

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Variação genética em *Tayassu pecari* (Link, 1795) e em *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758). Uma contribuição para a conservação dessas espécies.

Ana Carolina Dalla Vecchia

São Carlos
2011

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução

ANA CAROLINA DALLA VECCHIA

Variação genética em *Tayassu pecari* (Link, 1795) e em *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758). Uma contribuição para a conservação dessas espécies.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.

São Carlos
2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

D144vg

Dalla Vecchia, Ana Carolina.

Variação genética em *Tayassu pecari* (Link, 1795) e em *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758) : uma contribuição para a conservação dessas espécies / Ana Carolina Dalla Vecchia. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
69 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Genética animal. 2. *Tayassu pecari*. 3. *Pecari tajacu*. 4. Microssatélites. 5. Amplificação heteróloga. I. Título.

CDD: 591.15 (20ª)

Ana Carolina Dalla Vecchia

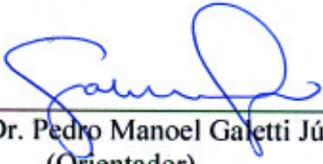
Variação genética em *Tayassu pecari* (Link, 1795) e em *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758). Uma contribuição para a conservação dessas espécies

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2011

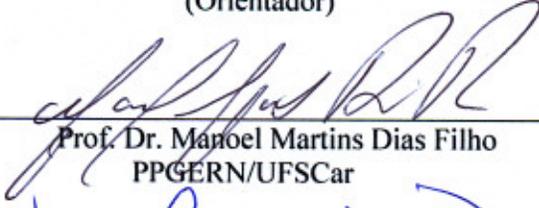
BANCA EXAMINADORA

Presidente



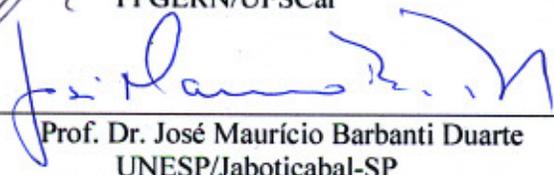
Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior
(Orientador)

1º Examinador



Prof. Dr. Manoel Martins Dias Filho
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte
UNESP/Jaboticabal-SP

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais pela oportunidade.

Ao meu orientador Pedro Manoel Galetti Júnior pela confiança, pelos ensinamentos e pela paciência com os inúmeros emails e telefonemas.

À minha co-orientadora, Alexandra Sanches, por tudo que me ensinou e pelo tanto que ajudou na realização desse trabalho, meu muito obrigada.

À Cibele, pela ajuda nas análises, nas inúmeras dúvidas e por sempre me dizer que as coisas dariam certo.

À Alexine Keuroghlian pelas amostras e por todo o apoio prestado.

À FAPESP (processos nº 2007/03392-6 e 2009/03667-0) e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À Ana Cristina pela ajuda no laboratório, porque as coisas sempre davam certo com ela!

À Savana pelos milhões de livros e artigos, pelos documentos entregues, recados dados e, principalmente pela amizade.

À Aline, pelas vezes que me acompanhou no laboratório, pela paciência ao me explicar algumas análises e várias dicas úteis.

À Alline, pelo asilo, pelas dúvidas tiradas, pelos favores pela amizade.

À Ana Carolina, Bruno, Carla, Dany, Camis e Niara pela ajuda que me deram em diversos momentos, pelas dúvidas que me tiraram, pelas coisas que me ajudaram a achar e pelo companheirismo. E à todos do lab, obrigada pelas risadas, pelos almoços no RU, pelos momentos de tédio, de ócio coletivo e mais risadas. Adorei conhecer todos vocês!

Aos Babelinos, que me acolheram tão carinhosamente nessa reta final. Especialmente o Zé, que brincava comigo quando eu estava de saco cheio.

À Mestiça, Sansão, Dalila e Chiquitita, para que eles não fiquem com ciúmes so Zé, já que são tão importantes para mim. À Biju, que acompanhou uma boa parte dessa trajetória comigo.

À toda minha família, que sempre compreendeu minha ausência, e sempre me deu todo o apoio. Em especial à minha madrinha, Sônia, e ao meu tio Bola, que sempre vibrou comigo em cada conquista, como se fosse dele também.

Aos meus amigos de longa data: Tamires, Marina, Arruda, Flávio, Luiz, Raquel, Zorro, Carolithca e Fioresi, simplesmente por estarem em minha vida.

Às queridas Ariane, Duda, Arodí.

Ao pessoal do DDS, especialmente à Camila, que me aguentou em todos os dias úteis no último ano.

Ao Daniel, que esteve comigo ao longo dessa conquista. Porque “diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com você.”

Aos meus pais, Ari e Márcia, e à minha avó, Orlanda, por terem me apoiado em mais essa jornada. Muito obrigada, pois eu não seria nada do que sou, nem teria feito nada disso sem vocês.

RESUMO

A família Tayassuidae, ordem Artiodactyla, ocorre exclusivamente no continente americano e possui, atualmente, apenas três espécies: *Tayassu pecari*, as queixadas, *Pecari tajacu*, os catetos e *Catagonus wagneri*, o taguá. A existência de uma quarta espécie na família, *Pecari maximus*, recentemente descrita, vem sendo discutida. As queixadas distribuem-se do sul do México ao norte da Argentina, enquanto os catetos possuem uma distribuição mais ampla, sendo encontrados desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. As duas espécies desempenham papel-chave nos ecossistemas, por fazerem parte da cadeia trófica e atuar como predadores e dispersores de sementes. São caçadas em diferentes intensidades ao longo de sua distribuição e também sofrem com a alteração, fragmentação e perda de habitats causados pela atuação humana em áreas naturais. Os microssatélites, sequências curtas e repetitivas, distribuem-se uniformemente por todo o genoma, apresentam alto grau de polimorfismo, são codominantes e seletivamente neutros e, por isso, considerados como marcadores moleculares ideais para serem usados em estudos populacionais. O fato de a região flanqueadora dos microssatélites apresentar-se extremamente conservada em algumas espécies relacionadas possibilita a utilização de marcadores microssatélites em espécies próximas àquelas para as quais foram descritos. Esse trabalho teve como objetivo descrever e caracterizar locos microssatélites para a espécie *Tayassu pecari* e testar sua aplicabilidade em estudos populacionais de *Pecari tajacu*. Para isso, foi construída uma biblioteca genômica parcial enriquecida. Tal metodologia baseia-se em três etapas principais: clivagem do DNA através de enzimas de restrição, hibridização dos fragmentos obtidos com sondas biotinizadas de sequência repetitiva e *motif* tetranucleotídico e recuperação magnética dos híbridos através da utilização de partículas magnéticas cobertas com streptavidina. Entre 192 colônias recombinantes que foram sequenciadas, foram obtidas 60 regiões repetitivas, tendo sido possível a construção de iniciadores para 19 delas. Dos iniciadores testados, 13 apresentaram um padrão satisfatório de amplificação em queixadas e 15 em catetos. Destes, dez foram polimórficos na população de queixadas analisada e 11 na de catetos. A variabilidade genética encontrada na população selvagem de queixadas estudada foi considerada moderada. Nessa população não foi encontrado desequilíbrio de ligação significativo e dois locos não se encontravam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, em virtude de um excesso de homocigotos, provocado pela presença de alelos nulos. A variabilidade genética encontrada na população cativa de catetos foi mais alta que a das queixadas, provavelmente por causa da origem diversa dos membros da população. Essa diferença também poderia ser explicada em função dos diferentes padrões de acasalamento das espécies: enquanto os bandos de queixadas parecem funcionar como unidades reprodutivas, a estrutura social mais flexível dos catetos, em vida livre, parece favorecer a maior diversidade genética nessa espécie, dessa forma, quando se estabelece uma população cativa, sua diversidade genética, que é um reflexo da diversidade total, também é maior. Foram encontrados mais indivíduos aparentados entre a população de queixadas do que na de catetos, o que pode ser uma consequência dos padrões reprodutivos das duas espécies. Os marcadores descritos aqui podem ser utilizados para estudos populacionais dessas duas espécies, que podem embasar futuros programas de manejo e conservação necessários para a manutenção das mesmas.

ABSTRACT

The tayassuidae family, order Artiodactyla, occurs exclusively in the American continent and has three extant species: *Tayassu pecari*, the White-lipped peccary, *Pecari tajacu*, the collared peccary, *Catagonus wagneri*, the chacoan peccary. The existence of a fourth species in the family, *Pecari maximus*, recently discovered, is being discussed. White-lipped peccaries occur from southern Mexico through northern Argentina, while collared peccaries have a wider distribution: from southern United States through northern Argentina. Both species play key roles in the ecosystem, being part of the trophic chain and acting as seeds predators and dispersers. They are hunted in various levels throughout their range and suffer with habitat changes provoked by humans. Microsatellites are short repetitive sequences of DNA found all over the genome and present a high degree of polymorphism, codominance and are selective neutral, therefore being considered an ideal molecular marker for population studies. The flanking regions of these microsatellites tend to be conserved among related species, which makes possible the cross amplification. The aim of this work was to describe and characterize microsatellite loci for *Tayassu pecari* and to test their applicability to population studies of *Pecari tajacu*. A partial enriched genomic library was constructed through the DNA cleavage with restriction enzymes, hybridization of the fragments with repetitive biotinylated probes and magnetic recovery of hybrids with streptavidin-coated magnetic beads. Among 192 recombinant clones that were sequenced, 60 repetitive regions were obtained. Design of primers was possible for 19 of them and they were tested in 30 individuals from a wild population of White-lipped and 23 from a captive population of collared peccaries. 13 loci amplified in the White-lipped peccary population and ten of them polymorphic. The genetic diversity in this population was considered moderate, two loci deviated from Hardy-Weinberg Equilibrium in response to the presence of a homozygous excess caused by null alleles. The genetic diversity found in the collared peccary population was slightly higher, probably due to the mixed origin of the animals. This difference may also be a result of different patterns of reproduction in the two species: while White-lipped herds seem to function as relatively closed reproductive units, the social flexibility of collared peccaries that occurs in the wild may favour the genetic diversity in the species, so when a captive population is established, its genetic diversity, as a reflex of the total genetic diversity, is also higher. There were more related individuals in the White-lipped population than were found for the collared population, which might be a consequence of the reproductive patterns of the two species. The genetic markers described here can be used in for population studies in both species, and may base future management and conservation programs for the maintenance of the peccaries.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	11
Família Tayassuidae	11
Queixadas.....	12
Catetos.....	14
Genética da Conservação	16
Uso de Microssatélites em estudos populacionais	17
O Pantanal e a Megafauna.....	19
OBJETIVOS	24
Objetivo Geral.....	24
Objetivos Específicos.....	24
JUSTIFICATIVA	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
Captura dos indivíduos	26
<i>Tayassu pecari</i>	26
<i>Pecari tajacu</i>	26
Extração de DNA.....	27
Isolamento dos Microssatélites.....	27
<i>Digestão do DNA</i>	27
<i>Ligação dos Adaptadores</i>	28
<i>Hibridização das sondas biotiniladas</i>	28
<i>Captura dos Fragmentos</i>	28
<i>Amplificação dos fragmentos de DNA enriquecidos</i>	29
<i>Miniprep</i>	30
<i>Reação de Sequenciamento</i>	31
Construção dos <i>Primers</i> e Caracterização dos Microssatélites	31
Validação dos locos	32
Teste de Amplificação Heteróloga em <i>Pecari tajacu</i>	32
Análise Estatística dos Locos Genotipados.....	33
RESULTADOS	35
Prospecção de Microssatélites e Caracterização Populacional de <i>Tayassu pecari</i>	35
Teste de Amplificação Heteróloga em <i>Pecari tajacu</i>	40

DISCUSSÃO	44
Prospecção de iniciadores para locos microssatélites em <i>Tayassu pecari</i>	44
Amplificação Heteróloga	45
Caracterização Genética Populacional de <i>Tayassu pecari</i> e <i>Pecari tajacu</i>	47
A importância de se conservar os taiassuídeos.....	49
CONCLUSÃO.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da distribuição geográfica da espécie *Tayassu pecari*, evidenciando as regiões nas quais ainda se encontra e nas quais já é considerada extinta. Adaptado de Reyna-Hurtado (2008). 12
- Figura 2.** Mapa da distribuição geográfica da espécie *Pecari tajacu*, evidenciando as regiões nas quais ainda se encontra e nas quais já é considerada extinta. Adaptado de Beck et al. 2008. 14
- Figura 3.** Mapa da porção brasileira da Bacia do Alto Paraguai, destacando a planície pantaneira (em verde mais claro) e os planaltos que a delimitam (1-4) (Uetenabaro et al. 2008). 20
- Figura 4.** Gráfico com as porcentagens de ocorrência de cada tipo de microsatélite descritos para a espécie *Tayassu pecari*. 35
- Figura 5.** Foto de gel de agarose mostrando os produtos de amplificação de amostras de queixada, obtidos para o teste de gradiente de temperatura, no qual foram testadas seis temperaturas, para os locos Tpec8, Tpec9, Tpec10, Tpec11, Tpec12 e Tpec13, estabelecidos para *Tayassu pecari*. 37
- Figura 6.** Fotos de géis de agarose a 2%, mostrando os produtos de amplificação obtidos para 27 indivíduos de queixada, utilizando-se os *primers* Tpec10, Tpec11, Tpec12 e Tpec13 nas reações de PCR. 38
- Figura 7.** Fotos de gel de agarose evidenciando os produtos de amplificação de amostras de *Pecari tajacu*, obtidos para o teste gradiente de temperatura, no qual foram testadas seis temperaturas, com os *primers* Tpec8, Tpec9, Tpec10, Tpec11, Tpec12 e Tpec13, desenvolvidos para a espécie *Tayassu pecari*. 42
- Figura 8.** Fotos de géis de agarose a 2%, mostrando os produtos de amplificação obtidos para 23 indivíduos de catetos, utilizando-se os *primers* Tpec9, Tpec10, Tpec11, Tpec12 e Tpec13 nas reações de PCR. **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação dos microssatélites prospectados, a sequência dos primers: (F) *Primer Forward* e (R) *Primer Reverse*, o motivo da repetição e o número de acesso da sequência ao GenBank. 36
- Tabela 2.** Caracterização de dez microssatélites polimórficos e três locos monomórficos isolados para a espécie *Tayassu pecari*. T_a : temperatura de anelamento. n_a : número de alelos (baseado em uma amostra de 30 indivíduos de queixadas); H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; P_{HW} : valores de significância para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg; os valores significativos, considerando a correção de Benjamini e Yekutieli ($P < 0, 01707$), estão marcados (*). 37
- Tabela 3.** Coeficiente de endogamia (F_{IS}) de cada loco e da população de queixadas analisada. P-larger: probabilidade do F_{IS} calculado ser significativamente maior que zero. P-smaller: probabilidade do F_{IS} calculado ser significativamente menor que zero (*)Valores significativos, considerando a correção de Benjamini e Yekutieli ($P < 0, 01707$). 39
- Tabela 4.** Probabilidade de Identidade (P_{id}) e *Polymorphism Information Content* (PIC) considerando dez locos de microssatélites polimórficos isolados para queixadas. 40
- Tabela 5.** Caracterização de onze microssatélites polimórficos e quatro locos monomórficos isolados para a espécie *Tayassu pecari* e testados em *Pecari tajacu*. T_a : temperatura de anelamento. n_a : número de alelos (baseado em uma amostra de 23 indivíduos de catetos); H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; P_{HW} : valores de significância para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg; os valores significativos, considerando a correção de Benjamini e Yekutieli ($P < 0, 01656$), estão marcados (*). 41
- Tabela 6.** Coeficiente de endogamia (F_{IS}) de cada loco da população de catetos analisada. P-larger: probabilidade do F_{IS} calculado ser significativamente maior que zero. P-smaller: probabilidade do F_{IS} calculado ser significativamente menor que zero (*)Valores significativos, considerando a correção de Benjamini e Yekutieli ($P < 0, 01656$). 42
- Tabela 7.** Probabilidade de Identidade (P_{id}) e *Polymorphism Information Content* (PIC) considerando onze locos de microssatélites polimórficos isolados para queixadas e testados em catetos. 42

INTRODUÇÃO

Família Tayassuidae

A subordem Suiformes, da ordem Artiodactyla, divide-se em três famílias atuais: Hippopotamidae, Suidae e Tayassuidae (Groves e Grubb 1993). A Família Tayassuidae teve sua origem no Sudeste da Ásia, no início do Eoceno, quando divergiu da família Suidae (Groves e Grubb 1993). A migração para a América do Norte ocorreu durante o final do Eoceno, entre 36 e 38 milhões de anos atrás (Ducrocq 1994). Atualmente existem três espécies pertencentes a essa família: *Catagonus wagneri*, o taguá, endêmico do Chaco Paraguai, *Tayassu pecari*, a queixada e *Pecari tajacu*, o cateto, sendo que todas ocorrem exclusivamente no continente Americano (Oliver 1993). A existência de uma quarta espécie na família, *Pecari maximus*, descrita recentemente (van Roosmalen et al. 2007), vem sendo discutida desde a publicação de sua descrição, em 2007.

O registro fóssil indica que os taiassuídeos extintos foram um dos primeiros grupos da América do Norte a migrar para a América do Sul, após a formação do istmo do Panamá (Marshall 1985), no final do Plioceno.

Segundo Gongora e Moran (2005), *T. pecari* e *C. wagneri* são mais próximos entre si do que em relação a *P. tajacu*. A divergência entre o grupo formado pelas espécies *T. pecari* e *C. wagneri* e *P. tajacu* deve ter ocorrido entre o final do Mioceno e o meio do Plioceno, ou seja, antes da colonização da América do Sul. Já a divergência entre as queixadas e os taguás provavelmente aconteceu entre o final do Plioceno e o início do Pleistoceno, quando o ancestral comum dessas duas espécies já ocupava a América do Sul (Theimer e Keim 1998).

P. maximus, por sua vez, seria mais próximo dos catetos (van Roosmalen et al. 2007) do que das outras espécies da família. A existência dessa espécie, no entanto, tem sido contestada, por ser considerado que as características genéticas, morfológicas, comportamentais e ecológicas analisadas por van Roosmalen et al. (2007) foram limitadas e insuficientemente analisadas (Gongora 2008; Gongora et al. no prelo). De acordo com Gongora et al. (no prelo), as características descritas para a suposta nova espécie coincidem com o extremo máximo da distribuição dessas características tanto em catetos como em queixadas. Além disso, descobriram que os dados moleculares apresentados por van Roosmalen et al. coincidem com os já reportados para as diferentes subespécies de *P. tajacu*. Para a confirmação do *status* de nova espécie conferido à *P. maximus*, são necessários mais

estudos e amostragem mais ampla, tanto do ponto de vista ecológico e comportamental, bem como um levantamento mais compreensivo da genética desse grupo, através da utilização de marcadores moleculares mais informativos.

Queixadas

Atualmente, as queixadas distribuem-se do sul do México até o norte da Argentina (Mayer e Wetzel 1987; March 1993, Figura 1). Dentro dessa grande área, habitam florestas tropicais (Amazônica e Mata Atlântica), pantanal e cerrados e, apesar de não ser encontrado na caatinga brasileira, também habitam regiões áridas da Argentina (Tiepolo e Tomas 2006).

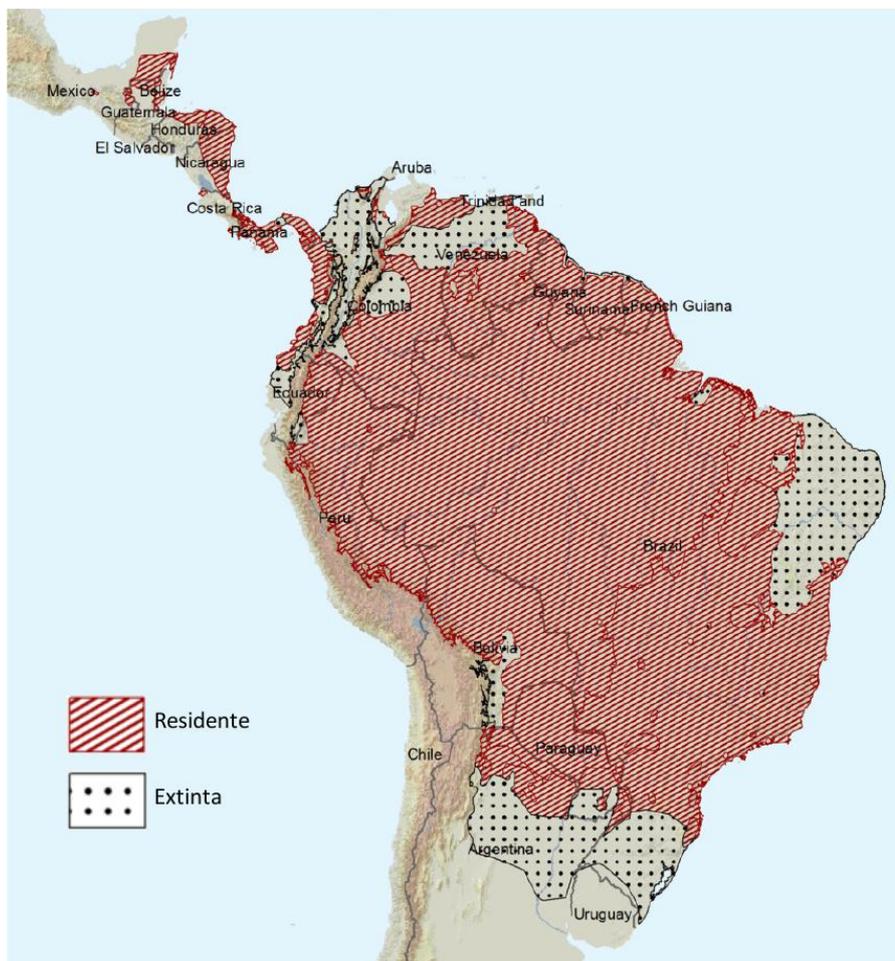


Figura 1. Mapa da distribuição geográfica da espécie *Tayassu pecari*, evidenciando as regiões nas quais ainda se encontra e nas quais já é considerada extinta. Adaptado de Reyna-Hurtado (2008).

