto final como o método de preservação (Wasser et al. 1997; Murphy et al. 2000; Murphy et al. 2002; Piggott e Taylor 2003), o método de extração de ADN (Flagstad et al.

1999; Goossens et al. 2000; Frantz et al. 2003; Wehausen et al. 2004) e o método de amplificação (Goossens et al. 2000; Bellemain e Taberlet 2004; Piggott et al. 2004).

2. A Ordem Carnívora enquanto modelo biológico

O grupo de animais escolhido para este estudo foram os mamíferos carnívoros pelas funções que desempenham na estrutura e funcionamento dos ecossistemas, pelo nível trófico que ocupam e por ser um táxon relevante em conservação, como será descrito neste capítulo.

A ordem dos carnívoros surgiu há 54 milhões de anos, no Eocénico (Gittleman 2013). Os mamíferos carnívoros dominantes em Portugal são de médio porte e por isso designam-se frequentemente por mesocarnívoros. Uma vez que, com exceção do lobo (*Canis lupus*) e do lince (*Lynx pardinus*), não existem em Portugal carnívoros de grande porte, os mesocarnívoros atuam como carnívoros de topo (Gittleman e Gompper 2005). Em geral estes, apesar de representarem a maior parte das espécies da ordem, são menos conhecidos que os mamíferos de grande porte (Gittleman e Gompper 2005; Hoffmann et al. 2010) devido à dificuldade na obtenção de informação e financiamento para o seu estudo.

Estes predadores, sobretudo os de grande porte, recebem uma considerável atenção na perspectiva da conservação. Apesar deste apoio se dever sobretudo à sua imagem carismática e chamar a atenção de diversos segmentos da sociedade, existem razões biológicas que justificam direcionar os recursos para a conservação de carnívoros (Gittleman e Gompper 2005).

Ao longo do tempo os carnívoros têm sido particularmente afetados pela deterioração ambiental e têm sofrido pressões devido a vários fatores como a sobre-exploração, a destruição e fragmentação do habitat, o declínio de presas, as patologias e o aumento da competição interespecífica, fatores que têm levado a um declínio geral das populações (Hueta 1992; Gittleman e Gompper 2005).

A relação conflituosa com o Homem, tem feito com que os carnívoros sejam intensamente perseguidos, o que contribuiu para a sua adaptação comportamental adotando uma atividade quase estritamente crepuscular e noturna (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

No decurso da sua evolução os mamíferos, e os carnívoros em particular, desenvolveram muito a audição e o olfato, sendo os odores muito importantes para a comunicação intraespecífica e interespecífica. Estes podem ser produzidos a partir de produtos fisiológicos secundários como excrementos, urina, suor ou secreções especiais. Estes odores servem para comunicar socialmente e marcarem território (Ruiz-Olmo 2012).

Uma das principais características que favorece a extinção, é a raridade, característica inerente à ordem carnívora e por isso é um grupo particularmente vulnerável (Humphrey 1985 in Hueta 1992), que merece particular atenção na perspectiva conservacionista.

Os carnívoros em geral são K estrategistas, o que significa que têm um número reduzido de crias, gestações longas e longos períodos de cuidados parentais até as crias adquirirem as aptidões necessárias para sobreviverem (Hickman et al. 2001), o que se traduz em reduzidas abundâncias.

Uma vez que os carnívoros ocupam o topo da cadeia alimentar, são os menos abundantes de toda a pirâmide, exercendo, desproporcionalmente à sua biomassa, uma elevada influência na estruturação das comunidades (Gittleman e Gompper 2005). A cada nível trófico a biomassa diminui e muita energia perde-se a cada nível, sendo que a transferência de energia ao longo da cadeia tem uma reduzida eficiência. Estes factos impõem a reduzida abundância dos carnívoros e a necessidade de procurarem alimento em áreas muito mais distantes que os elementos das cadeias tróficas inferiores (Begon et al. 1986 in Hueta 1992), obrigando-os também a terem áreas vitais de grande extensão.

Cada indivíduo, e o seu comportamento, influencia toda a comunidade faunística e florística em que se insere (Gittleman e Gompper 2005), e daí a importância da sua conservação.

Os predadores, têm uma importante função na estruturação dos ecossistemas pelo seu papel na regulação de presas, na competição ou ambas (Crooks e Soulé 1999; Beschta 2003; Estes et al. 2004; Ripple et al. 2001 in Cupples et al. 2011).

A exterminação de carnívoros, pelo homem, em algumas áreas tem levado à reprodução excessiva de alguns herbívoros o que provoca um desequilíbrio no ecossistema (Hickman et al. 2001). Sem estes agentes reguladores, o número de presas aumenta até se esgotarem os recursos. As variações nas densidades das presas também afetam a densidade de predadores, estabelecendo-se uma dependência mútua no controlo de densidades (Ruiz-Olmo 2012).

Os carnívoros também impulsionam a evolução, uma vez que selecionam as presas mais fáceis (menos aptas, feridas, etc.) e a adaptação destas faz com que os carnívoros também evoluam (Ruiz-Olmo 2012).

Alguns carnívoros são ainda capazes de limitar as populações de outros carnívoros (matando-os e por vezes alimentando-se dos mesmos) de modo a terem mais recursos disponíveis e menos competição (Ruiz-Olmo 2012).

Apesar de quando se fala de carnívoros, nos referirmos a animais que comem carne, ou seja, se alimentam de outros animais (Ruiz-Olmo 2012), muitos carnívoros na verdade são omnívoros. Na sua origem alimentavam-se apenas de carne, mas a história evolutiva permitiu que conquistassem outros nichos que os respetivos antepassados não ocupavam

(Ruiz-Olmo 2012). Atualmente alimentam-se de vários recursos de múltiplos níveis tróficos, como plantas, invertebrados ou vertebrados. Os seus hábitos, por vezes omnívoros, atuam como defesa contra flutuações da disponibilidade de espécies de presas particulares (Eubanks e Denno 1999).

Atualmente, pela sua dieta diversificada, também assumem um importante papel enquanto dispersores de sementes dos frutos consumidos (zoocoria), ajudando assim a moldar a paisagem e a estruturar o ecossistema (Rosalino, Rosa e Santos-Reis 2010; Ruiz-Olmo 2012).

Por todas estas razões os mamíferos carnívoros são um grupo que é importante investigar e conservar.

Em anexo (Anexo 1), apresentam-se as espécies de mesocarnívoros que ocorrem em Portugal e as suas características em particular.

2.1. Monitorização de Carnívoros

Os mamíferos carnívoros, são na sua maioria espécies noturnas, secretivas, possuem uma elevada mobilidade e uma vasta área vital, vivendo em habitats de vegetação densa ou em áreas remotas (Kohn et al. 1999; Engeman e Witmer 2000 in Witmer 2005; Gese 2001; Sadlier et al. 2004), o que torna a sua deteção, observação direta e captura difíceis (Foran et al. 1997; Sutherland1996; Prugh e Ritland 2005). Muitas destas espécies estão em declínio o que torna a sua observação ainda mais difícil e aumenta a necessidade de obter informação sobre as mesmas (Kohn e Wayne 1997). Por se verificar o declínio destas espécies, muitas beneficiam de um estatuto de proteção, o que impõe limitações no estudo das suas populações por métodos tradicionais invasivos (Davison et al. 2002).

As características dos carnívoros fazem com que os programas de inventariação ou monitorização de populações seja um problema (Gese 2001), uma vez que a maioria dos métodos para obter informação são logisticamente difíceis de implementar (Piggott e Taylor 2003). A fonte de informação mais acessível e mais comum no estudo de carnívoros são os dejetos (Putman 1984 in Reed et al. 2004), por ser o melhor método não invasivo para a monitorização de populações e determinação de dietas (Foran et al. 1997; Reed et al. 2004). No entanto, um estudo de Gompper et al. (2006), sugere que apenas uma técnica não é o ideal para o estudo de todas as espécies de carnívoros, sendo que as técnicas mais adequadas diferem entre espécies.

A amostragem de dejetos em carnívoros é facilitada por serem frequentemente abundantes e estes normalmente depositarem os mesmos em locais conspícuos e/ou proeminentes, como estradas, trilhos ou rochas/tufos de vegetação, usando-os para a comunicação intra e interespecifica (Gorman e Trowbridge 1989; Prugh e Ritland 2005). Por

este motivo a amostragem de dejetos é uma das técnicas mais usadas em estudos de carnívoros (Wilson et al. 1996; Birks et al. 2007; Gompper et al. 2000; Barea-Azcon et al. 2007 in Garcia e Mateos 2009). No entanto, a maioria das áreas naturais suportam várias espécies de carnívoros, de tamanho similar, o que aumenta o nível de incerteza na sua identificação (Prugh e Ritland 2005); porém, os avanços tecnológicos e metodológicos têm contribuído para um rápido incremento de estudos não invasivos de carnívoros (Kelly et al. 2012).

Múltiplos estudos têm demonstrado que o reconhecimento errado dos dejetos de vários carnívoros simpátricos é recorrente (e.g., Davison et al. 2002; Palomares et al. 2002; Dalén et al. 2004).

Os mustelídeos, marta e fuinha, são exemplo disso, sendo espécies similares em termos de morfologia, alimentação e comportamento, e simpátricas numa grande área da Europa (Ruiz-González et al. 2008). O facto da marta estar em declínio e ameaçada, a abundância da fuinha estar a aumentar em muitos países, e ambas terem um comportamento elusivo (tal como a maioria dos carnívoros), faz com haja a necessidade de monitorizar corretamente as suas populações. Mas os seus dejetos são indistinguíveis e por isso são populações de difícil monitorização (Ruiz-González et al. 2008), podendo ainda serem confundidos com os de raposa (Davison et al. 2002), geneta, e outros mustelídeos como o arminho, o toirão e o visão (Birks et al. 2004); acresce que o erro é superior quando as densidades de marta são muito reduzidas (Davison et al. 2002). Por isso o método de distinção dos dejetos e obtenção de mais informação sobre as duas espécies, só é possível através de análises moleculares (Ruiz-González et al. 2008).

Este também é um problema para o lince ibérico, espécie ameaçada, de atividade predominantemente noturna e cujos os limites geográficos da sua distribuição atual e a dimensão das subpopulações não são bem conhecidos. Os seus dejetos podem ser confundidos com os de raposa, gato selvagem, gato doméstico e cão (*Canis lupus familiaris*) (Palomares et al. 2002).

Estes dois exemplos demonstram a necessidade do uso de análises moleculares para uma correta monitorização, sobretudo para espécies em declínio ou ameaçadas.

3. Dieta dos carnívoros e sua importância na identificação dos excrementos

Os carnívoros alimentam-se de múltiplas presas, desde plantas, a invertebrados ou vertebradas, podendo a dieta variar com a disponibilidade de presas (Eubanks e Denno 1999 in Gittleman e Gompper 2005; Lanszki et al. 1999).

A análise de dejetos é uma fonte de informação sobre a atividade alimentar dos carnívoros, porque os recursos incompletamente digeridos, revelam o que o animal comeu (Chin 2002).

Os dejetos são constituídos por partes não digeríveis dos alimentos, como pêlos, penas, ossos, fragmentos do exoesqueleto de insetos, matéria vegetal, e ainda células da parede intestinal do animal produtor e um grande número de bactérias vivas ou mortas (Mathias e Ramalhinho 1999). Estas partes não digeríveis podem proporcionar informação sobre os alimentos consumidos (Mathias e Ramalhinho 1999) mas influenciam a morfologia dos mesmos (M. Santos-Reis, com. pess).

A análise da dieta pode fazer-se segundo diversos métodos (métodos qualitativos e quantitativos), os quais devem ser definidos segundo os objetivos (Klare et al. 2011).

No presente estudo, a análise da dieta foi relevante, não para estudar a dieta das espécies, mas para se compreender de que forma os recursos consumidos podem alterar a morfologia dos dejetos e dificultar ou facilitar a sua identificação apenas com base na observação.

I.2 - Raposa (© Laurent Geslin / naturepl.com), fuinha (© M. Watson / www.ardea.com) e texugo (© Stephen Dalton / www.photoshot.com) a alimentarem-se.

4. Objetivos do estudo

Uma vez compreendida a importância da correta monitorização das populações de mamíferos carnívoros na elaboração e sucesso dos planos de conservação, e o facto de muitas vezes esta monitorização ser realizada por métodos aparentemente fiáveis mas que têm demonstrado algum grau de incerteza, o presente estudo teve como objetivo comparar dois métodos de monitorização não-invasivos, recorrendo à mesma amostra, permitindo assim avaliar os fatores que influenciam o sucesso de ambos os métodos. Procurou-se comparar o método convencional de identificação de dejetos (critério exclusivamente morfológico) com o método molecular, mais dispendioso e com uma importância crescente.

Outro objetivo deste estudo foi compreender que fatores influenciam o sucesso nos dois métodos, enfatizando a influência do conteúdo alimentar dos dejetos na fiabilidade dos resultados.

Quis-se ainda testar se os resultados poderiam ser generalizados temporal e espacialmente ou se existiriam diferenças ao longo do tempo e entre locais que alterassem as conclusões e devessem ser tidos em conta nos estudos de monitorização das populações. Para tal estudou-se a comunidade de mesocarnívoros ibéricos presente em duas áreas distintas (Herdade da Ribeira Abaixo, Alentejo e Companhia das Lezírias, Ribatejo) e em estações do ano diferentes (outono, inverno e primavera).

Pretende-se com este estudo apresentar resultados que auxiliem no planeamento de uma monitorização não invasiva com recurso a dejetos e se diminua a percentagem de erro na identificação em futuros estudos com mesocarnívoros.

II. Metodologia

1. Áreas de estudo

Neste estudo, o trabalho de campo foi conduzido em duas áreas distintas. Na Herdade da Ribeira Abaixo (Estação de Campo do Centro de Ecologia, Evolução e Alterações Ambientais da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa) e na Charneca do Infantado da Companhia das Lezírias, S.A. (Figura II.1).

II.1 - Localização das duas áreas de amostragem. As linhas brancas assinalam os limites da Charneca do Infantado (CL) da Companhia das Lezírias, à esquerda, e da Herdade da Ribeira Abaixo (HRA), à direita.

Ambas as áreas situam-se em paisagens de montado, uma formação típica da região Mediterrânica (Pinto-Correia et al. 2013). É um sistema de origem antropogénica que resulta do uso agro-silvo-pastoril sendo por isso característico do sistema o uso múltiplo do solo (Pinto-Correia et al. 2013) (Figura II.2).

O montado ocupa uma área considerável de Portugal (superfície total de 1.067.944 ha) (Pinto-Correia et al. 2013) e os habitats de *"Montado de Quercus spp. de folha perene"*, *"Florestas de Quercus suber"* e *"Florestas de Quercus iles e Quercus rotundifolia"* são considerados de conservação obrigatória e devido à sua importância estão incluídos na Diretiva Habitats, que estabelece medidas de preservação dos habitats naturais e da flora e fauna selvagem, que integra várias espécies em perigo como algumas aves de rapina e mamíferos carnívoros (Pereira et al. 2004; Pinto-Correia et al. 2013).

II.2 - Sistema de montado de sobreiro português e a atividade de pastoreio típica do sistema. Foto de cerca de 1948 a 1955 do fotografo Charles Fenno Jacobs (catalog.archives.gov)

As duas áreas de estudo caracterizam-se pelo clima semiárido (tipo Mediterrâneo), com um inverno frio e húmido e um verão quente e seco (Correia e Santos-Reis 1999; Pereira et al. 2001; Guilherme 2010), que leva ao aparecimento de uma vegetação dominada por árvores e arbustos de folha perene e plantas herbáceas anuais (Feijão 2011).

1.1. Herdade da Ribeira Abaixo

A Herdade da Ribeira Abaixo (38º8'N-8º33W, UTM 29SNC3717) integra-se numa das maiores áreas de montado de Portugal, situando-se a Sul de Grândola (Baixo Alentejo), na Freguesia de Sta. Margarida da Serra (Figura II.1).

Tem uma área de cerca de 221 hectares onde a árvore mais representativa é o sobreiro que se distribui por praticamente toda a herdade (Pereira et al. 2004) (Figura II.3). É limitada a nascente pela Ribeira dos Castelhanos, contendo também várias linhas de água temporárias que desaguam nesta Ribeira (Correia e Santos-Reis 1999; Pereira et al. 2004).

A área possuí uma precipitação média anual de 500 mm, uma temperatura média anual de 15.5ºC e 3-4 meses de seca (Correia e Santos 1999; Pereira et al. 2004).

As práticas agrícolas e pecuárias sofreram um abandono gradual nas últimas décadas persistindo apenas a extração de cortiça, o que tem permitido o aumento do estrato arbustivo e a regeneração da vegetação antecedente ao montado (floresta lusitana de carvalho) (Pereira et al. 2004).

Nesta área pode encontrar-se mais de 64% das espécies de mamíferos carnívoros que ocorrem em Portugal, estando documenta a presença de oito diferentes espécies. Seis utilizam a herdade de forma generalizada - a raposa, a doninha, a fuinha, o texugo, a geneta e o sacarrabos - e duas apresentam uma área de ocupação mais restrita - a lontra e o toirão (Santos-Reis et al. 1999).

Em termos de presença a raposa, fuinha e o texugo são os mais abundantes e o sacarrabos, a geneta, a lontra e a doninha encontram-se numa abundância relativa mais reduzida (Gomes 2015).

A herdade alberga ainda uma grande diversidade de espécies de fruto que são consumidos por vários vertebrados, incluindo os carnívoros, como a silva (*Rubus ulmifolius*), a salsaparrilha-brava (*Smilax aspera*), o medronheiro (*Arbutus unedo*), a pereira-brava (*Pyrus bourgaeana*), a ameixoeira (*Prunus* sp.), a macieira (*Malus* sp.), a figueira (*Ficus carica*), o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), a nespereira (*Eriobotrya japonica*), a oliveira (*Olea europaea*) e a videira (*Vitis vinifera*) (Rosalino et al. 2010), existindo também hortas dispersas resultantes da ocupação da serra em períodos anteriores.

Apesar do montado ser um sistema florestal de origem antropogénica, atualmente, a Herdade da Ribeira Abaixo, devido à sua vocação enquanto estação de investigação científica (Estação de Campo do cE3c/FCUL), não sofre uma gestão ativa do terreno, já que não é intervencionada com regularidade, não se observando um impacto antropogénico expressivo.

II.3 - Herdade da Ribeira Abaixo

1.2. Companhia das Lezírias

A Companhia das Lezírias do Tejo e do Sado, atualmente Companhia das Lezírias (CL) foi criada em 1836 (Companhia das Lezírias, n.d.) e é a exploração agropecuária e florestal de maior dimensão em Portugal (Simões 2009). Próximo de Lisboa, a Companhia das Lezírias tem uma dimensão de 18 mil hectares e é composta por três blocos, nos concelhos de Salvaterra de Magos, Vila Franca de Xira e Benavente, situando-se neste último a Charneca do Infantado, local onde decorreu a amostragem do presente estudo (Mendes 2014; Gonçalves et al. 2014).

Localizada na margem esquerda do estuário do Tejo, a 40 km a nordeste de Lisboa, a Charneca do Infantado tem cerca de 11 mil hectares (Simões 2009; Gonçalves et al. 2013; Gonçalves et al. 2014) e é atravessada por várias linhas de água que se ligam ao rio Tejo sendo estas consideradas importantes corredores ecológicos, zonas de refúgio e alimentação para animais de diferentes espécies (Gonçalves et al. 2013; Pereira 2010). Possuí ainda vários cursos de água intermitentes que só contêm água nos períodos de maior precipitação (Mendes 2014). A área tem temperatura anual média de 16ºC e uma precipitação de 700 mm/ano (período de 2002-2010) (Guilherme 2010).

A Charneca surgiu através de uma formação aluvionar antiga, tem solos pobres e pouco profundos. O aquífero tem pouca profundidade o que faz com que haja problemas de drenagem (Pereira 2010). Apesar destas características existem terrenos de prática agrícola, mas a maior ocupação é, no entanto, florestal (Pereira 2010; Gonçalves et al. 2014).

O montado de sobro (*Quercus suber*) é dominante, ocupando cerca de 6 7000 hectares, em povoamentos puros ou mistos em que o coberto vegetal também integra pinheiro bravo (*Pinus pinaster*), pinheiro manso (*Pinus pinea*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (Pereira 2010; Gonçalves et al. 2013; Gonçalves et al. 2014) (Figura II.5).

Quase toda a Charneca do Infantado encontra-se sujeita a condicionantes devido à sua inclusão em áreas de conservação da natureza, como na Reserva Natural do Estuário do Tejo (RNET), na Zona de Proteção Especial da Reserva Natural do Estuário do Tejo (ZPE Estuário do Tejo) e no Sítio de Importância Comunitária integrado na Rede Natura 2000 (Simões 2009; Pereira 2010; Guilherme 2010; Gonçalves et al. 2013; Mendes 2014).

Apesar das restrições é uma área sob o efeito de intervenção antropogénica significativa e constante pelas atividades de exploração agro-silvo-pastoril que nela são desenvolvidas (Simões 2009; Mendes 2014) (Figuras II.4 e II.6). As zonas ripárias são aquelas que apresentam menor intervenção ou não são diretamente intervencionadas, albergando por isso um número de espécies mais elevado (Simões 2009).

Na Companhia das Lezírias já foram detetadas 9 espécies de mamíferos da ordem carnívora: a raposa, a doninha, o toirão, a fuinha, o texugo, a lontra, a geneta, o sacarrabos, e o gato-bravo (Simões 2009; Gonçalves et al. 2013).

O estudo de Santos (2014) sugere que o texugo, raposa e sacarrabos ocorrem na Companhia das Lezírias em elevada densidade, ao contrário da geneta e do gato.

II.4 - Caminhos da Charneca da CL

II.5 - Paisagem da Companhia das Lezírias

II.6 - Gado a pastar no montado

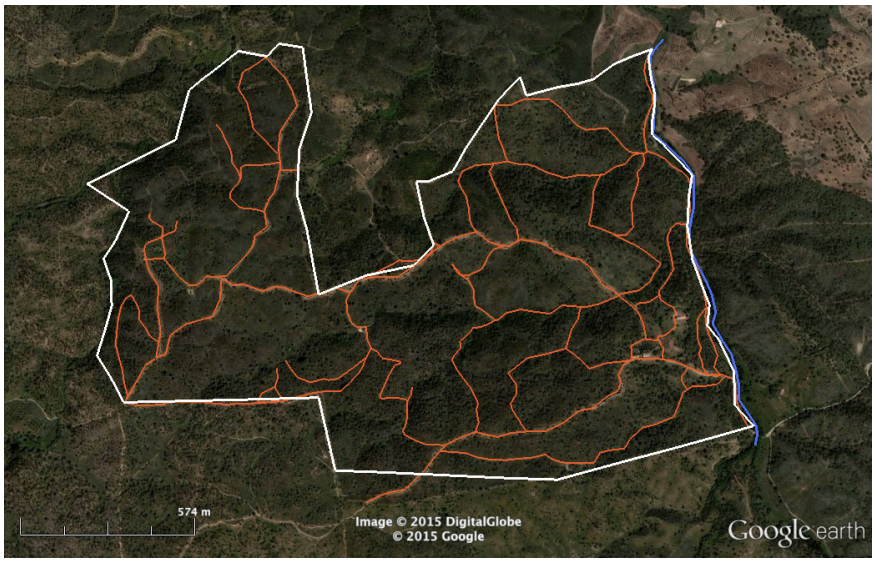
2. Metodologia de amostragem

Para obter as amostras pretendidas (dejetos de mesocarnívoros), foram definidos transectos recorrendo à rede de caminhos de terra existentes quer na Herdade da Ribeira Abaixo quer na Companhia das Lezírias.

