

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

LETÍCIA MARIA DE AQUINO

**DNA *barcoding* de Mamíferos Atropelados da Amazônia Ocidental: Um estudo em cutia,
cutiara e paca**

SÃO CARLOS - SP

2023

Letícia Maria de Aquino

**DNA *barcoding* de Mamíferos Atropelados da Amazônia Ocidental:
Um estudo em cutia, cutiara e paca**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro M. Galetti Junior

Coorientador: Prof. Dr. Bruno H. Saranholi

São Carlos - SP

2023

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho com muito amor e gratidão ao meu pai, Vagner Venceslau de Aquino (*in memoriam*), por acreditar em mim e por se esforçar tanto para me fazer feliz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família e em especial à minha mãe Susi, meu grande exemplo de perseverança e dedicação. Junto ao meu pai e meu irmão, foram a minha principal rede de apoio, sempre cuidando e apoiando o meu desejo de concluir essa etapa da vida. Agradeço à minha avó Enedina, por todo carinho, mimos, e pelas orações por mim.

Agradeço ao meu professor e orientador, Dr. Pedro M. Galetti Junior, por me acolher em seu laboratório, me incluir em sua pesquisa e me confiar grandes responsabilidades. Em um período pós-pandêmico e tão incerto, agradeço por ter sido totalmente receptivo e por acreditar no meu potencial. Agradeço ao meu coorientador, Dr. Bruno H. Saranholi, por ter dedicado toda sua paciência e tempo, me ensinando, me orientando e ajudando a trilhar meu caminho enquanto cientista.

Ao meu amigo estatístico, um querido de longa data, Guilherme Felix Guedes, agradeço por me ouvir todos esses anos, por ser como um irmão pra mim, e me dar suporte, aconselhamento e as broncas que eu preciso.

Às minhas amigas Jéssica e Laiane, agradeço por sempre me recordarem que mereço as melhores coisas que esse mundo tem para oferecer. Também agradeço tudo que vivi com os amigos incríveis que a Biotec UFSCar me deu, os futuros biotecnologistas Ana Maffei, Mariana, Rafaela, Daniel e Suzana.

Agradeço especialmente a cada amigo e colega de trabalho que tive no LabBMC: Ana, Anderson, Camila, Carla, Jacqueline, João Pedro, Kalebe, Leonardo, Marina, Nathália e Théo. Obrigada por serem tão gentis comigo em cada conversa, em cada almoço no RU, em cada cafezinho. Obrigada pelas experiências trocadas diariamente no laboratório, pois estas foram essenciais para o meu trabalho acontecer.

Também agradeço à minha orientadora de iniciação científica, Dra. Luciana C. de Almeida Regitano, por me dar a oportunidade de explorar uma nova perspectiva acadêmica e por ser uma fonte de inspiração para mim. Agradeço à minha coorientadora da IC, Dra. Liliane Costa Conteville, pelo apoio emocional, pela amizade e por todo auxílio no desenvolvimento da minha postura profissional. Às amigas que fiz nesse grupo de pesquisa, Alex, Bárbara, Jiannine, Juliana e Wanderson; agradeço pelo incentivo, aprendizado e companheirismo.

Agradeço à Dra. Fernanda D. Abra e sua equipe, tanto por viabilizar esse trabalho como pela parceria com o LabBMC.

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos, aos professores e colegas que fizeram parte da minha graduação.

Por fim, agradeço àquela pessoa que eu era em 2018 e outras versões minhas que moldaram a atual. Quando entrei na universidade, sabia que iria enfrentar muitos desafios; seria injusto não reconhecer que nos momentos mais difíceis eu consegui me reencontrar, me reinventar e crescer. Tenho muito orgulho de ser quem eu sou e até onde cheguei.

*“(Olha só)
Eu vim do interior.
E ainda tem tanto desse mundo
Que eu não aprendi e que eu não sei*

*(Olha só)
Mas meu coração é grande e cabem
Todos os meninos e as meninas
Que eu já amei”*

Meninos e Meninas - João

RESUMO

O DNA *barcoding* é um método relativamente recente, que permite a identificação molecular de uma espécie a partir de uma sequência obtida por um marcador molecular, tendo como premissa que cada espécie possui uma sequência única, ou seja, um código de barras (*barcoding*). Para isso, é necessária a geração de sequências a partir de *vouchers* de cada espécie, isto é, sequências obtidas a partir de um indivíduo que representa a espécie. A técnica pode ser útil em casos onde a identificação morfológica pode não ser suficiente para determinar a taxonomia da espécie, como atropelamentos, onde ocorre a perda dos caracteres morfológicos. Assim, o presente estudo teve como objetivo principal utilizar o método do DNA *barcoding* na identificação de espécimes de mamíferos atropelados em uma rodovia da Amazônia, com ênfase nas espécies de cutia (*Dasyprocta leporina*), cutiara (*Myoprocta acouchy*) e paca (*Cuniculus paca*). Ao todo, 21 amostras de tecidos musculares coletadas de espécimes atropelados e inferidas como *D. leporina*, *M. acouchy* e *C. paca* foram obtidas através de campanhas promovidas pelo Projeto Reconnecta, na região da rodovia BR-174, que se situa entre a cidade de Presidente Figueiredo (AM) e a divisa do estado de Roraima, compreendendo uma parte do território indígena Waimiri Atroari. Após a extração de DNA, as amostras foram amplificadas por PCR seguindo dois protocolos, os quais diferem principalmente nas concentrações de $MgCl_2$, *primers* para dois marcadores moleculares (COI e 16SrRNA) e temperaturas de anelamento. Os produtos de PCRs foram purificados utilizando polietilenoglicol e enviados para sequenciamento Sanger. As sequências obtidas foram comparadas com sequências de referência disponíveis em bancos de dados públicos para identificação da espécie. Apesar de várias tentativas de padronização dos protocolos de amplificação para o gene COI a partir dos *primers* utilizados, a taxa de sucesso foi muito baixa, com apenas duas amostras sequenciadas com sucesso. O gene 16SrRNA se mostrou uma região informativa para ser utilizada como *barcode* para as espécies estudadas, sendo obtidas 16 sequências de alta qualidade das quais quatro identificaram *C. paca* pela ferramenta BLAST. Apesar da falta de sequências de referência do gene 16SrRNA para as espécies em questão, as análises filogenéticas mostram três clados que sugerem a separação das três espécies estudadas. Considerando que o grupo de mamíferos permanece com lacunas de conhecimento quanto ao uso de *primers* para a técnica do DNA *barcoding*, o desenvolvimento de *primers* específicos para grupos taxonômicos pode ser útil para aumentar o sucesso das identificações moleculares, especialmente no caso do gene COI. As sequências aqui geradas serão úteis para contribuir com os bancos de sequências de referência para a

identificação molecular das espécies e no trabalho de conservação feito pelo Projeto Reconecta.

Palavras-chave: COI; atropelamentos; marcadores moleculares; Rodentia; 16SrRNA

ABSTRACT

DNA barcoding is a relatively recent method that allows for the molecular identification of a species from a molecular marker, based on the premise that each species has a unique sequence, which is a barcode sequence. For this, it is necessary to generate sequences from voucher individuals of each species, that is, sequences obtained from an individual that represents the species. The technique can be useful in cases where the morphological identification may not be enough to determine the taxonomy of the species, such as roadkill, where the loss of morphological characters occurs. Thus, the main objective of this study was to verify the use of DNA barcoding methodology in the identification of road-killed mammals on one highway in the Amazon, with emphasis on the Brazilian agouti (*Dasyprocta leporina*), red acouchi (*Myoprocta acouchy*) and lowland paca (*Cuniculus paca*). A total of 21 muscle tissue samples were collected from campaigns promoted by the Reconecta Project in the region of the BR-174 highway, which is located between the city of Presidente Figueiredo-AM and the border of the Roraima state, comprising part of the indigenous territory Waimiri Atoari. After extraction, samples were amplified by PCR using two protocols, which differ mainly in MgCl₂ concentrations, primers (COI and 16SrRNA), and annealing temperature. PCR products were purified using polyethylene glycol and sent for Sanger sequencing. The obtained sequences were compared with reference sequences available in public databases. For the analyzed samples, despite several attempts to standardize amplification protocols for the COI gene based on the primers used, the success rate was very low, with only two successful amplified samples. The 16SrRNA gene proved to be an informative region to be used as a barcode for the studied species, obtaining 16 high quality sequences, four of which were identified as *C. paca* by BLAST tool. Despite the lack of 16SrRNA gene reference sequences for the studied species, phylogenetic analyses show three distinct groups that reflect the three studied species. Considering that there are knowledge gaps regarding the use of primers for the DNA barcoding technique in mammalian group, developing specific primers for taxonomic groups can be useful to increase the success in molecular species identification, especially in case of COI gene. The sequences generated here will be useful to contribute to reference sequence databases for species identification and conservation works carried out by the Reconecta Project.

Keywords: COI; roadkills; molecular markers; Rodentia; 16SrRNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Principais etapas do processo de identificação molecular a partir de DNA, utilizando a técnica do DNA <i>barcoding</i>	14
Figura 2 — Comparativo das espécies colombianas de <i>Myoprocta acouchy</i> (<i>Red acouchi</i>), e <i>Myoprocta pratti</i> (<i>Green acouchi</i>)	18
Figura 3 — Comparativo das espécies de <i>Myoprocta acouchy</i> , <i>Dasyprocta leporina</i> e <i>Cuniculus paca</i> .	19
Figura 4 — Distribuição das espécies de <i>Dasyprocta leporina</i> , <i>Myoprocta acouchy</i> e <i>Cuniculus paca</i>	20
Figura 5 — Registro da campanha de coleta	23
Figura 6 — Mapa dos pontos de coleta das amostras biológicas	24
Figura 7 — Gel de agarose demonstrando um comparativo de amplificação das amostras inferidas de <i>Myoprocta acouchy</i> .	31
Figura 8 — Gel de agarose das amostras inferidas de <i>Dasyprocta leporina</i> e a amostra 190B, inferida de <i>Cuniculus paca</i>	31
Figura 9 — Gel de agarose das amostras 229, 240, 474, 678, 944, 1323, 1060, 1369 e 1505 com gradiente de temperatura de anelamento para gene COI	32
Figura 10 — Árvore filogenética do gene 16SrRNA com sequências de cutias, cutiarias e pacas	34
Figura 11 — Árvore filogenética do gene COI com sequências de cutias, cutiarias e paca	35
Figura 12 — Árvore filogenética de estatística bayesiana para o gene 16SrRNA.	36
Figura 13 — Árvore filogenética de estatística bayesiana para o gene COI	37
Figura 14 — Pontos de atropelamento das amostras inferidas de <i>Dasyprocta leporina</i> , <i>Myoprocta acouchy</i> e <i>Cuniculus paca</i>	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Classificação taxonômica proposta para as amostras-alvo	17
Tabela 2 — Classificação prévia das amostras-alvo: <i>Dasyprocta leporina</i> , <i>Myoprocta acouchy</i> e <i>Cuniculus paca</i>	24
Tabela 3 — Comparativo da técnica do DNA <i>barcoding</i> utilizando os genes COI e 16SrRNA com as plataformas <i>GenBank</i> e <i>BOLD Systems</i> .	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16SrRNA - RNA Ribossomal 16

BOLD - Barcode of Life Database

COI - Citocromo C Oxidase subunidade I

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, ethylenediamine tetraacetic acid)

g - Força g (ou Força Centrífuga Relativa)

HCl - Ácido clorídrico

IUCN - União Internacional para Conservação da Natureza (do inglês, International Union for Conservation of Nature)

LabBMC - Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação

M - Molar

mg - Miligrama

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

min - Minutos

ml - Mililitro

mM – Milimolar

mtDNA – DNA mitocondrial

NaCl - Cloreto de Sódio

NCBI - National Center for Biotechnology Information

ng - Nanograma

pb - Pares de base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction)

PEG - Polietilenoglicol

SDS - Dodecilsulfato de sódio

TBE - Tris/Ácido Bórico/EDTA

TIWA - Terra Indígena Waimiri Atroari

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

μl - Microlitro

μM - Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 A técnica do DNA <i>barcoding</i>	13
1.2 Fragmentos <i>barcode</i> para identificação de mamíferos	15
1.3 Caracterização das espécies de cutias, cutiaras e pacas	15
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Coleta das amostras biológicas	23
3.2 Extração de DNA	25
3.3 Amplificação dos fragmentos de DNA	26
3.4 Purificação dos produtos de PCR amplificados	27
3.5 Sequenciamento e análise das sequências obtidas	27
3.6 Edição e construção de árvore filogenética utilizando dados do sequenciamento	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Sequências referências disponíveis para as espécies em estudo	30
4.2 Identificação molecular	30
4.3 Análise filogenética	33
4.4 Distribuição das espécies atropeladas ao longo da rodovia	38
4.5 Comparação entre os marcadores COI e 16SrRNA para identificação de cutias, cutiaras e pacas	39
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
APÊNDICE A – Adaptações de protocolos de PCR para o gene COI.	50
APÊNDICE B – Sequências de referência dos bancos BOLD Systems e GenBank	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 A técnica do DNA *barcoding*

O DNA *Barcoding* (da tradução literal: “Códigos de barra de DNA”) é uma ferramenta da Biologia Molecular, viabilizada a partir do advento de tecnologias de clonagem e sequenciamento, consistindo em uma metodologia que permite a identificação molecular de espécies a partir de uma sequência que seja única para cada espécie. A tecnologia em sua forma atual, com o propósito de identificação molecular a partir da diferença dos nucleotídeos, foi estruturada por Hebert et al. (2003).

Entre as regiões do genoma mais utilizadas para esse propósito em vertebrados, destacam-se fragmentos de genes mitocondriais (mtDNA). Essa região do genoma compreende fragmentos que não possuem íntrons, possuem um modo de herança haploide e com baixa taxa de recombinação (AHMED et al., 2022). Outro ponto importante é o fato de que genes mitocondriais preenchem os requisitos para serem considerados boas regiões de *barcode*, ou seja, segundo a metodologia proposta por Hebert et al. (2003), essas regiões devem ser suficientemente curtas para serem viáveis de amplificação via PCR a partir de diferentes tipos de amostras e, ao mesmo tempo, polimórficas para distinguir diferentes espécies. Além disso, devem possuir regiões conservadas para o desenho de *primer* universais. Segundo Guo et al. (2022), a rápida mudança de sequência no mtDNA quando comparada aos genes nucleares, é o que permite que se acumulem diferenças entre espécies relacionadas, mesmo que tenham divergido recentemente.

De modo geral, a técnica do DNA *barcoding* é baseada nos seguintes passos: obtenção do DNA da amostra biológica, amplificação do fragmento de DNA de interesse via reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento do produto da PCR, e alinhamento dos resultados do sequenciamento com um banco de dados de referência. A última etapa é dependente de uma biblioteca de sequências de referência para comparação, sendo esta composta por uma cobertura abrangente para permitir uma identificação com mais acurácia (Figura 1).

