

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**BIOLOGIA E GENÉTICA DE *Lontra longicaudis* (OLFERS,
1818) (MAMMALIA, MUSTELIDAE): UMA REVISÃO E
ENSAIO A RESPEITO DO USO DE MARCADORES
MOLECULARES**

Orientador: Pedro Manoel Galetti Junior

SÃO CARLOS - SP

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**BIOLOGIA E GENÉTICA DE *Lontra longicaudis* (OLFERS,
1818) (MAMMALIA, MUSTELIDAE): UMA REVISÃO E
ENSAIO A RESPEITO DO USO DE MARCADORES
MOLECULARES**

RAPHAEL DE OLIVEIRA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

SÃO CARLOS - SP

2014

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

O48bg

Oliveira, Raphael de.

Biologia e genética de *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818) (Mammalia, Mustelidae) : uma revisão e ensaio a respeito do uso de marcadores moleculares / Raphael de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
56 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Conservação. 2. Mamífero aquático. 3. Microssatélites.
4. Paraná, Rio, Bacia. I. Título.

CDD: 574.5247 (20ª)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais do candidato Raphael de Oliveira, realizada em 18/11/2014:

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior
UFSCar

Profa. Dra. Débora Diniz Bezerra
UESB

Prof. Dr. Manoel Martins Dias Filho
UFSCar

Dedico este trabalho a todos amigos e familiares..

“Nessa vida não precisamos ter inteligência, e sim amigos.”

Juan Pablo Torres

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, **Vicente** e **Nely**, por sempre apoiarem e tornarem possível que eu cosiga ir atrás dos meus sonhos. Meu pai que foi peça fundamental na logística de minhas coletas, auxiliando no transporte, comida e companheirismo.

Ao professor **Pedro Galetti** por ter me aceitado como seu aluno de mestrado e ter me dado à oportunidade de aprender um pouco mais.

Minha avó **Maria** que desde que eu era pequeno me incentivava a assistir e me lembrava dos horários dos documentários sobre vida selvagem. E hoje passa nervoso quando vou para campo ver com meus olhos o que antes eu via pela televisão e livros. Meu tio **Ary** que foi o culpado por me fazer entender que eu gostava dessa vida de biólogo. Meus irmãos, **Mariana** e **Ricardo**, que sempre me apoiaram.

Minha amiga irmã **Fernanda D. Abra**, pelas brigas, risadas, conversas, sugestões, enchimentos de saco, companheirismo, dores de cabeça e tantas outras situações. Obrigado pela amizade e sempre ter me incentivado.

Aos moradores do **Rancho Feliz: Tony, Mario, Carmen, Elia e Oreia**. Rancho e pessoas que não tenho como agradecer pelos momentos que tivemos e oportunidade de compartilhar esses dias em nossas vidas. Desde os churrascos no quintal até as noites amarguradas na cozinha. “Temos que aproveitar a juventude. AH!”.

A todos os **amigos dos LabBMC**. Nunca pensei que um dia trabalharia em um laboratório, mas acabei que fui. E vim para um lugar com tanta gente interessante e divertida. Agradeço a **todos sem exceção** pelas inúmeras ajudas, conversas, novamente ajudas, risadas, ajudas mais uma vez, coletas, por terem me ajudado, discussões, pedaladas e mais uma vez por sempre terem me ajudado. Gostaria de agradecer especialmente pela paciência **Bruno, Karen e Andiará** que sempre me auxiliaram nos trabalhos de bancada e por terem me ensinado tudo a respeito de extrações, PCR, gel de agarose, genotipagem e tudo mais.

Obrigado **Juan** pela ajuda providencial que me deu na reta final desse trabalho, pelas conversas sérias e pelas conversas nem um pouco sérias.

Um agradecimento especial ao meu mestre de capoeira angola **Mestre Pé de Chumbo**, **Mestre Jurubeba**, meus professores **Lyron** e **Rosinha**, e a todos os camaradas do **Ceca-AJPP**, mas um em especial os camaradas do núcleo de São Carlos. Não tenho como separar minha vida da capoeira. *“Quem não conhece a capoeira, não pode dar o seu valor”*.

Aos amigos **Conrado** e **Roger** que estiveram comigo desde o início nas primeiras descidas de caiaque. Parceiros que sempre estiveram presentes me apoiando, participando das coletas, votando a favor ou contra, atrasando o “rolê” por não acordar e peixadas. E NUM OLHA PRA CAMERA!

A todos que me acompanharam em pelo menos uma das coletas. **Bruno Prudente**, **Lourenço Grimaldi**, **Rafael De Paula**, **Zé Filósofo**, **Edson Jr**, **Diego Verme**, **Ricardo de Oliveira**, **Créu**, **Léo Rasta**, **Fer Abra**. Um agradecimento especial para a **Paula Franco** que em algumas campanhas me acompanhou e me ajudou bastante no campo.

Fábio Maffei e **Flávio Ubaid** por desde os tempos de USC e até os dias de hoje me apoiarem e me ajudarem na biologia. Xééé.

Lucão Caldano, **André Selva Créu** e **Léo Rasta Niero**, meu obrigado pela amizade durante esses anos de mestrado. Pescarias, pedaladas, subidas pra BA e cervejinhas que fizeram a diferença.

Também ao **Jão** e **Roseli** da secretaria. Obrigado e desculpa pelas dores de cabeça haha.

Agradeço também a CAPES por ter me concedido a bolsa de mestrado.

INDICE

INTRODUÇÃO GERAL.....	8
1.1 Família Mustelidae.....	11
1.2 Subfamília Lutrinae.....	12
1.3 <i>Lontra longicaudis</i>	12
1.4 Marcadores moleculares em estudos populacionais.....	13
CAPÍTULO 1 – ARTIGO.....	14
CAPÍTULO 2 - PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO NÃO INVASIVO UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES E ANÁLISE DE UMA POPULAÇÃO DO RIO TIETÊ.....	34
Resumo.....	35
Introdução.....	36
Objetivos gerais e específicos.....	41
Material e métodos.....	42
Resultados / Discussão.....	47
Referências.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição atual de <i>Lontra longicaudis</i> (Fonte: IUCN, 2014).....	32
Figura 2. Projeção para nova distribuição de <i>L. longicaudis</i> proposto por Rheingantz et al. 2014. Em vermelho, pontos de ocorrência. Em verde claro, distribuição da lontra pela IUCN. Na cor verde, projeção feita por Maxent . (Fonte: Rheingantz et al. 2014).....	33
Figura 3. Relação filogenética de 12 espécies de lontra, utilizando a análise de máxima verossimilhança.....	34
Figura 4. Relação filogenética de 12 espécies de lontra, utilizando análise Bayesiana.....	35
Figura 5. Rio Tietê. Mapa extraído do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).....	42
Figura 6. Aspectos da paisagem da área amostral. (a) tráfego intenso de embarções; (b) pastagem; (c) ilhas de concreto no meio do rio; (d) construções antrópicas.....	43
Figura 7. Pontos de locais onde foram encontrados fezes ou muco de <i>L. longicaudis</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela1. Sequências <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primers</i> de microssatélites desenvolvidos para <i>Lontra canadensis</i> (Beheler et al, 2004,2005).....	45
Tabela 2. Tabela de genótipos de <i>Lontra longicaudis</i>	51

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Família Mustelidae

Mustelidae é considerada a maior e mais diversa família dentre os carnívoros, compreendendo oito subfamílias em todo o mundo, exceto Austrália e Antártica (Nowak,1999). Como características morfológicas apresentam o corpo alongado, cabeça pequena, pernas curtas, cauda longa e pelagem densa. Seus representantes são plantígrados possuindo cinco dedos em cada membro e habitam ambientes terrestres e aquáticos. São principalmente carnívoros, sendo algumas espécies altamente especializadas, predominantemente onívoras ou piscívoras (Emmons,1997).

Esta família engloba 25 gêneros e 67 espécies, ocorrendo no Brasil seis destas espécies que estão inseridas em cinco gêneros: *Mustela* (Linnaeus. 1758), *Eira* (Smith, 1842), *Galictis* (Bell, 1826), *Lontra* (Gray, 1843) e *Pteronura* (Gray, 1837)(Reis *et al*, 2011). A família Mustelidae se divide em duas subfamílias: Mustelinae, representada pelas doninhas, irara e furões; e Lutrinae, que são as lontras e ariranhas.

1.2 Subfamília Lutrinae

A subfamília Lutrinae compreende as espécies de lontra, que se dividem em 13 espécies e em cinco gêneros: *Enhydra* (Fleming, 1828), *Lutra* (Brünnich, 1771), *Lontra*, *Pteronura*, *Lutrogale* (Gray, 1865) e *Aonyx* (Lesson, 1827) (Kruuk, 2006). Na América do Sul estão presentes dois gêneros, *Lontra* e *Pteronura*, representados por quatro espécies: *Lontra provocax* (Thomas, 1908), *L. felina* (Molina, 1782) *L. longicaudis* e *Pteronura brasiliensis* (Gmelin, 1788). As duas últimas são mais

amplamente distribuídas, ocorrendo da América Central até América do Sul. Já as duas primeiras possuem uma distribuição mais restrita, presentes apenas na América do Sul. A *Lontra felina* na costa do Pacífico, da Patagônia até o Equador e a *Lontra provocax* principalmente na Patagônia (Chehébar, 1990). No território brasileiro duas espécies podem ser encontradas, a *Lontra longicaudis* (lontra) e a *Pteronura brasiliensis* (ariranha), que em algumas regiões do país ocorrem em simpatria (Reis *et al.*, 2011).

1.3 *Lontra longicaudis*

A *Lontra longicaudis* apresenta coloração marrom-pardacenta com o ventre e o focinho amarelados. Possuem por volta de 1,20 a 1,50cm de comprimento e pesam geralmente de 7 a 15 kg. Possuem dimorfismo entre os sexos, sendo o macho 20 a 25% maior do que a fêmea (Lariviere, 1999). Apresentam diversas adaptações para sua vida aquática como pelagem impermeável, membrana interdigital nas patas, cauda musculosa e achatada, fechamento das narinas ao mergulhar, longas vibrissas para auxiliar na localização de presas. São animais solitários, quando observados em grupo geralmente sendo a fêmea com filhotes.

Das espécies de Lontra presentes na América do Sul é a de maior distribuição, que ocorre desde o México até o norte da Argentina, sempre associada a ambientes aquáticos (Redford & Eisenberg 1992; Maldonado & Gonzalez, 2003). É um animal bastante versátil, ocorrendo em diversos tipos de habitat como rios, banhados, lagos e ambientes marinhos (Mason, 1990). Apresenta tolerância a atividades humanas, ocorrendo em locais antropizados como cursos d'água que cruzam meios urbanos (Waldemarin & Alvarez, 2008).

Diversos estudos foram direcionados a analisar sua dieta (Passamani & Camargo, 1995; Pardini, 1998; Colares & Waldemarin, 2000). Sendo apontados como principais itens os peixes, crustáceos e moluscos, podendo ela alimentar-se também de répteis, anfíbios, pequenos mamíferos, aves e insetos de forma oportunista.

Até os anos de 1970 foi largamente caçada para obtenção de sua pele, uma das mais requisitas pelo mercado de peles. Atualmente sua caça está proibida e as principais ameaças nos dias de hoje são a alteração e destruição de seu habitat, conflitos com pescadores e piscicultores, contaminação das águas e atropelamentos em rodovias (Waldemarin & Alvarez, 2008).

Pouco se sabe sobre essa espécie de lontra tendo os trabalhos já realizados a respeito da espécie se direcionado especialmente sobre sua dieta e utilização de habitat (Waldemarin, 2004). Porém pouca coisa se sabe sobre estrutura populacional, demografia atual e história evolutiva intraespecífica (Waldemarin & Alvarez, 2008).