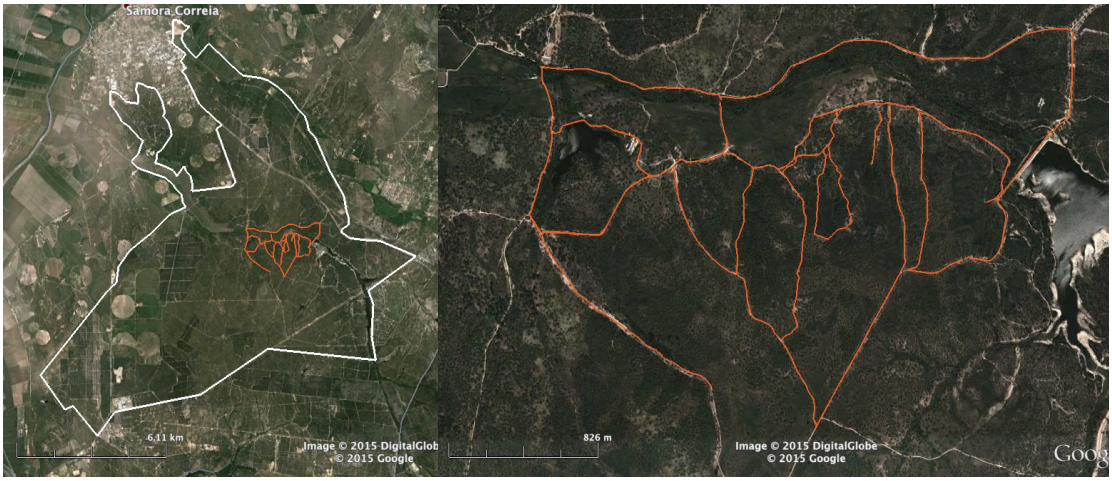
Tendo em conta as diferentes dimensões das áreas amostradas, foi definida, na Companhia das Lezírias, uma área de tamanho semelhante e com as características mais próximas possíveis, às que se encontravam na Herdade da Ribeira Abaixo.

Os transectos percorridos na Herdade da Ribeira Abaixo já se encontravam previamente definidos pois ocupam toda a área da mesma e correspondem à quase totalidade dos percursos pedestres existentes (Figura II.7). Para a definição dos transectos na Companhia das Lezírias, recorreu-se à aplicação Google Earth para o desenho dos mesmos, apesar de após a primeira amostragem terem sido ajustados para maximizar a amostragem (Figura II.8).

A extensão total dos transectos percorridos foi semelhante nas duas áreas sendo de aproximadamente 20 Km.



II.7 - Limites da Herdade da Ribeira Abaixo a branco, ribeira dos castelhanos a azul e percursos definidos como transectos a laranja (Google Earth)



II.8 - Limites da Companhia das Lezírias a branco e percursos definidos como transectos a laranja (com maior detalhe na imagem da direita – fonte Google Earth)

As amostragens de campo foram realizadas em três estações do ano diferentes (outono, inverno e primavera) para representarem a variação sazonal na disponibilidade de recursos alimentares e as diferentes condições ambientais.

A primeira amostragem (outono) decorreu na Herdade da Ribeira Abaixo em Outubro e na Companhia das Lezírias em Novembro e Dezembro.

A segunda amostragem (inverno) foi realizada na Herdade da Ribeira Abaixo em Fevereiro e na Companhia das Lezírias no mesmo mês.

A terceira e última amostragem (primavera) foi feita no mês de Abril, tanto na Herdade da Ribeira Abaixo como na Companhia das Lezírias.

Nas diferentes estações, os transectos previamente definidos foram percorridos a pé por duas ou três pessoas a um passo lento, de modo a garantir que a prospeção de dejetos nos caminhos fosse feita de forma eficaz, detetando assim o maior número possível. Os locais na imediação dos caminhos que demonstravam elevada probabilidade de marcação pelos mesocarnívoros (pedras, tufos de vegetação, margens de linhas ou pontos de água) foram também considerados.

Todos os dejetos detetados, à exceção dos mais degradados e antigos, impossíveis de identificar por critérios morfológicos (por estarem desagregados) quer através dos métodos moleculares (pelo facto de dificilmente terem algum material genético, que foi degradado for fatores ambientais e físicos), foram recolhidos na íntegra e feito o respetivo registo do local.

Todos os dejetos recolhidos foram previamente fotografados com escala para a posterior identificação pelos especialistas (método “expert-knowledge”) (Figura II.9).

Na identificação morfológica fez-se recurso a 5 observadores com experiência no estudo de carnívoros (método "expert-knowledge"), sendo os resultados comparados entre si e validados geneticamente.

II.9 - Dejecto de raposa fotografado com escala

Foram ainda registados (ver Anexo 2), o número de identificação, a espécie potencial (com base na morfologia e dimensões - comprimento x largura – observadas *in loco*), o número das fotos correspondentes, e a localização com recurso a GPS (Figuras II.10 e II.11).

As condições ambientais nos dias de amostragem foram também registadas pois é um fator que pode influenciar o estado do dejeto.

II.10 - Registo dos dados do dejeto

II.11 - Registo das coordenadas de localização do dejeto

O procedimento adotado para a recolha das amostras foi o seguinte: os dejetos foram borrifados com álcool para que fossem eliminadas algumas bactérias e fungos naturalmente presentes e fixar o ADN existente à superfície do dejeto. De seguida estes foram recolhidos na totalidade com o auxílio de luvas (descartadas a cada recolha) e colocados em tubos esterilizados e identificados de forma a evitar contaminações que pudessem comprometer os estudos moleculares posteriores (Figura II.12).

II.12 - Recolha de dejetos: pulverização com álcool e colheita com uma luva limpa para um tubo falcon esterilizado e identificado.

Todas as amostras, logo que possível, foram congeladas a -20º para que o ADN não se degradasse.

3. Seleção das amostras e subamostragem

As amostras alvo de análise (extração de ADN, identificação com base em marcadores moleculares mitocondriais – Fernandes et al. 2008 - e avaliação da dieta) foram selecionadas tendo em atenção vários parâmetros. Foram escolhidos os aparentemente mais recentes (pela maior probabilidade de sucesso na extração de ADN), intactos (para

facilitar a identificação pela morfologia) e com diferentes morfologias (pela possibilidade de pertencerem a diferentes espécies).

Tendo por objetivo mínimo obter a identificação genética de 30 amostras de cada área de amostragem e por estação do ano, foram sempre selecionados um número superior de amostras para a eventualidade de não se conseguir extrair ADN com sucesso ou chegar a uma identificação final em todas as amostras, quer pela reduzida quantidade e qualidade de material genético presente nos mesmos quer pela degradação do material.

Após a seleção dos dejetos estes foram preparados para a posterior análise molecular (Figura II.15).

Em laboratório fez-se a recolha de subamostras de cada dejeto selecionado de modo a apenas se realizar a extração de ADN das zonas onde poderiam existir células epiteliais do intestino da espécie predadora (mesocarnívoro), isto é, nas extremidades e zona mais superficial do dejeto (zonas de contacto direto com as paredes do intestino).

Estas subamostragens foram realizadas em ambiente estéril através da desinfeção de todo o material e bancada a cada subamostragem. A desinfeção da bancada foi feita com recurso a lixívia uma vez que esta degrada o material genético. As pinças usadas para recolher o material necessário dos dejetos e colocar em tubos eppendorf de 1,5ml (estéreis), foram desinfetadas usando álcool/etanol e colocadas à chama (Figura II.13). Não foram desinfetadas com lixívia como a bancada, pois haveria o risco de resíduos de lixívia ficarem nas pinças e degradar o material genético do dejeto na manipulação, comprometendo os resultados.

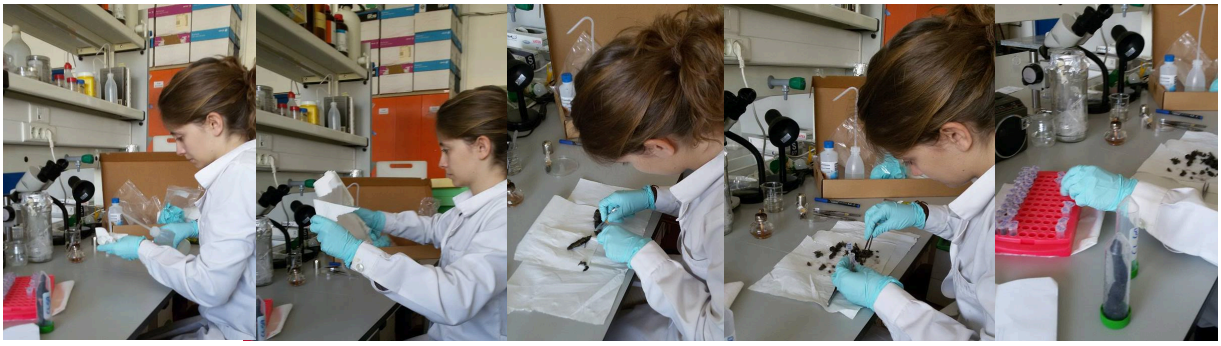
II.13 - Esterilização do material entre subamostragens

As luvas foram trocadas sempre que ocorreu contacto com o dejeto ou outra fonte de contaminação.

Para cada dejeto obteve-se duas subamostras (A e B) (Figura II.14). A segunda subamostra só foi utilizada quando não se obteve resultados da primeira e era essencial obter resultados da amostra em causa.

As subamostras foram igualmente guardadas a -20ºC de modo a preservar o material genético até se realizar a extração do mesmo.

II.14 - Tubos eppendorf com as subamostras A e B de algumas amostras da CL



II.15 - Processo de subamostragem dos dejetos: limpeza da bancada com lixívia, colocação de papel para evitar contaminações e uma maior contaminação da bancada, subamostragem com o auxílio de pinças, colocação dos fragmentos em eppendorfs e reserva dos mesmos

4. Extração e identificação genética das amostras

Para a extração do ADN mitocondrial foi utilizado um kit de extração "PSP® Spin Stool DNA *Plus* Kit" (Invitek) e foi seguido o protocolo do fabricante que se encontra em anexo (Anexo 3).

Este kit foi desenhado para o isolamento de ADN de micro-organismos patogénicos mas também para o pretendido, o isolamento do ADN do organismo produtor do dejeto.

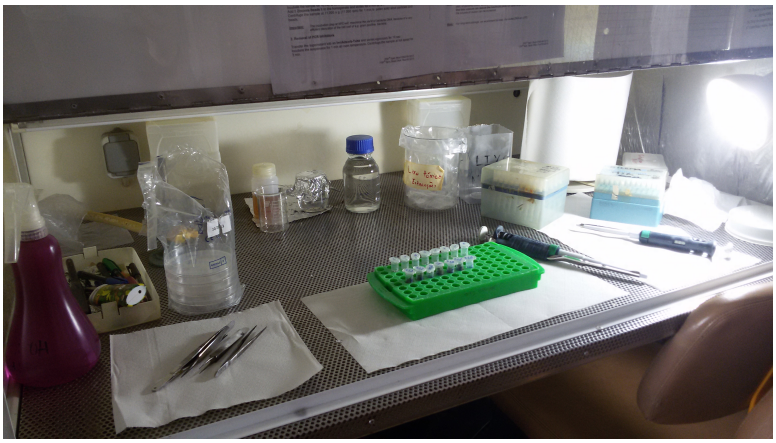
O procedimento resume-se às seguintes etapas: “lise” da amostra a temperatura ambiente (Lysis Buffer P), remoção dos inibidores de PCR presentes nos dejetos (InviAdsorb), digestão e degradação das proteínas (Proteinase K), ligação dos ácidos nucleicos (Binding Buffer P) à membrana das colunas coletoras (RTA Spin Filter), lavagem das colunas para eliminação de contaminantes e etanol (Wash Buffer I e II) e, por fim, a eluição dos ácidos nucleicos (Elution Buffer).

O volume final extraído recomendado pelo fabricante é entre 100µl e 200µl, optando-se por eluir e ter um volume final de 100µl para aumentar a concentração de ácidos nucleicos por µl, pois era previsível que a quantidade de ADN alvo extraído fosse reduzida.

As contaminações foram monitorizadas incluindo um controlo negativo de extração (branco de extração) em todas as extrações realizadas.

Todas as extrações foram realizadas dentro de uma hotte equipada com luzes UV exclusiva para o processo pré-PCR e o ADN extraído das amostras foi conservado a -20ºC.

Os equipamentos necessários foram limpos antes de cada utilização e após a utilização a bancada da hotte foi sempre limpa com lixívia e desinfetada usando as luzes UV. Todo o material usado a cada extração foi também colocado numa câmara de UVs.



II.16 - Material preparado para a realização de uma extração na hotte

Para a identificação da espécie produtora, através do ADN extraído dos dejetos, foi utilizado um painel de primers específicos desenhados por Fernandes et al. (2008) para identificar todos os mesocarnívoros Ibéricos. A robustez destes primers foi avaliada através do teste dos mesmos a dejetos cuja espécie produtora era conhecida, demonstrando o sucesso dos mesmos na identificação e daí a sua escolha para o estudo. Os primers foram utilizados numa concentração de 5 µM.

Na tabela II.1, encontra-se uma lista dos pares de primers utilizados no presente estudo, as suas sequências e o tamanho de bandas esperados dos produtos amplificados por PCR.

O primeiro PCR realizado às amostras, teve como objetivo confirmar se o material extraído continha material genético pertencente a algum carnívoro Ibérico ou não e para tal utilizou-se primers universais (L15533, H15791). Os resultados deste PCR determinaram imediatamente quais as amostras em que era possível obter uma identificação.

De seguida, foi realizado um segundo PCR para todas as amostras que continham material genético de carnívoro. Neste PCR foram utilizados primers destinados a identificar quais das amostras é que pertenciam à espécie *Vulpes vulpes* (raposa), visto que, por ser a de maior abundância em ambas as áreas, seria a mais provável de ser detetada, aplicando-se uma estratégia de custo-benefício.

Após estes resultados, os primers usados nos PCR seguintes foram os mais prováveis tendo por base a identificação potencial realizada em campo e validada pelo investigador mais experiente (M. Santos-Reis). Realizou-se ainda ao longo do processo testes à temperatura de anneling dos primers uma vez que alguns deles apresentavam inespecificidades.

Tabela II.1 - Primers usados para a identificação dos produtores dos dejetos através de PCR (*adaptado* de Fernandes et al. 2008)

Espécie alvo	Par de primer	Sequência	Extensão do fragmento (bp)
Universal Carnívoros	L15533	5'-CGGTAGAATGRATCTGAG-3'	---
	H15791	5'-AATGTAGTTGTCTGGGTC-3'	
Vulpes vulpes	Vvulpes F2	5'-ATAATCCTAGCCCTAGTG-3'	227
	Vvulpes R2	5'-GCGGTCAATAAGATAGCA-3'	
Canis lupus	Clupus F1	5'-CCCACTAGCCAAAATTGT-3'	252
	Clupus R1	5'-ATGAAGAATATGGAAGCG-3'	
Mustela nivalis	Mnivalis F1	5'-TAGTCCGCTATTCCGTAT-3'	182
	Mnivalis R1	5'-TATGAGGGGTTGTTAGAC-3'	
Mustela putorius	Mputorius F2	5'-TCCTCCGGAATTCCATCT-3'	233
	Mputorius R2	5'-GAGATGGATCGCAGAATG-3'	
Martes foina	Mfoina F2	5'-TATATTGGAACCAGCCTC-3'	275
	Mfoina R2	5'-CGGGATAGTACTAGTATC-3'	
Meles meles	Mmeles F2	5'-ATACCACCCCATATCAAG-3'	215
	Mmeles R2	5'-AATGTGAAGAGGTCTGCA-3'	
Lutra lutra	Llutra F1	5'-TGATCATCAACAACTCGC-3'	182
	Llutra R1	5'-ATTTTGGCAGATGTGTGC-3'	
Genetta genetta	Ggenetta F1	5'-ATACTACGGCTCATACTC-3'	210
	Ggenetta R1	5'-CTGTCTACTGAAAAGCCT-3'	
Herpestes ichneumon	Hichneumon F2	5'-ATGCTTGTAGCACTCATG-3'	224
	Hichneumon R2	5'-ATATGGAGTAGTGGTACG-3'	
Felis silvestris	Fsilvestris F2	5'-ATTATGGCTCCTACACCT-3'	181
	Fsilvestris R2	5'-CGTTCTACTAGTTCAGTC-3'	

A amplificação por Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR), foi realizada num volume total de 10µl, contendo 3 µl do produto de extração de ADN e 7 µl de mix. Esta mix é composta por 2,37 µl de ddH_2O, 1 µl de PCR Buffer, 0,8 µl de $MgCl_2$, 0,8 µl de dNTP (Bioline), 0,6 µl de BSA, 0,8 µl de primers a 0,5 µM e 0,13 µl de NZY Taq Polimerase (Tabela 7.2). Os valores da mix destinam-se à reacção de uma amostra, sendo necessário multiplicar os volumes de reagentes pelo número de amostras a realizar o PCR. Em todos os PCR realizados, ao número de amostras foram sempre acrescentados um controlo negativo de PCR.

Tabela II.2 - Reagentes e quantidades necessárias para a realização do mix e do PCR

	Reagentes - 1 amostra		
Mix	ddH_2O	2,37 µl	7 µl
	PCR Buffer	1 µl	
	$MgCl_2$	0,8 µl	
	dNTP	0,8 µl	
	BSA (10mg/ml)	0,6 µl	
	Primer (mix) (5µM)	0,8 µl	
	NZY Taq Polimerase	0,13 µl	
	Produto de extracção (ADN)	3 µl	
	Total	**10 µl**	

Para se ter a certeza que o mix era o suficiente para todas as reações, devido à possibilidade de existirem erros de pipetagem, aumentou-se sempre uma ou duas quantidades do mix, ou seja, obtendo-se 7 µl ou 14 µl de mix a mais.

Apesar de cada primer se destinar a um pequeno fragmento do gene e todos os primers terem o mesmo comprimento (18 nucleótidos) e um teor de guanina (G) e citosina (C) semelhante (45-50% de teor de GC) (Fernandes et al., 2008), foram criados perfis de termociclagem diferentes para os primers de modo a otimizar os resultados, pois com um único perfil foram verificadas muitas inespecificidades.

Estes ciclos de PCR diferenciais estão apresentados na tabela II.3, onde se pode observar que os perfis criados diferem sobretudo nos parâmetros definidos para o anneling, pois é a temperatura e tempo neste passo que permite um aumento da especificidade de ligação do primer e a diminuição da geração de bandas não-específicas.

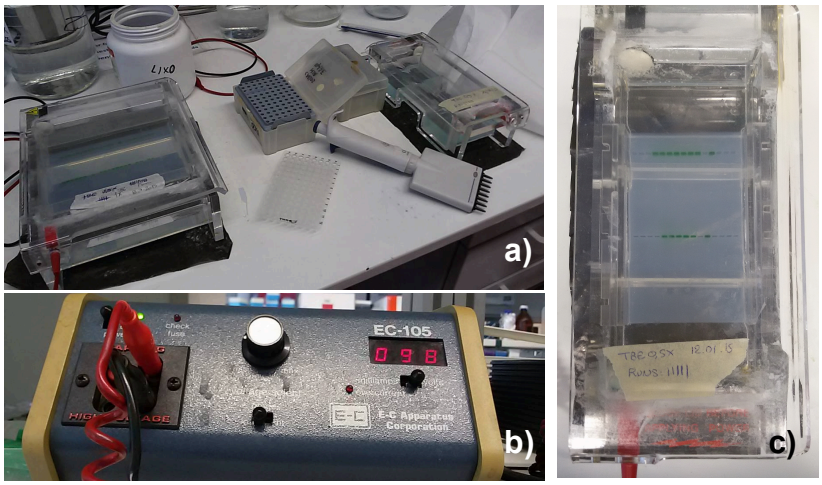
Tabela II.3 - Ciclos de PCR definidos e utilizados para os primers das diferentes espécies

	Primers Universais		Geneta, Fuinha e Lontra		Gato-bravo e Cão/Lobo		Texugo		Doninha	
	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração
Desnaturação Inicial	95ºC	3 min.	95ºC	3 min.	95ºC	3 min.	95ºC	3 min.	95ºC	3 min.
Nº ciclos:	55 x		55 x		55 x		55 x		55 x	
Desnaturação	95ºC	30 s.	95ºC	30 s.	95ºC	30 s.	95ºC	30 s.	95ºC	30 s.
Anneling	55ºC	30 s.	58ºC	30 s.	59ºC	30 s.	62ºC	20 s.	60ºC	20 s.
Extensão	72ºC	45 s.	72ºC	45 s.	72ºC	45 s.	72ºC	45 s.	72ºC	45 s.
Extensão final	72ºC	7 min.	72ºC	7 min.	72ºC	7 min.	72ºC	7 min.	72ºC	7 min.

Os produtos amplificados foram carregados e corridos em géis de agarose contendo 1,8gr de agarose e 3,5µl de RedSafe por 100ml TBE 0,5x (Figura II.17). O RedSafe foi

adicionado para a visualização das bandas de ácidos nucleicos quando expostas a luzes UV.

As amostras foram preparadas para serem corridas no gel usando 4,5 µl do produto do PCR e 2 µl de Loading dye para o acompanhamento da migração dos ácidos nucleicos durante a eletroforese. Por cada linha de poços carregados foi também corrido 2 µl de NZY DNA Ladder I ou V com 2 µl de Loading dye de forma a poder comparar o tamanho das bandas.



II.17 - a) material para o carregamento dos géis com as amostras. b) voltagem usada para a migração do material genético e elétrodos negativo e positivo. c) Gel de agarose com amostras e ladders carregadas. A verde visualiza-se o loading dye que permite o acompanhamento da migração

Os géis foram fotografados utilizando o sistema "Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290 (EDAS 290)", sendo os resultados visualizados em computador (Figura 7.18). Os géis que apresentavam uma banda do tamanho esperado foram considerados positivos para a espécie testada. Os que não apresentavam bandas foram testados com outros primers até ser obtida a respetiva identificação.

II.18 - Equipamento utilizado para a visualização das bandas no gel

4.1 Problemas e soluções encontradas

Ao longo da análise das amostras ocorreram diversos problemas para os quais, em geral, se obteve soluções ou explicações para os resultados.