É considerada como uma espécie frugívora, embora possa se alimentar também de caules, folhas e até mesmo restos animais (Kiltie 1981; Kiltie e Terborgh 1983; Barreto et al. 1997; Altrichter et al. 2001), sendo esse último item de sua dieta um complemento importante, que pode estar relacionado ao seu sucesso reprodutivo (Bodmer 1989).

Um adulto médio pesa em torno de 33 kg, sendo as fêmeas maiores que os machos. A espécie apresenta pelagem comprida e dura, de coloração marrom escuro a negra, com uma mancha clara ao longo da mandíbula, de onde vem o nome popular de “queixada” (Tiepolo e Tomas 2006). As queixadas são encontradas ativas em qualquer hora do dia ou da noite, embora pareça haver uma preferência pelas primeiras horas da manhã (Nascimento 2004).

T. pecari forma bandos grandes, muitas vezes excedendo os 200 indivíduos (Mayer e Wetzel 1987, March 1993). No entanto, vem se tornando cada vez mais difícil o encontro com bandos desse tamanho, já que se restringem a grandes áreas contínuas de florestas remanescentes (Tiepolo e Tomas 2006). Por ser a única espécie de ungulado neotropical a formar bandos grandes, extinções locais podem apresentar impactos profundos na biodiversidade da floresta (Groves e Grubb 1993), uma vez que não há redundância ecológica nesse aspecto.

As queixadas possuem uma glândula dorsal que produz uma secreção de forte odor, responsável pelo reconhecimento individual e pela coesão social dos bandos (March 1993), dentro dos quais há uma hierarquia social, na qual as posições mais altas são ocupadas pelos machos. Essa organização diminui a ocorrência de interações agonísticas que, quando acontecem, são, geralmente, ritualizadas. Os machos dominantes também tem prioridades no acasalamento (Byers e Bekoff 1981).

Observações de queixadas em floresta contínua mostram que esses animais ocupam um grande espaço territorial (Fragoso 1998; Carrillo et al. 2002; Keuroghlian et al. 2004) e seus movimentos e sua distribuição no ambiente podem ser uma resposta à disponibilidade de frutos (Bodmer 1990; Carrillo et al. 2002). O padrão de movimentação e ocupação territorial é ora descrito como migratório (e.g. Bodmer 1990), ora como nômade (e.g. Kiltie e Terborgh 1983; March 1993). Apesar dessa divergência; é consenso que a espécie necessita de uma grande área de vida.

Catetos

Os catetos possuem uma maior distribuição geográfica que as queixadas, estando presentes desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina (Figura 2, Bodmer e Sows 1993), sendo a mais plástica das espécies e ocupando a maior variedade de habitats da família (Castellanos 1983; McCoy et al. 1990; Suarez 1993; Taber et al. 1994; Judas e Henry 1999; Bodmer e Sows 1993; Tiepolo e Tomas 2006).



Figura 2. Mapa da distribuição geográfica da espécie *Pecari tajacu*, evidenciando as regiões nas quais ainda se encontra e nas quais já é considerada extinta. Adaptado de Beck et al. 2008.

Os hábitos alimentares são bastante similares àqueles das queixadas (Kiltie 1981; Kiltie e Terborgh 1983; Barreto et al. 1997; Altrichter et al. 2000), no entanto, sendo a espécie de maior adaptabilidade, sua alimentação pode ser grandemente influenciada pelo habitat de cada população (Kiltie 1981; Bodmer 1989; Bodmer e Sows 1993). Apresentam atividade diurna e crepuscular, alimentando-se, geralmente, nas primeiras horas da noite

(Sowls 1984; Nascimento et al. 2004). Essa espécie é a de menor porte entre as três espécies de *Tayassuidae* existentes (Bodmer e Sowls 1993). A pelagem varia de marrom a negra, salpicada de branca; possui uma crina de pelos mais longos que se estende até as ancas e possui um colar branco sobre o pescoço, disposta de forma oblíqua desde o dorso até os ombros (Tiepolo e Tomas 2006).

Como todos os *taiassuídeos*, são animais altamente sociais, mas que formam bandos menores, geralmente, entre dois e 50 indivíduos (Robinson e Eisenberg 1981). Descansam em grupos pequenos, de três ou quatro indivíduos (Sowls 1984) e podem juntar-se temporariamente para explorar um recurso abundante (Castellanos 1983). Os grupos sociais, formados por machos e fêmeas, são mantidos através de vocalizações e de sinais olfativos, liberados pela glândula dorsal (Byers e Bekoff 1981), tal como as queixadas. As diferenças observadas entre catetos e queixadas quanto à conformação de seus bandos tem uma grande importância para a conservação dessas espécies, uma vez que influem na suscetibilidade à pressão de caça (Peres 1996): a formação de um bando maior permite que mais animais sejam abatidos por empreitada (Kiltie 1980), fazendo com que as queixadas sejam mais ameaçadas por essa pressão específica do que os catetos.

Essas duas espécies vivem em simpatria na maior parte de sua ocorrência (Grubb e Groves 1993). A co-ocorrência dessas espécies deve-se a alguns aspectos comportamentais que divergem entre as mesmas, causando uma diferenciação de nicho. Kiltie (1982) propôs que a força da mandíbula poderia ser um fator de diferenciação: queixadas, que apresentam maior força na mordida, exploram sementes mais duras que aquelas consumidas por catetos, apesar de haver bastante sobreposição nos itens alimentares consumidos pelas duas espécies (Barreto et al. 1997). As queixadas também parecem apresentar uma predileção por habitats mais úmidos que os catetos (Bodmer 1990; Keuroghlian e Eaton 2008; Vidolin et al. 2008). Fragoso (1999) sugeriu que poderia haver uma diferenciação no modo como essas duas espécies percebem o ambiente e, conseqüentemente, na maneira como o exploram: em virtude do tamanho e da maior rigidez social do grupo, as queixadas enxergam o mosaico de ambientes de uma maneira mais ampla que os catetos e, dessa forma, ocupam nichos diferentes em um dado momento. Nascimento et al. (2004) apontam também para a diferença no horário de preferência para alimentação como um fator de diferenciação.

Tanto os catetos quanto as queixadas possuem papéis ecológicos fundamentais. Representam uma importante parcela da alimentação de grandes felinos. As onças pardas, por exemplo, são capazes de tolerar razoavelmente bem mudanças no ambiente em

decorrência da ação humana, desde que essas não se traduzam em redução na disponibilidade de suas presas (Redford e Fonseca 1986, Silva 1994). São também importantes na dinâmica da regeneração florestal, uma vez que atuam como predadores e dispersores de sementes (Kiltie 1981; Bodmer 1991; Altrichter et al. 2001).

As duas espécies são afetadas por perda e destruição de habitats, fragmentação e caça (Cullen Jr. 2000), embora *T. pecari* seja mais vulnerável. Em alguns locais de sua ocorrência, no entanto, essas pressões são mais ou menos importantes, dependendo do bioma no qual se encontram, da cultura da população local e do estado de conservação da região. Na floresta amazônica (não apenas na parte brasileira), por exemplo, a caça, principalmente a ilegal, realizada para obtenção de carne e peles para o comércio, é um fator mais determinante que a fragmentação e a perda de habitats (Peres 1996; Bodmer et al. 1988). Nessa região *T. pecari* e *P. tajacu* são as espécies cinegéticas mais exploradas (Kiltie 1980; Redford e Robinson 1987). Já nas regiões mais meridionais de sua ocorrência, onde a ocupação humana é mais intensa, a fragmentação e conseqüente diminuição da área disponível para ocupação parece ser mais determinante, embora ocorra em sinergismo com a caça ilegal (Cullen Jr. 2000; Keuroghlian et al. 2004); tanto que, dos sete estados do sul e sudeste do país, essas espécies encontram-se em algum grau de ameaça em seis (Chiarello et al. 2008). Nessa região também vem sendo reportada queda na freqüência de avistamento e declínios populacionais, sobretudo de queixadas (Araújo et al. 2008; Neri 2004). Além disso, essas espécies constam no Apêndice II do Cites, a Convenção Internacional sobre o Comércio de Espécies Ameaçadas, do qual o Brasil é signatário. Nesse apêndice constam aquelas espécies que, embora não estejam imediatamente ameaçadas de extinção, podem passar a sê-lo, caso seu o comércio não seja fortemente regulado (CITES 2010).

Genética da Conservação

A Biologia da Conservação é um campo multidisciplinar, que se desenvolveu bastante nos últimos dez anos em resposta a atual crise da biodiversidade e tem como objetivos, além de entender como as alterações antrópicas afetam as espécies, comunidades e ecossistemas, usar esse conhecimento na prevenção da extinção de espécies (Primack e Rodrigues 2001).

A biodiversidade geralmente é considerada em três níveis: dos genes, das espécies e dos ecossistemas. A diversidade genética compreende a variação de genes e alelos em um grupo taxonômico, responsável por conferir-lhe potencial evolutivo (Frankham et al. 2008). A Genética da Conservação preocupa-se, então, essencialmente em manter o potencial evolutivo nos ecossistemas naturais. Sendo assim, o tempo dos processos com os quais lida difere significativamente do tempo de ação para que esses processos sejam mantidos, frente à atuação humana nos sistemas naturais (Frankel 1994).

Espécies ameaçadas estão expostas a fatores determinísticos (como destruição e fragmentação de habitats, super-exploração ou poluição) ou estocásticos (demográficos, genéticos ou catastróficos) que podem levá-las à extinção (Shaffer 1981). Tais espécies usualmente apresentam reduzido tamanho populacional, ou estão em declínio, o que pode aumentar sua suscetibilidade à extinção, uma vez que em populações pequenas a perda de diversidade genética é intensificada e isso pode causar prejuízos como redução no tamanho populacional efetivo, depressão endogâmica e perda de potencial evolutivo (Frankham et al. 2008).

Há vários tipos de marcadores moleculares que podem ser utilizados no estudo de populações, e a decisão de qual o marcador ideal para cada tipo de análise depende do objetivo da mesma (Vignal et al. 2002). Dentre os marcadores disponíveis, os microssatélites são os que vem sendo mais largamente aplicados em estudos de genética populacional nas últimas décadas.

Uso de Microssatélites em estudos populacionais

Os microssatélites, também chamados de *Simple Sequences Repeat* (SSR) ou *Short Tandem Repeats* (STR), são sequências curtas de DNA, de um a seis pares de bases, repetidas em *tandem*, que podem ser largamente encontradas no genoma dos eucariotos (Tautz e Renz 1984, Tautz 1989). Estão presentes em regiões codantes, íntrons ou regiões não codantes e são caracterizados pelo elevado polimorfismo detectado em seus locos (Zane et al. 2002). Os microssatélites podem ser classificados de acordo com o número de nucleotídeos de suas unidades repetitivas (*motifs* ou motivos) em mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ou hexanucleotídeos. Em relação à composição, podem ser classificados em perfeitos, quando não há nenhuma base interrompendo a sequência, imperfeitos, quando há uma única base interrompendo a sequência, interrompidos, quando uma pequena

sequência encontra-se dentro dos motivos ou compostos, quando dois microssatélites estão justapostos (Oliveira et al. 2006).

Para explicar as altas taxas de mutação presentes nesses locos, que variam de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por loco por geração (Schlötterer 2000), várias hipóteses tem sido aventadas: *Crossing-over* desigual, durante o qual ocorre inserção em um cromossomo e deleção em seu homólogo (Oliveira et al. 2006) ou deslize da DNA polimerase (DNA *slippage*), durante a replicação ou reparo da sequência de DNA (Strand et al. 1993), provocando uma variação no número de repetições (Schlötterer 2000). Assim, os diferentes alelos de um loco microssatélite são caracterizados por seus tamanhos, determinados pelo número de repetições (Estoup et al. 1999) e o acúmulo desse tipo de variação ocorre mais rapidamente do que mutações pontuais ou eventos de inserção/deleção (Brown et al. 1986).

O modelo teórico *Stepwise Mutation* (SM) é um dos modelos para a descrição de como ocorre a evolução dos microssatélites. Segundo esse modelo, cada mutação pode aumentar ou diminuir uma repetição, com a mesma probabilidade (Kimura e Otha 1978). De acordo com o modelo *Infinity alleles* (IA), cada mutação cria um alelo novo e o número de repetições varia aleatoriamente. Di Rienzo et al. (1994), no entanto, considera o modelo *Two-phase* (TP) mais apropriado, pois considera que na maior parte das vezes a mutação causa a alteração de apenas uma repetição, mas não exclui a possibilidade de alterarem-se várias repetições em um único evento (Oliveira et al. 2006). Deste modo, o modelo TP englobaria melhor a complexidade na evolução desses marcadores.

Dentre todas as classes de marcadores moleculares, os microssatélites são os que mais se aproximam de um marcador ideal para o estudo de genética de populações, pois são abundantes e distribuídos uniformemente pelo genoma, são codominantes e altamente polimórficos, possuindo o maior conteúdo informativo por loco de todos os marcadores moleculares. Como são mais raros na região codificadora, esses marcadores não estão tão sujeitos à ação da seleção natural, ou seja, são seletivamente neutros, outra vantagem no estudo de populações naturais (Weber e Wong 1993).

As sequências que flanqueiam os locos microssatélites usualmente são bem conservadas dentro de uma mesma espécie, o que permite a confecção de *primers* específicos a serem usados em reações de PCR (*Polymerase chain reaction*) para amplificar os fragmentos contendo as sequências repetitivas. A presença de regiões flanqueadoras altamente conservadas tem sido observada também entre espécies relacionadas (Moore et al. 1991), o que possibilita que microssatélites possam ser utilizados em estudos

populacionais de espécies próximas. Geralmente, o número de locos heterólogos que amplificam com sucesso decai com o aumento da divergência entre as espécies (Moore et al. 1991; Peakall et al. 1998; Primmer et al. 2005). Apesar disso, a utilização de locos heterólogos tem apresentado sucesso em uma grande gama de espécies (e. g. Yin et al. 2009; Machado et al. 2009; Ma et al. 2009). Considerando que o isolamento de novos locos microssatélites exige investimento e tempo consideráveis, o uso de locos já descritos para outras espécies pode ser uma alternativa viável para estudos populacionais (Wilson et al. 2004).

O Pantanal e a Megafauna

O Pantanal Brasileiro é a maior planície inundável do mundo, ocupando cerca de 38% da área da Bacia do Alto Paraguai, o que corresponde a 138.183 km² (Silva e Abdon 1998). O Pantanal ocorre nos estados brasileiros de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Figura 3), sendo este último responsável por aproximadamente 65% da área dessa fisionomia (Silva e Abdon 1998) e se estende para a Bolívia e o Paraguai (Carvalho 1986).

O Pantanal é uma bacia sedimentar formada no período quaternário e preenchida com sedimentos aluviais da bacia do Alto Paraguai. A baixa declividade, que dificulta o escoamento da água, propicia o aparecimento de ambientes característicos, associados à vegetação em mosaico (Adámoli 1982). O cerrado corresponde à formação mais representativa da vegetação do Pantanal (36%), seguida pelos campos naturais (31%). Floresta estacional semidecidual de terras baixas e matas de galeria ocupam, juntas, aproximadamente 6 % da área do Pantanal (Silva et al. 2000).

O clima é quente, com pluviosidade média entre 800 e 1400 mm/ano, sendo que 80% da chuva concentra-se nos meses de novembro a março (Cadavid-Garcia 1984), e há uma defasagem entre o pico das chuvas e os picos de inundação (Cole 1960), que varia regionalmente.

As inundações, que ocorrem de forma periódica na região, são provocadas por um gradiente topográfico extremamente suave, que dificulta o escoamento da água proveniente do planalto adjacente (Carvalho 1986). De acordo com o conceito de pulso de cheia, proposto por Junk et al. (1989), tanto a alta biodiversidade quanto a grande produtividade presentes nesse ecossistema ocorrem em função das cheias: a cada ciclo de cheia a decomposição dos materiais orgânicos e inorgânicos contribui para a alta produtividade,

além de fornecer larga diversidade de habitats e nichos, suportando elevado número de espécies, que mantêm entre si níveis baixos de competição (Alho e Gonçalves 2005). O Pantanal tem uma grande importância biogeográfica na região central da América do Sul, pois atua como barreira à dispersão de algumas espécies, enquanto funciona como um corredor de biodiversidade para outras, propiciando seu fluxo gênico, além de servir como criadouro de muitas espécies animais (Brown Jr. 1986, pg. 137).

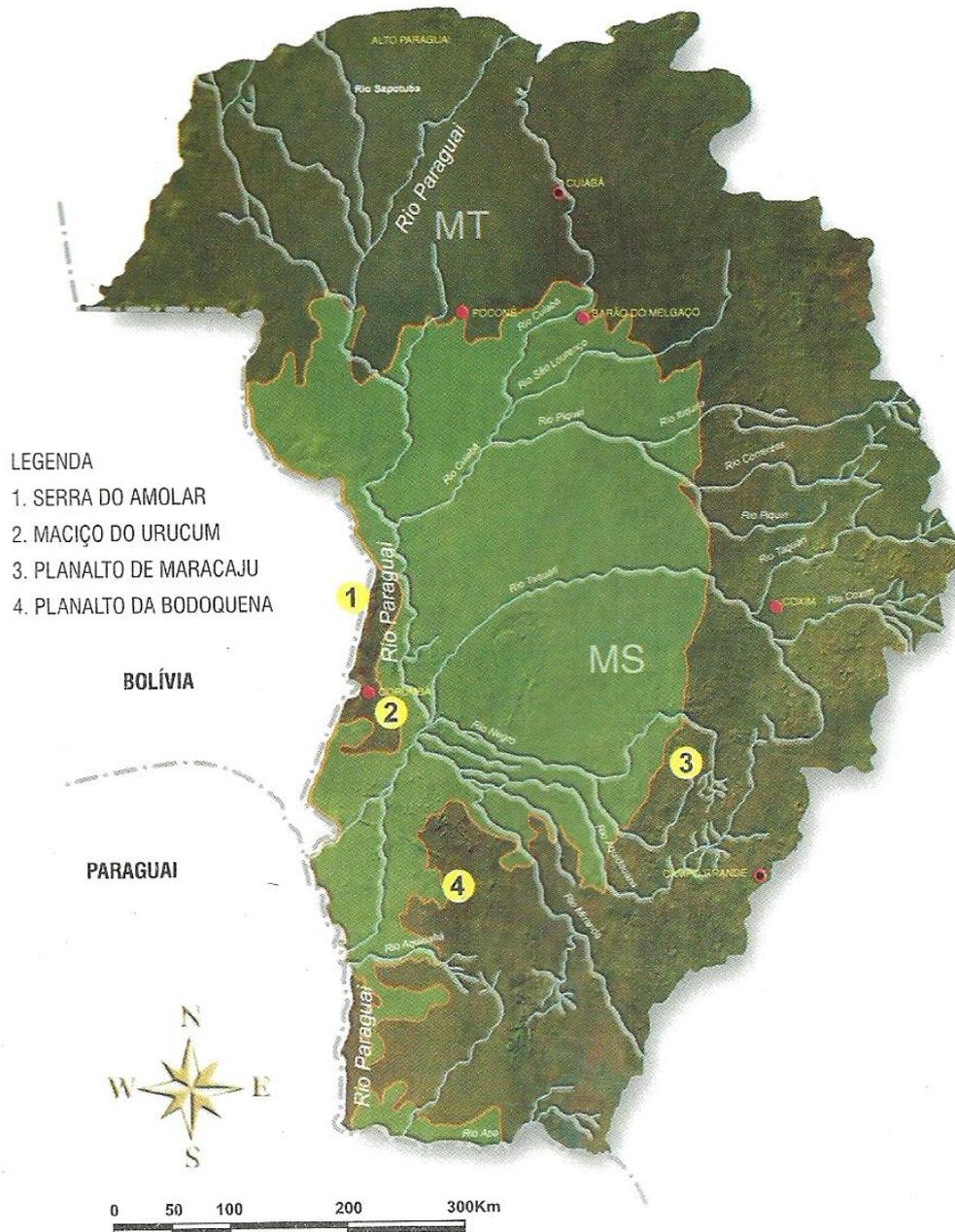


Figura 3. Mapa da porção brasileira da Bacia do Alto Paraguai, destacando a planície pantaneira (em verde mais claro) e os planaltos que a delimitam (1-4) (Uetenabaro et al. 2008).