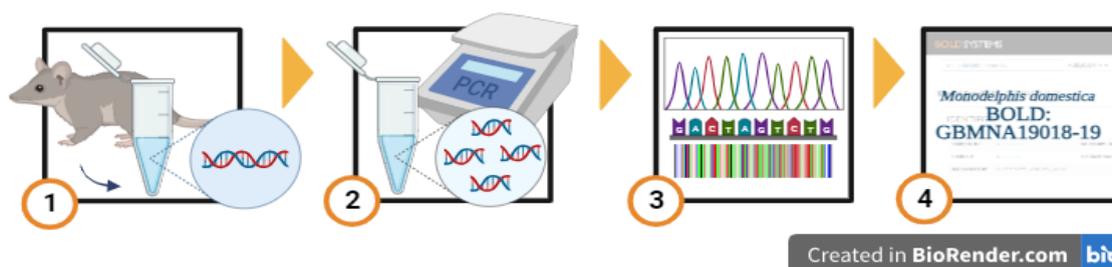


Figura 1 — Principais etapas do processo de identificação molecular a partir de DNA, utilizando a técnica do DNA *barcoding*. (1) Extração do DNA da amostra, (2) amplificação do fragmento de DNA utilizando PCR, (3) sequenciamento dos produtos de PCR e (4) comparação das sequências obtidas com o banco de dados de referência, para a busca de similaridade entre espécies. Fonte: Produzida pela autora no Bio Render (2022). Adaptado de: Website International Barcode of Life.

A plataforma de dados mais conhecida para fins de identificação molecular é o *GenBank* (BENSON et al., 2000), desenvolvida pelo NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). O *GenBank* fornece a ferramenta do BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) para o alinhamento das sequências (ALTSCHUL et al., 1990), o que torna a análise mais prática e rápida (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Além disso, a plataforma do *GenBank* é intuitiva e prática para o armazenamento de dados. Relacionado ao DNA *barcode*, talvez o ponto negativo mais evidente deste banco de dados seja a possibilidade da sequência depositada não estar atrelada a um espécime *voucher* depositado em uma coleção museológica. Isso pode dificultar o uso da plataforma em alguns casos, pois muitos são provenientes de pessoas com pouco conhecimento taxonômico (GUO et al., 2022). Por isso, outras informações sobre as espécies em questão, como os locais de origem da amostra biológica e a distribuição conhecida da espécie, devem ser levadas em conta para se atingir uma assertividade maior.

Em contraste com o *GenBank*, a plataforma pública *Barcode of Life Data System* (BOLD *Systems*), desenvolvida pelo Centro de Diversidade Genômica do Canadá (<https://www.boldsystems.org/>), é mais específica e rígida quanto ao armazenamento de dados, pois possui um sistema de registro contendo informações de rastreamento e depósito de um organismo *voucher* (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007). Assim, é possível obter informações da coleta, armazenamento, análise e a publicação desses registros de códigos de barras; com a segurança de um sistema padronizado necessário para atender como uma base de dados global (GUO et al., 2022; RATNASINGHAM & HEBERT, 2007).

Mesmo com algumas limitações, sobretudo referente à necessidade de sequências de referência confiáveis, o método do DNA *barcoding* pode ser bastante aplicável. Essa abordagem é especialmente aplicada nos casos em que a identificação morfológica de espécies pode ser pouco resolutiva, como para espécies crípticas (COATES et al., 2018), ou

para quando a fonte do material para a análise estiver degradada ou com baixa qualidade, devido a exposição a fatores climáticos como chuva e calor, ou a múltiplos atropelamentos (KLIPPEL et al., 2015; RODRÍGUEZ-CASTRO, 2017). Dito isso, neste trabalho a técnica de DNA *barcoding* foi aplicada na análise molecular de mamíferos cuja espécie não pôde ser definida através da caracterização morfológica.

1.2 Fragmentos *barcode* para identificação de mamíferos

Os mamíferos representam um exemplo de grupo pelo qual o DNA *barcoding* se mostrou eficaz para identificação precisa de espécies (RODRÍGUEZ-CASTRO, 2017; KLIPPEL et al., 2015). Segundo Luo e colaboradores (2011), quase todos os animais bilaterais contêm 13 genes mitocondriais codificadores de proteínas no processo oxidativo da maquinaria de fosforilação, sendo esses as subunidades I, II e III da Citocromo C Oxidase (COI a COIII); a subunidade do Citocromo b (CytB), as subunidades 1, 2, 3, 4, 4L, 5 da NADH desidrogenase, e 6 (NAD1 a NAD6, NAD4L) e subunidades ATPase 6 e 8 (ATP6 e ATP8). Além desses, existem dois genes que são transcritos em RNA ribossomais (16SrRNA e 12SrRNA) também explorados na técnica do DNA *barcoding* (LUO et al., 2011).

Para animais, o marcador molecular mais amplamente utilizado como código de barras está localizado nos primeiros 670 pb da região que codifica a subunidade I do gene da Citocromo c Oxidase (COI), um complexo enzimático envolvido na fosforilação oxidativa (FOLMER et al. 1994; GUO et al., 2022; RODRÍGUEZ-CASTRO et al., 2017). Além disso, uma porção do gene mitocondrial 16SrRNA (aproximadamente 550 pb) também revelou ser uma região bastante informativa para identificação molecular de vertebrados e revelou taxas mais altas de sucesso de amplificação em relação ao gene COI durante um estudo comparativo de *barcode* em anfíbios (PALUMBI, 1991; VENCES et al., 2005) e na identificação de espécimes de mamíferos atropelados (PALUMBI, 1991; RODRÍGUEZ-CASTRO et al., 2017). Ainda, com a identificação precisa das espécies, foi possível determinar os *hotspots* de atropelamentos, ou seja, os principais pontos nas rodovias onde as espécies foram mais atropeladas (RODRÍGUEZ-CASTRO et al., 2017).

1.3 Caracterização das espécies de cutias, cutiaras e pacas

As amostras deste estudo foram identificadas morfológicamente como roedores, pertencentes à ordem Rodentia (BOWDICH, 1821) e à subordem Hystricomorpha, que

embora tenha sido reconhecida a pelo menos três décadas, ainda carrega lacunas na compreensão da sua filogenia (D'ÉLIA, 2019). A maioria dos roedores têm corpos pequenos e redondos com pernas curtas; além da característica marcante dos dois pares dentários de incisivos que crescem de forma contínua e que estão diretamente relacionados à dieta desses animais (CARLETON & MUSSER, 2005; DELANEY et al., 2018). Por outro lado, em uma comparação interespecífica, os mamíferos da ordem Rodentia são taxonomicamente mega diversos em relação à morfologia, fisiologia, habitat e hábitos comportamentais (BONVICINO et al., 2008; REIS et al., 2006). No Brasil, os roedores estão representados em 257 espécies, subdivididos em nove famílias, representando 34% dos mamíferos brasileiros (ABREU-JR et al., 2020; BURGIN et al., 2020; PAGLIA et al., 2012; PERCEQUILLO et al., 2017).

Tal como outros grupos de mamíferos, há muitos desafios no trabalho de conservação desses roedores, como a constante perda e degradação de habitat, além do impacto da urbanização e da construção de rodovias e estradas (BUENO et al., 2015; FORMAN & ALEXANDER, 1998). Análises sobre o impacto dos atropelamentos devem alcançar cada vez mais grupos de espécies pouco avaliadas, como os roedores do presente estudo. Assim, a tendência é que exista cada vez menos dúvidas no entendimento dos padrões e efeitos do atropelamento na fauna, a fim de propor medidas mitigatórias efetivas (BUENO et al., 2015; MEDEIROS, 2019).

As amostras-alvo deste estudo foram pré-classificadas como pertencentes a duas famílias, Dasyproctidae e Cuniculidae, conforme a Tabela 1. A família Dasyproctidae é agrupada em dois importantes gêneros de agentes dispersores de sementes de árvores amazônicas, *Dasyprocta* sp. (cutias) e *Myoprocta* sp. (cutiaras), restritos à região dos neotrópicos (JORGE, 2008). Cutias e cutiaras são semelhantes do ponto de vista morfológico (Figura 2 e 3) e comportamental, porém diferem em tamanho na fase adulta (REIS et al., 2006; XIMENES, 1999).

Tabela 1 — Classificação taxonômica proposta para espécies de *Dasyprocta leporina*, *Myoprocta acouchy* e *Cuniculus paca*

Classificação taxonômica	Nome comum
Chordata	
Mammalia	
Rodentia	
Hystricomorpha	
Dasyproctidae	
Dasyprocta	
<i>Dasyprocta leporina</i>	Cutia ou cotia
Myoprocta	
<i>Myoprocta acouchy</i>	Cutiara, cutiaia ou cotiara
Cuniculidae	
Cuniculus	
<i>Cuniculus paca</i>	Paca

Fonte: MYERS, et al., 2023. The Animal Diversity Web (online). Disponível em: <https://animaldiversity.org>.

No Brasil, existem nove espécies do gênero *Dasyprocta*, sendo *D. leporina* a mais frequente das espécies de cutia, também chamada cotia ou Brazilian *agouti* (BONVICINO et al., 2008, MYERS et al., 2023), está distribuída do leste do Brasil à Amazônia oriental, estendendo-se a parte da Amazônia ocidental (EMMONS & REID, 2016). As cutias têm tamanho grande em relação aos roedores (REIS et al., 2006), possuem a pelagem dorsal composta por colorações amarelo-alaranjada (BONVICINO et al., 2008; REIS et al., 2006).

De acordo com Voss et al. (2001), as duas espécies do gênero *Myoprocta* (*M. pratti* e *M. acouchy*), popularmente chamadas de cutiara, cotiara ou cutiaia, e diferem-se principalmente pelo padrão de coloração dorsal e ventral, conforme o registro da Figura 2 (RAMÍREZ-CHAVES et al., 2014). Enquanto *M. acouchy* (também chamada de *Red acouchi*) tem pelagem castanha-avermelhada com pelos brilhantes, compridos e escuros; a espécie *M. pratti* (também chamada de *Green acouchi*) possui pelagem dorsal marrom-amarelada ou marrom-acinzentada, com pelos menos saturados ao longo da linha média do dorso, partes inferiores amareladas e uma pequena faixa branca na região ventral (RAMÍREZ-CHAVES et al., 2014; TETA, 2019; VOSS et al., 2001). Além disso, cutiaras da espécie *M. acouchy* são maiores do que *M. pratti* (BONVICINO, 2008; VOSS et al., 2001). As variações morfológicas observadas, no entanto, não conseguem responder a todas as questões no que diz respeito a ocorrência dessas espécies, pois são poucos estudos que abordam as diferenças taxonômicas entre cutiaras. Como um exemplo dessas diferenças está a morfologia do crânio, que ainda necessita de análises que determinem se as variações do tamanho e da forma do crânio estão relacionadas com a origem geográfica, o dimorfismo sexual ou à variação etária.

Assim, as análises sistemáticas que envolvem a identificação molecular podem contribuir para melhor compreensão do táxon (RAMÍREZ-CHAVES et al., 2014; TETA, 2019). Em comparação com as cutias, as cutiaras são menores, se assemelhando a cutias pequenas (REIS et al, 2006).



FIGURE 2: Ventral and dorsal view of the skins of *Myoprocta* from Colombia, showing the differential color patterns. a: greenish acouchi (ICN 211); b: greenish acouchi (ICN 212); c: reddish acouchi (IAvH 2542); d: reddish acouchi (IAvH 1856).

Figura 2 — Comparativo das espécies colombianas de *Myoprocta acouchy* (Red acouchi), e *Myoprocta pratti* (Green acouchi). As imagens ventrais (direita) e dorsais (esquerda) indicam a diferença entre a coloração de *M. acouchy* (a e b) e *M. pratti* (c e d). Fonte: RAMÍREZ-CHAVES et al., 2014.

Já o gênero *Cuniculus* (HOLLISTER, 1913) da família Cuniculidae consiste apenas em duas espécies de paca: *C. paca* (CHAHUD, 2022) e *C. taczanowskii* (GUIZA QUIROGA et al., 2019). A espécie mais comum é *C. paca* (CHAHUD, 2022), sendo a única espécie relatada no Brasil (BONVICINO et al., 2008; REIS et al., 2006). As pacas são descritas como roedores de tamanho grande, com a pelagem do dorso variando de coloração entre o marrom-avermelhado, marrom-chocolate, castanho escuro, até cinza-escuro (BONVICINO et al., 2008; REIS et al., 2006). Morfologicamente as pacas se diferenciam da família Dasyproctidae a partir de pequenas manchas horizontais e arredondadas na cor creme, que se

estendem na pelagem do dorso, desde o pescoço até a base da cauda (BONVICINO et al., 2008), conforme observado na Figura 3.

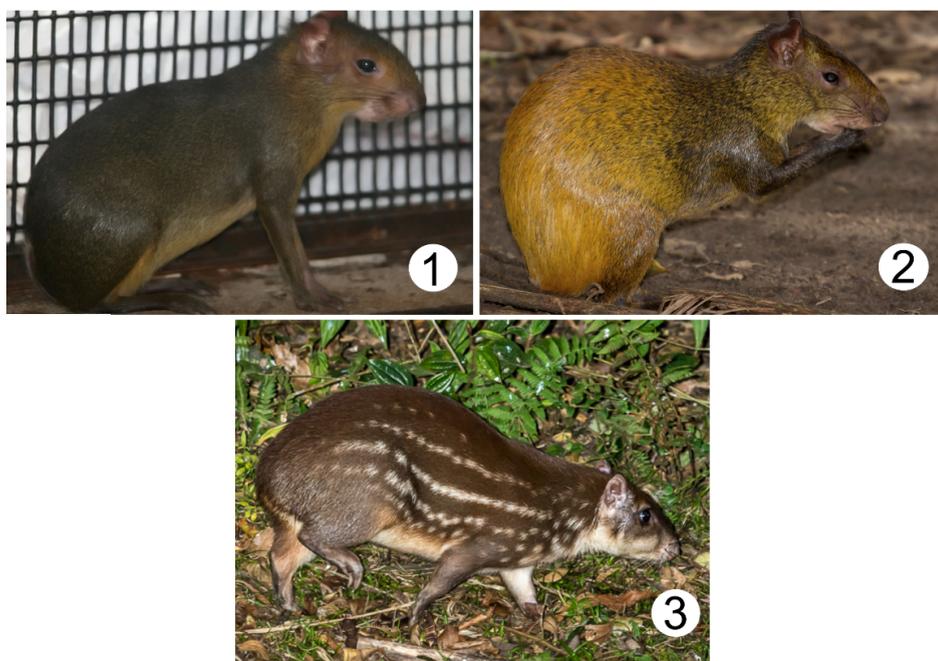


Figura 3 — Comparativo das espécies de *Myoprocta acouchy*, *Dasyprocta leporina* e *Cuniculus paca*. (1) Cutiara (*M. acouchy*), por David J. Stang (2006). (2) Cutia (*D. leporina*), por Wagner M. C. Lemos (2013). (3) Paca (*C. paca*) na borda da Mata Atlântica do Parque Estadual Intervales, por Marcos Antonio V. de Freitas (2016). Fonte: Wiki Commons e Flickr.

A distribuição geográfica das espécies-alvo está entre países da América do Sul e parte da América Central, conforme o mapa (Figura 4). Para as espécies em estudo, a área de amostragem está dentro das áreas de distribuição previstas para as três espécies (Figura 4).