4.1.1. Inespecíficidade na ligação dos primers

Como já referido, foram determinados diferentes perfis de PCR para os diferentes primers, isto porque inicialmente tinha sido definida uma temperatura de anneling de 55ºC para todos os primers; apesar disso para a maioria dos primers esta temperatura revelou-se insuficiente, pois estes ligavam-se a outras moléculas não alvo, dando origem a bandas inespecíficas com diferentes tamanhos o que poderia levar a erros nas conclusões tiradas.

Possivelmente com amostras de tecidos, este problema não seria tão visível pois ao contrário dos tecidos, os dejetos inevitavelmente contêm ADN de muitos outros organismos (bactérias, fungos e restos de presas ingeridas) o que aumenta a probabilidade dos primers se ligarem a sequências não alvo.

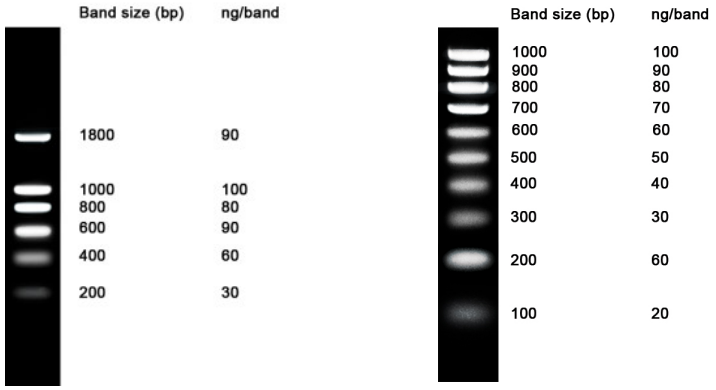
A temperatura a utilizar foi testada e otimizada para cada primer até que se revelasse suficiente para não ocorrerem ligações inespecíficas e se obter um resultado inequívoco (Tabela II.3).

4.1.2. Verificação do tamanho das bandas

Devido a algumas inespecíficidades a verificação do tamanho das bandas foi por vezes difícil de realizar deixando algumas dúvidas.

Para a verificação do tamanho das bandas foi usada em geral a NZY DNA Ladder I e, para aquelas amostras que surtiram dúvidas, a NZY DNA Ladder V (Figura II.19).

Apesar de se ter utilizado este método, o ideal teria sido usar controlos positivos para as diferentes espécies, o que facilitaria em alguns casos a confirmação do resultado, mas tal não foi possível.



II.19 - Tamanho das bandas da NZY DNA Ladder I (esquerda) e da NZY DNA Ladder V (direita) (nzytech.com)

4.1.3. Inibição da Taq Polimerase

A inibição da Taq Polimerase por componentes presentes no extrato é algo relatado em diversos artigos. Tal verificou-se em várias amostras, sobretudo nas amostras recolhidas na primavera.

Para ultrapassar este obstáculo alterou-se quantidades e concentrações de alguns componentes.

Inicialmente o componente a ser alterado foi o BSA. Foi aumentada a concentração do mesmo, mantendo as quantidades, o que apesar de ter melhorado os resultados não foi o suficiente para obter resultados em muitas amostras. Assim diminuiu-se a quantidade do extrato (de 3µl para 2,5µl), que apesar de diminuir a quantidade de ADN potencialmente presente também diminuiu a quantidade do componente que inibe as funções da Taq Polimerase. Aumentou-se a quantidade e concentração de buffer e a quantidade de BSA, e ainda a quantidade de Taq Polimerase e de cloreto de magnésio.

Tabela II.3 - Reagentes e quantidades usadas para o PCR de amostras com componentes inibitórios da Taq

	Reagentes - 1 amostra	
Mix	ddH_2O	2,37 µl
	PCR Buffer	1,2 µl
	$MgCl_2$	1,2 µl
	dNTP	0,8 µl
	BSA (25mg/ml)	0,8 µl
	Primer (mix) (5µM)	0,8 µl
	NZY Taq Polimerase	0,18 µl
	Produto de extracção (ADN)	2,5 µl
	Total	**9,5 µl**

4.1.4. Contaminações

Apesar de todos os cuidados tidos, quer no campo quer no laboratório, quatro amostras revelaram contaminação. Três delas com duas espécies de carnívoro (Raposa-Geneta, Raposa-Sacarrabos, Geneta-Sacarrabos) e uma delas identificada erradamente.

Estas contaminações podem ter ocorrido no campo antes até da recolha. Por exemplo, a raposa por vezes urina sobre os dejetos de outros carnívoros, contaminando-os. No entanto, podem ainda ter ocorrido durante a colheita, a subamostragem, a extração ou o PCR sendo assim difícil determinar a origem da mesma.

5.Conteúdo alimentar dos dejetos

Os dejetos recolhidos além de serem submetidos a análise genética para identificação da espécie foram ainda utilizados para obter informação sobre a atividade alimentar dos carnívoros correspondentes, ao longo das três estações e nos dois locais de estudo. O objetivo foi compreender se existe ou não alguma relação entre o sucesso de identificação genética e o conteúdo alimentar dos dejetos, e se de alguma forma influenciava o sucesso de identificação pelos observadores ou se o conteúdo não tinha nenhuma consequência.

Contudo, de forma a aumentar a amostragem relativamente à dieta das espécies alvo, foram analisados não apenas os dejetos em que se obteve sucesso na identificação genética, mas também aqueles em que não se obteve resultados.

Os dejetos foram inicialmente colocados com os tubos abertos numa estufa a 50ºC durante uma semana para que todo o conteúdo líquido evaporasse (Figura II.19).

II.20 - Amostras colocadas na estufa a 50ºC para a secagem dos dejetos

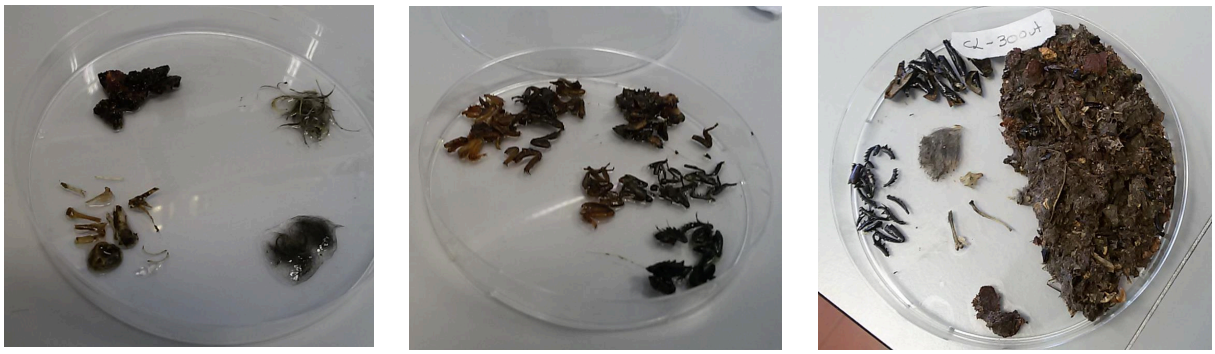
Após estarem secos, os dejetos foram colocados individualmente em copos com água para que todo o material do dejeto amolecesse e se separassem os diferentes componentes. Todo o material do dejeto foi colocado num passador de rede fina e passado por água até que toda a matéria orgânica e inorgânica (areia e terra recolhida junto ao dejeto) de pequenas dimensões e de impossível identificação fosse eliminada. Todo este processo teve a finalidade de facilitar a posterior triagem.

Todo o material que ficou retido no passador foi colocado num tabuleiro onde foi realizada a triagem juntamente com água. Este processo ajuda a separar alguns componentes que flutuam de outros que não e consequentemente facilitar a triagem.

Foram consideradas 8 categorias alimentares: Lagostim (crustacea), Outros artrópodes (arthropoda), Frutos, Mammalia, Aves, Reptilia, Matéria Orgânica não identificável (M.O) e Matéria Vegetal (M.V). O lagostim foi considerada uma categoria à parte dos outros artrópodes por representar uma presa aquática.

Foram os elementos não digeridos que permitiam identificar o tipo de presa consumida como por exemplo: sementes de fruto, cliceras de lagostim, ossos, pêlo. penas, peças

queratinosas e escamas de répteis (Figura II.20). Uma vez identificadas as categorias a que pertenciam os diversos componentes observados foi registado de duas formas o conteúdo dos dejetos. Foi registada a presença ou ausência dos itens alimentares em cada dejeto para que se determinasse a frequência de ocorrência de cada item (FO) e foi ainda registado a percentagem determinada visualmente que cada item ocupava no dejeto, o que se designou de biomassa (BM). Esta biomassa não se refere à biomassa consumida pelos indivíduos mas sim àquela presente nos dejetos pois para este estudo não se pretendia determinar a dieta propriamente dita mas sim analisar as consequências dos itens alimentares nos dejetos.



II.21 - Separação em caixas de petri dos componentes alimentares presentes nos dejectos

As caixas de petri devidamente identificadas foram colocadas de novo na estufa a 50ºC até que os componentes ficassem totalmente secos (entre 1 a 2 dias) para que pudessem ser guardados e identificados os elementos individualmente, caso necessário.

III. Apresentação e discussão dos resultados

1. Amostras recolhidas e análise genética

De todas as amostras recolhidas em cada local e estação, foi definido enquanto objetivo inicial obter a identificação genética de um mínimo de 30 dejetos. Esta meta foi alcançada com exceção das amostras recolhidas na Companhia das Lezírias na estação de Outono, onde tal apenas foi possível para 26 das amostras recolhidas. Nesta apenas foram encontrados 40 dejetos (menos de metade que na mesma estação na Herdade da Ribeira Abaixo - ver Tabela III.1) e muitos deles já se encontravam bastante degradados.

Este número reduzido de dejetos provavelmente teve como origem as condições ambientais no período anterior à amostragem, e nos dias entre amostragens, onde ocorreu bastante precipitação, a qual naturalmente lavou e destruiu muito dos dejetos e condicionou o sucesso da identificação. A chuva, como já referido anteriormente, lava o dejeto, removendo as células intestinais da superfície do mesmo e diminuindo a probabilidade de obtenção de ADN. Adicionalmente, e como também já referido, os solos da Charneca são pouco profundos e o aquífero encontra-se a um nível superficial o que leva a problemas de drenagem no local (Pereira 2010), tal como verificado durante a amostragem de outono em que muitos dos percursos se encontravam parcialmente ou totalmente alagados.

Além da chuva e terrenos alagados, o gado também poderá ter sido outro fator promotor do reduzido número de dejetos encontrados. Na Companhia das Lezírias, o gado segue anualmente um regime de transumância, passando o outono e o inverno na Charneca e a primavera e verão nas Lezírias (Companhia das Lezírias, s.d.). A época de presença do gado na Charneca corresponde às estações com menos dejetos encontrados (outono - 40; inverno - 76) e a estação analisada na ausência do gado corresponde à estação em que se encontrou um maior número de dejetos (primavera - 113). Apesar dos resultados sugerirem esta relação no presente estudo, seria necessário um estudo mais aprofundado e direcionado para perceber se relação é devida ao acaso, ou se realmente a presença do gado influencia a intensidade de uso pelos mamíferos carnívoros no local.

Na tabela III.1 pode ser observado: o número de dejetos recolhidos por estação e local; quantos foram analisados geneticamente e quantos foram identificados geneticamente. Apresenta-se também, em percentagem, os dejetos identificados e os não identificados em relação aos analisados.

Tabela III.1 – Número de amostras recolhidas, analisadas, identificadas e não identificadas por estação e local de amostragem (HRA e CL). As amostras identificadas e não identificadas apresentam-se em número absoluto e em percentagem em relação aos dejetos analisados.

		Recolhidas (N)	Analisadas (N)	Identificadas (N/ % / %)			Não identificadas (N/ %/ %)		
Outono	HRA	84	43	37	86,1	82,4	6	14,0	17,6
	CL	40	33	26	78,8		7	21,2	
Inverno	HRA	108	47	39	83,0	78,2	8	17,1	21,9
	CL	76	45	33	73,3		12	26,7	
Primavera	HRA	76	56	34	60,7	67,0	22	39,3	33,0
	CL	113	45	33	73,3		12	26,7	
Total		497	269	202	75,1		67	24,9	

Apesar de se observar uma variação no sucesso de amplificação entre estações e locais (dados a serem analisados mais adiante no presente capitulo), a nível global o sucesso de identificação genética (75,1%) encontra-se entre as percentagens esperadas, considerando-se uma elevada taxa de sucesso (Figura III.1).

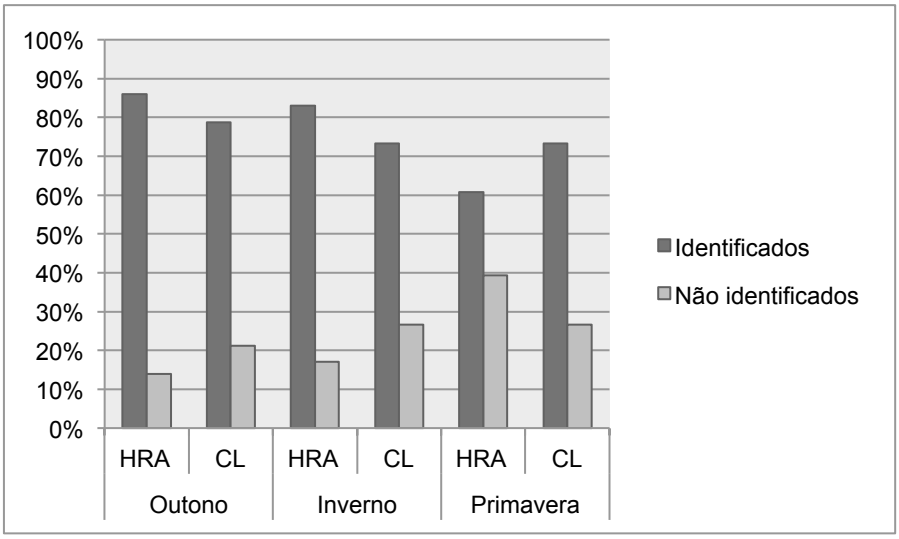
Na maioria da bibliografia analisada (e.g. Reed et al. 2004; Davison et al. 2002; Prugh e Ritland 2005; Gompper et al. 2006; Ruiz-González et al 2008 e Laguardia et al. 2015), as taxas de identificação por análise genética revelaram uma elevada taxa de sucesso (entre 78 e 80% de sucesso), apesar de em dois dos estudos (Davison et al. 2002; Reed et al. 2004) terem sido obtidas uma reduzida taxa de sucesso.

Os estudos de Prugh e Ritland (2005), Gompper et al. (2006), Ruiz-González et al. (2008) e Laguardia et al. (2015), obtiveram um sucesso elevado na identificação de dejetos de carnívoros - 78%, 88%, 80% e 88% respetivamente.

Já no estudo realizado por Reed et al. (2004), que pretendiam distinguir dejetos de lobo cinzento mexicano e coiote, o sucesso foi de apenas 24% (49 identificados de 203 testados), e no estudo de Davison et al. (2002) ao pretender distinguir os dejetos de marta e de raposa, tiveram 53% de sucesso (56 identificados de 163 analisados).

Os resultados do atual estudo e dos estudos referidos, demonstram que a identificação de espécies através de amostras não invasivas (dejetos) por métodos moleculares, é uma técnica viável, com resultados consistentes na sua maioria e em que as taxas de sucesso podem ser elevadas.

A figura III.1 ilustra, do total de amostras extraídas por local e por estação, o sucesso de identificação.



III.1 – Sucesso de identificação genética dos dejetos por locais (HRA e CL) e por estações.

O sucesso de identificação na Herdade da Ribeira Abaixo variou entre 60,7 e 86,1% e na Companhia das Lezírias variou entre 71,7 e 78,8% (Tabela III.1). Em ambos os locais as percentagens de maior sucesso de identificação correspondem ao outono e as de menor sucesso à primavera, embora na Companhia das Lezírias o sucesso se tenha mantido em relação ao inverno.

Tal como referido na introdução, o sucesso de identificação dos dejetos por métodos moleculares está dependente de diversos fatores, entre eles, o estado de degradação do ADN. A influência exercida por fatores abióticos e bióticos na degradação inicia-se após a deposição do dejeto pelo produtor. O ADN alvo após a separação dos processos celulares normais tornam-se instáveis (Lindahl 1993 in Stenglein et al. 2010; Deagle et al. 2006; Broquet et al. 2007) degradando-se rapidamente.

Os resultados obtidos indicam que a degradação dos dejetos, dá-se de forma mais rápida na primavera do que no outono, ou seja, a influência negativa dos referidos fatores é mais acentuada na primavera.

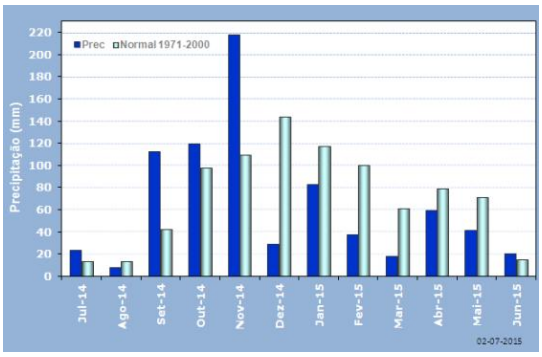
Este resultado isoladamente não permite determinar qual a causa da diferença de sucesso. Apesar disso tem sido descrito por vários autores que o sucesso está dependente das condições atmosféricas, o que poderá ser uma das justificações possíveis para os resultados obtidos.

Segundo Piggott (2004) a estação de recolha tem um efeito significativo nas taxas de amplificação de amostras fecais de carnívoros. Alguns estudos sugerem que o sucesso é mais elevado quando as amostras são recolhidas em climas secos (Farrell et al. 2000, Piggott 2004) ou muito frios (neve) (Lucchini et al. 2002); por outro lado a humidade (Farrell et al. 2000) e temperaturas mais elevadas têm impactos negativos significativos (Murphy et al. 2007).

Neste estudo esperava-se um menor sucesso, nos resultados referentes ao outono e inverno, devido à chuva e humidade mas por outro lado também são as estações mais frias. Assim, os resultados encontrados podem ter outras causas que não só às condições meteorológicas.

Os resultados da Companhia das Lezírias na estação de outono foram surpreendentemente positivos, pois a amostragem foi realizada num período de elevada precipitação, (ver na Figura III.2, mês de Novembro) sendo esperado que a chuva "lavasse" o ADN presente nos dejetos e que por isso não fosse possível obter resultados genéticos, o que não se verificou. Muitos dos dejetos amostrados não estavam em boas condições (encontravam-se muito destruídos) aparentando estarem há muito tempo no campo, tal como o dejeto apresentado na fotografia (Figura III.3).

Provavelmente os dejetos eram mais frescos do que realmente pareciam ser e talvez as temperaturas reduzidas tenham conservado o ADN e a chuva não tenha tido um impacto tão grande de lavagem.



III.2 - Precipitação média mensal em Portugal Continental entre julho de 2014 e junho de 2015, e os respetivos valores médios referentes ao período 1971-2000 (ipma.pt).

III.3 – Dejeto de raposa identificado geneticamente, porém muito destruído pelas chuvas (CL – outono)

Estes resultados podem ser justificados não só pela influência das condições ambientais na preservação do ADN mas também pelo conteúdo em alimento presente nos dejetos.

Ao longo do trabalho realizado em laboratório, verificou-se que o não sucesso em alguns dejetos não se deveu à ausência ou degradação de ADN mas sim à inibição da Taq Polimerase. No entanto, as tentativas que se seguiram não permitiram igualar o sucesso de identificação às outras estações, desconhecendo-se se a ausência de resultados foi pela degradação do ADN ou se pela presença de outros fatores inibitórios (normalmente presentes nos recursos alimentares e que são co extraídos dando origem a extratos de reduzida qualidade).

Poucos estudos se têm focado na influência dos produtos co extraídos e presentes no extrato no sucesso de PCR, mas acredita-se que a inibição da Taq Polimerase durante o

PCR pode ser provocado por exemplo por polissacarídeos de origem vegetal (Kohn and Wayne 1997; Monteiro et al. 1997) e tecidos animais (Murphy et al. 2003).

Esse problema foi verificado em laboratório e pode ser uma justificação para os resultados obtidos sendo o assunto melhor analisado e discutido no ponto 4.

2. Sucesso de identificação dos observadores

Na análise dos resultados do sucesso de identificação pelos observadores é necessário ter em conta que as identificações foram realizadas via fotografia, o que, sem dúvida e apesar da escala, torna a identificação mais difícil, quer pela falta de perspectiva, quer por outra informação adicional como as características do meio evolvente ao local de deposição do dejeto ou o odor do mesmo. Assim, espera-se que as taxas de sucesso sejam relativamente inferiores ao que seriam se as identificações fossem realizadas no campo; apesar disso, os resultados refletem o erro de identificação tendo por base apenas critérios morfológicos.

O sucesso de identificação por diferentes observadores foi analisado a vários níveis, desde um nível que inclui todos os dejetos de carnívoros de todas as estações e locais (nível mais global), à análise do sucesso de identificação entre estações e locais e à análise de sucesso na identificação das diferentes espécies individualmente.

Estes diferentes níveis de análise tiveram por objetivo compreender se as diferenças entre estações e o conhecimento dos locais terão ou não impacto no sucesso de identificação. Caso não se verifique diferenças muito acentuadas o estudo pode ser generalizado temporalmente e espacialmente.

2.1 Sucesso na identificação da comunidade de carnívoros

De 202 dejetos identificados geneticamente nas três estações e nos dois locais de estudo, o sucesso de identificação dos observadores variou entre 23% e 53%. Em média os cinco observadores identificaram corretamente 42% (±11%) dos dejetos, ou seja, um valor bastante inferior ao sucesso da identificação genética (75%).

O maior sucesso de identificação correspondeu ao observador mais experiente e com experiência de campo nos dois locais de amostragem. Adicionalmente o desvio padrão é elevado, o que indica que a experiência é relevante.

Os resultados revelam uma reduzida taxa de sucesso em relação aos métodos moleculares. Este nível de insucesso sugere que em estudos de comunidades diversas de carnívoros, como o que se verifica a nível ibérico, é vivamente aconselhável uma

confirmação genética, principalmente para as espécies em que a probabilidade de erro é superior.

A necessidade de confirmação genética também dependerá do nível de precisão que o estudo exija. Os resultados obtidos encontram-se abaixo do estimado por Halfpenny e Biesot (1986 in Piggott e Taylor 2003), que estimaram que apenas 50-66% dos dejetos sejam identificados corretamente na América do Norte. Segundo o presente estudo, a taxa média de identificação para a Península Ibérica (42%) não está longe da referência para a América do Norte. Sobretudo, tendo em conta que a média relativamente inferior é influenciada por a identificação dos dejetos ter sido realizada através de fotografias, sendo expectável que se as identificações fossem realizadas no campo a média se aproximaria dos valores descritos por Halfpenny e Biesot (1986 in Piggott e Taylor 2003).