Segundo a IUCN (2014)(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources), seu status de conservação é considerado como de Dados Deficientes, necessitando principalmente informações referentes a tamanho de população, composição e distribuição. Para a CITES, está enquadrada no Apêndice I (CITES,2014). No Brasil, segundo a última lista de espécies ameaçadas divulgada pelo IBAMA, a lontra está classificada como Vulnerável para os estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Paraná (IBAMA, 2008). Para o estado de São Paulo é dada como Quase Ameaçada (SEMMA, 2009)

1.4 Marcadores moleculares em estudos populacionais

Estudos das populações de carnívoros neotropicais geralmente são dificultados por algumas características comportamentais desses animais, tal como seus hábitos noturnos, grandes áreas de vida, e baixa densidade (Kohn & Wayne, 1997). Técnicas moleculares de genética têm utilizado amostras não invasivas, como fezes e pêlo, para estudos a nível populacional dessas espécies. Como grande parte dos mamíferos utilizam as fezes para demarcações odoríferas de seu território (Sillero-Zubiri & Macdonald 1998) e a captura destes apresentam vários riscos tanto para o pesquisador quanto para o animal, estudos que utilizem marcadores moleculares em amostras não invasivas representam uma ferramenta valiosa para a conservação desses animais (Haigh, 1998). Algumas informações que podem ser obtidas são a estimativa do tamanho da população, estruturação genética e dispersão (Ruell & Crooks, 2006).

Dentre os marcadores moleculares mais amplamente utilizados encontram-se os microssatélites. Destacam-se pela sua ampla distribuição no genoma, polimorfismo elevado e por possuírem pequenos segmentos de DNA, que facilitam sua amplificação em Reações de Cadeia de Polimerase (PCR) (Chistiakov *et al.*, 2006) e permitem sua utilização em amostras com DNA altamente fragmentado, como é o caso das fezes (Frankham *et al.*, 2002). Os microssatélites fornecem dados sobre a variabilidade genética, demografia, fluxo gênico, distribuição e individualização de amostras (Goldstein & Pollock, 1997) para estudos demográficos.

Atualmente poucos trabalhos que utilizaram marcadores moleculares como ferramenta para estudos populacionais de *Lontra longicaudis* foram publicados

(Ortega *et al*, 2012; Trinca *et al*, 2012; Weber *et al*, 2009). Sendo que, segundo a IUCN, informações a nível populacional são emergenciais para esta espécie.

CAPÍTULO 1 – ARTIGO

Biologia e genética de *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818): uma revisão e contribuições para a conservação

Raphael de Oliveira¹, Juan Pablo Torres² e Pedro Manoel Galetti Junior²

¹Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, Brasil.

²Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, Brasil.

RESUMO

A *Lontra longicaudis* é uma das 13 espécies de lontra com maior distribuição geográfica, ocorrendo desde o norte do México até o norte da Argentina. Em todo seu território, está presente em diversos tipos de ambientes e com variados níveis de qualidade ambiental. A oferta de alimentos e disponibilidade de locais propícios para criação de tocas são os fatores chave para a sua ocorrência. Considerada topo de cadeia, é um animal generalista, mas que apresenta uma preferência em sua dieta por peixes e crustáceos. Classificada pela IUCN como Dados Deficientes, possuindo vários trabalhos relacionados à dieta e utilização de ambiente. Porém, ainda há grandes lacunas no que diz respeito a estudos populacionais, distribuição atual e suas exigências ambientais. Este trabalho teve como objetivo fazer uma revisão do atual status e informações a respeito da espécie e propor quais atitudes devem ser tomadas para conservação da lontra, tal como, trabalhos de educação ambiental, monitoramento das unidades de conservação, maior rigidez com o cumprimento das leis ambientais e quais áreas necessitam de maiores informações para possibilitar uma classificação sobre o status de conservação mais adequada da lontra.

PALAVRAS CHAVE: *Lontra, Mamífero Aquático, Mustelidae, Conservação, América Latina*

ABSTRACT

The neotropical otter (*Lontra longicaudis*) is one of the 13 species of otter and has one of the widest geographic distribution, occurring from the north of Mexico until northern Argentina. Along its distribution the species, inhabits a variety of habitats facing different environmental quality levels. The availability of food and places to build burrows are the key factors to its occurrence. The species is defined as top predator and because its generalist habits, it has been suggested as a community structure species. Although the species tend to be generalist it shows a preferences for fishes and crustaceans in its diet. Its IUCN classification (data deficient) is based mainly on studies related to its diet and habitat use. Nevertheless, information about the species still have too much gaps in relation to populations studies, current distribution and environment requirements. This paper aims to review the current status and species information with the purpose of propose future conservation actions for the species, and therefore propose further information to enable a most appropriate classification on the conservation status of the neotropical otter.

Key words: , *Lontra*, *Aquatic Mammal*, *Mustelidae*, *Conservation*, *Latin America*.

Lontra longicaudis

Pertencente à subfamília Lutrinae da família Mustelidae, a *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818) ocorre no continente americano e é uma das espécies de lontra com maior área de distribuição (Chehebar,1990). Apresenta coloração marrom-pardacenta com o ventre e o focinho amarelados. Possuem por volta de 1,20 a 1,50 m de comprimento e pesam geralmente de 7 a 15 kg. Possuem dimorfismo sexual, sendo o macho 20 a 25% maior do que a fêmea (Larivière, 1999). Apresenta diversas adaptações para sua vida aquática como pelagem impermeável, membrana interdigital, cauda musculosa e achatada, capacidade de fechar as narinas ao mergulhar e longas vibrissas para auxiliar na localização de presas. São animais solitários e quando observados em grupo geralmente sendo a fêmea com filhotes (Kruuk, 2006). Os trabalhos já realizados a respeito da espécie se referem especialmente sobre sua dieta e utilização de habitat (Waldemarin e Alvarez 2008). Porém pouca coisa se sabe sobre sua estrutura populacional, demografia atual, história evolutiva intraespecífica e área de ocorrência(Waldemarin e Alvarez 2008). Segundo a International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN, 2014), seu status de conservação é considerado como Dados Deficientes, necessitando principalmente de informações referentes a tamanhos populacionais, exigências ambientais e distribuição atual. Para a Convenção Sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna Selvagem e Flora (CITES), está enquadrada no Apêndice I (CITES,2014).

DIETA e COMPORTAMENTO

A lontra está intimamente relacionada tanto ao ambiente aquático, quanto ao terrestre. Ela tem a capacidade de se locomover a grandes distâncias nadando, como relatado por Nakano-Oliveira et al. (2004),sem a necessidade de descansar. Adquiri a maior parte de seus alimentos na água, sendo que os principais itens encontrados em sua dieta são peixes e crustáceos (Pardini 1998, Colares e Waldemarin 2000, Quadros e Monteiro-Filho 2001, Kasper et al. 2004, Carvalho-Junior 2007, Rheingantz et al. 2011. Geralmente os alimentos são capturados na água e consumidos fora dela (Waldemarin 2004). De acordo com trabalhos a partir

de amostras fecais já realizados em diversas localidades, os principais itens de sua dieta são peixes e crustáceos seguidos em bem menor proporção por moluscos, aves, mamíferos, répteis, anfíbios e insetos.

Diversos estudos foram feitos no Brasil sobre a dieta da *L. longicaudis*, nos estados de Santa Catarina, em Florianópolis e em áreas de Reserva Natural (Quadros e Monteiro-Filho, 2001; Carvalho-Filho et al. 2013); Rio de Janeiro, no rio Mambucaba (Fonseca et al 2008; Rheingantz et al. 2011); Rio Grande do Sul, no Rio Forqueta no Vale do Taquari (Kasper et al. 2004) e na região costeira do estado (Colares e Waldemarin, 2000); Reservatório de Furnas em Minas Gerais (Passamani e Camargo, 1995); e São Paulo, no rio Betari (Pardini 1998). Regiões onde a espécie ocorre fora do Brasil também foram estudadas: Colômbia, nos rios Roble (Mayor-Victoria e Botero-Botero, 2010), e La Vieja do Alto Cauca (Restrepo e Botero-Botero, 2012); Argentina, no Parque Nacional El Rey em Salta (Chemes et al. 2010); e México, em algumas vertentes do Golfo de México e rio dos Pescados em Veracruz, Temascaltepec (Macías-Sánchez e Aranda 1999; Monroy-Vilchis e Mundo 2009).

Nos estudos realizados foram aplicados métodos de frequência de ocorrência e frequência volumétrica, com margens entre 2-10 km de rio, onde foram coletadas amostras de fezes por períodos que variaram entre 4-12 meses e levadas para laboratório para serem triadas.

Em duas áreas no sul do Brasil, Kasper et al. (2008) encontraram diferentes proporções em relação aos peixes consumidos. As famílias presentes foram Loricariidae (73.3%), Cichlidae (37.4%), Pimelodidae (22.5%), Characidae (11.6%), Curimatidae (2.7%) e Erythrinidae (1.0%). Nos altos andinos, Arcila (2003) encontrou uma possível preferência da lontra pela família *Loricariidae* devido à sua alta frequência nos Andes. Em uma área bastante antropizada no México, Monroy-Vilchis e Mundo (2009) reportaram só um tipo de peixe (*Oncorhynchus mykiss*) nas populações que foram estudadas, indicando que a seleção de presas por parte da lontra pode ser influenciada pela abundância e velocidade de natação dos peixes (Mayor-Victoria & Botero-Botero, 2009). Outro aspecto decisivo citado nos trabalhos apresentados sobre a dieta, é que a captura das presas é influenciada pelo gasto energético. Sendo que, a lontra optou por espécies que lhe trariam um ganho

energético maior, por serem mais vulneráveis à captura (Stephens & Krens, 1986). Apesar de ser um animal especialista no consumo de peixes, esses estudos demonstraram que em sua dieta também são encontrados itens capturados de forma oportunista (Quadros & Monteiro-Filho, 2001) como répteis, aves, anfíbios, moluscos e pequenos mamíferos (Pardini, 1998; Spínola & Vaughan, 1995; Kasper et al., 2004; Gallo-Reynoso et al. 2008;). Gallo-Reynoso (1997) constatou que na região norte do México os peixes são os mais representativos na dieta, enquanto que em outras localidades do país os crustáceos foram os principais itens. Carvalho-Junior (2013) comparando a dieta em dois ambientes diferentes no sul do Brasil verificou que houve uma diferença nos itens encontrados na dieta da lontra, sugerindo que tal diferença ocorreu por conta de cada ambiente apresentar uma gama diferente de presas. Já para os estudos feitos nas diferentes regiões do Brasil, os peixes foram o grupo mais representativo da dieta deste animal, seguido dos crustáceos.

A lontra tem o costume de utilizar tocas para descanso e criar seus filhotes e geralmente elas estão localizadas até 150m do curso d'água e são feitas em barrancos, em meio a raízes e em cavernas (Pardini e Trajano 1999). Em locais em que há uma elevação na altura das águas no período de cheia, registrou-se que as tocas foram feitas acima no nível da enchente (Kasper et al. 2008). O período reprodutivo ocorre principalmente na primavera, com tempo de gestação de 56 a 86 dias e os filhotes nascem em terra e começam a ter suas atividades aquáticas por volta de 74 dias depois (Larivière, 1999).

As marcações odoríferas desempenham um importante papel na comunicação intraespecífica da *Lontra longicaudis* (Parera, 1996). As fezes e mucos anais são depositados em locais secos e conspícuos evidenciando a presença de indivíduos no local e coordenar a atividade sexual (Rheingantz et al 2011).