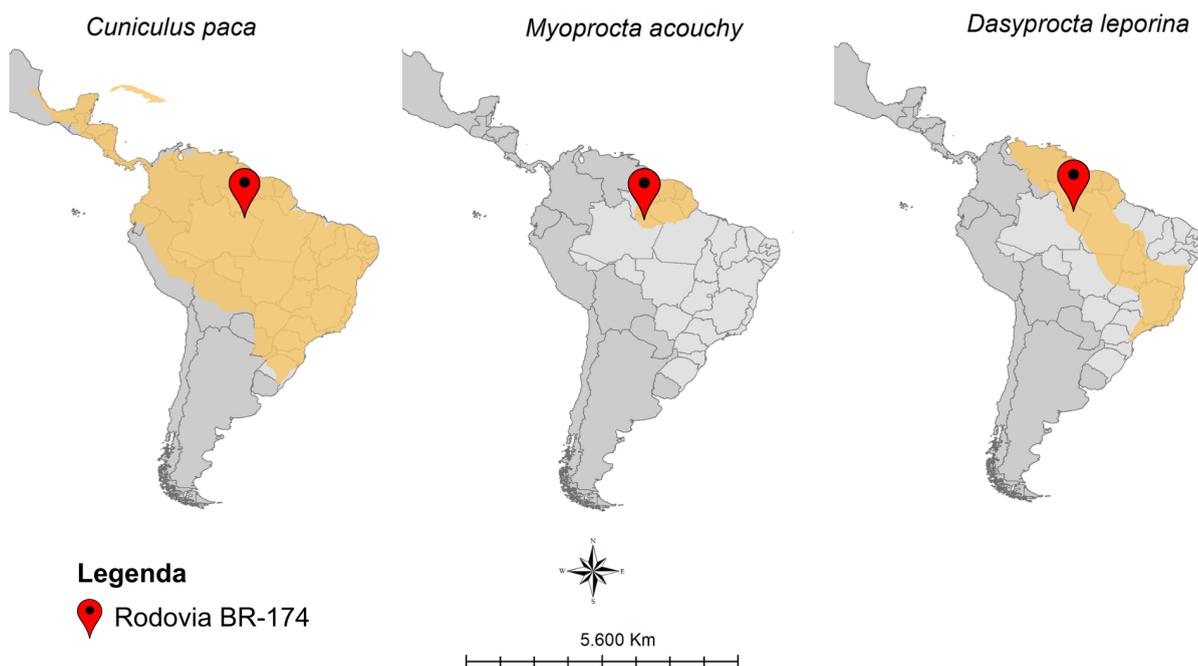


Figura 4 — Distribuição das espécies de *Dasyprocta leporina*, *Myoprocta acouchy* e *Cuniculus paca*. Área de ocorrência destacada pela cor amarela. A Rodovia BR-134 está destacada em todos os mapas. Fonte: Mapa produzido pela autora, a partir das áreas de distribuição disponíveis na IUCN (CATZEFLIS & WESKLER, 2016; EMMONS et al., 2016; EMMONS & REID, 2016).

O gênero *Dasyprocta* está distribuído em países como Brasil, Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Venezuela e Bolívia (BONVICINO et al., 2008). No Brasil, as espécies estão distribuídas em várias regiões. A distribuição de *D. leporina* se concentra na bacia amazônica, ao leste do Rio Negro, no norte do rio Amazonas, até o estado do Amapá (BONVICINO et al., 2008; XIMENES, 1999). A espécie *D. fuliginosa* está presente nos estados do Acre, Amazonas, Rondônia e uma porção do Mato Grosso (XIMENES, 1999). Algumas espécies de *Dasyprocta* são distribuídas na região nordeste do Brasil, como *D. nigriclunis*, *D. croconota* e *D. primnolopha*, sendo esta última também distribuída ao norte do estado de Minas Gerais (XIMENES, 1999). No estado de Santa Catarina, há a ocorrência de apenas uma espécie, *D. catrinae* (XIMENES, 1999). A espécie *D. azarae* está distribuída em vários estados, incluindo Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, e porções territoriais do sul do Tocantins, oeste da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (XIMENES, 1999).

O gênero *Myoprocta* está distribuído pela região norte do Brasil, Guiana Francesa, Guiana e Suriname. De acordo com Voss e colaboradores (2001), as duas espécies descritas de *Myoprocta* estão presentes no Brasil de forma não sobreposta, e a grande maioria dos estudos indicam que essas espécies apresentam distribuição simpátrica na Colômbia (RAMÍREZ-CHAVES et al., 2014; TETA, 2019), sendo *M. acouchy* distribuída no Baixo Rio

Amazonas, a leste do Rio Negro, nos estados do Amazonas e Pará, e no estado de Roraima (VOSS et al., 2001); e *M. pratti* distribuída na bacia amazônica, a oeste do Rio Negro, no norte do Rio Amazonas, a oeste do Rio Madeira no sul (XIMENES, 1999).

A distribuição geográfica de *C. paca* é composta por todos os estados do território brasileiro, assim como países próximos como Guiana Francesa, Paraguai e nordeste da Argentina (BONVICINO et al., 2008; REIS et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificação molecular de espécimes de cutia (*D. leporina*), cutiara (*M. acouchy*) e paca (*C. paca*) atropelados da região ocidental da Amazônia pelo método de DNA *barcoding*.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os espécimes suspeitos de cutia, cutiara e paca, comparando as sequências obtidas com sequências de referência depositadas nos bancos de dados BOLD *Systems* e *GenBank*.
- Levantamento dos pontos de ocorrência de atropelamentos das espécies de cutia (*D. leporina*), cutiara (*M. acouchy*) e paca (*C. paca*) em uma rodovia da Amazônia ocidental.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras biológicas

As amostras biológicas para identificação molecular das espécies fazem parte de um conjunto de tecidos de animais atropelados, obtidos a partir de campanhas de coleta realizadas pelos pesquisadores do Projeto Reconnecta (<https://projettoreconnecta.com/pt-br/>) na rodovia BR-174 (Figura 5). O projeto atua no monitoramento de rodovias, prezando principalmente pela segurança humana e conservação da fauna na Amazônia, incidindo estrategicamente na mitigação dos atropelamentos, através da criação de passagens de fauna (RODRIGUES, 2022).



Figura 5 — Registro da campanha de coleta. Espécies inferidas de *Dasyprocta leporina* (esquerda) e *Myoprocta acouchy* (direita). À esquerda, a pesquisadora Fernanda Abra realizando o trabalho de campo com a coleta de amostras biológicas dos animais atropelados. Fonte: Dados do Projeto Reconnecta.

As campanhas de coleta são datadas a partir de outubro de 2021 e se estenderam até novembro de 2022, em um trecho de aproximadamente 364 km de extensão da rodovia BR-174 (AM), conforme o mapa a seguir (Figura 6). A estrada se situa na região da Amazônia Ocidental e liga a cidade de Presidente Figueiredo/AM à divisa com o estado de Roraima, compreendendo uma parte da Terra Indígena Waimiri Atroari (TIWA), constituída por uma das áreas florestais mais bem conservadas atravessadas pela rodovia, embora ainda represente uma das maiores fontes de impacto ambiental, devido a constante mortalidade de vertebrados (COSTA, 2018, SECCO et al., 2018; MEDEIROS, 2019).

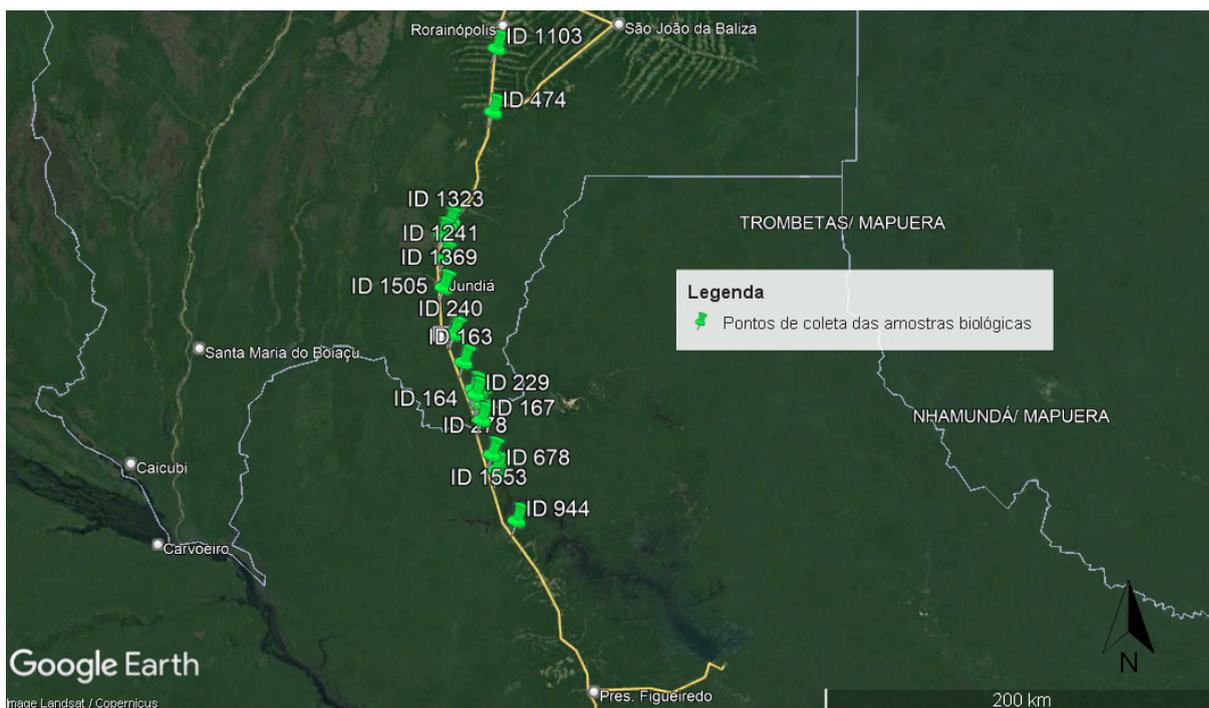


Figura 6 — Mapa dos pontos de coleta das amostras biológicas. Produzido pela autora no Google Earth (2023). Fonte: Dados do Projeto Reconecta.

Para as análises moleculares, um pedaço de tecido muscular de cada animal foi retirado e armazenado em etanol 70% até o envio para o laboratório. Informações das coletas como data e hora, local exato, dados climáticos, estado físico do espécime, bem como fotografias e atribuição taxonômica estimada pelas características morfológicas visíveis foram registradas (Tabela 2).

Tabela 2 — Classificação prévia das amostras-alvo: *Dasyprocta leporina*, *Myoprocta acouchy* e *Cuniculus paca*. Ao todo, foram contabilizadas 13 amostras inferidas como cutias (*D. leporina*), 5 como pacas (*C. paca*) e 3 como cutiaras (*M. acouchy*). Fonte: Dados do Projeto Reconecta.

ID amostral	Nome comum (inferida)	Nome científico (inferida)
163	Cutia	<i>D. leporina</i>
164	Cutiara	<i>M. acouchy</i>
167	Cutia	<i>D. leporina</i>
175	Paca	<i>C. paca</i>
190	Paca	<i>C. paca</i>
229	Cutia	<i>D. leporina</i>
240	Cutia	<i>D. leporina</i>
278	Cutiara	<i>M. acouchy</i>
474	Cutia	<i>D. leporina</i>
678	Cutia	<i>D. leporina</i>

ID amostral	Nome comum (inferida)	Nome científico (inferida)
944	Cutia	<i>D. leporina</i>
1060	Cutia	<i>D. leporina</i>
1103	Paca	<i>C. paca</i>
1241	Paca	<i>C. paca</i>
1323	Cutia	<i>D. leporina</i>
1369	Cutia	<i>D. leporina</i>
1505	Cutia	<i>D. leporina</i>
1553	Cutia	<i>D. leporina</i>
1554	Cutiara	<i>M. acouchy</i>
1590	Cutia	<i>D. leporina</i>
1594	Paca	<i>C. paca</i>

3.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA, foi utilizado o protocolo de extração de DNA genômico pela método do tampão salino proposta por Aljanabi & Martinez (1997), sendo essa uma técnica de baixo custo, rápida e de fácil acesso, pois exige pouca quantidade de amostra tecidual (cerca de 50 mg) e não exige um suporte tecnológico alto.

Em microtubos de 2 ml foram adicionadas alíquotas dos tecidos, de 50 a 100 mg e homogeneizadas em 400 µl de tampão salino (NaCl 0,4 M; Tris HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA pH 8,0 a 2 mM). O tecido foi macerado com auxílio de tesouras e, em seguida, foram adicionados 40 µl de SDS 20% e 15,0 µl de Proteinase K a 20 mg/ml. As amostras foram incubadas e mantidas em banho seco *overnight*, a 55°C.

Após a digestão do tecido, foram adicionados 300 µl de NaCl (6 M) e as amostras foram agitadas em vortex por 30 segundos em velocidade máxima. Para a remoção dos resíduos, as alíquotas foram centrifugadas por 30 min a uma velocidade de 12.300 g. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 ml, onde foi adicionado um volume de 700 µl de isopropanol. As amostras foram incubadas a -20°C por 1 hora. Novamente, as alíquotas foram centrifugadas a 12.300 g rpm, durante 20 min. Foram realizadas duas lavagens de *pellet*, sendo a primeira com 300 µl etanol (70%) e a segunda com 300 µl de etanol (100%). As lavagens foram seguidas por centrifugações de 5 min a 12.300 g. As alíquotas de DNA

foram mantidas em estufa para secagem, ressuspensas em 100 µl de água e mantidas em *freezer* a -20 °C.

Cada extração foi submetida a uma quantificação de DNA em biofotômetro (*BioPhotometer, Eppendorf®*). Para isso, uma alíquota na proporção 2:98 µl (DNA:água ultrapura) foi preparada para cada amostra a ser quantificada. Amostras com concentração > 50 ng/µl foram diluídas em uma concentração final de 50ng/µl para padronização e uso nas PCRs.

Além da metodologia do tampão salino, foi preciso fazer a re-extração de algumas amostras que apresentaram dificuldade de amplificação das sequências de interesse, como as amostras de ID 175, 190 e 1554. Para estas, foi utilizado o protocolo do adaptado do Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (SAMBROOK et al., 2006).

3.3 Amplificação dos fragmentos de DNA

As reações de amplificação por PCR foram realizadas em termociclador (*Proflex PCR systems, Applied Biosystems®*). Para a amplificação do fragmento do gene COI do material genético extraído, foi utilizado o par de *primers* universais LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'), com aproximadamente 670 pb, descritos por Folmer e colaboradores (1994).

Inicialmente, se utilizou o protocolo de PCR proposto por Folmer et al. (1994), no entanto, várias adaptações de concentrações de MgCl₂ foram necessárias para buscar um aumento do sucesso nas amplificações¹. Os ciclos de PCR para o gene COI foram padronizados utilizando um ciclo de 10 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos em temperaturas variando de 50 a 58°C para anelamento¹ e um minuto a 72°C, e por fim, um ciclo final de 10 min a 72°C.

