

---

ECOLOGIA

---

**Mariana Sayuri Tanaka Gotardi**

**Caracterização da diversidade genética em  
queixadas (*Tayassu pecari*) e catetos (*Pecari  
tajacu*) isolados em um fragmento florestal**

MARIANA SAYURI TANAKA GOTARDI

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM  
QUEIXADAS (*Tayassu pecari*) E CATETOS (*Pecari tajacu*)  
ISOLADOS EM UM FRAGMENTO FLORESTAL

**Orientadora: Profa. Dra. Cibele Biondo**

**Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Galetti Rodrigues**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro,  
para obtenção do grau de Ecólogo.

Rio Claro

2012

591.15 Gotardi, Mariana Sayuri Tanaka  
G683c Caracterização da diversidade genética em queixadas (Tayassu pecari) e catetos (Pecari tajacu) isolados em um fragmento florestal / Mariana Sayuri Tanaka Gotardi. - Rio Claro : [s.n.], 2012  
41 f. : il., figs., tabs., mapas

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ecologia) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Cibele Biondo  
Co-Orientador: Mauro Galetti Rodrigues

1. Genética animal. 2. Isolamento. 3. Endogamia. 4. Fragmentação. 5. Tayassuídeos. 6. Microssatélites. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente àquela que, como diz minha priminha, “agora é uma estrelinha”, mas eterna em minha memória: Mãe! A mulher mais linda e mais guerreira que eu conheci. Aquela que me ensinou que, aconteça o que acontecer, devo me manter forte e honrar o escudo que ela me deixou; que se não fosse por isso, hoje não saberia o que fazer e como estar aqui concluindo esta, tão sonhada por ela, etapa de minha vida. É querida, pois aqui está a conclusão de mais uma etapa da caminhada em busca de ser alguém melhor... Esteja onde estiver continue me guiando para que muitas mais etapas sejam concluídas! Com amor, Mamá.

Ao meu querido namorado Topera, vulgo Fábio, o tesouro encontrado na “Cidade Azul”. O que teria sido de mim sem você nestes últimos anos? Obrigada por todo apoio e compreensão em todos os momentos. Você realmente é uma das pessoas mais lindas que conheci em minha vida.

À minha querida amiga e orientadora Profa. Dra Cibele Biondo, CIBS!!!. Além de me introduzir no mundo da “porcajada” do mato, me ensinou muitas coisas da vida, entre elas o conhecimento, que ninguém jamais poderá me tirar. Adotou-me como filha e me ensinou o meu atual lema de vida: “No final dá tudo certo!” E, por fim, deu tudo certo. Obrigada por tudo querida!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Mauro Galetti, pelo apoio ao projeto, por ter permitido sua realização no Laboratório de Biologia da Conservação (Labic) e pelas sugestões sempre pertinentes.

À Alexine Keuroghlian, pessoa boa, que nos confiou suas amostras para que fosse possível realizar este projeto. Obrigada pela atenção e cuidado de sempre.

À FAPESP e à WCS-Brasil pelo apoio financeiro.

À minha família Rio Clarence: Geni, Issa, Biz (Vocês duas foram essenciais nisso tudo...obrigada por me ensinarem a ser uma pessoa melhor! Irmãs de corpo, alma e coração. Amo e amarei sempre), Nati, Zhu, Pedrota e Cascão, queridos da Rep. Tomba! Aos outros membros não tão menos importantes: Jack, Bambu, Gambé, Goiaba, Lama, Arrêa, Manga, Roots, Lucía, Tortis, Tróia, Rafa, Roots, Azeite e Everest e, é claro, nossos queridos amigos caninos Cataia, Polenta e Thoureau! Aprendi coisas fundamentais com vocês... A Irmandade e o amor (ao próximo e a cerveja nossa de cada dia! Rs.)!

A minha bonequinha Batian, teimosinha preferida, meu alicerce! E ao tio, pai e amigo Celso por todo o empenho em não me deixar desamparada!

Às queridas amigas Valesca e Alexandra Sanches (Também te acho uma pessoa especial neste mundo!) pelas conversas, risadas e auxílios. E a todos os colegas do Labic pelos acréscimos pessoais e intelectuais.

A querida companheira de laboratório Flávia Appolinário, com quem compartilhei além de primers e alíquotas, muito companheirismo e dedicação aos porcos nossos de cada dia. Obrigada por tudo querida. Você foi e será muito especial em minha vida.

E não podia me esquecer das famílias moranguenses: Aos De Angelis, Rocha, Souza Pagani, Almeida Iha, Ferreiras Lourenço e Freitas Scalese. Sem vocês muito disso não teria acontecido. Fazem parte da minha formação, portanto muito disso aqui devo a vocês!