Tabela III.2 – Sucesso de identificação de carnívoros ibéricos dos observadores e média dos mesmos

Nº dejetos	Obs 1		Obs 2		Obs 3		Obs 4		Obs 5		Média	Desv. Padrão
N	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	%	%
202	107	53,0	47	23,3	94	46,5	79	39,1	101	50,0	42,4	±10,6

2.2. Diferenças no sucesso de identificação entre locais

A diferença do erro entre os dois locais não revelou ser um fator que influenciasse a identificação. Em nenhum dos observadores a diferença entre os locais excedeu os 10%, havendo uma diferença mínima entre locais de 2,4% e máxima de 8,4%.

Dois dos observadores tinham sobretudo experiência na identificação de dejetos na Companhia das Lezírias, e outro na Herdade da Ribeira Abaixo, experiência que não demonstrou ser relevante, pois apesar da reduzida diferença, o sucesso dos dois primeiros foi superior na identificação das amostras da Herdade da Ribeira Abaixo, e o último obteve maior sucesso na Companhia das Lezírias. Estes resultados indicam que a experiência de campo num determinado local não significa um maior sucesso nesse local comparativamente a outros, o que leva a crer que o conhecimento do local não influência o êxito.

Face ao exposto, e uma vez que a diferença média entre os locais é de apenas 0,52%, é demonstrado que o estudo pode ser generalizado espacialmente. Os desvios padrões superiores a 10% indicam que a diferença entre observadores que é atribuída à variação de experiência na identificação de dejetos de mamíferos carnívoros e não aos locais.

Tabela III.3 – Sucesso de identificação por local e observador. Apresenta-se ainda a diferença entre locais do sucesso, média dos sucessos e desvio padrão

	Dejetos	Obs 1		Obs 2		Obs 3		Obs 4		Obs 5		Média	Desv. Padrão
	N	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	%	%
HRA	108	55	51,0	24	22,2	49	45,4	47	43,5	56	51,9	42,8	±10,8
CL	91	52	57,1	23	25,3	45	49,5	32	35,2	45	49,5	43,3	±11,5
Diferença de sucesso		6,2		3,1		4,1		8,4		2,4		0,5	

2.3. Diferenças no sucesso de identificação entre estações do ano

Como se concluiu não existirem diferenças relevantes entre locais analisou-se de seguida a influência das estações do ano na identificação dos dejetos identificados com base apenas em critérios morfológicos.

Na tabela III.4 pode constatar-se que três dos observadores alcançaram um maior sucesso na primavera enquanto os restantes dois no outono. À exceção de um observador (Obs. 4), o menor sucesso foi observado no inverno.

Tabela III.4 - Sucesso de identificação por estações e observador. Apresenta-se ainda a diferença entre estações, média dos sucessos por estação e desvio padrão.

	Dejetos	Obs 1		Obs 2		Obs 3		Obs 4		Obs 5		Média	Desv. padrão
	N	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	%	%
Out.	62	34	54,8	18	29,0	31	50,0	31	**50,0**	43	**69,4**	**50,7**	±12,9
Inv.	72	34	47,2	10	13,9	30	41,7	30	41,7	29	40,3	36,9	±11,8
Prim.	65	39	**60,0**	19	**29,2**	33	**50,8**	18	27,7	29	44,6	42,5	±12,5
		Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max		
		47,2	60,0	**13,9**	29,2	41,7	50,8	27,7	50,0	40,3	**69,4**		
Diferenças de sucesso		12,8		15,3		9,1		22,3		29,1		**8,2**	

Em média a estação onde o sucesso foi superior foi no outono (51%±13), seguindo-se a primavera (43%±13) e por último o inverno (37% ±12).

A diferença do sucesso dos observadores entre as estações variou entre 9,1% e 29,1%. Quanto maior a amplitude maior o impacto das estações na identificação, isto porque quanto maior a diferença mais o sucesso varia.

Apenas um observador teve uma variação inferior a 10%, entre a estação de maior e menor sucesso, o que sugere alguma influência das estações; porém não se observa um padrão consistente uma vez que não existe concordância entre os resultados dos diferentes

observadores com uma estação revelando uma influência positiva ou negativa nos resultados.

A diferença do sucesso médio não revelou ser tão elevado como individualmente, tendo um valor de 8,2%. Os desvios padrões são mais ou menos constantes nas três estações, pelo que a média pode ser tida em conta como um indicador de qual a estação do ano mais adequada para realizar um trabalho onde apenas é possível recorrer à identificação morfológica dos dejetos.

2.5. Identificação das espécies

Outra questão que se pretendeu abordar foi se existia alguma diferença no sucesso de identificação entre as diferentes espécies de carnívoros que integram a comunidade local, estando os resultados expressos na tabela III.4.

Tabela III.5 – Sucesso de identificação médio dos observadores por espécies. O rank enumera as espécies por sucesso

	Média (%)	Desvio Padrão (%)	Rank
Raposa (n=81)	50,1	±14,1	3
Fuinha (n=73)	35,8	±12,4	4
Texugo (n=10)	58,0	±11,7	2
Lontra (n=6)	66,7	±10,5	1
Geneta (n=15)	22,7	±15,0	6
Sacarrabos (n=11)	23,6	±12,3	5
Gato (n=2)	0	± 0	8
Cão (n=1)	20,0	±40,0	7

Em média os observadores tiveram menos dificuldade em identificar os dejetos de lontra (67% foram corretamente identificados) e, considerando apenas os carnívoros silvestres, uma maior dificuldade em identificar os dejetos de geneta (apenas 22,8% foram identificados corretamente) e de gato que nenhum observador identificou corretamente apesar de ser necessário ter em conta que se trata de apenas 1 dejeto.

Este facto pode relacionar-se com duas evidências, o primeiro é que a lontra possui uma dieta típica baseada em presas associadas à água, como o lagostim que estava presente em todos os dejetos de lontra, e deposita os dejetos junto a corpos de água o que permite distinguir os dejetos de lontra dos de outros carnívoros mais generalistas e oportunistas, facilitando a identificação dos mesmos. Além disto, raramente produz dejetos inteiros mas sim fragmentos que vão depositando ao longo das margens (M. Santos-Reis, com. pess.).

Os dejetos de geneta além de possuírem uma grande variabilidade de morfologias, por serem muito longos encontram-se também frequentemente fragmentados, o que dificulta a identificação. Além disso a literatura indica que a geneta faz latrinas e deposita os dejetos em locais altos mas nem sempre os dejetos desta espécie são encontrados nesta forma.

Por outro lado os gatos, nos locais de estudo, encontram-se em reduzida abundância sendo que foram recolhidos poucos dejetos desta espécie e por isso, na dúvida, naturalmente o observador opta por identificar como sendo de uma espécie mais comum no local. Além disso, já foi referido por Urra et al. (2014) que, dependendo da alimentação, os dejetos de gato podem ser confundidos com dejetos de outros mesocarnívoros, especialmente com os de raposa que naturalmente são muito mais abundantes.

Os dejetos de texugo foram os segundos mais corretamente identificados, provavelmente por ser a única espécie que cria latrinas em buracos que escava no solo e onde os dejetos são acumulados até ao topo não sendo tapados e traduzindo um volume elevado. Este facto distingue-os das outras espécies tal como referido por Rosalino e Loureiro (2012), é uma particularidade que facilita a sua identificação em relação aos restantes mesocarnívoros.

Apenas os dejetos de lontra, texugo e raposa demonstraram um sucesso de identificação superior a 50%. A variação observada nas percentagens de dejetos corretamente identificados para as diferentes espécies, indicam uma maior necessidade de confirmação genética para umas espécies do que para outras.

3. Concordância nas identificações

Foi analisado anteriormente o sucesso de identificação dos observadores e a média do mesmo segundo vários parâmetros (estações, locais e espécies) para perceber a respetiva influência.

No entanto para melhor compreender quais os fatores que influenciaram a correta identificação de uns dejetos em relação a outros é necessário ter em consideração quantos dejetos foram corretamente identificados por todos os observadores (100%), por mais de 3 observadores (três ou quatro observadores identificaram corretamente - >5 0% de identificação correta), por um ou dois observadores (< 50%) ou por nenhum (0%).

Analisou-se, assim, o sucesso por estações, locais, espécies e ainda se procurou explicar, observando os dejetos individualmente, quais as diferenças entre os dejetos identificados corretamente ou erradamente por todos os observadores.

3.1. Análise por local

Quanto aos locais de amostragem, a diferença entre os locais apenas foi superior a 10% nos dejetos identificados corretamente por mais de 50% dos observadores. Foram os dejetos recolhidos na Companhia das Lezírias que revelaram uma percentagem superior de identificação 100% correta, ou seja, em que todos os observadores estavam de acordo e corretos.

Apesar disso, foi na Herdade da Ribeira Abaixo que a percentagem de dejetos corretamente identificados por mais de 50% dos observadores foi superior e quando, somando as categorias 100% e mais de 50% corretamente identificados, também foi neste local em que o sucesso foi superior.

Fazendo a análise desta forma, regista-se alguma diferença nas identificações entre locais, o que não sucedeu quando se considerou o valor médio (ver 2.2 do capítulo III).

Tabela III.6 – Percentagens dos dejetos identificados por 100%, mais de 50%, menos de 50% e 0% dos observadores por locais. Apresenta-se ainda a amplitude de diferença para se perceber se os resultados nos dois locais foram muito diferentes ou não.

	100%	**< 50%**	**< 50%**	**0%**
HRA	6,8	40,8	35,92	16,5
CL	12,4	29,6	41,98	16,1
Amplitude de diferença	5,6	11,2	6,06	0,5

3.2. Análise por estação

Quanto às estações, foi na primavera que se verificou uma maior percentagem de dejetos corretamente identificados por todos os observadores, seguindo-se o inverno e o outono, apesar de não se ter registado uma diferença aparentemente significativa. Por outro lado, foi no outono que se verificou uma menor percentagem de dejetos identificados erradamente por todos os observadores (0%) e o inverno aquele que possui uma maior percentagem; mais de 50% dos observadores identificaram corretamente um maior número de dejetos (48,2%) no outono seguindo-se a primavera (42,3%).

Somando as identificações com um sucesso superior a 50% e 100%, o outono é a estação que revela ter um sucesso superior de identificações, seguindo-se a primavera e por fim o inverno.

Poderá ser importante considerar estes dados para estudos posteriores baseados na identificação exclusivamente morfológica. Observa-se uma variação temporal do sucesso de identificação dos dejetos e os resultados indicam que as estações em que se obtém os melhores resultados são o outono ou a primavera.

Tabela III.7 – Percentagens dos dejetos identificados por 100%, mais de 50%, menos de 50% e 0% dos observadores por estações

	100%	< 50%	> 50%	0%
Outono	9,3	48,2	35,2	7,4
Inverno	9,9	21,1	46,5	22,5
Primavera	10,2	42,4	33,9	17

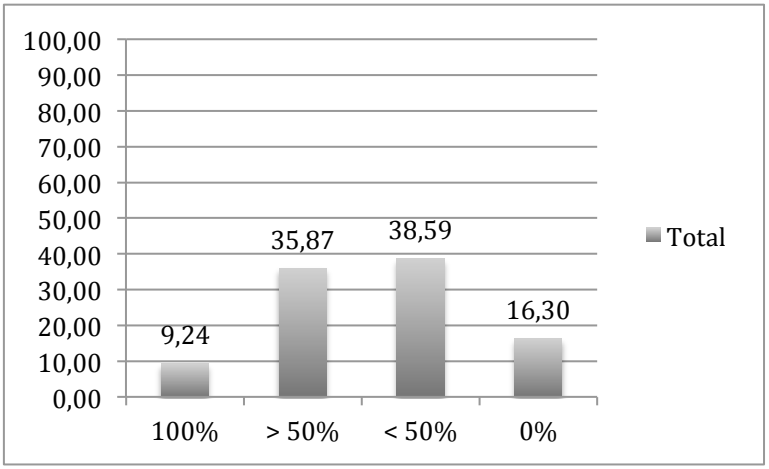
3.3. Análise observador

Em geral, como se pode observar pela figura III.4, muitos dos dejetos são identificados corretamente quando mais do que 50% dos observadores estão de acordo na identificação. Ainda assim a percentagem em que todos os observadores identificam corretamente o dejeto é reduzida, sendo inferior a 10%.

É de realçar as percentagens em que apenas uma minoria dos observadores está de acordo (< 50% e 0%) e identifica corretamente um mesmo dejeto, pois estas apresentam-se relativamente elevadas. É de referir ainda, que a percentagem de dejetos que foi erradamente identificada por todos os observadores (16%) é superior àquela em que todos identificaram corretamente (9%).

Isto significa que a concordância entre observadores numa determinada identificação não significa que essa identificação seja a correta ou haja uma maior probabilidade de a ser.

Quando existe este nível de dúvida num estudo, tal sugere uma elevada probabilidade de identificações erróneas. Este resultado indica-nos novamente a importância de incluir confirmações genéticas nos estudos em que é necessário identificar dejetos de mesocarnívoros.



III.**4 – Concordância dos observadores nas identificações corretas - Percentagens dos dejetos identificados por 100%, mais de 50%, menos de 50% e 0% dos observadores**

4. Conteúdo em alimento nos dejetos e sua influência na identificação genética

4.1. Variação na dieta dos carnívoros por local e estação

A dieta dos carnívoros entre os dois locais de estudo e por estação demonstra variação (Tabela III.8). No outono o alimento dominante presente nos dejetos são os frutos e coincide nos dois locais, apesar de ser muito mais consumido em biomassa e frequência pelos carnívoros da Herdade da Ribeira Abaixo. Na Companhia das Lezírias os frutos foram consumidos em biomassa superior aos mamíferos, mas ambos foram encontrados no mesmo número de dejetos. Os artrópodes também é um componente relevante em relação ao recurso dominante.

Já no inverno o alimento dominante coincide se considerada a frequência de ocorrência mas não em termos de biomassa. Em ambos os locais, a maioria dos dejetos apresentavam indícios do consumo de mamíferos. Na Herdade da Ribeira Abaixo os frutos encontram-se em maior biomassa (40,6%) apesar dos mamíferos estarem presente numa biomassa elevada (33,8%) e possuírem uma frequência de ocorrência superior em relação aos frutos (71,8%).

Na Companhia das Lezírias o item alimentar dominante foram os mamíferos (BM - 62,5%; FO - 81,8%), não se verificando praticamente o consumo de frutos, possivelmente pela disponibilidade dos mesmos ser diferente entre as duas zonas.

Na Herdade da Ribeira Abaixo existem mais frutos disponíveis (ver área de estudo - ponto 1 do capitulo II) e num período temporal mais alargado não sendo necessário os carnívoros despenderem tanta energia na captura de mamíferos para se alimentarem, consumindo mais frutos. Em ambos os locais, o inverno foi a estação em que se registou uma menor frequência de ocorrência de artrópodes.

Na primavera o alimento dominante presente nos dejetos volta a ser igual nos dois locais, em relação à biomassa. No inverno, os mamíferos, foram consumidos em maior biomassa mas com menor frequência pelos carnívoros da Herdade da Ribeira Abaixo. Na Companhia das Lezírias a biomassa consumida e a frequência de consumo de mamíferos diminuiu e o consumo de frutos volta a aumentar.

Os artrópodes em ambos os locais têm uma importância superior na dieta dos carnívoros na primavera embora sejam consumidos em todas as estações.

É de referir que nesta análise apenas foram considerados os dejetos identificados geneticamente.

Tabela III.8 – Percentagem dos tipos de alimentos presentes nos dejetos de carnívoros, por locais de amostragem (HRA e CL) e por estações

Categorias alimentares	HRA						CL					
	Out		Inv		Prim		Out		Inv		Prim	
	n=37		n=39		n=34		n=26		n=33		n=33	
	BM	FO	BM	FO	BM	FO	BM	FO	BM	FO	BM	FO
Crustacea	3,9	5,4	0	0	8,7	8,8	8,6	30,8	4,9	9,09	3,03	3,03
Arthropoda	10,1	37,8	9,3	28,2	17,6	58,8	12,7	50	10,8	39,4	17,9	54,6
Reptilia	0,7	8,1	1,9	5,1	4,7	17,7	3,5	3,9	0	0	1,2	3
Aves	0,1	2,7	1,8	5,1	0,7	2,9	0,6	3,9	1,2	9,1	3,2	9,1
Mammalia	7	24,3	33,8	71,8	36,9	50	27,4	53,9	62,5	81,8	43,4	69,7
Frutos	71,4	83,8	40,6	59	12,4	14,7	33,7	53,9	0,4	9,1	19,6	39,4
M.V	0,1	2,7	0	0	0	0	0,1	3,9	10,3	27,3	4,2	6,1
M.O	6,7	27	12,5	71,8	19,1	47,1	13,4	38,5	10	27,3	7,5	21,2
Alimento dominante	Frutos	Frutos	Frutos	Mam.	Mam.	Artro.	Frutos	Frutos Mam.	Mam.	Mam.	Mam.	Mam.

Pela maioria dos mesocarnívoros ibéricos serem generalistas e oportunistas, a dieta reflete a disponibilidade de alimento ao longo das estações e nos locais, consumindo estes o recurso mais fácil de obter e que por isso lhes fornece mais energia em relação aos gastos de energia relacionados com a procura e obtenção do alimento.

4.2. Influência do conteúdo alimentar na identificação genética

Como referido oportunamente (ver ponto 2 do capitulo I), teoricamente, o PCR torna possível amplificar ADN de qualquer amostra biológica. Contudo, na prática existem componentes que inibem o PCR e que podem ser co purificados com o ADN alvo (Reiss e Rutz 1999).

Os resultados do conteúdo em alimento dos dejetos foram expressos em três tabelas (Tabelas III.9, III.10 e III.11) com o intuito de compreender quais as possíveis influências do mesmo no sucesso da identificação genética, pois a dieta já foi referida como uma importante variável que influência o sucesso da identificação por PCR (Reiss e Rutz 1999; Murphy et al. 2003).

Tabela III.9 – Biomassa média presente nos dejetos identificados geneticamente. As médias encontram-se em percentagens e por estações

Categorias alimentares	Total dos dejetos identificados		
	Out	Inv	Prim
	n=63	n=72	n=67
Crustacea	4,27	2,22	5,90
Arthropoda	11,17	9,99	**17,72**
Reptilia	1,86	1,04	2,97
Aves	0,32	1,53	1,94
Mammalia	15,38	**46,92**	**40,06**
Frutos	**57,41**	22,19	15,93
M.V	0,13	4,72	2,09
M.O	9,46	11,39	13,40
Amplitude de nicho	32,07	100,49	32,07
Recurso dominante	Frutos	Mamalia	Mamalia

Verificou-se que a dieta variou entre estações, sendo que a principal categoria alimentar consumida no outono foram os frutos (identificada através das sementes e cascas detetadas nos dejetos) e no inverno e primavera os mamíferos (pêlos e ossos), apesar destes serem mais comuns no inverno (47%) comparativamente com a primavera (40%) (Tabela III.9).

É de referir que a segunda categoria alimentar com maior percentagem de ocorrência no inverno também foram os frutos, enquanto na primavera foram os artrópodes (Tabela III.9).

Nos dejetos em que a identificação genética não teve sucesso, verificou-se no conteúdo uma pequena variação em relação aos dejetos identificados o que poderá ter influenciado a ausência de resultados (Tabela III.10). No outono e inverno o alimento dominante nos dejetos manteve-se o mesmo (Tabela III.10) mas na primavera dominaram os artrópodes, apesar da percentagem de mamíferos ser também elevada. Este facto sugere que os restos não digeridos dos artrópodes presentes nos dejetos contêm algum elemento que inibe a Taq polimerase ou que de alguma forma, uma dieta com base em artrópodes, faz com que durante os processos fisiológicos o dejeto contenha menos células intestinais. A primeira hipótese parece ser a mais plausível uma vez que foi exatamente com os dejetos da primavera que se teve mais problemas com a inibição do PCR, que mesmo assim foi resolvida em muitos dejetos, mas não naqueles com conteúdo elevado de artrópodes.

Tabela III.10 – Média dos itens alimentares presente nos dejetos que não se conseguiu obter uma identificação genética. As médias encontram-se por estações

Categorias alimentares	Total dos dejetos não identificados		
	Out	Inv	Prim
	n=15	n=16	n=32
Crustacea	0	0	3,33
Arthropoda	11	6,13	35,07
Reptilia	0	0	1,33
Aves	0	0	0,23
Mammalia	14,29	56,19	32,93
Frutos	48,43	16,13	8,33
M.V	7,14	6,56	4,67
M.O	19,14	15	14,10
Amplitude de nicho	3,24	2,69	8,27
Alimento dominante	Frutos	Mamalia	Artropoda

A tabela III.11 evidencia a diferença observada entre as percentagens dos recursos alimentares detetados nos dejetos não identificados e identificados geneticamente, realçando os elementos que não interferiram na identificação genética e aqueles que potencialmente a inibiram.

Tabela III.11 – Diferença do conteúdo alimentar entre os dejetos não identificados e os identificados. Os valores positivos indicam percentagens superiores do item nos dejetos não identificados e valores negativos indicam maiores percentagens nos dejetos identificados.

Categorias alimentares	Diferença entre os não identificados e identificados		
	Out	Inv	Prim
Crustacea	-4,27	-2,22	-2,56
Arthropoda	-0,17	-3,86	**17,35**
Reptilia	-1,86	-1,04	-1,64
Aves	-0,32	-1,53	-1,71
Mammalia	-1,10	**9,27**	-7,13
Frutos	-8,98	-6,07	-7,59
M.V	7,02	1,84	2,58
M.O	9,68	3,61	0,70

Mais uma vez, os artrópodes são um recurso que aparenta influenciar o insucesso da identificação genética enquanto os frutos evidenciam ter alguma influência positiva na mesma. Nas três estações do ano os dejetos identificados possuíam sempre um maior conteúdo de frutos, o que leva a crer que a presença de fruta na dieta e consequentemente nos dejetos, possivelmente por conter mais fibra, quando ingerida e digerida no trato gastrointestinal faz com que o dejeto na superfície de contacto com o trato contenha um maior número de células do epitélio intestinal.

Quanto ao consumo de mamíferos não é clara a influência que exerce na obtenção de resultados pois na estação de inverno os dejetos não identificados possuíam uma percentagem superior àqueles que foram identificados, mas na primavera sucedeu o contrário. Este facto poderá dever-se por um lado a que no inverno, em geral, a maioria dos dejetos contêm pêlos (tanto identificados como não identificados) e por outro, os artrópodes exercerem uma influência negativa nos resultados superior aos mamíferos.

Vários estudos anteriores (e.g., Bessetti 2002) já demonstraram que algumas amostras biológicas e não biológicas contém inibidores, como o sangue, tecidos e o solo, e em alguns casos sabe-se os componentes específicos que causam a inibição (Tabela III.12).

Tabela III.12 – Inibidores de PCR conhecidos e a sua fonte (adaptado de Bessetti 2007)

Inibidor	Fonte do inibidor
Sais biliares	Dejetos
Complexos polissacarídeos	Dejetos, material vegetal
Colagénio	Tecidos
Heme	Sangue
Ácido húmico	Solo, material vegetal
Melanina e eumelanina	Cabelo/pêlo, pele
Mioglobina	Tecido muscular
Polissacarídeos	Plantas
Proteinases	Leite
Iões de cálcio	Leite, ossos
Ureia	Urina
Hemoglobina, lacto errina	Sangue
Imunoglobulina G (IgG)	Sangue

Já foi descrito anteriormente por Calderón-Cortés et al. (2010) que isolar ADN de insetos xilófagos pode ser problemático pelo facto do seu trato digestivo conter tecidos ricos em compostos fenólicos e taninos que inibem a Taq polimerase. Esta pode ser a justificação pela qual obtivemos menor sucesso em dejetos que continham restos não digeridos de

insetos mas também não se exclui a hipótese que os próprios insetos contenham algum componente (como a quitina) inibitório.