DISTRIBUIÇÃO

Das espécies de lontras presentes na América do Sul é a de maior distribuição, encontrando-se desde o norte do México até o norte da Argentina (Fig. 1), estando sempre associada a ambientes aquáticos (Redford & Eisenberg 1992;

Maldonado & Gonzalez, 2003). É um animal bastante versátil, ocorrendo em diversos tipos de habitat como rios, banhados, reservatórios, lagos e ambientes marinhos (Mason, 1990; Quadros, 2012). Sua presença em ambientes marinhos está relacionada com fontes de água doce, para que possa se limpar do sal e se hidratar (Kruuk, 2006). Há registros dessa espécie em uma extensa variação de altitude, desde o nível do mar até 4.200 m nos Andes peruanos (Rheingantz et al 2014). Apresenta tolerância a atividades humanas, ocorrendo em locais antropizados como cursos d'água que cruzam meios urbanos e com grande tráfego de embarcações (Gomez, J. et al 2014; Waldemarin & Alvarez, 2008). Para Kruuk (2006), a ameaça mais significativa para a *Lontra longicaudis* é o impacto na redução de oferta de alimentos. Este autor também comenta que as lontras podem suportar degradação estrutural do habitat e até certo limite de poluição das águas. Outro fator importante é a presença de mata ciliar no local, pois a lontra está estreitamente ligada a ela para fazer suas tocas, descansar, criar seus filhotes, etc. (Waldemarin & Colares, 2000). Em coletas mensais realizadas no Rio Tietê no ano de 2013 (Pederneiras, SP – UTM -22.337036°/-48.721550°), um local com ambas as margens apresentando construções como ranchos e porto intermodal, com tráfego intenso de embarcações, encontramos vestígios de *L. longicaudis* em diversos elementos da paisagem de origem antrópica: embarcações velhas, embaixo das estruturas do porto intermodal, estaleiros. Tais observações vão a encontro da afirmação de que as lontras suportam locais grandemente alterados pelo homem.

A densidade da lontra apresentou uma variação em relação aos locais estudados. No Pantanal, Kruuk (2006) encontrou um valor de uma lontra a cada 2-3 km em linha reta. Já Carvalho-Filho (1990 e 2007) relatou um indivíduo a cada um quilometro. Porém, em um estudo utilizando marcadores moleculares no mesmo local em 2004, o autor encontrou a densidade estimada de 0,5 indivíduo a cada quilometro (Carvalho-Filho, 2007). Segundo Larivière (1999), locais com maior qualidade ambiental, com baixa poluição e baixa densidade demográfica, proporcionariam uma maior abundancia nas populações de lontra.

Em estudos recentes, foram registrados novos pontos de ocorrência para a espécie. Na região nordeste do Brasil, onde não há registros no mapa atual da IUCN, foram publicadas ocorrências nos estados da Bahia (Souto, 2012),

Pernambuco, Sergipe e Paraíba (Astúa et al. 2010). Outras localidades que devem ser incluídas no mapa de distribuição da *L. longicaudis* são: região dos Andes no Peru, Equador e Colômbia, região norte do México, oeste da Colômbia e Bolívia (Fig. 2) (Rheingantz et al. 2014). Esses novos dados se dão pelo aumento de esforços dos pesquisadores nessas regiões. Astúa et al (2010) comentam que a falta de registros na região nordeste do Brasil se dá pela falta de amostragens adequadas, pois já haviam registros antigos de lontra para a região.

Rheingantz et al. (2014), utilizando dados de ocorrência e relacionando com dados climáticos, hidrológicos, de população humana e de vegetação, estimaram um modelo de distribuição de espécies a partir do modelo de máxima entropia. Seus resultados indicaram que locais com alta temperatura anual e densidade populacional humana foram as variáveis que mais afetaram a distribuição da espécie. Verificaram também que as áreas protegidas são áreas mais adequadas para a ocorrência das lontras. Gomez et al. 2014 também encontraram resultados similares, sendo a densidade humana e tráfego intenso de embarcações fatores que influenciaram negativamente a presença de *L. longicaudis* no Delta do rio Paraná, na Argentina. Eles também defendem maiores cuidados com as áreas protegidas, restringindo o acesso de seres humanos, pois são áreas chave para a integridade das populações de lontras.

FILOGENIA

A subfamília Lutrinae está representada por 13 espécies de lontras, divididas em seis gêneros. Elaboramos duas árvores filogenéticas utilizando dois genes mitocondriais citocromo b e NADH5, de sequências de 12 espécies de lontra que estão depositadas no banco de sequências do GenBank. Apenas a espécie *Aonyx congicus* não possui sequências depositadas, não sendo possível acrescentá-la em nossa análise. Como grupo externo utilizamos duas espécies, a *Canis lupus* e a *Mustela nivalis*. O alinhamento das amostras foi feito no programa Geneious 7.1.7., a árvore de máxima verossimilhança foi feita no programa MEGA 6.06 (Fig. 3) e a análise Bayesiana foi realizada utilizando o programa Mr. Bayes 3.2.1.(Fig. 4). As sequências utilizadas estão disponibilizadas em anexo (Anexo 1). Segundo nossos

resultados, as lontras estão divididas em três clados: (1) *Lutra*, *Lutrogale*, *Aonyx* e *Enydra*; (2) *Lontra*; e (3) *Pteronura*. Anteriormente as espécies do gênero *Lontra* eram classificadas como *Lutra*, porém Van Zyll de Jong (1972) em um trabalho taxonômico, estudando lontras da América do Norte e a lontra Euroasiática, encontrou algumas diferenças na morfologia desses animais, propondo que aqueles existentes no Novo Mundo fossem classificados com o gênero *Lontra*. No entanto, somente após o trabalho de Koepfli & Wayne (1998) que assumiu-se oficialmente o gênero *Lontra* para as lontras do Novo Mundo, com exceção de *Pteronura brasiliensis*. O trabalho utilizou o gene mitocondrial *citocromo b* para construir a árvore filogenética das lontras e diagnosticou que os gêneros *Lontra* e *Lutra* estão representados em dois clados monofiléticos, sustentando a proposta de Van Zyll de Jong (Koepfli & Wayne 1998; Koepfli & Wayne, 2003)

As espécies sul americanas divergiram da *L. canadensis* no final do Plioceno, por volta de 1.9-3.4 milhões de anos atrás (Marmi et al. 2004; Koepfli et al. 2008). Tal colonização da América do Sul coincide com a formação do istmo do Panamá, 3.0-2.5 milhões de anos atrás. Já entre as espécies sul americanas, o tempo de divergência de *L. longicaudis* em relação às espécies irmãs *L. felina* e *L. provocax*, foi estimado para 1.57 milhões de anos atrás (Vianna, 2010).

Foram propostas três subespécies para a lontra (Harris 1968): *L. longicaudis annectes* (México, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela e Equador); *L. longicaudis enudris* (Guiana Francesa, Suriname, Trinidad e Peru); e *L. longicaudis longicaudis* (grande parte da América do Sul, incluindo Brasil e Uruguai) (van Zyll de Jong 1972; Larivière 1999). Já em um trabalho utilizando marcadores moleculares, Trinca et al. (2012) analisaram material de 52 indivíduos de grande parte da área de ocorrência da espécie e constataram que a lontra é composta por quatro filogrupos estruturados geograficamente: 1) Colômbia; 2) Bolívia; 3) Amazônia e Guiana Francesa; e 4) Leste da América do Sul. Sendo o resultado semelhante ao encontrado com a taxonomia. O filogrupo situado na Colômbia chamou a atenção por apresentar uma separação de haplótipo de 17 passos mutacionais em relação às outras subespécies de *L. longicaudis*. Em vista que, a divergência estimada entre *L. provocax* e *L. felina* é de 12 passos mutacionais. Os autores comentam que a amostra referente a esse filogrupo é originária do vale do

rio Magdalena, que está cercado por duas cordilheiras, Cordilheira Central e Cordilheira Oriental, e tem sua foz no mar do Caribe. Podendo ser uma barreira dificultando o fluxo gênico entre as populações de *L. longicaudis*.

Poucos trabalhos utilizando ferramentas moleculares foram realizados para *L. longicaudis* até os dias de hoje, a ausência de informações genéticas sobre essa espécie limita estratégias de manejo e conservação. Isso faz com que, apesar dos vários estudos ecológicos, seja a espécie com menos conhecimento genético entre as lontras Neotropicais (Trinca et al. 2007). Nas últimas décadas, uma variedade de locos de microssatélites têm sido isolados de mustelídeos (Dallas and Piertney 1998; Carpenter et al. 2003; Beheler et al. 2004, 2005) e testados através de amplificação cruzada em espécies relacionadas (Trinca et al. 2011). Trinca e colaboradores (2011) reportaram sucesso na amplificação cruzada em *L. longicaudis* utilizando DNA extraído de amostras de sangue e tecido, por outro lado, alguns trabalhos que utilizaram amostras não invasivas não obtiveram tanto sucesso.

Muitos estudos genéticos com mamíferos têm usado amostras não invasivas como alternativa para reduzir os riscos de captura dos animais. Amostras de pelos e fezes têm sido usadas para essas análises, porém esse tipo de amostra apresenta muitas dificuldades em relação à qualidade de DNA extraído (Morin and Woodruff 1996; Wasser et al. 1997; Nsubuga et al. 2004; Weber et al. 2009). Em seu trabalho, Weber e colaboradores (2009), tiveram muitos problemas para a amplificação de locos de microssatélites em amostras de fezes. Esses autores minimizaram esse problema re-amplificando as amostras, dessa forma eles obtiveram quase 40% de sucesso na amplificação dos locos.

Dados de diversidade genética de populações de lontra, utilizando microssatélites heterólogos, têm apresentado locos altamente polimórficos. Um estudo realizado por Trinca et al. (2011), os autores testaram 12 locos heterólogos (Dallas and Piertney 1998; Beheler et al. 2004, 2005) utilizando amostras de tecido e sangue de 31 indivíduos provenientes de várias localidades do Brasil. Os autores encontraram uma média de 8,6 alelos por loco e heterozigidade esperada elevada. Eles demonstraram que o conjunto de locos de microssatélites testados tem um grande potencial para aplicação em estudos genético-populacionais,

ecológicos e evolutivos da lontra, permitindo seu uso em estudos baseados em amostragem não invasiva.

Weber et al. (2009) analisaram duas populações de *L. longicaudis* de duas localidades no sul do Brasil. Os dados obtidos através das análises de cinco locos de microssatélites apresentaram um déficit de heterozigotos nas duas populações, apesar do alto polimorfismo dos locos (9,8 alelos por loco). Os autores observaram diferenças nas frequências alélicas entre as duas localidades e também foram encontrados vários alelos privados na amostragem das duas localidades. Segundo os autores, esses resultados evidenciaram a existência de ao menos duas populações de lontra no sul do Brasil.

Outros marcadores moleculares também tem sido eficazes para obtenção de dados de diversidade genética em *L. longicaudis*, como a região controladora do DNA mitocondrial. Trinca et al. (2007) analisando sequências da região controladora do DNA mitocondrial em populações do sul e sudeste do Brasil, encontraram alta diversidade haplotípica (0,8188), mas exibiram baixos níveis de variação nucleotídica. A região de controle do DNA mitocondrial é conhecida por ser um marcador altamente polimórfico em outros vertebrados (Awise, 1994). A rede de haplótipos mostrou algumas reticulações, indicando a ocorrência de homoplasia e os haplótipos foram divergentes por uma única diferença, indicando uma origem recente e nenhuma grande divergência entre estas sequências. Os autores não observaram diferenciação genética entre essas áreas. As informações sobre a diversidade genética, e sua conexão com dados ecológicos, são passos necessários para a efetiva conservação desta espécie.

CONFLITOS

Apesar de a lontra ser constantemente vista em áreas urbanizadas e compartilhando locais e estruturas também utilizados pelo homem, tal proximidade nem sempre é saudável. Mortes por atropelamento, caça, ataques de animais domésticos e por afogamento ao se prenderem em redes e covos são constantemente relatados.

Conflitos com pescadores e piscicultores são frequentes por competirem pelo mesmo recurso alimentar. Um fator agravante é que os locais onde os pescadores conseguem um maior sucesso na captura de peixes é o mesmo lugar onde as lontras forrageiam (Quintela et al. 2012). Os pescadores culpam as lontras por danos causados em suas redes e covos e por diminuírem a quantidade de peixes no local (Barbieri et al. 2012). Em resposta, alguns pescadores chegam a caçá-las (Gomez et al.,2014; Barbieri et al. 2012). As redes e covos indiretamente são também um grande perigo, pois ao irem atrás dos peixes as lontras acabam ficando presas e chegam a morrer afogadas. Trabalhos buscando entender a percepção dos pescadores foram realizados e os resultados demonstraram que a grande maioria sabe da importância de se preservar a lontra, porém devido ao prejuízo gerado por ela, a maneira de diminuir o prejuízo é abatendo o animal (Gomez et al. 2014; Castro et al. 2014).