Assim como na composição florística, a fauna pantaneira sofre impressionante influência do Cerrado e, em menor escala, da região amazônica e chaquenha (Rodrigues et al. 2002).

Cerca de 120 espécies de mamíferos ocorrem no Pantanal (Mourão et al. 2000; Tomas et al. 2000). A região não possui altos níveis de endemismo (Müller 1973; Freitas 2003), quando comparada a outros biomas brasileiros (Myers et al. 2000) apesar de surpreender pela diversidade e alta densidade populacional que suporta (Brown Jr. 1996; Rodrigues et al. 2002; Alho e Gonçalves 2005; Lacher Jr. et al. 1986), abrigando populações de algumas espécies ameaçadas, como o cervo-do-pantanal, os tamanduás e a onça-pintada (Alho e Gonçalves 2005). Tanto que é considerado como um dos 200 locais mais importantes para a conservação da biodiversidade mundial (Olson e Dinerstein 1998).

Há uma variação sazonal na abundância de mamíferos, relacionada à sazonalidade dos habitats criados pelos ciclos de cheia-enchente. Os campos inundáveis representam o tipo de hábitat preferido pela maior parte das espécies, nos quais há uma maior frequência de avistamento durante o período de seca, quando estão expostos, seguido pela fisionomia cerradão e matas galerias (Mamede e Alho 2006).

Em recente revisão (Machado et al. 2006), foram delimitadas 294 áreas prioritárias para conservação no Cerrado e no Pantanal, frente à 87 indicadas pelo Ministério do Meio Ambiente em 1998 (MMA 2002). Essas áreas localizam-se em *fronts* de expansão de atividades agropecuárias. Machado et al. (2006) indicam, por isso, uma preocupação muito grande em relação à necessidade de se estabelecerem políticas de regulamentação do uso do solo nessa região, considerando que, se for deixado para que as relações comerciais determinem qual será o uso da terra, certamente muitas áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade serão impactadas pela expansão do agronegócio.

As ameaças mais proeminentes ocorrem em virtude de sua irreversibilidade e pela extensão dos impactos causados aos processos ecológicos relacionados aos ciclos de cheia, mais determinantes do funcionamento do ecossistema e responsáveis por sua biodiversidade (Freitas 2003). Apesar de a mudança nos cursos d'água ocorrer naturalmente, em razão da sedimentação, causada pelo lento escoamento (Assine 2003), a alteração no uso do solo vem acelerando esse processo e mudando seu padrão natural. O Pantanal é fortemente dependente dos planaltos adjacentes, uma vez que todo o fluxo de água é proveniente do mesmo. O desmatamento e a alteração do uso do solo nessas regiões aumentam a erosão nos planaltos e sedimentação dos cursos d'água da planície, modificando fluxo de água em todo o sistema (Freitas 2003; Harris et al. 2005). O efeito

cumulativo da construção de diversas barragens; inclusive das consideradas pequenas centrais hidrelétricas, pode alterar o regime natural de cheias (Girard 2002). A construção da Hidrovia Paraguai-Paraná, projetada para a região, que visa à utilização dessas duas bacias como via de escoamento da produção agrícola, também terá uma forte influência na hidrodinâmica, além de apresentar altos riscos de acidentes ambientais (Harris et al. 2005).

A pecuária, atividade tradicional na região, vem se intensificando nas últimas décadas. Com isso, estima-se que aproximadamente 40% dos habitats florestados do pantanal tenham sido convertidos em pastagens, com plantio de espécies exóticas, até o ano de 2000 (Padovani et al. 2004; Harris et al. 2005). O fogo, usualmente utilizado para a renovação de pastagens e controle de pragas, como o carrapato, frequentemente sai de controle, causando incêndios, que danificam toda a biota, é uma grande ameaça, sobretudo no período das secas (Macedo et al. 2009).

Além de gramíneas para forragem, espécies animais exóticas também foram introduzidas no pantanal e algumas dessas populações se tornaram ferais, como o búfalo (*Bubalus bubalis*) e o porco-monteiro (*Sus scrofa*). O búfalo foi introduzido como alternativa à criação de gado nelore na região (Harris et al. 2005). Apesar de não haver estudos sobre os impactos causados por essa espécie no Pantanal, é sabido que ela tem causado danos ambientais de toda a sorte em planícies alagáveis da Austrália, em virtude de sobrepastejo, pisoteamento e compactação do solo (Hill e Webb 1982; Bayliss e Yeomans 1989). O impacto das populações ferais de *S. scrofa* sobre as espécies de taiassuídeos nativos ainda não é bem conhecida, embora se saiba que os recursos explorados por essas espécies coincidem (Herrea et al. 1996). Não obstante, a situação preocupa, já que essa espécie encontra-se agora abundante (Alho et al. 1987) e amplamente distribuída pelos diversos tipos de habitats do pantanal (Gonela 2005; Mourão et al. 2002; Graves 1984). Em diversos locais do mundo porcos ferais são considerados pragas: competem por recursos com espécies nativas, além de poder lhes transmitir doenças, e alteram o padrão de regeneração vegetal natural, causando impactos negativos nos ecossistemas (Oliver e Brisbin, 1993). Apesar disso, sua caça tem sido usada como alternativa para o consumo local de carne (Harris et al. 2005), o que pode, talvez, diminuir o efeito dessa pressão sobre catetos e queixadas.

A expansão do setor agrícola, altamente tecnificado e com vistas ao mercado externo, no centro-oeste brasileiro tem aumentado o uso de agrotóxicos, muitas vezes sem o controle necessário (Silva et al. 2004). Já foram constatadas contaminações de rios do Pantanal por diversos agrotóxicos (Alho et al. 1998; Mourão et al. 2002). A mineração de

ouro na região de Poconé era feita, até meados dos anos 1990, com o auxílio de mercúrio. Mesmo após quase duas décadas de sua proibição, ainda são detectáveis contaminações pelo metal na cadeia trófica local (Vieira et al. 2004; Fonseca et al. 2004).

Na região, a caça de taiassuídeos para consumo de carne é uma fonte de ameaça menor, quando comparada a outros fatores, como a perda de habitats e o manejo inadequado dos recursos hídricos, provavelmente por causa da baixa densidade populacional do pantanal (Cordeiro 2004). O comércio ilegal de peles e o tráfico de animais vivos é mais expressivo e ameaça diversas espécies, como papagaios, araras e jacarés (Firmino 2003), além dos taiassuídeos. A perseguição de grandes predadores, especialmente as onças parda e pintada, por parte de criadores de gado, sob o pretexto de proteção dos rebanhos vem reduzindo as densidades populacionais desses animais (Alho 1986; Crawshaw 2002; Dalponte 2002). Embora a caça na região não seja uma ameaça muito grande aos taiassuídeos, considerando toda a sua distribuição geográfica, este é um fator muito significativo para a conservação dessas espécies.

Atualmente menos de 3% de toda a área da Bacia Hidrográfica do Alto Paraguai encontra-se sob algum regime oficial de proteção (Harris et al. 2005). As áreas estabelecidas para a conservação da biodiversidade, então, englobam apenas uma reduzida fração daquela encontrada na região pantaneira e, infelizmente, muitas dessas unidades não são eficientemente protegidas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética de uma população selvagem de *T. pecari* do Pantanal Sul Mato-grossense.

Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar iniciadores e locos microssatélites para a espécie *T. pecari*;
- Avaliar a diversidade genética dessa espécie em uma população do Pantanal;
- Apresentar dados sobre a variabilidade genética dessa espécie que possam contribuir na elaboração de esquemas de manejo adequados às reais necessidades das queixadas;
- Uma vez que a prospecção de microssatélites é dispendiosa, tanto em termos econômicos quanto em relação ao tempo que demanda, esse trabalho também visou testar a aplicabilidade dos iniciadores descritos na espécie relacionada *P. tajacu*, bem como avaliar seu potencial em elucidar questões populacionais para essa espécie.

JUSTIFICATIVA

O exemplo da Mata Atlântica e de alguns países da América Latina, como Colômbia e Equador (Grubb e Groves 1993; Reyna-Hurtado 2008), nos mostram o futuro de *T. pecari* caso o histórico de superexploração não seja revertido a tempo. Entender a biologia dessa espécie em ambientes relativamente bem conservados, desde seu comportamento até sua estruturação genética, pode ser útil no planejamento de estratégias de conservação em qualquer ambiente, seja qual for seu grau de alteração. Marcadores microssatélites são ferramentas poderosas para a inferência desses aspectos.

Os taiassuídeos são espécies de grande importância econômica, tanto em relação à subsistência de populações tradicionais, quanto em relação à comercialização (legal e ilegal) de seu couro e sua carne. Taiassuídeos também possuem um importante papel na manutenção da diversidade local dos ecossistemas que os abrigam. Dessa forma, são necessários esforços para ampliar o conhecimento dessas espécies, visando a construção de sistemas de uso sustentável, de forma a manter seu potencial econômico indefinidamente.

Além disso, apesar de o Pantanal ainda se apresentar uma área contínua, a expansão de unidades de produção agropecuária na região tende a fragmentá-lo, prejudicando a existência de taiassuídeos, sobretudo das queixadas, mais exigentes em termos de qualidade área e qualidade ambiental.

MATERIAL E MÉTODOS

Captura dos indivíduos

Tayassu pecari

Os indivíduos de um bando de queixadas foram capturados na Fazenda Rio Negro (19°34'52" S; 56°14'74" O), localizada no Pantanal Sul Mato-grossense, na região do médio Rio Negro. Os indivíduos foram capturados através do uso de armadilhas-caixa com mandioca e milho, ou em dois chiqueiros de 2,5m x 2,5m e um chiqueirão de 5m x 5m, também com mandioca e milho à disposição, que foram dispostos em locais onde esses animais costumavam freqüentar. As armadilhas eram armadas ao entardecer e checadas no dia seguinte, pela manhã, sendo a distância entre os pontos de captura, no mínimo, 1000m em linha reta. Foram feitas 24 expedições a campo, divididas igualmente entre os períodos de cheia e seca. Os animais capturados eram sedados com zolazepam–tiletamine (Zoletil, 0,9ml/10kg) com o auxílio de uma zarabatana. A coleta de sangue era feita por uma veia superficial localizada cranialmente à região da articulação femoro-tíbio-patelar e as amostras de sangue coletadas eram armazenadas em tubos de coleta à vácuo com EDTA, mantidas sob refrigeração até o momento da extração de DNA. Após a coleta de sangue, os animais eram devolvidos, nas armadilhas, ao mesmo local no qual haviam sido capturados e eram liberados assim que estivessem totalmente recuperados dos efeitos da anestesia.

Pecari tajacu

Também foram estudados um total de 23 indivíduos de *Pecari tajacu* de uma população cativa da Fazenda Vale Verde, localizada em São Miguel Arcanjo, São Paulo. Essa população é composta por indivíduos capturados em diversos locais do Brasil, além de alguns animais provenientes de zoológicos.

É importante esclarecer que a coleta de material genético de queixada foi realizada pelo grupo de pesquisa da Wildlife Conservation Society of Brazil, sob a coordenação de Alexine Keuroghlian, entre janeiro de 2001 e agosto de 2006 e que a coleta do material genético de cateto foi realizada por Cibele Biondo, em 2002.

Extração de DNA

DNA de um indivíduo de *T. pecari* da população natural foi extraído de uma amostra de sangue utilizando-se o protocolo Standard Proteinase K e Fenol-clorofórmio, descrito por Sambrook (1989).

O sangue foi colocado em um *Eppendorf* de 1,5mL com álcool, centrifugado rapidamente e o excesso de álcool foi retirado com o auxílio de uma pipeta. Foram acrescentados 500µL da solução de digestão, o material foi agitado e deixado em banho-maria por uma hora a 37°C. Foram colocados 7µL de proteinase K 10mg/mL e o tubo foi deixado em banho-maria por mais duas horas a 42°C, tendo sido agitado suavemente a cada meia hora. O volume foi dobrado pelo acréscimo de fenol:clorofórmio, agitado por cinco minutos e centrifugado por 15 minutos a 10000 rpm. Ao sobrenadante foi acrescentado NaCl 5M, e posteriormente precipitado com a adição de etanol 100% gelado e centrifugação por dez minutos. O sobrenadante foi descartado e o material foi lavado com 500µL de etanol 70% gelado, deixado secar em estufa e diluído em TE.

Isolamento dos Microssatélites

Digestão do DNA

Aproximadamente 4µg do DNA extraído foi digerido com as enzimas de restrição *Rsa* I (GE Healthcare), de acordo com a reação abaixo:

Reagente	Volume
Tampão da Ligase 10x NEB	2,5µL
BSA 100x	0,25µL
NaCl 5M	0,25µL
<i>Rsa</i> I	1,0µL
<i>Xmn</i> I	1,0µL
Total	5,0µL

A solução foi deixada no Termobloco a 37°C *overnight*. Após o período da digestão, todo o produto foi aplicado em um gel de agarose 1%; através da comparação com o marcador de peso molecular *Mass Ruller*, foram selecionados os fragmentos entre 400 e 1000pb. Os pedaços do gel contendo os fragmentos de interesse foram purificados com o Kit “*Wizard SV Gel and PCR Clean-up System*”, da Promega.

Ligação dos Adaptadores

Todo o DNA purificado foi ligado aos adaptadores, ou *linkers*, conforme proposto por Hamilton et al. 1999. Os *linkers* foram inseridos nas duas extremidades dos fragmentos de interesse, com o objetivo de criar sítios de ligação para a realização das próximas PCRs.

A reação de ligação se deu conforme descrito a seguir:

Reagentes	Volume
<i>Linkers</i> (dupla fita)	7,0 μ L
T ₄ DNA Ligase	2,0 μ L
Tampão da T ₄ DNA Ligase	1,5 μ L
H ₂ O Milli-Q	4,5 μ L
Total	15,0 μ L

Hibridização das sondas biotiniladas

Os fragmentos de DNA ligados aos *linkers* foram, então, hibridizados com um conjunto de oito sondas biotiniladas: (AAAC)₆, (AAAG)₆, (AATC)₆, (AATG)₆, (ACCT)₆, (ACAG)₆, (ACTC)₆, (ACTG)₆. A reação, descrita a seguir, foi realizada de acordo com o seguinte programa do Termociclador: Desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de uma rápida queda de temperatura para 70°C, e reduções de 0,2°C a cada 5 segundos, até atingir a temperatura de 50,2°C. Em seguida, permaneceu a 50°C por 10 minutos, e foi posteriormente reduzida em 0,5°C a cada 5 segundos, até atingir 40°C. A reação foi deixada no termociclador *overnight*.

Reagentes	Volume
Solução Hyb (12x SSC, 0,2% SDS)	25 μ L
“Mix” de sondas biotiniladas	5 μ L
DNA ligado aos <i>linkers</i>	10 μ L
H ₂ O	10 μ L
Total	50 μ L

Captura dos Fragmentos

Para a captura dos fragmentos candidatos foi utilizado o Kit *Streptavidin Magnosphere Paramagnetic Particles*, da Promega, seguindo as instruções do fabricante, a saber: o conteúdo de *Streptavidin-Paramagnetic Particles* foi agitado, até que todas as partículas estivessem dispersas; o tubo foi, então, colocado na coluna magnética. Assim que todos os *beads* se encontraram concentrados na parede lateral do tubo, o sobrenadante foi descartado, tomando-se o cuidado de não retirar nenhum *bead*. O mesmo processo foi repetido por

mais três vezes, adicionando-se sempre 300µL de 0,5 x SSC, seguido por uma última lavagem com 100µL de 0,5 x SSC. Todo o conteúdo da reação de hibridização foi adicionado ao tubo contendo as sondas e deixado à temperatura ambiente por dez minutos. O conteúdo foi gentilmente misturado, através da inversão do tubo, por dois minutos. Os *beads* foram mais uma vez capturados com o auxílio da estante magnética e o sobrenadante foi retirado, com o cuidado de não dissolver o *pellet*. As partículas foram lavadas quatro vezes com 300µL de 0,1xSSC, sendo que após a última lavagem o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de partículas magnéticas foi dissolvido em 100µL de água. As sondas foram capturadas e o DNA eluído, transferido para um novo tubo; foram, então, dissolvidas em mais 150µL de água, totalizando um volume final de 250µL. O DNA enriquecido foi precipitado com 25µL de NaOAc (3M) e 550µL de etanol 95% e deixado por 30 minutos no freezer a -80°C. Após passar por uma centrifugação de dez minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com 500µL de etanol 70%, que, então, foi centrifugado por mais um minuto. Após ter secado, o *pellet* foi dissolvido em 25µL de tampão TLE.

Amplificação dos fragmentos de DNA enriquecidos

Após a captura dos fragmentos candidatos a terem sequências de microssatélites, uma PCR foi realizada, com um *primer* não fosfatado complementar ao *linker*, com o objetivo de aumentar o número desses fragmentos, que, posteriormente, seriam clonados.

Reagentes	Volume
Tampão de amplificação 10x	5,0µL
BSA	5,0µL
dNTP (2,5mM Cf 150µL)	3,0µL
SuperSNX-24 (10µM Cf 0,5µL)	2,5µL
MgCl ₂ (25mM Cf 2mM)	4,0µL
H ₂ O	25,2µL
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/µL)	0,3µL
DNA enriquecido	5,0µL
Total	50,0µL

A reação ocorreu em um termociclador com a seguinte programação: desnaturação inicial de 95°C por dois minutos seguidos por 25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C e um minuto e meio a 72°C, com uma extensão final de 30 minutos a 72°C.

Ligação e Clonagem do DNA enriquecido

O produto da amplificação foi clonado através do kit *pGEM-T Vector Systems* da *Promega*. A reação descrita a seguir permaneceu *overnight* a 4°C.

Reagente	Volume
2x Rapid Ligation Buffer	5,0µL
pGem-T Vector	1,0µL
Produto da PCR	3,0µL
T ₄ DNA Ligase	1,0µL
Total	10,0µL

A transformação de *Escherichia coli* cepa DH5α, competente, foi realizada no dia seguinte, através de um choque térmico, no qual as bactérias foram mantidas em gelo por 20 minutos, após os quais, foram transferidas para o banho-seco (*Eppendorf*) a 42°C por exatamente 50 segundos. Em seguida, o material foi novamente colocado em gelo, por mais 2 minutos. Foram adicionados 200µL de meio de cultura líquido (Circle Grow) e, então, incubadas a 37°, com agitação constante, por uma hora e meia. Foram preparadas oito placas de petri contendo 15mL de meio de cultura sólido (LB-Ágar) 15µL de Ampicilina, 40µL de X-Gal 2% e 100µL de IPTG 2,3%. Em cada placa, 100µL das bactérias transformadas foram adicionadas e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C, em uma estufa utilizada apenas para esse fim.

Após esse período, as colônias mutantes (brancas) foram transferidas individualmente para poços de uma placa (Megatiter, 96 well), contendo 1mL de meio de cultura líquido (LB+Ampicilina) e incubadas, com agitação constante, por 22 horas a 37°C.