“Why she had to go I do not know  
She would not say...  
[but I believe that is in a better place  
watching over me!!]”  
Paul McCartney - Yesterday

## RESUMO

A fragmentação de ambientes naturais é um processo que pode ocasionar a redução e isolamento das populações de mamíferos. Entre os mamíferos tropicais mais afetados pela fragmentação estão os pecarídeos. Neste trabalho, foi analisada a variabilidade genética das populações de dois pecarídeos simpátricos, os catetos (*Pecari tajacu*) e as queixadas (*Tayassu pecari*), isoladas em um fragmento de Mata Atlântica do sudeste do Brasil (a Estação Ecológica de Caetetus, EEC). Por conta desse isolamento, esperava-se encontrar baixo grau de variabilidade genética, além de evidência de endogamia e gargalo populacional para ambas as espécies. Comparando-se as duas espécies, devido as suas diferenças comportamentais e por terem sido registrados vários bandos de catetos e apenas um de queixadas na EEC, esperava-se que a variabilidade genética estimada para queixadas fosse menor do que para catetos. Foram genotipadas 16 amostras de queixadas e 17 de catetos para cinco locos de microssatélites. Contrariando a hipótese de que a diversidade genética seria menor em queixadas do que em catetos, foram encontrados níveis de diversidade similares para ambas as espécies (número médio de alelos = 2,60 para queixada e 2,80 para catetos; riqueza alélica = 2,52 para queixadas e 2,54 para catetos; e heterozigosidade média observada = 0,50 para queixada e 0,48 para cateto e esperada = 0,41 para queixada e 0,38 para cateto). Houve evidência de gargalo populacional recente para queixadas, mas não para catetos, o que pode estar relacionado à maior vulnerabilidade daquela espécie a fragmentação do habitat e à caça. Entretanto, os coeficientes de endocruzamento  $F_{IS}$  (-0,16 para queixadas e -0,18, para catetos) encontrados não foram positivos e nem significativos ( $p > 0,02$ ), não evidenciando endogamia para ambas as espécies. O fato de não ter sido encontrada evidência de gargalo populacional em catetos e de endogamia para ambas as espécies, não significa que as espécies não estejam sofrendo com a fragmentação e isolamento da área. Mas pode ser que ainda não tenha dado tempo suficiente para que as alterações pudessem ser percebidas ou mesmo que a amostragem não tenha sido suficiente para evidenciá-las. De todo modo, este trabalho é um importante ponto de partida para um monitoramento genético de longo prazo dessas espécies na área.

*Palavras-chave:* Fragmentação. Isolamento. Endogamia. Microssatélites. Tayassuidae.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	07
1.1- Caracterização das espécies.....	09
2. OBJETIVOS.....	15
2.1- Hipóteses.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1- Área de estudo.....	16
3.2- Amostragem e procedimento laboratorial.....	17
3.3- Análise de dados.....	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Testes de amplificação e genotipagem dos locos.....	23
4.2 Estimativa de diversidade genética, endocruzamento e gargalo populacional recente.....	25
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	33
7. REFERÊNCIAS.....	35

## 1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é considerada como um dos mais ricos conjuntos de ecossistemas em termos de diversidade biológica do Planeta (CAPOBIANCO, 2001), tratando-se de uma prioridade para conservação, pois muitas espécies encontram-se seriamente ameaçadas devido à ação antrópica (MYERS et al., 2000; BROOKS et al., 2002; GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2003; ORME et al., 2005; CEBALLOS; EHRLICH, 2006). Segundo Ribeiro et al. (2009), apenas 12% dos 1.000 km<sup>2</sup> existentes no passado resistiram aos distúrbios sofridos; e muitas das matas persistem como pequenos fragmentos.

O processo de fragmentação é resultado da perda de habitat e mudança na configuração da paisagem (FAHRIG, 2003). Os fragmentos originados podem se tornar isolados, dependendo da conectividade entre eles que, em última análise, depende de quão permeáveis são as matrizes do entorno às espécies (AWADE; METZGER, 2008). O isolamento dos fragmentos tem contribuindo significativamente para o declínio e isolamento de populações selvagens, aumentando assim o risco de extinção (SCHIPPER et al., 2008).

O comportamento, a morfologia e a ecologia das espécies são características importantes que têm sido apontadas para determinar se uma espécie irá persistir no fragmento (CALAÇA, 2009). Algumas espécies, principalmente aquelas que precisam de grandes áreas, podem não ter recurso suficiente em fragmentos pequenos, além de outros recursos importantes para sobreviverem em longo prazo (MCNAB, 1963) Assim grandes mamíferos como felinos, antas e tayassuídeos, que ocupam grandes áreas de vida, são pouco vistos em fragmentos pequenos (CHIARELLO, 1999). A permanência das espécies nos fragmentos dependerá também de sua resposta à nova composição da paisagem, não somente em termos de tamanho da área, mas principalmente da conectividade funcional da mesma, pois sem ela a área pode se tornar isolada (WILLIS, 1979; TABARELLI et al., 1998; PARDINI et al., 2005). A conectividade é definida como elemento facilitador de fluxos biológicos entre os fragmentos (URBAN; SHUGART 1986; TAYLOR et al., 1993).

