



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**



VANESSA ARAÚJO RIOS

**PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-VOADORES E O CONSUMO DE
CACAU EM AGROFLORESTAS NO SUL DA BAHIA**

**Ilhéus-BA
2018**

VANESSA ARAÚJO RIOS

**PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-VOADORES E O CONSUMO DE CACAU EM
AGROFLORESTAS NO SUL DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz, como cumprimento de requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Camila Righetto Cassano
Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Fernanda Amato Gaiotto

**Ilhéus-BA
2018**

VANESSA ARAÚJO RIOS

**PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-VOADORES E O CONSUMO DE CACAU EM
AGROFLORESTAS NO SUL DA BAHIA**

Prof^a Dr^a Camila Righetto Cassano

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)
(Orientadora)

Prof^a Dr^a Fernanda Amato Gaiotto

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)
(Coorientadora)

Prof^a Dr^a Deborah Maria de Faria

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)
(Examinadora)

Prof. Dr. Thomas Püttker

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)
(Examinador)

**Ilhéus-BA
2018**

*Dedico à minha mãe e meu pai por todo o apoio que me
foi dado para que mais essa etapa fosse cumprida.*

AGRADECIMENTOS

É chegado mais um final de ciclo na minha vida. E o momento é de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Primeiramente à minha mãe e meu pai por serem os maiores incentivadores da minha carreira, por sempre estar ao meu lado nas minhas escolhas e me ensinarem a nunca desistir dos meus sonhos. Ao meu irmão, pelo apoio e carinho. Todos os meus esforços são dedicados a vocês, que mesmo não entendendo o que eu faço sentem o maior orgulho. Obrigada, família: meu amor incondicional!

Ao meu namorado Inácio, por todo o amor e companheirismo. Pelo apoio e paciência nas horas difíceis, e por mesmo com a distância, se manter sempre presente. Te amo!

À minha orientadora prof^a Dr^a Camila Righetto Cassano, por ter aceitado me orientar, pela paciência e dedicação nas correções para que este trabalho tivesse a melhor qualidade possível. Obrigada pelos abraços e palavras de conforto nos momentos que precisei. À minha coorientadora prof^a Dr^a Fernanda Amato Gaiotto, por, assim como eu, ter aceitado o desafio de trabalhar com algo novo e comemorar comigo cada resultado positivo de nossas PCR's. Foi uma ótima experiência e aprendizado.

Ao prof. Dr. Martín Roberto del Valle Alvarez, por todo o apoio que me deu para a execução do trabalho. Pelas conversas, sempre construtivas, e por me receber tão bem. Obrigada pelo enorme carinho que me tratou durante o tempo que estive no laboratório.

Aos meus colegas de turma do mestrado, César, Cecília, Joanison, Heriberto, Letícia, Mário, Vanessa Ramos, Gabriel, Érica, Wendel, Daniel e Leildo. Obrigada pelas risadas, apoio e pela amizade. Vocês foram a melhor turma que eu poderia ter tido. Gostaria de agradecer a Dafne, em especial, por estar ao meu lado em todos os momentos que precisei, pelas conversas, gargalhadas e lágrimas compartilhadas. Sentirei saudade de cada um de vocês.

Aos meus queridos do grupo #CampoRhips, que me ajudaram na coleta de dados. Em especial a Elson e Maycon que sempre que precisei estiveram do meu lado, até mesmo na hora de contar “birros” (risos). E a Adna por dividir o seu campo comigo, por ter me recebido tão bem e por sempre me socorrer nas horas de desespero. Obrigada por ser a

melhor companheira de trabalho do mundo! Aos colegas do grupo #Genética da conservação, por terem me recebido tão bem e me ensinado as técnicas necessárias para execução desse trabalho, em especial a Alessandro, Dani França e Leiza, sempre tão receptivos e atenciosos comigo. Vocês foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Às minhas companheiras da vida e morada em Ilhéus, Damile e Jade, pela cumplicidade e apoio de todas as horas. Foi um presente dividir o lar, as alegrias e as angustias com vocês. Nossa amizade se fortaleceu ainda mais, e a nossa “Toca das Biólogas” sempre irá existir. Obrigada por tornar esses dois anos mais leves e felizes!

Ao meu querido amigo e vizinho peruano, Omar Rojas, pela ajuda nas análises estatísticas e nossas ótimas conversas em “portunhol” subindo a ladeira de casa. Foi um prazer te conhecer!

Aos administradores das fazendas por permitirem a realização desse trabalho em suas áreas e nos receber tão bem. Obrigada pelo apoio!

Ao professor Dr. Thomas Püttker e a professora Dr^a. Deborah Maria de Faria por aceitarem participar da banca examinadora e contribuir com o trabalho.

À Universidade Estadual de Santa Cruz pelo financiamento da pesquisa

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, por todo suporte fornecido.

Ao Laboratório de Vertebrados e ao Laboratório de Marcadores Moleculares pelo fornecimento dos equipamentos necessários para realização e obtenção dos dados dessa pesquisa.

Aos motoristas da UESC, pelo comprometimento em nos levar e trazer em segurança.

A todos meus sinceros agradecimentos!

PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-VOADORES E O CONSUMO DE CACAU EM AGROFLORESTAS NO SUL DA BAHIA

RESUMO

No sul da Bahia os danos causados por pequenos mamíferos em plantios agroflorestais de cacau são pouco estudados. A identificação das espécies causadoras de danos e avaliação da taxa de consumo são fundamentais para realizar medidas de controle que não afetem a biota nativa da região. O presente estudo avalia o consumo de cacau em cabucas por pequenos mamíferos não-voadores através da relação entre abundância de três espécies comuns e estimativas de danos, e da análise molecular para detectar DNA de cacau nas fezes de seis espécies deste grupo. O estudo foi desenvolvido a partir de coletas realizadas em cabucas na zona rural dos municípios de Ilhéus e Uruçuca, em uma paisagem típica da região cacauceira do sul da Bahia. Esta dissertação é composta por uma introdução geral, e dois capítulos em forma de artigo. No primeiro capítulo, intitulado “*Populations of small mammals and damage in the cacao fruits in agroforests in southern Bahia*”, nós analisamos alguns parâmetros populacionais de pequenos mamíferos abundantes nas cabucas, estimamos a taxa de danos nos frutos do cacau e testamos a associação da abundância destas espécies e os danos estimados. Para isso foi realizado uma campanha de captura de pequenos mamíferos com uso de armadilhas *live trap*, a partir da qual três espécies foram descritas por sua abundância, razão sexual e estrutura etária. Os danos no cacau foram monitorados por uma contagem mensal durante seis meses, e as estimativas de danos foram relacionadas a estas espécies de pequenos mamíferos. No segundo capítulo, intitulado “*Detecção molecular do consumo de cacau por pequenos mamíferos em agroflorestas no sul da Bahia*”, analisamos quais espécies de pequenos mamíferos são responsáveis pelo consumo de cacau através de análise molecular de suas fezes e relacionamos com o hábito locomotor e alimentar conhecidos na literatura. Nossos resultados demonstraram que o roedor *Rhipidomys mastacalis* é o principal causador de danos nos frutos do cacau. Esta espécie foi a única que apresentou relações positivas para o consumo de frutos verdes e maduros nos testes realizados, além de ter sido detectado presença de cacau na análise via reação em cadeia da polimerase. Seu hábito arborícola e dieta baseada na frugivoria/predação de sementes, nos mostra com maior confiança a relação desta espécie com o cacau. O marsupial *Marmosa murina* também apresentou resultados positivos quanto a presença de DNA de cacau nas fezes, porém a abundância desta espécie não foi relacionada com a taxa de danos aos frutos. A ausência desta relação, aliada ao fato de *M. murina* não possuir dentição adaptada para romper a casca do fruto e possuir dieta insetívora/onívora, sugere que o consumo do cacau se dá de forma mais oportunista para esta espécie, provavelmente se aproveitando de frutos já abertos.

Palavras-chave: Abundância. Consumo de cacau. DNA fecal. Marsupial. Roedor.

NON-VOLANT SMALL MAMMALS AND CACAO CONSUMPTION IN AGROFORESTS IN SOUTHERN BAHIA

ABSTRACT

In Southern Bahia, damage caused by small mammals in cacao agroforestry systems has been insufficiently researched. Identification of harmful species and consumption rates evaluation are fundamental to perform control measures that do not affect the native biota. The present study evaluates cacao consumption in cabruças by non-volant small mammals through the relationship among three common species abundance and damage estimation, as well as molecular analysis to detect cacao DNA in feces of six species of this group. The research was developed from collections in cabruças in the rural region of Ilhéus and Uruçuca, in a typical landscape of the cacao region in southern Bahia. This dissertation is compounded by a general introduction and two chapters written in an article shape. In the first chapter, “*Populations of small mammals and damage in the cacao fruits in agroforests in southern Bahia*”, we analyzed population parameters of small mammals abundant in cabruças, estimating damage rates in cacao fruits and tested the association of these species abundance and estimated damage. For this purpose, a campaign to capture small mammals was conducted using live traps, from which, three species were described according to its abundance, sex ratio and age structure. Cacao damage was monitored in a monthly count during six months, and damage estimative was related to those small mammals’ species. In the second chapter, entitled “*Deteção molecular do consumo de cacau por pequenos mamíferos em agroflorestas no sul da Bahia*”, we analyzed which species of small mammals are responsible for cacao consumption after a molecular analysis of its feces and correlated the results with locomotor and feeding habits previously known. Our results show that the rodent *Rhipidomys mastacalis* is the main cause of cacao fruit damage. This species was the only one showing positive relation in mature and immature fruit consumption, besides the detection of cacao in the molecular analysis. Its arboreal habit and diet based on fruits and seed predation inspire greater confidence about the relation among this species and cacao tree. The marsupial *Marmosa murina* also showed positive results about the presence of cacao DNA in feces, however, the abundance of this species was not related to damage rates. The lack of this relation associated to the fact that *M. murina* does not have adapted dentition to break the fruit peel and has an insectivorous/omnivorous diet, suggest that this species consume cacao opportunistically, probably taking advantage of already opened fruits.

Key-words: Abundance. Cacao consumption. Fecal DNA. Marsupial. Rodent.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: “Populations of small mammals and damage in the cacao fruits in agroforests in southern Bahia”

Figure 1: Map of the study area with location of sample sites.....28

Figure 2: Fruit development stages: (A) “Birro”; (B) Immature; (C) Mature and (D) Dry.....31

Figure 3: Most common small mammal species in the sampling sites: a) *Rhipidomys mastacalis*; b) *Hylaeamys seuanezi*; c) *Marmosa murina*.....32

Figura 4: (A) Beginning of the gnawing process; (B) perforation of the fruit; (C) cacao seed on the ground.....34

Figura 5: Relation among the percentage of the consumed cacao fruits during three months of counting and the abundance of the three species of the most common small mammal species in nine cacao agroforests in the South of Bahia.....36

Figure S1: Arrangement of traps in each sample site.....43

Figure S2: Relation among the percentage of cacao tree fruits consumed in six months and the abundance of the three most common species of small mammals in nine agroforests in the South of Bahia.....44

Figure S3: Small mammals poisoned in a cacao farm in Southern Bahia.....44

Capítulo II: “Detecção molecular do consumo de cacau por pequenos mamíferos em agroflorestas no sul da Bahia”

Figura 1: Figura 1: Animal preso na armadilha para coleta das fezes em estudo controle.....51

Figura 2: Padrão eletroforético obtido pela amplificação do DNA das amostras fecais.....54

LISTA DE TABELAS

Capítulo I: “Populations of small mammals and damage in the cacao fruits in agroforests in southern Bahia”

Table 1: Male and female numbers (mean, standard deviation, minimum and maximum) for the three most common small mammal species in the nine studied cacao agroforests.....33

Table 2: Age structure of the three most common small mammal species in the nine studied cacao agroforests.....33

Table 3: Number of consumed and intact fruits of each category per sampling site.....35

Table S1: Mean, standard deviation, minimum, maximum and total individuals of the three most abundant species in each sample site.....43

Capítulo II: “Detecção molecular do consumo de cacau por pequenos mamíferos em agroflorestas no sul da Bahia”

Tabela 1: Espécies capturadas para análise molecular de fezes caracterizadas quanto ao hábito de locomoção, dieta, número de amostras totais por espécie e número de amostras que apresentaram DNA de cacau na PCR.....54

Tabela S1: Espécies fruteiras utilizadas em teste para padronização de *primer* específico para o cacau.....60

Tabela S2: Resultado da amplificação das amostras de fezes.....61

SUMÁRIO

RESUMO _____	vii
ABSTRACT _____	viii
LISTA DE FIGURAS _____	ix
LISTA DE TABELAS _____	x
INTRODUÇÃO GERAL _____	13
Pequenos mamíferos: diversidade, ecologia e danos em sistemas produtivos	14
Identificação de espécies consumidoras _____	16
Objetivos e estrutura da dissertação _____	17
REFERÊNCIAS _____	18
CAPÍTULO I: POPULATIONS OF SMALL MAMMALS AND DAMAGE IN THE CACAO FRUITS IN AGROFORESTS IN SOUTHERN BAHIA _____	23
INTRODUCTION _____	27
METODOLOGY _____	28
Study area _____	28
Capture of small mammals _____	30
Consumption of cacao fruits by small mammals _____	31
Data Analysis _____	32
RESULTS _____	32
Population parameters _____	32
Fruit consumption _____	34
Relation among fruit consumption and abundance of small mammals _____	36
DISCUSSION _____	37
REFERENCES _____	40
ATTACHMENTS _____	44

CAPÍTULO II: DETECÇÃO MOLECULAR DO CONSUMO DE CACAU POR PEQUENOS MAMÍFEROS EM AGROFLORESTAS NO SUL DA BAHIA	46
INTRODUÇÃO	48
METODOLOGIA	50
Procedimentos em campo	50
Procedimentos em laboratório	52
RESULTADOS	54
DISCUSSÃO	56
REFERÊNCIAS	58
MATERIAL SUPLEMENTAR	61
CONCLUSÃO GERAL	65

INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica do sul da Bahia pode ser vista como um mosaico diversificado de ecossistemas e apresenta uma rica biodiversidade, com grande número de espécies endêmicas (SILVA; CASTELETTI, 2003). O centro de endemismo que ocupa o sul da Bahia e norte do Espírito Santo constitui a segunda região com maior percentual de cobertura vegetal mantida na Mata Atlântica (RIBEIRO et al., 2009). No entanto, parte desta região é na verdade coberta por sistemas agroflorestais, ocupando cerca de 6.370 km², constituindo uma das principais formas de uso do solo no litoral sul da Bahia (LANDAU, 2003).

Os sistemas agroflorestais são formas de uso da terra que envolvem a introdução ou preservação de árvores nativas ou plantas lenhosas em unidades de produção agrícola/animal, com objetivo de beneficiar o sistema produtivo econômica, ecológica e/ou socialmente (DANIEL, 1999; NAIR, 1993). Agroflorestas que conciliam espécies cultivadas comercialmente com uma grande diversidade de plantas lenhosas são sistemas simplificados quando comparados às florestas originais, mas podem abrigar grande parte da fauna e flora nativas (CASSANO et al., 2009; SMITH et al., 1996).

Nesses sistemas, algumas interações dirigidas por animais no habitat original são mantidas, a exemplo da predação de artrópodes por aves, morcegos e formigas (CASSANO et al., 2016; PHILPOTT et al., 2004). No entanto, novas interações podem se estabelecer, incluindo interações com espécies introduzidas, como os cultivares. Para as espécies cultivadas, tais interações podem ser benéficas e até fundamentais, como a polinização ou o controle de pragas. Em agroflorestas de cacau e café, por exemplo, o controle da abundância de insetos por aves e morcegos se reflete em maior produtividade das plantações (JOHNSON et al., 2009; MAAS; CLOUGH; TSCHARNTKE, 2013). Entretanto, as interações entre a fauna silvestre e cultivares também podem ser negativas, resultando em danos que podem reduzir a rentabilidade do sistema produtivo.