Por outro lado, as plantas, por conterem polissacarídeos (Bessetti 2007; Calderón-Cortés et al. 2010) e ácidos húmicos (Bessetti 2007), deveriam também dificultar a obtenção de resultados através do PCR por inibirem a Taq polimerase. Contudo, no presente, não se verificaram dificuldades na obtenção de resultados em dejetos contento plantas/frutos, talvez pelos frutos possuírem menos inibidores e, como referido anteriormente, pela fibra que contêm.

É também de referir que quando se extrai ADN de dejetos, não é só a dieta (ou seja do dejeto) que pode inibir a reação mas o próprio dejeto contém sais biliares (resultantes da digestão) e complexos polissacarídeos que são inibidores da reação (Bessetti 2007).

Além destes fatores, a maioria dos dejetos são depositados sobre o solo e por isso à superfície do dejeto (onde se encontra o ADN alvo) podem aderir alguns sedimentos os quais também contem ácido húmico, inibidor da Taq polimerase (Bessetti 2007).

5. Fatores indutores de erro na identificação dos dejetos com base em critérios morfológicos

Porque é importante identificar as variáveis com maior impacto na identificação correta ou incorreta dos dejetos através de critérios morfológicos, e quais as espécies que induzem o observador em maior erro, foi efetuada uma análise qualitativa comparativa.

Para tal foram definidos quatro critérios: as dimensões (comprimento x largura), o estado de integridade (completo ou fragmentado), a forma. (ex., perfil recto ou espiralado), e os recursos alimentares consumidos (ex., frutos, mamíferos, etc).

5.1. Caraterísticas dos dejetos identificados corretamente por todos os observadores

A variabilidade das dimensões referidas bibliograficamente para as espécies em estudo (e.g. Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Elbroch et al. 2012; Blanco-Garrido e Rivas 2014; Clavero, Blanco-Garrido e Ruiz-Olmo 2014; Moral, Prunier e Saldaña 2014; Urra et al. 2014 - anexo 4) torna difícil comprovar até que ponto este critério pode ser de aplicação generalizada, sendo que muitas vezes se verificou que as medidas registadas estavam de acordo com uma fonte bibliográfica mas não com outras.

Apesar de por vezes ser difícil definir com certeza se o dejeto amostrado se encontrava de na sua forma integral ou não, a maioria dos dejetos identificados corretamente, claramente encontravam-se completos, ocorrendo apenas dúvida em dois

deles (11% dos identificados) e um (5,6% dos identificados) era claro que correspondia apenas a uma parte.

Quanto à forma do dejeto, todos eles apresentavam a forma definida como típica da espécie, e alguns encontravam-se localizados em estruturas naturais utilizadas habitualmente (ex.: dejetos de lontra em rochas junto à água, dejetos de texugo depositados em latrinas escavadas no solo e o dejeto de geneta depositado em latrina sobre um muro), que ajudaram na identificação. O único dejeto que possuía uma forma atípica era um dejeto de lontra, que devido à idade perdeu a forma original, mas os observadores identificaram corretamente possivelmente pelo recurso consumido (lagostim) e pela sua localização junto a um curso de água.

Todos os dejetos identificados corretamente demonstravam o consumo de recursos alimentares típicos da espécie em causa; contudo é preciso ter em conta que a maioria dos carnívoros em estudo são espécies generalistas cuja dieta varia com a disponibilidade alimentar. No caso da lontra os dois dejetos identificados corretamente por todos os observadores integravam exclusivamente lagostim.

No anexo 5 e 6 é possível verificar mais detalhadamente estas inconsistências detetadas.

5.2. Caraterísticas dos dejetos identificados erradamente por todos os observadores

Apenas quatro dejetos (9,5%) possuíam dimensões que se encontravam de acordo com as referências bibliográficas para a mesma espécie (ver Anexo 6). Dos restantes, 13 (31%) possuíam medidas que não se encontravam de acordo com nenhuma referência e 24 (57,1%) dos dejetos não correspondiam às medidas indicadas por algumas das referências ou alguma das dimensões não estava dentro do enunciado. Em dois dejetos de texugo não se considerou este parâmetro por esta espécie depositar os dejetos em latrina e ser difícil realizar medições de um dejeto isolado.

Dos dejetos identificados erradamente por todos dos observadores, 10 dos dejetos (23,8%) encontravam-se incompletos e relativamente aos restantes dois (4,8%) persistiu a dúvida. A maioria dos dejetos (69,1%) identificados erradamente por todos os observadores possuíam uma forma que não é típica da espécie o que justifica o erro consistente. Quanto ao conteúdo do dejeto, em 12 (28,6%) os alimentos consumidos eram pouco frequentes para a espécie (ex. um dejeto de raposa continha uma elevada percentagem de lagostim, que apesar da espécie poder consumir não é um recurso comum).

Outro facto constatado com esta análise qualitativa foi que os dejetos de fuinha que continham apenas restos de mamíferos, foram sempre identificados como sendo de doninha. Os resultados evidenciam que a dieta influencia a identificação pelo facto de alterar

a morfologia e o tamanho dos dejetos. Os dejetos de fuinha que continham só restos de mamíferos (pêlos e ossos) eram mais pequenos e mais retorcidos que o tipicamente descrito, fazendo com que se assemelhem aos dejetos de doninha.

6. Erros mais frequentes associados à identificação dos dejetos

Pretende-se neste capítulo alertar para os erros mais frequentes associados à identificação de dejetos com base em critérios exclusivamente morfológicos, alertando para a necessidade de uma identificação genética quando as espécies alvo sejam mais sujeites a erro. Apesar das variações entre observadores terem sido registadas, estas não são agora avaliadas individualmente, estando apenas representadas nas tabelas pelo desvio padrão.

Analisam-se os resultados, como nos capítulos anteriores, por espécie, local e estação do ano.

A tabela III.13 sintetiza a informação relativa a todas as espécies que foram identificadas e aquelas com que foram confundidas. Apesar de terem sido identificadas pelos observadores amostras de dejetos de raposa (n=81), fuinha (n=73), texugo (n=10), lontra (n=6), geneta (n=15), sacarrabos (n=11), gato (n=2) e cão (n=1), apenas foram analisadas mais detalhadamente as espécies com que se confundem a raposa e a fuinha pelo reduzido número de amostras identificadas das restantes espécies.

Tabela III.13 - Tabela síntese das espécies com que os dejetos podem ser confundidos e se existiu alguma variação local ou temporal das espécies com as quais são confundidas.

		Espécies com as quais os dejetos se confundem											
		Raposa	Fuinha	Texugo	Lontra	Geneta	Sacarrabos	Gato	Cão	Doninha	Toirão	Influência Espacial	Influência Temporal
Espécies produtoras do dejeto	Raposa (n=81)		X	X		X	X	X	X	X		✔	✔
	Fuinha (n=73)	X				X	X			X	X	✔	✔
	Texugo (n=10)	X					X						✔
	Lontra (n=6)	X	X									✔	✔
	Geneta (n=15)	X	X	X			X					✔	✔
	Sacarrabos (n=11)	X				X		X	X			✔	✔
	Gato (n=2)	X	X				X					---	---
	Cão (n=1)	X				X						---	---

A espécie relativamente à qual é mais problemática a identificação dos dejetos é a raposa, sendo confundida com seis outras espécies, seguindo-se a fuinha, confundida com cinco espécies, e a geneta e o sacarrabos, ambas confundidas com quatro espécies.

Verificou-se ainda uma influência temporal em todas as espécies em que se obteve amostras das diferentes estações e uma influência espacial (efeito do local) à exceção do texugo. Tal significa que as espécies com que os dejetos são confundidos diferem entre estações e entre locais de amostragem.

6.1. Influência dos locais na identificação errônea da raposa e da fuinha

A nível espacial verificou-se uma ligeira diferença, quer em termos de percentagem (frequência média do erro) quer do número de espécies passíveis de serem confundidas. Acresce que para ambas as espécies, a muitos dejetos foi atribuído o estado de não identificável (NI).

Na Herdade da Ribeira Abaixo, verificou-se que os dejetos pertencentes à raposa, mas que foram identificados erradamente, eram sobretudo confundidos e identificados como sendo de sacarrabos (em média 10% dos dejetos de raposa foram identificados como sendo de sacarrabos) seguindo-se a fuinha (8,46%). É ainda de realçar que 5,38% dos dejetos foram identificados erradamente como sendo de texugo e outros como sendo de geneta (1,54%), gato (0,77%) e cão (0,77%).

Na Companhia das Lezírias a percentagem de dejetos não identificáveis da raposa foi superior em relação à Herdade da Ribeira Abaixo e a percentagem de dejetos identificados erradamente como de sacarrabos neste local foi praticamente metade de na Herdade da Ribeira Abaixo (5,58%). A fuinha e o sacarrabos foram as duas espécies mais atribuídas aos dejetos de raposa na Companhia das Lezírias mas é de referir que dejetos de raposa também foram confundidos com os de texugo (0,36%), gato (0,36%) e doninha (0,36%).

Em termos de locais na Herdade da Ribeira Abaixo os dejetos de fuinha foram confundidos com mais uma espécie (cinco espécies) em relação à Companhia das Lezírias (quatro espécies).

Verificou-se que muitos dos dejetos que não foram identificados corretamente, foram classificados como não identificável (HRA - 28%, CL - 25,56%), sendo que na Companhia das Lezírias, os restantes dejetos de fuinha foram identificados como sendo de doninha (22,2%), de raposa (12,2%), de sacarrabos (2,2%) e de toirão (1,1%). Na Herdade da Ribeira Abaixo foram identificados como pertencentes à raposa (11,3%), sacarrabos (9,8%), doninha (5,1%), geneta (2,6%) e toirão (0,4%).

Assim, a identificação dos dejetos de fuinha como sendo de raposa foi semelhante em ambos os locais enquanto na Herdade da Ribeira Abaixo foram mais confundidos com geneta. Os dejetos de fuinha, na Herdade da Ribeira Abaixo foram confundidos com mais uma espécie (geneta) em relação à Companhia das Lezírias.

Assim, de uma forma geral, verificou-se que os dejetos de raposa foram confundidos com um maior número de espécies que os dejetos de fuinha.

Os dejetos de raposa apesar de nos dois locais terem sido confundidos com o mesmo número de espécies, estas diferiram de local para local. Os dejetos de fuinha foram confundidos com menos espécies na Companhia das Lezírias, sendo que as restantes espécies coincidiram nos dois locais

Tabela III.14 - Tabela em que é possível comparar a influência espacial na identificação errada dos dejetos

				Espécies com as quais os dejetos se confundem									
				NI	Raposa	Fuinha	Sacarrabos	Geneta	Texugo	Gato	Cão	Doninha	Toirão
Espécies produtoras do dejeto	HRA	Raposa	Freq. Média do erro	24,6		8,5	10,0	1,5	5,4	0,8	0,8	0,0	0,0
			Desv.Padrão	±9,6		±2,9	±3,9	±1,9	±3,9	±1,5	±1,5	0,0	0,0
		Fuinha	Freq. Média do erro	28,0	11,3		9,8	2,5	0,0	0,0	0,0	5,1	0,4
			Desv.Padrão	±9,2	±8,0		±5,5	±1,9	0,0	0,0	0,0	±3,3	±0,7
	CL	Raposa	Freq. Média do erro	34,2		8,4	5,8	0,4	0,4	0,4	0,0	0,4	0,0
			Desv.Padrão	±16,0		±6,1	±3,5	±0,7	±0,7	±0,7	0,0	±0,7	0,0
		Fuinha	Freq. Média do erro	25,6	12,2		2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	22,2	1,1
			Desv.Padrão	±15,9	±8,9		±2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	±9,9	±2,2

6.2. Influência das estações na identificação errônea da raposa e da fuinha

Em termos médios, dos dejetos identificados erradamente nas três estações, a maioria foi identificado como não identificável.

Verifica-se pela tabela III.15 que o grupo de espécies com que os dejetos de raposa são confundidos mudam entre estações, à exceção de fuinha e sacarrabos. Além deste facto, verificou-se que o inverno é a estação em que os dejetos de raposa são confundidos com um menor número de espécies.

Quanto à fuinha, dentro das espécies com as quais existiu confusão na identificação, aquela que apresentou uma percentagem menor foi a geneta no outono e o toirão no inverno e na primavera. A espécie com que os dejetos de fuinha foram mais confundidos variaram no inverno em relação ao outono e primavera. No outono a percentagem mais

elevada correspondeu à raposa (8,6%) apesar de ser uma percentagem menor em relação às outras estações. No inverno os dejetos de fuinha foram identificados com maior frequência como sendo de sacarrabos (18%) e por fim na primavera foram mais identificados como sendo de raposa (16%). Em todas as estações os dejetos de fuinha foram confundidos com as espécies raposa, sacarrabos, geneta e doninha. Adicionalmente no outono foram-no ainda com o toirão.

Tabela III.15 - Tabela em que é possível comparar a influência temporal na identificação errada dos dejetos de raposa e fuinha

				Espécies com as quais os dejetos se confundem									
				NI	Raposa	Fuinha	Sacarrabos	Geneta	Texugo	Gato	Cão	Doninha	Toirão
Espécies produtoras do dejeto	Outono	Raposa	Freq. Média do erro	34,8		8,1	2,2	0,7	4,4	0,7	0,0	0,0	0,0
			Desv.Padrão	±10,9		±3,6	±3,0	±1,5	±4,3	±1,5	0,0	0,0	0,0
		Fuinha	Freq. Média do erro	30,0	8,6		4,3	2,1	0,0	0,0	0,0	6,4	1,4
			Desv.Padrão	±10,5	±8,6		±5,7	±1,7	0,0	0,0	0,0	±1,4	±2,9
	Inverno	Raposa	Freq. Média do erro	30,9		9,7	10,9	0,0	0,0	0,6	0,0	0,6	0,0
			Desv.Padrão	±15,7		±9,5	±3,1	0,0	0,0	±1,2	0,0	±1,2	0,0
		Fuinha	Freq. Média do erro	26,0	10,0		18,0	3,0	0,0	0,0	0,0	9,0	0,0
			Desv.Padrão	±14,6	±7,1		±8,1	±4,0	0,0	0,0	0,0	±5,8	0,0
	Primavera	Raposa	Freq. Média do erro	26,7		6,7	7,6	1,9	1,9	0,0	1,0	0,0	0,0
			Desv.Padrão	±18,7		±6,5	±2,3	±3,8	±2,3	0,0	±1,9	0,0	0,0
		Fuinha	Freq. Média do erro	25,6	16,0		4,0	0,8	0,0	0,0	0,0	12,8	0,0
			Desv.Padrão	±21,1	±6,2		±2,5	±1,6	0,0	0,0	0,0	±9,9	0,0

6.3. Identificação errônea da raposa e da fuinha

De uma forma geral os dejetos pertencentes à raposa são identificados como sendo de fuinha, sacarrabos, texugo, geneta, gato, cão e doninha e os dejetos de fuinha foram confundidos com os de raposa, doninha, sacarrabos, geneta e o toirão.

É de considerar a elevada percentagem de dejetos em que não foi possível ter uma identificação pela morfologia quer com os dejetos de raposa quer com os de fuinha.

O facto de muitos dejetos não serem identificados (NI) e outros serem identificados como pertencentes a outras espécies podem ter como consequência uma subestimativa ou sobrestimava populacional das diferentes espécies, sendo que os resultados pressupõem a

existência de uma influência temporal e espacial na identificação dos dejetos de raposa e fuinha.

Tabela III.16 - A tabela demonstra com que espécies é que os dejetos de raposa e fuinha são confundidos

			Espécies com as quais os dejetos se confundem											
			NI	Raposa	Fuinha	Sacarrabos	Geneta	Texugo	Gato	Cão	Doninha	Toirão	Influência Local	Influência Temporal
Espécies produtoras do dejeto	Raposa	Freq. Média do erro	31,1		8,4	7,2	0,7	2,0	0,5	0,2	0,2	0,0	✔	✔
		Desv.Padrão	±13,7		±4,0	±2,4	±1,0	±1,5	±1,0	±0,5	±0,5	0,0		
	Fuinha	Freq. Média do erro	27,4	11,5		8,0	1,9	0,00	0,00	0,00	9,3	0,6	✔	✔
		Desv.Padrão	±10,0	±5,7		±4,0	±1,4	0,00	0,00	0,00	±4,8	±1,1		

7. Variabilidade de dejetos pertencentes à mesma espécie

Neste capítulo pretende-se analisar as diferenças visuais e possíveis causas para estas tendo por base as fotografias dos dejetos das diferentes espécies de mesocarnívoros que foram corretamente identificados e dos dejetos que foram erradamente identificados.

7.1. Raposa

III.5. Fotografias de dejetos de raposa utilizados no estudo e identificados corretamente pela morfologia.

a) Dejeto de raposa constituído predominantemente por pêlo de mamífero. Outono HRA

b) Dejeto de raposa constituído por frutos, mamíferos e artrópodes. Outono CL

c) Dejeto de raposa constituído por frutos, mamíferos e lagostim. Inverno CL

d) Dejeto de raposa constituído exclusivamente por mamíferos. Inverno CL

e) Dejeto de raposa constituído sobretudo por mamíferos mas também alguns artrópodes. Inverno CL

f) Dejeto de raposa constituído sobretudo por mamíferos mas também alguns artrópodes. Inverno CL

Apesar da variabilidade de cor e conteúdo dos dejetos, todos os dejetos da figura III.5 possuem uma morfologia típica de dejetos de raposa (ver Anexo 5).

Todos eles possuem uma forma cilíndrica, com extremidades afiladas e são seccionados.

III.16. Fotografias de dejetos de raposa utilizados no estudo e identificados erradamente pela morfologia.

a) Dejeto de raposa constituído por lagostim e fruta. Identificado como de texugo (2) e não identificável (3). Outono HRA

b) Dejeto de raposa constituído exclusivamente por frutos. Identificado como de fuinha (3) e não identificável (2). Outono HRA

c) Dejeto de raposa constituído por mamíferos, artrópodes e fruta. Identificado como de fuinha (4) e geneta (1). Outono HRA

d) Dejeto de raposa constituído por mamíferos e aves. Identificado como de fuinha (3) e sacarrabos (2).Inverno CL

e) Dejeto de raposa constituído exclusivamente por mamíferos. Identificado como de fuinha (3) e sacarrabos (2) Primavera CL

Os dejetos das figuras III.6. a) e b) estão depositados sobre a vegetação, algo típico da espécie, apesar disso, a deposição sobre a mesma altera a morfologia original do dejeto além de tornar mais difícil a sua observação.

Os dejetos das figuras iii.6. c) e d) apesar de terem uma forma mais definida e terem uma extremidade afilada, não são seccionados, um facto que pode ter levado à identificação errada. Além disso, ambos os dejetos são um pouco mais estreitos que o típico da espécie, o que pode estar relacionado com o conteúdo dos dejetos (pêlo de mamífero).

O dejeto da figura III.6. d) também é mais estreito que o típico e não apresenta secções bem definidas, o que sugere que seja devido ao conteúdo alimentar.

7.2. Fuinha

III.7. Fotografias de dejetos de fuinha utilizados no estudo e identificados corretamente pela morfologia.

a) Dejeto de fuinha constituído exclusivamente por frutos. Outono HRA

b) Dejeto de fuinha constituído por mamíferos e alguma matéria orgânica. Inverno HRA

Os dejetos de fuinha, tal como os exemplares das figuras III.7. a) e b), são mais estreitos que os dejetos de raposa e possuem as extremidades curvadas e uma delas afilada (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

A cor é variável conforme a dieta e apesar de na figura III.7. a) o dejeto se encontrar fragmentados, este não é por ser típico mas pelo comprimento e conteúdo alimentar do dejeto, a fruta é menos consistente.

III.8. Fotografias de dejetos de fuinha utilizados no estudo e identificados erradamente pela morfologia.

a) Dejeto de fuinha constituído exclusivamente por mamíferos. Identificados como de doninha (5). Outono CL

b) Dejeto de fuinha constituído exclusivamente por mamíferos Identificados como de doninha (2) e não identificável (3). Primavera CL

c) Dejeto de fuinha constituído exclusivamente por frutos. Considerado não identificável (5). Inverno HRA

d) Dejeto de fuinha constituído por frutos e mamíferos. Identificado como de sacarrabos (3) e geneta (2). Inverno HRA

e) Dejeto de fuinha constituído por frutos e mamíferos. Identificado como de sacarrabos (3), geneta (1) e não identificável (1). Inverno HRA

Os resultados sugerem que o conteúdo dos dejetos, que está diretamente relacionado com a dieta, influência a morfologia dos dejetos de fuinha, induzindo em erro a identificação dos mesmos.

Na figura III.8. a) e b) os dejetos apenas contém restos de mamíferos, o que faz com que os mesmos tenham uma menor dimensão e que sejam mais retorcidos que o típico, assemelhando-se aos dejetos de doninha.

O dejeto da figura III.8. c) é um dejeto que perdeu a sua forma original quer por estar depositado sobre plantas, quer por ser constituído apenas por frutos, o que confere uma textura mais mole ao dejeto.

Os dejetos da figura III.8. e) e f) têm o mesmo conteúdo alimentar o que leva a querer que se reflete na mesma morfologia. Morfologia esta que não é a típica da espécie: possui uma espessura superior, é um dejeto linear e tubular, não possuem qualquer curvatura e uma das extremidades apesar de ser pontiaguda não é tão pronunciada como na morfologia típica (comparar com figura III.8. b)).

7.3. Texugo

III.9. Fotografias de dejetos de texugo utilizados no estudo e identificados corretamente pela morfologia.

a) Dejeto de texugo constituído por matéria orgânica. Inverno CL

b) Dejeto de texugo constituído por frutos e matéria orgânica. Primavera HRA

Tipicamente os dejetos de texugo encontram-se em latrinas escavadas no solo tal como as presentes na figura III.9. a) e b). Este facto torna fácil a identificação dos dejetos de texugo que se encontram nos mesmos.

III.10. Fotografias de dejetos de texugo utilizados no estudo e identificados erradamente pela morfologia.

a) Dejeto de texugo constituído por artrópodes e matéria orgânica. Considerado não identificável (5). Inverno HRA

b) Dejeto de texugo constituído por mamíferos e artrópodes. Identificado como de sacarrabos (1) e não identificável (4). Primavera CL

O dejeto da figura III.10. a) possuía larvas de artrópode, o que pode ter dificultado a identificação. No caso do dejeto da figura III.10. b) o facto de o dejeto se localizar fora da latrina possivelmente induziu a identificação em erro.