Paralelamente também foi amplificado um fragmento para o gene 16SrRNA utilizando o par de *primers* proposto por Palumbi (1991), 16SarL (5'-CGCCTGTTTACCAAAAACAT-3') e 16SbrH (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'), com aproximadamente 550 pb. Para amplificação, foi utilizado o seguinte protocolo: volume final de 12,5 µl, contendo 0,4 µM de cada *primer*, 4,0 mM de MgCl₂, 0,8 mM de dNTPs, 0,5 unidade de Taq DNA Polimerase (*Platinum*), 1X de buffer (200 mM Tris HCl pH 8,4 e 500 mM KCl) e 3 µl de DNA. Os ciclos

¹ Verificar apêndice A para consulta de protocolo de PCR e valores de temperatura de anelamento do gene COI

de PCR para o gene 16SrRNA foram padronizados utilizando um ciclo de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 63°C e 45 segundos a 72°C, e por fim, um ciclo final de 10 min a 72°C.

Para todas as reações foram utilizados controles negativos (Ø) para verificação de possíveis contaminações.

Os produtos de PCR foram checados em gel de agarose com uma concentração variando de 1,5% a 2%, corados com *GelRed*© (*Uniscience*) e visualizados em transiluminador de luz UV para a confirmação da amplificação. Para checagem do tamanho da sequência amplificada foi utilizado um marcador de peso molecular conhecido (*Ladder*) da *Invitrogen*TM (*1 Kb Plus DNA Ladder*).

3.4 Purificação dos produtos de PCR amplificados

As amplificações bem-sucedidas foram purificadas utilizando o método de precipitação por polietilenoglicol (PEG) proposto por Lis (1980). Os produtos das PCRs foram purificados com um volume padrão de 10 µl de solução de PEG para aproximadamente 10 µl de volume de produto de PCR amostra. Em seguida, foram incubadas em banho seco a 37°C por 20 min e centrifugadas a uma velocidade de 11500 g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e então 125 µl de etanol gelado (80%) foi adicionado. Em seguida, foram feitas duas centrifugações a 11500 g, com remoção dos sobrenadantes ao final: a primeira por 4 min e a segunda por 10 min. As amostras foram secadas em estufa a 37°C por cerca de 1 hora. Posteriormente, as amostras foram eluídas em 7 µl de água e as purificações foram checadas em gel de agarose a 1,5% corados com *GelRed*© (*Uniscience*) e visualizados em transiluminador de luz UV.

3.5 Sequenciamento e análise das sequências obtidas

Para o sequenciamento em plataforma Sanger, nos produtos de PCRs purificados foram adicionados 5 µl do *primer forward* a cinco mM dos respectivos fragmentos de genes amplificados. O material foi enviado para sequenciamento em sequenciador automático 3730xl *DNA Analyzer* (*Applied Biosystems*).

A qualidade das sequências obtidas foi analisada no software Geneious v.7 (KEARSE et al., 2012). As regiões de baixa qualidade, geralmente situadas no início e fim das sequências, foram aparadas (*trimmed*) manualmente. Somente sequências aparadas com um

padrão de alta qualidade (picos dos eletroferogramas com qualidade > 97%) foram consideradas para a identificação molecular bem-sucedida das espécies. As sequências obtidas foram comparadas com sequências de referência disponíveis² nos bancos de dados do *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e do *BOLD Systems* (nesse caso, somente para as sequências do gene COI). Para a identificação a nível de espécie, foi considerado um valor mínimo de taxa de identidade de 98%, valor comumente utilizado para análise de DNA *barcoding* (NIELSEN, 2006; RODRÍGUEZ-CASTRO et al., 2017).

3.6 Edição e construção de árvore filogenética utilizando dados do sequenciamento

Foram feitas análises filogenéticas para verificação da distância e ancestralidade das espécies. A primeira foi elaborada com as sequências de COI obtidas das bases de dados do NCBI e *BOLD Systems*, em conjunto com as duas sequências de COI obtidas no presente trabalho. A segunda árvore foi elaborada com o conjunto de dados de 16SrRNA do banco de dados do NCBI em conjunto com as sequências de 16SrRNA obtidas.

As sequências foram baixadas em formato FASTA e alinhadas no software MEGA v. 11 (HALL, 2013; KUMAR, 2018). Para isso, foi utilizado o método ClustalW de alinhamento progressivo. Nesse tipo de alinhamento, os nucleotídeos são alinhados por identidade, de forma que sequências mais semelhantes (por matriz de distância par a par) são alinhadas progressivamente, até que ocorra o agrupamento de sequências mais distantes para um alinhamento global (THOMPSON et al., 1994). Os parâmetros utilizados para essa análise foram os já definidos como *default* pelo software. Para a análise par-a-par, foram utilizados os valores 15,00 e 6,66, representando respectivamente o valor de *Gap Opening Penalty* e o valor de *Gap Extension Penalty*.

Após alinhamento, as porções iniciais e finais das sequências foram removidas, a fim de manter sequências do mesmo tamanho. Em seguida, foram feitas árvores filogenéticas para calcular as distâncias genéticas entre as espécies a partir das sequências DNA obtidas em comparação com as sequências de referência através do programa MEGA v.5.03 (TAMURA et al., 2011), utilizando o Modelo de dois Parâmetros de Kimura (1980) e a análise de *Neighbor-Joining* (SAITOU & NEI, 1987). A significância estatística foi avaliada pelo método de bootstrap com 1000 replicações. Consideramos o agrupamento das nossas sequências com as sequências de referência como sendo a espécie de origem da amostra coletada, quando foi possível obter sequências de referências nos bancos de dados (ver

² Verificar tabela de sequências de referência no Apêndice B

detalhes nos resultados). A edição gráfica das árvores filogenéticas foi realizada no software FigTree v.1.4.3 (RAMBAUT et al., 2018).

Uma topologia ultramétrica foi construída no BEAST v.2.2.1 (BOUCKAERT et al., 2014) usando o método de inferência bayesiana, que consiste na combinação da informação *a priori* e a função de máxima verossimilhança. O modelo de substituição de nucleotídeos baseado no critério de informação bayesiano (BIC) foi determinado pelo JModeltest v.2.1.10, sendo (HKY) para o gene 16SrRNA e (HKY+I) para o gene COI (DARRIBA et al., 2012). Foram empregadas como especificações, relógio molecular estrito, que é o mais adequado para dados intraespecíficos (DRUMMOND & BOUCKAERT, 2015); e modelo *Birth Death* para o *prior* da árvore. Foram realizadas três execuções independentes das cadeias de Markov com 20 milhões de iterações cada, sendo que as árvores e os parâmetros foram salvos a cada 20.000 gerações. A combinação dos arquivos logaritmos e de árvores foi realizada com o LogCombiner v.1.8 (RAMBAUT & DRUMMONT, 2013). A convergência das cadeias e os valores de tamanho de amostra efetivo (ESS) estimados foram verificados no Tracer v.1.7 (RAMBAUT et al., 2018), considerando ESS de 200 ou mais para todos os parâmetros. A árvore foi resumida com o TreeAnnotator v.1.8 (DRUMMOND et al., 2012) e, posteriormente, visualizada e editada no FigTree v.1.4.3 (RAMBAUT, 2017).

4 RESULTADOS

4.1 Sequências referências disponíveis para as espécies em estudo

Na plataforma *BOLD Systems*, estão depositadas nove sequências da ordem *Dasyproctidae* para o gene *COI*, sendo sete para *D. leporina*, uma sequência de *M. pratti* e uma sequência de *Myoprocta* sp. Além disso, há 26 sequências de referência depositadas para *C. paca*. Portanto, há uma carência de informação em relação à espécie *M. acouchy* nesse banco de dados.

No *GenBank*, há dois genomas mitocondriais completos para *C. paca*, uma sequência 16SrRNA para *M. pratti* e nenhuma sequência de 16SrRNA para a espécie *D. leporina*. Entretanto, para o *COI*, o banco *GenBank-NCBI* apresenta sequências para todos os gêneros, sendo sete sequências de *D. leporina*, uma sequência de *Myoprocta* sp., uma sequência de *M. pratti* e 27 sequências de *C. paca*, dentre elas duas disponíveis a partir de dois genomas mitocondriais completos depositados.

4.2 Identificação molecular

A extração do DNA das amostras pelo método do tampão salino se mostrou bem-sucedida para quase todas as amostras, com uma concentração de DNA variando de 50 a 2800 ng/μl por amostra. No entanto, apesar de apresentarem uma medida de concentração de moléculas de DNA adequadas pelo biofotômetro, posteriormente se pôde notar a ausência das bandas após as PCRs correspondentes às amostras inferidas de *C. paca* (ID 175 e 190) e *M. acouchy* (ID 1554). Essas amostras foram re-extraídas com o uso do protocolo do Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico, seguindo a metodologia adaptada de Sambrook et al. (2006) que se mostrou bastante eficaz, sendo possível visualizar a formação do *pellet* para algumas amostras, e posteriormente se pôde notar a presença dessas bandas, utilizando o gene 16SrRNA (Figura 7).

Mediante às várias adaptações de protocolos, das 21 amostras, 10 amostras exibiram banda no gel de agarose para o gene *COI* e 16 para o gene 16SrRNA. Notou-se uma diferença no sucesso de amplificação entre os dois genes utilizados. Por exemplo, as amostras inferidas de *M. acouchy* apresentaram uma amplificação bem-sucedida do gene 16SrRNA em contraste com o gene *COI* (Figura 7).

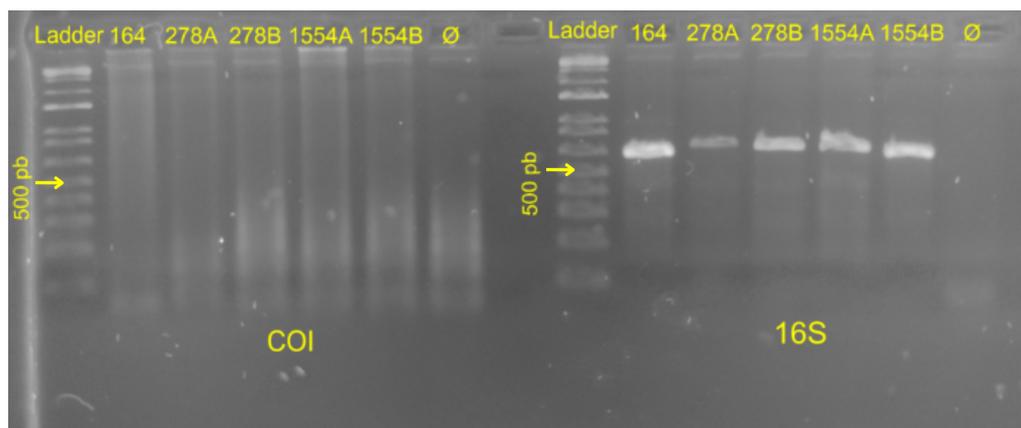


Figura 7 — Gel de agarose demonstrando um comparativo de amplificação das amostras inferidas de *Myoprocta acouchy*. Fonte: Elaborado pela autora.

Para o gene 16SrRNA, apenas uma tentativa foi suficiente para obter todos os fragmentos amplificados das amostras inferidas de *D. leporina* (Figura 8).

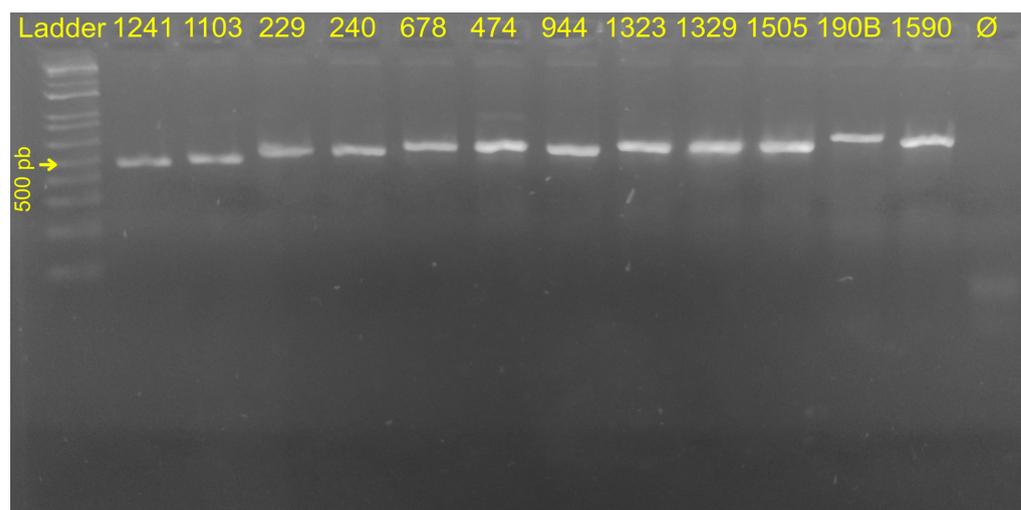


Figura 8 — Gel de agarose das amostras inferidas de *Dasyprocta leporina* e a amostra 190B, inferida de *Cuniculus paca*. Fonte: Elaborado pela autora.

Devido à dificuldade na amplificação dos fragmentos do gene COI para algumas amostras, foram utilizadas diferentes abordagens de adaptação da metodologia (Apêndice A). As primeiras adaptações consistiram na regulagem da concentração de $MgCl_2$. Em seguida, também foram testados diferentes gradientes de temperaturas de anelamento. Apesar de todas essas tentativas, o sucesso de amplificação se manteve baixo (Figura 9).

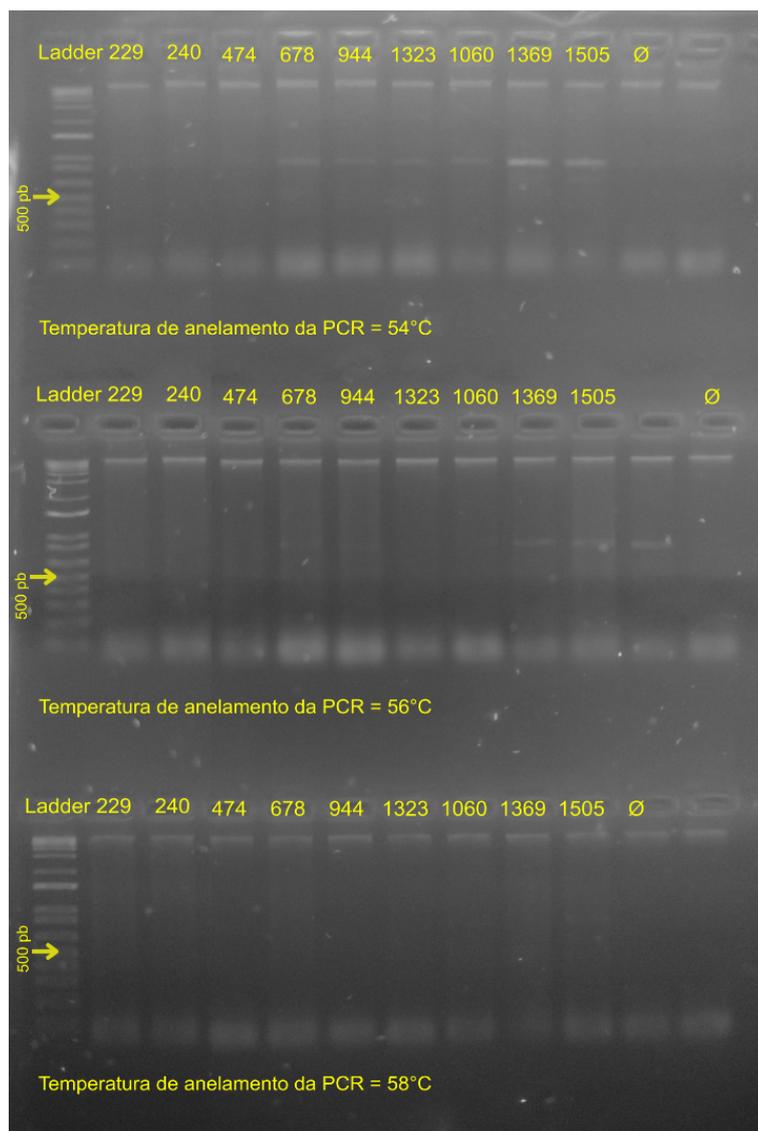


Figura 9 — Gel de agarose das amostras 229, 240, 474, 678, 944, 1323, 1060, 1369 e 1505 com gradiente de temperatura de anelamento para gene COI. O protocolo foi padronizado a uma concentração de 4mM de MgCl₂ e temperaturas distintas (T=54°C, T=56°C e T=58°C). A temperatura de 54°C se mostrou mais eficiente para o anelamento do *primer* para as amostras 678, 944, 1323, 1060, 1369 e 1505. Fonte: Elaborado pela autora.