Miniprep

Com o fim de isolar o DNA clonado de cada colônia mutante, foi realizada uma extração plasmidial. Após checar a uniformidade do crescimento das colônias mantidas em agitação, a placa foi centrifugada a 4000 rpm por 6 minutos a 20°C e, então, o sobrenadante foi descartado. Em cada poço da placa foram adicionados 240µL de GTE (Glucose 0,92%, EDTA 0,01M, Tris 0,026M), a placa foi selada e levada ao agitador até que todas as células fossem suspensas. A placa foi então novamente centrifugada a 4000 rpm por 6 minutos a 20°C e o sobrenadante, descartado. Foram adicionados 80µL de GTE, a placa foi, mais uma vez, selada e levada ao agitador. Após essa suspensão, 60µL do material foram transferidos para uma placa com fundo em U. Em cada poço dessa nova

placa foram adicionados 5µL de RNase (10mg/mL) e 60µL de NaOH/SDS (NaOH 0,2M, SDS 1%). A placa foi selada com um adesivo fino e invertida dez vezes, a fim de se homogeneizar a suspensão, que foi deixada à temperatura ambiente por dez minutos. Ao fim desse período, foi dado um pulso de 700 rpm e adicionou-se 60µL de Acetato de Potássio (KOAc 3M) a 4°C. Novamente a placa foi selada, invertida dez vezes e deixada na bancada por dez minutos. Mais um pulso a 700 rpm foi dado, o adesivo, retirado, e a placa, deixada em estufa por 30 minutos a 90°C. A placa foi então colocada em gelo por dez minutos e centrifugada a 4000 rpm a 20°C por mais dez minutos. Todo o volume do sobrenadante foi transferido para uma placa com filtro, tomando-se o cuidado de não remover o *pellet*, que foi centrifugada a 4000 rpm por seis minutos a 20°C. Acrescentou-se 110µL de isopropanol gelado, a placa foi selada com adesivo grosso e invertida por dez vezes. Foi, então, centrifugada a 4000 rpm, por 45 minutos a 20°C e o sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 200µL de etanol 70% gelado e a placa foi novamente centrifugada a 4000 rpm por dez minutos a 20°C. O sobrenadante foi removido e a placa, invertida sobre um papel absorvente. O material foi posto em estufa para secagem a 50°C por dez minutos e, finalmente, o DNA foi eluído em 20µL de água e permaneceu a 4°C *overnight*.

Reação de Sequenciamento

Inicialmente, 96 clones foram seqüenciados em um seqüenciador automático, modelo 3100 (Applied Biosystem Inc). A reação de seqüenciamento foi realizada com a utilização do kit *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante.

Construção dos *Primers* e Caracterização dos Microssatélites

O programa CID (Freitas et al. 2008), disponível na rede, foi usado para extrair a parte das seqüências correspondentes ao DNA do vetor e para procurar por microssatélites e *primers*. As seqüências repetitivas encontradas foram, então, analisadas no programa Chromas 2, disponível na rede (<http://www.technelysium.com.au/>) e o programa Gene Runner (Hastings Softwares, INC, Hastings, NY, USP) foi usado para o desenho dos *primers*.

Os *primers* desenhados foram sintetizados com o acréscimo à extremidade 5' dos *primers forward* da seguinte sequência: 5'-GGAAACAGCTATGACCAT-3' (Boutin-Ganache et al. 2001).

Validação dos locos

Para a padronização das PCRs foram feitos vários testes variando-se temperatura e concentração dos reagentes.

Depois de determinadas as quantidades de reagentes para (75 ng de DNA, 0.2 mM de dNTPs, 1x tampão PCR, 3 pmol do *primer reverse*, 1 pmol do *primer forward*, 2 pmol de 6-FAM ou TET M13(-21) *primer*, 2.5 mM de MgCl₂ e 0.5 U de *Taq* Polimerase (Invitrogen)), a reação foi realizada para dois indivíduos em diferentes temperaturas, variando de 52°C a 60°C, para cada *primer*, afim de se determinar a temperatura ideal para a realização da PCR de cada loco.

Os locos que apresentaram um satisfatório padrão de amplificação foram testados em 30 amostras de DNA da espécie *T. pecari* provenientes de uma população selvagem do Pantanal. O *primer* universal M13 ligado ao fluoróforo específico (TET ou FAM) foi usado em todas as reações para genotipagem. As condições das PCRs para todos os locos foi: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 52-58°C e 30 segundos a 72°C com uma extensão final de dez minutos a 72°C.

Os produtos das amplificações foram analisados em gel de agarose 2% e submetidos à genotipagem no Setor de Genotipagem do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual de São Paulo em seqüenciador automático modelo *MegaBACE 1000* (GE Healthcare) com o auxílio do *software Genetic Profiler* (GE Healthcare).

Teste de Amplificação Heteróloga em *Pecari tajacu*

Todos os locos descritos para *Tayassu pecari*, inclusive os que não obtiveram um padrão satisfatório de amplificação e aqueles que mostraram-se monomórficos na população de queixada analisada, foram testados em uma população cativa de *Pecari tajacu*.

As PCRs e as genotipagens seguiram o mesmo padrão descrito anteriormente para *T. pecari*.

Análise Estatística dos Locos Genotipados

O *software* Genepop v. 3.4 (Raymond e Rousset 1995), disponível na rede, foi utilizado para o cálculo das frequências alélicas e genotípicas, números de heterozigotos e homozigotos esperados e observados, equilíbrio de Hardy-Weinberg e Equilíbrio de Ligação. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado a partir da hipótese nula de que os gametas unem-se aleatoriamente na população, através de um teste análogo ao exato de Fischer (Guo e Thompson 1992); os valores de significância foram calculados pelo método Markov-Monte Carlo de cadeia. Os valores críticos para teste de confiança foram ajustados para múltiplas comparações usando a correção de Benjamini e Yekutieli (Benjamini e Yekutieli 2001).

O fenômeno conhecido como alelos nulos ocorre devido à não amplificação de determinados locos, em razão de alterações na sequência da região flanqueadora do loco ou em virtude da amplificação preferencial de um alelo, em detrimento de outros, sendo normalmente o alelo mais curto amplificado com maior sucesso. Com o programa Micro-Checker foi verificada a existência de alelos nulos e sua frequência (van Oosterhout et al. 2004).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC – *polymorphism information content*), que é uma medida a informatividade de cada loco, baseado nas frequências alélicas e na heterozigosidade esperada, foi calculado com o auxílio do programa Cervus 3.0 (Marshall et al. 1998). Cada loco foi classificado como altamente, razoavelmente ou pouco informativo com base no seu valor de PIC, sendo altamente informativos aqueles cujo valor de PIC foi maior do que 0,5, razoavelmente informativos aqueles cujo valor de PIC ficou entre 0,25 e 0,5 e pouco informativos aqueles cujo valor de PIC foi menor do que 0,25 (*sensu* Botstein et al. 1980)

A Probabilidade de Identidade (P_{id}) foi calculada com o programa Gimlet (Valière 2002) e refere-se à probabilidade de identificar um indivíduo através do seu genótipo multiloco.

Com o programa Bottleneck (Piry et al. 1999), foi buscada evidência de gargalos populacionais recentes. Foi utilizado o teste de Wilcoxon, que admite a utilização de menos

de 20 locos e o modelo de mutação escolhido foi o Two-Phase (considerando 30% para o modelo *Infinity Alleles* e 70% para o *Stepwise Mutation*).

O coeficiente de endocruzamento (F_{IS} , Weir e Cockerham 1984) foi calculado no programa FSTAT (Goudet 1995). Também considerando a hipótese nula de união aleatória de gametas na população, os valores de significância foram estimados através da simulação de populações de genótipos formadas aleatoriamente. Dessa forma, um valor de P-larger significativo indica que a proporção de F_{IS} calculado na hipótese nula é maior que a observada no conjunto de dados e, portanto, o loco possui um déficit de heterozigotos, enquanto um valor significativo de P-smaller indica um excesso dos mesmos. Nessa análise os valores de P também foram corrigidos para comparações seqüenciais com o uso da correção de Benjamini e Yekutieli (2001).

O programa ML-Relate (Kalinowski et al. 2006) foi utilizado para o cálculo dos coeficientes de parentesco (r) e inferência das relações entre pares de indivíduos. A média dos coeficientes de parentesco (r_m) foi calculada como a média aritmética dos coeficientes de parentesco de cada par de indivíduos. Esse programa considera o método de cálculo Maximum Likelihood e é capaz de acomodar alelos nulos nas análises de parentesco, um fator que pode alterar grandemente os resultados nesse tipo de análise, quando presentes e não considerados.

RESULTADOS

Prospecção de Microssatélites e Caracterização Populacional de *Tayassu pecari*

Um total de 192 colônias recombinantes foi selecionado e sequenciado. Através da análise das sequências no programa CID, obtiveram-se 60 (31,25%) regiões contendo microssatélites, sendo que foi possível a construção de *primers* para 19 delas (Tabela 1).

As sequências selecionadas foram alinhadas entre si para a identificação de microssatélites idênticos, sendo que nenhum foi encontrado. A maior parte dos locos encontrados foram tetranucleotídeos (52,6%), uma vez que as sondas utilizadas possuíam sequência repetitiva com motivo tetranucleotídeo, 26,3% foram dinucleotídeos e os 21,1% restantes, mono e trinucleotídeos ou compostos (Figura 4).

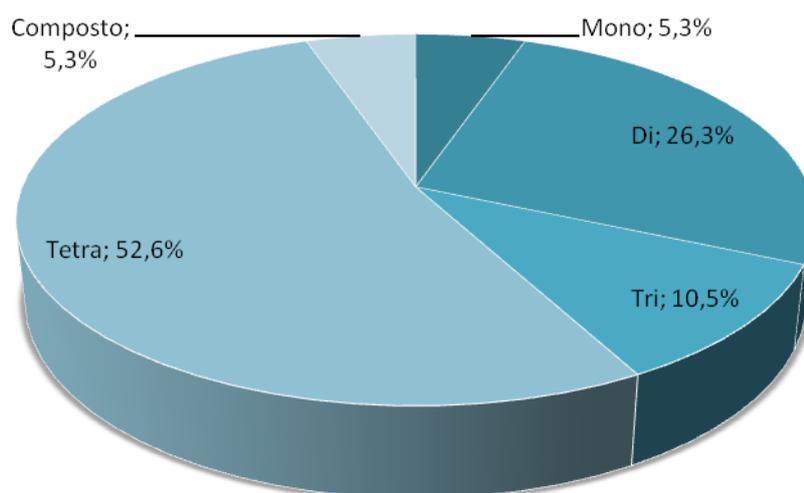


Figura 4. Gráfico com as porcentagens de ocorrência de cada tipo de microssatélite descritos para a espécie *Tayassu pecari*.

Dos 19 pares de *primers* testados, 13 (Tabela 2) apresentaram um padrão satisfatório de amplificação (Figura 5) e foram, posteriormente, aplicados em um número maior de amostras (Figura 6). Os locos Tpec1, Tpec2, Tpec8, Tpec9, Tpec14 e Tpec19 não amplificaram em nenhum dos testes realizados com indivíduos de queixadas.

Tabela 1. Relação dos microssatélites prospectados, a sequência dos primers: (F) *Primer Forward* e (R) *Primer Reverse*, o motivo da repetição e o número de acesso da sequência ao GenBank.

Locos	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Motivos	Número de Acesso ao GenBank
Tpec1	F: GGTTAAGGATCTGGCATTG R: TACTGCTGAGCCACAATGG	(AG) ₁₂ ...(GAAA) ₂₁	-
Tpec2	F: GGTGTTGGGAAAATTGGA R: GGAGTTTTATGGCTTCATGT	(AGAA) ₁₃ ...(AGGA) ₅ ...(GAAG) ₅	HM448402
Tpec3	F: ACCTGTCTCCTGTAGGCAC R: TGAACAGTTTATAGAAAACGCTG	(AAGG) ₅	HM448403
Tpec4	F: CAGTGGACCAGAGAAAACAT R: GGTAATAGCTAAACTTGCCT	(AGAA) ₇	HM448404
Tpec5	F: TAGTGTGCCAGTTTCAGATG R: TTTTGTGATGAGCTATGGG	(TTC) ₆	HM448405
Tpec6	F: GGGTCAGCAGATCAAGATAC R: TCTGTGTGAACCACTATAATG	(GAAT) ₇	HM448406
Tpec7	F: CTCACAGAACCCTGAACCTG R: TCTGTGTGAACCACTATAATG	(TGGA) ₁₀	HM448407
Tpec8	F: TGCGTGTGTAATGAATGTG R: CCAGTTCTAAACTATTAGCAAC	(TG) ₆ ...(TG) ₆ ...(GT) ₆	-
Tpec9	F: TCTTTGGAGAATCGTCTGTT R: CACTGGCAAGGGATTAATC	(TTTG) ₆	HM448408
Tpec10	F: AGACTAGATCTCATGTTAAGTGTTT R: AGGGTATAGAGTCCAGGAGC	(AC) ₁₄	HM448409
Tpec11	F: GAGTTCCCATCATAGCTCAG R: TAGGGAGTTGAATAGGAGCA	(A) ₂₀	HM448410
Tpec12	F: CTAGCTGCATCCCTGTTACT R: CTATCTGGACGAAACCGTAG	(GT) ₁₆	HM448411
Tpec13	F: GCATAGTTGTTTAGTTCTACTCC R: CTAATACCTATCTTGCTGGGA	(AAAC) ₅	HM448412
Tpec14	F: TTTTCCAACCTGGACTGATTC R: TGATAAACCGTATGGGAAAAG	(TGAA) ₅	HM448413
Tpec15	F: GAGCTTCTATATGCCACAGG R: CTCTAAGCAATGAAGGGATG	(AAAC) ₅ ...(CAAA) ₅	HM448414
Tpec16	F: TAGTTGTCACTCAGCATCCA R: CTTCCAAGAAATCAACCTCA	(AAAC) ₇	HM448415
Tpec17	F: CACATGGTTTCTCTATGGT R: TTAGTCATAAGAGCCAGGGA	(AC) ₆	HM448416
Tpec18	F: CTGGGAAGGTATCTCAGCA R: ACCAGGTGGATACCAAGTTA	(TCTA) ₇ (CCTA) ₇	HM448417
Tpec19	F: CTGATTCAACCCTAGTCTGG R: GGGATCCATCAGTAGAATCA	(AAC) ₇	-

Foram genotipados 30 indivíduos para cada loco que havia amplificado com sucesso nos testes anteriores. Os locos Tpec11, Tpec13 e Tpec15 apresentaram-se monomórficos em todos os indivíduos analisados, sendo os outros dez locos, polimórficos (Tabela 2). Entre os locos polimórficos, encontrou-se um total de 32 alelos, sendo que o número de alelos por loco variou de dois, nos locos Tpec3, Tpec4, Tpec16 e Tpec17, a

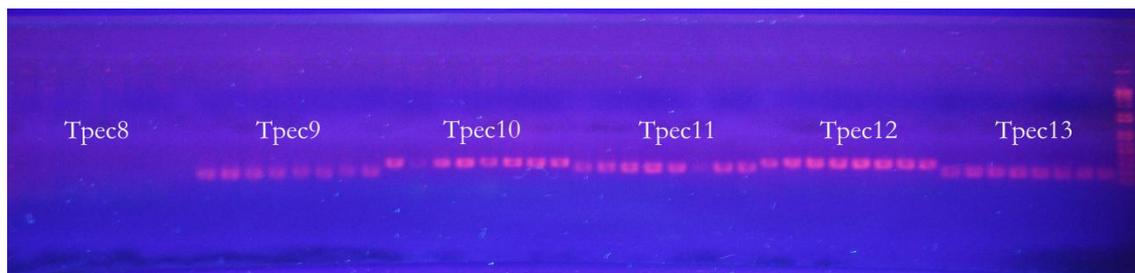


Figura 5. Foto de gel de agarose mostrando os produtos de amplificação de amostras de queixada, obtidos para o teste de gradiente de temperatura, no qual foram testadas seis temperaturas, para os locos Tpec8, Tpec9, Tpec10, Tpec11, Tpec12 e Tpec13, estabelecidos para *Tayassu pecari*.

Tabela 2. Caracterização de dez microssatélites polimórficos e três locos monomórficos isolados para a espécie *Tayassu pecari*. T_a : temperatura de anelamento. n_a : número de alelos (baseado em uma amostra de 30 indivíduos de queixadas); H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; P_{HW} : valores de significância para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg; os valores significativos, considerando a correção de Benjamini e Yekutieli ($P < 0,01707$), estão marcados (*).

Locos	T_a (°C)	n_a	Tamanho (bp)	H_o	H_e	P_{HW}
Polimórficos						
Tpec3	58	2	185-189	0,286	0,299	1
Tpec4	58	2	231-235	0,481	0,465	1
Tpec5	58	3	102-108	0,500	0,566	0,350
Tpec6	58	3	214-222	0,346	0,389	0,297
Tpec7	58	3	136-148	0	0,143	0,0004*
Tpec10	58	4	241-249	0,696	0,614	0,776
Tpec12	58	8	211-233	0,704	0,802	0,595
Tpec16	52	2	229-237	0,178	0,318	0,044
Tpec17	58	2	170-174	0,036	0,219	0,001*
Tpec18	54	3	265-273	0,321	0,325	1
Monomórficos						
Tpec11	56	1	173	-	-	-
Tpec13	52	1	142	-	-	-
Tpec15	54	1	132	-	-	-

oito, no loco Tpec12, com uma média de 3,2 alelos por loco. A heterozigosidade esperada variou de 0,143, no loco Tpec7, a 0,802, no loco Tpec12, com uma média de 0,414 e a heterozigosidade observada variou, nesses mesmos locos, de zero a 0,704, com uma média de 0,323, não havendo diferença significativa entre elas. Todos os locos polimórficos estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto Tpec7 e Tpec17, nos quais foi identificado déficit de heterozigotos ($P\text{-larger} = 0,005$ para ambos; Tabela 3), pelo programa FSTAT, causado pela presença de alelos nulos, evidenciados pelo programa

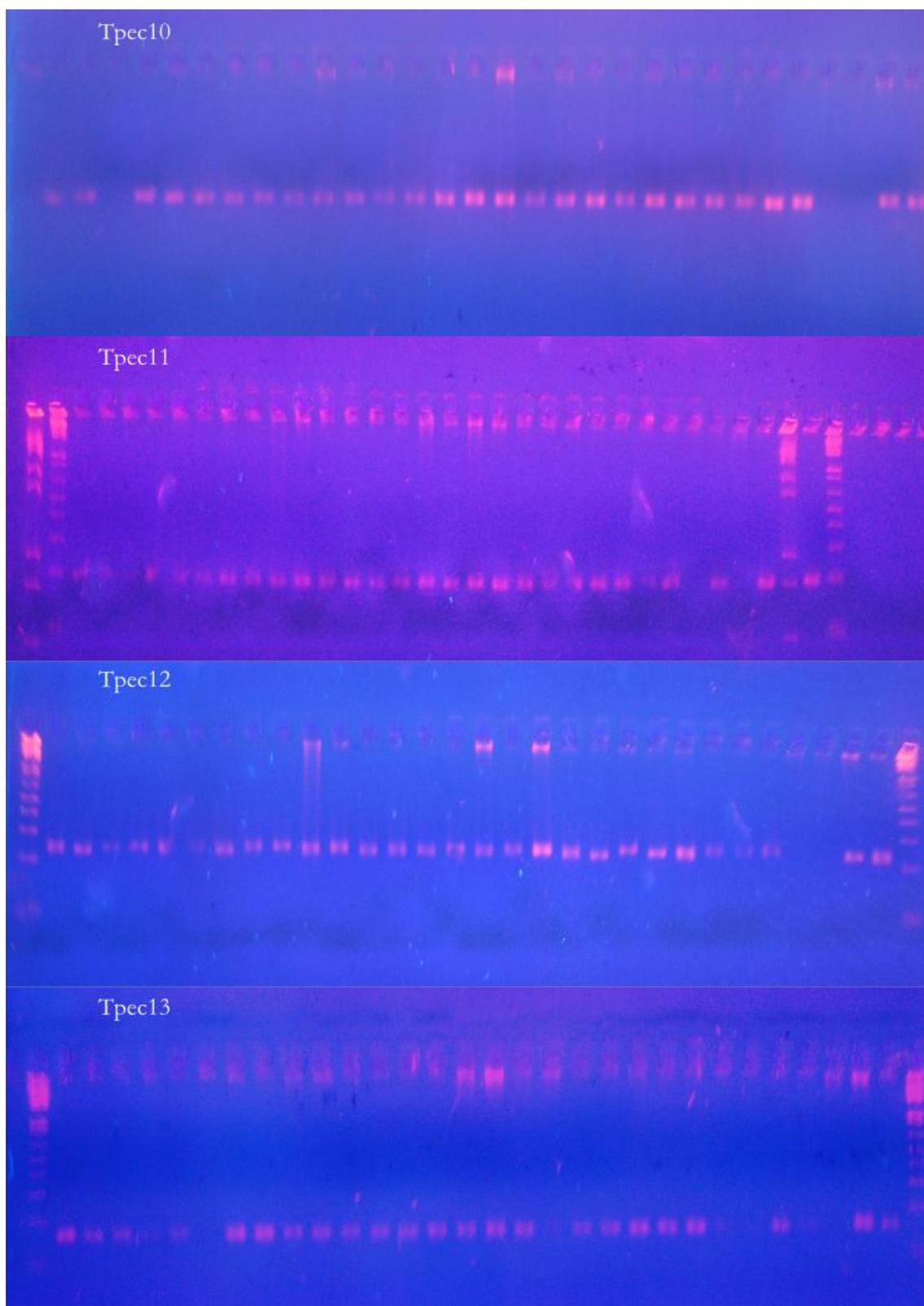


Figura 6. Fotos de géis de agarose a 2%, mostrando os produtos de amplificação obtidos para 27 indivíduos de queixada, utilizando-se os *primers* Tpec10, Tpec11, Tpec12 e Tpec13 nas reações de PCR.