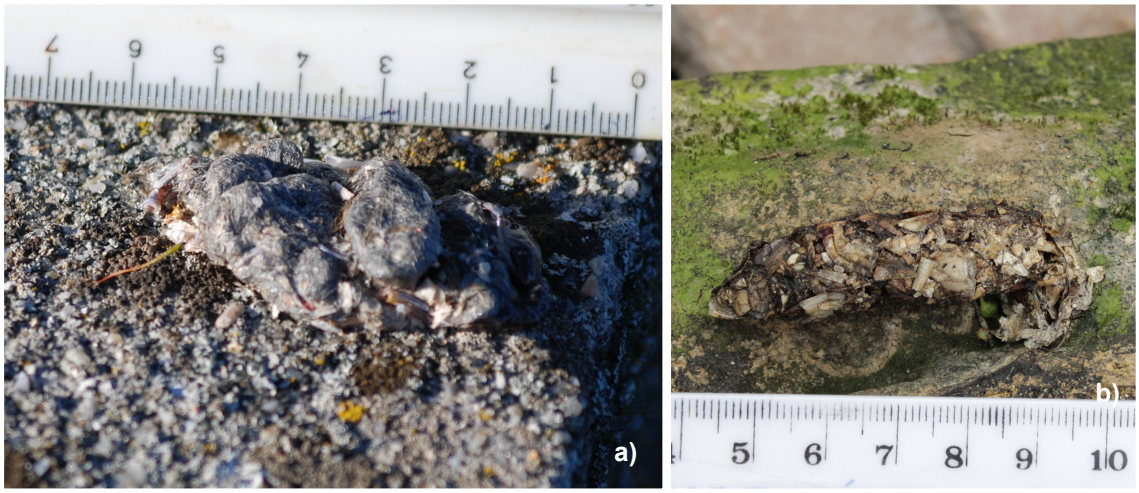
7.4. Lontra

III.11. Fotografias de dejetos de lontra utilizados no estudo e identificados corretamente pela morfologia.

a) Dejeto de lontra constituído exclusivamente por lagostim. Outono HRA

b) Dejeto de lontra constituído exclusivamente por lagostim. Inverno CL

Os dejetos de lontra têm uma forma cilíndrica e são algo retorcidos (Clavero et al. 2003). Normalmente não depositados em locais proeminentes junto a massas de água (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Pedroso e Sales-Luis 2012) tal como sucede nos dejetos da figura III.11. a) e b). Além deste facto ambos os dejetos eram constituídos apenas por lagostim o que, sem dúvida, facilita a identificação.



III.12. Fotografias de dejetos de lontra utilizados no estudo e identificados erradamente pela morfologia.

a) Dejeto de lontra constituído por mamíferos e lagostim. Considerado como não identificável (4). Inverno CL

b) Dejeto de lontra constituído exclusivamente por lagostim. Identificado como de raposa (1) e fuinha (1). Primavera HRA

O dejeto da figura III.12. a) além de não possuir uma forma típica, o conteúdo também o item alimentar que a lontra mais consome o que leva à errada identificação.

No dejeto da figura III.12. b) apesar de ter uma forma cilíndrica, numa das pontas ser retorcido e o conteúdo ser lagostim, este não apresenta uma cor avermelhada como seria de esperar do lagostim.

7.5. Geneta

III.13. Fotografias de dejeto de geneta utilizados no estudo e identificados corretamente pela morfologia.

a) e b) Dejeto de geneta constituído por artrópodes e mamíferos. Outono HRA

Os dejetos de geneta são compridos e tubulares, com um aspeto compacto, escuro e uniforme por vezes fragmentados e com uma extremidade pontiaguda (Blanco-Garrifo e Rivas 2014) tal como se apresentam os dejetos da figura III.13. O aspeto compacto e escuro dos dejetos poderá dever-se à dieta de artrópodes e mamíferos.

Pelas capacidades trepadoras da geneta (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Alves 2012) pode realizar as latrinas em locais elevados como em árvores ou muros tal como se verifica na figura III.13. a).

III.14. Fotografias de dejetos de geneta utilizados no estudo e identificados erradamente pela morfologia.

a) Dejeto de geneta constituído por frutos e artrópodes. Identificado como de sacarrabos (4) e fuinha (1). Inverno HRA

b) Dejeto de geneta constituído exclusivamente por mamíferos. Identificado como de fuinha (1), sacarrabos (2), raposa (1) e não identificável (1). Inverno HRA

c) Dejeto de geneta constituído por frutos e mamíferos. Identificado como de sacarrabos (3), raposa (1) e não identificável (1). Inverno HRA

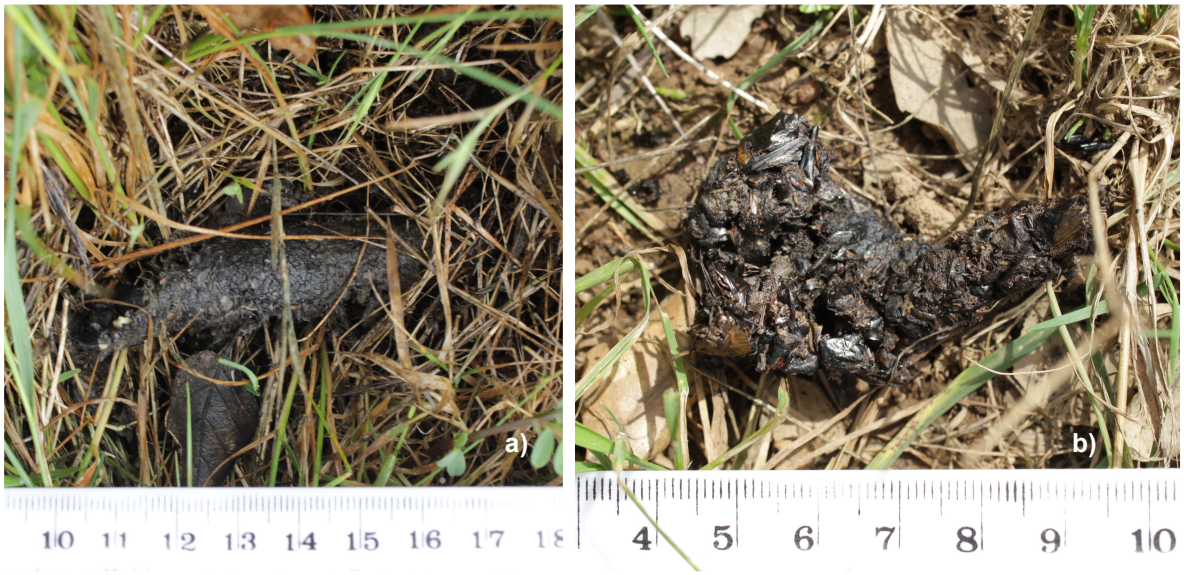
Os dejetos da figura III.14. a), b) e c) não se encontram em latrinas como o descrito, facto que provavelmente levou à errada identificação dos dejetos a) e c). No caso do dejeto b), além da evidência anterior, a composição do dejeto exclusiva de mamíferos tornou o dejeto mais claro e menos compacto do que o descrito para a espécie.

7.6. Sacarrabos

III.15. Fotografia de dejeto de sacarrabos utilizado no estudo e identificado corretamente pela morfologia.

a) Dejeto de sacarrabos constituído por mamíferos, répteis e artrópodes. Primavera HRA

O dejeto de sacarrabos é cilíndrico, alongado e não retorcido (Moral et al. 2014) tal como o da figura III.15 que se encontra ao nível do solo.



III.16. Fotografias de dejetos de sacarrabos utilizados no estudo e identificados erradamente pela morfologia.

a) Dejeto de sacarrabos constituído por mamíferos, artrópodes e répteis. Identificado como de raposa (1) e não identificável (4). Primavera HRA

b) Dejeto de sacarrabos constituído exclusivamente por artrópodes. Identificado como de raposa (1) e não identificável (4). Primavera HRA

O facto dos dejetos da figura III.16 a) e b) se encontrarem no meio da vegetação não facilita a observação das características dos dejetos. Uma forma de distinguir os dejetos de

sacarrabos de geneta é por comparação, os de sacarrabos são mais compactos, grossos e menores que os de geneta (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999), porém usar este conhecimento teórico na identificação dos dejetos não é fácil por não se ter termos de comparação e por a morfologia poder estar alterada como é o caso do dejeto da figura III.16 b).

IV. Considerações finais

Durante o trabalho de campo verificou-se uma maior facilidade de recolha de amostras na Herdade da Ribeira Abaixo em relação à Companhia das Lezírias. Este facto poder-se-á dever à existência de uma diferença na abundância de mesocarnívoros entre os dois locais, muito fruto da perturbação antropogénica que se verifica ser muito superior na Companhia das Lezírias (Santos 2014).Tal é explicado pelas diferentes características fisiográficas e vocação atual de cada área. A Herdade da Ribeira Abaixo localiza-se uma área moderadamente acidentada, com uma elevada cobertura arbórea e reduzidas atividades económicas, nomeadamente no que se refere à ausência de pressão de pastoreio. Já a Companhia das Lezírias é uma área essencialmente plana, com elevadas variações a nível da cobertura arbórea e arbustiva e uma intensa pressão de pastoreio por gado bovino.

Apesar de no presente estudo se ter obtido percentagens significativas de identificação das amostras fecais, verificou-se que pela identificação morfológica existe uma elevada taxa de dejetos em que não é possível chegar a uma identificação final; a este problema acrescenta-se a taxa de identificação errada que confere incerteza aos resultados.

A identificação molecular da espécie produtora do dejeto é um procedimento rigoroso mas que, devido a diversos fatores (ex.: degradação de ADN, fatores inibitórios), não se traduz num sucesso de 100%.

Contudo, as técnicas moleculares produzem resultados definitivos mas que devem ser interpretados com cautela devido a possíveis contaminações ou ligações inespecíficas. A otimização da técnica, apesar de demorada, é importante para a obtenção de um maior sucesso e de forma mais rápida e inequívoca.

A variação temporal, observada (diminuição do sucesso do outono para a primavera) no sucesso de identificação pelas técnicas moleculares, deve ser considerada no planeamento amostral, apesar de não ser claro neste estudo quais os fatores que comprometem ou favorecem o sucesso da identificação.

É difícil fazer comparações entre diferentes estudos cuja a recolha foi feita em locais geográficos muito diferentes, ainda que na mesma estação do ano, por as condições ambientais, paisagísticas e comunidades faunísticas e florísticas poderem ser muito distintas. Além disso existem outros fatores, que não ambientais ou que não se relacionam com a degradação do ADN, que podem reduzir o sucesso, tal como a inibição da Taq polimerase. Apesar desta inibição nem sempre poder ser contornada, a otimização dos protocolos ajuda certamente no aumento do sucesso, evidência também verificada ao longo deste estudo.

Constatou-se também que o sucesso de identificação pela morfologia é muito reduzido, em média menos de 50% dos dejetos são identificados corretamente, e é comparativamente inferior ao sucesso de identificação pelos métodos moleculares (em média 75%). Não é negligenciável o facto dos observadores apenas terem tido acesso a fotografias para identificar os dejetos. Apesar da escala presente nas fotografias, a observação no campo permite a visualização mais detalhada e em várias perspetivas do dejeto e a observação em tempo real dos componentes dominantes da dieta, assim como a análise da zona envolvente e outras evidências que podem facilitar a identificação.

Os dejetos que não são identificados corretamente pela morfologia, podem comprometer as estimativas reais de abundância das espécies e os eventuais planos de gestão, o que não acontece com os métodos moleculares pelos resultados serem rigorosos. Estes resultados suportam a importância do recurso a métodos moleculares em qualquer estudo que envolva amostragens não invasivas de mesocarnívoros, tanto mais importante quanto mais diversas e abundantes forem as comunidades em análise.

O sucesso de identificação dos dejetos pela morfologia não é influenciado pelo local, mas constatou-se uma diferença na identificação entre espécies, estações do ano, e observadores. As espécies em que os dejetos possuíam alguma particularidade distintiva (deposição em latrinas, localização junto a cursos de água e uma alimentação particular), como é o caso dos dejetos de lontra e texugo, foram aqueles que foram mais facilmente e corretamente identificados pelos observadores.

Em seguida, o maior sucesso revelou ocorrer na identificação dos dejetos de raposa e fuinha, que coincidem com as espécies reconhecidamente mais abundantes e que por isso são espécies cujos dejetos, face aos outros mesocarnívoros, tem uma maior probabilidade de ocorrer.

O gato por outro lado como se encontra em reduzida abundância foi aquele em que os seus dejetos nunca foram identificados corretamente, sendo o dejeto identificado como pertencente a uma espécie mais abundante, verificando-se a importância da inclusão de métodos moleculares nos estudos de espécies que se encontram em reduzidas abundâncias.

Perante os resultados (positivos e negativos) obtidos na identificação morfológica dos dejetos, comprova-se que o sucesso da identificação é multifatorial estando sem dúvida dependente do grau de integridade dos dejetos, e parâmetros associados, e do tipo de recursos consumidos.

Além de se compreender neste estudo quais as espécies que são mais corretamente identificadas através dos dejetos, e aquelas que induzem maior erro de identificação, também foi possível averiguar aquelas com as quais os dejetos são mais facilmente confundíveis (ver Tabela III.16).

A concordância de identificação entre os observadores também é importante de salientar. Os resultados revelaram que nem sempre o facto de existir uma concordância entre os observadores quer dizer que a identificação é a correta. Efetivamente quando mais de 50% dos observadores identificam um dejeto da mesma forma, existe uma maior probabilidade de esta ser identificação ser correta mas também foi constatado que em muitos casos a minoria está correta e não a maioria. De salientar ainda os casos em que todos os observadores identificaram de forma igual mas que estavam errados. Esta constatação é mais um argumento a favor da necessidade de se recorrer a métodos moleculares para identificação das espécies a partir de amostras fecais.

A dieta/conteúdo do dejeto é um fator com elevada influência na identificação do produtor do dejeto por métodos moleculares. Aparentemente um maior conteúdo de artrópodes na amostra dificulta a obtenção de resultados pela inibição da Taq Polimerase e por outro lado um maior conteúdo de frutos no dejeto parece de alguma forma facilitar o sucesso da identificação, sendo este um dos resultados mais inovadores deste estudo.

De acordo com os resultados obtidos, os fatores que mais aparentam levar a identificações erradas dos dejetos com base em critérios morfológicos é a elevada diversidade de formas que podem assumir, mais óbvia numas espécies que noutras, mas também a identificação através de apenas parte do dejeto. Também o conteúdo em alimento nos dejetos pode influenciar a identificação quer pela positiva quer pela negativa.

Os resultados obtidos no presente estudo revelam assim informações que devem ser tidas em conta para futuros estudos que envolvam a identificação de amostras não invasivas de mesocarnívoros, mais especificamente dejetos.

O uso de métodos moleculares para a identificação de dejetos num estudo acresce com a necessidade de rigor. É especialmente importante esta confirmação em planos de conservação que envolva a monitorização de populações com um número reduzido de indivíduos. Uma monitorização que não seja rigorosa pode levar a planos de conservação ineficientes, a sub ou sobre estimativas populacionais e a estatutos de conservação inadequados.

V. Bibliografia

Adrian M. I. and Delibes M. 1987. Food habits of the otter (*Lutra lutra*) in two habitats of the Doñana National Park, SW Spain. *Journal of Zoology*, 212 (3), 399–406.

Alves F. 2012. Geneta (*Genetta genetta*): a trepadora africana. Pp.167-180. . In: Loureiro F., Pedroso N.M., Santos M.J. and Rosalino L.M. (eds) Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses, CARNIVORA.

Alves F. and Basto M.P. 2012. Doninha (*Mustela nivalis*):Pequena mas implacável. Pp.67-80. In: Loureiro, F., Pedroso, N.M., Santos, M.J. and Rosalino, L.M. (eds) Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses, CARNIVORA.

Arnheim N., White T. and Rainey W.E. 1990. Application of PCR: Organismal and Population Biology. *BioScience,* 40(3), 175-182.

Asprea, A. and De Marinis, A. M. 2004. The diet of the badger *Meles meles* (Mustelidae, Carnivora) on the Apennines (Central Italy). *Mammalia* 69 (1), 1-7.

Bakaloudis D. E., Vlachos C.G., Papakosta M. A., Bontzorlos V. A. and Chatzinikos E. N. 2012. Diet Composition and Feeding Strategies of the Stone Marten (Martes foina) in a Typical Mediterranean Ecosystem. *The Scientific World Journal* 1-11.

Balestrieri A, Remonti L. and Prigioni C. 2004. The diet of the Eurasian badger (Meles meles) in an agricultural riverine habitat (NW Italy). Hystrix, *Italian Journal of Mammalogy* 15, 3–12.

Baltrûnaite L. 2001. Feeding habits, food niche overlap of red fox (*Vulpes vulpes* L.) and pine marten (*Martes martes* L.) in hilly moraine highland, Lithuania. *Ekologija (Vilnius),* 2, 27-32

Beja P.R. 1996. An analysis of otter *Lutra lutra* predation on introduced American crayfish Procambarus clarkii in Iberian streams. *Journal of Applied Ecology*, 33, 1156-1170.

Bellemain E. and Taberlet P. 2004. Improved non invasive genotyp- ing method: application to brown bear (Ursus arctos) faeces. *Molecular Ecology Notes*, 4, 519–522.

Bertolino S. and Dore B. 1995. Food Habits of Stone Marten Martes foina in "La Mandria" regional park (Piedmont region, North-Western Italy). *Hystrix*, 7 (1-2), 105-111.

Beschta R.L. 2003. Cottonwood, elk, and wolves in the Lamar Valley of Yel- lowstone National Park. *Ecological Applications* 13, 1295–1309.

Bessetti J. 2007. An Introduction to PCR Inhibitors. *Profiles in DNA*. 9-10

Birks J., Messenger J., Braithwaite T., Davison A., Brookes R. and Strachan C.. 2004. Are scat surveys a reliable method for assessing distribution and population status of pine martens? In: Harrison DJ, Fuller AK, Proulx G (eds) Martens and fishers (Martes) in human-altered environments: an international perspective. Springer, New York, pp 235-252.

Biscoito M., Cunha R.T., Ferrand de Almeida F., Luis A.M.S, Matos L.F., Monteiro L.R., Paulo Fontoura A., Soares A.A. and Teixeira A.M. 1990. Mamíferos. Pp. 81-90 In: Cabral, J.M., Magalhães, C.P, Oliveira, E. and Romão, C. (eds) Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Lisboa

Blanco-Garrido F. and Rivas A. 2014. Gineta *Genetta genetta* (Linnaeus, 1758). In: Calzada, J., Clavero, M. and Fernández, A. (eds). Guía virtual de los indicios de los mamíferos de la Península Ibérica, Islas Baleares y Canarias. Sociedad Española para la Conservación y Estudio de los Mamíferos (SECEM). http://www.secem.es/guiadeindiciosmamiferos/ Download em 10/08/2015.

Bonin A., Bellemain E., Eidesen P.B., Pompanon F., Brochmann C. and Taberlet P.. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, 13: 3261—3273.

Borralho R., Palomares, F. e Hora, A. 1996. The distribution of the Egyptian mongoose Herpestes ichneumon (L.) in Portugal. *Mammal Review*,*26*(1), 1-8.

Broquet T., Petit E. 2004. Quantifying genotyping errors in non-invasive population genetics. *Molecular Ecology*, 13, 3601– 3608.

Broquet T., Ménard N. and 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.

Brzezinski M., Romanowski J., Kopczynski L. and Kurowicka E.. 2006. Habitat and seasonal variations in the diet of otters, *Lutra lutra* in eastern Poland. *Folia Zool.* 55, 337–348.

Bulinski, J. and McArthur, C. 2000. Observer error in counts of macropod scats. *Wildlife Research* 27(3), 277-282.

Cabral M.J. (coord.), Almeida J., Almeida J.R., Dellinger T., Ferrand de Almeida N., Oliveira M.E., Palmeirim J.M., Queiroz Al, Rogado L. e Santos-Reis (eds.) 2006. Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. 2ªed. Instituto da Conservação da Natureza/Assírio & Alvim. Lisboa.

Calderón-Cortés N., Quesada M., Cano-Camacho H. and Zavala-Páramo G. 2010. A Simple and Rapid Method for DNA Isolation from Xylophagous Insects. *Int. J. Mol. Sci.*, *11*, 5056-5064

Castro L.R. 2012. Gato-bravo (*Felis silvestris*): O gato que prefere o bosque à quinta. Pp.193-202. In: Loureiro F., Pedroso N.M., Santos M.J. and Rosalino L.M. (eds) Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses, CARNIVORA.

Chin K. 2002. Analysis of coprolites produced by carnivorous vertebrates. *Paleontological Society Papers*, 8, 43-50.

Clavero M., Blanco-Garrido F. and Ruiz-Olmo J. 2014. Nutria paleártica *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758). In: Calzada J., Clavero M. and Fernández A. (eds). Guía virtual de los indicios de los mamíferos de la Península Ibérica, Islas Baleares y Canarias. Sociedad Española para la Conservación y Estudio de los Mamíferos (SECEM). http://www.secem.es/guiadeindiciosmamiferos/ Download em 10/08/2015.

Clavero M., Prenda J. and Delibes M.. 2003. Trophic diversity of the otter (*Lutra lutra* L.) in temperate and Mediterranean fresh-water habitats. *J. Biogeogr*. 30, 761–769.

Correia A. I. and Santos-Reis M. 1999. Área de estudo. - In: Santos-Reis M. & Correia A. I. (eds.), *Caracterização da flora e da fauna do montado da Herdade da Ribeira Abaixo (Grândola - Baixo Alentejo)*: 5-8. Centro de Biologia Ambiental.

Crooks K.R. and Soulé M.E. 1999. Mesopredator release and avifaunal extinctions in a fragmented system. *Nature* 400, 563–566.

Cupples J.B, Crowther M.S., Story G. and Letnic M. 2011. Dietary overlap and prey selectivity among sympatric carnivores: could dingoes suppress foxes through competition for prey? *Journal of Mammalogy*, 92(3), 590–600

Dalén L., Gotherstrom A. and Angerbjorn A. 2004. Identifying species from pieces of faeces. *Conservation Genetics*, 5, 109-111.

Davison A., Birks J. D. S., Brookes R. C., Braithwaite T.C. and Messenger J. E.. 2002. On the origin of faeces: morphological *versus* molecular methods for surveying rare carnivores from their scats. *J. Zool.,* 257, 141-143.

Deagle B. E., Eveson J.P. and Jarman S.N. 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples - a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology*, 13 (11).

Del Bove E. and Isotti R. 2001. The European Badger (*Meles meles*) diet in a Mediterranean area. *Hystrix It. J. Mumm.* (n.s.) 12 (1), 19-25

Ernest H. B., Penedo M. C. T., May B. P., Syvanen M. and Boyce W. M. 2000. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Mol. Ecol.* 9, 433–441.

Estes J.A., Danner E.M., Doak D.F., Konar B., Springer A.M., Steinberg P.D., Tinker M.T., and Williams T.M. 2004. Complex trophic interactions in kelp forest ecosystems. *Bulletin of Marine Science* 75, 621–638.