O isolamento das espécies nos fragmentos florestais pode levar à ocorrência de gargalos populacionais, ou seja, à redução drástica do tamanho populacional. Os

impactos genéticos resultantes da fragmentação podem variar dependendo dos detalhes da estrutura populacional resultante e dos padrões de fluxo gênico entre os fragmentos. Em populações pequenas, alguns alelos, principalmente aqueles raros, podem não ser transmitidos para as gerações futuras pela ação da deriva genética, o que ocasiona perda e fixação de alelos dentro da população, influenciando a taxa de sobrevivência da espécie. Populações pequenas e isoladas podem sofrer também com o processo de endogamia, o qual consiste no acasalamento de indivíduos aparentados ou quando a taxa de acasalamento preferencial supera a de cruzamentos aleatórios. Esse processo pode resultar em uma depressão endogâmica, reduzindo a heterozigosidade, reprodução e sobrevivência de tais populações. Estes fatores acabam, em última análise, por diminuir a capacidade das populações evoluírem em resposta às mudanças ambientais, aumentando o risco de extinção (FRANKHAM et al., 2008).

É o que pode vir a ocorrer com as queixadas (*Tayassu pecari*) e catetos (*Pecari tajacu*) que habitam a Mata Atlântica, onde o intenso processo de fragmentação, juntamente com a caça, vem ocasionando reduções populacionais em ambas as espécies (CHIARELLO et al., 1999; CULLEN JR et al., 2000; AZEVEDO; CONFORTI, 2008; GALETTI et al., 2009). Tal cenário impõe a necessidade de elaboração de planos de manejo e conservação adequados para ambas as espécies neste bioma.

Recentemente, tem sido reforçada a importância do conhecimento do grau de variabilidade genética das espécies para a conservação, já que a alocação de recursos e manejo inapropriado podem ocorrer se os fatores genéticos forem ignorados (FRANKHAM, 2003). Novos métodos têm sido desenvolvidos para o monitoramento da diversidade biológica, essencial para a elaboração de planos de manejo e conservação adequados. Dentre estas metodologias, o uso de marcadores moleculares para estimativas de parâmetros populacionais e *status* de conservação tem sido cada vez mais empregado por serem mais sensíveis e confiáveis do que as abordagens tradicionais (SCHWARTZ, 2007). Entre estes estão os marcadores microsatélites, que se tratam de repetições em tandem de 1-6 pares de bases (TAUTZ 1984). Um exemplo de uma sequência de repetição de microsatélites é o dinucleotídeo (CA)<sub>12</sub>, que consiste de 12 repetições de duas bases, neste caso, citosina (C) e adenina (A). Microsatélites são marcadores co-dominantes,

permitindo a identificação dos genótipos homozigotos e heterozigotos, possibilitando o cálculo das frequências de cada um dos alelos presentes em uma população. Esses marcadores possuem taxas de mutação elevadas o que faz com que existam múltiplos alelos em cada loco, e este alto grau de polimorfismo os tornam interessantes para estudos de genética de populações (FREELAND, 2005).

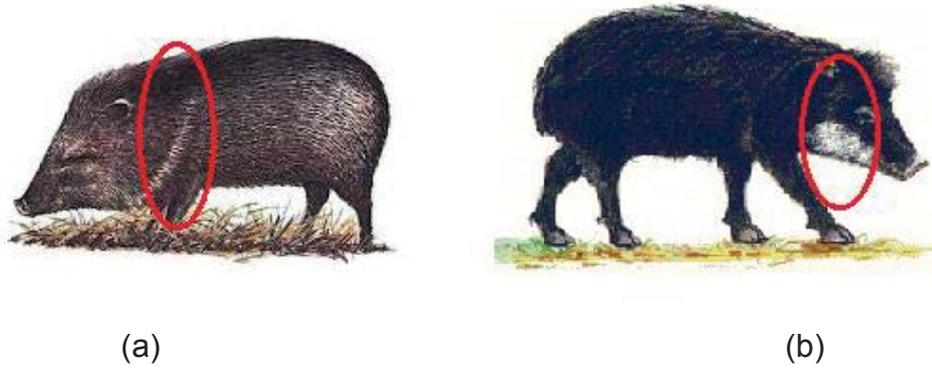
Entretanto, até o presente momento, poucos estudos utilizando-se de ferramentas moleculares foram desenvolvidos para avaliar o grau de diversidade genética das populações de cateto (*Pecari tajacu*, ver COOPER et al., 2010) e queixada (*Tayassu pecari*, ver BIONDO et al., 2012); além disso, nenhum foi realizado no bioma Mata Atlântica.

### **1.1 Caracterização das espécies**

No Brasil, duas espécies de pecarídeos podem ser encontradas em simpatria em fragmentos florestais, a queixada (*Tayassu pecari*) e o cateto (*Pecari tajacu*) (SOWLS, 1997). Ambas as espécies, embora conhecidas popularmente como porcos-do-mato, estão classificadas em uma família distinta da dos porcos domésticos devido a diferenças morfológicas e genéticas (SILVA, 1984), pertencendo então à família Tayassuidae (Ordem Cetartiodactyla, Classe Mammalia). As espécies se diferem quanto ao tamanho do bando, comportamento, morfologia e padrões de uso do habitat (BODMER, 1990; PERES, 1996; FRAGOSO, 1999).