Micro-Checker, em frequência de 0,235 e 0,263, respectivamente. Não foi encontrado Desequilíbrio de Ligação significativo entre nenhum par de locos.

O PIC médio para os dez locos foi 0,363, sendo o loco mais informativo Tpec12 e o menos informativo, Tpec7 (Tabela 4). Dos dez locos polimórficos, apenas dois foram considerados pouco informativos ($PIC < 0,25$), seis foram considerados razoavelmente informativos ($0,5 > PIC > 0,25$) e dois foram considerados altamente informativos ($PIC > 0,5$, Tabela 3, Botstein et al. 1980). O P_{id} calculado para cada loco encontra-se na Tabela 3 e o P_{id} considerando todos os locos foi de $3,82 \times 10^{-34}$, o que significa que os locos caracterizados tem um bom poder de resolução na identificação individual.

A análise realizada no programa Bottleneck não evidenciou nenhum evento de redução populacional recente ($P=0,375$ para o teste de Wilcoxon).

A análise de parentesco, realizada no programa ML – Relate, evidenciou a existência de meio-irmãos, pais e filhos e irmãos completos em frequência de 13,5%, 9,6% e 3,4%, respectivamente, na população de 30 indivíduos estudada. A média das estimativas de parentesco (r_m) calculada para cada par de indivíduos foi de $0,18 \pm 0,3$.

Tabela 3. Coeficiente de endogamia (F_{IS}) de cada loco e da população de queixadas analisada. P-larger: probabilidade do F_{IS} calculado ser significativamente maior que zero. P-smaller: probabilidade do F_{IS} calculado ser significativamente menor que zero (*)Valores significativos, considerando a correção de Benjamini e Yekutieli ($P < 0, 01707$).

Loco	F_{IS}	P-larger	P-smaller
Tpec3	0,044	0,6450	0,8200
Tpec4	-0,037	0,7350	0,5750
Tpec5	0,118	0,2850	0,8600
Tpec6	0,112	0,2650	0,8700
Tpec7	1,000	0,0050*	1,0000
Tpec10	-0,135	0,9100	0,2400
Tpec12	0,124	0,1600	0,9450
Tpec16	0,444	0,0500	0,9950
Tpec17	0,840	0,0050*	1,0000
Tpec18	0,013	0,6150	0,7750

Tabela 4. Probabilidade de Identidade (P_{id}) e *Polymorphism Information Content* (PIC) considerando dez locos de microssatélites polimórficos isolados para queixadas.

Loco	P_{id}	PIC
Tpec3	0,00021	0,250
Tpec4	0,00041	0,352
Tpec5	0,0282	0,485
Tpec6	0,0011	0,350
Tpec7	0,00015	0,135
Tpec10	0,0151	0,536
Tpec12	0,0578	0,757
Tpec16	0,00009	0,272
Tpec17	0,0002	0,212
Tpec18	0,00019	0,287
Total/Média	$3,82 \times 10^{-34}$	0,363

Teste de Amplificação Heteróloga em *Pecari tajacu*

Todos os locos descritos para *Tayassu pecari*, mesmo os que não apresentaram um padrão satisfatório de amplificação e os que foram monomórficos, foram testados, inicialmente, em dois indivíduos de *Pecari tajacu*. Dos 19 locos testados, 15 (Tabela 5; Figura 7) apresentaram um padrão satisfatório de amplificação e foram, posteriormente, testados em 23 indivíduos de catetos (Figura 8). Os locos Tpec1, Tpec6, Tpec8 e Tpec19 não amplificaram em nenhum dos testes realizados em indivíduos dessa espécie.

Os locos Tpec7, Tpec15, Tpec16 e Tpec17 foram monomórficos, e os demais, polimórficos na população estudada (Tabela 5).

Considerando os locos polimórficos, encontrou-se um total de 48 alelos, sendo que o número máximo de alelos por loco variou de dois, nos locos Tpec3, Tpec11 e Tpec13, a oito, no loco Tpec2, com uma média de 4,363 alelos por loco. A heterozigosidade esperada variou de 0,043, no loco Tpec3, a 0,629, no loco Tpec14, com uma média de 0,432 e a heterozigosidade observada variou de 0,043 a 0,695 nos mesmos locos. Todos os locos estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto os locos Tpec9, para o qual o F_{IS} foi significativamente diferente de zero (P -larger = 0,0136; Tabela 6), indicando déficit de heterozigotos, causado pela presença de alelos nulos, numa frequência de 0,2405 e Tpec10, no qual não foi evidenciada a presença de alelos nulos. Nesse caso, o loco em questão pode não estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg devido a outros fatores, como endocruzamento, que é comum em populações cativas, cruzamento não-aleatório, seleção contra heterozigotos, ou em consequência do efeito de Wahlund, que ocorre em virtude da

existência de subdivisões na população estudada que não são detectadas. Considerando que a população é formada por indivíduos de diversas origens, o efeito de Wahlund pode ser o responsável pelo desvio. Não foi encontrado Desequilíbrio de Ligação significativo entre os locos.

O PIC médio, considerando os 11 locos, foi de 0,475, sendo o loco mais informativo Tpec2 e o menos informativo, Tpec3 (Tabela 7). Dos 11 locos, dois foram considerados pouco informativos, três razoavelmente informativos e seis altamente informativos (Tabela 6, *sensu* Botstein et al. 1980). O P_{id} de cada loco encontra-se na Tabela 6 e o P_{id} para todos os locos foi de $3,64 \times 10^{-60}$.

A análise realizada no programa Bottleneck não evidenciou nenhum evento de redução populacional recente ($P=0,432$ para o teste de Wilcoxon).

O programa ML-Relate mostrou a existência de meio-irmãos, pais e filhos e irmãos completos em frequência de 10,7%, 8,3% e 6,7%, respectivamente, entre os 23 indivíduos de catetos analisados. A média das estimativas de parentesco (r_m) calculada para cada par de indivíduos foi de $0,19 \pm 0,3$, a qual não diferiu significativamente da média calculada para a população de queixadas.

Tabela 5. Caracterização de onze microssatélites polimórficos e quatro locos monomórficos isolados para a espécie *Tayassu pecari* e testados em *Pecari tajacu*. T_a : temperatura de anelamento. n_a : número de alelos (baseado em uma amostra de 23 indivíduos de catetos); H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; P_{HW} : valores de significância para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg; os valores significativos, considerando a correção de Benjamini e Yekutieli ($P < 0, 01656$), estão marcados (*).

Locos	T_a	n_a	Tamanho (pb)	H_o	H_e	P_{HW}
Polimórficos						
Tpec2	54	8	233-273	0,565	0,564	0,879
Tpec3	56	2	186-190	0,043	0,043	-
Tpec4	54	6	228-248	0,478	0,551	0,215
Tpec5	56	4	100-118	0,268	0,304	1
Tpec9	60	4	137-141	0,261	0,549	0,004*
Tpec10	52	5	245-255	0,522	0,514	0,0104*
Tpec11	56	2	167-171	0,087	0,084	1
Tpec12	58	5	208-216	0,522	0,461	0,499
Tpec13	52	2	186-190	0,478	0,463	1
Tpec14	54	4	249-257	0,695	0,629	0,119
Tpec18	50	6	257-289	0,522	0,588	0,057
Monomórficos						
Tpec7	58	1	137	-	-	-
Tpec15	58	1	128	-	-	-
Tpec16	58	1	229	-	-	-
Tpec17	58	1	174	-	-	-

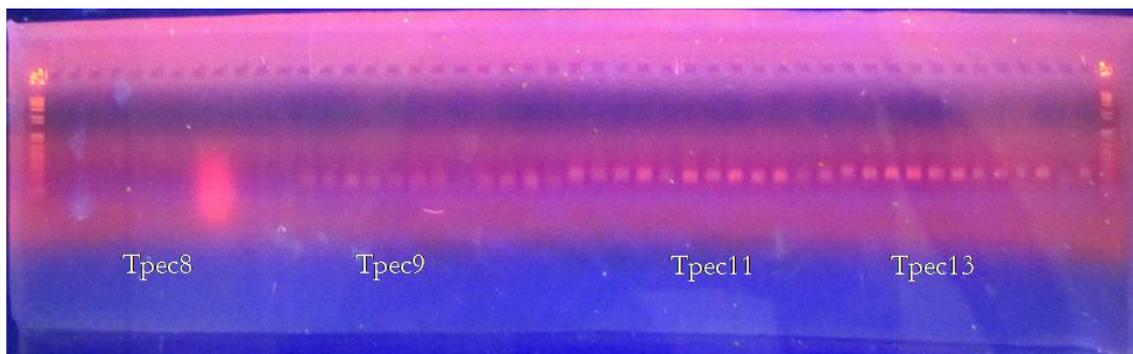


Figura 7. Fotos de gel de agarose evidenciando os produtos de amplificação de amostras de *Pecari tajacu*, obtidos para o teste gradiente de temperatura, no qual foram testadas seis temperaturas, com os *primers* Tpec8, Tpec9, Tpec11 e Tpec13, desenvolvidos para a espécie *Tayassu pecari*.

Tabela 6. Coeficiente de endogamia (F_{IS}) de cada loco da população de catetos analisada. P-larger: probabilidade do F_{IS} calculado ser significativamente maior que zero. P-smaller: probabilidade do F_{IS} calculado ser significativamente menor que zero (*)Valores significativos, considerando a correção de Benjamini e Yekutieli ($P < 0, 01656$).

Loco	F_{IS}	P-larger	P-smaller
Tpec2	-0,003	0,6773	0,6182
Tpec3	0,000	1,0000	1,0000
Tpec4	0,135	0,2182	0,9318
Tpec5	-0,140	1,0000	0,5182
Tpec9	-0,016	0,0136*	1,0000
Tpec10	-0,016	0,5909	0,6182
Tpec11	-0,030	1,0000	1,0000
Tpec12	-0,136	0,8864	0,2773
Tpec13	-0,033	0,7318	0,6318
Tpec14	-0,107	0,8773	0,3364
Tpec18	0,115	0,2682	0,8727

Tabela 7. Probabilidade de Identidade (P_{id}) e *Polymorphism Information Content* (PIC) considerando onze locos de microssatélites polimórficos isolados para queixadas e testados em catetos.

Loco	P_{id}	PIC
Tpec2	$2,96 \times 10^{-2}$	0,815
Tpec3	$2,96 \times 10^{-8}$	0,062
Tpec4	$2,78 \times 10^{-3}$	0,680
Tpec5	$4,38 \times 10^{-8}$	0,291
Tpec9	$2,65 \times 10^{-7}$	0,432
Tpec10	$4,74 \times 10^{-6}$	0,616
Tpec11	$3,44 \times 10^{-8}$	0,099
Tpec12	$8,73 \times 10^{-7}$	0,531
Tpec13	$9,73 \times 10^{-8}$	0,373
Tpec14	$3,39 \times 10^{-5}$	0,649
Tpec18	$2,76 \times 10^{-4}$	0,681
Total/Média	$3,64 \times 10^{-60}$	0,475

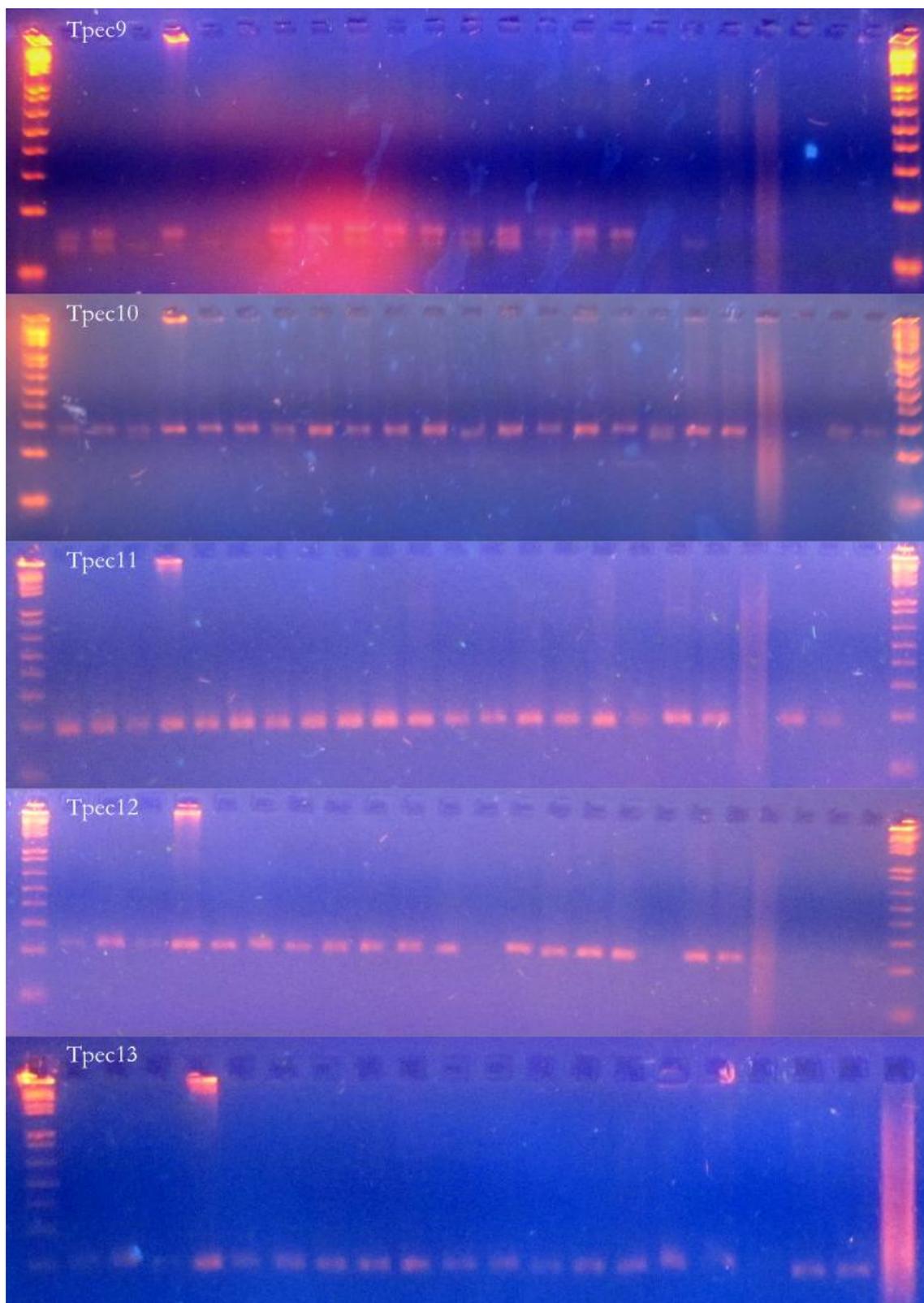


Figura 8. Fotos de géis de agarose a 2%, mostrando os produtos de amplificação obtidos para 23 indivíduos de catetos, utilizando-se os *primers* Tpec9, Tpec10, Tpec11, Tpec12 e Tpec13 nas reações de PCR.

DISCUSSÃO

Prospecção de iniciadores para locos microssatélites em *Tayassu pecari*

Microssatélites já foram utilizados com sucesso para elucidação de questões demográficas de várias espécies de vertebrados, como, por exemplo, realizações de estimativas populacionais para elefantes (Eggert et al. 2003), ursos marrons (Bellemain et al. 2005), lobos (Creel et al. 2003), morcegos (Sloane et al. 2009) e de tamanho efetivo populacional (Wang 2009); detecção de estruturação populacional e existência de fluxo gênico em onças pardas (Ernest et al. 2003), marsupiais (Hansen et al. 2009), aves (Jones et al. 2005, Schlosser et al. 2005), lagartos (Urquhart et al. 2009) e anfíbios (Wang 2009); análise de movimentos e migrações em lobos (Luchini et al. 2002), tigres chineses (Wan et al. 2003), aves (Schlosser et al. 2009) e coiotes (Prugh et al. 2005); detecção de gargalos populacionais (Wang 2009, Maudet et al. 2002) e efeito fundador (Schlosser et al. 2009); para acompanhamento dos efeitos de programas de reintrodução (Maudet et al. 2002) e embasamento de programas de reprodução em cativeiro (Williams e Hoffman 2009), para determinação de grau de parentesco e diversidade genética (Miller et al. 2003) e para elucidação de questões filogenéticas (Jones et al. 2005).

A ordem Artiodactyla destaca-se pela grande quantidade de espécies de importância econômica que possui, entre eles bovinos, caprinos, ovinos e suínos domesticados e criados para corte. A utilização dessas espécies gerou uma grande quantidade de estudos, sendo que a maior parte delas possui mapas genéticos bastante completos, com um grande número de microssatélites descritos (e.g. Archibald et al. 1995; Barendse et al. 1994; Bishop et al. 1994; Kemp et al. 1995). Dentro da ordem Artiodactyla, em todas as suas famílias, também existem muitas famílias de DNA repetitivo bem conservadas entre os diversos taxa (Modi et al. 1995), como DNA satélites e elementos do tipo SINE e LINE (Kostia 2000).

Para a família Tayassuidae, cujas espécies também tem grande importância econômica, apesar de não serem domesticadas, ainda não havia nenhum iniciador para marcador microssatélite descrito. Considerando os variados graus de ameaça em que se encontram as espécies dessa família, a falta de estudos sobre a diversidade genética é um grande empecilho para a delimitação de planos e políticas de conservação.

Entre 60 microssatélites encontrados, foi possível a construção de iniciadores para 19 deles, ou seja, 31,7%. A maior parte dos locos para os quais foram construídos iniciadores são tetranucleotídeos e dinucleotídeos. Locos dinucleotídeos podem apresentar *stutters*, ou seja, a sequencia amplificada difere do loco real por algumas unidades de repetição, dificultando ou mesmo impedindo a identificação correta do alelo (Schlötterer e Tautz 1992; Sarlo et al 2009). Sanches (2007) sugere a utilização de locos dinucleotídeos de menor comprimento para a mitigação desse problema. Os locos Tpec8, Tpec10 e Tpec12, apesar de serem dinucleotídeos com grande número de repetições, não apresentaram dificuldades na designação dos alelos, nem foi evidenciado o fenômeno de *stutter bands* na análise realizada pelo programa Micro-Checker.

Os locos descritos apresentaram-se razoavelmente informativos, com o PIC médio de 0,363, na população de queixadas e de 0,475, na população de catetos. A P_{id} foi bastante baixa nas duas populações, o que significa que esses locos, em conjunto, possuem uma boa resolução para a identificação individual, fundamental para estudos que envolvam, por exemplo, a coleta não-invasiva de dados, ferramenta muito útil para estudo de espécies elusivas e/ou de difícil captura.

Amplificação Heteróloga

A possibilidade de amplificação heteróloga de locos microssatélites tem sido pouco explorada, especialmente em espécies neotropicais, que geralmente encontram-se ameaçadas e das quais se dispõem de poucos estudos (Barbará et al. 2007). Entre os artiodáctilos há vários estudos que obtiveram sucesso na utilização de iniciadores heterólogos, tanto dentro de uma mesma família (Maudet et al. 2003; Beja-Pereira et al. 2004), quanto entre espécies pertencentes a famílias distintas (Slate et al. 1998; Gonela; 2003), levando a crer que as regiões flangeadoras desses marcadores encontram-se bem conservadas dentro da Ordem.

Houve um sucesso de 78,9% na amplificação heteróloga dos iniciadores descritos, sendo que o sucesso de obtenção de locos heterólogos polimórficos foi de 73,3%. Barbará et al (2007) reportou uma probabilidade de 80% na obtenção de amplificação heteróloga entre espécies congêneras de mamíferos e de 70% de ocorrência de polimorfismo nesses locos, valores bastante similares ao encontrados no presente trabalho.

No presente estudo, de 19 locos descritos, 12 foram comuns às duas espécies. Dentre esses, oito locos se apresentaram mais polimórficos em catetos do que em

queixadas, espécies para o qual foram descritos. Nesses locos, a temperatura de anelamento utilizada nas reações de PCR foram menores em cinco locos e iguais em três àquelas usadas na reação para queixadas. É costumeiro abaixar a temperatura de anelamento em testes de amplificação heteróloga, aumentando assim as chances de se obter sucesso na amplificação e polimorfismo na segunda espécie. Entretanto, considerando o grau de divergência entre o número de alelos apresentados em vários locos entre as duas espécies, é possível que a composição da população de catetos, formada por indivíduos de origens bastante distintas, tenha maior influência na diversidade genética dessa população, em comparação com a população de queixadas analisadas.