Farrell L.E., Roman J. and Sunquist M.E. 2000. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Mol. Ecol.,* 9, 1583-1590.

Feijão M.D.M. 2011. A Flora Medicinal e Aromática da Herdade da Ribeira Abaixo, Grândola (Estação de Campo, CBA): caracterização micromorfológica e dos óleos essenciais de *Lavandula luisieri.* Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências

Fernandes C.A., Ginja C., Pereira I., Tenreiro R., Bruford M.W. and Santos-Reis M. 2008. Species-specific mitochondrial DNA markers for identification of non-invasive samples from sympatric carnivores in the Iberian Peninsula. *Conservation Genetics,* 9, 681-690.

Fernando P., Vidya T.N.C., Rajapakse C., Dangolla A., Melnik D.J. 2003. Reliable non-invasive genotyping: fantasy or reality? *Journal of Heredity*, 94, 115–123.

Flagstad O., Roed K., Stacy J.E., Jakobsen S.K. 1999. Reliable non- invasive genotyping based on excremental PCR of nuclear DNA purified with a magnetic bead protocol. *Molecular Ecology*, 8, 879–884.

Foran D. R., Crooks K. R. and Minta S. C. 1997. Species identification from scat: an unambiguous genetic method. *Wildlife Society bulletin,* 25, 835-839

Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Frantz A.C., Pope L.C., Carpenter P.J., Roper G.J., Delahay R.J and Burke T. 2003. Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. *Molecular Ecology*, 12, 1649–1661.

Gese E.M. 2001. Monitoring of terrestrial carnivore populations. In: Carnivore Conservation (eds) Gittleman J.L., Funk S.M., MacDonald D.W. and Wayne R.K. Cambridge: Cambridge University Press & The Zoolgical Society of London, 372-396.

Gittleman J.L. and Gompper M.E. 2005. Plight of Predators - The importance of carnivores for understanding patterns of biodiversity and extinction risk, 370-388 In: Ecology of Predator - Prey interactions (eds) Barbosa P., Castellanos I. Oxford University Press, Inc, New York.

Gittleman, J. L. (2013). *Carnivore behavior, ecology, and evolution*. Springer Science & Business Media.

Gomes, D. J. C. 2015. Estado actual da comunidade de mesocarnívoros no montado da serra de Grândola: distribuição e abundância relativa. Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências

Gompper M.E., Kays R.W., Ray J.C., Lapoint S.D., Bogan D.A. and Cryan J.R.. 2006. A Comparison of Noninvasive Techniques to Survey Carnivore Communities in Northeastern North America. *Wildlife Society Bulletin,* 34(4), 1142-1151

Gompper M.E., Goodman R.M. Kays R.W., Ray J.C., Fiorello C.V. and Wade S.E. 2003. A survey of the parasites of coyotes (*Canis latrans*) in New York based on fecal analysis. *Journal of Wildlife Diseases,* 39, 712–717.

Gonçalves P., Alcobia S. and Santos-Reis M., Eds. 2013. Atlas dos Mamíferos na Charneca do Infantado. Companhia das Lezírias S.A./Centro de Biologia Ambiental (FCUL), Benavente e Lisboa, 92 pp.

Gonçalves P., Simões J. and Ala L. 2014. Companhia das Lezírias: a gestão florestal em prol da biodiversidade, Candidatura aos Green Project Awards – Portugal. *Companhia das Lezírias.*

Goossens B., Chikhi L., Utami S.S., Ruiter J. and Bruford M.W. 2000. A multi-sample, multi-extracts approach for microsatellite analysis of faecal samples in an arboreal ape. *Conservation Genetics*, 1, 157–162.

Greenwood J.J.D. 1996. Basic techniques. In *Ecological census techniques, a handbook:* 11–110. Sutherland, W.J. (Ed.). New York: Cambridge University Press.

Guilherme F.I.J. 2010. Abundância e Diversidade de Pequenos Mamíferos em Habitats Marginais numa Paisagem Rural. Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências

Harrison S., Quinn J. F., Baughman J. F., Murphy D.D. and Ehrlich P.R. 1991. Estimating the effects of scientific study on two butterfly populations. *The American Naturalist,* 137, 227-243.

Hoffman A., Decher J., Rovero F., Schaer J., Voigt C. and Wibbelt G. 2010. Field Methods and Techniques for Monitoring Mammals. In: Eymann J., Degreef J., Hauser C., Monje J.C., Samyn Y. and VandenSpiegel D. (eds), Manual on Field Recording Techniques and Protocols for All Taxa Biodiversity Inventories. Abc Taxa, pp.482-529

Hoss M., Kohn M., Paabo S., Knauer F. and Schroder W. 1992. Excrement analysis by PCR. *Nature,* 359, 199.

Hueta A.H. 1992. Los Carnívoros y sus perspectivas de conservacion en las areas protegidas de Mexico. *Acta Zool.Mex*., 1-23.

Kelly M.J., Betsch J., Wultsch C., Mesa B. and Millis S.. 2012. In: Boitani L. and Powell A.R. (eds) Carnivore Ecology and Conservation. Oxford University Press, USA, pp 47-69.

Klare U., Kamler J.F. and Macdonald D.W. 2011. A comparison and critique of different scat- analysis methods for determining carnivore diet. *Mammal Review*, 41(4), 294-312.

Kohn M., Knauer F., Stoffella A., Schröder W. and Pääbo S. 1995. Conservation genetics of the European brown bear - a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Ecology,* 4(1), 95-104.

Kohn M.H. and Wayne R.K. 1997. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution,* 12, 223-227.

Kohn M.H., York E.C., Kamradt D.A., Haught G., Sauvajot R.M. and Wayne R.K. 1999. Estimating population size by genotyping faeces*. Proc. R. Soc. Lond*. 266, 657-663.

Korpimäki E. and Norrdahl K. 1998. Experimental reduction of predators reverses the crash phase of small-rodent cycles. *Ecology*, 76, 2448–2455.

Krawczyk A.J., Skierczynski M. and Tryjanowski P. 2011. Diet of the Eurasian otter Lutra lutra on small watercourses in Western Poland. *Mammalia* 75, 207–210

Krebs C.J. 2006. Mammals. Pp.351-368. In: Sutherland, J.S. (eds), *Ecological Census Techniques*. United States of America: Cambridge University Press.

Laguardia A., Wang J., Shi F., Shi K. and Riordan P. 2015. Species identification refined by molecular scatology in a community of sympatric carnivores in Xinjiang, China. *Zoological Research*, 36 (2), 72-78.

Lanszki J., Körmendi S., Hancz C. and Zalewski A. 1999. Feeding habits and trophic niche overlap in a Carnivora community of Hungary. *Acta Theriol*. 44, 429–442.

Lanszki J., Mórocz A. and Conroy J.W.H. 2010. Diet of Eurasian otters (*Lutra lutra*) in natural habitats of the Gemenc Area (Danube-Drava National Park, Hungary) in early spring period. *Natura Somogyiensis*, 17, 315-326

Lanszki J., Széles L.G. and Yoxon G. 2009. Diet composition of otters (*Lutra lutra* L.) Living on small watercourses in southwestern Hungary. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 55 (3), 293–306

Loureiro F. 2012. Raposa (*Vulpes vulpes*): A Matreira das Fábulas. Pp. 19-30. In: Loureiro F., Pedroso N.M., Santos M.J. and Rosalino L.M. (eds) Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses, CARNIVORA. Lisboa

Lucchini V., Fabbri E., Marucco F., Ricci S., Boitani L. and Randi E. 2002. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (Canis lupus) packs in the western Italian Alps. Molecular Ecology 11:857–868.

Machiels B.M., Ruers T., Lindhout M., Hardy K., Hlavaty T., Bang D.D., Somers V.A., Baeten C., von Meyenfeldt M. and Thunnissen F.B. 2000. New protocol for DNA extraction of stool. *Biotechniques*, 28(2), 286-290.

Marassi M. and Biancardi C.M. 2002. Diet of the Eurasian Badger (Meles meles) in an area of the

Italian Prealps. *Hystrix,* (n.s.) 13 (1-2), 19-28

Mathias M.L. and Ramalhinho M.G. 1999. Pequenos mamíferos. Pp. 264-271 In: Santos-Reis M. and Correia A.I. (eds) Caracterização da Flora e Fauna da Herdade da Ribeira Abaixo (Grândola - Alto Alentejo), Centro de Biologia Ambiental, Lisboa.

Mendes T.F.C. 2014. Adequabilidade da Charneca do Infantado para o gato--bravo (*Felis silvestris*) e influência da presença do gato doméstico (*Felis catus*). Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências

Monteiro L., Bonnemaison D., Vekris A., Petry K.G., Bonnet J., Vidal R., Cabrita J. and Mégraud F. 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model. J. *Clin. Microbiol.* 35, 995–8.

Moral M., Prunier F. and Saldaña S. 2014. Melocillo *Herpestes icheneumon* (Linnaeus, 1758). In: Calzada J., Clavero M. and Fernández A. (eds). Guía virtual de los indicios de los mamíferos de la Península Ibérica, Islas Baleares y Canarias. Sociedad Española para la Conservación y Estudio de los Mamíferos (SECEM). http://www.secem.es/guiadeindiciosmamiferos/ Download em 10/08/2015.

Morin P.A. and Woodruff D.S. 1996. Non-invasive genotyping for vertebrate conservation, pp. 298-313. In: Smith T.B. and Wayne R.K (eds.) Molecular Genetic Approaches in Conservation. Oxford University Press.

Morin P.A., Wallis J., Moore J.J., Chakraborty R. and Woodruff D.S. 1993. Non-invasive Sampling and DNA Amplification for Parternity Exclusion, Community Structure, and Phylogeography in Wild Chimpanzees. *Primates*, 34(3), 347-356.

Morin P.A., Moore J.J., Charkraborty R., Jin L., Goodall J. and Woodruff D.S. 1994. Kin Selection, Social Structure, Gene Flow, and the Evolution of Chimpanzees. *Science*, 265, 1193-1201.

Mullis K.B. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American,* 262(4) , 56-65.

Mullis K., Faloona F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. *Meth. Enzymol*. 155, 335-350.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. and Erlich H.. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Syposia on Quantitative Biology,* 263-273.

Murphy M.A., Waits L.P., Kendall K.C. 2000. Quantitative evaluation of faecal drying methods for brown bear DNA analysis. *Wildlife Society Bulletin*, 28, 951–957.

Murphy M.A., Waits L.P., Kendall K.C. 2003. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (Ursus arctos). *Molecular Ecology*, 12, 2261- 2265.

Murphy M.A., Waits L.P., Kendall K.C., Wasser S.K. Higbee J.A. and Bogden R. 2002. An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. *Conservation Genetics*, 3, 435–440.

Murphy M.A., Kendall K.C., Robinson A.P. and 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 P.A.P., Simões P.C. and Quartau J.A. 2001. Calling songs of certain orthopteran species (Insecta, Orthoptera) in southern Portugal. *Animal Biodiversity and Conservation*, 24(1), 65–79.

Paabo S., Gifford J.A. and Wilson A.C. 1988. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Research*, 16(20), 9775-9787.

Paetkau D. 2003. An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular Ecology*, 12, 1375–1387.

Pakalniske M. 2012. The Feeding Habits of the Red Fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in different landscapes and seasons in Latvia. *Acta Biol. Univ. Daugavp.* 12 (2)

Palomares F., Godoy A., Piriz A., O'Brien J. and Johnson W.E. 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology,* 11, 2171-2182.

Pedroso N.M. and Sales-Luís T. 2012. Lontra (*Lutra lutra*): Como peixe na água. Pp. 149-166. In: Loureiro F., Pedroso N.M., Santos M.J. and Rosalino L.M. (eds) Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses, CARNIVORA.

Pereira M.J.M.A., 2010. Companhia das Lezírias, S.A. - Relatório de Sustentabilidade 2010

Pereira H.M, Domingos T. and Vicente L. (eds). 2004. Portugal Millennium Ecosystem Assessment: State of the Assessment Report. Centro de Biologia Ambiental, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Pereira M.J.M.A., 2010. Relatório de Sustentabilidade 2010. *Companhia das Lezírias, S.A.*

Piggott M.P. 2004. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. *Wildlife Research*, 31, 485-493.

Piggott M.P. and Taylor C.. 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.

Posluszny M., Pilot M., Goszczyński J., Gralak B. 2007. Diet of sympatric pine marten (*Martes martes*) and stone marten (*Martes foina*) identified by genotyping of DNA from faeces. *Ann Zool Fennici,* 44, 269–284.

Powledge T.M. 2004. The polymerase chain reaction. *Advances in Physiology Education*, 28, 44-50.

Prugh L.R. and Ritland C.E. 2005. Molecular testing of observer identification of carnivore feces in the field. *Wildlife Society Bulletin*, 33 (1), 189-194.

Reed J.E., Baker R.J., Ballard W.B. and Kelly B.T. 2004. Differentiating Mexican gray wolf and coyote scats using DNA analysis. *Wildlife Society Bulletin,* 32, 685-692.

Reiss R.A. and Rutz B. 1999. Quality Control PCR: A Method for Detecting Inhibitors of *Taq* DNA Polymerase. *BioTechniques* 27, 920-926.

Rosalino L.M., Rosa S. and Santos-Reis M. 2010. The role of carnivores as Mediterranean seed dispersers. *Ann. Zool. Fennici*, 47, 195-205.

Rosalino L.M and Chambel I. 2012. Sacarrabos (*Herpestes ichneumon*): O emigrante africano. Pp.181-192. In: Loureiro F., Pedroso N.M., Santos M.J. and Rosalino L.M. (eds) Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses, CARNIVORA. Lisboa

Roux K.H. 1995. Optimization and Troubleshooting in PCR. *PCR Methods and Applications*, 4 (5), 185-194.

Ruiz-González A., Rubines J., Berdión O., Gómez-Moliner J.. 2008. A non-invasive genetic method to identify the sympatric mustelids pine marten (Martes martes) and stone marten (Martes foina): preliminary distribution survey on the northern Iberian Peninsula. *Eur J Wildl Res,* 54, 253-261.

Ruiz-Olmo J. 2012. Conhecendo melhor a ordem dos mamíferos carnívoros. Pp. 1-17. In: Loureiro F., Pedroso N.M., Santos M.J. and Rosalino L.M. (eds) Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses, CARNIVORA. Lisboa

Rysavá-Nováková M. and Koubek P. 2009. Feeding habits of two sympatric mustelid species, European polecat Mustela putorius and stone marten Martes foina, in the Czech Republic. *Folia Zool.* 58(1), 66–75

Sadlier L.M.J., Webbon C.C., Baker P.J. and Harris S. 2004. Methods of monitoring red foxes *Vulpes vulpes* and badgers *Meles meles*: are field signs the answer? *Mammal Rev.*, 34(1), 75-98.

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T, Erlich H.A. and Arnheim N. 2005. Enzymatic Amplification of beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, 230, 1350-1354.

Sánchez M., Rodrigues P., Ortoño V. and Herrero J. 2008. Feeding Habits of the Genet *Genetta genetta* in an Iberian Continental Wetland. *Hystrix It. J. Mamm.* 19(2), 133-142.

Santini A., Lucchini V., Fabbri E. and Randi E. 2007. Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (Canis lupus) excremental DNA samples. *Molecular Ecology Notes*, 7 (6), 955-961.

Santos M.J and Matos H.M. 2012. Fuinha (*Martes foina*): A nossa vizinha. Pp.109-120. In: Loureiro F., Pedroso N.M., Santos M.J. and Rosalino L.M. (eds) Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses, CARNIVORA. Lisboa

Santos M.J. 2012. Toirão ou Furão (*Mustela putorius*), eis a questão? Pp. 97-108. In: Loureiro F., Pedroso N.M., Santos M.J. and Rosalino L.M. (eds) Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses, CARNIVORA.

Santos-Reis M. and Petrucci-Fonseca F. 1999. Carnívoros. In: Mathias M. (eds), Mamíferos Terrestres de Portugal Continental, Açores e Madeira. Instituto da Conservação da Natureza e Centro de Biologia Ambiental da Universidade de Lisboa, pp.136-164.

Santos-Reis M., Rosalino L.M. and Rodrigues M. 1999. Lagomorfos, Carnívoros e Artiodáctilos (Mamíferos). Pp. 249-261 In: Santos-Reis M. and Correia A.I. (eds.), Caracterização da flora e da fauna do montado da Herdade da Ribeira Abaixo (Grândola - Baixo Alentejo). Centro de Biologia Ambiental.

Santos, J. G. 2014. Niche partitioning in managed landscapes: Temporal and spatial segregation in a Mediterranean community of mesocarnivores. MSc Thesis. Uppsala University, Uppsala, Sweden.

Sarmento P., 1996. Feeding ecology of the European wildcat Felis silvestris in Portugal. *Acta Theriologica* 41, 409–414.

Seber G.A.F. 1986. A Review of Estimating Animal Abundance. *Biometrics.* 42, 2, 267-292.

Shehzad W., Riaz T., Nawaz M.A., Miquel C., Poillot C., Shah S.A., Pompanon F., Coissac E. and Taberlet P. 2012. Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (Prionailurus bengalensis) in Pakistan. *Molecular Ecology,* 21, 1951-1965.

Simões L.G., 2009. Factores Determinantes da Diversidade e Abundância de Mamíferos num Sistema Agro-Silvo-Pastoril Mediterrânico. Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências

Smith K.L., Alberts S.C., Bayes M.K., Bruford M.W. and Altmann J. 2000. Cross-species amplification, non-invasive genotyping, and non-Mendelian inheritance of human STRPS in savannah baboons. *Am J Primat* 51, 219–227.

Stenglein J.L., Barba M.D., Ausband D.E. and Waits L.P. 2010. Impacts of sampling location within a faeces on DNA quality in two carnivore species. *Molecular Ecology Resources,* 10, 109-114.

Sunnucks P. 2000. Efficient genetic markers for population bioloby. *TREE*, 15(5), 199-203.

Sutherland W.J. 1996 Mammals. In Ecological census techniques a handbook, pp.351. Cambridge University Press.

Symondson W.O.C. 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Mol Ecol* 11, 627-641.

Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P., Bouvet J. 1996. Realiable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research,* 24, 3189-3194.

Taberlet P., Luikart G.. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society,* 68, 41-55.

Taberlet P., Waits L.P. and Luikart G.. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *TREE,* 14, 323-327.

Urra F., Lozano J., Fernandes M.,España A.J and Monterroso P. 2014. El gato montés *Felis silvestris* Schreber, 1777. In: Calzada J., Clavero M. and Fernández A. (eds). Guía virtual de los indicios de los mamíferos de la Península Ibérica, Islas Baleares y Canarias. Sociedad Española para la Conservación y Estudio de los Mamíferos (SECEM). http://www.secem.es/guiadeindiciosmamiferos/ Download em 10/08/2015.

Waits L.P. and Paetkau D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of wildlife management* 60(4), 1419-1433.

Wasser S.K., Houston C.S., Koehler G.M., Cadd G.G., Fain S.R. 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of ursids. *Molecular Ecology*, 6, 1091–1097.

Wehausen J.D., Ramey R.R., Epps C.W. 2004. Experiments in DNA extraction and PCR amplification from bighorn sheep faeces: the importance of DNA extraction method. *Journal of Heredity*, 95, 503–509.

Witmer G.W. 2005. Wildlife population monitoring: some practical considerations. *Wildlife Research*, 32, 259-263.

Zhang B., Li M., Ma L. e Wei F.. 2006. A Widely Applicable Protocol for DNA Isolation from Fecal Samples. *Biochemical Genetics,* 44, 503-511.

VI. Anexos

Anexo 1 - Folha de registo dos dejetos amostrados. Foram registados as características dos dejetos assim como os locais e dias de amostragem.

Folha de Registo - Indícios Dia: ___ / ___ / _____ GPS: _____

Trabalho:_____ Local:_____

Observadores:_____

ID	Espécie	Ind	C x L x A (cm)	Coordenadas X	Y	Foto	Local

Anexo 2 - Mamíferos carnívoros de Portugal e as suas características

Das 286 espécies de carnívoros conhecidas mundialmente (Hoffmann et al. 2010), 14 ocorrem em Portugal (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Ruiz-Olmo 2012), sendo 11 autóctones e 3 introduzidas (Ruiz-Olmo 2012). É de referir que ainda existiu em Portugal o urso-pardo (*Ursus arctos*) ocorrendo a sua extinção em 1650 com a morte do último exemplar conhecido na serra do Gerês (Beata Neves 1967; Antunes 1993; Mathias et al. 1998 in Cabral et al. 2003).

As 14 espécies que ocorrem em Portugal distribuem-se por cinco famílias e 10 géneros diferentes (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Ruiz-Olmo 2012) tal como descrito na tabela VI.1. É ainda apresentada a sua origem a nível nacional, assim como o seu estatuto de ameaça em Portugal.

Tabela VI.1 - Espécies de mamíferos carnívoros que ocorrem em Portugal, família e subfamília a que pertencem, a sua origem e o estatuto de ameaça a nível nacional (Ex - Extinto; RE - Regionalmente Extinto; CR - Criticamente em Perigo; EN - Em Perigo; VU - Vulnerável; LC - Pouco Preocupante; DD - Informação Insuficiente; NA - Não aplicável) (*adaptado* de Cabral et al. 2003)

Família	Subfamília	Nome comum	Nome científico	Origem	Estatuto de Ameaça
Canidae	Caninae	Raposa	*Vulpes vulpes*	Autóctone	LC
		Lobo-ibérico	*Canis lupus*	Autóctone	EN
Mustelidae	Mustelinae	Arminho	*Mustela erminea*	Autóctone	DD
		Doninha	*Mustela nivalis*	Autóctone	LC
		Visão-Americano	*Neovison vison*	Introduzida	NA
		Toirão	*Mustela putorius*	Autóctone	DD
		Fuinha	*Martes foina*	Autóctone	LC
		Marta	*Martes martes*	Autóctone	DD
	Melidae	Texugo	*Meles meles*	Autóctone	LC
	Lutrinae	Lontra	*Lutra lutra*	Autóctone	LC
Viverridae	Viverrinae	Geneta	*Genetta genetta*	Introduzida	LC
Herpestidae	Herpestinae	Sacarrabos	*Herpestes ichneumon*	Introduzida	LC
Felidae	Felinae	Gato-bravo	*Felis silvestris*	Autóctone	VU
		Lince-ibérico	*Lynx pardinus*	Autóctone	CR

Do elenco de espécies que atualmente ocorrem em Portugal serão aprofundadas algumas das características das espécies que ocorrem nas áreas de estudo consideradas e que são relevantes para a compreensão do presente estudo.

Raposa - *Vulpes vulpes* (Linnaeus 1958)

Em Portugal, apenas ocorre uma espécie de raposa, também designada de raposa comum, raposa vermelha ou zorra, a qual é um dos maiores carnívoros que existe no país. Esta é a espécie mais usual e abundante em todo o mundo (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Loureiro 2012), ocupando variados ambientes terrestres apesar de preferir áreas heterogéneas (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

É uma espécie que além de possuir o estatuto de Não Ameaçada está classificada como espécie cinegética (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

Esta espécie muito ágil está adaptada à marcha, à corrida e à caça, possuindo longos membros com quatro dedos nas patas posteriores e cinco nas anteriores, com garras não retrácteis (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Loureiro 2012).