O sul da Bahia é responsável pela maior produção de cacau do Brasil, cultivado majoritariamente em sistemas agroflorestais (SAMBUICHI et al., 2012). Além da importância econômica, esses sistemas abrigam um grande número de espécies nativas, a exemplo dos pequenos mamíferos (MOURA, 1999; MOURA; CASSANO, 2003; PARDINI, 2004), grupo abordado na presente pesquisa.

Pequenos mamíferos: diversidade, ecologia e danos em sistemas produtivos

Os pequenos mamíferos não voadores, formado por roedores e marsupiais, constituem o grupo mais diversificado de mamíferos das florestas neotropicais (REIS et al., 2011). Cerca de 290 espécies são atualmente reconhecidas para o Brasil, sendo que destas, 120 espécies são encontradas na Mata Atlântica, e aproximadamente 73 são endêmicas deste bioma (PAGLIA et al., 2012). De acordo com Paglia e colaboradores (2012), os marsupiais (ordem Didelphimorphia) apresentam 55 espécies, que corresponde a 7,9% dos mamíferos brasileiros e os roedores (ordem Rodentia) apresentam aproximadamente 234 espécies, ou 34,7% dos mamíferos brasileiros, sendo esta a ordem de maior diversidade de mamíferos no Brasil e no mundo.

Variações no habitat em diferentes escalas espaciais e temporais podem alterar a abundância e a distribuição de pequenos mamíferos. Estas variações estão relacionadas a fatores como disponibilidade de abrigos, alimento, locais de nidificação, presença de parceiros, predadores e competidores (JENSEN; GRAY; HURST, 2003; MORRIS, 1987). Sistemas agroflorestais podem manter grande parte das espécies de pequenos mamíferos encontradas em florestas na mesma região, no entanto, as estruturas das comunidades tendem a ser distintas entre esses dois sistemas, uma vez que as espécies respondem diferentemente às alterações do habitat (PARDINI, 2004).

A análise das relações tróficas de comunidades pode ser de grande importância para a implementação de medidas que preservem a biodiversidade de ambientes tropicais (SOULÉ; SIMBERLOFF, 1986). Os pequenos mamíferos exercem um papel importante nos ecossistemas, atuando como predadores de sementes, invertebrados ou pequenos vertebrados (CÁCERES; MONTEIRO-FILHO, 2001; PINOTTI; NAXARA; PARDINI, 2011; VIEIRA; PAISE; MACHADO, 2006), presas para mamíferos maiores, aves e serpentes (BERNARDE; ABE, 2010; CÁCERES; MONTEIRO-FILHO, 2001; PARDIÑAS; TETA; FORTABAT, 2005), ou realizando a dispersão de sementes (CÁCERES; MONTEIRO-FILHO, 2007; VIEIRA; PAISE; MACHADO, 2006). Considerando que a predação e dispersão de sementes são fatores que influenciam a estrutura da vegetação e a dinâmica da comunidade de plantas em longo prazo, deve-se destacar os mamíferos terrestres como grandes responsáveis pela remoção de sementes e frutos no chão (PINTO; SANTOS; TABARELLI, 2009). Embora os mamíferos de médio a grande porte tenham maior desempenho na predação e dispersão de sementes (DEMATTIA; CURRAN; RATHCKE, 2004; PIMENTEL;

TABARELLI 2004), estudos comprovam que pequenos roedores também podem desempenhar esta função, inclusive sobre sementes consideravelmente grandes (DEMATTIA; CURRAN; RATHCKE, 2004; DIRZO; MENDOZA; ORTIZ, 2007; VIEIRA; PIZO; IZAR, 2003). Já os marsupiais não são descritos na literatura como grandes responsáveis pela dispersão de sementes. As espécies deste grupo podem ser responsáveis pela predação de sementes, e conseqüente controle de populações de plantas, porém tendem a ser mais generalistas, se alimentando de sementes de forma oportunista, sem necessariamente depender deste recurso (CÁCERES; LESSA, 2012).

Quando presentes em sistemas agrícolas, muitos animais podem gerar prejuízo econômico por causar danos na produção de alimentos, gerando conflitos com os seres humanos (JACINTO et al., 2007; PUTMAN; MOORE, 1998; RAO et al., 2002; SANTOS-NETO; GOMES, 2007). Os roedores de pequeno porte são exemplos de mamíferos que tem despertado atenção, pois algumas espécies possuem grande capacidade de adaptação aos ambientes antropizados e elevada abundância mesmo em regiões onde originalmente não existiam (UMETSU; PARDINI, 2007). Alguns trabalhos já realizados destacam espécies de roedores que podem ser consideradas pragas em cultivos agrícolas, tais como: *Mastomys natalensis* ao milho na Tanzânia (MWANJABE; SIRIMA; LUSINGU, 2002), *Rattus rattus* causando danos em cultivos de macadâmia no Havaí e cana-de-açúcar na Flórida (LEFEBVRE et al., 1989; TOBIN; KOEHLER; SUGIHARA, 1997), e *Rattus argentiventer* em plantações de arroz na Indonésia (SINGLETON et al., 2005).

Espécies animais são consideradas pragas quando produzem dano econômico elevado às culturas comerciais, sendo necessário medidas de controle (SILVEIRA NETO et al., 1976 apud ANDREIV, 2002). Para que um organismo seja considerado uma praga é necessário, portanto, que exista uma quantificação das perdas em decorrência dos danos (PICINATTO FILHO, 2014). Em agroflorestas de cacau no sul da Bahia estudos sugerem que pequenos mamíferos podem estar relacionados com o consumo dos frutos do cacauzeiro, tornando essas espécies indesejáveis por causar danos à produção (CRUZ, 1983; ENCARNAÇÃO, 2001; LOBÃO; NOGUEIRA-FILHO, 2011), no entanto não há estudos que de fato comprovem prejuízos econômicos causados por esses animais ou que identifiquem as espécies responsáveis por tais danos.

Identificação de espécies consumidoras

Os roedores estão entre os maiores responsáveis por danos aos cultivos agrícolas em todo o mundo (MULUNGU et al., 2003; SINGLETON et al., 2005). Alguns estudos relacionaram os danos gerados na produção dos alimentos com a abundância desses animais (LEFEBVRE et al., 1989; MULUNGU et al., 2003) demonstrando que quando maior a população de roedores, maior os prejuízos causados. Desta forma, relacionar os danos com as espécies abundantes existentes nos sistemas produtivos pode ser uma forma de identificar espécies consumidoras.

Outra forma de identificar as espécies causadoras de dano consiste na análise da dieta. Este tipo de estudo permite avaliar a diversidade e preferência de alimentos de determinada espécie, além de estimar os impactos que estas espécies podem gerar na vegetação ou em outras populações animais (CORTÉS et al., 2002). Alguns métodos são utilizados para estudos de conhecimento de hábitos alimentares, dentre eles a identificação visual do conteúdo estomacal ou fecal. A análise de conteúdo estomacal permite que os itens alimentares sejam identificados mais inteiros do que a análise de fezes, uma vez que são coletados antes de passarem pelo intestino. Usando esta metodologia, vários estudos identificaram o tipo e percentual de itens consumidos pelos animais como artrópodes em estágios larval e adultos, material vegetal como partes de caule, sementes, folhas, fragmentos de frutos, obtendo dados para o agrupamento das espécies em guildas tróficas e/ou análise da variação sazonal na dieta (CASELLA; CÁCERES, 2006; NOBLECILLA; PACHECO, 2012; TALAMONI et al., 2008).

Já a análise visual das fezes permite identificar principalmente estruturas mais rígidas, como fragmentos de ossos de vertebrados ou exoesqueleto de insetos, fragmentos de folhas ou caules e sementes intactas (GIANNONI et al., 2005; PINHEIRO et al., 2002; POLOP et al., 2015; SAHLEY et al., 2015). A análise das fezes apresenta vantagens metodológicas por ser um método menos invasivo, uma vez que a coleta de conteúdo estomacal deve envolver lavagem da parte anterior do trato digestivo ou sacrifício do animal. Contudo, muitas vezes o material fecal não pode ser identificado por meio de técnicas visuais, a exemplo de morcegos hematófagos (BOBROWIEC, 2007) ou espécies frugívoras que se alimentam apenas da polpa ou degradam as sementes que passam por seu trato digestivo (NOGUEIRA; PERACCHI, 2003).

Nas últimas décadas, vem se desenvolvendo novas formas de estudos de dieta baseados em métodos de análise de DNA fecal, podendo ser bastante úteis por ser um método não invasivo, sem danos ao animal estudado (SYMONDSON, 2002). No entanto, para que haja uma boa detecção molecular do conteúdo fecal é importante que o material não esteja muito degradado, uma vez que pode influenciar o tamanho dos fragmentos de DNA que serão amplificados (DEAGLE et al., 2005). Para realização deste tipo de estudo são desenvolvidos pares de iniciadores (“*primers*”) específicos que amplificam uma determinada região do DNA da espécie que se quer identificar, possibilitando assim a identificação das espécies consumidas (HARPER et al., 2005; SHEPPARD; HARWOOD, 2005).

Objetivos e estrutura da dissertação

As agroflorestas de cacau do sul da Bahia possuem grande importância econômica e ambiental, particularmente para a conservação de biodiversidade. Entre os grupos animais mantidos nestes agroecossistemas, destacam-se os pequenos mamíferos, com comunidades ricas e abundantes. Uma vez que o consumo do cacau por espécies nativas pode gerar conflitos entre as funções de produção e conservação, é necessário que hajam pesquisas que investiguem os efeitos das populações deste grupo na produção agrícola. Este trabalho tem como objetivo analisar parâmetros populacionais de pequenos mamíferos comuns em sistemas agroflorestais, avaliar a existência de relação entre a abundância dessas espécies comuns e o consumo de frutos e verificar quais espécies presentes nas agroflorestas consomem o fruto do cacau.

A presente dissertação está dividida em dois capítulos: o primeiro capítulo intitulado “*Populations of small mammals and damage in the cacao fruits in agroforests in southern Bahia*”, que tem como objetivos (1) Caracterizar as populações (abundância, razão sexual, distribuição etária) das espécies de pequenos mamíferos mais comuns nas agroflorestas; (2) quantificar a taxa de frutos dos cacauzeiros com danos causados por pequenos mamíferos; (3) testar a associação entre taxa de frutos danificados e abundância das espécies mais comuns de pequenos mamíferos nas agroflorestas. O segundo capítulo intitulado “*Detecção molecular do consumo de cacau por pequenos mamíferos em agroflorestas no sul da Bahia*”, tem como objetivo verificar a presença de DNA do cacau nas fezes dos pequenos mamíferos como forma alternativa de identificar quais espécies consomem os frutos do cacauzeiro.

REFERÊNCIAS

- ANDREIV, J. **Danos causados por roedores em povoamentos de pinus e técnicas de redução de danos**. 2002. 85 f. (Dissertação) Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.
- BERNARDE, P.S.; ABE, A.S. Hábitos alimentares de serpentes em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1, p. 167-173, 2010.
- BOBROWIEC, P.E.D. **Caracterização molecular da dieta do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Mammalia: Chiroptera) na Amazônia brasileira**. 2007. 101 f. (Tese) Doutorado. Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. INPA/UFAM. Manaus, 2007.
- CÁCERES, N.C.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Food habits, home range and activity of *Didelphis aurita* (Mammalia, Marsupialia) in a forest fragment of southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 36, n. 2, p. 85-92, 2001.
- CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Germination in seed species ingested by opossums: implications for seed dispersal and forest conservation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 6, p. 921-928, 2007.
- CÁCERES, N. C.; LESSA, L. G. O papel de marsupiais na dispersão de sementes. In: **Os marsupiais do Brasil: Biologia, Ecologia e Conservação**. CÁCERES, N. C. (org). Editora UFMS, Campo Grande – MS, 2012.
- CASSANO, C.R. et al. Landscape and farm scale management to enhance biodiversity conservation in the cocoa producing region of southern Bahia, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v, 18, p. 577–603, 2009.
- CASSANO, C.R. et al. Bat and bird exclusion but not shade cover influence arthropod abundance and cocoa leaf consumption in agroforestry landscape in northeast Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v., 232, p. 247–253, 2016.
- CASELLA, J.; CÁCERES N.C. Diet of Four Small Mammal Species from Atlantic Forest Patches in South Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 1, n. 1, p. 5–11, 2006.
- CORTÉS, A. et al. Hábitos alimenticios de *Lagidium viscacia* y *Abrocoma cinerea*: roedores sintópicos en ambientes alto andinos del norte de Chile. **Rev. chil. hist. nat.**, v.75, n.3, p. 583-593, 2002.
- CRUZ, P. F. N. DA. Ocorrência e avaliação de danos causados por roedores, praga do cacauero na Bahia, Brasil. **Theobroma**, p. 59–60, 1983.
- DANIEL, O.; COUTO, L.; GARCIA, R.; PASSOS, C.A.M. Proposta para padronização da terminologia empregada em sistemas agroflorestais no Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v.23, n.3, p.367-370, 1999
- DEAGLE B.E. et al. Genetic screening for prey in the gut contents from a giant squid (*Architeuthis* sp.). **Journal of Heredity**, v. 96, p. 417–423, 2005.

DEMATTIA, E. A.; CURRAN, L. M.; RATHCKE, B. J. Effects of small rodents and large mammals on neotropical seeds. **Ecology**, v. 85, n. 2161-2170, 2004.

DIRZO, R.; MENDOZA, E.; ORTIZ, P. Effects of Differential Mammalian Defaunation on Seed Predation Patterns in a Mexican Tropical Rain Forest. **Biotropica**, v. 39, p. 355–362, 2007

ENCARNAÇÃO, A. M. V. **Ocupação temporal e espacial e aspectos da predação de frutos do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) por pequenos mamíferos (Mammalia) em cacauais e mata atlântica no sudeste da Bahia.** 2001. 141. f. (Dissertação) Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional. Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, 2001.

GIANNONI, S.M. et al. Main food categories in diets of Sigmodontine Rodents in The Monte (Argentina). **Mastozoología Neotropical**, v. 12(2), p. 181-187, 2005.

HARPER, G.L. et al. Rapid screening of invertebrate predators for multiple prey DNA targets. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 819–828, 2005.

JACINTO, J. C. et al. Dano em um cultivo de sorgo (*Sorghum bicolor*) causado por aves. **VIII Congresso de Ecologia do Brasil.** Sociedade de Ecologia do Brasil. Caxambu, Minas Gerais, Brasil. Setembro, 2007.

JENSEN, S.P.; GRAY, S.J.; HURST, J.L. How does habitat structure affect activity and use of space among house mice? **Animal Behaviour**, v. 66, p. 239–250, 2003.

JOHNSON, M.D. et al. Effects of shade and bird exclusion on arthropods and leaf damage on coffee farms in Jamaica's Blue Mountains. **Agroforestry Systems**, v. 76, p. 139–148, 2009.

LANDAU, E. C. Padrões de ocupação espacial da paisagem na Mata Atlântica do sudeste da Bahia, Brasil. In: **Corredor de Biodiversidade da Mata Atlântica do Sul da Bahia.** Instituto de Estudos Sócio-Ambientais do Sul da Bahia e Conservation International do Brasil, 2003

LEFEBVRE, L.W.; ENGEMAN, R.M.; DECKER, D.G.; HOLLER, N.R. Relationship of roof rat population indices with damage to sugarcane. **Wildlife Soc.**, v. 17, p. 41–45, 1989.

LOBÃO É.S.P.; NOGUEIRA-FILHO S.L.G. Human-wildlife Conflicts in the Brazilian Atlantic Forest. **Suiform Soundings**, v. 10, n. 2, 2011.

MAAS, B.; CLOUGH, Y.; TSCHARNTKE, T. Bats and birds increase crop yield in tropical agroforestry landscapes. **Ecology Letters**, v.16, p. 1480–1487, 2013.

MORRIS, D.W. Ecological Scale and Habitat Use. **Ecology**, v. 68, p. 362–369, 1987.