Catetos possuem pelos de cor acinzentada e uma faixa branca ao redor do pescoço que lembra um “colar” (FIGURA 1a). Sua gestação tem duração de aproximadamente 146 dias, nascendo geralmente dois filhotes (SOWLS, 1997). Já as queixadas possuem uma pelagem com coloração que varia de marrom a negro (FIGURA 1b), possuindo uma grande quantidade de pêlos brancos na região da mandíbula e focinho, o que as diferencia dos catetos. A gestação dura em torno de 250 dias, nascendo aproximadamente de 1,6 a 1,69 filhotes por ninhada (SOWLS 1997; GOTTDENKER; BODMER, 1998).

**Figura 1-** Ilustração das espécies estudadas. (a), cateto; (b), queixada. Os círculos vermelhos destacam as características da pelagem que diferenciam as espécies: o “colar” mais claro nos catetos e o “queixo” branco das queixadas.

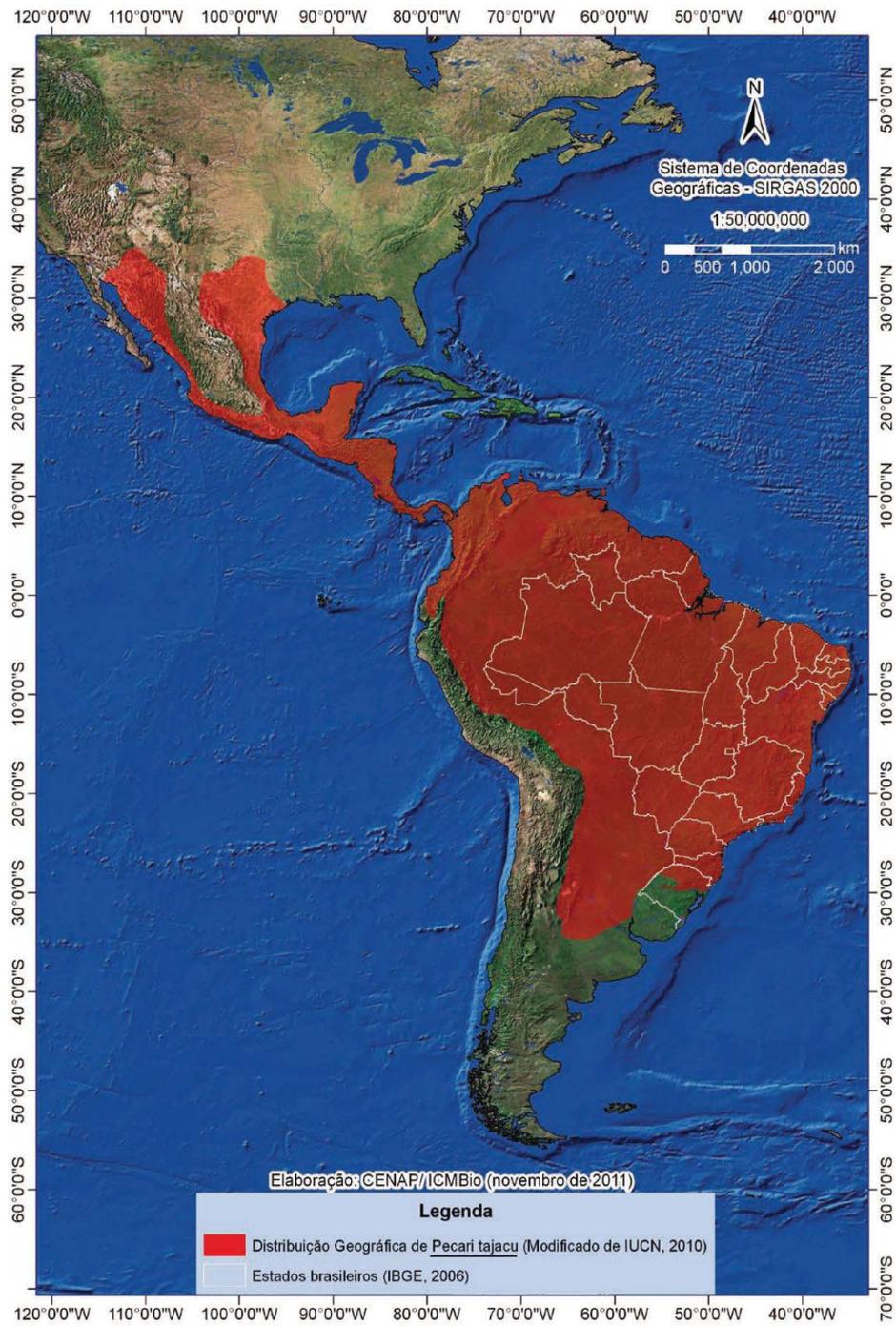


Os catetos se distribuem geograficamente do sudoeste dos Estados Unidos (região Sul do Texas) até a Argentina (FIGURA 2, ocupando uma variedade de habitats (MAYER; BRANDT, 1982; BODMER; SOWLS, 1993). Seu comprimento pode variar de 0,79 a 1,06 m e altura de 0,40 a 0,45 m (NOWAK; PARADISO, 1983). As queixadas se distribuem desde o sul do México até o norte da Argentina (FIGURA 3, embora esta distribuição tenha sido reduzida devido a forte pressão de caça e desmatamento (OLIVER, 1993), e estão principalmente associadas à florestas tropicais úmidas (MAYER; WETZEL, 1987). Podem medir em torno de 1,20 m de comprimento e de 0,40 a 0,50 m de altura (SOWLS, 1984).