Após o sequenciamento, foram obtidas duas sequências para o gene COI, com tamanhos de 307 e 411 pb. Para o gene 16SrRNA, a média do comprimento dos 16 fragmentos tratados e viáveis para o BLAST foi de aproximadamente 516 pares de base, que se aproximam do tamanho de amplificação esperado de 550 pb (PALUMBI, 1991).

Devido a ausência de sequências de referência do gene 16SrRNA para as espécies de *D. leporina* e *M. acouchy*, as amostras inferidas de ambas as espécies foram identificadas pela ferramenta BLAST como sendo *M. pratti*, que representa a sequência mais próxima, embora com porcentagem de identidade que variou de 92,27% a 93,13%% (Tabela 3). Além disso, *M. pratti* não possui distribuição conhecida na localidade da região amazônica na qual as amostras foram coletadas, segundo os dados atualizados da IUCN (CATZEFLIS et. al, 2016).

Quatro amostras inferidas de *C. paca* foram identificadas pelo BLAST com sucesso, tanto para o gene 16SrRNA tanto para o gene COI, fornecendo uma taxa de identidade de 100% para as quatro sequências utilizando o gene 16SrRNA e de 99,5% a 100% para duas sequências utilizando o gene COI. A única sequência inferida como *C. paca* que não apresentou 100% identidade para o gene 16SrRNA referência para esta mesma espécie foi a amostra de ID 175, que apresentou 91,58% de identidade com *M. pratti* (Tabela 3).

Assim, devido à carência de sequências referência de *D. leporina* para o gene 16SrRNA na plataforma do NCBI, e a ausência de sequências de *M. acouchy* para ambos os genes nas duas plataformas. Portanto, a construção da árvore filogenética ajudou na confirmação molecular das espécies.

4.3 Análise filogenética

A árvore filogenética gerada a partir das sequências de 16SrRNA obtidas neste estudo e as de referência obtidas no *GenBank* agrupou as amostras em três clados principais (Figura 10). Observando o cladograma, é possível verificar três clados principais com alto suporte (Figura 10). Pode ser notada uma grande semelhança com o agrupamento de amostras da classificação prévia proposta pelos pesquisadores de campo, com exceção da amostra destacada na Figura 10 (ID 474), que fora classificada a princípio como sendo *M. acouchy* e se agrupou com *D. leporina*, e da amostra de ID 175, que fora classificada como *C. paca* e está inserida no clado de *D. leporina*. Entretanto, é importante destacar que a amostra de ID 474, em específico, foi coletada de uma carcaça em estado de decomposição, sendo assim possível de ter sido classificada erroneamente a partir da morfologia.

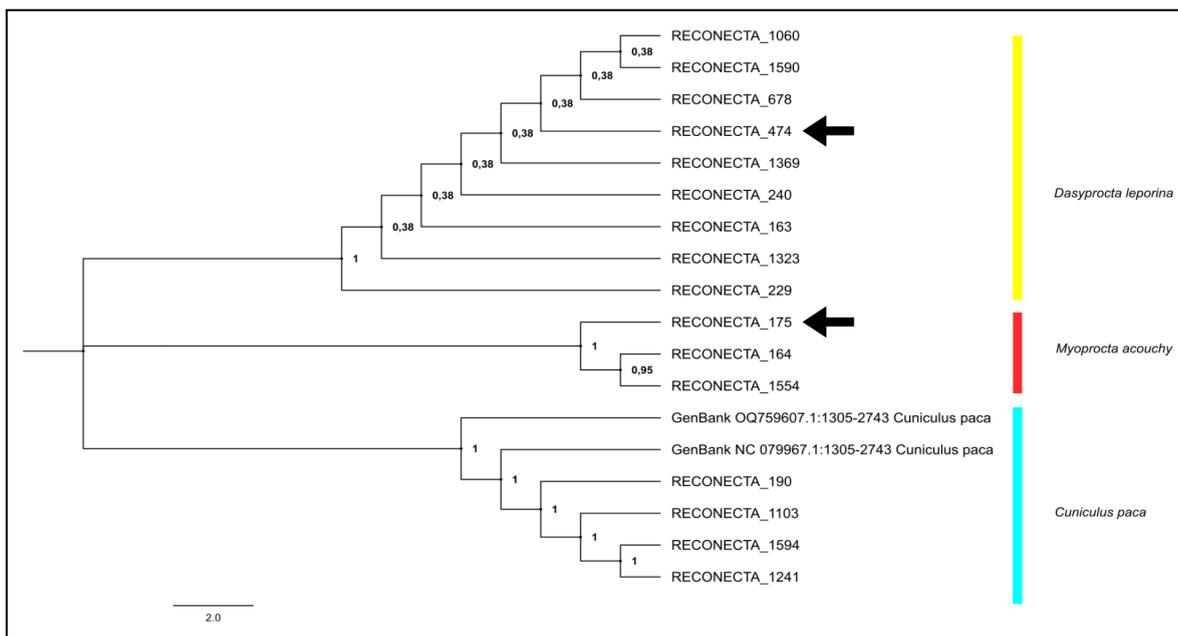


Figura 10 — **Árvore filogenética do gene 16SrRNA com seqüências de cutias, cutiarias e pacas.** No cladograma, destaca-se o agrupamento evidente de três clados a partir das 16 amostras do gene 16SrRNA e as duas seqüências de paca obtidas do *GenBank* (cores do eixo vertical: amarelo para *D. leporina*; vermelho para *M. acouchy* e azul-claro para *C. paca*). A análise mostrou congruência com as identificações de espécie feitas em campo feitas pelo Projeto Reconnecta, com exceção das seqüências das amostras de ID 175 e 474 (destacadas pelas setas de cor preta). Os valores de bootstrap estão expressos como decimais de 1.000 replicações. Fonte: Produzido pela autora no FigTree v. 1.4.3 (2023).

A segunda árvore filogenética (Figura 11) foi gerada a partir do alinhamento das duas seqüências de COI obtidas em conjunto com as 35 seqüências de referência de COI depositadas no *GenBank* e 34 seqüências de COI do BOLD *Systems*. As duas seqüências obtidas agruparam dentro do clado de *C. paca*, como esperado baseado na identificação morfológica dos espécimes em campo. A partir do cladograma, é evidente a formação de três clados, corroborando a existência de diferenciação nas seqüências de COI entre as três espécies.

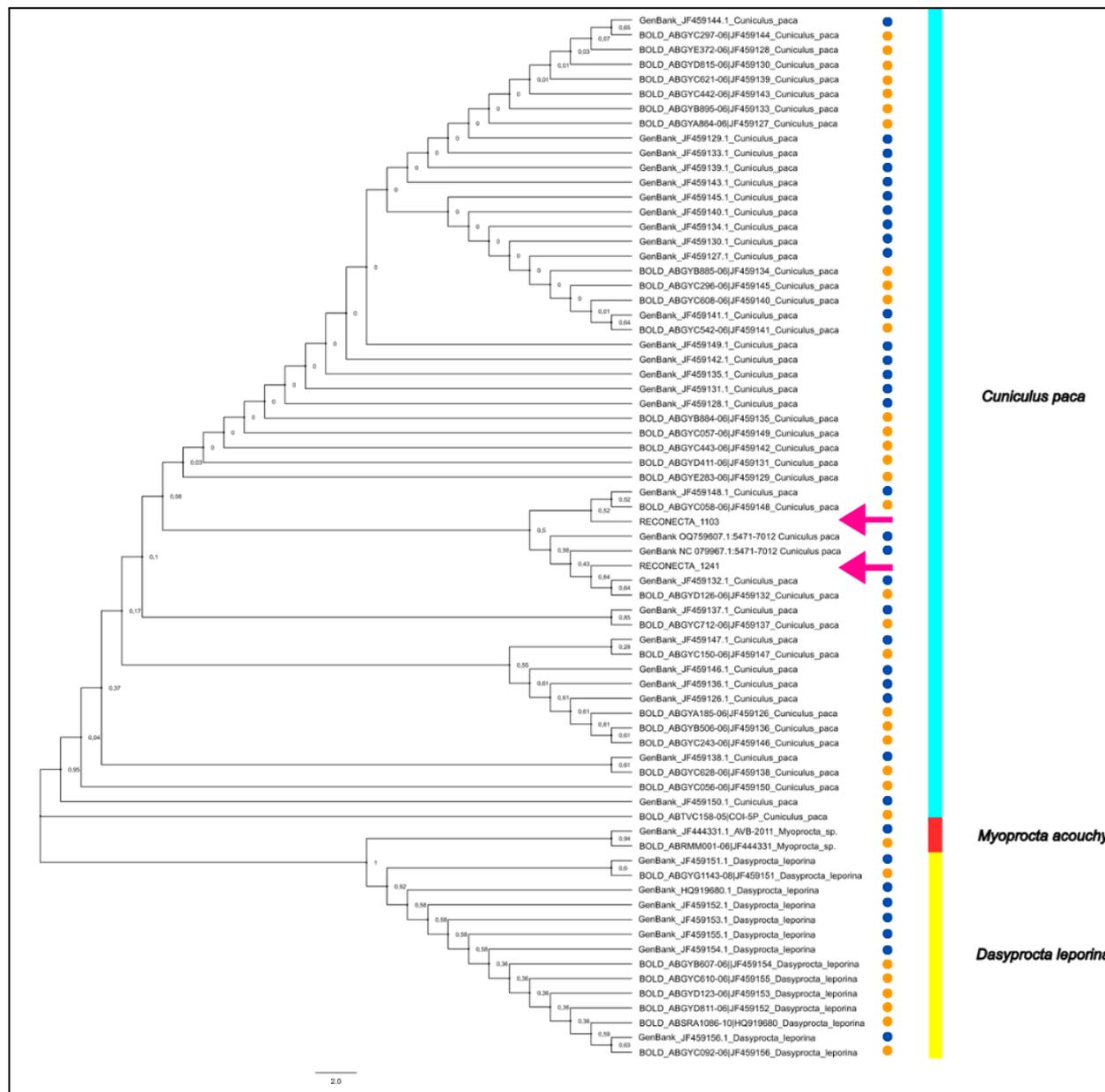


Figura 11 — Árvore filogenética do gene COI com seqüências de cutias, cutiaras e pacas. No cladograma, destaca-se o agrupamento evidente em três clados taxonômicos (cores do eixo vertical: amarelo para *D. leporina*; vermelho para *M. acouchy* e azul-claro para *C. paca*). Destacam-se as seqüências das amostras de ID 1103 e 1241 (setas cor de rosa) de *C. paca* que são geneticamente próximas de outras seqüências de *C. paca* encontradas nos bancos de dados *GenBank* (pontos em azul-escuro) e *BOLD Systems* (pontos em laranja). Os valores de bootstrap estão expressos como decimais de 1.000 replicações. Fonte: Produzido pela autora no FigTree v.1.4.3 (2023).

Também foram elaboradas árvores baseadas na metodologia estatística bayesiana, as quais também confirmaram a identidade taxonômica das espécies quando comparadas aos dados dos bancos de referência (Figuras 12 e 13).

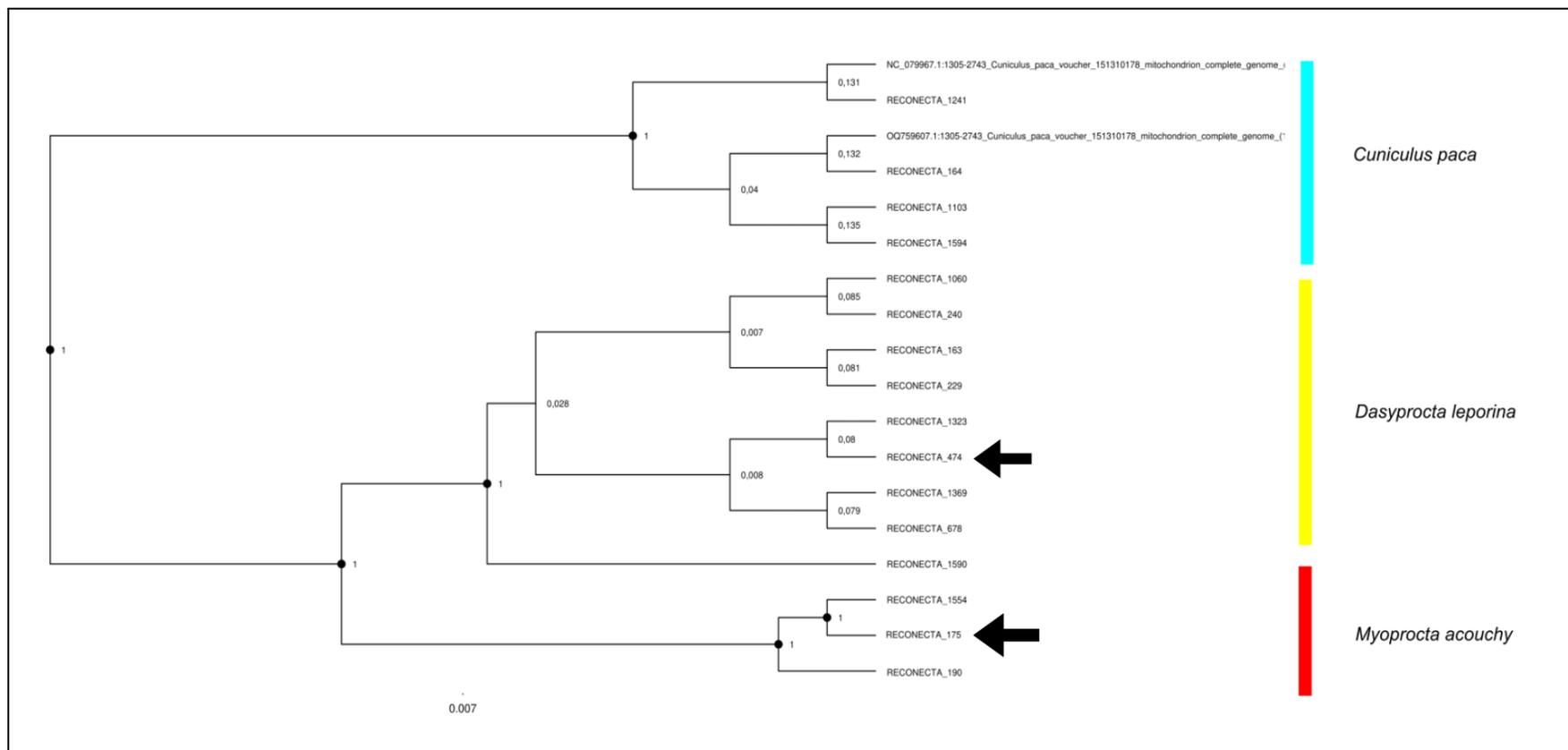


Figura 12 – Árvore filogenética de estatística bayesiana para o gene 16SrRNA. Árvore construída pelo método da estatística bayesiana. No cladograma é possível verificar o agrupamento em três clados suportados (cores do eixo vertical: amarelo para *Dasyprocta leporina*; azul-claro para *Cuniculus paca* e vermelho para *Myoprocta acouchy*) pelos valores da estatística e as sequências do *GenBank* com seus respectivos números de acesso, que coincidem com as amostras inferidas de cutia, cutiara e paca. As exceções são as amostras 175 e 474, marcadas por setas indicadoras (setas de cor preta). Fonte: Elaborado pela autora no FigTree 1.4.3 (2023).