Também não foi encontrada evidência que suportasse a hipótese de Ellegren (1995) de que tanto a extensão dos locos quanto o polimorfismo diminui em amplificações heterólogas, uma vez que a maior parte dos locos que amplificaram em ambas as espécies apresentou basicamente o mesmo tamanho de alelos e que um loco (Tpec13), inclusive, foi mais longo em catetos e o polimorfismo também foi maior na segunda espécie. Essa consistência entre as amplitudes de variação de tamanho dos alelos pode indicar que os locos são, de fato, homólogos nas duas espécies, embora a confirmação só possa ser obtida através do seqüenciamento dos fragmentos amplificados em catetos e posterior comparação com os previamente seqüenciados de queixadas.

O loco Tpec 13 é um bom candidato a ser usado na diferenciação das duas espécies, considerando a grande diferença entre o tamanho dos alelos encontrados em queixadas (142 pb) e catetos (entre 186 e 190 pb). No entanto, essa investigação precisa ser aprofundada, pois, na população de queixadas analisada, o loco se apresentou monomórfico e, em outras populações, nas quais o loco pode vir a ser polimórfico, o tamanho dos alelos pode não ser tão discrepante daqueles encontrados na população de catetos estudada. Alternativamente, nesse caso, pode ter sido amplificado um loco distinto em catetos. Seria necessário o sequenciamento dessa região em pelo menos um indivíduo de cateto, para comparação com a sequência descrita para queixadas, para a verificação de se tratarem do mesmo ou loco ou não nas duas espécies.

A existência de três locos (Tpec2, Tpec9 e Tpec14) que amplificaram apenas em catetos, além de se apresentarem polimórficos, aponta para a necessidade considerar todos os locos descritos em amplificação cruzada, incluindo os monomórficos, aumentando as chances de se ter um maior número de locos polimórficos úteis no estudo da espécie de interesse. Apesar disso, a sequência dos iniciadores Tpec1, Tpec8 e Tpec19 não foram publicadas no GenBank, uma vez que falharam em amplificar nas duas espécies.

Gonela (2003) encontrou um sucesso de 100% na amplificação heteróloga de seis pares de iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* em queixadas. Silva (2006) utilizando também seis iniciadores descritos para *S. s. domestica*, reportou um sucesso de amplificação de 83%. O tempo de divergência entre o porco doméstico e os taiassuídeos é de 36-38 milhões de anos (Ducroq 1994). Entre catetos e queixadas há um tempo de divergência de 3,4 – 7,4 milhões de anos (Theimer e Keim 1998) e, no presente trabalho, foi encontrado um sucesso na amplificação de 75%, considerando apenas os locos que produziram algum produto de PCR em pelo menos uma das espécies, apesar do tempo de divergência entre os estes dois grupos ser significativamente menor.

Catagonus wagneri é a mais ameaçada das espécies de Tayassuidae e também a que apresenta menor distribuição geográfica (Taber 1993). O conhecimento a cerca dessa espécie ainda é deficitário, o que prejudica o delineamento de planos de ação concretos para a sua conservação. Sob a atual taxa de depleção populacional em que se encontra, a espécie não se recuperará. Considerando que as queixadas são mais próximas dos taguás que dos próprios catetos (Gongora e Moran 2005), nos quais a amplificação heteróloga apresentou um grande sucesso, sugere-se o teste de amplificação dos locos aqui descritos também nos taguás, na esperança de que eles se apresentem úteis na obtenção de informações importantes para a conservação dessa espécie.

Caracterização Genética Populacional de *Tayassu pecari* e *Pecari tajacu*

Na população de queixadas estudada, o número médio de alelos foi de 3,2 e a heterozigidade esperada média foi de 0,414. Já na população de catetos, número médio de alelos por loco foi de 4,36, com uma heterozigidade esperada média de 0,432. Em um estudo com uma população de queixadas, que utilizou seis iniciadores descritos para o porco doméstico (Gonela 2003), o número médio de alelos por loco em queixadas foi de 3,17. Já Silva (2006), usando também seis iniciadores de porco doméstico reportou número médio de alelos por loco de 4,83 em população de queixadas e de 8,5 em população de catetos. Biondo et al. (2008) encontraram, em duas populações de queixadas do Pantanal uma média de 4,2 e 4,4 alelos por loco e heterozigidade esperada de 0,58 e 0,61 e observada de 0,58 e 0,68. Apesar de o número médio de alelos por loco ser bastante semelhante, os valores de heterozigidade observada e esperada do referido estudo foram significativamente mais altos que os encontrados aqui. As duas populações apresentaram

uma baixa diferenciação entre si, e, portanto, os autores sugeriram que fossem manejadas como uma metapopulação. Essa estrutura de metapopulação pode explicar os maiores valores encontrados de heterozigosidade.

A média de coeficientes de parentesco encontrada nas duas populações são consistentes com um grau de parentesco próximo, indicando que há bastante indivíduos aparentados dentro das mesmas. Essa informação condiz com a existência de uma estrutura familiar complexa dentro dos bandos.

A baixa diversidade genética encontrada na população selvagem de queixadas poderia ser um indicativo da ocorrência de gargalos populacionais recentes, no entanto, essa hipótese foi rejeitada pelas análises realizadas com auxílio do programa Bottleneck. Nesse caso a baixa diversidade pode resultar de aspectos naturais da biologia dessa espécie: Telles et al. (2003), estudando a variação genética de diversos bandos através da utilização de marcadores RAPD, encontraram evidências de que os bandos de queixadas formam unidades reprodutivas relativamente fechadas, o que propiciaria a existência de taxas de endogamia naturalmente mais altas. Lage et al. (2008) também encontraram forte estruturação entre bandos de queixada. As análises de parentesco realizadas no presente estudo também indicaram uma ocorrência de um número maior de indivíduos relacionados dentro da população de queixadas em comparação com os encontrados na população de catetos, apesar de as médias de coeficiente de parentesco não diferirem entre elas. Esse fator pode ser agravado em resposta à alteração antrópica dos ambientes: os bandos comumente grandes de queixadas tem diminuído por causa da restrição de habitats contínuos (Fragoso 1999). Assim sendo, a tendência à endogamia apresentada naturalmente pode tornar-se mais severa e a população passar a apresentar os efeitos deletérios da depressão endogâmica.

O fato de os bandos de queixadas funcionarem como unidades reprodutivas influencia na estruturação populacional encontrada entre esses grupos (Telles 2003; Lages 2008), embora essa diferenciação não tenha sido encontrada por Biondo (2008). A existência de estruturação populacional influencia nas estratégias de manejo genético necessárias para a espécie, já que cada uma das distintas linhagens contribui com a variabilidade genética total da espécie, influenciando na sua capacidade de apresentar respostas evolutivas frente a alterações ambientais (Franklin 1980; Young et al. 1998; Bryant e Reed 1999) e; por isso, devem ser consideradas como unidades de manejo distintas (Frankham et al. 2008; Laikre et al. 2005).

A estrutura de metapopulações descrita em Biondo et al. (2008) provavelmente ocorre em ambientes menos fragmentados, nos quais os grupos podem apresentar maior mobilidade. Os bandos também podem se subdividir em períodos de escassez de alimentos (March 1993), de forma que duas populações amostradas nesses períodos possam ser derivadas de um único bando maior, que volta a se formar em épocas mais favoráveis.

Apesar de a maior diversidade genética da população de catetos desse estudo poder ser explicada pela origem diversa dos membros da população, a espécie parece apresentar uma diversidade genética consistentemente maior (Gongora et al. 2002; Silva 2006), o que pode ser uma consequência da maior flexibilidade social (Bodmer e SOWLS 1993), que resulta em menor endocruzamento.

A importância de se conservar os taiassuídeos

O grupo de especialistas da IUCN para a conservação de porcos, taiassuídeos e hipopótamos estabelece, como prioridades para a conservação e planos de ação para as queixadas as seguintes iniciativas (March 1993):

- Identificar e monitorar o *status* populacional, sobretudo nas regiões onde a espécie é mais ameaçada;
- Complementar informações já existentes sobre a distribuição, *status* e habitats da espécie ao longo de sua distribuição geográfica, bem como sobre a dinâmica populacional, área de vida e ecologia dos bandos e realizar pesquisas sobre reprodução em cativeiro e reintroduções;
- Fortalecer áreas protegidas que contenham populações de queixadas;
- Condução de estudos sobre a regulação da caça de subsistência, aliados à realização de medidas educacionais e conservacionistas em áreas rurais e
- Implantar medidas que visem a erradicação da caça comercial em larga escala.

Em relação aos catetos, basicamente as mesmas medidas são estabelecidas, apesar de se apresentarem em um caráter mais preventivo, uma vez que, em virtude de apresentar maior distribuição geográfica e ser menos suscetível às pressões causadas pelas alterações antrópicas, essa espécie não se encontra tão ameaçada quanto as queixadas (Bodmer e SOWLS 1993).

Marcadores moleculares altamente informativos, como os microssatélites descritos aqui para *T. pecari* constituem ferramentas potenciais que podem ser utilizadas em cada uma dessas ações.

Não há uma revisão recente a nível sub-específico para catetos ou queixadas (Grubb e Groves 1993). O grau de ameaça imposto a essas espécies varia de acordo com a região geográfica (March 1993), de forma que cada sub-espécie está exposta à diferentes condições e, portanto, requer medidas distintas de conservação, é imprescindível que qualquer incerteza taxonômica seja resolvida. Os marcadores aqui descritos são apropriados para esse tipo de análise (Nei e Kumar 2000), em ambas espécies.

As maiores ameaças à sobrevivência de queixadas e catetos são a contínua taxa de destruição de habitats e a sobre-exploração através da caça, tanto para subsistência, quanto para comércio ilegal de peles e carne. Esses fatores levaram a espécie a ser considerada extinta em El Salvador e Uruguai (Mones e Ximemes 1980; Reyna-Hurtado 2008) e localmente extirpada da maior parte das reservas menores presentes na Mata Atlântica do Sudeste do Brasil (e.g. Neri 2004; Cullen Jr. 2000), além de constar, sob diferentes graus de ameaça, em todas as listas de fauna ameaçada nos estados do sul e sudeste do Brasil (Chiarello et al. 2008) publicadas até hoje. Sendo assim, todas as populações existentes necessitam de monitoramento constante (Bodmer e Sowls 1993), tarefa que pode ser realizada com grande confiabilidade através da coleta não-invasiva de dados genéticos e utilização de marcadores moleculares.

Declínios populacionais de queixadas tem sido registrados inclusive na Floresta Amazônica, o que pode indicar que, mesmo em florestas contínuas, populações dessa espécie podem estar fragmentadas (Peres 1996; 2000; 2001).

As espécies *Tayassu pecari* e *Pecari tajacu* figuram entre os mamíferos mais explorados tanto para subsistência quanto para comércio (legal ou ilegal) de carne e peles nas Américas do Sul e Central (Bodmer et al 1994) e, portanto, medidas de conservação para essas duas espécies não podem deixar de contemplar legislações específicas que regulamentem a caça e o comércio das mesmas. A importância da caça de subsistência e a chamada caça esportiva varia de acordo com a região considerada (Bodmer et al. 1988; Cullen Jr. 2000; Peres 2001) e devem ser abordadas de maneiras diferentes em tais legislações, de forma a manter as populações exploradas em níveis produtivos (Bodmer et al. 1988). No Brasil, por exemplo, qualquer tipo de caça é proibida (Lei de Crimes Ambientais, lei n. 9605, 12 de fevereiro de 1998). No entanto, algumas experiências tem demonstrado que a simples proibição é menos efetiva do que um programa de manejo que considere a caça de subsistência por

parte de populações tradicionais, para as quais essa é a principal, ou mesmo única, fonte de proteína da comunidade, e condene a prática de caça esportiva e para comércio ilegal de carne e peles (Bodmer et al. 1988). Nesse caso, os programas de manejo devem, sim, estabelecer restrições a espécies que podem ser utilizadas, até mesmo para subsistência, como, por exemplo, primatas (Redford e Robinson 1985), bem como monitorar a sustentabilidade dessa atividade de subsistência (Rios 2001).

Além da importância para a subsistência de populações tradicionais, a caça e o comércio dos taiassuídeos também tem grande relevância econômica no comércio internacional, movimentando grandes quantias de dinheiro, apesar de esse setor estar decrescendo a cada ano. Apesar disso, quase nada do lucro obtido através das transações comerciais são revertidas para o manejo e a manutenção das populações dos animais explorados (Bodmer et al. 1993), evidenciando a insustentabilidade da prática.

Catetos e queixadas tem um importante papel ecológico na predação e dispersão de sementes (Kiltie 1981; Bodmer 1989; Altrichter et al. 2000) e na regeneração vegetal (Dirzo e Miranda 1990). Diversos estudos mostram a importância das interações entre animais e plantas para a manutenção da estrutura dos ecossistemas (e.g. Asquith et al. 1997; Dirzo e Miranda 1990; Galetti et al. 2006). Plantas com sementes grandes, por exemplo, podem depender de grandes mamíferos para sua dispersão (Beck 2006) e, por isso, tendem a ser mais afetadas pelos efeitos da fragmentação de habitats. Quando a dispersão é ineficiente, devido à redução na riqueza de dispersores, pode haver um aumento significativo da competição entre as sementes e também da predação, causando um decréscimo no recrutamento (Galetti et al. 2006). O pisoteio das plântulas por parte dos herbívoros de grande porte, como os catetos e as queixadas, por diminuir a sobrevivência de plântulas junto à planta-mãe, também tem um papel importante à medida que diminui a competição intra-específica e permite a coexistência entre várias espécies vegetais (Beck 2006). Alterações na composição, abundância e distribuição das espécies vegetais tem severos efeitos sobre o fluxo gênico nessas populações (Pacheco e Simonetti 2000), o que agrava ainda mais os impactos das interferências antrópicas.

Conservar os taiassuídeos significa conservar toda uma gama de interações ecológicas que ajudam na manutenção da biodiversidade dos ecossistemas onde habitam (Redford 1992). No entanto, essa empreitada não será efetiva caso não haja um bom embasamento teórico para o delineamento de suas ações práticas, o que só pode ser alcançado através do estudo aprofundado dos vários aspectos da biologia desses animais, como a dinâmica populacional, a estruturação dos bandos, o padrão de movimentação e

ocupação do território, sobretudo em ambientes fragmentados (Taber e Oliver 1993). Com esses conhecimentos em mãos, é possível se ter uma idéia de como as perturbações antrópicas afetam as populações dessas espécies e, então, elaborar estratégias e planos que visem a mitigação de tais efeitos negativos. Também é possível se pensar em programas de recuperação e reintrodução para essas espécies em locais onde se encontram mais ameaçadas ou extintas.

Os taiassuídeos tem um papel fundamental na manutenção da biodiversidade dos ecossistemas, por isso justifica-se todo o esforço para sua conservação. Além disso, por precisarem de habitats contínuos e bem conservados, sobretudo *T. pecari*, outras espécies também podem ser beneficiadas com os planos de ação voltados para essas espécies.

CONCLUSÃO

A metodologia empregada na prospecção de locos microssatélites e na construção de iniciadores para os mesmos obteve sucesso. Foram descritos 19 iniciadores, dos quais dez produziram genótipos polimórficos em queixadas e 11 em catetos.

Com os marcadores, que se mostraram uma boa ferramenta para avaliar a espécie, foi possível caracterizar geneticamente a população natural de queixadas do Pantanal, na qual foi encontrada uma diversidade genética relativamente baixa.

A amplificação heteróloga desses iniciadores também se mostrou como uma ferramenta útil para o estudo populacional de catetos. A diversidade genética encontrada nesta espécie foi ligeiramente maior que a das queixadas, embora isso possa ser um reflexo da composição diversa da população cativa estudada.

É necessário conduzir mais estudos para avaliar melhor a estruturação genética entre os bandos de queixada, que parecem funcionar como unidades reprodutivas fechadas, uma vez que essa característica tem profundas implicações sobre o modo como a espécie deve ser manejada, visando seu uso sustentável e conservação.

BIBLIOGRAFIA

- ADÁMOLI, J. O Pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados: discussão sobre o conceito “Complexo do Pantanal”. *In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA*, 32., 1981, Teresina. **Anais...** Teresina: UFPI. p.109-119. 1982.
- ALHO, .C.J.R., LACHER Jr., T.E., CAMPOS, Z.M.S. e GONÇALVES, H.C. Mamíferos da Fazenda Nhumirim, sub-região da Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul. I – Levantamento preliminar de espécies. **Revista Brasileira de Zoologia** vol.4, n.2, p.151-164. 1987.
- ALHO, C. J. R. e GONÇALVES. H. C. *Biodiversidade do Pantanal – Ecologia & Conservação*, Editora UNIDERP, Campo Grande, 135p. 2005.
- ALHO, C. J. R. Manejo de fauna silvestre. *In: Anais do I Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal*. EMBRAPA Corumbá, Brasília, Brasil. p. 183-197. 1986.
- ALHO, C. J. R; LACHER JR., E. T. & GONÇALVES, H. C. Environmental Degradation in the Pantanal Ecosystem. **BioScience** vol38, p.164-171. 1988.
- ALTRICHTER, M., CARRILLO, E., SAÉNZ, J., FULLER, T.D. White-lipped peccary (*Tayassu pecari*, Artiodactyla: Tayassuidae) diet and fruit availability in a Costa Rican Rain Fores. **Revista de Biología Tropical** vol. 49, n.3, p.1105-1114. 2001.
- ARAÚJO, R.M., SOUZA, M.B e RUIZ-MIRANDA, C.R. Densidade e tamanho populacional de mamíferos cinegéticos em duas Unidades de Conservação do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia Série Zoológica** vol. 98, n.3, p. 391-396. 2008.
- ARCHIBALD, A.L., HALEY, C.S., BROWN, J.F., COUPERWHITE, S., MCQUEEN, H.A., NICHOLSON, D., COPPIETERS, W., VAN DE WEGHE, A., STRATIL, A., WINTERO, A.K., FREDHOLM, M., LARSEN, N.J., NIELSEN, V.H., MILAN, D., WOLOSZYN, N., ROBIC, A., DALENS, M., RIQUET, J., GELLIN, J., CARÍTEZ, J-C., HUE, D., BURGAUD, G., OLLIVIER, L., BIDANEL, J-P., VAIMAN, M., RENARD, C., GELDERMANN, H., DAVOLI, R., RUYTER, D., VERSTEGE, E.J.M., GROENEN, M.A.M., DAVIES, W., HOYHEIM, B., KEISERUD, A., ANDERSSON, L., ELLEGREN, H., JOHANSSON, M., MARKLUND, L., MILLER, J.R., ANDERSON DEAR D.V., SIGNER, E., JEFFREYS, A.J., MORAN, C., TISSIER, P. LE., MULADNO, ROTHSCHILD, M.F., TUGGLE, C.K., VASKE, D., HELM, J., LIU, H-C., RAHMAN, A., YU, T.P., LARSON, R.G., SCHMITZ, C.B. The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). **Mammalian Genome** vol. 6, p. 157-175. 1995.
- ASQUITH, N.M., WRIGHT S.J. & CLAUSS, M.J. Does mammal community composition control recruitment in neotropical forests? Evidence from Panama. **Ecology** vol. 78, p. 941-946. 1997.

- ASSINE, M.L. Sedimentação na Bacia do Pantanal Mato-grossense, Centro-oeste do Brasil. Tese de Livre-Docência. Universidade Estadual Paulista. 2003.
- BARBARÁ, T., PALMA-SILVA, C., PAGGI, G.M., BERED, F., FAY, M.F. e LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology** vol. 16, p. 3759-3767. 2007.
- BARENDSE, W., ARMITAGE, S.M., KOSSAREK, L.M., SHALOM, A., KIRKPATRICK, B.W., RYAN, A.M., CLAYTON, D., LI, L., NEIBERGS, H.L., ZHANG, N., GROSSE, W.M., WEISS, J., CREIGHTON, P., MCCARTHY, F., RON, M., TEALE, A.J., FRIES, R., MCGRAW, R.A., MOORE, S.S., GEORGES, M., SOLLER, M., WOMACK, J.E. e HETZEL, D.J.S. A genetic linkage map of the bovine genome. **Nature Genetics** vol. 6, p. 227–235. 1994.
- BARRETO, G.R., HERNÁNDEZ, O.E. e OJASTI, J. Diet of peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*) in a dry forest of Venezuela. **Journal of Zoology London** vol. 1, p. 241-256. 1997.
- BAYLISS, P. e YEOMANS, K.M. Distribution and abundance of feral livestock in the "top end" of the Northern Territory (1985-86), and their relation to population control. **Australian Wildlife Research** vol, 16, p. 651-676. 1989.
- BECK, H. A review of peccary-palm interactions and their ecological ramifications across neotropics. **Journal of Mammalogy** vol. 87, p. 519-530. 2006.
- BECK, H., TABER, A., ALTRICHTER, M., KEUROGHLIAN, A. e REYNA, R. *Pecari tajacu*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. Disponível em: www.iucnredlist.org. (Último acesso em 15 de setembro de 2010). 2008.
- BEJA-PEREIRA, A., ZEYL, E., OURAGH, L., NAGASH, H., FERRAND, N., TABERLET, P. e LUIKART, G. Twenty polymorphic microsatellites in two of North Africa's most threatened ungulates: *Gazella dorcas* and *Ammotragus lervia* (Bovidae; Artiodactyla). **Molecular Ecology Notes** vol. 4, p. 452-455. 2004.
- BELLEMAIN, E., SWENSON, J.E., TALLMON, D., BRUNBERG, S. e TABERLET, P. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears. **Conservation Biology** vol. 19, n. 1, p. 150-161. 2005.
- BENJAMIN, Y. e YEKUTIELI, D. The control of false discovery rate under dependency. **Animal Statistics** vol. 29, p. 1165–1188. 2001.
- BIONDO, C., KEUROGHLIAN, A. e MYIAKI, C.Y. Analysis of genetic variability and population genetic structure of White-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) from the Pantanal (Brazil): Preliminary results. **Suiform Soundings** vol. 8, n.1, p. 28-31. 2008.
- BISHOP M, KAPPES S, KEELE J. A genetic linkage map for cattle. **Genetics** vol. 136, p. 619-639. 1994.
- BISHOP, M. D. et al. A genetic linkage map for cattle. **Genetics** vol. 136, p. 619-639. 1993.