MOURA, R. T. **Análise comparativa da estrutura de comunidades de pequenos mamíferos em remanescente de Mata Atlântica e em plantio de cacau em sistema de cabruca no sul da Bahia.** 1999. 67. f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

- MOURA, R. T. DE; C. R. CASSANO. Mamíferos em sistemas produtivos de cultura permanente no entorno da reserva biológica de Una, Bahia. **Não publicado** (Instituto de Estudos Sócio-Ambientais do Sul da Bahia e Conservation International Brasil), Ilhéus-BA. 2003.
- MULUNGU, L.S. et al. The rodent density–damage function in maize fields at an early growth stage. 2003.
- MWANJABE, P.S.; SIRIMA, F.B.; LUSINGU, J. Crop losses due to outbreaks of *Mastomys natalensis* (Smith, 1834) Muridae, Rodentia, in the Lindi Region of Tanzania. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 49, p. 133–137, 2002.
- NAIR, P. K. Classification of agroforestry systems. An introduction to agroforestry. 1993.
- NOBLECILLA, M. C.; PACHECO, V. Dieta de roedores sigmodontinos (Cricetidae) en los bosques montanos tropicales de Huánuco, Perú. **Rev. peru. biol.**, v. 19(3), n. 3, p. 33–318, 2012.
- NOGUEIRA, M.R.; PERACCHI, A.L. Fig-seed predation by two species of Chiroderma: discovery of a new feeding strategy in bats. **Journal of Mammalogy**, v. 84, p. 225–233, 2003.
- PAGLIA, A.P. et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. 2ª Edição. **Conservation International**, Arlington, VA., v. 6, p. 76, 2012.
- PARDIÑAS, U.; TETA, P.; FORTABAT, S.H. Vertebrate prey of the barn owl (*Tyto alba*) in subtropical wetlands of northeastern Argentina and eastern Paraguay. **Journal of raptor research**, v. 39, n. 1, p. 65-69, 2005.
- PARDINI, R. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. **Biodiversity and Conservation**, v. 13, p. 2567–2586, 2004.
- PHILPOTT, S.M. et al. Impacts of major predators on tropical agroforest arthropods: comparisons within and across taxa. **Oecologia**, v. 140, p. 140–149, 2004.
- PICINATTO FILHO, V. **Avaliação de danos causados por roedores silvestres em Pinus taeda L. como subsídio ao manejo de pragas florestais**. 2014. 81 f. (Dissertação) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages, 2014.
- PIMENTEL, D. S.; TABARELLI, M. Seed dispersal of the palm *Attalea oleifera* in a remnant of the Brazilian Atlantic forest. **Biotropica**, v. 36, p. 74-84, 2004.
- PINHEIRO, P.S. et al. Diet of the Marsupial *Micoureus demerarae* in Small Fragments of Atlantic Forest in Southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment.**, v. 37, n. 3, p. 213–218, 2002.
- PINTO, S. R. R.; SANTOS, A. M. M.; TABARELLI, M. Seed predation by rodents and safe sites for large seeded trees in a fragment of the Brazilian Atlantic forest. **Brazilian Journal of Biology**, v. 6, p. 763-77, 2009.

- PINOTTI, B.T.; L. NAXARA & R. PARDINI. Diet and food selection by small mammals in an old-growth Atlantic forest of south-eastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 46, n. 1, p. 1-9, 2011.
- POLOP, F. et al. Estructura de la dieta de roedores sigmodontinos en arbustales del ecotono bosque-estepa del suroeste de Argentina. **Mastozoología Neotropical**, v. 22, n. 1, p. 85-95, 2015.
- PUTMAN, R.J.; MOORE, N.P. Impact of deer in lowland Britain on agriculture, forestry and conservation habitats. **Mammal Rev.**, v. 28, p. 141– 164, 1998.
- RAO, K.S., et al. Crop damage and livestock depredation by wildlife: a case study from Nanda Devi Biosphere Reserve, India. **Environmental Management**, v. 66, p. 317–327, 2002.
- REIS, N.R. et al. Sobre os mamíferos do Brasil. In: REIS, N.R. et al. **Mamíferos do Brasil**. 2. ed. Londrina, p.23-29, 2011.
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed. Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.
- SAHLEY, C.T. et al. Diet of a sigmodontine rodent assemblage in a Peruvian montane forest. **Journal of Mammalogy**, v. 96, n. 5, p. 1071-1080, 2015.
- SAMBUICHI, R.H.R. et al. Cabruca agroforests in Southern Bahia, Brazil: tree components, management practices and tree species conservation. **Biodiversity Conservation**, 2012.
- SANTOS-NETO, J.R. DOS; GOMES D.M. Predação de milho por arara-azul-de-Lear, *Anodorhynchus leari* (Bonaparte, 1856) (Aves: Psittacidae) em sua área de ocorrência no Sertão da Bahia. **Ornithologia**, v. 2, n. 1, p. 41-46, 2007.
- SHEPPARD, S.K.; HARWOOD, J.D. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator–prey food-webs. **Functional Ecology**, v. 19, p. 751-762, 2005.
- SILVA, J. M. C.; CASTELETTI, C. H. M. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Center for Applied Biodiversity Science and Island Press. Washington, D.C. p. 43-59. 2003.
- SILVEIRA NETO, S et al. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 419 p., 1976.
- SINGLETON, G.R.; SUDARMAJI; JACOB, J.; KREBS, C.J. Integrated management to reduce rodent damage to lowland rice crops in Indonesia. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 107, n. 1, p. 75-82, 2005.
- SMITH, N. J. H. et al. Agroforestry trajectories among small holders in the Brasília Amazon: innovation and resiliency in pioneer and older settled areas. **Ecological Economics**, v. 18, p. 15- 27, 1996.

SOULÉ, M. E.; SIMBERLOFF, D. What do genetics and ecology tell us about the design of nature reserves? **Biological Conservation**, v. 35, p. 19-40, 1986.

SYMONDSON, W.O.C. Molecular identification of prey in predator diets. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 627-641, 2002.

TALAMONI, S. A. et al. Diet of some species of Neotropical small mammals. **Mammalian Biology**, v. 73, p. 337-341, 2008.

TOBIN, M.E.; KOEHLER, A.E.; SUGIHARA, R.T. Effects of simulated rat damage on yields of macadamia trees. **Crop Prot.**, v. 16, p. 203-208, 1997.

UMETSU F.; PARDINI R. Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats-evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. **Landscape Ecology**, v. 22, p. 517-530, 2007.

VIEIRA, E. M.; PIZO, M. A.; IZAR, P. Fruit and seed exploitation by small rodents of the Brazilian Atlantic forest. **Mammalia**, v. 67, n. 4, p. 533-539, 2003.

VIEIRA, E.M.; PAISE, G.; MACHADO, P.H. Feeding of small rodents on seeds and fruits: a comparative analysis of three species of rodents of the Araucaria Forest, southern Brazil. **Acta theriologica**, v. 51, n. 3, p. 311-318, 2006.

**CAPÍTULO I: POPULATIONS OF SMALL MAMMALS AND DAMAGE IN
THE CACAO FRUITS IN AGROFORESTS IN SOUTHERN BAHIA**



(Manuscrito a ser submetido à revista “Agriculture, Ecosystems and Environment”)

**POPULATIONS OF SMALL MAMMALS AND DAMAGE IN THE CACAO
FRUITS IN AGROFORESTS IN SOUTHERN BAHIA.**

Vanessa Araújo Rios¹, Camila Righetto Cassano^{2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Prof. Soane Nazaré de Andrade, Km 16 – Rodovia Jorge Amado, Ilhéus, BA 45662-900, Brazil

²Laboratório de Ecologia Aplicada à Conservação, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Prof. Soane Nazaré de Andrade, Km 16 – Rodovia Jorge Amado, Ilhéus, BA 45662-900, Brazil. *Autor correspondente: e-mail: cassanocami@hotmail.com.

ABSTRACT

Small mammals interfere in plant dynamics through seed and seedling predation as well as seed dispersion, thereby playing an important role in natural ecosystems. In anthropic systems, some species provide desirable ecosystem services while others are considered pests. The vegetation cover of the southern region of Bahia state, Brazil, is mainly formed by native forest remnants interspersed with cacao agroforests. While these agroforests provide important resources for small mammals (rodents and marsupials), some studies suggest that some species can cause eventual damage to agricultural production. However, detailed knowledge on the quantity of damage caused by rodents as well as on the relationship between abundance of small mammals and quantity of damage are missing. This work aimed to estimate the amount of damage in cacao fruits, estimate population parameters of common small mammals in cacao agroforests, and test for correlation of species abundance and estimated damage. The study was developed in nine agroforests in Ilhéus and Uruçuca, Bahia. We estimated the consumption of cacao fruits by counting the total number of fruits and damaged fruits, considering four categories: birro, immature, mature and dry. We estimated the abundance, sex ratio and age structure of the three most common species: *Rhipidomys mastacalis*, *Hylaeamys seuanezi* and *Marmosa murina*. The total abundances of *R. mastacalis*, *H. seuanezi* and *M. murina* were 266, 136 and 80 individuals, respectively. The sex ratio was close to 1:1 for the three species, and the majority of the captured individuals were classified as adults. We found a positive association between fruit consumption and species abundance only for *R. mastacalis* and the categories of mature and immature fruits. The results of our study show that this rodent species is the main

responsible for the observed damages of cacao fruits in agroforests in the South of Bahia.

Key words: Abundance. Cabruca. Fruit consumption. Marsupial. Rodents.

RESUMO

Pequenos mamíferos interferem na dinâmica das plantas pela predação de sementes e plântulas e pela dispersão de sementes, tendo um papel importante nos ecossistemas. Nos sistemas antrópicos, algumas espécies podem desempenhar funções desejáveis enquanto outras são consideradas pragas. A região sul da Bahia possui uma cobertura vegetal formada por remanescentes florestais intercalados a cabruças. Estudos já realizados nesta região apresentam as cabruças como importantes fontes de recurso e habitat para espécies de pequenos mamíferos terrestres e sugerem que algumas espécies podem interagir com o cacau, causando eventuais danos à produção agrícola. Este trabalho tem como objetivo analisar parâmetros populacionais de pequenos mamíferos abundantes nas cabruças, estimar a taxa de danos em frutos de cacau e testar a associação da abundância destas espécies e os danos estimados. O estudo foi desenvolvido em nove cabruças, nos municípios de Ilhéus e Uruçuca, BA. Foram estimadas as abundâncias, razão sexual e estrutura etária das três espécies mais comuns: *Rhipidomys mastacalis*, *Hylaeamys seanezi* e *Marmosa murina*. O consumo de frutos de cacau foi estimado a partir da contagem de frutos total e com danos causados por pequenos mamíferos, considerando-se quatro categorias: birro, verde, maduro e seco. As abundâncias observadas de *R. mastacalis*, *H. seanezi* e *M. murina* foram 266, 136 e 80, respectivamente. A razão sexual foi próxima de 1:1 para as três espécies e a maioria dos indivíduos capturados foram classificados como adultos. A relação entre o consumo de frutos e a abundância das três espécies foi significativa apenas para *R. mastacalis*, nas categorias de frutos maduros e verdes. Os resultados desse estudo indicam que esta espécie de roedor é a principal consumidora dos frutos de cacau em cabruças no sul da Bahia.

Palavras-chave: Abundância. Cabruca. Consumo de frutos. Marsupial. Roedor.

INTRODUCTION

Plant-animal interactions are fundamental for maintaining the integrity of communities, once the reproductive success of several plant species is related to ecological functions performed by animals (e.g. Jordano et al., 2006). In tropical forests, most part of the arboreal species produce fleshy fruits adapted to consumption and seed dispersion by animals (Hower, 1984). Many arboreal mammals, birds and bats remove fruits and seeds directly from the trees, while terrestrial species usually consume these resources on the ground (Pinto et al., 2009).

Small mammals, a group formed by rodents and marsupials, are considered good environmental indicators because they respond rapidly to habitat changes (Pardini and Umetsu, 2006). This group is represented by arboreal, terrestrial, scansorial and semiaquatic species and influences the dynamics of plants via predation on seeds and seedlings as well as by seed dispersion (DeMattia et al., 2004; Pinto et al., 2009; Soares et al., 2015; Vieira et al., 2003), playing thereby an important role in natural ecosystems. In anthropic systems, some species can provide desirable functions, while others are considered pests or are potential disease reservoirs, causing losses to the agricultural production and/or might pose threats to health of livestock or humans (Bonecker et al., 2009; Brown et al., 2007; Singleton et al., 2005).

Agroforestry systems are practices that combine perennial wood species with agricultural cultivars and/or animals in different spatial or temporal arrays (Nair, 1993). In some regions, these systems can be important in maintaining part of the native vegetation mosaic, becoming an auxiliary instrument in wildlife conservation (Clough et al., 2009; Sambuichi, 2002; Schroth et al., 2004). Some agroforests are inhabited by a considerable amount of native species, acting as ecological corridors and/or permanent habitat (Cassano et al., 2009; Faria et al., 2007; Perfecto and Vandermeer, 2008).

Large parts of the southern region of Bahia is occupied by cacao agroforest (*Theobroma cacao*), regionally recognized as cabruças, where cacao trees are cultivated under the shade of native or introduced trees (Rice and Greenberg, 2000; Sambuichi et al., 2012). Studies conducted in the last two decades in this region indicate a high diversity of small mammals inhabiting cabruças. The majority of these studies concentrate on the evaluation of richness and abundance, comparing the number of species and individuals between forests and cabruças (e.g. Encarnação, 2001; Moura, 1999; Pardini, 2004), or developing inventories to increase the knowledge about species

distribution (Geise and Pereira, 2008). All together, 14 of the 16 small mammal species recorded in forest remnants in the region were also detected in cabruças. Therefore, cabruças harbour similar numbers of species compared to forests, however the structure of small mammal communities differ between the two vegetation types. Specifically, some generalist species have been shown to benefit in the modified environments, becoming more abundant in cabruças, while forest dependent species exhibit an opposite pattern (Pardini, 2004). It has been shown that some of these generalist species might cause relevant damages to cacao fruits, with potential economic losses (Cruz, 1983; Encarnação, 2001; Lob o and Nogueira-Filho, 2011). *Rhipidomys mastacalis* (Cruz, 1983; Encarnação, 2001) and *Hylaeamys seuanezi* (synonymy to *Oryzomys laticeps*; (Lob o and Nogueira-Filho, 2011) have been indicated as the species responsible by fruit damage. However, evidence to support to these assertions is weak, as they are based solely on the observation of high abundance of these species in the cacao plantations, interviews, or on a single observation of cacao consumption by trapped individuals.

In the present work we characterized populations of the three most common small mammals species registered in nine cacao agroforests and the amount of damage caused to cacao fruits in these plantations. To evaluate if rodent abundance is related to the amount of damage in fruits, we tested for correlation between those variables. Among the three common species, two are arboreal (*R. mastacalis* and *Marmosa murina*), and one is strictly terrestrial (*Hylaeamys seuanezi*). Given the arboreal habit and the presence of large incisors, we hypothesized that the rodent *R. mastacalis* is the species that responsible for most of the cacao fruit damage. Thus, we expect the fruit damage to be only related to the abundance of this species.

METODOLOGY

Study area

This study was performed in nine rural properties located in the municipalities of Ilhéus and Uruçuca, in southern Bahia (central coordinates: 14 43'S, 39 12'W; Figure 1), in a landscape dominated by cacao agroforests and few native forest remnants. The climate of this region is tropical, type Af by the Köppen system, considered hot and humid, and there is no well-defined dry season (Mori et al., 1983). The annual precipitation varies from 1.200 to 1.800 mm and the annual average temperature varies

between 24° and 25°C (Mori et al., 1983). The original vegetation is the South Humid Forest of Bahia (Thomas, 2003), characterized for the presence of tall, broad-leaved and evergreen trees, with abundant populations of lianas, bromeliads and epiphytes.

The conservation of forest remnants in this region is highly influenced by the dominant agroforestry system. In cabruca systems, the cacao is grown under the thinned canopy of native trees, replacing understory plants (Sambuichi, 2006). Cabruca in southern Bahia show great levels of tree diversity. In a survey conducted in 16 cabruca located in 13 municipalities in this region, with an area of 1 ha in each plantation, 216 arboreal species were found and most part of the individuals and species were native trees (Sambuichi et al., 2012).

In Bahia, cacao is harvested in two periods: the early harvest, which starts in April and runs through July, and the main harvest, which comprises the beginning of August until the end of March (Zugaib et al., 2015).