As duas espécies são consideradas, nos trópicos, como preferencialmente frugívoras (BECK, 2006; KEUROGHLIAN; EATON, 2009) e, dependendo da região, também podem consumir raízes e folhas (SOWLS, 1984). Ambas desempenham papel chave na dispersão e predação de sementes nas florestas neotropicais (KILTIE, 1981; BODMER, 1990, 1991; OLIVER, 1993; TERBOGH; WRIGHT, 1994; FRAGOSO, 1999; REDFORD, 1999; FULLER et al., 2002). Além disso, são responsáveis pelo pisoteio de plântulas regulando assim a densidade populacional da vegetação de sub-bosque (SILMAN *et al.*, 2003; KEUROGHLIAN; EATON, 2009). Segundo Beck (2006), a extinção de pecarídeos estaria diretamente ligada a mudanças na dinâmica populacional de algumas palmeiras, pois estas representam

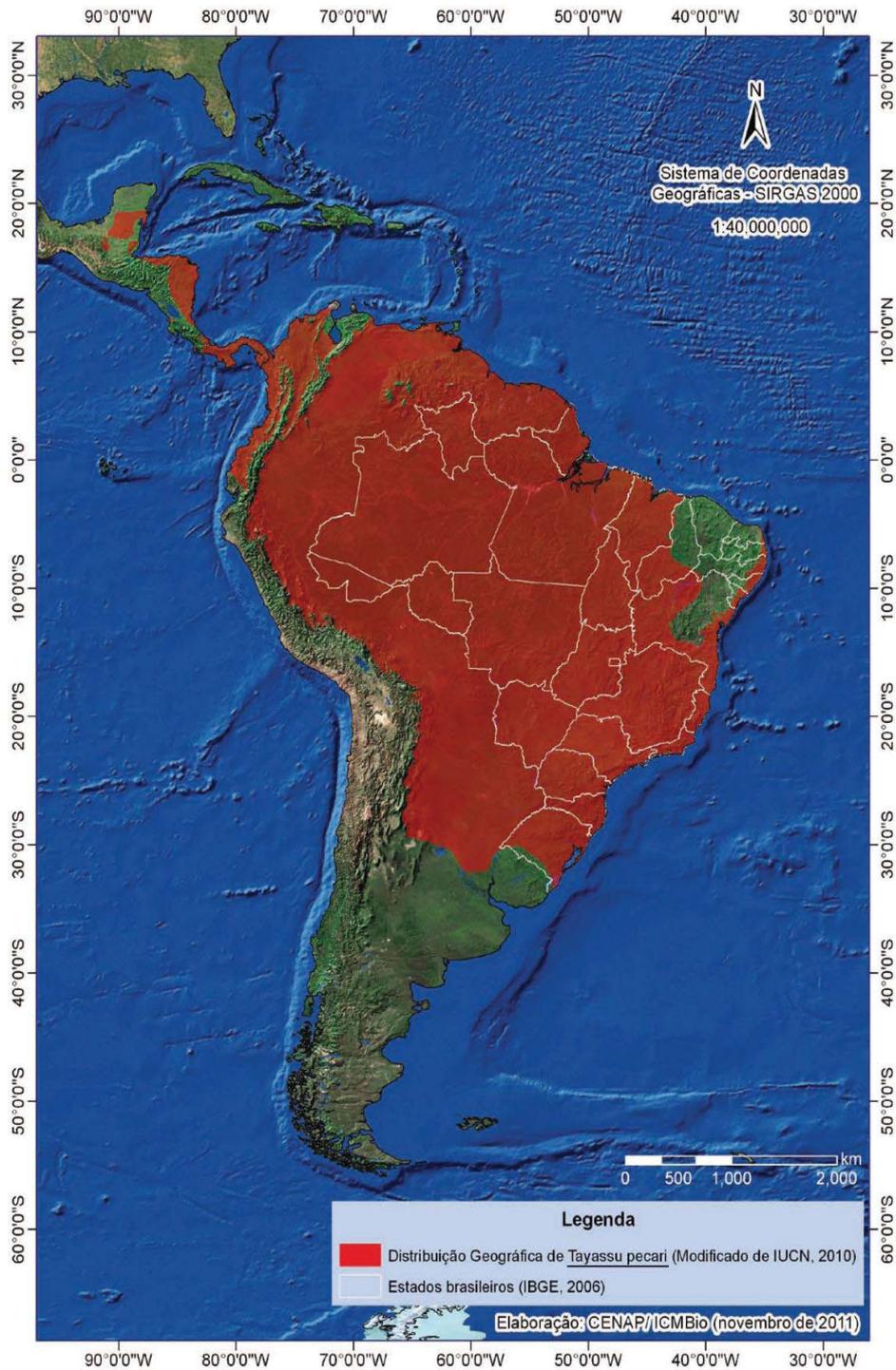
cerca de 60% de sua dieta (BODMER, 1990; PAINTER, 1998; KEUROGHLIAN; EATON, 2009).