Em um estudo no sul do Brasil, Quintela et al.(2012) constatou que cães domésticos são responsáveis pela morte de lontras em áreas mais povoadas. Tal informação se caracteriza preocupante, pois ao longo de sua área de distribuição a lontra utiliza corredores e canais para sua dispersão, potencializando o risco de ataques por cães domésticos (Gomez et al. 2014). Outro fator negativo dessa proximidade são as estradas. Vários atropelamentos ocorrem perto de cursos d'água, podendo tais casos estarem associados com o fato das rodovias se situarem as margens ou próximas de canais pluviais (Quintela et al. 2012). Estes locais são áreas de ocorrência de lontra, se configurando como outro conflito. A construção de passagens de fauna poderia desempenhar uma diminuição nessas mortalidades.

A poluição das águas também se mostra uma ameaça para a lontra, por conta da bioacumulação por metais pesados. Alguns trabalhos realizados nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil verificaram altas concentrações de mercúrio nas fezes, tecidos e pelos de *Lontra longicaudis* (Josef et al., 2008; Fonseca et al. 2004). Por ser um animal topo de cadeia, ele pode demonstrar as consequências dos metais pesados tardiamente.

IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO

L. longicaudis é hoje classificada pela IUCN como Dados Deficientes, necessitando de estudos mais aprofundados em nível populacional, exigências ambientais e de sua atual distribuição. Por ser um animal topo de cadeia, seu status é importante para a conservação de ecossistemas hídricos, auxiliando a biodiversidade local. A espécie necessita de grandes extensões territoriais para estabelecer populações viáveis e cada indivíduo necessita de vários quilômetros de mata ciliar. Depende também das condições físico químicas da água e estruturas do habitat para persistir no local. Modificações dessas características podem afetar as populações das lontras, reduzindo assim a diversidade local. Trabalhos de educação ambiental se mostram essenciais para amenizar os conflitos entre pescadores e a lontra. As áreas protegidas desempenham um importante papel para a integridade das populações dessa espécie. Assim, o monitoramento das unidades de conservação e uma maior rigidez no cumprimento das leis ambientais, são atitudes que devem ser tomadas para assegurar a sobrevivência da lontra.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio.

Legendas de Figuras

Figura 1. Distribuição atual de *Lontra longicaudis* (Fonte: IUCN, 2014).

Figura 2. Projeção para nova distribuição de *L. longicaudis* proposto por Rheingantz et al. 2014. Em vermelho, pontos de ocorrência. Em verde claro, distribuição da lontra pela IUCN. Na cor verde, projeção feita por Maxent . (Fonte: Rheingantz et al. 2014)

Figura 3. Relação filogenética de 12 espécies de lontra, utilizando a análise de máxima verossimilhança.

Figura 4. Relação filogenética de 12 espécies de lontra, utilizando análise Bayesiana.

Referências

- Arcila, D., 2003. Distribución, uso de microhábitat y dieta de la nutria neotropical *Lontra longicaudis* (Olfers 1818) en el Cañón del Río Alicante, Antioquia, Colombia: Tesis, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Astúa, D., Asfora, P. H., Aléssio, F. M. and Langguth, A. 2010. On the occurrence of the neotropical otter (*Lontra longicaudis*) (Mammalia: Mustelidae) in northeastern Brazil. *Mammalia* 74: 213–217.
- Avise, J.C., 1994. Molecular markers, natural history e evolution. New York, Chapman & Hall, 511p.
- Barbieri, F., Machado, R., Zappes, C.A., Rosa de Oliveira, L., 2012. Interactions between the Neotropical otter (*Lontra longicaudis*) and gillnet fishery in the southern Brazilian Coast. *Ocean. Coast. Manag.* 63, 16-23.
- Beheler, A.S., Fike, J.A., Murfitt, L.M., Rhodes, O.E. Jr., Serfass, T.S. 2004. Development of polymorphic microsatellite loci for North American river otters (*Lontra canadensis*) and amplification in related Mustelids. *Molecular Ecology Notes*, 4, 56-58.
- Beheler, A.S., Fike, J.A., Murfitt, L.M., Dharmarajan G., Rhodes, O.E. Jr., Serfass, T.L. 2005. Ten new polymorphic microsatellite loci for North American river otters (*Lontra canadensis*) and their utility in related mustelids. *Molecular Ecology Notes*, 5, 602-604.
- Carpenter, P.J., Dawson, D.A., Greig, C., Parham, A., Cheeseman, C.L., Burke, T. 2003. Isolation of 39 polymorphic microsatellite loci and the development of a fluorescently labeled marker set for the Eurasian badger (*Meles meles*) (Carnivora: Mustelidae). *Molecular Ecology Notes*, 3, 610-615.
- Carvalho, J. O.; Birolo B. A.; Iabrude, S. A.; Barbosa, C.; Tosatti, M.; 2006. É a *Lontra longicaudis* uma espécie oportunista? In: I Congresso Sul-Americano de Mastozoologia, RS.
- Carvalho-Junior, O., Macedo-Soares, L., Bez-Birolo, A., Snyder, T. 2013. A comparative diet analysis of the Neotropical Otter in Santa Catarina Island, Brazil. *IUCN Otter Spec. Group Bull.* 30 (2).
- Castro, F.R., Stutz-Reis, S., Reis, S.S., Nakano-Oliveira, E., Andriolo, A. 2014. Fishermen's perception of Neotropical otters (*Lontra longicaudis*) and their attacks on artisanal fixed fence traps: The case of caiçara communities. *Ocean & Coastal Management* 92. 19-27.
- Chéhebar, C., 1990. Action plan for Latin American otters Otters: an action plan for their conservation P. Foster-Turley, P. S. MacDonald and C. Mason. Brookfield, Illinois. In: Chicago Zoological Society, 6, pp. 4–73.
- Chemes S et al., 2010. Dieta de *Lontra longiacudis* (Carnivora, Mustelidae) en el parque nacional El Rey (Salta, Argentina) y su comparación con otras poblaciones de la cuencadel Paraná. *Mastizoología Neotropical*, 17 (1): 19-29, Mendoza.

- CITES . 2014. Convenção Sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna Selvagem e Flora. Disponível em: <www.cites.org> . Acesso: 20.10.2014.
- Colares E.P. e Waldemarin H.F. 2000. Feeding of the Neotropical river otter (*Lontra longicaudis*) in the coastal region of the Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. IUCN Otter Specialist Group Bulletin 17(1):6-13.
- Dallas, J.F., Piertney, S.B. 1998. Microsatellite primers for the Eurasian Otter. Molecular Ecology. 7, 1247-1263.
- Fonseca, F.R.D.; Sanaiotti, T.M. & Malm, O. 2004. Concentração de mercúrio em ariranhas (*Pteronura brasiliensis*), lontras (*Lontra longicaudis*) e peixe de sua dieta no Pantanal, Brasil. In: Anais do IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal. Corumbá/MS.
- Gallo-Reynoso, J. P. 1997. Situación y distribución de la nutria en México, con énfasis en *Lontra longicaudis annectens* Major, 1897. Revista Mexicana de Mastozoología 2:10-32.
- Gallo-Reynoso, J. P., Ramos-Rosas N.N e Rangel-Aguilar.O, 2008. Depredación de aves acuáticas por la nutria neotropical (*Lontra longicaudis annectens*), en el río Yaqui, Sonora, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 79:275-279.
- Gomez,J.I., Túnez, J.I.,Fracassi, N., Cassini, M.H. 2014. Habitat suitability and anthropogenic correlates of Neotropical river otter (*Lontra longicaudis*) distribution. Journal of Mammalogy,95(4).824–833.
- Harris C. J. 1968. Otters: a study of the recent Lutrinae. London: Weinfield and Nicholson. p. 397
- Helder D.A. 1997. Food and feeding habits of the Neotropical river otter *Lontra longicaudis* (Carnivora, Mustelidae). Mammalia 61:193-203.
- Hynes, H.B.N., 1950. The food of freshwater stickle back (*Gasterosteus aculeatus* and *Pungosteus pungitius*) with a review of methods used in studies of the food fishes. Journal of Animal Ecology 19: 35-58.
- IUCN. 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 27.10.2014.
- Josef, C.F., Adriano, L.R., Franca, E.J., Carvalho, G.G.A., Ferreira, J.R. 2008. Determination of Hg and diet identification in otter (*Lontra longicaudis*) feces. Environmental Pollution, 152. 592-596
- Kasper C.B *et al.*,2004. Estimativa do tamanho de duas espécies de ciclídeos [*Osteichthyes*, Perciformes] predados por *Lontra longicaudis* [Olfers] [Carnivora, Mustelidae], através de análise das escamas. *Revista Brasileira de Zoologia* 21 [3]: 499-503.
- Koepfli, K.P., Wayne, R.K., 1998. Phylogenetic relationships of otters (Carnivora:Mustelidae) based on mitochondrial cytochrome b sequences. J. Zool. 246,401–416.

- Koepfli, K.P., Wayne, R.K. 2003. Type-1 STS markers are more informative than cytochrome b in phylogenetic estimation of the Mustelidae (Mammalia: Carnivora). *Syst Biol*, 52:571-593.
- Koepfli, K.-P., Deere, K.A., Slater, G.J., Begg, C., Begg, K., Grassman, L., Lucherini, M., Veron, G., Wayne, R.K., 2008. Multigene phylogeny of the Mustelidae: resolving relationships, tempo and biogeographic history of a mammalian adaptive radiation. *BMC Biol.* 6, 10.
- Kruuk H. 2006. Otters: Ecology, Behaviour and Conservation. Oxford University Press, New York.
- Larivière, S. 1999. *Lontra longicaudis*. *Mammalian Species*, 609: 1-5.
- Macías-Sánchez e Aranda 1999. Análisis de la alimentación de la nutria *Lontra longicaudis* (Mammalia: Carnivora) en el sector del río Los Pescados, Veracruz México. *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie), número 076. 49-57pp.
- Maldonado, J.R.E. e González, C.A.L. 2003 Recent Records For The Neotropical River Otter (*Lontra Longicaudis*) In Guerrero, Mexico. *IUCN Otter Spec. Group Bull.* 20(2): 65 – 68
- Marmi, J., López-Giráldez, J.F., Domingo-Roura, X. 2004. Phylogeny, evolutionary history and taxonomy of the Mustelidae based on sequences of the cytochrome b gene and a complex repetitive flanking region. *Zool Scr*, 33:481-499.
- Mayor-Vitoria R., Botero-Botero A., 2009. Dieta de la nutria neotropical *Lontra longicaudis* (Carnivora, Mustelidae) en el Rio Roble, Alto Cauca, Colombia. *Acta biol. Colomb.*, Vol 15 N° 1, p 241.
- Mason C. 1990. An introduction to the otters. In: Foster-Turley P., Macdonald S., Mason C., editors. *Otters: an action plan for their conservation*. Gland: IUCN/SSC Otter Specialist Group; p. 4-7.
- Monroy-Vilchis O. e Mundo V., 2009. Nicho trófico de la nutria neotropical (*Lontra longicaudis*) en un ambiente modificado, Temascaltepec, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 80: p 801-806.
- Morin, P.A., Woodruff, D.S. 1996. Noninvasive genotyping for Vertebrate conservation. In: Smith, T.B., WAYNE, R.K. eds. *Molecular Genetics Approaches in Conservation*. New York, Oxford University. p.298-313.
- Nakano-Oliveira, E.; Fusco, R., Santos, E.A.V. & Monteiro-Filho, E.L.A. 2004. New information about the behavior of *Lontra longicaudis* (Carnivora: Mustelidae) by radio-telemetry. *IUCN Otter Specialist Group Bulletin*, 21(1): 31 – 35.
- Nsubuga, A.M., Robbins, M.M., Roeder, A.D.; Morin, P.A., Boesch, C., Vigilant, L. 2004. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved storage method. *Molecular Ecology* 13, 2089-2094.
- Pardini R., 1998. Feeding ecology of the Neotropical river otter *Lontra longicaudis* in an Atlantic Forest stream, south-eastern. *Journal of Zoology* 245:385-391.