- BODMER, R. E. Frugivory in Amazonian Artiodactyla: evidence for the evolution of the ruminant stomach. **Journal of Zoology London** vol. 219, p. 457-467. 1989.
- BODMER, R. E., FANG, T. G. e MOYA, I. L. Ungulate management and conservation in the Peruvian Amazon. **Biological Conservation** vol. 45, p. 303-10. 1988.
- BODMER, R.E. e SOWLS, L.K. The neotropical tayassuids (*Tayassu* e *Catagonus*): The Collared Peccary (*Tayassu tajacu*). In: Oliver, W.L.R.(org) **Pigs, peccaries and hippos**. Gland, Swtzerland: IUCN, 1993. p. 20-28. 1993.
- BODMER, R.E. Responses of Ungulates to seasonal inundations in the Amazonian floodplain. **Journal of Tropical Ecology** vol. 6, p. 191-201. 1990.
- BODMER, R.E. Strategies of seed dispersal and seed predation in Amazonian ungulates. **Biotropica** vol. 23, p. 255-261. 1991.
- BODMER, R.E., FANG, T.G., MOYA I, L. e GILL, R. Managing wildlife to conserve amazon forests: population biology and economic considerations of game hunting. **Biological Conservation** vol. 67, p. 29-35. 1994.
- BODMER, R.E., SOWLS, L.K. e TABER, A.B. The neotropical tayassuids (*Tayassu* e *Catagonus*): Economic importance and Human utilization of peccaries. In: OLIVER, W.L.R.(org) **Pigs, peccaries and hippos**. Gland, Swtzerland: IUCN, 1993. p. 51-61. 1993.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M. e DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics** vol. 32, p. 314-331. 1980.
- BOUTIN-GANACHE, I., RAPOSO, M., RAYMOND, M. e DESCHEPPER, C.F. M13-Tailed Primers Improve the Readability and Usability of Microsatellite Analyses Performed with Two Different Allele- Sizing Methods. **BioTechniques** vol. 31, n. 1, p. 27-29. 2001.
- BROWN Jr., K.S. Zoogeografia da região do Pantanal Mato-grossense. In: Anais do I Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal. pp. 137-178. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa-Pantanal, Corumbá, Brasil. 1996.
- BROWN, A.D., GARVIN, D.F., BURDON, J.J., ABBOTT, D.C. e READ, B.J. The effect of combining scald resistance genes on disease levels, yield and quality traits in barley. **Theoretical and Applied Genetics** vol. 93, p. 361-366. 1996.
- BRYANT, E.H. e REED, D.H. Fitness decline under relaxed selection in captive populations. **Conservation Biology** vol. 13, p. 665-669. 1999.
- BYERS, J.A. e BECKOFF, M. Social, spacing, and cooperative behaviour of the collared peccary, *Tayassu tajacu*. **Journal of Mammology** vol. 62, p. 767-785. 1981.
- CADAVID-GARCIA, E.A. O Clima do Pantanal Mato-grossense Corumbá: Embrapa-UEPA. 42p. 1984.

- CARRILLO, E., SAENZ, J.C. e FULLER, T.K. Moviments and activities of white-lipped peccaries in Corcovado National Park, Costa Rica. **Biological Conservation** vol. 108, p. 317-324. 2002.
- CARVALHO N.O. Hidrologia da Bacia do Alto Paraguai. *In: Anais do Simpósio Sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal*, 1. Corumbá. EMBRAPA, Brasília. pp.43-48. 1986.
- CARVALHO, N.O. Hidrologia da Bacia do Alto Paraguai. *In: Anais do I Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal*. pp. 43-50. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa-Pantanal, Corumbá, Brasil. 1986.
- CASTELLANOS, A. H. G. Aspectos de la organizacion social del baquiro de collar, *Tayassu tajacu*, en el estado Guarico, Venezuela. **Acta Biologica Venezuelica** vol. 11, p. 127-143. 1983.
- CHIARELLO, A.G., AGUIAR, L.M.S., CERQUEIRA, R., MELO, F.R., RODRIGUES, F.H.G. e SILVA, F.M.V. Mamíferos Ameaçados de Extinção no Brasil. *In: Livro vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. MMA. 2008.
- CITES. 2010. The CITES Appendices. Available on: www.cites.org. Último acesso em 16 de dezembro 2010.
- COLE, M.M. The distribution and origin of the savanna vegetation of Brazil. **The Geographical Journal** vol. 126, n. 2, p. 168-179. 1960.
- CORDEIRO, J.L.P. Estrutura e heterogeneidade da paisagem de uma unidade de conservação no nordeste do Pantanal (RPPN SESC Pantanal), Mato Grosso, Brasil:efeitos sobre a distribuição e densidade de antas (*Tapirus terrestris*) e de cervos-do-pantanal (*Dicotyles blastocerus*). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 221 p. 2004.
- CRAWFORD A.M., DODDS K.G., EDE A.J. et al. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. **Genetics** vol. 140, p. 703-724. 1995.
- CRAWSHAW Jr., P.G. 1995. Comparative ecology of ocelot (*Felis pardalis*) and jaguar (*Panthera onca*) in a protected subtropical forest in Brazil and Argentina. Tese de doutorado (PhD). Universidade da Flórida, Gainesville. 190p.
- CRAWSHAW, P. Mortalidad inducida por humanos y conservación de jaguares: el Pantanal y el Parque Nacional Iguazu em Brasil. *In: R.A. MEDELLÍN, C. EQUIHUA, C.L.B. CHETKIEWICZ, P.G. CRAWSHAW Jr., A. RABINOWITZ, K.H. REDFORD, J.G. ROBINSON, E.W. SANDERSON e A.B. TABER (eds.). El jaguar en el nuevo milenio*. pp. 451-462. Fondo de Cultura Económica, Universidad Nacional Autónoma de México, México e Wildlife Conservation Society, Nova York. 2002.
- CREEL, S., SPONG, G., SANDS, J.L, ROTELLA, J., ZEIGLE, J., JOE, L., MURPHY, K.M. e SMITHES, D. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellites genotypes. **Molecular Ecology** vol. 12, p. 2003-2009. 2003.

- CULLEN Jr., L., BODMER, R.E. e PADUA, C.V. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, **Brazil. Biological Conservation** vol. 95, p.49-56. 2000.
- DALPONTE, J.C. Dieta del jaguar y depredación de ganado em el norte del Pantanal, Brasil. In: R.A. MEDELLÍN, C. EQUIHUA, C.L.B. CHETKIEWICZ, P.G. CRAWSHAW Jr., A. RABINOWITZ, K.H. REDFORD, J.G. ROBINSON, E.W. SANDERSON & A.B. TABER. (eds.). El jaguar en el Nuevo milenio. pp. 209-221. Fondo de Cultura Econômica, Universidad Nacional Autónoma de Mexico, México e Wildlife Conservation Society, Nova York. 2002.
- DI RIENZO, A., PETERSON, A. C. J., GARZA, C., VALDES, A.M. e SLATKIN, M. Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Science USA** vol. 91, p. 3166-3170. 1994.
- DIRZO, R. e MIRANDA, A. Contemporary Neotropical defaunation and forest structure, function and diversity – a sequel to Jonh Terborgh. **Conservation Biology** vol. 4, p. 444-447. 1990.
- DONATTI, C.I. Consequências da Defaunação na Dispersão e Predação de sementes e no Recrutamento de Plântulas da Palmeira Brejaúva (*Astrocaryum aculeatissimum*) na Mata Atlântica. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Agroecossistemas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. 2004.
- DUCROCQ, S., An Eocene peccary from Thailand and the biogeographical origins of the artiodactyl family Tayassuidae. **Palaeontology** vol. 37, p. 765–779. 1994.
- EGGERT, L.S., EGGERT, J.A. e WOODRUFF, D.S. Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. **Molecular Ecology** vol. 12, p. 1389-1402. 2003.
- ELLEGREN, H., PRIMMER, CR. e SHELDON, B.C. Microsatellite ‘evolution’: directionality or bias. **Nature Genetics** vol. 11, p. 360-362. 1995.
- ENGEL, S.R., LINN, R.A., TAYLOR, J.F. e DAVIS, S.K. Conservation of Microsatellite Loci across Species of Artiodactyls: Implications for Population Studies. **Journal of Mammalogy** vol. 77, n. 2, p. 504-518. 1996.
- ERNEST, L.S., PENEDO, M.C.T., MAY, B.P., SYNAVEN, M.S., BOYCE, W.M. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California genetic analysis using microsatellites and fecal DNA. **Molecular Ecology** vol. 9, p. 433-441. 2000.
- ESTOUP, A., CORNUET, J.M., ROUSSET, F. e GUYOMARD, R. Uxtapose microsatellite systems as diagnostics markers for admixtene: theoretical aspect. **Molecular Biology and Evolution**. vol. 16, p. 898-908. 1999.
- FONSECA, F.R.D.; SANAIOTTI, T.M.; MALM, O. Concentração de mercúrio em ariranhas (*Pteronura brasiliensis*), lontras (*Lontra longicaudis*) e peixes de sua dieta no Pantanal, Brasil. In: IV Simpósio sobre recursos naturais e Sócio-Econômicos do

- Pantanal. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)-Pantanal, Corumbá, Brasil. Available from <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos/asperctos/bioticos.htm> (último acesso em: 10 de outubro de 2010). 2004.
- FRAGOSO, J.M. Home range and movement patterns of white-peccary (*Tayassu pecari*) herds in the northern Brazilian Amazon. **Biotropica** vol. 30, p. 458-469. 1998.
- FRAGOSO, J.M.V. Perception of Scale and Resource Partitioning by Peccaries: Behavioral Causes and Ecological Implications. **Journal of Mammalogy** vol. 80, n. 3, p. 993-1003. 1999.
- FRANKEL, O.H. Genetic Conservation: our evolutionary responsibility. *In: Annals of the XIII International Congress of Genetics*. 1974.
- FRANKHAM, R., BALOU, J.D. e BRISCOE, D.A. Fundamentos da Genética da Conservação. SBG. Ribeirão Preto. SP. 2008.
- FRANKLIN, I.R. Evolutionary changes in small populations. *In: Conservation biology – An Evolutionary-Ecological Perspective*. 1980.
- FREITAS, G.K. Planejamento Ecorregional do Pantanal. Relatório do Subprojeto 2.3 - Planejamento Ecorregional do Pantanal - MS/MT. TNC. Brasília. 2003.
- FREITAS, P.D., MARTINS, D.S., GALETTI, P.M. Jr. CID (Clipping vectors, Identifying SSR, Design of primers): a rapid and efficient bioinformatics tool for the detection of simple sequence repeats (SSRs) from genomic libraries. **Molecular Ecology Resources** vol. 8, p. 107–108. 2008.
- GALETTI, M., DONATTI, C.I., PIRES, A.S., GUIMARÃES, P.R. e JORDANO, P. Seed survival and dispersal of an endemic Atlantic forest palm: the combined effects of defaunation and fragmentation. **Botanical Journal of the Linnean Society** vol. 151, p. 141-149. 2006.
- GARLA, R. Ecologia alimentar de onça pintada (*Pantera onca*) na Mata Atlântica de Linhares, ES (carnívora: Felidae). Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 65p. 1998.
- GIRRARD, P. Efeito cumulativo das barragens no Pantanal. Instituto Centro Vida. Campo Grande-MS. 28 p. 2002.
- GONELA, A. Aplicação de marcadores microssatélites de *Sus scrofa domestica* na caracterização genética de populações de *Sus scrofa* sp (porco-Monteiro) e *Tayassu pecari* (queixada). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 89 p. 2003.
- GONGORA, J. e MORAN, C. Nuclear and mitochondrial evolutionary analyses of Collared, White-lipped and Chacoan Peccaries (*Tayassuidae*). **Molecular Phylogenetics and Evolution** vol. 35, p. 181-189. 2005.
- GONGORA, J. *Pecari maximus*. *In: IUCN Red List of Threatened Species Version 2010.4*. Disponível em: www.iucnredlist.org. Último acesso em: 1 de março de 2011.

- GONGORA, J., BIONDO, C. COOPER, J.D., TABER, A., KEUROGHLIAN, A., ALTRICHTER, M., NASCIMENTO, F.F., CHONG, A.Y., MIYAKI, C.Y., BODMER, R., MAYOR, P. e GONZÁLEZ, S. Revisiting the species status of *Pecari maximus* van Roosmalen et al., 2007 (Mammalia) from the Brazilian Amazon. **Bonner Zoologische Beiträge**. No prelo.
- GONGORA, J., CHEN, Y., BERNAL, J.E., NICHOLAS, F.W. e MORAN, C. Interspecific amplification of peccary microsatellite markers using porcine primers. **Animal Genetics** vol. 33, p. 312-327. 2002.
- GOUDET J. FstatVersion 1.2.A computer program to calculate F-statistics. **Journal Heredity** vol. 86, p. 485-486. 1995.
- GRAVES, H.B. Behavior and ecology of wild and feral swine (*Sus scrofa*). **Journal of Animal Science** vol. 58, n. 2, p. 482-92. 1984.
- GROVES, C.P. e GRUBB, P. The Suborder Suiformes. *In*: OLIVER, W.L.R.(org) **Pigs, peccaries and hippos**. Gland, Swtzerland: IUCN, 1993. p. 10-15. 1993.
- GRUBB, P. e GROVES, C.P. The Neotropical Tayassuids: Taxonomy and description. *In*: OLIVER, W.L.R.(org) **Pigs, peccaries and hippos**. Gland, Swtzerland: IUCN, 1993. p. 16-20. 1993.
- GUO, S.W. e THOMPSON, W.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics** vol. 48, p. 361-372. 1992.
- HALL, B.G. Phylogenetics made easy: A how-to manual for Molecular Biologists. Sinauer, Sunderland, MA. 2001.
- HANSEN, B.D., HARLEY, D.K.P., LINDERMAYER, D.B. e TAYLOR, A.C. **Molecular Ecology** vol. 18, p. 3346-3362. 2009.
- HARRIS, M.B., TOMAS, W., MOURÃO, G., SILVA, C.J., GUIMARÃES, E.. SONODA, F. e FACHIM, E. Safeguarding the Pantanal wetlands: threats and conservation initiatives. **Conservation Biology** vol. 19, n. 3, p. 714-720. 2005.
- HERRERA, R.C.S.P., SOUZA, R., HERRERA, H.M. e MAURO, R. de A. Hábitos alimentares do porco-monteiro (*Sus scrofa*) no pantanal da Nhecolândia. *In*: Anais do II Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal Corumbá/MS. p. 67. 1996.
- HILL, R.; WEBB, G. Floating grass mats of the Northern Territory floodplains an endangered habitat. **Wetlands** vol. 2, p. 45-50. 1982.
- JONES, K.L., BARZEN, J.A. e ASHLEY, M.V. Geographical partitioning of microsatellite variation in the sarus crane. **Animal Conservation** vol. 8, p. 1-8. 2005.
- JORDANO, P.; GALETTI, M.; PIZO, M.A. e SILVA, W.R. Ligando Frugivoria e dispersão de sementes à biologia da conservação. Pp 411-436. *In*: C.F. DUARTE; H.G. BERGALLO; M.A.S. ALVES & M. VAN SLUYS (eds.). Biologia da Conservação: Essências. Editora Rima, São Paulo, Brasil. 2006.

- JUDAS, J. e HENRY, O. Seasonal variation of home range of collared peccary in tropical rain forests of French Guiana. **Journal of Wildlife Management** vol. 63, p. 546–555. 1999.
- JUNK, W.J., BAYLEY, P.B., SPARKS, R.E. The flood pulse concept in river-floodplain systems. *In*: DODGE, D.P. (Ed) Proceedings of the international Large River symposium. **Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences** vol. 106, p. 100-127. 1989.
- KALINOWSKI, S.T., WAGNER, A.P e TAPER, M.L. ML-Relate: a computer program for maximum-likelihood estimation of relatedness and relationship. **Molecular Ecology Notes** vol. 6, p. 576-579. 2006.
- KEMP S, HISHIDA O, WAMBUGU J et al. A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. **Animal Genetics** vol. 26, p. 299–306. 1995.
- KEMP, S. J., BREZINSKY, L. & TEALE, A. J. A panel of bovine, ovine and caprine polymorphic microsatellites. **Animal Genetics** vol. 24, p. 363-365. 1993.
- KEUROGHLIAN, A. e EATON, D.P. Importance of rare habitats and riparian zones in a tropical Forest fragment: preferential use by *Tayassu pecari*, a wide-ranging frugivore. **Journal of Zoology** vol. 275, p. 283-293. 2008.
- KEUROGHLIAN, A., EATON, D.P. e LONGLAND, W.S. Area use by white-lipped and collared peccaries (*Tayassu pecari* e *Tayassu tajacu*) in a tropical rain forest fragment. **Biological Conservation** vol. 120, p. 411-425. 2004.
- KILTIE, A.R. Bite force as a basis for niche differentiation between rainforest peccaries (*Tayassu tajacu* e *T. pecari*). **Biotropica** vol. 14, p. 188-195. 1982.
- KILTIE, R. A. More on Amazon cultural ecology. **Current Anthropology** vol. 21, p. 541-6. 1980.
- KILTIE, R.A. e TERBORGH, J. Observations on the behavior of rain forest Peccaries in Peru: Why do white- lipped peccaries form herds? **Z. Tierpsychol.** vol. 62, p. 241-255. 1983.
- KILTIE, R.A. Stomach contents of rain forest peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*). **Biotropica** vol. 13, p. 234-236. 1981.
- KIMURA, M. e OHTA, T. Distribution of allelic frequencies in a finite population under stepwise production of neutral alleles. **Proceedings of the National Academy of Science USA** vol. 72, p. 2761-2764. 1975.
- KIMURA, M. e OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Science USA** vol. 75, p. 2868-2872. 1978.
- KOSTIA, S. Genomic evolution and diversity in artiodactyla. Dissertação de mestrado. Universidade de Helsinky. 47p. 2000.
- LACHER Jr., T. E., , ALHO, C. J. R., CAMPOS, Z. M. S. e GONCALVES, H. Densidades e preferencias de microhabitat de los mamiferos en la Hacienda

- Nhumirim, sub-region Nhecolândia, Pantanal del Mato Grosso del Sur. **Ciencia Interamericana** vol. 26, p. 30-38. 1986.
- LAGE, E.A.S., TELLES, M.P.C., SOARES, T.N., RESENDE, L.V., JÁCOMO, A.T.A e SILVEIRA, L. Variabilidade genética em bandos de queixadas (*Tayassu pecari*) no Parque Nacional das Emas utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). **Neotropical Biology and Conservation** vol. 3, n. 3, p. 126-134. 2008.
- LAIKRE, L., PALM, S. e RYMAN, N. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. **Ambio** vol. 34, n. 2, p. 111-119. 2005.
- LUCHINI, V., FABBRI, E., MARUCCO, F., RICCI, S., BOITANI, L. e RANDI, E. Noninvasive molecular tracking of colonizing Wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. **Molecular Ecology** vol. 11, p. 857-868. 2002.
- MA, H., CHEN, S., LIAO, X., XU, T. e GE, J. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from a dinucleotide-enriched genomic library of obscure puffer (*Takifugu obscurus*) and cross-species amplification. **Conservation Genetics** vol. 10, p. 955-957. 2009.
- MACEDO, H.A., SILVA, A., NEVES, S.M.A.S e NEVES, R.J. Avaliação das queimadas no Pantanal do Paraguai na região de Corumbá e Ladário, MS no período de maio de 2009. In: Anais 2º Simpósio de Geotecnologias no Pantanal, Corumbá, 7-11 novembro 2009, Embrapa Informática Agropecuária/INPE, p.452-459. 2009.
- MACHADO, M.P., FELDHEIM, K.A., SELAS, A.B. e BOWIE, R.C.K. Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and widespread application to others members of the Pelecanidae. **Conservation Genetics** vol. 10, p. 1033-1036. 2009.
- MACHADO, R.B., PAGLIA, A.P., FONSECA, R.L. Áreas e paisagens prioritárias no Cerrado, Pantanal e Amazônia. Proceedings A Expansão da Agroenergia e seus impactos sobre os Ecossistemas Brasileiros. 26-27 Março 2007, Rio de Janeiro Brasil. Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável (FBDS). (http://www.fbds.org.br/Apresentacoes/6_Areas_Cerrado_Pant_Amaz_Paglia.pdf). 2006.
- MAMEDE, S.B e ALHO, C.J.R. Response of wild mammals to seasonal shrinking-and-expansion of habitats due to flooding regime of the Pantanal, Brazil. **Brazilian Journal of Biology** vol. 66, n. 4, p. 991-998. 2006.
- MARCH, I. The Neotropical Tayassuids: The White-lipped peccary (*Tayassu pecari*). In: Oliver, W.L.R.(org) **Pigs, peccaries and hippos**. Gland, Swtzerland: IUCN, 1993. p. 28-41. 1993.
- MARSHALL, L. Geochronology and land-mammal biochronology of the transamerican faunal interchange. In: STEHLI, F.G., WEBB, S.D. (Eds.), *The Great American Biotic Interchange*. Plenum Press, New York. 1985.