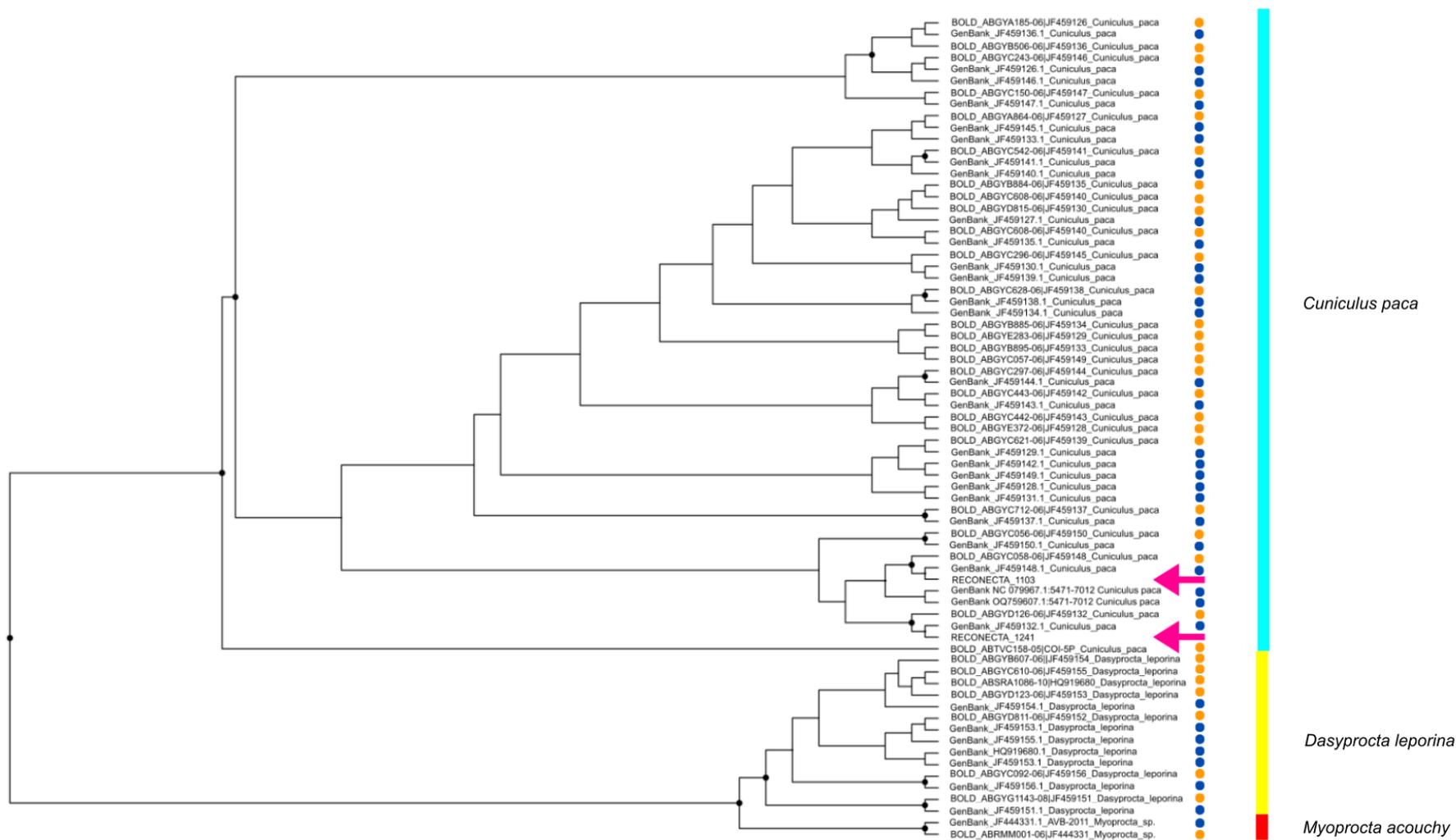


Figura 13 – Árvore filogenética de estatística bayesiana para o gene COI. Árvore construída pelo método da estatística bayesiana. No cladograma é possível verificar o agrupamento em três cladogramas suportados (cores do eixo vertical: amarelo para *Dasyprocta leporina*; azul-claro para *Cuniculus paca* e vermelho para *Myoprocta acouchy*) com as seqüências do *GenBank* e *BOLD systems*. Houve a formação de cladogramas que coincidem com as amostras inferidas de cutia, cutiara e paca. As seqüências das amostras de ID 1103 e 1241 estão destacadas (setas cor de rosa), e se agrupam com as amostras de *C. paca*, conforme o esperado. Fonte: Elaborado pela autora no FigTree 1.4.3 (2023).

4.4 Distribuição das espécies atropeladas ao longo da rodovia

A partir da análise molecular e a construção da filogenia dos espécimes, embora não totalmente precisa para as espécies do gênero *Dasyproctidae*, foi possível visualizar a distribuição geográfica dos atropelamentos (Figura 14).



Figura 14 — Pontos de atropelamento das amostras inferidas de *Dasyprocta leporina*, *Myoprocta acouchy* e *Cuniculus paca*. Produzido pela autora no Google Earth (2023). Pontos de atropelamento das amostras inferidas de (A) *Dasyprocta leporina*, (B) *Myoprocta acouchy* e (C) *Cuniculus paca*. Fonte: Dados do Projeto Reconecta.

4.5 Comparação entre os marcadores COI e 16SrRNA para identificação de cutias, cutiaras e pacas

Com base nos dados de sucesso de amplificação e sequenciamento, foi elaborada a seguinte tabela (Tabela 3), a fim de comparar a identificação adquirida pelos dois genes em ambas as plataformas de banco de dados utilizadas.

Tabela 3 — Comparativo da técnica do DNA *barcoding* utilizando os genes COI e 16SrRNA com as plataformas *GenBank* e *BOLD Systems*. Na tabela, são comparadas as espécies inferidas de *Dasyprocta leporina*, *Myoprocta acouchy* e *Cuniculus paca*. N/A: Não amplificadas. SBQ: Sequenciadas com baixa qualidade. Fonte: Elaborado pela autora.

ID Amostrai	Espécie inferida	Espécie baseado na maior taxa de % de identidade	% de identidade		
			Gene COI		Gene 16SrRNA
			<i>GenBank</i>	<i>BOLD Systems</i>	<i>GenBank</i>
163	<i>D. leporina</i>	<i>M. pratti</i>	SBQ	SBQ	93.06
164	<i>M. acouchy</i>	<i>M. pratti</i>	SBQ	SBQ	92.54
167	<i>D. leporina</i>	-	N/A	N/A	N/A
175	<i>C. paca</i>	<i>M. pratti</i>	SBQ	SBQ	91.58
190	<i>C. paca</i>	<i>C. paca</i>	SBQ	SBQ	100.00
229	<i>D. leporina</i>	<i>M. pratti</i>	N/A	N/A	93.09
240	<i>D. leporina</i>	<i>M. pratti</i>	N/A	N/A	93.00
278	<i>M. acouchy</i>	<i>M. pratti</i>	N/A	N/A	SQB
474	<i>D. leporina</i>	<i>M. pratti</i>	SBQ	SBQ	93.13
678	<i>D. leporina</i>	<i>M. pratti</i>	SBQ	SBQ	92.75
944	<i>D. leporina</i>	<i>M. pratti</i>	SBQ	SBQ	SBQ
1060	<i>D. leporina</i>	<i>M. pratti</i>	SBQ	SBQ	93.11
1103	<i>C. paca</i>	<i>C. paca</i>	99.27	99.5	100.00
1241	<i>C. paca</i>	<i>C. paca</i>	100.00	100.00	100.00
1323	<i>D. leporina</i>	<i>M. pratti</i>	SBQ	SBQ	92.97
1369	<i>D. leporina</i>	<i>M. pratti</i>	SBQ	SBQ	93.04
1505	<i>D. leporina</i>	-	SBQ	SBQ	SBQ
1553	<i>D. leporina</i>	-	N/A	N/A	N/A
1554	<i>M. acouchy</i>	<i>M. pratti</i>	SBQ	SBQ	92.60

ID Amostras	Espécie inferida	Espécie baseado na maior taxa de % de identidade	% de identidade		
			Gene COI		Gene 16SrRNA
			GenBank	BOLD Systems	GenBank
1590	<i>D. leporina</i>	<i>M. pratti</i>	SBQ	SBQ	93.11
1594	<i>C. paca</i>	<i>C. paca</i>	SBQ	SBQ	100.00

Dos 21 indivíduos analisados, o gene ribossomal 16SrRNA foi o fragmento *barcode* que identificou mais amostras a nível de espécie, gerando um total de quatro espécimes de *C. paca* identificadas com um valor de identidade igual a 100% (Amostras 190, 1103, 1241 e 1594). Em contraste, com os *primers* universais utilizados para amplificar o gene COI, apenas as amostras 1103 e 1241 puderam ser sequenciadas com sucesso (Tabela 3). Para o gene COI, a identidade das sequências obtidas com as sequências do banco BOLD Systems foi de 99,5% a 100%, e em comparação com o GenBank, variou de 99,27% a 100% (Tabela 3).

Para as espécies inferidas de *D. leporina* (amostras 163, 229, 240, 474, 678, 944, 1060, 1323, 1369 e 1590) e *M. acouchy* (164, 278 e 1554) e uma amostra inferida de *C. paca* (175) ocorreu um alinhamento das sequências de 16SrRNA com a sequência de *M. pratti* do gene 16SrRNA depositada no banco GenBank, com um valor de identidade baixo, variando de 91,58% a 93,13% (Tabela 3).

Apesar de utilizar vários protocolos adaptados para amplificação, as amostras 167 e 1553 não apresentaram bandas nos géis de agarose, tanto para o gene COI quanto para o gene 16SrRNA. Para o gene COI, após várias tentativas, as amostras 229, 240 e 278 apresentaram bandas nos géis, porém também apresentaram bandas espúrias, indicando assim a baixa a qualidade dos produtos de PCR (Tabela 3).

Para o COI, as sequências de 12 amostras (163, 167, 175, 190, 474, 678, 1060, 1323, 1369, 1554, 1590 e 1594) apresentaram picos de eletroferograma de baixa qualidade. O sequenciamento das amostras 944 e 1505 apresentou picos de baixa qualidade no eletroferograma para ambos os genes.

5 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados dos dois marcadores moleculares testados, verificamos que há diferenças entre os dois genes utilizados neste estudo quanto ao sucesso de amplificação. Para o gene do COI, foram necessárias várias tentativas de adaptações do protocolo de PCR universal de Folmer et al. (1994) para garantir o sucesso de amplificação das amostras. Foi demonstrado que a melhor temperatura de anelamento foi de 54°C, a uma concentração de 4,0 mM MgCl₂. O protocolo proposto por Palumbi (1991), por outro lado, foi bastante eficaz para garantir a amplificação de quase todas as amostras para o gene 16SrRNA.

A taxa de sucesso de amplificação e de sequenciamento foi mais alta para o gene 16SrRNA do que o gene COI, o que confirma o gene 16SrRNA como uma sequência *barcode* candidata para grupos específicos de mamíferos (SARRI et al., 2014). Para o gene COI, no entanto, houve um resultado diferente do que relatado em literatura para outras espécies que pertencem à ordem Rodentia (NICOLAS et al., 2012), o que sugere uma inespecificidade do par de *primers*. Existem estudos focados em outros gêneros de roedores que comprovam a eficiência, tanto na amplificação como no sequenciamento do gene COI como fragmento *barcode* (LU et al., 2012), porém utilizando *primers* mais específicos, como por exemplo, os *primers* BatL5310 e R6036R, descritos para espécies de roedores. Sendo assim, fica evidente a necessidade de desenhar *primers* específicos para o gene COI para os gêneros *Myoprocta* e *Dasyprocta*, a fim de aumentar o sucesso nas etapas de amplificação, assim como foi proposto por Galan e colaboradores (2012).

Os resultados das comparações das sequências de 16SrRNA obtidas com as informações do *GenBank* evidenciam o déficit dos bancos de dados já reportado em outros trabalhos (RODRÍGUEZ-CASTRO et al., 2017; TETA, 2019). Logo, os valores de identidade, embora baixos, apontam *M. pratti* como o melhor *match* para o gene 16SrRNA ao se comparar as espécies inferidas de *M. acouchy* e *D. leporina* com o banco de dados. Tais valores baixos de identidade mostram que as espécies em questão não possuem sequências de referência nos bancos de dados. Vale mencionar que, analisando a distribuição geográfica das espécies *M. pratti* e *M. acouchy* observa-se que elas não são simpátricas (TETA, 2019), tendo o Rio Negro como provável barreira, e conseqüentemente influenciando na variação interespecífica entre essas espécies (BONVICINO et al., 2008; CATZEFLIS et al., 2016; XIMENES, 1999; TETA, 2019). Sendo assim, para esse caso, o uso de outras informações complementares, como a pré-identificação morfológica e o conhecimento sobre a distribuição geográfica pode auxiliar na questão fundamental para a pesquisa taxonômica que é a

delimitação das espécies, pois o uso dos dados isolados de dados morfológicos pode subestimar o número de espécies e produzir falhas na identificação (LU et al., 2012).

A utilização do gene do DNA mitocondrial em estudos filogenéticos, como o gene 16SrRNA, pode explicar padrões de divergências interespecíficas observadas (NICOLAS et al., 2009; SARRI et al., 2014). Baseado nos alinhamentos e agrupamentos realizados pela construção das árvores filogenéticas para o gene 16SrRNA, foi possível confirmar a performance do gene como um bom candidato a marcador molecular universal (SARRI et al., 2014) e verificar a presença de três clados principais, ou seja, clados que embora consistentes com existência das três espécies inferidas dentre as amostras estudadas, ainda necessita de maiores investigações para o esclarecimento de filogenia a partir da variação interespecífica (DUCROZ et al., 2001; NICOLAS et al., 2009).