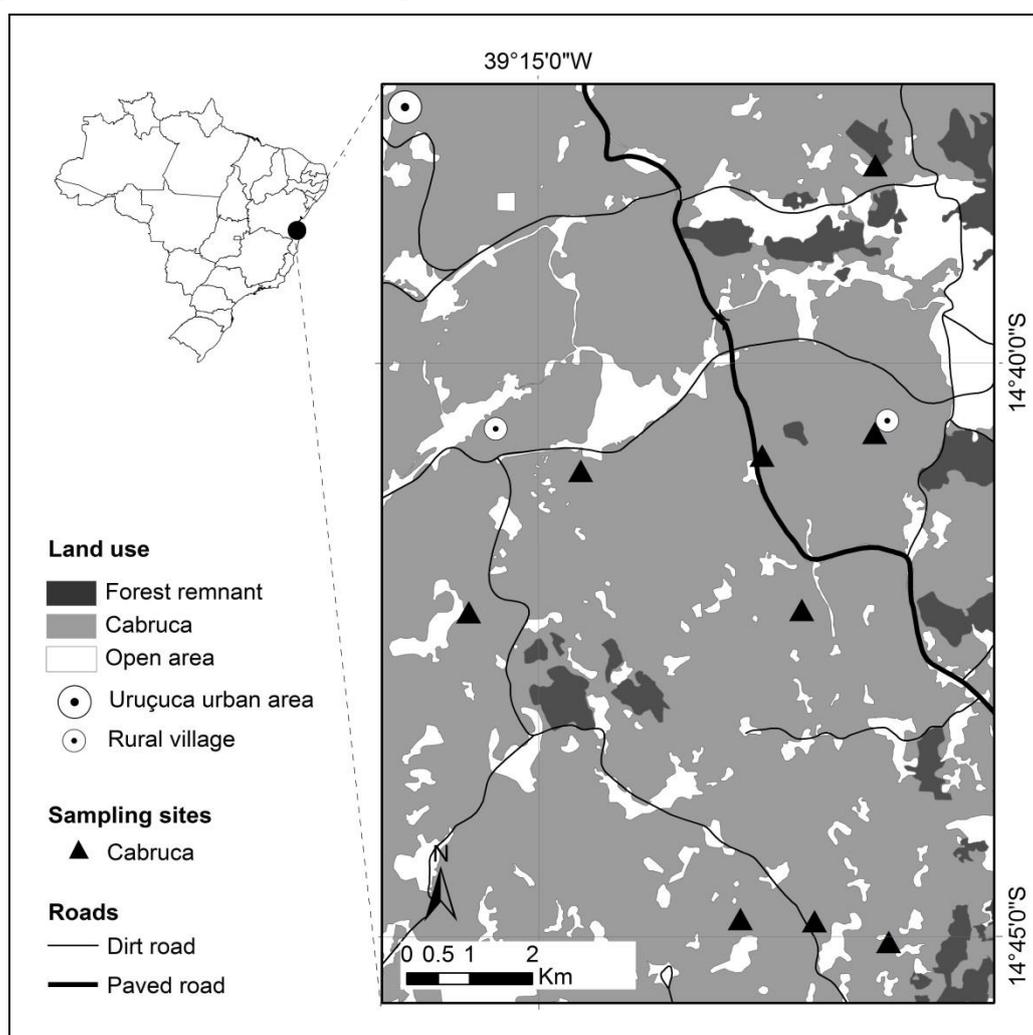


Figure 1: Map of the study area with location of sample sites.

Capture of small mammals

In each property we established a sampling site (grid of 100 x 100 m described below) inside a cabruca. Each grid consisted of four parallel linear transects of 100 m, equidistant 25 m. Within each of them, six capture stations were placed, at intervals of 20 m, totalizing 24 sampling stations. Each station was composed by two traps: *Sherman*® (30 x 9 x 8 cm) and *Tomahawk*® (45 x 16 x 16 cm) arranged on the ground and understory (0,5 to 1,5 m from the ground) alternately. The traps were prepared with a mixture of banana, corn meal, peanut, oat and sardine in the first day and every two days. Additionally to the trapping grids, at each sampling site, six pitfall traps were installed in a row, consisting of buckets of 60 l spaced 10 m apart and connected by a fence. The pitfall line was located 30 m distant from the border of the trapping grid to avoid interference between trap types (Figure S1). Captures of small mammals were performed in one campaign of seven consecutive nights at each sampling site during the months of July to September of 2016, which coincided with the rainy season and the beginning of cacao the main harvest season 2016/17. Three of the nine sites were sampled simultaneously, due to logistic issues and availability of traps which impeded simultaneous sampling at all nine sites. The sampling effort was 336 trap nights per site, totalizing 3024 trap nights, and 42 pitfall nights per site, totalizing 378 pitfall nights.

Each captured individual was marked with metallic earrings numbered and released near to the capture site. The species identification occurred in the field, following the specialized bibliography: Freitas and Silva (2005), Bonvicino et al. (2008), Cáceres (2012), Paglia et al. (2012), Reis et al. (2014). Individuals that were not identifiable were collected and deposited in the Alexandre Rodrigues Ferreira Mammal Collection of the State University of Santa Cruz (CMARF-UESC). For each animal, the following information was collected: type of trap, species, gender, development stage and biometric data. The development stage (infant, juvenile or adult) was evaluated according to body measurements, texture and coloring of the coat for rodents, and from the dentition through analysis of the pattern of eruption and wear of the molars for the marsupials.

Small mammals' capture was performed in conjunction with the study "Species diversity and resources used by non-flying small mammals in agroforests in the South of Bahia", authorized by CEUA (n°015/15) and SISBIO (n° 49238-1). The described

procedure was conducted together with the researchers of the aforementioned project, with no other intervention unless those authorized.

Consumption of cacao fruits by small mammals

The consumption of cacao fruits by small mammals was evaluated from the characterization of damage and count of damaged fruits in 23 to 48 cacao trees (DAP > 10 cm) at each sampling site. The individual cacao trees included in counting were selected based on the location of every second of the 24 sampling stations. At each station, up to four cacao trees were marked for fruit counting. Additional to the central tree of the station, the three closest cacao trees were selected within a radius of 5 m. In the absence of three other trees, we included only the trees (1 or 2) within this radius.

The total number of fruits and the number of damaged fruits were counted monthly during six months during the harvest period. The first count was performed concomitantly to the campaign to capture small mammals, posteriorly returning every month for a repeated count of intact and gnawed fruits in order to increase accuracy. The fruits were characterized according to the development stage: (A) “Birro” (immature fruits < 10 cm); (B) Immature; (C) Mature and (D) Dry (Figure 2). Dry and damaged fruits were removed after counting to avoid recounting. The repetition of the count was necessary in order to increase the accuracy of the data and testify the existence of fruits in different categories during the sampling. To avoid the harvest before fruit count, an agreement was made with the administrators of the rural properties for the harvest to happen after the monthly count.



Figure 2: Fruit development stages: (A) “Birro”; (B) Immature; (C) Mature and (D) Dry. Picture: Vanessa Rios.

Data Analysis

The populations of the three small mammal species (*Rhipidomys mastacalis*, *Hylaeamys seuanezi* and *Marmosa murina*) are described by their observed abundance, sex ratio (each site and total) and number of individual per age group (each site and total). The fruit damage is presented as the percentage of damaged fruits in relation to the total number of fruits per sampling site in the same category, considering the stages of development (“birro”, immature, mature and dry) and the period of six months of sampling.

A paired t test was conducted to evaluate if there are deviations for males or females in populations of the three analyzed species. Linear regressions were used to evaluate the relation between the percentage of damaged fruits in the categories immature, mature and dry and the abundance of each species. These analyses were performed in the program R, version 3.4.3 (R Core Team, 2017). Variations in small mammal populations can occur even in ecosystems with low climatic variation (Feliciano et al., 2002), as in our study area, what can affect the investigated relationships. For this reason, the linear regressions described above were conducted using fruit consumption data in the periods of three months (sampling month and the two subsequent months) and six months (sampling month and the five subsequent months), expecting that stronger associations between consumption and abundance may happen considering a shorter time interval.

RESULTS

Population parameters

The most abundant species was *Rhipidomys mastacalis* (N=266), followed by *Hylaeamys seuanezi* (N=136) and *Marmosa murina* (N=80) (Figure 3). These species were present in all areas, excepting *M. murina* that was not captured in one of the sampling sites. The number of individuals of the three species varied among sampling sites, with average and standard deviation of 29.5 ± 18.2 , 15.1 ± 10.2 , and 8.0 ± 4.5 for *R. mastacalis*, *H. seuanezi* and *M. murina*, respectively.



Figure 3: Most common small mammal species in the sampling sites: a) *Rhipidomys mastacalis*; b) *Hylaeamys seuanezi*; c) *Marmosa murina*. Pictures: Vanessa Rios and Adna Souza.

The sex ratio (male:female) was 1:0.7, 0.8:1 and 1:1 for *H. seuanezi*, *R. mastacalis*, and *M. murina*, respectively. The paired t-tests showed no difference between males and females mean abundances (*H. seuanezi*: $t = -1.08$, $p = 0.31$, *R. mastacalis*: $t = 1.48$, $p = 0.17$ and *M. murina* $t = 0.11$, $p = 0.91$) (Table 1).

Table 1: Male and female numbers (mean, standard deviation, minimum and maximum) for the three most common small mammal species in the nine studied cacao agroforests.

Species	Sex	Mean	SD	Min	Max	Total
<i>Hylaeamys seuanezi</i>	Male	6,7	5,3	2	18	61
	Female	4,6	4,0	1	12	42
	Undetermined*	3,6	2,9	0	8	33
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	Male	12,4	7,6	2	24	112
	Female	14,3	7,8	3	24	129
	Undetermined*	2,7	3,7	0	10	25
<i>Marmosa murina</i>	Male	4,0	2,8	0	10	36

Female	4,1	2,7	0	8	37
Undetermined*	0,7	0,9	0	2	7

*Individuals not identified by the gender.

All species showed greater amount of adult individuals, with intermediate quantities of juveniles and few or none infants (Table 2). Some individuals were classified as undetermined because it was not possible to define the category, between juvenile and adult.

Table 2: Age structure of the three most common small mammal species in the nine studied cacao agroforests.

Species	Age Category	Mean	SD	Min	Max	Total
<i>Hylaeamys seuanezi</i>	Adult	8,5	5,9	3	17	77
	Juvenile	3,2	2,1	0	6	29
	Infant	0,3	0,7	0	2	3
	Undetermined*	3,0	2,6	0	8	27
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	Adult	19,4	11,2	5	34	175
	Juvenile	5,8	6,2	0	19	53
	Infant	0,1	0,3	0	1	1
	Undetermined*	4,1	2,7	0	8	37
<i>Marmosa murina</i>	Adult	5,6	3,2	0	10	51
	Juvenile	0,8	1,3	0	4	8
	Infant	0	0	0	0	0
	Undetermined*	2,3	1,7	0	5	21

*Undetermined between juvenile and adult stage of development.

Fruit consumption

The pattern of marks observed in damaged fruits is characteristic of rodents. These animals begin the process of gnawing (Figure 4a), perforating the fruit (Figure 4b) and accessing the pulp and seed, which are afterwards disposed on the ground (Figure 4c). Marks suggesting opening by marsupial were not observed.



Figura 4: (A) Beginning of the gnawing process; (B) perforation of the fruit; (C) cacao seed on the ground. Pictures: Vanessa Rios and Elson Rios.

In total, 17,584 fruits were evaluated (including recounting of intact non-harvested fruits), from 339 cacao trees in six months of crop monitoring. The total number of fruits (including recounting) and the number of damaged fruits varied among the sampling sites and categories (Table 3). Dry fruits showed the highest percentage of damage (49% of fruits), followed by mature fruits (8%) and immatures (2%). Birros showed no considerable damage.

Table 3: Number of consumed and intact fruits of each category per sampling site.

Fruit	Fruit	Mean	SD	Min	Max	Total
--------------	--------------	-------------	-----------	------------	------------	--------------

category	condition						
Dry	Consumed	30,4	15,6	9	56	274	
	Intact	74,1	50,9	11	173	667	
Mature	Consumed	17,3	8,2	2	27	156	
	Intact	209,3	92,9	69	342	1884	
Immature	Consumed	16,5	18,6	1	59	149	
	Intact	940,7	499,1	152	1870	8467	
Birro	Consumed	0,6	1,3	0	3	6	
	Intact	664,5	480,5	80	1344	5981	

Relation among fruit consumption and abundance of small mammals

The abundance of the rodent *R. mastacalis*, showed positive relation with the damages to mature and immature on the three first months of sampling ($R = 0.43$, $p = 0.03$; $R = 0.55$, $p = 0.01$, respectively – Figure 5) as well as the consumption of immature fruits in six months of sampling ($R = 0.48$, $p = 0.02$ – Figure S2). All other relationships were non-significant (Figure 5; Figure S2).

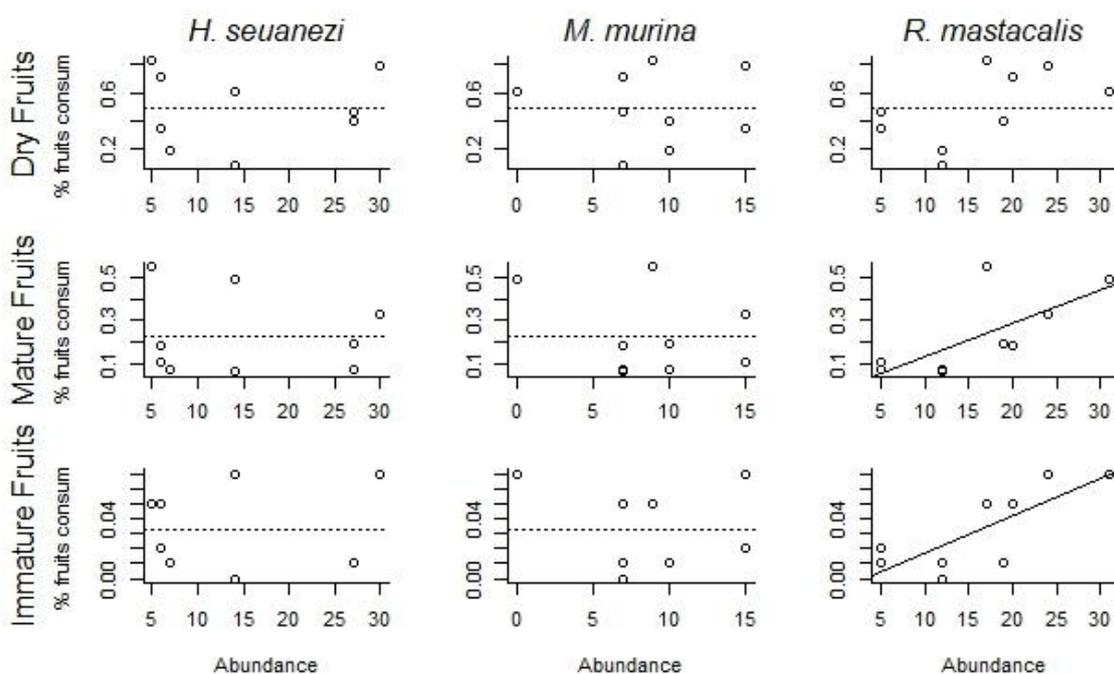


Figure 5: Relation among the percentage of the consumed cacao fruits during three months of counting and the abundance of the three species of the most common small mammal species in nine cacao agroforests in the South of Bahia.

DISCUSSION

The three most common species of our study are also common in other cabruças in southern Bahia, mainly *R. mastacalis* which stands out as the first or second most abundant species in other studies performed in these system and region (Moura, 1999; Moura and Cassano, 2003; Pardini, 2004). This species, as well as *M. murina*, are considered habitat generalists and their abundances tend to increase in agroforests and other disturbed environments (secondary forest and forest edges) when compared to mature forest (Moura, 1999; Pardini, 2004). Given the significant correlation between the abundance of *R. mastacalis* and the number of damaged fruits, it is likely that this species is responsible for the majority of fruit consumption in the study area. Thus, the elevated abundance of this species in cabruças may show relevant implications for this productive system. In the paragraphs below, we compare the small mammal population abundances and damage to cacao with data in the literature, in order to build an understanding of the advances and limitations of our results. Afterwards, we discuss the implications of the positive relation between damages found in the fruits and the abundance of *R. mastacalis* populations, as well as factors related to the abundance of this species in the cacao plantations.