- Pardini, R. & Trajano, E. 1999. Use of shelters by the neotropical river otter (*Lontra longicaudis*) in an Atlantic Forest stream, southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy*, 80: 600-610.
- Parera A., 1992. Análisis de la dieta de *Lutra longicaudis* en Laguna Iberá, Provincia de Corrientes, Argentina. 5 Reunión de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur. Libro de Resúmenes. Buenos Aires, Argentina: 49.
- Passamani, M., Camargo, S.L., 1995. Diet of the river otter *Lutra longicaudis* in Furnas Reservoir, south-eastern Brazil. *Otter Spec. Group Bull.* 12, 32–34.
- Quadros, J., Monteiro-Filho, E. L., 2001. Diet of the neotropical otter, *Lontra longicaudis*, in an Atlantic forest area, Santa Catarina State, southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 36 (1): 15-21.
- Quadros, J. 2012. Uso do habitat e estimativa populacional de lontras antes e depois da formação do reservatório de Salto Caxias, rio Iguaçu, Paraná, Brasil. *neotropical Biology and Conservation* 7(2):97-107.
- Quintela, F.M., Da Silva, F.A., Assis, C.L., Antunes, V.C. 2012. Data on *Lontra longicaudis* (Carnivora: Mustelidae) mortality in southeast and southern Brazil. *IUCN Otter Spec. Group Bull.* 29(1).
- Redford, K.H., Eisenberg, J.F., 1992. *Mammals of the Neotropics, The Southern Cone: Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay.* University of Chicago Press, Chicago.
- Restrepo, C.A., Botero-Botero, A. 2012. Ecología Trófica de la Nutria Neotropical *Lontra longicaudis* (Carnívora, Mustelidae) en el Río La Vieja, Alto Cauca, Colombia. *bol.cient.mus.hist.nat.* 16 (1).207 – 214
- Rheingantz, M. L., Waldemarin, H. F., Rodrigues, L. and Moulton, T. P. 2011. Seasonal and spatial differences in feeding habits of the neotropical otter *Lontra longicaudis* (carnivora: mustelidae) in a coastal catchment of southeastern Brazil. *Zoologia (Curitiba, Impresso)* 28. 37–44.
- Rheingantz, M.L., Menezes, J.F.S., Thoisy, B. 2014. Defining Neotropical otter *Lontra longicaudis* distribution, conservation priorities, and ecological frontiers. *Tropical Conservation Science* Vol.7 (2): 214-229.
- Rosenzvaig AL., 1974. Contribución al conocimiento de la biología del lobito de río (*Lutra platensis* Waterhouse, 1839). Instituto para la Investigación de los problemas del mar. Mar del Plata, Argentina.
- Spínola, R.M & Vaughan, C., 1995. Dieta de la nutria neotropical (*Lutra longicaudis*) en la Estación Biológica La Selva, Costa Rica. *Vida Silvestre Neotropical.* 4(2): 125-132.
- Stephens, D. W. & Krebs, J. R., 1986. *Foraging Theory.* Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Trinca, C.S., Waldemarin, H.F., Eizirik, E. 2007. Genetic diversity of the Neotropical otter (*Lontra longicaudis* Olfers, 1818) in Southern and Southeastern Brazil. *Braz. J. Biol.* 67(4), 813-818.

Trinca, C.S., Waldemarin, H.F., Rosas, F.C.W., Eizirik, E. 2011. Characterization and assessment of 12 autosomal microsatellite loci suitable for population and evolutionary studies of the Neotropical otter (*Lontra longicaudis*). IUCN Otter Spec. Group Bull. 28(A).

Trinca C.S., de Thoisy B., Rosas F.C.W., Waldemarin H.F., Koepfli K.P, Vianna J.A., Eizirik E. 2012. Phylogeography and demographic history of the Neotropical otter (*Lontra longicaudis*). Journal of Heredity 103:479–492.

Van Zyll de Jong, C.G. 1972. A systematic review of the nearartic and neotropical river otters. Royal Ontario Museum, 80: 1-104.

Vianna, J., Ayerdi, P., Medina-Vogel, G., Mangel, J.C., Zeballos, H., Apaza, M., Faugeron, S., 2010. Phylogeography of the Marine Otter (*Lontra felina*): historical and contemporary factors determining its distribution. J. Hered. 101 (6), 676–689.

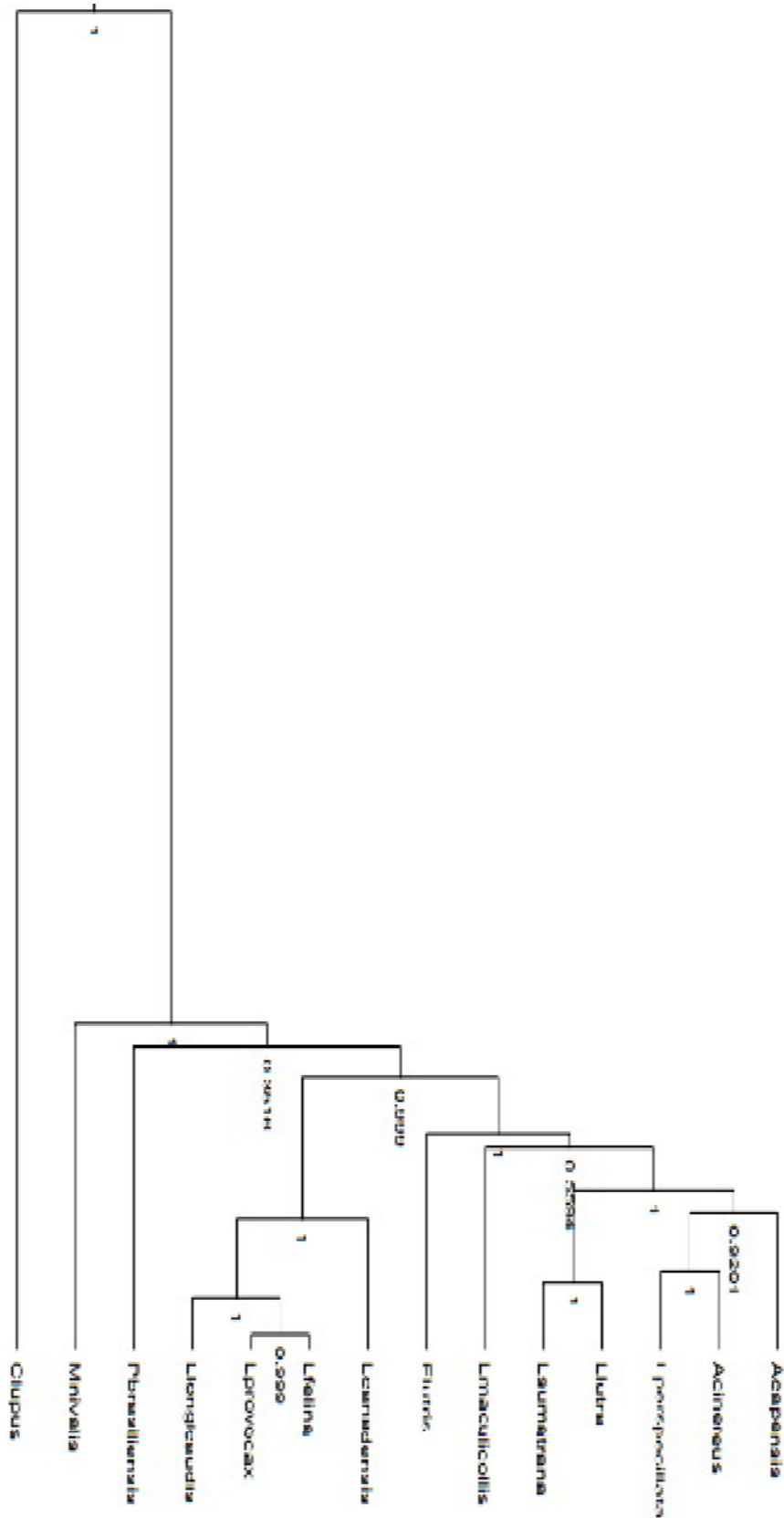
Waldemarin, H.F. & Colares, E. P. 2000. Utilization of resting sites and dens by the neotropical river otter (*Lontra longicaudis*) in the south of Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. IUCN Otter Specialist Group Bulletin 17(1): 14-19.

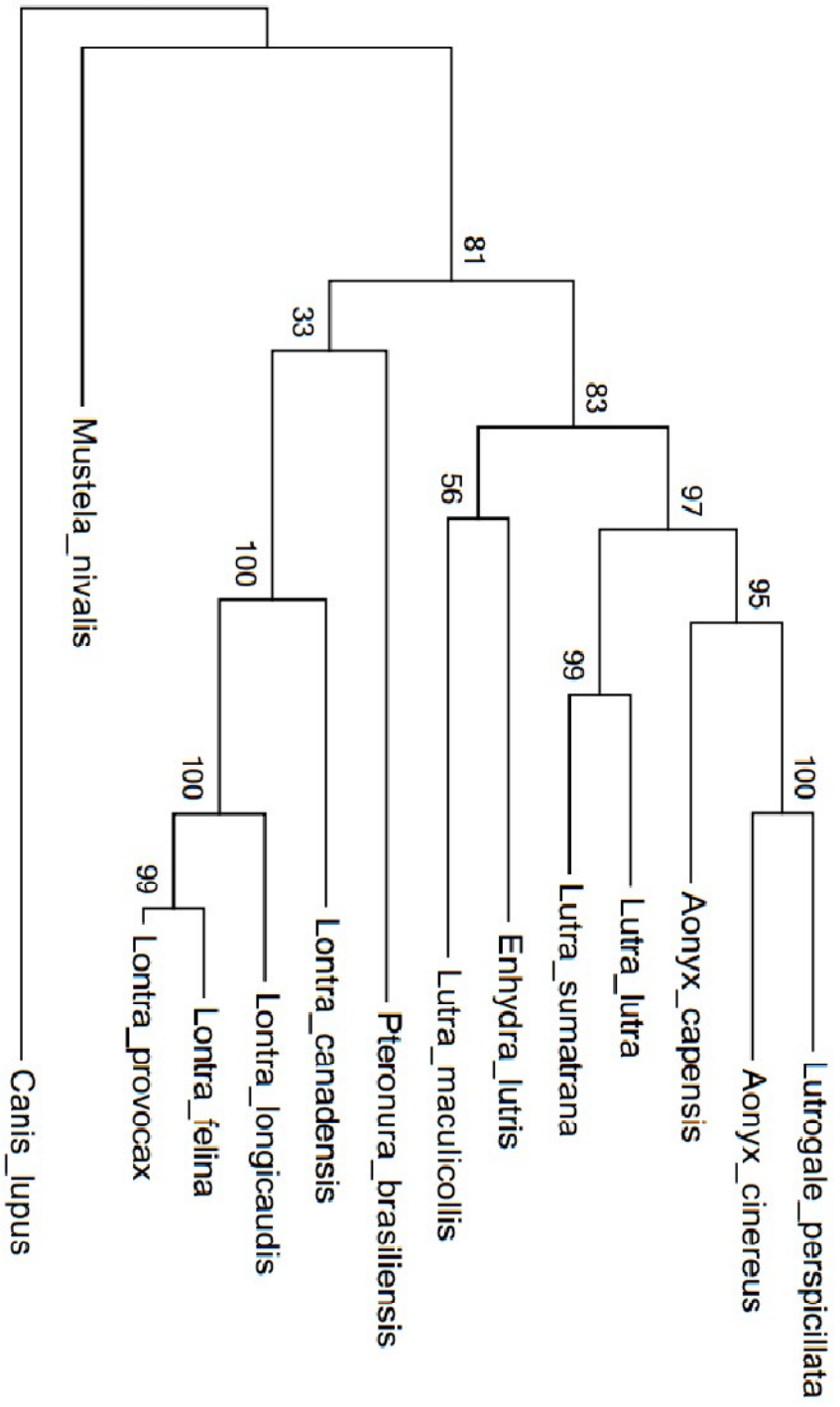
Waldemarin, H.F. & Alvarez, R. 2008. *Lontra longicaudis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 13 October 2014.