Ainda, tal análise permitiu detectar dois possíveis erros na identificação morfológica a priori das amostras 175 e 474. A amostra 175 inicialmente foi inferida de *C. paca*, porém a sequência se agrupou junto com as sequências inferidas de *M. acouchy*. Enquanto a amostra 474, inferida de *M. acouchy*, se agrupou junto às amostras inferidas de *D. leporina*. A divergência, pelo menos para a amostra 474, pode ser justificada pela observação anotada durante o procedimento de coleta dos tecidos, que indica que o material coletado da amostra apresentava um estágio de degradação avançado. Situações como essa, em que o animal se apresenta desconfigurado, é usualmente relatada em trabalhos de ecologia de estradas e rodovias, o que reforça ainda mais a importância da análise molecular, pois o conjunto de características determinantes geralmente é perdido (GALAN et al., 2012; KLIPPEL, 2015; RODRÍGUEZ-CASTRO, 2017).

Para o gene COI, a segunda árvore filogenética por *Neighbor-Joining* corrobora com a identificação a priori de que as duas amostras sequenciadas com sucesso eram realmente da espécie *C. paca*, uma vez que a mesma se agrupou no clado formado por sequências de referências obtidas nos bancos de dados BOLD *Systems* e *GenBank*. Apesar disso, é importante salientar que alguns trabalhos indicam uma limitação no uso do gene COI como fragmento para reconstrução filogenética molecular confiável (LU et al., 2012) e certamente isso pôde ser observado pelos valores de bootstrap da árvore construída, que se aproximam de zero.

As árvores baseadas na metodologia bayesiana também apresentaram padrões de agrupamento de clados, e, portanto, também apresentam informações taxonômicas em relação a filogenia apresentada.

A abordagem do DNA *barcoding* mostrou mais uma vez ser útil na identificação molecular de espécies de mamíferos, em especial para espécimes danificados morfologicamente.

Apesar de não representarem declínio populacional de acordo com dados da IUCN (CATZEFLIS & WESKLER, 2016; EMMONS et al., 2016; EMMONS & REID, 2016), os atropelamentos podem levar a mudança na dinâmica populacional local, causando uma redução na viabilidade da população, e assim aumenta o risco de extinções locais a longo prazo (SARANHOLI et al., 2016).

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir desse estudo, foi possível fazer a atribuição taxonômica em 16 das 21 amostras analisadas, destacando a identificação molecular bem-sucedida para as quatro amostras de *C. paca* pela técnica do DNA *barcoding*. Por comparação, os *primers* universais do gene 16SrRNA se adaptaram melhor ao método na identificação molecular dessa grupo, devido à facilidade de amplificação, e, conseqüentemente, na qualidade das sequências obtidas.

Ainda, é possível concluir que o estudo de técnicas moleculares como DNA *barcoding* pode contribuir efetivamente para evidenciar diferenças interespecíficas entre os grupos taxonômicos analisados, inclusive para amostras biológicas advindas de animal em mau estado de conservação, como foi demonstrado através da análise filogenética do gene 16SrRNA.

Apesar da literatura corroborar o uso do gene COI como *barcode*, o par de *primers* universais utilizados apresentou dificuldades durante o uso da técnica ao ser aplicada nas espécies de roedores analisadas, sendo necessária uma série de adaptações dos protocolos de PCR. Assim, projetar novos desenhos de *primers* que se adequem ao uso da tecnologia do DNA *barcoding* para as espécies-alvo do estudo pode ser essencial para garantir a eficácia da identificação molecular.

Os dados fornecidos pela identificação molecular podem contribuir para uma análise de *hotspots* de atropelamento da região da rodovia BR-174. A longo prazo, depois de se obter um amplo conjunto de dados estatísticos relacionados aos locais de atropelamento, é esperado que o Projeto Reconecta encontre os *hotspots* de atropelamento, e assim possa elaborar novas medidas de mitigação do atropelamento da fauna local, atuando frente à segurança humana e conservação de espécies silvestres da região da Amazônia. Por fim, as sequências aqui geradas poderão ser úteis para auxiliar em outros trabalhos que utilizem a mesma abordagem, por exemplo, na genética forense para identificação molecular de amostras de origem desconhecida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-JR, Edson Fiedler de et al. Spatiotemporal diversification of tree squirrels: is the South American invasion and speciation really that recent and fast? **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 230, 2020.

AHMED, Sarfraz et al. Pragmatic applications and universality of DNA barcoding for substantial organisms at species level: a review to explore a way forward. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022.

ALJANABI, Salah M.; MARTINEZ, Iciar. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ARNOT, David E.; ROPER, Caroline; BAYOUMI, Riad AL. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the Plasmodium falciparum circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 61, n. 1, p. 15-24, 1993.

BENSON, Dennis A. et al. GenBank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 15-18, 2000.

BONVICINO, Cibele R. et al. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. **Série de Manuais Técnicos; 11**, 2008.

BOUCKAERT, Remco et al. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 4, p. e1003537, 2014.

BOWDICH, Thomas Edward. **An analysis of the natural classifications of Mammalia: for the use of students and travellers**. J. Smith, 1821.

BUENO, C.; SOUSA, C. O. M.; FREITAS, S. R. Habitat or matrix: which is more relevant to predict road-kill of vertebrates? **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, p. 228-238, 2015.

BURGIN, Connor J. et al. (Ed.). **Illustrated Checklist of the Mammals of the World**. Lynx, 2020.

CARLETON, Michael D.; MUSSER, Guy G. Order rodentia. **Mammal Species of the World A Taxonomic and Geographic Reference**. John Hopkins University Press, Baltimore, p. 745-752, 2005.

CATZEFLIS, F., & WEKSLER, M. *Myoprocta acouchy*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T14100A22198890**. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T14100A22198890.en>. Accessed on 17 August 2023.

CATZEFLIS, F.; WEKSLER, M.; BONVICINO, C. *Myoprocta pratti*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e. T136663A22198733**, 2016. Accessed on 17 August 2023.

CHAHUD, Artur. CUNICULUS PACA LINNAEUS, 1766 (CUNICULIDAE, RODENTIA) NO HOLOCENO DA GRUTA CUVIERI, BRASIL. **Journal of Neotropical Biology/Revista de Biologia Neotropical**, v. 19, n. 1, 2022.

COATES, David J.; BYRNE, Margaret; MORITZ, Craig. Genetic diversity and conservation units: dealing with the species-population continuum in the age of genomics. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, p. 165, 2018.

COSTA, Edson Rodrigues et al. Atropelamentos de Marsupiais (Didelphimorphia: Didelphidae) na BR-174, na terra indígena Waimiri Atroari, Amazônia Central, Brasil. 2018.

DARRIBA, Diego et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012.

DRUMMOND, Alexei J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular biology and evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969-1973, 2012.

DRUMMOND, Alexei J.; BOUCKAERT, Remco R. Bayesian evolutionary analysis with BEAST. **Cambridge University Press**, 2015.

DELANEY, Martha A.; TREUTING, Piper M.; ROTHENBURGER, Jamie L. Rodentia. In: **Pathology of Wildlife and Zoo Animals**. Academic Press, 2018. p. 499-515.

DUCROZ, J. F.; VOLOBOUEV, V.; GRANJON, L. An assessment of the systematics of Arvicanthine rodents using mitochondrial DNA sequences: evolutionary and biogeographical implications. **Journal of mammalian Evolution**, v. 8, p. 173-206, 2001.

EMMONS, L. Cuniculus paca. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T699A22197347**. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T699A22197347.en>. Accessed on 17 August 2023.

EMMONS, L. & REID, F. Dasyprocta leporina. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T89497102A22197762**. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T89497102A22197762.en>. Accessed on 17 August 2023.

FOLMER O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol Mar Biol Biotechnol**. 1994 Oct;3(5):294-9. PMID: 7881515.

FORMAN, Richard TT; ALEXANDER, Lauren E. Roads and their major ecological effects. **Annual review of ecology and systematics**, v. 29, n. 1, p. 207-231, 1998.

GALAN, Maxime; PAGÈS, Marie; COSSON, Jean-François. Next-generation sequencing for rodent barcoding: species identification from fresh, degraded and environmental samples. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48374, 2012.

GenBank Overview. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>

GUIZA QUIROGA, Yonni Estiven. Análisis de la distribución del Borugo de montaña (*Cuniculus taczanowskii*; *Agouti taczanowskii*) (Stolzmann, 1865) en Colombia mediante el uso de un sistema de información geográfica (SIG) para planteamiento de una posible estrategia para su conservación. 2019.

GUO, Mali et al. Life barcoded by DNA barcodes. **Conservation Genetics Resources**, v. 14, n. 4, p. 351-365, 2022.

HALL, Barry G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 5, p. 1229-1235, 2013.

HEBERT, Paul DN et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HOLLISTER, N. The type species of *Cuniculus brisson*. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, 1913.

JORGE, Maria Luisa SP. Effects of forest fragmentation on two sister genera of Amazonian rodents (*Myoprocta acouchy* and *Dasyprocta leporina*). **Biological Conservation**, v. 141, n. 3, p. 617-623, 2008.

KIMURA, Motoo. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KEARSE, Matthew et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KLIPPEL, Angelica H. et al. Using DNA barcodes to identify road-killed animals in two atlantic forest nature reserves, Brazil. **Plos one**, v. 10, n. 8, p. e0134877, 2015.

KUMAR, Sudhir et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018.

LIS, John T. [42] Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1980. p. 347-353.

LU, Liang et al. Small mammal investigation in spotted fever focus with DNA-barcoding and taxonomic implications on rodents species from Hainan of China. 2012.

LUO, Arong et al. Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals. **Bmc genomics**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2011.

MEDEIROS, Aline. Vertebrados atropelados na Amazônia: monitoramento em longo prazo, influência do fluxo de veículos e alternância de hotspots em um trecho da Rodovia BR-174, Brasil. 2019.

MYERS, Phil et al. The animal diversity web. Accessed on 05 September 2023.

NICOLAS, Violaine et al. Assessment of three mitochondrial genes (16S, Cytb, CO1) for identifying species in the Praomyini tribe (Rodentia: Muridae). **Plos one**, v. 7, n. 5, p. e36586, 2012.

NICOLAS, Violaine et al. Phylogeography of spiny mice (genus *Acomys*, Rodentia: Muridae) from the south-western margin of the Sahara with taxonomic implications. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 98, n. 1, p. 29-46, 2009.

NIELSEN, Rasmus; MATZ, Mikhail. Statistical approaches for DNA barcoding. **Systematic Biology**, v. 55, n. 1, p. 162-169, 2006.

PAGLIA, Adriano P. et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição/Annotated Checklist of Brazilian Mammals. **Occasional papers in conservation biology**, v. 6, n. 6, 2012.

PALUMBI, S. R. The simple fool's guide to PCR, version 2.0. **University of Hawaii, Honolulu**, v. 45, 1991.

PERCEQUILLO, Alexandre R. et al. How many species of mammals are there in Brazil? New records of rare rodents (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) from Amazonia raise the current known diversity. **PeerJ**, v. 5, p. e4071, 2017.

RAMBAUT, Andrew. FigTree-version 1.4.3, a graphical viewer of phylogenetic trees. **Computer program distributed by the author, website: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>**, 2017.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. LogCombiner version 1.8. 0. 2013.

RAMBAUT, Andrew et al. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic biology**.67 (5): 901-904. 2018.

RAMÍREZ-CHAVES, Héctor E.; SUÁREZ-CASTRO, Andrés F.; PATTERSON, Bruce D. Re-examining the hypothesis of allopatric distribution of *Myoprocta acouchy* and *M. pratti* (Mammalia: Dasyproctidae) in South America. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 54, p. 447-456, 2014.

RATNASINGHAM, Sujeevan; HEBERT, Paul DN. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.

REIS, Nélio Roberto et al. **Mamíferos do Brasil. In: Mamíferos do Brasil**. 2006. p. 437-437.

RODRIGUES, P. Bicho na pista: Empresa trabalha para reduzir atropelamento de animais. Disponível em: <<https://www.uol.com.br/ecoa/ultimas-noticias/2022/03/17/bicho-na-pista-empresa-trabalha-para-reduzir-atropelamento-de-animais.htm?cmpid=copiaecola>>. Acesso em: 17 ago. 2023.

RODRÍGUEZ-CASTRO, Karen Giselle et al. Using DNA barcode to relate landscape attributes to small vertebrate roadkill. **Biodiversity and Conservation**, v. 26, p. 1161-1178,

2017.

SAITOU, Naruya; NEI, Masatoshi. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, n. 1, p. pdb. prot4455, 2006.

SARANHOLI, Bruno H.; GESTICH, Carla C.; DE OLIVEIRA, Marina E. Molecular ecology in neotropical mammals: key aspects for conservation.

SARRI, Constantina et al. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. **Food Control**, v. 43, p. 35-41, 2014.

SECCO, Helio; ALVES DA ROSA, Clarissa; GONÇALVES, Pablo Rodrigues. Biodiversity crisis on Brazilian roads. **Biodiversity**, v. 19, n. 3-4, p. 219-220, 2018.

TAMURA, Koichiro et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TETA, Pablo. Geographic variation in quantitative skull traits in the genus *Myoprocta* Thomas, 1903 (Rodentia, Dasyproctidae) and its taxonomic implications. **Mammalia**, v. 83, n. 3, p. 212-218, 2019.

THOMPSON, Julie D.; HIGGINS, Desmond G.; GIBSON, Toby J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

VENCES, Miguel et al. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in Zoology**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2005.

VOSS, Robert S.; LUNDE, Darrin P.; SIMMONS, Nancy B. The mammals of Paracou, French Guiana: a Neotropical lowland rainforest fauna part 2. Nonvolant species. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 2001, n. 263, p. 3-236, 2001.

XIMENES, Gilson E. Iack; VIVO, Mario de. Sistemática da família Dasyproctidae Bonaparte, 1838 (Rodentia, Histicognathi) no Brasil. 1999.

APÊNDICE A – Adaptações de protocolos de PCR para o gene COI.

O primeiro protocolo adaptado para a amplificação das amostras-alvo se demonstrou pouco eficiente para as amplificações.

PROTOCOLO 1. ADAPTADO – GENE COI (FOLMER, 1994) – Fevereiro 2023

AMOSTRAS: 163, 164, 167, 175, 240, 278, 474

AMOSTRAS AMPLIFICADAS (T = 50°C): Nenhuma

Solução	[Inicial]	[Final]	Volume (µl)
Água	-	-	4,3
Buffer	10x	1x	1,25
dNTP	2,5 mM	0,25 mM	1,25
MgCl ₂	50 mM	4,0 mM	1,0
COI-Forward	10 µM	0,6 mM	0,75
COI-Reverse	10 µM	0,6 mM	0,75
Taq (<i>Platinum</i>)	1 unid/0,2 µl	0,5 unidade	0,1
DNA	-	150 ng	3
Volume final			12,5

O protocolo a seguir teve um ajuste na concentração de MgCl₂, diminuído de 4 mM para 3 mM.