Populations of small mammals can suffer temporal variation in the abundance and age structure, besides deviation on sex ratio. Population fluctuation tends to follow variations in the availability of resources, which are influenced by seasonal and supra-annual climatic conditions (Adler, 1998; Ferreira et al., 2016; Madsen et al., 2006; Rocha et al., 2017). Abundance of rodents and marsupials may rapidly vary along time, with some populations more than doubling in size in a few months (Ferreira et al., 2016; Gentile et al., 2000). D'Andrea and collaborators (2007) and Graipel and collaborators (2006) found that adults are predominant in marsupial populations of the Atlantic Forest during the whole year and juvenile occur only in a part of the year. Rodents can present continuous reproduction during the year; however, fluctuations along time are also observed (Bonecker et al., 2009; D'Andrea et al., 2007; Feliciano et al., 2002; Graipel et al., 2006). A work conducted in the Atlantic Forest demonstrated that *R. mastacalis* reproduce during dry and rainy periods (Oliveira et al., 2007). However, other studies in this biome evidenced seasonality in rodent reproduction, for example *Akodon montensis* (Oliveira et al., 2007) and *Nectomys squamipes* (Gentile et al., 2000) reproduce during the rainy season and *Bolomys lasiurus* (Feliciano et al., 2002) and *Akodon cursor* (Gentile et al., 2000) during the dry season. The sex ratio of the studied populations

follow the pattern observed in small Neotropical mammals that normally do not change from 1:1 (Gentile et al., 2012). On the other hand, some works registered deviations to one sex, normally tending to a majority of male individuals (Bonecker et al., 2009; D'Andrea et al., 2007; Graipel et al., 2006), which can be influenced by their exploratory behavior, increasing the chance of being captured by traps (Gentile et al., 2012).

Variation in the number of individuals and development stages can interfere in the energetic demand of populations and, consequently, in the amount of resource withdrawn from the environment. This rapid dynamics and large variability in the size of small mammal populations limit the association with rates of fruit consumption in periods that are distant from the population sampling. Thus, the described population abundance can be assumed with higher confidence as representative of the populations within the two subsequent months, which is coherent with the stronger associations among fruit consumption and abundance of *R. mastacalis* when considering only three months of fruit sampling.

The present study reveals a minimum percentage of 3.3% of consumed fruits by small mammals in a crop, which can be considered as a small impact to characterize a species as pest. However, this estimative is highly conservative, once the intact fruits were kept in the cacao shrubs and part of them was counted more than one time. On the other hand, Lobão and Nogueira-Filho (2011) described damage rates caused by cacao rats, identified as *Hylaeamys seuanezi* (synonymy to *Oryzomys laticeps*) by the authors, in about 10 to 20% in plantations of six municipalities in the southern region of Bahia. In this study, the authors estimate the damage and the responsible species from interviews with 27 rural owners and workers and do not clarify the methodology used in the species identification. The scarce information about cacao consumption by small mammals does not allow concluding the real economic importance of this type of damage. Encarnação (2011) attributed the damages, in about 30% in plantations, to *Rhipidomys macrurus*, however it is an incorrect identification of *Rhipidomys mastacalis*. According to Bonvicino et al. (2008), *R. macrurus* does not occur in the Atlantic Forest in southern Bahia, while *R. mastacalis* occurs in this region, especially in the cabucas. Additionally, these losses do not seem to be relevant in all harvest seasons. For example, in the year prior to this study, harvest of 2015-2016, several complaints about damage caused by rodents were heard, resulting in the poisoning of small mammals in one property (CRC, personal observation; Figure S3). The hypothesis

of *R. mastacalis* being the potential harmful species was corroborated by the positive relation between damage rate of immature and mature fruits and abundance of this species. Our study is the first to explain the damage caused by small mammals in cacao plantations by following cacao damages and estimating populations abundance in the same period. Previous studies attributed cacao damage to *R. mastacalis* based only on the fact that this arboreal species is abundant in cabruças (Cruz, 1983; Encarnação, 2001; Moura, 1999; Moura and Cassano, 2003) or through an experiment feeding an individual trapped with cacao in order to evidence the type of opening and damage caused in the fruit (Encarnação, 2001). In this last study, the author concluded that *R. mastacalis* is the harmful species because it perforated the fruit offered in the trap in a similar pattern as observed in damaged fruits found on the field, however without comparing to the patterns left by other species, and thereby leaving the possibility that opening patterns are similar among different rodent species.

Agroforestry systems promote highly diverse environments providing several resources to native species. In southern Bahia, exotic fruit trees were introduced in agroforests to increase cacao tree shading, such as the jackfruit tree (*Artocarpus heterophyllus*) and caj a tree (*Spondias mombin*), which composed 18% of the trees in 16 cabruças studied by Sambuichi and collaborators (2012). Besides shading, these trees also favor frugivorous species that inhabit this system, due to high and continuous resource availability (Oliveira et al., 2011). A recent study indicates that *R. mastacalis* is more abundant in cabruças, the vegetation structure of which is less complex despite the larger basal area of trees with a great part corresponding to jackfruit and caj a tree (27 a 48%) (Silva, 2017). In these areas, overall small mammals diversity tends to be lower. The conjunction of large resource availability and low interference of negative interactions may generate favorable conditions to maintain some large rodent populations, as observed elsewhere (e.g. Bonecker et al., 2009). In cabruças, studies of *R. mastacalis* ecology may assist the reduction of damage to cacao fruits when elucidating mechanisms responsible for their population dynamics.

Agroforestry systems are highly important for the conservation and maintenance of species in the cacao growing region of Bahia. Our study shows that some native species interact with the cacao shrub, gnawing its fruits and reducing cacao yield, even without predated the seeds. Cacao fruit damage can be relevant in some harvest seasons, however precise economic losses and variation among seasons are unknown. Even though other species can cause damage to cacao, *R. mastacalis* is apparently the

major responsible. This species seems to benefit itself from fruit abundance and agroforestry system complexity, which can reduce the pressure of negative interactions. Population monitoring and ecology studies of this species may facilitate the identification of controlling methods without damaging other species inhabiting this region, considered a hotspot for biodiversity conservation.

REFERENCES

- Adler, G.H., 1998. Impacts of Resource Abundance on Populations of a Tropical Forest Rodent. *Ecology* 79, 242–254.
- Bonecker, S.T., Portugal, L.G., Costa-Neto, S.F., Gentile, R., 2009. A long term study of small mammal populations in a Brazilian agricultural landscape. *Mamm. Biol.* 74, 467–477. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2009.05.010>
- Bonvicino, C.R., Oliveira, J. a De, D’Andrea, P., 2008. Guia dos roedores do Brasil , com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. *Biologia (Bratisl)*. 15, 120. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492003000600001>
- Brown, P.R., Huth, N.I., Banks, P.B., Singleton, G.R., 2007. Relationship between abundance of rodents and damage to agricultural crops. *Agric. Ecosyst. Environ.* 120, 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.10.016>
- Cáceres, N.C., 2012. Os Marsupiais do Brasil. *Biologia Ecologia e Conservação*, 2 ed. ed. Campo Grande - MS.
- Cassano, C.R., Schroth, G., Faria, D., Delabie, J.H.C., Bede, L., 2009. Landscape and farm scale management to enhance biodiversity conservation in the cocoa producing region of southern Bahia, Brazil. *Biodivers. Conserv.* 18, 577–603. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9526-x>
- Clough, Y., Faust, H., Tschardtke, T., 2009. Cacao boom and bust: sustainability of agroforests and opportunities for biodiversity conservation. *Conserv. Lett.* 2, 197–205. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2009.00072.x>
- Cruz, P.F.N. DA, 1983. Ocorrência e avaliação de danos causados por roedores, praga do cacauero na Bahia, Brasil. *Theobroma* 13, 59–60.
- D’Andrea, P., Gentile, R., Maroja, L., Fernandes, F., Coura, R., Cerqueira, R., 2007. Small mammal populations of an agroecosystem in the Atlantic Forest domain, southeastern Brazil. *Brazilian J. Biol.* 67, 179–186. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842007000100025>
- DeMattia, E.A., Curran, L.M., Ratheke, B.J., 2004. Effects of Small Rodents and Large Mammals on Neotropical Seeds. *Ecology* 85, 2161–2170.
- Encarnação, A.M. da, 2001. Ocupação temporal e espacial e aspectos da predação de frutos do cacauero (*Theobroma cacao* L.) por pequenos mamíferos (Mammalia) em cacauais e mata atlântica no sudeste da Bahia. Universidade Estadual de Santa

Cruz.

- Faria, D., Paciencia, M. L. B, Dixo, M., Laps, R. R., and Baumgarten, J. 2007. Ferns, frogs, lizards, birds and bats in forest fragments and shade cacao plantations in two contrasting landscape in the Atlantic forest, Brazil. *Biodivers. Conserv.* 16, 2335–2357.
- Feliciano, B.R., Fernandez, F.A.D.S., de Freitas, D., Figueiredo, M.D.S.L., 2002. Population dynamics of small rodents in a grassland between fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Mamm. Biol. - Zeitschrift für Säugetierkd.* 67, 304–314. <https://doi.org/10.1078/1616-5047-00045>
- Ferreira, M.S., Vieira, M.V., Cerqueira, R., Dickman, C.R., 2016. Seasonal dynamics with compensatory effects regulate populations of tropical forest marsupials : a 16-year study. *Oecologia* 182, 1095–1106. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3735-x>
- Freitas, M.A. de; Silva, T.F.S., 2005. Guia Ilustrado Mamíferos na Bahia: espécies continentais, USEB.
- Geise, L., Pereira, L.G., 2008. Rodents (Rodentia) and marsupials (Didelphimorphia) in the municipalities of Ilhéus and Pau Brasil, state of Bahia, Brazil. *Check List J. Species List. Distrib.* 4, 174–177.
- Gentile, R., Andrea, P.S.D., Cerqueira, R., Maroja, L.S., 2000. Population dynamics and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area : a five-year study. *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* 9, 1–9. [https://doi.org/0165-0521/00/3501-0001\\$15.00](https://doi.org/0165-0521/00/3501-0001$15.00)
- Gentile, R., Teixeira, B. R., Bergallo, H. G., 2012. Dinâmica populacional de marsupiais brasileiros. P. 311-326. In Cáceres, N.C.(eds.). *Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e evolução.* Edit. UFMS, Campo Grande.
- Graipel, M.E., Cherem, J.J., Monteiro-filho, E.L. a, Glock, L., 2006. Dinâmica Populacional De Marsupiais E Roedores No Parque Municipal Da Lagoa Do Peri, Ilha De Santa Catarina, Sul Do Brasil. *Mastozool. Neotrop.* 13, 31–49.
- Hower, H.F., 1984. Implications of Seed Dispersal by Animals for Tropical Reserve Management. *Biol. Conserv.* 30, 261–281.
- Jordano, P., Galetti, M., Pizo, M. a, Silva, W.R., 2006. Ligando frugivoria e dispersão de sementes à biologia da conservação. *Essências em Biol. da Conserv.* 5, 411–436.
- Lobão, E. de S.P., Nogueira-Filho, S.L.G., 2011. Human-wildlife Conflicts in the Brazilian Atlantic Forest. *Suiform Sound.* 10, 14–22. <https://doi.org/http://data.iucn.org/themes/ssc/sgs/pphsg/Suiform%20soundings/Suiform%20Soundings%2011%281%29.pdf>
- Madsen, T., Ujvari, B., Shine, R., Olsson, M., 2006. Rain, rats and pythons : Climate-driven population dynamics of predators and prey in tropical Australia. *Austral Ecol.* 31, 30–37. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2006.01540.x>

- Mori, S.A et al. 1983. Southern Bahian Moist forest. The New York Botanical Garden, 49, 155–232.
- Moura, R.T. De, 1999. Análise comparativa da estrutura da comunidade de pequenos mamíferos em remanescentes de Mata Atlântica e plantio de cacau em sistema de cabruca no Sul da Bahia. Inst. Ciências Biológicas.
- Moura, R.T. de, Cassano, C.R., 2003. Mamíferos em sistemas produtivos de cultura permanente no entorno da Reserva Biológica de Una, Bahia. Inst. Estud. Sócio-Ambientais do Sul da Bahia- IESB 36.
- Nair, P.K.R., 1993. An Introduction to Agroforestry.
- Oliveira, F.F.R., Nessim, R., Costa, L.P., Leite, Y.L.R., 2007. Small mammal ecology in an urban Atlantic forest fragment in southeastern Brazil. *Lundiana* 8, 27–34.
- Oliveira, L.C., Neves, L.G., Raboy, B.E., Dietz, J.M., 2011. Abundance of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) affects group characteristics and use of space by golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) in Cabruca agroforest. *Environ. Manage.* 48, 248–262. <https://doi.org/10.1007/s00267-010-9582-3>
- Paglia, A.P., Fonseca, G.A.B. da, Rylands, A.B., Herrmann, G., Aguiar, L.M.S., Chiarello, A.G., Leite, Y.L.R., Costa, L.P., Siciliano, S., Kierulff, M.C.M., Mendes, S.L., Mittermeier, R.A., Patton, J.L., 2012. Annotated checklist of Brazilian mammals 2ª Edição, Occasional Papers in Conservation Biology.
- Pardini, R., 2004. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. *Biodivers. Conserv.* 13, 2567–2586. <https://doi.org/10.1023/B:BIOC.0000048452.18878.2d>
- Pardini, R., Umetsu, F., 2006. Pequenos mamíferos não-voadores da Reserva Florestal do Morro Grande: distribuição das espécies e da diversidade em uma área de Mata Atlântica. *Biota Neotrop.* 6. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032006000200007>
- Perfecto, I., Vandermeer, J., 2008. Biodiversity conservation in tropical agroecosystems: A new conservation paradigm. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1134, 173–200. <https://doi.org/10.1196/annals.1439.011>
- Pinto, S.R.R., Santos, A.M.M., Tabarelli, M., 2009. Seed predation by rodents and safe sites for large-seeded trees in a fragment of the Brazilian Atlantic forest. *Brazilian J. Biol.* 69, 763–771. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000400003>
- Reis, N.R. et al., 2014. Mamíferos do Brasil: Guia de Identificação. Technical Books. 2ª Ed.
- Rice, R.A., Greenberg, R., 2000. Cacao Cultivation and the Conservation of Biological Diversity. *Ambio* 29, 167–173.
- Rocha, C.R., Ribeiro, R., Marinho-Filho, J., 2017. Influence of temporal variation and seasonality on population dynamics of three sympatric rodents. *Mamm. Biol.* 84, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2017.01.001>
- Sambuichi, R.H.R., 2006. Estrutura e dinâmica do componente arbóreo em área de cabruca na região cacauceira do sul da Bahia, Brasil. *Acta Bot. Brasilica* 20, 943–

954. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000400018>

- Sambuichi, R.H.R., 2002. Fitossociologia e diversidade de espécies arbóreas em cabruca (Mata Atlântica raleada sobre plantação de cacau) na região sul da Bahia, Brasil. *Acta Bot. Brasilica* 16, 89–101.
- Sambuichi, R.H.R., Vidal, D.B., Piasentin, F.B., Jardim, J.G., Viana, T.G., Menezes, A.A., Mello, D.L.N., Ahnert, D., Baligar, V.C., 2012. Cabruca agroforests in southern Bahia, Brazil: Tree component, management practices and tree species conservation. *Biodivers. Conserv.* 21, 1055–1077. <https://doi.org/10.1007/s10531-012-0240-3>
- Schroth, G., Fonseca, G.A.B. da, Harvey, C.A., Gascon, C., Vasconcelos, H.L., Izac, A.-M.N., 2004. *Agroforestry and Biodiversity Conservation in Tropical Landscapes*, Island Pre. ed. Washington.
- Silva, A.A. de S., 2017. Diversidade de pequenos mamíferos não-voadores e a intensificação do manejo em agroflorestas no Sul da Bahia. Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus.
- Singleton, G.R., Sudarmaji, Jacob, J., Krebs, C.J., 2005. Integrated management to reduce rodent damage to lowland rice crops in Indonesia. *Agric. Ecosyst. Environ.* 107, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.09.010>
- Soares, L.A.S.S., Faria, D., Vélez-García, F., Vieira, E.M., Talora, D.C., Cazetta, E., 2015. Implications of Habitat Loss on Seed Predation and Early Recruitment of a Keystone Palm in Anthropogenic Landscapes in the Brazilian Atlantic Rainforest. *PLoS One* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133540>
- Thomas, W.W., 2003. Natural Vegetation Types in Southern Bahia. *Inst. Estud. Sócio-Ambientais do Sul da Bahia e Conserv. Int. do Bras.* 1–4.
- Vieira, E.M., Pizo, M. a, Izar, P., 2003. Fruit and seed exploitation by small rodents of the Brazilian Atlantic forest. *Mammalia* 67, 1–7. <https://doi.org/10.1515/mamm-2003-0407>
- Zugaib, A.C.C., Barreto, R.C.S., Santos, L. p. dos, 2015. Variação sazonal do preço e da produção do cacau na Bahia - 2003 a 2014. *Agrotropica* 27, 267–280.