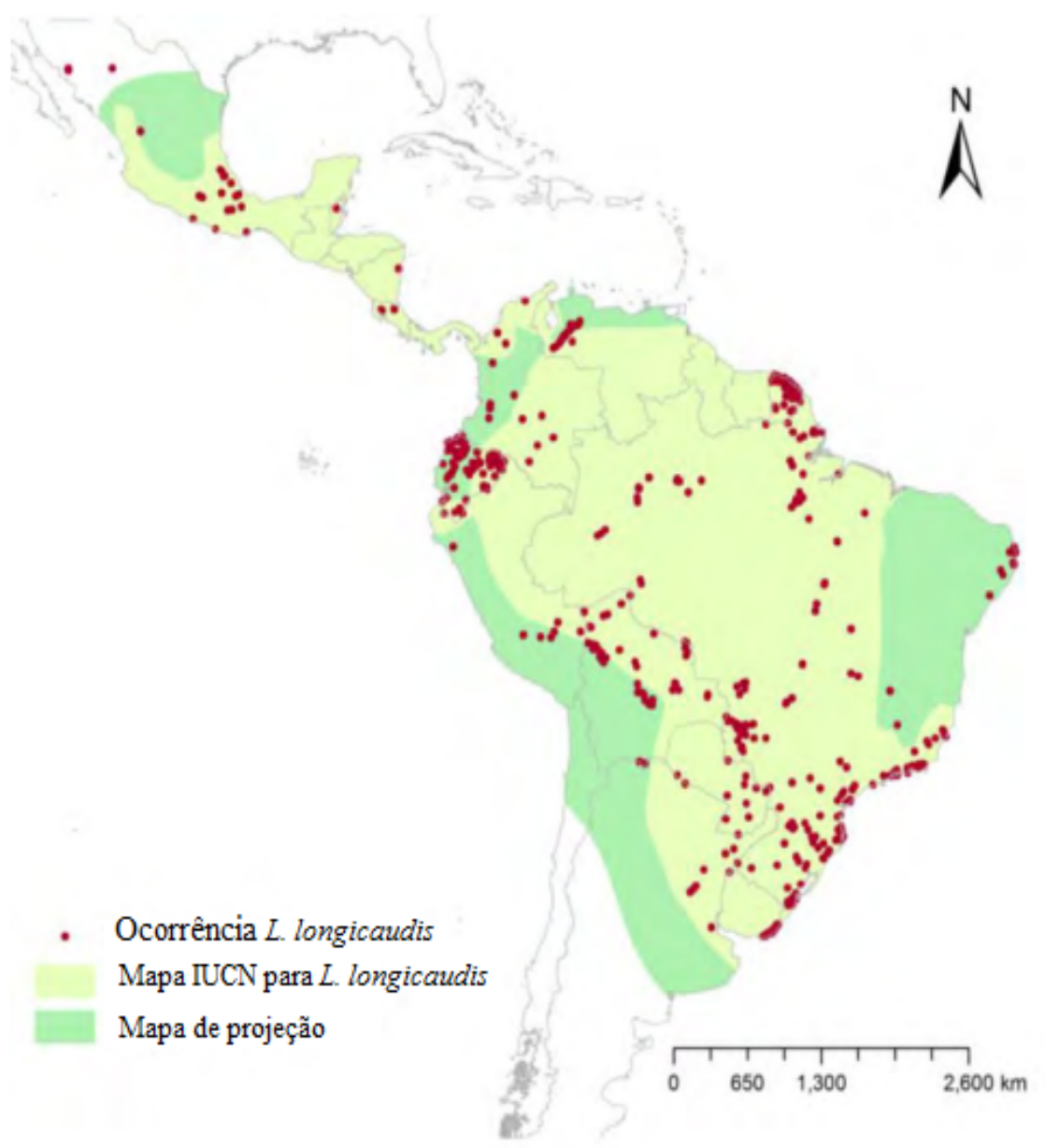
Wasser, S.K., Houston, C.S., Koehler, G.M., Cadd, G.G., Fain, S.R. 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. Molecular Ecology. 6, 1091-1097.

Weber, L. I., Hildebrand, C.G., Ferreira, A., Pedarassi, G., Levy, J.A., Colares, E.P. 2009. Microsatellite genotyping from faeces of *Lontra longicaudis* from southern Brazil. Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, 99(1), 5-11.









ESPÉCIE	CYTB	NADH5
Número de acesso		
<i>E. lutris</i>	AB291077.1	JQ038845.1
<i>L. felina</i>	AF057122.1	EF472375.1
<i>L. canadensis</i>	AF057121.1	AY598561.1
<i>L. longicaudis</i>	AF057123.1	JQ038833.1
<i>L. perspicillata</i>	EF472348.1	EF472381.1
<i>A. cinereus</i>	AF057119.1	JQ038846.1
<i>L. lutra</i>	AF057124.1	EF472377.1
<i>L. sumatrana</i>	EF472347.1	EF472380.1
<i>P. brasiliensis</i>	AF057126.1	EF472379.1
<i>A. capensis</i>	AF057118.1	EF472371.1
<i>L. maculicollis</i>	AF057125.1	EF472378.1
<i>L. provocax</i>	HM997017.1	GQ843819.1
<i>C. lupus</i>	AY928668.1	AY598505.1
<i>M. nivalis</i>	AB046612.1	GU167334.1

CAPITULO 2 - Padronização do método não-invasivo utilizando marcadores moleculares e análise de uma população do Rio Tietê.

Resumo

A *Lontra longicaudis* é um mustelídeo de hábitos semi-aquáticos e apresenta uma distribuição bastante ampla no território brasileiro e América do Sul. Tem um papel fundamental nos locais que habita por ser considerada uma espécie topo de cadeia e assim regular os demais níveis tróficos existentes.. Hoje as principais ameaças a lontra são a destruição de seu habitat, poluição das águas e conflitos com pescadores e piscicultores. Pouco se sabe sobre essa espécie, havendo os poucos trabalhos realizados em relação a ela se dedicado a análises de dieta e utilização de habitat. Seu status de ameaça está enquadrado como Dados Deficientes pela IUCN, necessitando principalmente informações a nível populacional para se ter um melhor embasamento de seu verdadeiro status de ameaça. Este trabalho procurou padronizar a metodologia que utiliza marcadores moleculares a partir de amostras não-invasivas de *Lontra longicaudis*, do Rio Tietê, SP. Caracterizando os locais que em que foram encontradas as amostras, notou-se que a lontra tolera certos níveis de alterações em seu ambiente e que ela tem preferência por mata nativa. Encontrou-se várias dificuldades em relação a padronização dos primers, sendo que não obtivemos resultados suficientes para inferirmos a respeito da população desta área amostral. Se faz necessária uma maior quantidade de testes em relação as concentrações dos reagentes e temperatura para que se possa obter melhores resultados, possibilitando inferir a respeito da população de lontra desta área.

Palavras chave: *Lontra longicaudis*; *Marcadores moleculares*; *Microssatélites*; *Rio Tietê*; *Genética da Conservação*.

Abstract

The *Lontra longicaudis* is a mustelid with semi-aquatic habits and presents a fairly wide distribution in the Brazilian and South American territory. It plays a key role in the environment where it lives and as it is considered a top-chain specie this regulates the other existing trophic levels. Today the main threats to neotropical otters are habitat destruction, water pollution, and conflicts with fishermen and fish farmers. Little is known about this specie, with the few studies carried out in relation to it is devoted to analysis of diet and habitat use. Their threat status is defined as Data Deficient by the IUCN needing more information at population level to have a better basis of their true status threat. This study sought to standardize the methodology that uses molecular markers from non-invasive samples of *Lontra longicaudis*, from the Tietê River, SP. Featuring locations in which the samples were found, it was noted that the otter tolerate certain levels of changes in its environment and that it has a preference for native forest. We faced several difficulties concerning the standardization of primers, and we did not get enough results to infer about the population of this sample area. A larger amount of tests related to the concentrations of reactants and temperature is required to obtain better results, to make possible to infer about this otter population

Keywords: *Lontra longicaudis*; *Molecular markers*; *Microsatellites*; *Tietê River*; *Conservation Genetics*.

INTRODUÇÃO

As espécies de carnívoros terrestres neotropicais geralmente são noturnas, possuem grandes áreas de vida e existem em baixa densidade, características que dificultam estudos populacionais de tais espécies (Kohn & Wayne, 1997).

Técnicas moleculares a partir de amostras não invasivas (fezes, pêlos, animais atropelados) têm se mostrado uma ferramenta bastante eficiente para estudos com espécies de características como as dos carnívoros Vianna *et al.* (2010), Miotto *et al.* (2011), Trinca *et al.* (2013), Stronen *et al.* (2014).

Como grande parte dos mamíferos utilizam as fezes para demarcações odoríferas de seu território (Sillero-Zubiri & Macdonald 1998) e a captura destes apresentam vários riscos tanto para o pesquisador quanto para o animal, estudos que utilizem marcadores moleculares em amostras não invasivas representam uma ferramenta valiosa para a conservação desses animais (Haigh, 1998). Algumas informações que podem ser obtidas são a estimativa do tamanho da população, estruturação genética e dispersão (Ruell & Crooks, 2006).

Alguns trabalhos foram realizados para a *Lontra longicaudis* utilizando ferramentas moleculares, abordando a dinâmica populacional (Trinca *et al.* 2013), diversidade genética (Trinca *et al.* 2007 ; Weber *et al.* 2009). Sendo a maioria dos trabalhos realizados no sul do Brasil. Mesmo com tais informações, ainda é grande a falta de informações populacionais a respeito da espécie.

OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

Este trabalho teve como objetivo principal padronizar a metodologia de utilização de marcadores moleculares para estudos populacionais em *Lontra longicaudis* a partir de amostras não-invasivas.

Já os objetivos específicos foram:

- Individualização das amostras coletadas;
- Estabelecer a proporção sexual;
- Contribuir sobre o estado de conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A área amostral para este estudo está localizada no Rio Tietê, na cidade de Pederneiras, SP. O local caracteriza-se por possuir diversas alterações feitas pelo ser humano como a supressão da mata ciliar para construção de ranchos, clube náutico, porto intermodal, curtume, praia para banhistas. Mata nativa quando encontrada limita-se a pequenas porções de mata. Suas águas possuem certo grau de poluição e alto tráfego de embarcações, tanto pequenas quanto navios cargueiros.

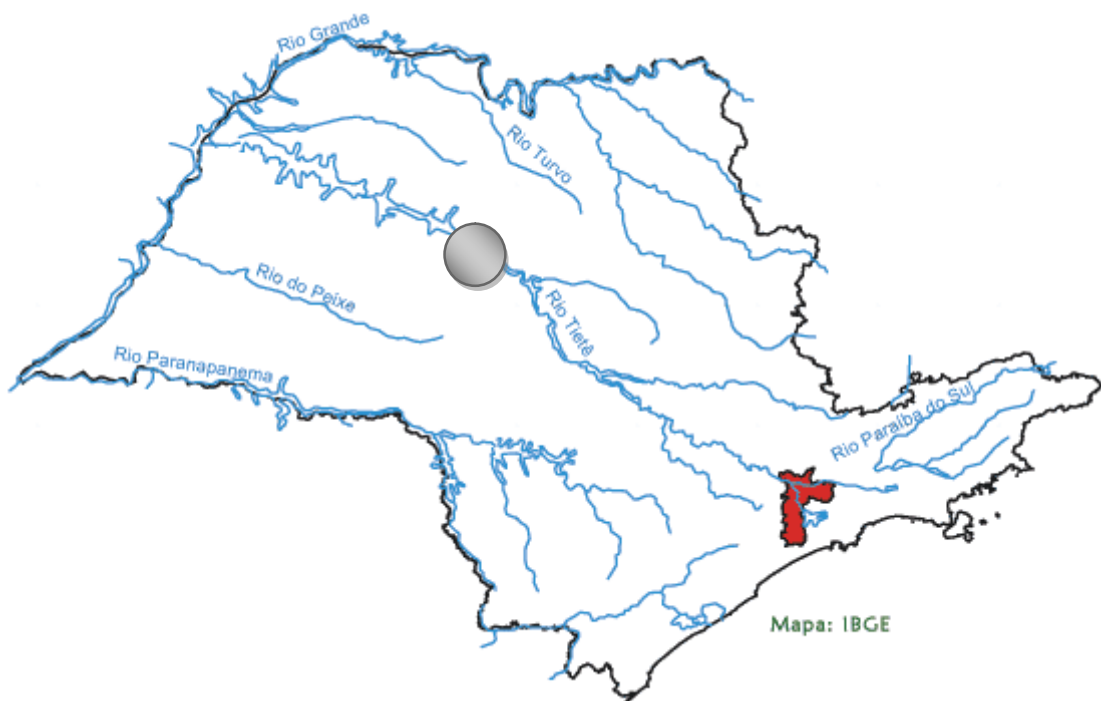


Figura 5. Rio Tietê. Mapa extraído do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).