PROTOCOLO 2. ADAPTADO – GENE COI (FOLMER, 1994) – 16 de fevereiro de 2023

AMOSTRAS: 163, 164, 167, 175, 190A, 190B, 229, 240, 278, 474

AMOSTRAS AMPLIFICADAS (T = 50°C): 175 (apresentou banda fraca) e 278 (apresentou banda espúria, descartada)

Solução	[Inicial]	[Final]	Volume (µl)
Água	-	-	4,55
Buffer	10x	1x	1,25
dNTP	2,5 mM	0,25 mM	1,25
MgCl ₂	50 mM	3,0 mM	0,75

COI-Forward	10 µM	0,6 mM	0,75
COI-Reverse	10 µM	0,6 mM	0,75
Taq (<i>Platinum</i>)	1 unid/0,2 µl	0,5 unidade	0,2
DNA	-	150 ng	3
Volume final			12,5

O protocolo a seguir manteve as mesmas concentrações de reagentes do protocolo anterior e houve sucesso nas amplificações de algumas amostras.

PROTOCOLO 3. ADAPTADO – GENE COI (FOLMER, 1994) – 07 de Março de 2023

AMOSTRAS: 163, 164, 167, 175, 190B, 229, 240, 278, 474, 678, 944, 1060, 1103, 1241, 1323, 1369, 1505, 1553, 1554, 1590, 1594

AMOSTRAS AMPLIFICADAS (T = 50°C): 164, 1103, 1241, 1590, 1594

O protocolo a seguir teve um ajuste na concentração de MgCl₂, diminuído de 3 mM para 2,48 mM. O protocolo foi realizado em duplicata, a fim de serem utilizados dois níveis de temperatura de anelamento (T=52°C e T=54°C). A temperatura de anelamento de 54°C apresentou um bom resultado, eliminando as bandas espúrias. Houve uma contaminação demonstrada pelo controle negativo.

PROTOCOLO 4. ADAPTADO – GENE COI (FOLMER, 1994) – 22 de Março de 2023

AMOSTRAS: 229, 240, 474, 678, 944, 1323, 1060, 1369, 1505

AMOSTRAS AMPLIFICADAS (T = 52°C): 474, 678, 944, 1323, 1369, 1505 (banda espúria)

AMOSTRAS AMPLIFICADAS (T = 54°C): 474, 678, 944, 1323, 1060, 1369, 1505 (banda espúria no controle negativo)

Solução	[Inicial]	[Final]	Volume (µl)
Água	-	-	4,68
Buffer	10x	1x	1,25
dNTP	2,5 mM	0,25 mM	1,25
MgCl ₂	50 mM	2,48 mM	0,62
COI-Forward	10 µM	0,6 mM	0,75
COI-Reverse	10 µM	0,6 mM	0,75

Taq (<i>Platinum</i>)	1 unid/0,2 µl	0,5 unidade	0,2
DNA	-	150 ng	3
Volume final			12,5

O mesmo protocolo foi repetido no **Protocolo 5. Adaptado**, porém todos os produtos de PCR amplificaram com banda espúria. Para o protocolo 6, houve um aumento na concentração de MgCl₂, para 2 mM.

PROTOCOLO 6. ADAPTADO – GENE COI (FOLMER, 1994) – 6 de Abril de 2023

AMOSTRAS: 229, 240, 474, 678, 944, 1323, 1060, 1369, 1505

AMOSTRAS AMPLIFICADAS COM BANDA ESPÚRIA (T=54°C): 678, 944, 1323, 1369, 1505

Solução	[Inicial]	[Final]	Volume (µl)
Água	-	-	4,8
Buffer	10x	1x	1,25
dNTP	2,5 mM	0,25 mM	1,25
MgCl ₂	50 mM	2 mM	0,5
COI-Forward	10 µM	0,6 mM	0,75
COI-Reverse	10 µM	0,6 mM	0,75
Taq (<i>Platinum</i>)	1 unid/0,2 µl	0,5 unidade	0,2
DNA	-	150 ng	3
Volume final			12,5

Para o seguinte protocolo, foram utilizadas as mesmas concentrações de reagentes propostas no protocolo anterior, utilizando as amostras extraídas pelo protocolo Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico.

PROTOCOLO 7. ADAPTADO – GENE COI (FOLMER, 1994) – 19 de Maio de 2023

AMOSTRAS: 164, 278A, 278B, 1554A e 1554B

AMOSTRAS AMPLIFICADAS (T = 54°C): Nenhuma

Para o seguinte protocolo, foi proposto a concentração de 4 mM de MgCl₂.

PROTOCOLO 8. ADAPTADO – GENE COI (FOLMER, 1994) – 6 de Junho de 2023

AMOSTRAS: 164, 278A, 278B, 1554A e 1554B, 175, 190A, 190B, 1060, 1241, 1594

AMOSTRAS AMPLIFICADAS (T = 54°C): 175, 1241, 1594

Solução	[Inicial]	[Final]	Volume (µl)
Água	-	-	4,3
Buffer	10x	1x	1,25
dNTP	2,5 mM	0,25 mM	1,25
MgCl ₂	50 mM	4,0 mM	1,0
COI-Forward	10 µM	0,6 mM	0,75
COI-Reverse	10 µM	0,6 mM	0,75
Taq (<i>Platinum</i>)	1 unid/0,2 µl	0,5 unidade	0,1
DNA	-	150 ng	3
Volume final			12,5

Para o seguinte protocolo, não houve adaptações na concentração de MgCl₂ em relação ao Protocolo 7. Adaptado. Houve a tentativa de um novo gradiente de temperatura de anelamento (T=54°C, T=56°C e T=58°C), porém todas as amplificações falharam.

PROTOCOLO 9. ADAPTADO – GENE COI (FOLMER, 1994) – 20 de Junho 2023

AMOSTRAS: 190A, 190B, 164, 278, 1554A, 1554B, 1060, 1103, 163, 474, 678, 944

AMOSTRAS AMPLIFICADAS (T = 54°C, T=56°C e T= 58°C): Nenhuma

O protocolo a seguir foi executado em triplicata, sem adaptações na concentração de MgCl₂. Foi utilizado um gradiente de temperatura de anelamento diferentes em um gradiente de temperatura (T=52°C, T=54°C e T= 56°C). A temperatura de 54°C se mostrou mais eficiente embora algumas apresentassem banda espúria.

PROTOCOLO 10. ADAPTADO – GENE COI (FOLMER, 1994) – 22 de Junho de 2023

AMOSTRAS: 1103, 190A, 190B, 164, 278A, 278B, 1554A, 1554B, 163, 167, 229, 240, 474, 678, 944, 1060, 1323, 1369, 1553

AMOSTRAS AMPLIFICADAS (T = 54°C): 1103, 190A, 190B, 163
AMOSTRAS AMPLIFICADAS COM BANDA ESPÚRIA: 229, 240, 474, 678, 944, 1060, 1323, 1369, 1554

APÊNDICE B – Sequências de referência dos bancos BOLD Systems e GenBank

Quadro de sequências referências (16SrRNA e COI) - GenBank

Gênero/Espécie	Gene	Local	Código de acesso
<i>Cuniculus paca</i>	16SrRNA	Peru	OQ759607.1
<i>Cuniculus paca</i>	16SSrRNA	Peru	NC_079967.1
<i>Myoprocta pratti</i>	16SrRNA	Altamira, right bank Rio Juruá, Amazonas, Brazil	AF422880.1
<i>Myoprocta pratti</i>	COI	Equador: Orellana, Onkone Gare, 38 Km S Of Pompeya Sur	JF444937.1
<i>Myoprocta sp.</i>	COI	Metro Toronto Zoo	JF444331.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, 10 Km, Sse of Kurupukari	JF459150.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, 10 Km, Sse of Kurupukari	JF459149.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, 10 Km, Sse of Kurupukari	JF459148.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Upper Takutu-Upper Essequibo, Kamoia River, 50 Km SWW Of Gunn'S Strip	JF459147.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Pakatau Mountain, Siparuni River, 42 Km WNW Of Kurupukari	JF459146.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Pakatau Mountain, Siparuni River, 42 Km WNW Of Kurupukari	JF459145.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Pakatau Mountain, Siparuni River, 42 Km WNW Of Kurupukari	JF459144.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Burro River, 25 Km WNW Of Kurupukari	JF459143.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Burro River, 25 Km WNW Of Kurupukari	JF459142.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Burro River, 25 Km WNW Of Kurupukari	JF459141.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Pakatau Mountain, Siparuni River, 42 Km WNW Of Kurupukari	JF459140.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Burro River, 25 Km WNW Of Kurupukari	JF459139.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Burro River, 25 Km WNW Of Kurupukari	JF459138.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Cuyuni-Mazaruni, Kuwaima Fall, Mazaruni River, 15 Km NNW Of Kamarang	JF459137.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Upper Takutu-Upper Essequibo, 5 Km SE Of Surama	JF459136.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, 25 Km SSW Of Kurupukari	JF459135.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, 25 Km SSW Of Kurupukari	JF459134.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, 25 Km SSW Of Kurupukari	JF459133.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, 38 Mile Camp, 35 Km SW Of Kurupukari, Iwokrama Reserve	JF459132.1

Gênero/Espécie	Gene	Local	Código de acesso
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Gorge Camp, 40 Km SSW Of Kurupukari, Iwokrama Reserve	JF459131.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Pakatau Falls, Siparuni River, Iwokrama Reserve	JF459130.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Sand Stone, Iwokrama Forest	JF459129.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Sand Stone, Iwokrama Forest	JF459128.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Barima-Waini, Baramita, Old World	JF459127.1
<i>Cuniculus paca</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, 30 Km Ne Of Surama	JF459126.1
<i>Dasyprocta leporina</i>	COI	Suriname: Sipaliwini, Iconja Landing, Sipaliwini River, terra firme primary lowland forest	HQ919680.1
<i>Dasyprocta leporina</i>	COI	Guiana: Upper Takutu-Upper Essequibo, Chodikar River, 55 Km SW Of Gunn'S Strip	JF459156.1
<i>Dasyprocta leporina</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Pakatau Mountain, Siparuni River, 42 Km WNW Of Kurupukari	JF459155.1
<i>Dasyprocta leporina</i>	COI	Guiana: Upper Demerara-Berbice, Tropenbos, 20 Km Sse Of Mabura Hill	JF459154.1
<i>Dasyprocta leporina</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, 38 Mile Camp, 35 Km SW Of Kurupukari, Iwokrama Reserve	JF459153.1
<i>Dasyprocta leporina</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Pakatau Falls, Siparuni River, Iwokrama Reserve	JF459152.1
<i>Dasyprocta leporina</i>	COI	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Forest, Canopy Walkway	JF459151.1

Quadro de sequências referências (COI) - Bold Systems

Gênero/Espécie	Local	Museu	Código de acesso	Voucher
<i>Dasyprocta leporina</i>	Guiana: Upper Demerara-Berbice, Tropenbos, 20 Km Sse Of Mabura Hill	Royal Ontario Museum	ABGYB607-06	ROM 103355
<i>Dasyprocta leporina</i>	Guiana: Upper Takutu-Upper Essequibo, Chodikar River, 55 Km Sw Of Gunn'S Strip	Royal Ontario Museum	ABGYC092-06	ROM 106598
<i>Dasyprocta leporina</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Pakatau Mountain, Siparuni River, 42 Km Wnw Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYC610-06	ROM F38927
<i>Dasyprocta leporina</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, 38 Mile Camp, 35 Km Sw Of Kurupukari, Iwokrama Reserve	Royal Ontario Museum	ABGYD123-06	ROM 108426
<i>Dasyprocta leporina</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Pakatau Falls, Siparuni River, Iwokrama Reserve	Royal Ontario Museum	ABGYD811-06	ROM 109234
<i>Dasyprocta leporina</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Forest, Canopy Walkway	Royal Ontario Museum	ABGYG1143-08	ROM 119790
<i>Dasyprocta leporina</i>	Suriname: Sipaliwini, Iconja Landing, Sipaliwini River	Royal Ontario Museum	ABSRA1086-10	ROM MAM 120320
<i>Myoprocta pratti</i>	Equador: Orellana, Onkone Gare, 38 Km S Of Pompeya Sur	Royal Ontario Museum	ABECB098-08	ROM 118760
<i>Myoprocta sp.</i>	Captive, Source Unknown, Metro Toronto	Royal Ontario Museum	ABRMM001-06	ROM PM10266

Gênero/Espécie	Local	Museu	Código de acesso	Voucher
	Zoo	Museum		
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, 30 Km Ne Of Surama	Royal Ontario Museum	ABGYA185-06	ROM 98051
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Barima-Waini, Baramita, Old World	Royal Ontario Museum	ABGYA864-06	ROM 100935
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Upper Takutu-Upper Essequibo, 5 Km Se Of Surama	Royal Ontario Museum	ABGYB506-06	ROM 103241
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, 25 Km Ssw Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYB884-06	ROM 104729
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, 25 Km Ssw Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYB885-06	ROM 104730
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, 25 Km Ssw Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYB895-06	ROM 104740
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, 10 Km Sse Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYC056-06	ROM 104833
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, 10 Km Sse Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYC057-06	ROM 104834
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, 10 Km Sse Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYC058-06	ROM 104835
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Upper Takutu-Upper Essequibo, Kamao River, 50 Km Ssw Of Gunn'S Strip	Royal Ontario Museum	ABGYC150-06	ROM 106666
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Pakatau Mountain, Siparuni River, 42 Km Wnw Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYC243-06	ROM 107023
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Pakatau Mountain, Siparuni River, 42 Km Wnw Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYC296-06	ROM 107101
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Pakatau Mountain, Siparuni River, 42 Km Wnw Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYC297-06	ROM 107102
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Burro Burro River, 25 Km Wnw Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYC442-06	ROM 107266
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Burro Burro River, 25 Km Wnw Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYC443-06	ROM 107267
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Burro Burro River, 25 Km Wnw Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYC542-06	ROM 107381
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Pakatau Mountain, Siparuni River, 42 Km Wnw Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYC608-06	ROM F38837
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve,	Royal Ontario	ABGYC621-06	ROM F39285

Gênero/Espécie	Local	Museu	Código de acesso	Voucher
	Burro Burro River, 25 Km Wnw Of Kurupukari	Museum		
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Burro Burro River, 25 Km Wnw Of Kurupukari	Royal Ontario Museum	ABGYC628-06	ROM F39483
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Cuyuni-Mazaruni, Kuwaima Fall, Mazaruni River, 15 Km Nnw Of Kamarang	Royal Ontario Museum	ABGYC712-06	ROM 108112
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, 38 Mile Camp, 35 Km Sw Of Kurupukari, Iwokrama Reserve	Royal Ontario Museum	ABGYD126-06	ROM 108429
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Gorge Camp, 40 Km Ssw Of Kurupukari, Iwokrama Reserve	Royal Ontario Museum	ABGYD411-06	ROM 108758
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Pakatau Falls, Siparuni River, Iwokrama Reserve	Royal Ontario Museum	ABGYD815-06	ROM 109238
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Sand Stone, Iwokrama Forest	Royal Ontario Museum	ABGYE283-06	ROM 111732
<i>Cuniculus paca</i>	Guiana: Potaro-Siparuni, Sand Stone, Iwokrama Forest	Royal Ontario Museum	ABGYE372-06	ROM 111822
<i>Cuniculus paca</i>	Costa Rica	Museum of Southwestern Biology	ABTVC158-05	05-PARA-0159