ATTACHMENTS

Support information

Table S1: Mean, standard deviation, minimum, maximum and total individuals of the three most abundant species in each sample site.

Species	Mean	SD	Min	Max	Total
<i>Hylaeamys seuanezi</i>	15.1	10.2	5	30	136
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	29.5	18.2	5	58	266
<i>Marmosa murina</i>	8.9	4.5	0	15	80

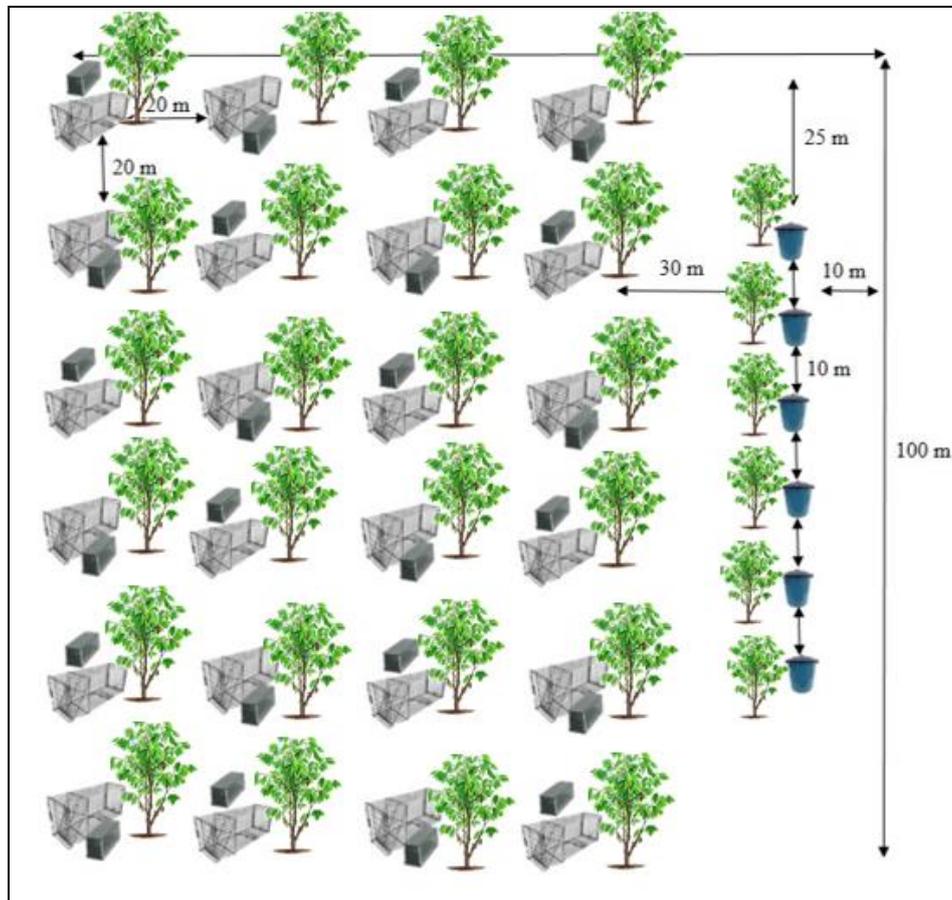


Figure 6: Arrangement of traps in each sample site.

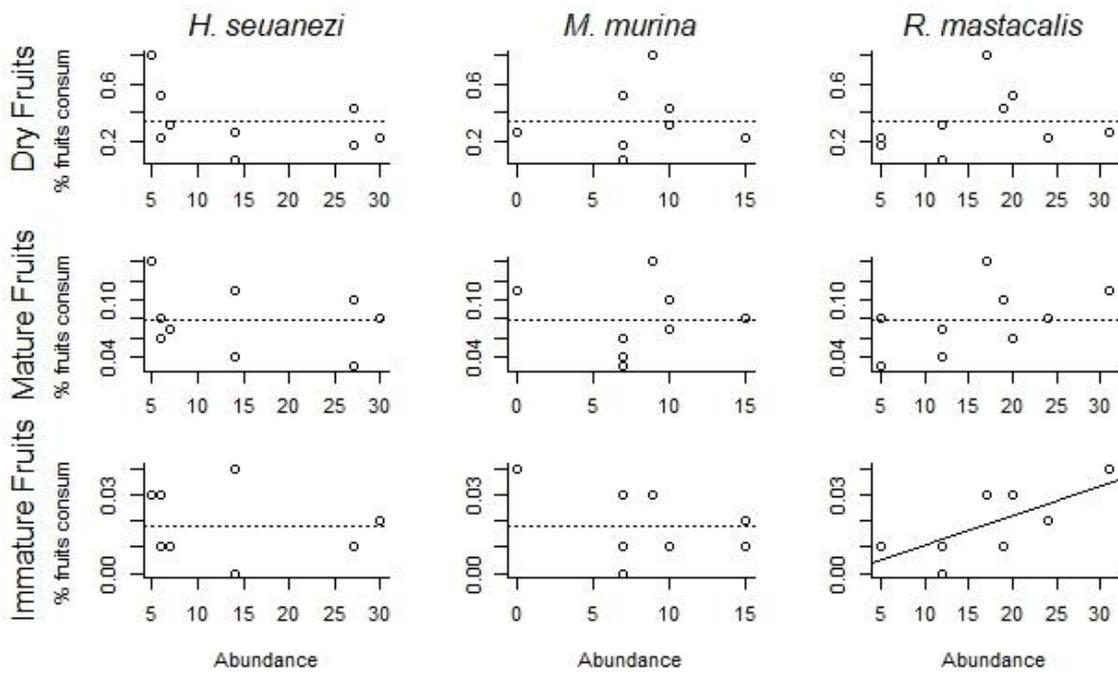


Figure S2: Relation among the percentage of cacao tree fruits consumed in six months and the abundance of the three most common species of small mammals in nine agroforests in the South of Bahia.



Figure S3: Small mammals poisoned in a cacao farm in Southern Bahia.

**CAPÍTULO II: DETECÇÃO MOLECULAR DO CONSUMO DE CACAU
POR PEQUENOS MAMÍFEROS EM AGROFLORESTAS NO SUL DA
BAHIA**



Foto: Vanessa Rios

DETECÇÃO MOLECULAR DO CONSUMO DE CACAU POR PEQUENOS MAMÍFEROS EM AGROFLORESTAS NO SUL DA BAHIA.

Vanessa Araújo Rios¹, Fernanda Amato Gaiotto², Camila Righetto Cassano^{2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Prof. Soane Nazaré de Andrade, Km 16 – Rodovia Jorge Amado, Ilhéus, BA 45662-900, Brazil

²Laboratório de Ecologia Aplicada à Conservação, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Prof. Soane Nazaré de Andrade, Km 16 – Rodovia Jorge Amado, Ilhéus, BA 45662-900, Brazil. *Autor correspondente: e-mail: cassanocami@hotmail.com.

RESUMO

Os sistemas agroflorestais são ambientes modificados pelo homem que permite conciliar a produção agrícola com a conservação da biodiversidade. Os pequenos mamíferos não-voadores são abundantes e diversos em sistemas agroflorestais e desempenham papéis ecológicos importantes. Porém, em sistemas agroflorestais, pequenos mamíferos podem ter efeitos indesejáveis por causar danos aos cultivos. Estudos de dieta baseados em técnicas de DNA fecal podem ser espécies consumidoras de cultivos agrícolas. Este trabalho teve como objetivo reconhecer espécies de pequenos mamíferos responsáveis por danos aos frutos do cacau em cabucas localizadas entre os municípios de Ilhéus e Uruçuca. Para a obtenção das amostras foi realizada a captura de pequenos mamíferos em armadilhas. Os indivíduos capturados foram identificados a nível específico e tiveram suas fezes coletadas. Em laboratório foi feita a extração do DNA de 45 amostras fecais utilizando kit de extração (Qiagen) e posteriormente a realização de PCR com *primer* específico de cacau. Foram analisadas as amostras fecais de seis espécies de pequenos mamíferos e apenas duas espécies, *Rhipidomys mastacalis* e *Marmosa murina*, tiveram resultado positivo quanto a presença de DNA de cacau. Ainda que a maior parte dos resultados positivos sejam atribuídos à *M. murina*, esta espécie provavelmente consome frutos de cacau de maneira oportunista, uma vez que não possui dentição adaptada para romper a casca do fruto e tem dieta majoritariamente insetívora. O presente estudo mostrou que a técnica utilizada foi eficiente para determinar as prováveis espécies consumidoras de cacau.

Palavras-chave: Cabucas. Cacau. DNA fecal. Marsupial. Roedor.

ABSTRACT

Agroforestry systems are environments modified by humans, which allow for the combination of agricultural production and biodiversity conservation. Non-volant small mammals are abundant and diverse in agroforestry systems, playing an essential role in nature. In these systems, some performances can be desirable, such as controlling pest insects, or undesirable, when cause damage to agricultural cultivations. Diet studies based on techniques of fecal DNA can be useful to identify species that consume agricultural crops. This work aimed to recognize small mammals responsible for cacao fruit damage in cabruças located among the municipalities of Ilhéus and Uruçuca. We obtained feces samples from small mammals captured in traps and identified to the species level. The DNA of 45 feces samples was extracted using extraction kit (Qiagen) and PCR was performed using specific cacao primers. Fecal samples of six species of small mammals were analyzed and only two, *Rhipidomys mastacalis* and *Marmosa murina*, obtained positive results for cacao DNA. Even though most part of the positive results are attributed to *M. murina*, this species probably consumes cocoa fruits opportunistically, since it does not have a dentition adapted to break the fruit peel and has a mostly insectivorous diet. The present work showed that the applied technique was efficient to determine species that are probable cacao consumers.

Key-words: Cabruças. Cacao. Fecal DNA. Marsupial. Rodent.

INTRODUÇÃO

Os Sistemas Agroflorestais (SAFs) são considerados uma forma alternativa de uso do solo que permitem maior estabilidade do ecossistema e otimização do uso de recursos naturais (NAIR, 1993). Estes sistemas proporcionam um grande potencial de conservação da biodiversidade em paisagens agrícolas, pois podem abrigar parte das espécies nativas de uma região e/ou conectar manchas de habitat nativo (CASSANO et al., 2009; RICE; GREENBERG, 2000).

Os pequenos mamíferos, um grupo ecológico formado por marsupiais e roedores de pequeno porte, respondem a alterações no habitat e na paisagem (PARDINI; UMETSU, 2006) e são abundantes e diversos em sistemas agroflorestais (ENCARNAÇÃO, 2001; MOURA, 1999; PARDINI, 2004; SILVA, 2017). Esses animais desempenham papéis ecológicos importantes na natureza, como a predação e dispersão de sementes, que interfere no recrutamento de plantas, ou a predação e eventual controle de populações de insetos (LESSA; GEISE, 2014; PIMENTEL; TABARELLI, 2004; VIEIRA; PAISE; MACHADO, 2006; VIEIRA; PIZO; IZAR, 2003). Em sistemas agrícolas, as funções desempenhadas pelos pequenos mamíferos podem gerar eventuais benefícios ou perdas. Quando o consumo de frutos ou sementes implica em danos à produção, estes organismos podem ser considerados pragas (BROWN et al., 2007).

Estudos sobre os hábitos alimentares de pequenos mamíferos são bastante úteis para descrever o nicho, compreender relações de competição e predação, ou relações entre a abundância desses animais e a disponibilidade de recursos (GALETTI; PIZO; MORELLATO, 2003). Métodos tradicionais utilizados na identificação da dieta utilizam a análise visual de conteúdo estomacal e das fezes (CASELA; CÁCERES, 2006; NOBLECILLA, MAGGIE C.; PACHECO, 2012; POLOP et al., 2015; SAHLEY et al., 2015). Esses métodos permitem a identificação de partes rígidas dos organismos consumidos, a exemplo de partes de exoesqueleto de insetos e sementes inteiras, sendo menos eficientes para a identificação de itens digeridos com maior facilidade, como a polpa de frutos ou sementes roídas. Entretanto, o uso de técnicas moleculares tem favorecido estudos de dieta animal baseada nas análises de DNA fecal de predadores e

herbívoros (DEAGLE et al., 2005; JARMAN et al., 2002; SYMONDSON, 2002; BRADLEY et al., 2007). Esse método apresenta vantagens, por ser um método não invasivo e permitir identificar itens que não podem ser identificados de modo visual.

A região sul da Bahia é uma das principais produtora de cacau (*Theobroma cacao* L.) do Brasil. Grande parte da cobertura vegetal da região é formada por sistemas agroflorestais, no qual o cacauzeiro é plantado sob a sombra de espécies nativas da Mata Atlântica (SAMBUICHI et al., 2012). Estudos realizados na região cacauzeira da Bahia indicam que algumas espécies de pequenos mamíferos podem estar relacionadas a danos nas plantações de cacau. Cruz (1983) menciona danos atingindo 15 a 48% da produção. Encarnação (2001) estimou perdas econômicas de até 30% e conferiu os danos ao roedor *Rhipidomys macrurus*, o qual segundo a autora foi a única espécie que perfurou o cacau em um experimento deixando um indivíduo em uma gaiola com o fruto. Lobão; Nogueira-Filho (2011) realizaram entrevistas a agricultores e estimaram taxas de 10 a 20% dos danos ao cacau, atribuindo os prejuízos à espécie *Oryzomys laticeps* (sinonímia de *Hylaeamys seuanezi*). Porém, não há evidências claras sobre quais espécies são responsáveis para o dano de frutas nas cabruças. Compreender a dieta desses animais pode ser uma ferramenta útil para reconhecer espécies consumidoras dos frutos e relacionar os danos com a abundância destas populações. Este trabalho teve como objetivo verificar, por meio de análise molecular de fezes, quais espécies de pequenos mamíferos são consumidoras de cacau em agroflorestas do sul da Bahia, e relacionar esses resultados com os hábitos alimentares e de locomoção descritos na literatura.

METODOLOGIA

Procedimentos em campo

A coleta das fezes dos pequenos mamíferos foi realizada durante sete dias de fevereiro de 2017, em três propriedades rurais situadas entre os municípios de Ilhéus e Uruçuca, na região sul da Bahia (coordenada central: 14°43'S, 39°12'W). A área de estudo é uma paisagem típica da região cacauzeira, formada por sistemas agroflorestais, nos quais o cacau (*T. cacao*) é plantado sob a sombra de árvores nativas, conhecidos regionalmente por cabruças (SAMBUICHI et al., 2012).