**Figura 2-** Mapa de distribuição geográfica de *Pecari tajacu*.



Fonte: CENAP/ICMBio

**Figura 3-** Mapa de distribuição geográfica de *Tayassu pecari*.



Fonte: CENAP/ICMBio

Tanto catetos, como queixadas vivem em bandos constituídos de indivíduos de distintas faixas etárias e de ambos os sexos (SOWLS, 1984). Os catetos vivem em bandos que variam de 5 a 25 indivíduos (BIGLER, 1974; KILTIE; TERBORGH, 1983; JUDAS; HENRY, 1999) e dividem-se em subgrupos temporários que se unem no início da manhã e no fim da tarde; durante o dia o grupo pode conter de um a três indivíduos (KEUROGHLIAN et al., 2004). Segundo Mendes-Pontes (2004), no bioma Amazônico foram encontradas diferenças nos tamanhos de grupos entre as estações úmida e seca (4 a 10 ind/grupo). Já as queixadas vivem em bandos que facilmente excedem 100 indivíduos (KILTIE; TERBORGH, 1983; ALTRICHTER; ALMEIDA, 2002; KEUROGHLIAN et al., 2004). Kiltie, Terborgh (1983) sugerem que, em grandes grupos, as queixadas são mais eficientes contra os ataques de predadores, e também acreditam que, assim, os mais inexperientes possam aprender com os mais velhos a encontrar fontes de alimento, e evitar visitas desnecessárias a áreas já superexploradas.

O tamanho da área de vida ocupada pelos bandos de catetos varia de 50 a 700 ha (SOWLS, 1984; JUDAS; HENRY, 1999; KEUROGHLIAN et al., 2004). Os territórios são considerados estáveis, já que o tamanho da área utilizada não variam ao longo do tempo (JUDAS; HENRY, 1999). Já as queixadas ocupam grandes áreas de vida, de 1.500 a 20.000 ha (KILTIE; TERBORGH, 1983; FRAGOSO, 1998; CARRILO et al., 2002; KEUROGHLIAN et al., 2004), cujo tamanho pode variar sazonalmente. Pesquisadores relacionaram esses movimentos dos bandos de queixadas à disponibilidade diferencial de frutos nas diferentes épocas do ano (KILTIE; TERBORGH, 1983; BODMER, 1990, PERES, 1994, 1996; CARRILO et al., 2002; KEUROGHLIAN et al., 2004; KEUROGHLIAN; EATON, 2008). Keuroghlian e Eaton (2008) observaram também a importância da variedade de habitats, córregos e manchas de palmitos jussara (*Euterpe edulis*) para bandos de queixadas em áreas menores do que 2.000 ha na Mata Atlântica.

Os bandos de catetos foram considerados como permanentes, com todos os indivíduos fiéis ao grupo natal (SCHWEINSBURG, 1971). Porém, Ellisor e Harwell (1969) e Oldenburg et al. (1985) observaram movimentos de animais de um grupo para outro, o que pode indicar possível dispersão. Além disso, Cooper et al. (2010), utilizando marcadores moleculares, demonstraram que a dispersão ocorre e é principalmente mediada por machos. No caso das queixadas, estudos relataram que

os bandos são subdivididos em sub-bandos que se fundem e se dividem periodicamente, processo denominado de fissão-fusão, e que nesse processo pode haver trocas de indivíduos entre os sub-bandos (KEUROGHLIAN et al., 2004). A dispersão nas queixadas é mediada por ambos os sexos, ao contrário da dispersão preferencial de machos observada para a maioria dos mamíferos (BIONDO et al., 2012).

Catetos foi recentemente classificada como quase ameaçada na Mata Atlântica (DESBIEZ et al., 2012) e queixadas como criticamente ameaçada (KEUROGHLIAN et al., 2012); o que se deve a intensa fragmentação de habitat nesse bioma (Ribeiro et al. 2009), assim como à caça ilegal (CHIARELLO et al., 1999; CULLEN JR et al., 2000; GALETTI et al., 2009, DESBIEZ et al., 2012).

Na Estação Ecológica dos Caetetus (EEC), um fragmento de floresta Atlântica localizado no interior do Estado de São Paulo onde foi realizado este trabalho, foi registrada a ocorrência de um bando de queixadas de aproximadamente 150 indivíduos e 7-22 bandos de catetos de tamanho médio de nove indivíduos; o tamanho da área de vida estimada para o bando de queixadas foi de 1.871 ha e para dois dos bandos de catetos, de 123 e 305 ha (KEUROGHLIAN et al. 2004). Até o momento, não se tem indícios de que essas espécies cruzam a matriz do entorno da EEC, estando esta população isolada no fragmento a mais de 70 anos (A. Keuroghlian, comunicação pessoal). Além disso, a ocorrência de caça de ambas as espécies na EEC já foi registrada (TABANEZ et al., 2005).

Por conta do grau de ameaça, bem como de seu papel no ecossistema, planos efetivos de manejo e conservação das populações de queixadas e catetos, em especial na EEC, precisam ser elaborados e espera-se que os dados aqui gerados sirvam de subsídios para isso. Afinal, trata-se de uma área altamente isolada, sem registros de entrada ou saída de indivíduos, o que demonstra a necessidade urgente de uma análise da variabilidade genética de suas populações.