- MARSHALL, T.C., SLATE, J., KRUK, L.E.B. e PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology** vol. 7, p. 639-655. 1998.
- MAUDET, C., MILLER, C., BASSANO, B., BREITENMOSER-WÜRSTEN, C., GAUTHIER, D., OBEXER-RUFF, G., MICHALLET, J., TABERLET, P e LUIKART, G. Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: Application in Alpine ibex [*Capra ibex (ibex)*]. **Molecular Ecology** vol. 11, p. 421-436. 2002.
- MAYER, J.J. e WETZEL, R.M. *Tayassu pecari*. **Mammalian Species** vol. 293, p. 1-7. 1987.
- MCCOY, M. B., C. S. VAUGHN, M. A. RODRIGUEZ, e KITCHEN, D. Seasonal movement, home range, activity and diet of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in Costa Rican dry forest. **Vida Silvestre Neotropical** vol. 2, p. 6-20. 1990.
- MILLER, H.C., LAMBERT, D.M., MILLAR, C.D., ROBERTSON, B.D. e MINOT, E.O. Minisatellite DNA profiling detects lineages and parentage in the endangered kakapo (*Strigops habroptilus*) despite low microsatellite DNA variation. **Conservation Genetics** vol. 4, p. 265-274. 2003.
- MMA. Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira. Ministério do Meio Ambiente, Brasília - DF. 2002.
- MODI, S.W., GALLAGHER, D.S. e WOMACK, J.E. Evolutionary histories of highly repeated DNA families among the Artiodactyla (Mammalia). **Journal of Molecular Evolution** vol. 42, p. 337-349. 1996.
- MONES, A. and XIMENEZ, A. Hallazgo de los mamíferos extintos del Uruguay. Rev. Fac. **Humanidades y Ciencia, Serie Ciencias Biológicas** vol. 1, n. 12, p. 203-207. 1980.
- MOORE, S. S., SARGEANT, L. L., KING, T. J., MATTICK, J. S., GEORGES, M. and HETZEL, D. J. S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics** vol. 10, p. 654-660. 1991.
- MOURÃO, G., M. COUTINHO, R. MAURO, Z. CAMPOS, W. TOMÁS e W. MAGNUSSON. Aerial surveys of caiman, marsh deer and pampas deer in the Pantanal wetland of Brazil. **Biological Conservation** vol. 92, p. 175-183. 2000.
- MOURÃO, G., M.E. COUTINHO, R. MAURO, W. TOMÁS e W. MAGNUSSON. Levantamentos aéreos de espécies introduzidas no Pantanal: porcos ferais (porco monteiro), gado bovino e búfalos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Pantanal** vol. 28, p. 1-22. 2002.
- MÜLLER, P. Centres of dispersion and evolution in the Neotropical region. **Studies on Neotropical Fauna** vol. 7, p. 173-185. 1972.

- MYERS N., MITTERMEIER R.A., MITTERMEIER C.G., DA-FONSECA G.A.B., KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** vol. 403, p. 853-858. 2000.
- NASCIMENTO, V.L., FERREIRA, J.A., FREITAS, D.M., LIMA BORGES, P.A. e TOMAS, W.A. Período de atividade de alguns vertebrados do Pantanal, estimado por fotografia remota. *In*: IV Simpósio sobre recursos naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)-Pantanal, Corumbá, Brasil. Available from <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos/asperctos/bioticos.htm> (último acesso em: Outubro de 2010). 2004.
- NEI, M. e KUMAR, S. Molecular Evolution and Phyllogenetics. Oxford Universtiy Press, New York. 2000.
- NERI, F.M. Ecologia e Conservação de catetos, *Tayassu tajacu*, (Linnaeus, 1758) (Artiodactyla, Tayassuidae) em áreas de cerrado do estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. 148 p. 2004.
- OLIVEIRA, E.J., PÁDUA, J.G.; ZUCCHI M.I., VENCOVSKY, R., VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology** vol. 29, n. 20, p. 294-307. 2006.
- OLIVER, W.L.R.; BRISBIN, I.L. Introduced and feral pigs: problems, policy and priorities. *In*: OLIVER, W.L.R.(org) **Pigs, peccaries and hippos**. Gland, Swtzerland: IUCN, 1993. p.179-199. 1993.
- OLIVER, W.R.L. Introduction. *In*: OLIVER, W.L.R.(org) **Pigs, peccaries and hippos**. Gland, Swtzerland: IUCN, 1993. p. 3-10. 1993.
- OLSON, D.M. e DINERSTEIN, E. The Global 200: A representarion approach to conserving the Earth's most biologically valuable ecorregions. **Conservation Biology** vol. 12, n. 3, p. 502-515. 1998.
- PACHECO, F.L. e SIMONETTI, A.J. Genetic structure of a Mimosoid tree deprived of its seed disperser, the spider monkey. **Conservation Biology** vol. 14, p. 1766-1775. 2000.
- PADOVANI, C.R., CRUZ, M.L.L. e PADOVANI, S.L.A.G. Desmataento no Pantanal Brasileiro para o ano 2000. Anais do IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal Corumbá/MS. 2004.
- PEAKALL, R., GILMORE, S., KEYS, W., MORGANTE, M., RAFALSKI, A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. **Molecular Biology and Evolution** vol. 15, p. 1275–1287. 1998.
- PERES, C.A. Effects of subsistence hunting on vertebrate community structure in Amazonian forests. **Conservation Biology** vol. 14, p. 240–253. 2000.

- PERES, C.A. Population status of White-lipped *Tayassu pecari* and Collared peccaries *T. tajacu* in hunted and unhunted Amazonian forests. **Biological Conservation** vol. 7, p. 115-123. 1996.
- PERES, C.A. Synergistic effects of subsistence hunting and habitat fragmentation on Amazonian forest vertebrates. **Conservation Biology** vol. 15, p. 1490-1505. 2001.
- PIRES, A.S. *Perda de Diversidade de Palmeiras em Fragmentos de Mata Atlântica: Padrões e Processos*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, Brasil. 2006.
- PIRY, S., LUIKART, G., CORNUET, J-M. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in effective population size from allele frequency data. **Journal of Heredity** vol., 90, p. 502-503. 1999.
- PONCE, V.M. Estudos hidrológicos e Ambientais da Hidrovia Paraná-Paraguai no Pantanal Mato Grossense. Um estudo de referência. San Diego State University, San Diego. 1995.
- PRIMACK, R.B. e RODRIGUES, E. *Biologia da Conservação*. Ed. Planta, Londrina. 2001.
- PRIMMER, C.R., PAINTER, J.N., KOSKINEN, M.T., PALLO, J.U. e MERILÄ, J. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. **Journal Of Avian Biology** vol. 36, p. 348-360. 2005.
- PRUGH, L.R., RITLAND, C.E, ARTHUR, S.M. e KREBBS, C.J. Molecular testing of observer identification of carnivore feces in the field. **Wildlife Society Bulletin** vol. 14, p. 1585-1596. 2005.
- RAYMOND, M. e ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): a population genetic software for exact test and ecumenism. **Journal of Heredity** vol. 86, p. 248-249. 1995.
- REDFORD, K. H. & ROBINSON, J. G. The game of choice: patterns of Indian and colonist hunting in the neotropics. **American Anthropologist** vol. 89, p. 650-67. 1987.
- REDFORD, K.H. e FONSECA, G.A.B. The role of gallery forests in the zoogeography of the Cerrado's non-volant mammalian fauna. **Biotropica** vol. 18, n. 2, p. 126-135. 1986.
- REDFORD, K.H. The Empty Forest. **BioScience** vol. 42, n. 6, p. 412-422. 1992.
- REYNA-HURTADO, R., TABER, A., ALTRICHTER, M., FRAGOSO, J., KEUROGHLIAN, A. & BECK, H. *Tayassu pecari*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. <www.iucnredlist.org>. Último acesso em 15 de setembro 2010. 2008.
- RIOS, G.Z. Sustentabilidad de la cacería de subsistència: El caso de cuatro comunidades quíchuas em La Amazonia nororiental ecuatoriana. **Journal of Neotropical Mammalogy** vol. 8, n. 1, p. 59-66. 2001.

- ROBINSON, J.G. e EISENBERG, J.F. Group Size and Foraging Habits of the Collared Peccary *Tayassu tajacu*. **Journal of Mammalogy** vol. 66, n. 1, p. 153-155. 1981.
- RODRIGUES, F.H.G., MEDRI, I.M., TOMAS, W.M e MOURÃO, G.M. Revisão do conhecimento sobre ocorrência e distribuição de mamíferos do Pantanal. Corumbá, MS: Embrapa CPAP. 41p. (Documentos, 38) 2002.
- ROHRER, G. A., ALEXANDER L. J., KEELE J. W., SMITH T. P. & BEATTIE C. W. A microsatellite linkage map of the porcine genome. **Genetics** vol. 136, p. 231-245. 1994.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- SANCHES, A. Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. 126 pp. 2007.
- SANDERSON, E.W., C.L.B. CHETKIEWICZ, R.A. MEDELLIN, A. RABINOWITZ, K.H. REDFORD, J.G. ROBINSON e A.B. TABER. Un análisis geográfico del estado de conservación y distribución de los jaguars através de su área de distribución. In: R.A. MEDELLÍN, C. EQUIHUA, C.L.B. CHETKIEWICZ, P.G. CRAWSHAW Jr., A. RABINOWITZ, K.H. REDFORD, J.G. ROBINSON, E.W. SANDERSON e A.B. TABER (eds.). El jaguar en el Nuevo milenio. pp. 551-560. Fondo de Cultura Económica, Universidad Nacional Autónoma de México, México e Wildlife Conservation Society, Nova York. 2002.
- SARLO, L.G., SILVA, A.F.A. e MEDINA-COSTA, E. Diagnóstico molecular da distrofia muscular Duchenne. **Revista Científica da FMC** vol. 4, n. 1, p. 2-9. 2009.
- SCHLOSSER, J.A., DUBACH, J.M., GARNER, T.W.J., ARAYA, B., BERNAL, M., SIMEONE, A., SMITH, K.A. e WALLACE, R.S. Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. **Conservation Genetics** vol. 10, p. 839-849. 2009.
- SCHLÖTTERER, C. e Tautz, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research** vol. 20, n. 2, p. 211-215. 1992.
- SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma** vol. 109, p. 365-371. 2000.
- SHAFFER, M. L. Minimum population sizes for species conservation. **BioScience** vol 31, p. 131-134. 1981.
- SILVA, A., RIEDER, A., DORES, E.F.G.C, RODRIGUES, G.L., MENDES, M.F., SILVA, P.L., LACERDA, R.G. e HACON, S. Agentes pesticidas de intoxicação em três zonas habitacionais do município de Cáceres, Alto Pantanal, MT, Brasil.). In: IV Simpósio sobre recursos naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)-Pantanal, Corumbá, Brasil. Available from <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos/asperctos/bioticos.htm> (último acesso em: Outubro de 2010). 2004.

- SILVA, J.A.S. Onça parda, suçuarana: *Felis concolor* (Linnaeus, 1771). In: Fonseca, A.B., Rylands, A.B., Costa, C.M.R., Machado, R.B. e Leite, Y.L.R. Livro Vermelho dos mamíferos brasileiros ameaçados de extinção. Belo Horizonte. Fundação Biodiversitas. 1994.
- SILVA, J.S.V. e ABDON, M.M. Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** vol. 33, p. 1703-1711. 1998.
- SILVA, M.P., MAURO, R., MOURÃO, G. e COUTINHO, M. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. **Revista Brasileira de Botânica** vol. 23, n. 2, p. 143-152.
- SILVA, R. W. Avaliação da variabilidade genética em *Tayassu tajacu* (cateto) e *Tayassu pecari* (queixada) por meio da utilização de marcadores microssatélites. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 77 p. 2006.
- SLATE, J., COLTMAN, D.W., GOODMAN, S.J., MACLEAN, I., PEMBERTON, J.M. e WILLIAMS, J.L. Bovine microssatelite locos are highly conserved in red deer (*Cervus elaphus*), sika deer (*Cervus nippon*) and Soay sheep (*Ovis aries*). **Animal Genetics** vol. 29, p. 307-315. 1998.
- SLOANE, M.A., SUNNUCKS, P., ALPERS, D., BEHEREGARAY, L.B., TAYLOR, A.C. Highly reliable genetic identification of individual northern hairy-nosed wombats from single remotely collected hairs: a feasible censusing method. **Molecular Ecology** vol. 12, p. 1233-1240. 2000.
- SOWLS, L.K. Javalinas and other Peccaries their Biology, Management and Use. 2nd Edn. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona. 1997.
- STRAND, M., T. A. PROLLA, R. M. LISKAY, and T. D. PETES. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature** vol. 365, p. 274–276. 1993.
- TABER, A. B., C. P. DONCASTER, N. N. NERIS e COLMAN. Ranging behavior and activity patterns of two sympatric peccaries, *Catagonus wagneri* and *Tayassu tajacu*, in the Paraguayan Chaco. **Mammalia** vol. 58, p. 61-71. 1994.
- TABER, A.B. e OLIVER, W.L.R. The neotropical tayassuids (*Tayassu* e *Catagonus*): Review of priorities for conservation action and future research on neotropical peccaries. In: OLIVER, W.L.R.(org) **Pigs, peccaries and hippos**. Gland, Switzerland: IUCN, 1993. pg. 16-41. 1993.
- TABER, A.B. The Chacoan Peccary (*Catagonus wagneri*). In: OLIVER, W.L.R.(org) **Pigs, peccaries and hippos**. Gland, Switzerland: IUCN, 1993. p. 16-20. 1993.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids** vol. 17, p. 6364-6471. 1989.
- TAUTZ, D. e RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids** vol. 12, p. 4126- 4138. 1984.

- TELLES, M.C.P., RESENDE, L.V., SOARES, T.N., RODRIGUES, F.M., JÁCOMO, A.T.A. e SILVEIRA, L. Avaliação do padrão de amplificação de marcadores RAPD em bandos de queixada (*Tayassu pecari*) do Parque Nacional das Emas. **Ciência Animal Brasileira** vol. 7, n. 1, p. 7-14. 2003.
- THEIMER, T.C., KEIM, K.. Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome b DNA sequences. **Journal Mammalogy** vol. 79, p. 566–572. 1998.
- TIEPOLO, L.M. e TOMAS, W.M. Ordem Artiodactyla. *In*: Mamíferos do Brasil (REIS, N., PERACCHI, A.L., PEDRO, W.A. e LIMA, I.P. Eds.). Edifurb. Londrina. 2006.
- TOMAS, W.M., P.A. LIMA BORGES, H.J.F. ROCHA, R. SÁ FILHO, F. KUTCHENSKI Jr. & T.V. UDRY. Potencial dos rios Aquidauana e Miranda, no Pantanal de Mato Grosso do Sul, para a conservação da ariranha (*Pteronura brasiliensis*). In: Anais do III Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal. pp. 1-12. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa-Pantanal, Corumbá, Brasil. Disponível em <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congresso/Bioticos/TOMAS-073.pdf> (acessado em 22 de janeiro de 2005). 2000.
- UETENABARO, M., PRADO, C.P.A, RODRIGUES, D.J., GORDO, M. e CAMPOS, Z. Guia de campo dos anuros do Pantanal e Planaltos do entorno. Editoras UFMS/UFMT. 193p. 2008.
- URQUHART, J., WANG, Y. e FU, J. Historical vicariance and male-mediated gene flow in the toad-headed lizards *Phrynocephalus przewalskii*. **Molecular Ecology** vol. 18, p. 3714-3729. 2009.
- VALIÈRE, N. GIMLET: A computer program for analyzing genetic individual identification data. **Molecular Ecology Notes** vol. 10, p. 1046. 2002.
- VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W.F., WILLS, D.P.M. e SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Mol Ecol Notes** vol. 4, p. 535–538. 2004.
- VAN ROOSMALEN, M.G.M., FRENZ, L., VAN HOOFT, P., IONGHI, H.H. e LEIRS, H. A new species of living peccary (Mammalia: Tayassuidae) from the Brazilian Amazon. **Bonner Zoologische Beiträge** vol. 55, p. 105-112. 2007.
- VIDOLIN, G.L., BIONDI, D. e WANDEMBRUCK, A. Habitat selectivity of Araucaria Forest by White-lipped Peccaries (*Tayassu pecari*) in Paraná, Brasil. **Suiform Soundings** vol. 8, n. 1, p. 27-31. 2008.
- VIEIRA, L.M., V.N. SILVA & R.C. CAMPOS. Níveis de mercúrio total na carne de peixes como indicadores de contaminação em sistemas aquáticos no Pantanal. In: IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal. pp. 1-9. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa-Pantanal, Corumbá, Brasil. Disponível em <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos/asperctos/bioticos.htm> (acessado em 10 de outubro de 2010). 2004.

- VIGNAL, A., MILAN, D., SANCRISTOBAL, M. e EGGEL, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection and Evolution** vol. 34, p. 275-305. 2002.
- WAN, Q., FANG, S., CHEN, G., WANG, Z., DING, P., ZHU, M., CHEN, K., YU, J. e ZHAO, Y. Use of oligonucleotide fingerprinting and fecal DNA in identifying the distribution of the Chinese tiger (*Panthera tigris amoyensis* Hilzheimer). **Biodiversity and Conservation** vol. 12, p. 1641-1648. 2003.
- WANG, I.J. Fine scale population structure in a desert amphibian: landscape genetics of the black-toad (*Bufo exsul*). **Molecular Ecology** vol. 18, p. 3847-3856. 2009.
- WEBER, L.J. e WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Human Molecular Genetics** vol. 2, p. 1123-1128. 1993.
- WEIR, B.S. e COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analyses of population structure. **Evolution** vol. 38, p. 1358-1370. 1984.
- WILLIAMS, S.E. e HOFFMAN, E.A. Minimizing genetic adaptation in captivity breeding programs: A review. **Biological Conservation** vol. 142, p. 2388-2400. 2009.
- WILSON, A.C.C., MASSONNET, B., SIMON, J., PRUNIER-LETERME, N., DOLATTI, L., LLEWELLYN, K.S., FIGUEROA, C.C., RAMIREZ, C.C., BLACKMAN, R.L., ESTOUP, A. e SUNNUCKS, P. Cross-species amplification of microsatellite loci in aphids: assessment and application. **Molecular Ecology Notes** vol. 4, p. 104-109. 2004.
- YIN, J., LIU, W., GUO, T., ZHANG, S. e HUA, P. Development and characterization of 13 novel microsatellite loci from the flat-headed bar (*Tylonycteris pachypus*) with cross-species amplification in closely related taxa. **Conservation Genetics** vol. 10, p. 1061-1063. 2009.
- YOUNG, D.L., ALLARD, M.W., WARD, R.H. e SHIELDS, G.F. Mitochondrial DNA phylogeography of the north american brown bear and implications for conservation. **Conservation Biology** vol. 12, p. 408-417. 1998.
- ZANE, L. BARGELLONE, L. e PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology** vol. 11, p. 1-16. 2002.