O período em que ocorreu essa amostragem se deu no final da safra do cacau, em um momento que havia principalmente frutos maduros nos cacauzeiros. Em cada

sítio amostral foram estabelecidos 24 pontos fixos espaçados em 20 metros ao longo de uma parcela de 100 x 100 m. Foram utilizadas armadilhas do tipo Sherman® (30 x 9 x 8 cm) e do tipo *Tomahawk*® (45 x 16 x 16 cm). As armadilhas foram dispostas aos pares, sendo uma depositada no chão e outra no sub-bosque (altura de 1 a 1,5 m) alternando-se os diferentes tipos em cada estrato totalizando 48 armadilhas. Embaixo de cada armadilha foi colocada uma bandeja de isopor para a coleta das fezes. A armadilha foi abastecida com uma isca, formada pela mistura de fubá, paçoca de amendoim, banana, aveia e sardinha a fim de atrair os pequenos mamíferos. As armadilhas foram checadas todas as manhãs para identificação e soltura dos espécimes, coleta do material fecal e limpeza da armadilha e da bandeja, evitando contaminação entre as amostras.

Os animais capturados foram identificados a nível de espécie e marcados com um brinco na orelha. A marcação de cada indivíduo foi importante para evitar que animais recapturados apresentassem apenas o material da isca em suas fezes, para isso apenas os animais capturados pela primeira vez tiveram suas fezes coletadas. As amostras fecais foram coletadas imediatamente após a defecação do animal capturado, bem como aquelas encontradas na bandeja de isopor abaixo da armadilha, e foram identificadas conforme a espécie correspondente e os dados de cada indivíduo, juntamente com o número da amostra. Em cada sítio amostral um indivíduo da espécie *Rhipidomys mastacalis* foi mantido preso durante duas noites em uma armadilha com fruto do cacauzeiro (Figura 1). As fezes desses animais foram utilizadas como controles positivos nas análises moleculares. Após a realização da coleta de fezes os animais capturados foram devolvidos ao habitat no mesmo ponto de captura. As fezes foram acondicionadas em tubos *ependorf* e ao final de cada dia de coleta foram armazenadas e congeladas em freezer e mantidas por um período de aproximadamente três meses. As espécies foram classificadas quanto ao seu hábito locomotor e dieta segundo a Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil (PAGLIA et al., 2012).

Os procedimentos em campo foram realizados em parceria com o projeto “Diversidade de espécies e uso de recursos por pequenos mamíferos não voadores em agroflorestas no sul da Bahia”, com autorização CEUA (nº015/15) e SISBIO (nº 49238-1).



Figura 1: Animal preso na armadilha para coleta das fezes em estudo controle. Foto: Vanessa Rios.

Procedimentos em laboratório

Em laboratório foram realizados testes preliminares com cinco *primers* desenvolvidos especificamente para cacau utilizando DNA de cacau e de outras fruteiras presentes nas cabrucas. Esses testes foram realizados para comprovar que o *primer* utilizado nas amostras de fezes amplificasse apenas na presença de DNA do cacau. Extrações de DNA das espécies elencadas na Tabela S1 foram realizadas de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1987). O DNA foi quantificado em gel de agarose 1%. A estimativa da concentração de DNA foi realizada com base na comparação da intensidade das bandas com padrão de DNA Lambda e diluído a uma concentração de 2,5 ng/ μL para utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

As PCR's para os *primers* MDH-cacau, GAPDH-cacau e ACT-cacau foram realizadas em volume final de 25 μL , contendo 2,5 μL tampão 1X; 0,75 μL de MgCl_2 (50 nM); 1,0 μL de dNTP (0,25 μM); ; 1 μL de primer F (0,2 mol/ μL) + 1 μL de primer R (0,2 mol/ μL); 1 μL de DNA das fruteiras (30 nM); 0,2 μL de Taq DNA polimerase e 17,55 μL de água estéril (Milli-Q). Para Y16982 e Y16984 utilizou-se o volume final de 13 μL , contendo 1,3 μL de tampão 10X; 1,3 μL de dNTPs (2,5 nM); 0,72 μL de MgCl_2 (50 nM); 1 μL de *primer* (F+R) (10 mM); 1,3 μL de BSA (2,5

ng/mL); 3 µL de DNA das fruteiras (2,5 ng/ µL); 0,2 µL de Taq DNA polimerase e 4,18 µL de água estéril. As condições de amplificação seguiram o seguinte programa para os *primers* MDH-cacau, GADPH-cacau e ACT-cacau: desnaturação inicial do DNA a 94° C por 4 min, seguido de 40 ciclos consistindo de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 60° C por 45 segundos (anelamento), e 72°C por 1 minuto (polimerização), seguido de um ciclo de 72°C, por 7 minutos. Para os *primers* Y16982 e Y16984 a programação se deu da seguinte forma: desnaturação inicial do DNA a 94° C por 5 min, seguido de 35 ciclos consistindo de 94°C por 45 segundos, 48° C por 45 segundos, e 72°C por 45 segundos, seguido de um ciclo de 72°C, por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (65 volts, por cerca de 40 min), corado com corante tipo IV e gel green em tampão 1X de TBE e visualizado sob luz ultravioleta.

Foi extraído o DNA de 45 amostras de fezes de pequenos mamíferos. Para a extração do DNA das amostras foi utilizado cerca de 200 mg de material fecal utilizando o kit para extração de DNA *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen). Nesta etapa, foram seguidas as instruções do fabricante com adaptações sugeridas por Chaves, Dias e Pomilla (2010) para a extração de DNA fecal. Após a extração do DNA fecal foi realizado a sua quantificação em gel de agarose a 1%, estimando a sua concentração também com base na intensidade das bandas de DNA Lambda. Estas por sua vez, não apresentaram uma boa concentração em relação a visualização das bandas, mantendo o DNA extraído das fezes concentrado para a realização da PCR.

As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 13 µL, contendo 1,18 µL de água estéril (Milli-Q); 1,3 µL de tampão 10X; 1,3 µL de dNTPs (2,5 nM); 0,72µL de MgCl₂(50nM); 1 µL de *primer* (F+R) (10 mM); 1,3 µL de BSA (2,5 ng/mL); 0,2µL de Taq DNA polimerase e 6µL de DNA fecal concentrado. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial do DNA a 94° C por 5 min, seguido de 35 ciclos consistindo de 94°C por 45 segundos (desnaturação), 48° C por 45 segundos (anelamento), e 72°C por 45 segundos (polimerização), seguido de um ciclo de 72°C, por 7 minutos. Todas as reações de amplificação realizadas neste estudo foram conduzidas em termociclador (Veriti ® thermalcycler – Applied Biosystems). Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (90 volts, por cerca de 30 min), corado com corante tipo IV e gel Green em tampão 1X de TBE e visualizado sob luz UV. Foram incluídos na amplificação das amostras de fezes controles positivos, contendo DNA extraído das fezes do indivíduo mantido preso com

o fruto (amostra 39), o DNA de cacau, o controle negativo (água ultrapura Milli-Q) e o Ladder 100pb para comparar o tamanho do fragmento amplificado.

A análise dos resultados moleculares foi realizada através da observação direta da presença de bandas no gel correspondente ao tamanho do fragmento esperado para o *primer* selecionado.

Os procedimentos em laboratório estão cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SISGEN (processo: A4DA13A).

RESULTADOS

O teste de *primers* nas fruteiras demonstrou que o *primer* Y16982 teve melhor resultado na amplificação do cacau, amplificando em seis das oito amostras de cacau utilizadas neste teste, e não amplificou nas outras espécies de plantas analisadas (Tabela S1), sendo este utilizado para realização da PCR nas amostras fecais.

Foram analisadas 44 amostras de fezes de seis espécies de pequenos mamíferos, sendo quatro roedores: *Akodon cursor* (N=2), *Hylaeamys seuanezi* (N=12), *Nectomys squamips* (N=2) e *Rhipidomys mastacalis* (N=19), e dois marsupiais *Didelphis aurita* (N=1) e *Marmosa murina* (N=8). Das amostras analisadas 25% apresentaram resultados positivos como resultado da PCR (N=11) (Figura 2). Foi detectada a presença de DNA de cacau nas fezes de indivíduos de duas espécies: o roedor *R. mastacalis*, com 6 amostras positivas (32% das amostras fecais desta espécie) e o marsupial, *M. murina*, com 5 amostras positivas (63% das amostras fecais desta espécie) (Tabela 1). A amostra 39 não foi contada como resultado porque corresponde às fezes do roedor deixado na armadilha para utilizar como controle positivo (Tabela S2).

Três das seis espécies capturadas exibem adaptações para se locomover em árvores, tendo hábito arborícola (N=1) ou escansorial (N=2); as demais são mais restritas ao solo, com hábito terrestre (N=2) ou semi-aquático (N=1) (Tabela 1). Quanto à dieta, quatro espécies são descritas na literatura como frugívoras: Frugívoro/onívoro (N=2), Frugívoro/granívoro (N=1), Frugívoro/predador de sementes (N=1), sendo as demais consideradas de hábito Insetívoro/onívoro (N=2) (Tabela 1).

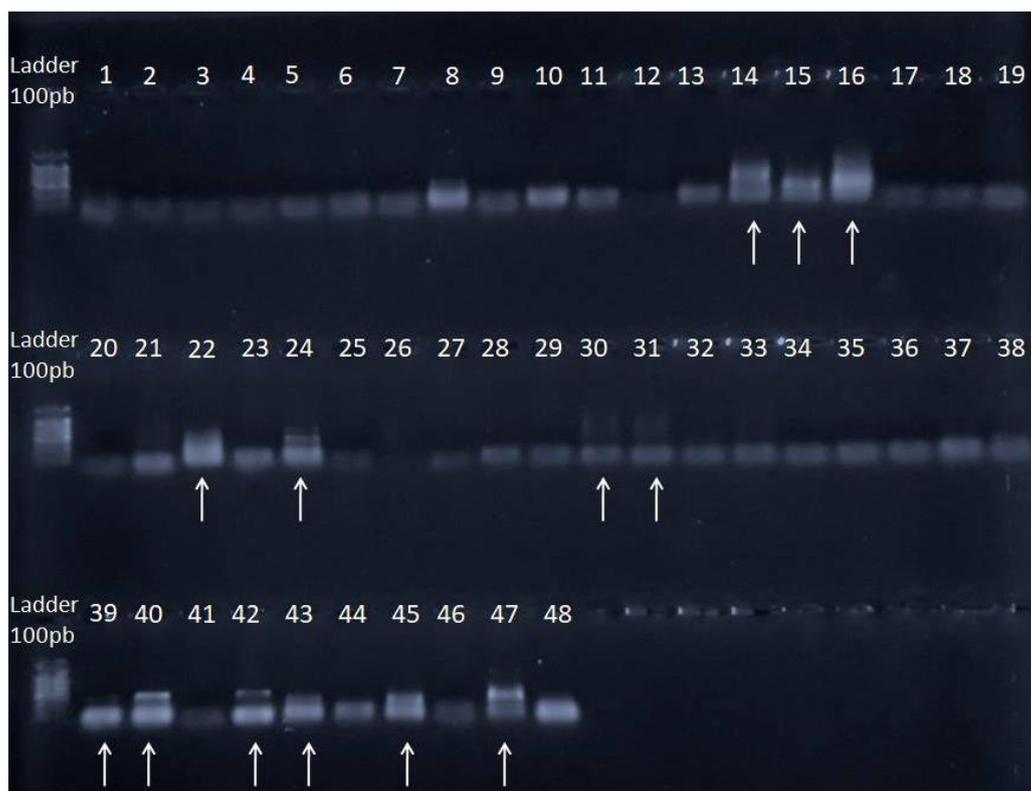


Figura 2: Padrão eletroforético obtido pela amplificação do DNA das amostras fecais. Os números representam: Amostras de DNA fecal (1 a 45), controle negativo-H₂O (46), controle positivo-dna de cacau (47 e 48). A amostra 39 corresponde às fezes utilizadas como controle positivo (Ver tabela S1). As setas indicam as amostras que amplificaram no cacau.

Tabela 1: Espécies capturadas para análise molecular de fezes caracterizadas quanto ao hábito de locomoção (Ar=arborícola, Sa=semiaquática, Sc=escansorial e Te=terrestre) e dieta (Fr=frugívoro, In=insetívoro, Gr=granívoro, On=onívoro, Se=Predador de sementes) de acordo com Paglia et al. (2012). Número de amostras totais por espécie e número de amostras que apresentaram DNA de cacau na PCR.

Espécie	Locomoção	Dieta	Total de amostras	Presença de DNA de cacau
<i>Akodon cursor</i>	Te	In/On	2	0
<i>Hylaeamys seuanezi</i>	Te	Fr/Gr	12	0
<i>Nectomys squamips</i>	As	Fr/On	2	0
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	Ar	Fr/Se	19	6 (32%)
<i>Didelphis aurita</i>	Sc	Fr/On	1	0

<i>Marmosa murina</i>	Sc	In/On	8	5 (63%)
TOTAL	-	-	44	11 (25%)

DISCUSSÃO

O consumo de cacau por pequenos mamíferos na região cacauceira da Bahia pode ser relevante em algumas safras, fazendo com que as espécies deste grupo sejam consideradas indesejáveis neste sistema e eliminadas indiscriminadamente. O resultado deste estudo indica que apenas parte das espécies presentes nas cabucas do sul da Bahia é responsável pelo consumo dos frutos do cacau, o que sugere que o controle dos danos deveria ser focado em medidas mais específicas.

O uso de marcadores moleculares para identificar a dieta de predadores e herbívoros tem crescido nos últimos anos. Além de permitir a investigação dos itens consumidos não identificáveis visualmente, a coleta de material é executada de modo não invasivo, sem necessidade de sacrifício ou lavagem do trato digestivo do animal (HUNG; LI; LEE, 2004). Grande parte dos estudos envolvendo essa técnica para análise de dieta tem sido desenvolvidos a partir de *primers* grupo-específicos para os itens consumidos. Os conjuntos de iniciadores de PCR grupo-específicos (*primers*) são um meio de especificar os diversos táxons que produzem um produto de amplificação numa PCR (JARMAN; DEAGLE; GALES, 2004). Jarman; Deagle e Gales (2004) desenvolveram um conjunto de *primers* grupo-específico da região do DNA genômico que codifica para RNA ribossômico (rDNA) para amplificar o DNA extraído das fezes coletadas de baleias (*Balaenoptera physalus*) e pinguins (*Pygoscelis adeliae*). Deagle et al. (2007), comparou os itens alimentares visualizados no estômago e análise molecular das fezes de pinguins (*Eudyptes chrysolophus*) e mostrou que os métodos utilizados são correspondentes quanto ao resultado da dieta. Bradley et al (2007) investigou a dieta de dois primatas herbívoros na África (*Gorilla gorilla* e *Colobus guereza*), encontrando correspondência entre as espécies de plantas identificadas nos estudos moleculares e as plantas consumidas durante o monitoramento dos animais por visualização focal.

O consumo de cacau por um quarto dos pequenos mamíferos capturados deve ser visto como um resultado conservador em função de possíveis falsas ausências, ou seja, fezes contendo DNA de cacau, nas quais o DNA não foi detectado. Para que os resultados das análises moleculares sejam conclusivas é necessário que o DNA esteja o

mínimo degradado possível, uma vez que a degradação do mesmo influencia o tamanho dos fragmentos de DNA do material fecal, que são amplificados (DEAGLE et al., 2005). Além disso, o tempo de permanência do DNA que foi consumido é mantido no trato digestivo também pode influenciar na qualidade do mesmo. Em relação aos pequenos mamíferos, os animais pertencentes a este grupo tem altas taxas metabólicas e o alimento deve passar rapidamente pelo trato digestivo (COROMINAS, 2004), podendo não afetar nos resultados das amplificações. Estudos mostram que fragmentos menores que 300 pb do DNA consumido são amplificados com sucesso, uma vez que fragmentos maiores de DNA são quebrados com mais facilidade durante a passagem pelo trato digestivo do consumidor (AGUSTÍ et al., 2003; CHEN et al., 2000; JÜEN; TRAUGOTT, 2005). O *primer* utilizado nesse estudo amplifica em fragmentos de aproximadamente 284-310pb (LANAUD et al., 1999), condizendo com o recomendado nos trabalhos supracitados.