## OBJETIVOS

Neste trabalho, será analisada uma população de queixada (*Tayassu pecari*) e outra de cateto (*Pecari tajacu*) que habitam a Estação Ecológica dos Caetetus (ECC) para:

- ✓ Estimar o grau de diversidade genética e analisar a ocorrência de endogamia para ambas as espécies;
- ✓ Verificar a ocorrência de gargalo populacional em ambas as espécies;
- ✓ Comparar as duas espécies, quanto a estes parâmetros;

### **2.1 Hipóteses**

Espera-se encontrar baixa variabilidade genética e evidência de endogamia e gargalos populacionais recentes para ambas as espécies devido à intensa perda de habitat sofrida na área e pela incidência de caça. Estes fatores reduzem o tamanho populacional e o fluxo gênico entre populações e, conseqüentemente, o grau de variabilidade genética das mesmas.

Como vários bandos de catetos foram registrados na EEC, é possível que haja um fluxo de indivíduos entre eles, o que pode garantir certo grau de variabilidade genética nessa população mesmo ela estando isolada de outros fragmentos. Já no caso das queixadas, apenas um bando foi observado e não há registros de populações dessa espécie no entorno, o que limita a possibilidade de fluxo gênico. Em última análise, espera-se observar uma menor variabilidade genética nesta espécie, em relação à registrada para os catetos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

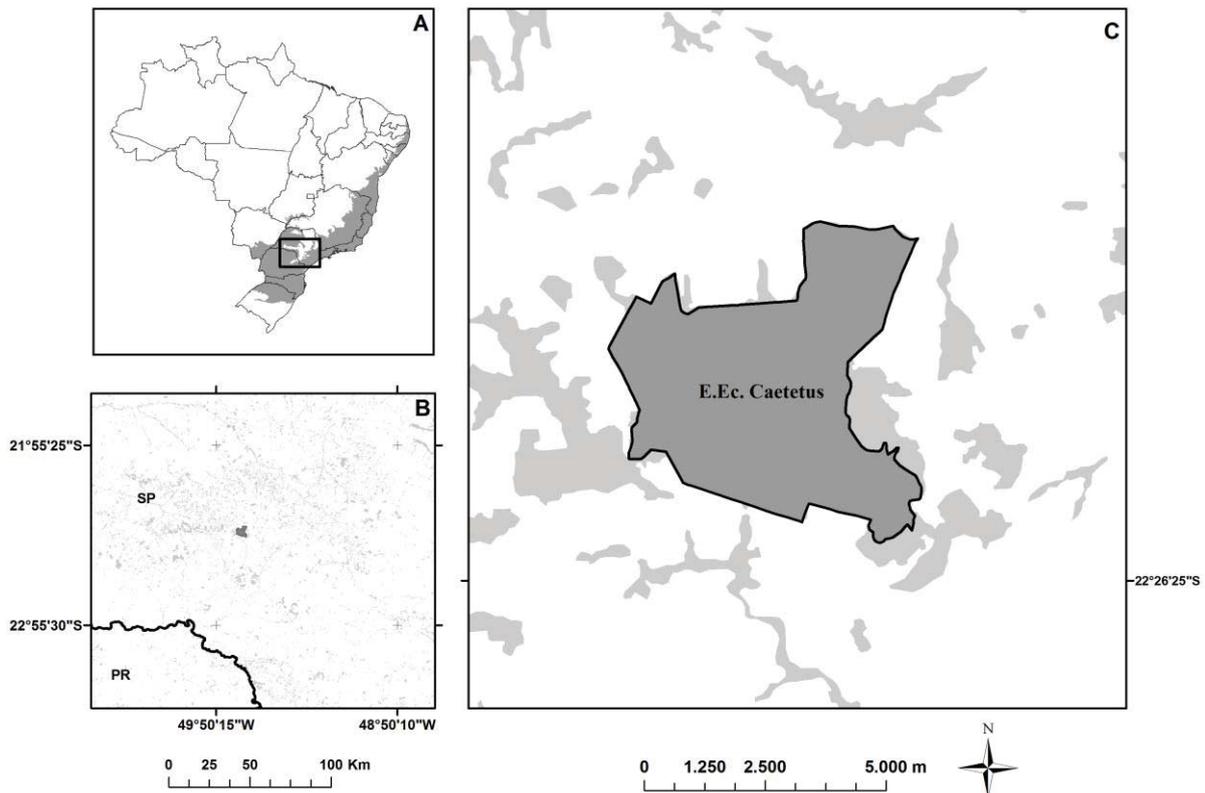
#### 3.1 Área de estudo

A Estação Ecológica dos Caetetus (EEC) possui 2.178 ha (FIGURA 4), sendo um dos últimos remanescentes da Mata Atlântica (Floresta Estacional Semidecidual) que revestia o Planalto Ocidental Paulista, o qual ocupa cerca de 50% da área do Estado de São Paulo (TABANEZ et al. 2005). Está localizada nos municípios de Gália e Alvinlândia, entre as coordenadas geográficas 22°20' e 22°30' de latitude S e 49°40' e 49°45' de longitude. W Gr. As altitudes variam, em geral, de 520 a 680 metros. O clima da EEC apresenta estacionalidade bem definida, com inverno seco e verão chuvoso. Os dados mensais e anuais da temperatura média do ar e da disponibilidade hídrica indicam uma precipitação total anual de 1.431 mm e uma temperatura média de 21,5°C (TABANEZ et al., 2005).