Figura 6. Aspectos da paisagem da área amostral. (a) tráfego intenso de embarções; (b) pastagem; (c) ilhas de concreto no meio do rio; (d) construções antrópicas.

Coleta das amostras e Extração de DNA

O material coletado consistiu em fezes e muco frescos de *Lontra longicaudis*. A preocupação de estarem frescos refere-se por ainda possuírem DNA, mesmo que fragmentados.

Um trecho contendo 10 km de extensão foi estipulado e percorrido durante os meses de fevereiro a outubro. Em cada campanha, o trecho foi percorrido por três dias consecutivos buscando otimizar o sucesso na captura de amostras frescas.

Como a lontra possui hábitos semi-aquáticos e para demarcar seu território geralmente defeca em praias, troncos e pedras presentes nas margens ou no meio dos rios, utilizamos caiaques para percorrer a área, buscando obter um maior sucesso em encontrar o material a ser coletado.

Para todas as amostras coletadas foram anotadas algumas informações, que são:

-Tipo de vestígios encontrado;

-Tipo de substrato;

-Fisionomia da vegetação presente e sua quantidade e qualidade;

-Atividade humana desenvolvida na área;

-Localização geográfica a partir de um aparelho de GPS (Global Position System).

O material coletado foi armazenado em tubo plástico de 2mL contendo álcool 96% e posteriormente armazenado em freezer em temperatura de -22°C até que fosse feita a extração do DNA.

Para a extração de DNA das fezes e muco utilizamos o kit de extração desenvolvido especificamente para amostras de fezes “PSP@Spin Stool DNA Kit” (Invitex), seguimos as recomendações do fabricante para o procedimento de extração. Após a extração foram armazenados em freezer a -22°C.

Individualização e caracterização genética das amostras

Como as fezes e muco de lontra são bastante característicos devido a sua morfologia e material ingerido (Medina-Vogel & Gonzalez-Lagos, 2008), não realizamos a identificação das amostras utilizando marcadores moleculares. Para a individualização e caracterização genética das amostras utilizamos 8 microssatélites diferentes que foram desenvolvidos por Beheler *et al.* (2005) para a *Lontra*

canadensis e Dallas e Piertney (1998) e Huang *et al.* (2005) para a lontra euroasiática *Lutra lutra* porém mostraram-se eficientes para a *Lontra longicaudis* (Ortega *et al* 2012; Trinca *et al.*, 2012). Os primers estão especificados na tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Sequências *forward* e *reverse* dos *primers* de microssatélites utilizados.

Sequências		
Primer	Forward	Reverse
Lut 453 ¹	AGTGCTTTGTACTTGGTAATGG	AGACTGAAAGCTCTGTGAGGTC
Lut 701 ¹	GGAAACTGTAAAGGAGCTCACC	CAGTGTTCATAAGGATGCTCCTAC
Lut 733 ¹	GATCTCATTTTAAATGTTCTTACCAC	TGGTTCTCTTGCAGGATCTG
Lut 782 ¹	GAGATATCACTAAGCAATACACGATG	ACAAAGACTGAGCAAAACAAGC
Rio 11 ²	TCTTCCACTTTTCAATTTAGGTA	GCCCAAGGTTCACTATCAAG
04OT04 ³	AACTCTGACTCTGGGTGGAGGTGTT	GCCTGGGAGGCAGCATGATTAGT
04OT17 ³	ATCAGGTATGAGGATACATTTACCT	TGCAACCTACTTCTATATGAATTT
04OT22 ³	CTATCTGACCATTGTCCCATGA	ACCCATGTAGGGTGCCATGCT

¹ Dallas e Piertney (1998)

² Beheler *et al.* (2005)

³ Huang *et al.* (2005)

As sequencias *forward* de todos os *loci* continham a cauda universal (M13) de dezoito pares de base (TGT AAA ACG ACG GCC AGT), de acordo com Schuelke (2000). Para um maior sucesso na amplificação dos microssatélites foi utilizado o procedimento proposto por Piggot *et al.* (2004). Tal procedimento se mostrou necessário pois o DNA encontrado em amostras não invasivas é de baixa qualidade e quantidade.

A reação da PCR para individualização teve como volume final 10 µl, contendo: MgCl₂ 2,0mM; buffer 1x (Promega); dNTPs 0,2mM; primer forward a

0,2µM e reverse a 0,8 µM; fluoróforo a 0,8 µM; BSA 0,48 mg/µl; 1 unidade de Taq Polimerase 3 µl de DNA e H₂O. Realizamos eletroforese em gel de agarose a 1,5% para testarmos a qualidade do rendimento da PCR. No termociclador Veriti Termocycler (Applied Biosystem), o programa empregado foi: 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos na temperatura de anelamento específica de cada par de primers, 1 minuto e trinta segundos a 72°C; 10 ciclos de 30seg a 95°C, 45 segundos a 53°C e 45 segundos a 72°C; e 72°C por 20 minutos.

Sexagem

Para a sexagem dos indivíduos utilizamos o marcador Lut-SRY, em conjunto com o microssatelite 04OT22. O primeiro, descrito por Dallas *et al*, (2000) que foi desenvolvido para a lontra euro-asiática (*Lutra lutra*), amplifica o cromossomo sexual Y e o segundo funciona como controle positivo da amostra. Tal técnica foi descrita por Trinca e Eizirick (2011) e mostrou-se eficiente para a lontra, sendo também utilizada com sucesso por Ortega *et al*, (2012).

A reação da PCR para sexagem teve como volume final 12 µl, contendo: MgCl₂ 2,0mM; buffer 1x (Promega); dNTPs 0,2mM; 0,2µM para os quatros primers; BSA 0,48 mg/µl; 1 unidade de Taq Polimerase 4 µl de DNA e H₂O. Realizamos eletroforese em gel de agarose a 3% para testarmos a qualidade do rendimento da PCR. O programa empregado foi: 94°C durante 3 minutos; 40 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 1 minuto e trinta segundos a 72°C; e 72°C por 20 minutos.

Análise dos dados

Individualização das amostras e estimativa de abundância e densidade populacional

A visualização dos fragmentos amplificados foi feita na empresa MACROGEN pelo serviço de genotipagem, através do sequenciador 3730XL (AB,USA). Para a determinação dos tamanhos dos alelos utilizamos o programa Geneious versão 7.1.7 .

A estimativa da densidade populacional foi feita manualmente, pois não conseguimos primers genotipados suficientes para analisarmos em programas computacionais apropriados.

RESULTADO / DISCUSSÃO

Coleta

Foram coletadas 90 amostras frescas, dessas 69 eram de fezes e 21 de muco (Fig 5). A maioria das amostras (43%) foi coletada em antigas embarcações, ilhas de concreto e estruturas do porto intermodal. Em seguida, encontramos em pedras (30%), tronco de árvore (19%) e por final em barrancos (8%).

A maior parte dos pontos em que encontramos amostras possuía em sua margem mata nativa, que eram pequenas porções de mata em sua maioria. Em seguida encontramos em maior quantidade em pasto (32%) e depois em construções antrópicas (28%).

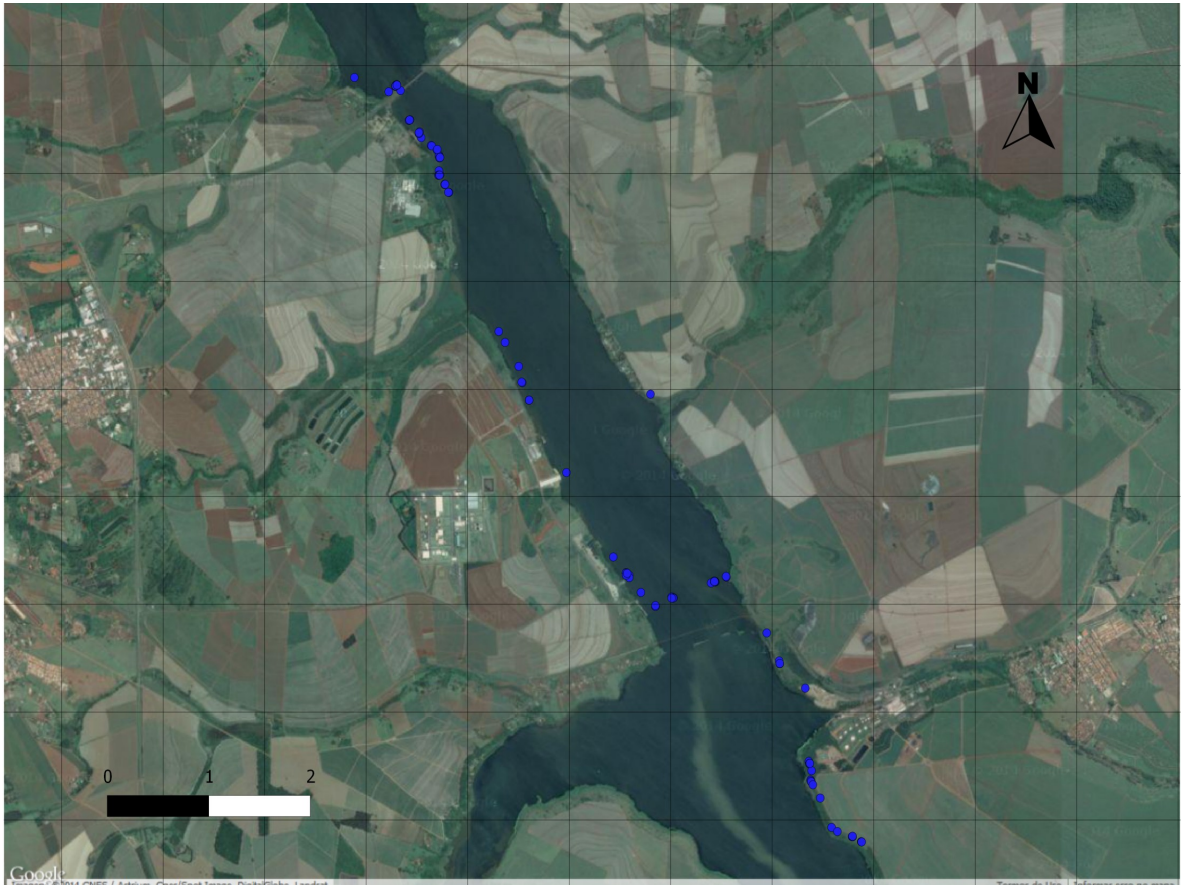


Figura 7. Pontos de locais onde foram encontrados fezes ou muco de *L. longicaudis*.

Tais resultados demonstraram que a *Lontra longicaudis* apresenta certa tolerância às alterações e atividades humanas em seu ambiente, mas possuem uma preferência por locais que apresentem mata nativa, mesmo que em pequena quantidade. Rheingatz et al. (2014) usando um modelo de distribuição de espécie encontrou que a densidade populacional humana interfere negativamente na ocorrência de *L. longicaudis*, mesmo ela ocorrendo em áreas com alta densidade humana. Kruuk (2006) comenta que esta capacidade de persistir em áreas alteradas e em meios urbanos é comum em grande parte das espécies de lontra.

A espécie está intimamente ligada à parte terrestre do ambiente. É neste local que ela geralmente ingere os alimentos capturados, em sua maioria no meio aquático, constrói suas tocas e cria seus filhotes. A mata ciliar proporciona um local

com maior proteção e possibilidades para construir tocas em meio às raízes de árvores (Pardini, 1995).