A sua dieta apresenta um largo espectro alimentar, sendo por isso omnívoro e oportunista (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

Consome sobretudo pequenos mamíferos mas também outros vertebrados, frutos e insetos. A dieta é muito variável entre populações e estações. Além disso é influenciada pela disponibilidade dos alimentos (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Van Valkenburgh 1989 in Loureiro 2012).

Os dejetos são frequentemente usados para marcar o seu extenso território (Loureiro 2012).

Os dejetos possuem uma forma cilíndrica, com extremidades afiladas e uma coloração variável dependente da dieta (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

Depositam os mesmos sobre montes de vegetação ao longo dos caminhos (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999), em pedras proeminentes e outros locais onde se destaquem para que a comunicação seja eficiente (Azcón e Duperón 1999 in Loureiro 2012).

VI.1 - Raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) a realizar marcação por dejetos (© Mike Lane / www.photoshot.com)

VI.2- Ilustração dejetos de raposa (*Vulpes vulpes*) com mais e menos restos de ossos (*adaptado* de Purroy e Varela 2005)

Doninha - *Mustela nivalis* (Schreber 1777)

Dos carnívoros da Europa é esta espécie que tem menor porte (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

É uma espécie versátil que ocupa quase todos os ambientes terrestres tendo uma vasta distribuição mundial e sendo uma das espécies mais abundantes da Península Ibérica. (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Alves e Basto 2012)

Encontra-se ativa de dia e de noite, alternando as horas de repouso com as de atividade, este facto deve-se à sua necessidade de se alimentar frequentemente devido aos custos de termorregulação (Alves e Basto 2012).

VI.3 - Doninha a alimentar-se (*Mustela nivalis*)(© Martin H. Smith / naturepl.com)

É uma espécie especializada em predar roedores estando a sua abundância bastante dependente destas. Ocasionalmente pode consumir ovos, aves lagomorfos, répteis, anfíbios e minhocas (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Palomo and Gisbert 2002 in Alves e Basto 2012). Os nichos explorados por fêmeas e machos são diferentes (Santos-Reis a Petrucci-Fonseca 1999).

VI.4 - Ilustração de um dejeto de doninha (*Mustela nivalis*) (*adaptado* de Bang e Dahlstrom 2011)

Os seus dejetos são alongados, retorcidos e muito enrolados com a extremidade afilada tal como acontece com os dejetos de toirão. Possuem coloração escura e por norma são depositados sobre muros ou sob a vegetação (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Macdonald e Barrett in Alves e Basto 2012).

Toirão - *Mustela putorius* (Linnaeus 1758)

É um carnívoro que explora a interface água/terra (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999). Em Portugal tem uma distribuição generalizada mas descontínua suspeitando-se que se encontra em franco declínio (Santos 2012).

VI.5 - Toirão a alimentar-se (*Mustela putorius*)(© Mike Birkhead / gettyimages.com)

É uma espécie oportunista que apresenta um vasto espectro alimentar mas que consome sobretudo pressas associadas à água, como crustáceos, moluscos, peixes, anfíbios, aves e pequenos mamíferos semi aquáticos. Alimenta-se ainda de lagomorfos, pequenos mamíferos, ovos, répteis, insetos e frutos (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999). A dieta é influenciada pela disponibilidade e varia sazonalmente (Lodé 1994 in Santos 2012).

São alongados e retorcidos com a exterminada afilada, semelhantes aos de doninha, porém maiores (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

São depositados em locais de destaque ao longo das margens das massas de água ou dos caminhos (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

VI.6 - Ilustração dejetos de toirão (*Mustela putorius*) (*adaptado* de Purroy e Varela 2005)

VI.7 - Ilustração de um dejeto de toirão (*Meles meles*) (*adaptado* de Bang e Dahlstrom 2011)

Fuinha - *Martes foina* (Erxleben 1777)

Esta espécie é muito versátil, podendo usar diferentes habitats (Santos e Matos 2012). É uma espécie abundante e está adaptada a trepar, comportamento que a leva a evitar terrenos baixos, abertos ou de cobertura vegetal não lenhosa, preferindo zonas de cobertura arbórea ou rochosas (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

É uma espécie generalista e a sua dieta está dependente da disponibilidade de recursos, alterando-se com as variações de disponibilidade (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

Consome preferencialmente pequenos roedores (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999) e artrópodes mas também se alimenta de outros vertebrados terrestres e durante alguns períodos consome sobretudo frutos, devido à sua elevada abundância. Pelas suas capacidades trepadoras pode ainda consumir aves. (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

Possuem cor e forma semelhantes aos dejetos de toirão, apesar de serem maiores e as extremidades muitas vezes curvadas (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

Depositados em pequenas latrinas, em cima de rochas ou ramos de árvores mas também ao longo de trilhos, sobre pedras, troncos caídos ou no solo (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Santos e Matos 2012).

VI.8 - Fuinha (*Martes foina*) (© Yann Arthus-Bertrand / www.ardea.com)

VI.9 - Ilustração dejetos de fuinha (*Martes foina*) (superior - *adaptado* de Bang e Dahlstrom 2011; inferior - *adaptado* de Purroy e Varela 2005)

Texugo - *Meles meles* (Linnaeus 1758)

Prefere locais de cobertura heterogénea, onde encontra alimento (áreas agrícolas) e refúgio (bosques de caducifólias) (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

É um carnívoro omnívoro e oportunista (Salgado 2014). É o que menos consome carne (Rosalino e Loureiro 2012). Baseia a sua alimentação em invertebrados, frutos e raízes mas adapta-se à disponibilidade local e estacional alimentando-se dos alimentos mais abundantes (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Rosalino e Loureiro 2012).

A forma varia com a dieta mas em geral são cilíndricos, grossos, escuros e quase sempre dispostos em pequenos fragmentos (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Salgado 2014).

Estes são depositados em latrinas escavadas no solo e deixadas a descoberto (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Rosalino e Loureiro 2012; Salgado 2014), não se confundindo com mais nenhum carnívoro português (Rosalino e Loureiro 2012).

VI.10 - Texugo (*Meles meles*) (© Duncan Usher / www.ardea.com)

VI.11 - Ilustração dejetos de texugo (*Meles meles*) (superior - *adaptado* de Purroy e Varela 2005; inferior - *adaptado* de Bang e Dahlstrom 2011)

Lontra - *Lutra lutra* (Linnaeus 1958)

Possui membranas interdigitais nas patas o que lhes permite serem nadadores ágeis e adaptados a caçar na água (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Pedroso e Sales-Luis 2012), característica que influência o nicho alimentar explorado.

Espécie sobretudo piscívora mas que também consome crustáceos e anfíbios quando abundantes (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Clavero et al. 2003; Pedroso e Sales-Luis 2012).

Ocasionalmente também predam répteis, aves e mamíferos, embora constituindo uma pequena fração da dieta (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Clavero et al. 2003).

Têm uma forma cilíndrica e são algo retorcidos (Clavero et al. 2003).

São pequenos, viscosos e pouco consistentes quando recentes (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Clavero et al. 2003). A sua cor pode ser muito variável dependendo do conteúdo e idade do dejeto (Clavero et al. 2003). São normalmente depositados em locais proeminentes como rochas, troncos ou vegetação, emersos ao longo das margens ou cercados por água (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Pedroso e Sales-Luis 2012).

O cheiro é intenso, com um odor almiscarado e inconfundível devido à sua dieta característica (Clavero et al. 2003; Pedroso e Sales-Luis 2012).

VI.12 - Lontra (*Lutra lutra*) a defecar sobre uma rocha, local típico de deposição de dejetos (© Solvin Zankl / naturepl.com)

VI.13 - Ilustração dejetos de lontra (*Lutra lutra*) (*adaptado* de Purroy e Varela 2005)

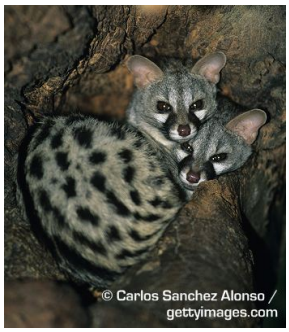
Geneta - *Genetta genetta* (Linnaeus 1758)

Esta é uma espécie de aptidões trepadoras (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Alves 2012) a qual partilha os mesmos biótopos preferenciais que a fuinha apesar de ser mais generalista (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

Com uma dieta generalista, possui um regime alimentar diversificado, mas dominado por pequenos mamíferos e aves. Consome ainda insetos, répteis e frutos (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999). Alimenta-se dos alimentos mais abundantes e de acesso mais fácil (Alves 2012).

Dejetos notavelmente compridos, tubulares com um aspeto compacto, escuro, uniforme (Blanco-Garrido e Rivas 2014) e menos retorcidos do que os de mustelídeo (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999). Por vezes possuem vários estrangulamentos que divide o dejeto em fragmentos unidos ou separados sendo uma das extremidades pontiaguda (Blanco-Garrido e Rivas 2014)

Depositam habitualmente em latrinas, às quais revelam uma elevada fidelidade, localizadas em locais proeminente (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).



VI.14 - Geneta (*Genetta genetta*) (© Carlos Sanchez Alonso / gettyimages.com)

VI.15 - Dejeto de geneta (*Genetta genetta*) (© Chris & Tilde Stuart / www.flpa-images.co.uk)

VI.16 - Ilustração dejetos de Geneta (*Genetta genetta*) (*adaptado* de Purroy e Varela 2005)

Sacarrabos - *Herpestes ichneumon* (Linnaeus 1758)

É uma espécie originalmente de África, região de origem (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Rosalino e Chambel 2012), tendo sido introduzida em Portugal e sendo que atualmente um dos carnívoros mais abundantes no país (Borralho et al. 1996; Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

É pouco especializada em termos de habitat, apesar de preferir uma elevada cobertura do solo. É o único carnívoro português maioritariamente diurno (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

O sacarrabos é um carnívoro generalista, mas a base da sua dieta são pequenos mamíferos. Consome ainda, insetos, crustáceos, peixes, anfíbios entre outras presas (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Moral et al. 2014).

Os dejetos são cilíndricos, alongados, não retorcidos, escuros e brilhantes e de tamanho grande (Moral et al. 2014) mas são menores, mais grossos, mais compactos e homogéneos que os de geneta (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

Deposita os dejetos isoladamente mas também em latrinas (Rosalino e Chambel 2012) e frequentemente ao nível do solo (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999). Usa-os para marcar território (Moral et al. 2014).

VI.17 - Sacarrabos (*Herpestes ichneumon*)

(© Suzi Eszterhas / naturepl.com)

VI.18 - Ilustração dejetos de Sacarrabos (*Herpestes icheumon*) (*adaptado* de Purroy e Varela 2005)

Gato-bravo - *Felis silvestris* (Schreber 1777)

É uma espécie com aptidões arborícolas que gosta de floresta de caducifólias com subcoberto desenvolvido e usa os habitats abertos para caçar (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Castro 2012). É uma espécie que enfrenta a regressão (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

VI.19 - Gato-bravo (*Felis silvestris)* com uma presa (© Martin H Smith / naturepl.com)

É uma espécie especializada em pequenos mamíferos e aves, consumindo por vezes répteis e insetos, mas apesar da forte tendência carnívora, ocasionalmente pode também consumir matéria vegetal com o objetivo de se purgar (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Castro 2012;

Urra et al. 2014). A variação da dieta pode, em casos pontuais, fazer variar o aspeto do dejeto e dificultar a sua identificação (Urra et al. 2014).

Os seus dejetos são formados por dois ou três fragmentos arredondados que se encaixam e com uma das extremidades muito afilada. À medida que o tempo passa o dejeto adquire uma cor esbranquiçada (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999).

Deposita-os em zonas por si cavadas no solo e que podem posteriormente ser tapadas totalmente ou parcialmente (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999) ou em locais proeminentes como caminhos ou rochedos (Castro 2012).

Os dejetos, dependendo da alimentação, podem ser confundidos com dejetos de outros mesocarnívoros, sobretudo com os da raposa (Urra et al. 2014).

VI.20 - Dejeto de gato-bravo (*Felis silvestris)* (© Adrian Davies / naturepl.com)

VI.21 - Ilustração de um dejeto de gato-bravo (*Felis silvestris*) (*adaptado* de Bang e Dahlstrom 2011)

Anexo 3 - Protocolo de extracção de DNA de dejetos utilizado no presente estudo. PSP® Spin Stool DNA Kit.

Instructions

The following notes are valid for all protocols:

Note: *The centrifugation steps were made with the* ***Centrifuge 5415 D from Eppendorf.*** *The indicated refers to this centrifuge.*

Protocol 1: Isolation of total DNA from up to 200 mg stool samples with and without enrichment of bacterial DNA

Please read protocols prior the start of the preparation and complete preparing steps!!

***Important Note*:** *Please note, that the majority of extracted DNA from stool samples is of bacterial origin !*

Heat heating blocks (e.g. thermomixer) to 70°C and 95 °C

Preheat the ***Elution Buffer D*** *to 70°C (e.g. transfer the needed volume into a tube and place it at the appropriate temperature into a thermomixer)*

1. Sample homogenization and prelysis

Weigh 200 mg of stool sample (fresh or frozen) into a 2.0 ml Safe-Lock-Tube and add 1.2 ml **Lysis Buffer P** to each stool sample .Vortex vigorously for 1 min. Even if you use less starting material , perform the protocol like described**.**

Important: *If the sample is liquid, pipet 200 µl into the 2.0 ml Safe-Lock-Tube. Cut-off the end of the pipet tip to make pipetting easier. If the sample is frozen, use a scalpel or spatula to scrape bits of stool into the provided 2.0 ml Safe-Lock-Tube on ice. Take care, that this samples do not thaw until Lysis Buffer P is added, otherwise the DNA in the sample may degrade. After addition of the buffer, the following steps can be performed at RT or like recommended.*

For an enrichment of host DNA, don! t perform this temperature step.

Incubate the sample for 10 min at RT under continuous shaking at 900 rpm. Centrifuge the sample at 11.000 x g (11.000 rpm) for 1 min to pellet solid stool particles.

For an enrichment of bacterial DNA :

Incubate the sample for 10 min at 95°C in a thermomixer under continuously shaking at 900 rpm. Add 5 **Zirconia Beads II** to the homogenate and vortex for 2 min at RT. Centrifuge the sample at 11.000 x g (11.000 rpm) for 1 min to pellet solid stool particles and beads.

Important: *The incubation step at 95°C will maximize the yield of bacterial DNA, because of a very efficient disruption of the cell wall of e.g. gram positive bacteria.*

2. Removal of PCR inhibitiors

Transfer the supernatant into an **InviAdsorb-Tube** and vortex vigorously for 15 sec. Incubate the suspension for 1 min at room temperature. Centrifuge the sample at full speed for 3 min.

3. Second sample cleanup

Transfer the supernatant completely into a new 1.5 ml Receiver Tube. Discard the pellet. Centrifuge the sample again at full speed for 3 min.

4. Proteinase K digestion

Transfer 25 µl **Proteinase K** into a new 1.5 ml Receiver Tube and pipet 400 µl of the supernatant from step 3 to the 1.5 ml Receiver Tube containing **Proteinase K**. Mix shortly by vortexing and incubate the sample for 10 min at 70°C in a thermomixer under continuous shaking at 900 rpm.

5. Binding of the DNA

Add 200 µl **Binding Buffer P** to the lysate and mix shortly by vortexing or by pipetting up and down several times. Transfer the mixture completely onto the membrane of the RTA Spin Filter. Incubate for 1 min at room temperature and centrifuge at 11.000 x g (11.000 rpm) for 2 min. Discard the filtrate and the RTA Receiver Tube.

6. Washing steps

Put the RTA Spin Filter in a new RTA Receiver Tube. Add 500 µl **Wash Buffer I** to the membrane of the RTA Spin Filter. Close the lid and centrifuge at 11.000 x g (11.000 rpm) for 1 min. Discard the filtrate and the RTA Receiver Tube.
Put the RTA Spin Filter in a new RTA Receiver Tube. Add 700 µl **Wash Buffer II** to the membrane of the RTA Spin Filter. Close the lid and centrifuge and centrifuge at 11.000 x g (11.000 rpm) for 1 min. Discard the filtrate and put the RTA Spin Filter back to the same RTA Receiver Tube.

7. Ethanol removal

To eliminate any traces of ethanol, centrifuge again for 4 min at maximum speed, discard the RTA Receiver Tube

8. DNA Elution

Place the RTA Spin Filter into a new 1.5 ml Receiver Tube and add 100 - 200 µl preheated (70°C) **Elution Buffer** to the sample**.** Incubate for 3 min at RT. Centrifuge at 11.000 x g (11.000 rpm) for 1 min. to elute the DNA. Finally discard the RTA Spin Filter.

Note: *The DNA can also be eluted with a lower volume of Elution Buffer D (depends on the expected yield of genomic DNA). But pay attention that the minimum volume for the elution is* ***50 µl and that this volume can reduce the maximum yield.*** *If a quite large amount of DNA is expected, the volume of elution can be increased.*

Note: *For long-term storage, we recommend to keep the eluted DNA at ! - 20°C.*

Anexo 4 - Dimensões dos dejetos dos mamíferos carnívoros segundo referências bibliográficas

Além da morfologia dos dejetos, apresentada para cada espécie, é também importante para este estudo, referir as dimensões descritas para cada espécie pois é um fator muitas vezes considerado para identificar os mesmos.

Na tabela VI.2, são apresentadas várias medidas de referência retiradas de diversas fontes bibliográficas (e.g., Santos-Reis e Petrucci-Fonseca 1999; Elbroch et al. 2012; Secem.es - Guia Virtual de los indícios de los mamíferos de la Península Ibérica, Islas Baleares y Canarias), pois estas consideram tamanhos distintos para os dejetos das mesmas espécies.

Tabela VI.2 - Dimensões dos dejetos das diferentes espécies de carnívoros segundo diferentes fontes bibliográficas

Espécies	Guia dos Mamíferos Terrestres de Portugal Continental, Açores e Madeira (Santos-Reis e Petrucci-Fonseca, 1999)		Field Guide to Animal Tracks and Scat of California (Elbroch et al. 2012)		Guía virtual de los indicios de los mamíferos de la Península Ibérica, Islas Baleares y Canarias - secem.es	
	Comprimento	**Largura**	**Comprimento**	**Largura**	**Comprimento**	**Largura**
Raposa	7 - 10 cm	2,5 cm	7,6 - 15,2 cm	0,8 - 1,9 cm	---	---
Doninha	3 - 6 cm	0,5 cm	---	---	---	---
Toirão	6 - 8 cm	0,9 cm	---	---	---	---
Fuinha	7 - 10 cm	1 cm	---	---	---	---
Lontra	2 - 6 cm	1,5 - 1,8 cm	---	---	1,95 - 11,2 cm (média 4,53)	0,7 - 2 cm (média 1,27)
Geneta	> 10 cm	1,2 - 1,6 cm	---	---	4,8 - 17,5 cm (média 4,53)	0,7 - 2,1 cm (média 1,31)
Sacarrabos	7 - 10 cm	1 cm	---	---	7,5 - 15 cm (média 13,9)	1,5 cm
Gato-bravo	4 - 6 cm	1 - 1,5 cm	---	---	1,6 - 27,4 cm (média 7,63)	1 - 3 cm (média 1,82)

As medidas dos dejetos de texugo, não foram apresentadas pois não são usadas como critério na sua identificação, por depositarem vários dejetos em latrina sendo frequentemente de difícil individualização.

Estes dados são relevantes na identificação dos dejetos através da sua morfologia, critérios que serão analisados e discutidos na dissertação (ver capítulo III).

Anexo 5 - Características dos dejetos identificados corretamente por todos os observadores

Tabela VI.3 – A tabela apresenta os dejetos que foram identificados corretamente por todos os observadores e as caraterísticas dos dejetos individuais

	Dejetos		Alimentação		Medidas		Comprimento		Forma	
	nº	Espécie	Típica	Menos comum	Típicas	Atípicas	Completo	Incompleto	Típica	Atípica
HRA Outono	8	Lontra	X		X		X		X	
	17	Raposa	X		X		?		X	
	65	Fuinha	X		X		X		X	
	95VI	Geneta	X		X		X		X	
CL Outono	34	Raposa	X		X		X		X	
	35	Raposa	X				X		X	
HRA Inverno	30	Fuinha	X		X		X		X	
CL Inverno	11	Raposa	X		X			X	X	
	24	Lontra	X		X		X			X
	38	Texugo	X						X	
	41	Raposa	X		X		?		X	
	44	Raposa	X		X		X		X	
	54	Raposa	X			X	X		X	
HRA Primavera	13	Texugo	X						X	
	73	Sacarrabos	X			X	X		X	
	76	Texugo	X						X	
CL Primavera	83	Raposa	X		X		X		X	
	108	Raposa	X		X		X		X	

Anexo 6 - Características dos dejetos identificados erradamente por todos os observadores

Tabela VI.4 - A tabela apresenta os dejetos que não foram identificados corretamente por todos os observadores e as caraterísticas dos dejetos individuais

	Dejetos		Alimentação		Medidas		Comprimento		Forma	
	nº	Espécie	Típica	Menos comum	Típicas	Atípicas	Completo	Incompleto	Típica	Atípica
HRA Outono	18	Raposa	X			X	X			X
	21	Raposa	X		X		X			X
	42	Raposa	X		X		X			X
	53	Raposa	X		X		X			X
	P058	Fuinha	X		X		X			X

CL Outono	10	Fuinha	X		X			X	X	
	11	Fuinha		X		X	X		X	
	12	Fuinha	X		X			X		X
	14	Geneta	X		X			X		X
	30	Raposa	X			X	X			X
	37	Fuinha		X		X	X			X
HRA Inverno	17	Geneta	X		X		X		X	
	21	Fuinha	X			X		X		X
	25	Geneta			X		X			X
	29	Fuinha	X		X		X			X
	37	Fuinha	X		X		X		X	
	41	Fuinha	X		X		X			X
	46	Geneta	X		X		X		X	
	47	Geneta	X		X		X			X
	49	Raposa	X			X	X			X
	65	Texugo	X							X
	75	Fuinha		X		X	X		X	
	89	Geneta	X		X		X		X	
CL Inverno	12	Raposa	X			X		X		X
	32	Geneta	X			X		X		X
	43	Raposa	X		X		X		X	
	47	Gato	X		X		X		X	
	63	Raposa		X		X		X		X
	64	Raposa	X			X	X			X
HRA Primavera	11	Fuinha	X		X			X		X
	20	Sacarrabos	X		X			X	X	
	21	Fuinha		X		X	X			X
	37	Sacarrabos		X	X		X		X	
	44	Fuinha	X		X		X			X
	78	Sacarrabos	X		X		?			X
CL Primavera	3	Raposa		X	X		X			X
	27	Geneta		X	X		?		X	
	29	Texugo		X						X
	49	Gato		X	X		X		X	
	61	Fuinha		X		X	X			X
	88	Raposa	X			X		X		X
	101	Raposa	X		X		X			X