Os pequenos mamíferos registrados possuem hábitos de locomoção e dieta variados e o hábito arborícola parece ser o maior determinante das espécies que consomem o cacau. *Rhipidomys mastacalis* é um roedor arborícola e *Marmosa murina* é um marsupial escansorial, o que é plausível com o fato de que a maior parte dos frutos não está disponível para espécies de hábito terrestre. No que se refere à dieta, a maior parte das espécies se alimenta predominantemente de frutos (dietas frugívora/onívora, frugívora/granívora ou frugívora/predador de semente). Outras mesmo com dietas mais insetívoras, também podem consumir frutos por exibirem algum grau de onivoria, e na ausência do seu recurso ou levando em conta a alta disponibilidade de cacau na época das safras podem consumi-lo de forma oportunista. A exemplo de *M. murina*, que neste estudo apresentou resultados positivos quanto a presença de DNA de cacau nas fezes, e que há relatos de trabalhadores rurais nestas áreas que já observaram este marsupial se alimentando deste fruto.

Estudos já realizados na região atribuíram os danos causados aos frutos do cacauzeiro à *R. mastacalis*, por conta deste roedor arborícola ser bastante abundante nas cabruças (CRUZ, 1983) e pela relação positiva entre a abundância de frutos com danos e a abundância dessa espécie (Capítulo 1). Embora Encarnação (2011) tenha atribuído os danos a *Rhipidomys macrurus*, é provável que se trata de uma identificação incorreta de *Rhipidomys mastacalis*. Segundo Bonvicino, Oliveira e D'Andrea (2008), esta espécie está presente em toda a Mata Atlântica do sul da Bahia e é bastante comum na região, sobretudo nas cabruças, enquanto que *R. macrurus* tem sua distribuição na

região oeste da Bahia. No presente estudo, *R. mastacalis* teve o maior número de amostras fecais analisadas, por ser abundante na amostragem, mas não foi a espécie com maior número de resultados positivos. O maior número e percentual de registros positivos estiveram ligados à *M. murina*, uma espécie que provavelmente se alimenta dos frutos de forma mais oportunista por sua dentição não ser especializada a perfurar/roer os frutos como os roedores (ver capítulo 1). Portanto, embora tenha sido comprovado que esta espécie tenha consumido o cacau, esta não deve ser considerada a maior causadora de danos aos frutos. Outros estudos com uma amostragem maior poderão dar maior precisão sobre os percentuais de consumo por espécie, e também identificar o consumo de cacau por outras espécies existentes nas cabruças.

O presente estudo demonstrou a aplicabilidade da técnica PCR para identificar espécies de pequenos mamíferos consumidoras de cacau, dando suporte ao seu uso para investigar interações na cadeia alimentar que não seriam identificadas através de métodos tradicionais (SHEPPARD; HARWOOD, 2005; SYMONDSON, 2002). Nas agroflorestas, esta metodologia pode ser aplicada para avaliar se esses animais se alimentam de outras plantas cultivadas - a exemplo da jaca e cajá, espécies exóticas que foram inseridas nas cabruças para o sombreamento do cacauzeiro - ou ainda identificar se alguma espécie consome insetos que causam danos ao cacauzeiro. O consumo de cacau por pequenos mamíferos na região cacauzeira da Bahia pode ser relevante em algumas safras, fazendo com que as espécies deste grupo sejam consideradas indesejáveis neste sistema e eliminadas indiscriminadamente. O resultado deste estudo indica que apenas parte das espécies presentes nas cabruças do sul da Bahia são responsáveis pelo consumo dos frutos do cacauzeiro, o que sugere que o controle dos danos deveria ser focado em medidas espécie-específicas. Pesquisas combinando múltiplas abordagens devem ser incentivadas para entender a ecologia alimentar deste grupo e fatores responsáveis pelas grandes abundâncias de algumas espécies, aumentando o conhecimento do impacto das ações humanas sobre a biota nativa e auxiliando na identificação de práticas agroecológicas para minimizar danos à produção agrícola.

REFERÊNCIAS

AGUSTÍ, N. et al. Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: Prey detection within predators using molecular markers. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 12, p. 3467–3475, 2003.

- BONVICINO, C.R., OLIVEIRA, J. A DE, D'ANDREA, P. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. **Biologia (Bratisl)**. 120 f., 2008. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492003000600001>
- BRADLEY, B.J. et al. Plant DNA sequences from feces: Potential means for assessing diets of Wild Primates American **Journal of Primatology**, v. 69, p. 699-705, 2007.
- BROWN, P. R. et al. Relationship between abundance of rodents and damage to agricultural crops. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 120, n. 2-4, p. 405-415, 2007.
- CASELA, J.; CÁCERES, N. C. Diet of four small mammal species from Atlantic forest patches in South Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 1, n. august, p. 5-11, 2006.
- CASSANO, C. R. et al. Landscape and farm scale management to enhance biodiversity conservation in the cocoa producing region of southern Bahia, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, n. 3, p. 577-603, 2009.
- CHAVES, S.L., DIAS, I., POMILLA, C. Extraction of genomic DNA from carnivore fecal samples using QIAamp DNA Stool Mini Kit. **Modified from QIAamp® DNA Stool Handbook**, 2010.
- CHEN, Y. et al. Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 11, p. 1887-1898, 2000.
- COROMINAS, I. T. **Distribution, population dynamics and habitat selection of small mammals in Mediterranean environments: the role of climate, vegetation structure, and predation risk**. 2004. (Tese). Programa de Doctorado: Biología Animal I: Zoología. Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, 2004.
- CRUZ, P. F. N. DA. Ocorrência e avaliação de danos causados por roedores, praga do cacauero na Bahia, Brasil. **Theobroma**, v. 13, n. 1, p. 59-60, 1983.
- DEAGLE, B. E. et al. Molecular scatology as a tool to study diet: Analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 6, p. 1831-1842, 2005.
- DEAGLE, B. E. et al. Studying seabird diet through genetic analysis of faeces: A case study on macaroni penguins (*Eudyptes chrysolophus*). **PLoS ONE**, v. 2, n. 9, 2007.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- ENCARNAÇÃO, A. M. DA. **Ocupação temporal e espacial e aspectos da predação de frutos do cacauero (*Theobroma cacao* L.) por pequenos mamíferos (Mammalia) em cacauais e mata atlântica no sudeste da Bahia**. [s.l.] Universidade Estadual de Santa Cruz., 2001.
- GALETTI, M.; PIZO, M.A.; MORELLATO, P.C. Fenologia, frugivoria e dispersão de sementes. In: CULLEN JR, L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Curitiba, UFPR. Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, 667 p., 2003.

- HUNG, C. M.; LI, S. H.; LEE, L. L. Faecal DNA typing to determine the abundance and spatial organisation of otters (*Lutra lutra*) along two stream systems in Kinmen. **Animal Conservation**, v. 7, n. 3, p. 301–311, 2004.
- JARMAN, S. N. et al. A DNA-based method for identification of krill species and its application to analyzing the diet of marine vertebrate predators. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2679–2690, 2002.
- JARMAN, S. N.; DEAGLE, B. E.; GALES, N. J. Group-specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 5, p. 1313–1322, 2004.
- JUEN, A.; TRAUGOTT, M. Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: A case study using a soil insect predator-prey system. **Oecologia**, v. 142, n. 3, p. 344–352, 2005.
- LANAUD, C. et al. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 12, p. 2141–2143, 1999.
- LESSA, L. G.; GEISE, L. Food habits and carnivory by a small size opossum, *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae). **Mastozoologia Neotropical**, v. 21, n. 1, p. 139–143, 2014.
- LOBÃO, E. DE S. P.; NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. Human-wildlife Conflicts in the Brazilian Atlantic Forest. **Suiform Soundings**, v. 10, n. 2, p. 14–22, 2011.
- MOURA, R. T. DE. **Análise comparativa da estrutura da comunidade de pequenos mamíferos em remanescentes de Mata Atlântica e plantio de cacau em sistema de cabruca no Sul da Bahia**. 1999. 67. f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.
- NAIR, P. K. R. Classification of agroforestry systems. **An Introduction to Agroforestry**, 1993.
- NOBLECILLA, MAGGIE C.; PACHECO, V. Dieta de roedores sigmodontinos (Cricetidae) en los bosques montanos tropicales de Huánuco, Perú. **Revista Peruana de Biología**, v. 19, n. 3, p. 317–322, 2012.
- PAGLIA, A. P. et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. 2ª Edição. **Conservation International**, Arlington, VA., v. 6, p. 76, 2012.
- PARDINI, R. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. **Biodiversity and Conservation**, v. 13, p. 2567–2586, 2004.
- PARDINI, R.; UMETSU, F. Pequenos mamíferos não-voadores da Reserva Florestal do Morro Grande: distribuição das espécies e da diversidade em uma área de Mata Atlântica. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 2, 2006.
- PIMENTEL, D. S.; TABARELLI, M. Seed Dispersal of the Palm *Attalea oleifera* in a Remnant of the Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 36, n. 1, p. 74–84, 2004.
- POLOP, F. et al. Estructura de la dieta de roedores sigmodontinos en arbustales del ecotono bosque-estepa del Suroeste de Argentina. **Mastozoologia Neotropical**, v. 22, n. 1, p. 85–95, 2015.

- RICE, R. A.; GREENBERG, R. Cacao Cultivation and the Conservation of Biological Diversity. **Ambio**, v. 29, n. 3, p. 167–173, 2000.
- SAHLEY, C. T. et al. Diet of a sigmodontine rodent assemblage in a Peruvian montane forest. **Journal of mammalogy**, v. 96, n. 5, p. 1071–1080, 2015.
- SAMBUICHI, R. H. R. et al. Cabruca agroforests in southern Bahia, Brazil: Tree component, management practices and tree species conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 4, p. 1055–1077, 2012.
- SHEPPARD, S. K.; HARWOOD, J. D. Advances in molecular ecology: Tracking trophic links through predator-prey food-webs. **Functional Ecology**, v. 19, n. 5, p. 751–762, 2005.
- SILVA, A. A. DE S. **Diversidade de pequenos mamíferos não-voadores e a intensificação do manejo em agroflorestas no Sul da Bahia**. 2017. 57 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zoologia. Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, 2017.
- SYMONDSON, W. O. C. Molecular identification of prey in predator diets. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 4, p. 627–641, 2002.
- VIEIRA, E. M.; PAISE, G.; MACHADO, P. H. D. Feeding of small rodents on seeds and fruits: a comparative analysis of three species of rodents of the Araucaria forest, southern Brazil. **Acta Theriologica**, v. 51, n. 3, p. 311–318, 2006.
- VIEIRA, E. M.; PIZO, M. A.; IZAR, P. Fruit and seed exploitation by small rodents of the Brazilian Atlantic forest. **Mammalia**, v. 67, p. 1–7, 2003.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1: Espécies fruteiras utilizadas em teste para padronização de *primer* específico para o cacau. Os sinais + e - representam as amostras que foram positivas e negativas quanto a amplificação, respectivamente.

Fruteiras	MDH- cacau	GADPH- cacau	ACTINA -cacau	Y16982	Y16984
Jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.)	-	-	-	-	-
Mamão (<i>Carica papaya</i> L.)	-	-	-	-	-
Embaúba (<i>Cecropia</i> sp.)	-	+	-	-	-
Sapucaia (<i>Lecythis pisonis</i> Camb.)	-	+	-	-	-
Limão (<i>Citrus</i> sp.)	-	+	-	-	-
Graviola (<i>Annona muricata</i> L.)	-	+	-	-	+

Gameleira (<i>Ficus</i> sp.)	-	-	-	-	-
Acerola (<i>Malpighia emarginata</i> D.C.)	-	-	-	-	-
Cajú (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	-	+	-	-	-
Carambola (<i>Averrhoa carambola</i> L.)	-	+	-	-	+
Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.)	-	+	-	-	-
Goiaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	-	-	-	-	-
Cajá (<i>Spondias mombin</i> L.)	-	+	-	-	-
Jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.)	-	+	-	-	+
Cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) Schum)	-	-	-	-	-
Virola (<i>Virola officinalis</i> Warb.)	-	-	-	-	-
Cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	-	-	-	-	-
Cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	-	-	-	-	-
Cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	-	-	-	+	-
Cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	-	+	-	+	-
Cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	-	-	-	+	-
Cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	-	-	-	+	-
Cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	-	-	-	+	-
Cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	-	-	-	+	-

Tabela S2: Resultado da amplificação das amostras de fezes. Os sinais + e - representam as amostras que foram positivas e negativas quanto a amplificação, respectivamente.

Amostras	Espécie	Primer Y16982
1	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-
2	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-
3	<i>Hylaeamys seuanezi</i>	-
4	<i>Hylaeamys seuanezi</i>	-

5	<i>Marmosa murina</i>	-
6	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-
7	<i>Nectomys squamipes</i>	-
8	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-
9	<i>Hylaeamys seuanezi</i>	-
10	<i>Nectomys squamips</i>	-
11	<i>Hylaeamys seuanezi</i>	-
12	<i>Akodon cursor</i>	-
13	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-
14	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	+
15	<i>Marmosa murina</i>	+
16	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	+
17	<i>Hylaeamys seuanezi</i>	-
18	<i>Marmosa murina</i>	-
19	<i>Hylaeamys seuanezi</i>	-
20	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-
21	<i>Hylaeamys seuanezi</i>	-
22	<i>Marmosa murina</i>	+
23	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-
24	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	+
25	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-
26	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-
27	<i>Akodon cursor</i>	-
28	<i>Hylaeamys seuanezi</i>	-
29	<i>Marmosa murina</i>	-
30	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	+
31	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	+
32	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-
33	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-

34	<i>Didelphis aurita</i>	-
35	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-
36	<i>Hylaeamys seuanezi</i>	-
37	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	-
38	<i>Hylaeamys seuanezi</i>	-
39	<i>Rhipidomys mastacalis</i> (controle positivo)	+
40	<i>Marmosa murina</i>	+
41	<i>Hylaeamys seuanezi</i>	-
42	<i>Marmosa murina</i>	+
43	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	+
44	<i>Hylaeamys seuanezi</i>	-
45	<i>Marmosa murina</i>	+
46	H ₂ O (controle negativo)	-
47	DNA de Cacau 1 (controle positivo)	+
48	DNA de Cacau 2 (controle positivo)	-

CONCLUSÃO GERAL

Estudos realizados em agroflorestas no sul da Bahia já indicaram espécies de pequenos mamíferos causadoras de danos nas plantações de cacau. No entanto estes estudos atribuíram os danos aos frutos a tais espécies apenas no fato destas serem abundantes neste sistema, não havendo um acompanhamento em campo dos danos causados na safra. O presente estudo buscou determinar as possíveis espécies consumidoras de cacau através de metodologias combinadas, a partir de dados obtidos de abundância de pequenos mamíferos não-voadores e estimativas de danos causados nos frutos do cacauzeiro, e por meio de análise molecular das fezes, para comprovação do consumo de cacau por esses indivíduos.

Nossos resultados corroboram com a hipótese levantada de que *Rhipidomys mastacalis* é a espécie causadora de danos. Este roedor foi a única espécie que apresentou relação positiva entre taxa de dano e sua abundância, além de também ter sido comprovado o consumo de cacau por detecção molecular de suas fezes. *R. mastacalis* possui sua dieta caracterizada como frugívoro/predador de sementes e possui hábito arborícola, o que facilita o uso desse ambiente, mantendo uma forte relação com os cacauzeiros por esta espécie.

Apesar de também ter sido observado a presença de DNA de cacau em fezes de *Marmosa murina*, um marsupial escansorial, esta espécie não deve ser considerada principal causadora de danos, por conta de sua dentição não ser considerada apta a roer/perfurar frutos duros como o cacau, como é a dos roedores. No entanto, uma vez o fruto perfurado e disponível, *M. murina* pode consumir de forma oportunista.

Estudos a longo prazo a cerca desta temática devem ser estimulados para elucidar flutuações populacionais das populações de pequenos mamíferos nas cabruças e sua relação com danos à lavoura cacauzeira, contribuindo para o conhecimento das relações entre a fauna e o sistema produtivo da região. Nossos dados indicam uma espécie como principal causadora de danos ao cacau, e necessidade de medidas de controle que não tenham efeitos negativos sobre outras espécies que habitam a região. A combinação de diferentes métodos se mostrou eficaz e devem ser incentivadas para responder questões da cacauicultura em sistemas agroflorestais a fim de reduzir os danos à produção agrícola e garantir o valor de conservação desses sistemas.