As fezes e muco encontrados, em sua maioria, estavam em locais de fácil visualização. Na área amostral dois pontos foram definidos como latrinas (Fig.5), que são locais onde são encontradas grandes quantidades de excrementos (Kruuk, 2006). Os dois lugares são pilares de uma antiga ponte que passava no local, porém foi destruída para a construção da ponte atual que se encontra mais alta que a antiga. Tais pilares possuem uma pequena vegetação em seu centro, muito utilizado pelas lontras, e encontra-se distante da margem, o primeiro a 200m e o segundo a 600m. Sendo encontrada uma grande quantidade de vestígios, como excrementos, restos de alimentos, arranhados e “camas” feitas no capim.

Tais excrementos desempenham um importante papel na comunicação intraespecífica. Segundo Larivière (1999) a lontra os utiliza para coordenar a atividade sexual e presença aos demais indivíduos.

Análise Genética

Foi extraído o DNA de todas as amostras coletadas. Por conta das amostras de fezes possuírem DNA de outros organismos além do da lontra, não foi feita a quantificação das alíquotas extraídas, pois não corresponderia ao valor real da espécie em questão.

Encontramos uma grande dificuldade para a individualização das amostras, não sendo possível obter um número suficiente de primers genotipados para que fosse possível utilizar as informações nos programas de análise populacionais.

Na tentativa de conseguirmos obter sucesso nas ampliações dos primers, uma série de testes foi feita em relação às concentrações dos reagentes e temperatura de anelamento. Gradientes com diferentes concentrações de MgCl₂, dNTP, Primer, BSA e temperatura foram testados. Porém, não conseguimos êxito.

Para a sexagem, encontramos a mesma dificuldade. Algumas vezes conseguíamos amplificar o cromossomo Y, todavia o lócus 04OT22, que seria o controle da amostra, não obtivemos sucesso. Para as amostras que amplificaram o cromossomo Y, não conseguimos trélicas do resultado. Não nos permitindo atestar sobre o sexo do indivíduo.

Os primers *Lut 453* e *Lut 733* foram os que apresentaram melhor resultado e *RIO 11*, com a menor taxa de sucesso dentre os utilizados neste estudo. Vale ressaltar que mesmo para os primers com melhores resultados, por conta das várias dificuldades não tivemos tempo de realizarmos réplicas para atestar se a genotipagem estava correta ou não.

Por conta desse insucesso, das 90 amostras selecionamos 19 delas (Tabela 2). Levamos em conta as que apresentavam ao menos três primers genotipados e manualmente por eliminação tentamos inferir um possível número de indivíduos na área amostrada. O número de indivíduos encontrado em 10km em linha de rio, foi oito. Trinca et al. (2013) em um estudo no Rio Grande do Sul, encontraram uma densidade linear de lontra de uma lontra a cada 1km de rio. Resultado semelhante ao encontrado por Ortega et al (2012) e sugerido por Larivière (1999).

Tabela 2 Tabela de *loci* genotipados.

ID	LUT453		LUT701		LUT733		LUT782		04OT17		04OT22		04OT04		RIO11	
X31A	160	164	106	106	153	153	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X41B	160	164	106	106	153	153	151	151	0	0	0	0	0	0	0	0
X41C	160	164	106	106	153	153	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X45A	160	164	106	106	153	153	0	0	0	0	124	130	0	0	0	0
X45B	0	0	106	106	153	153	0	0	0	0	126	134	0	0	153	153
X45D	160	164	106	106	0	0	0	0	0	0	0	0	137	161	0	0
X45G	160	164	106	106	0	0	119	119	153	153	0	0	0	0	0	0
X49A	160	164	106	106	0	0	0	0	0	0	122	128	0	0	0	0
X71"	160	164	106	106	0	0	123	123	0	0	0	0	0	0	0	0
X97	160	164	106	106	0	0	0	0	153	153	0	0	0	0	0	0
X97A	160	164	106	106	0	0	0	0	153	153	0	0	0	0	0	0
X99A	160	164	106	106	0	0	0	0	0	0	0	0	169	169	0	0
24	160	164	106	106	0	0	175	183	0	0	0	0	0	0	0	0
29B	160	164	106	106	0	0	123	139	0	0	0	0	0	0	0	0
X40	160	164	106	144	153	153	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X37A	160	164	106	144	153	153	0	0	0	0	0	0	137	161	0	0
X37B	160	164	106	144	0	0	129	143	0	0	0	0	0	0	0	0
X38A	160	164	106	144	0	0	129	129	0	0	0	0	0	0	0	0
X38B	172	176	106	106	153	153	0	0	153	153	0	0	0	0	0	0

Referências

- Beheler, A.S.; Fike, J.A.; Dharmarajan, G.; Rhodes, O.E.; Serfass, T.S. (2005) Ten new polymorphic microsatellite loci for North American river otters (*Lontra canadensis*) and their utility in related mustelids. *Molecular Ecology Notes*, 5, 602–604.
- Beheler, A.S.; Fike, J.A.; Murfitt, L.M.; Rhodes, O.E.; Serfass, T.S. (2004). Development of polymorphic microsatellite loci for North American river otters (*Lontra canadensis*) and amplification in related mustelids. *Molecular Ecology Notes*, 4, 56–58.
- Chehebar, C. (1990). Action plan for Latin American otters. IUCN/SSC Otter Specialist Group, Gland, Switzerland.
- Cheida, C. C.; Nakano-Oliveira, E.; Fusco-Costa, R.; Rocha-Mendes, F.; Quadros, J.Ordem Carnivora em: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Eds.) *Mamíferos do Brasil*. 2.ed. Londrina: Nelio Roberto dos Reis, 2011, p.261-263.
- Chistiakov, D.A.; Hellemans, B. & Volckaert, F.A.M. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 255: 1-29.
- CITES – Convention on International Trades in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. *Cites species database*. Setembro 2012. Disponível em: <http://www.cites.org>. Acessado em 28 de outubro de 2014.
- Colares, E.P. ;Waldemarin, H.F. (2000) Feeding of the neotropical river otter (*Lontra longicaudis*) in the coastal region of the Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. *IUCN Otter Specialist Group Bulletin*, 17, 6–13.
- Dallas, J.F.; Carss, D.N.; Marshall, F.; Koepfli, K.P.; Kruuk, H.;Piertney, S.B.; Bacon, P.J. (2000). Sex identification of the Eurasian otter *Lutra lutra* by PCR typing of spraints. *Conserv. Genet.* 1: 181-183.
- Emmons, L.H. 1997. *Neotropical Rainforest Mammals: a field guide*. The University of Chicago Press, Chicago.
- IBAMA & MMA. (2008). *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Machado, A.B.M.; Drummond, G.M. & Paglia, A.P. (Eds.). 1ª ed. Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas. 2º v. 1420 p.
- Jolly, G. M. (1965). Explicit estimates from capture-recapture data with both death and immigration - Stochastic model. *Biometrika*52: 225-247.
- Frankham, R.; Ballou, J.D. & Briscoe D.A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*.Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Goldstein, D.B. & Pollock D.D. (1997). Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*. 88: 335-342.
- Haig, S. M. (1998). Molecular contributions to conservation. *Ecology*. 79(2):413-425.

IUCN (2006) IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org> Acessado em 10 de outubro de 2014.

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

Kruuk, H. (2006) Otters, ecology, behaviour and conservation. Oxford University Press, Oxford, 265 pp.

Lariviere, S. (1999). *Lontra longicaudis*. Mammalian Species 609, 1-5.

Maldonado, J.R.E. and López González, C.A. (2003) Recent Records For The Neotropical River Otter (*Lontra Longicaudis*) In Guerrero, Mexico. IUCN Otter Spec. Group Bull. 20(2): 65 – 68.

Mason, C. (1990) An introduction to the otters. Em: P. Foster-Turley, S. Macdonald and C. Mason (eds), *Otters: an action plan for their conservation*, pp. 4-7. Gland, Switzerland.

Medina-Vogel, G. & Gonzalez-Lagos, C. (2008). Habitat use and diet of endangered southern river otter *Lontra provocax* in a predominantly palustrine wetland in Chile. - *Wildl. Biol.* 14: 211-220.

Nowak, M.R. (1999). *Walter's Mammals of the World Vol I*. Sixth edition. John Hopkins University Press. Baltimore and London.

Ortega, J., Navarrete, D. & Maldonado, J. E., (2012). Non-invasive sampling of endangered neotropical river otters reveals high levels of dispersion in the Lacantun River System of Chiapas, Mexico. *Animal Biodiversity and Conservation*, 35.1: 59–9.

Pardini, R. (1998). Feeding ecology of the neotropical river otter, *Lontra longicaudis*, in an Atlantic Forest Stream, southeastern Brazil. *Journal of Zoology*, 245, 385–391.

Passamani, M. & Camargo, S.L. (1995). Diet of the river otter *Lutra longicaudis* in Furnas Reservoir, south-eastern Brazil. *Otter Specialist Group Bulletin*, Wageningen, 12: 32-34.

Piggott, M.P.; Bellemain, E.; Taberlet, P. & Taylor, A.C. (2004). A multiplex pre-amplification method that significantly improves microsatellite amplification and error rates for faecal DNA in limiting conditions. *Conservation Genetics*. 5: 417-420.

Raymond, M. & Rousset, F. (1995). Genepop: population genetics software for exact tests and ecumenicist. *Journal of Heredity*. 86: 248-249.

Redford, K.; Eisenberg, J. (1992). *Mammals of the Neotropics*. Chicago: University of Chicago Press.

Ruell, E.W. & Crooks, K. (2007). Evaluation of noninvasive genetic sampling methods for felid and canid populations. *The Journal of Wildlife Management*. 71(5):1690-1694.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Press, New York.

Seber, G.A.F. (1965). A note on the multiple recapture census. *Biometrika*. 52:249-259.

Sillero-Zubiri, C. & Macdonald, D.W. (1998). Scent-marking and territoriality of Ethiopian wolves *Canis simensis*. *Journal of Zoology (London)* 245:351-361.

Trinca, C.S.; de Thoisy, B.; Rosas, F.C.; Waldemarin, H.F.; Koepfli, K.P.; Vianna, J.A.; Eizirik, E. (2012) Phylogeography and Demographic History of the Neotropical Otter (*Lontra longicaudis*). *J Hered.* 2012 Jul;103(4):479-92.

Valiére, N. (2002). GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*. 2(3): 377-379.

Waits, L.P.; Luikart, G. & Tarbelet, P. (2001). Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10: 249-256.

Waldemarin, H. F. *Ecologia da lontra neotropical (Lontra longicaudis), no trecho inferior da bacia do rio Mambucada, Angra dos Reis*. 122p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

Waldemarin, H.F. & Alvarez, R. (2008). *Lontra longicaudis*. Em: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>. Visualizado em 31 de Agosto de 2012.

Weber, L. I.; Hildebrand, C. G.; Ferreira, A.; Pedarassi, G.; Levy, J. A.; Colares, E. P. (2009). Microsatellite genotyping from faeces of *Lontra longicaudis* from southern Brazil. *Iheringia Série Zoologia Porto Alegre*, 99: 5–11.

White, G.C. & Burnham, K.P. (1999). Program MARK: Survival Estimation from Populations of Marked Animals. Disponível em: <http://warnercnr.colostate.edu/~gwhite/fw663/BirdStudy.PDF>. Acessado em: 01 de setembro de 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia utilizada neste trabalho para acessar informações populacionais utilizando marcadores moleculares, não obteve sucesso, diferentemente do que ocorreu nos outros trabalhos com a espécie.

O insucesso com a padronização dos primers possivelmente se deu pela falta de tempo para demais testes em relação a ajustes na concentração de reagentes e temperaturas. Outro fator que deve ser levado em conta é o kit utilizado para extração do DNA das amostras, pois alguns colegas de laboratório passando a usar o kit da marca QIAGEN relataram um aumento no sucesso de suas amplificações.

A utilização do caiaque se mostrou bastante eficiente para este tipo de trabalho, pois é de baixo custo comparado a utilização de barcos e permitiu que realizássemos uma busca minuciosa no ambiente.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.