A vegetação dessa região corresponde à Floresta Estacional Semidecidual, tratando-se de floresta alta, com estratificação complexa e alta diversidade florística (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 1988). A Estação é coberta em sua totalidade pela floresta natural, que se encontra em diferentes estágios de regeneração. A floresta semidecidual foi muito devastada, pois seus solos férteis foram muito procurados para expansão da zona agropecuária, além de possuírem no passado grande quantidade de espécies visadas na exploração madeireira (TABANEZ et al., 2005). Como resultado, hoje restam poucos fragmentos florestais maiores que 2.000 ha (RIBEIRO et al., 2009).

A EEC abriga fauna bastante rica, a qual inclui espécies ameaçadas de extinção, como o mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*), a queixada (*Tayassu pecari*) e a anta (*Tapirus terrestris*), assim como animais considerados como vulneráveis como o cateto (*Pecari tajacu*) (CULLEN et al., 2001, 2004). Sua biodiversidade inclui populações geneticamente originais, espécies endêmicas, comunidades adaptadas ao processamento de detritos florestais e habitats originais (TABANEZ et al., 2005).

**Figura 4-** Mapa da localização da Estação Ecológica de Caetetus no estado de São Paulo. A= Distribuição original do Bioma Mata Atlântica; B= Remanescentes florestais do Bioma Mata Atlântica; C= Destaque para a Estação Ecológica de Caetetus.



Fonte: SOS Mata Atlântica- INPE (2008).

As principais atividades econômicas desenvolvidas no entorno da EEC são a cafeicultura e a pecuária de corte. Estas resultam em implicações diretas e indiretas sobre os recursos naturais, como invasão e pisoteio de plântulas pelo gado, carregamento de agrotóxicos para as cabeceiras dos córregos e invasão de animais domésticos. Fora dos limites da EEC, há grande ocorrência de desmatamento e o manejo incorreto dos solos agrícolas (TABANEZ et al., 2005).

### **3.2 Amostragem e procedimento laboratorial**

Amostras de pelos de 16 queixadas (sete fêmeas, cinco machos e quatro indivíduos sem sexo identificado) e 19 catetos (três fêmeas, quatro machos e 12

indivíduos sem sexo identificado) foram coletadas previamente durante o estudo de Keuroghlian et al. (2004) entre os anos de 1994 e 1996 (Tabela 1). Tais amostras foram mantidas a -20°C em envelopes de papel até o momento da extração de DNA.

**Tabela 1-** Caracterização das amostras coletadas para cada uma das espécies (Código da amostra, sexo e bando correspondente).

<i>Tayassu pecari</i>			<i>Pecari tajacu</i>		
Amostras	Sexo	Bando	Amostras	Sexo	Bando
Q01	Fêmea	Bando 1	C01	-	Bando 1
Q02	Fêmea	Bando 1	C02	-	Bando 2
Q03	Fêmea	Bando 1	C03	-	Bando 3
Q05	Macho	Bando 1	C04	-	Bando 4
Q06	Macho	Bando 1	C05	Macho	Bando 5
Q07	Macho	Bando 1	C06	-	Bando 5
Q08	Fêmea	Bando 1	C07	-	Bando 3
Q09	-	Bando 1	C08	-	Bando 5
Q10	-	Bando 1	C09	-	Bando 6
Q11	Fêmea	Bando 1	C10	-	Bando 5
Q12	-	Bando 1	C11	-	Bando 2
Q13	Fêmea	Bando 1	C12	-	Bando 4
Q14	Fêmea	Bando 1	C13	Macho	Bando 5
Q15	Macho	Bando 1	C14	-	Bando 5
Q16	-	Bando 1	C15	Macho	Bando 5
Q17	Macho	Bando 1	C16	Fêmea	Bando 3
-	-	-	C17	Fêmea	Bando 3
-	-	-	C18	Fêmea	Bando 2
-	-	-	C19	Macho	Bando 5

Para realizar a primeira extração de DNA das amostras fez-se uso do seguinte protocolo:

1. Adicionar à raiz de 1-5 pêlos 250 µl de tampão de digestão (163,5 µl de H<sub>2</sub>O; 2,5 µl de TrisHCl 1M; 20 µl de NaCl 5M; 50 µl de EDTA 0,5M; 12,5 µl de SDS 10%; e 5 µl de RNase 0,1 mg/ml), 25 µl de proteinase K e 10 µl de ditioneitol (DTT);
2. Vortexar e deixar a 55°C *overnight* ou até que esteja completamente digerido;
3. Adicionar 360 µl de NaCl 5M, vortexar e centrifugar por 30 min. na velocidade máxima;
4. Recuperar o sobrenadante, transferir para outro tubo e adicionar igual volume de isopropanol gelado e misturar bem;
5. Incubar as amostras a -20°C por 1h, centrifugar por 20 min. na velocidade máxima e descartar o sobrenadante;
6. Adicionar 300 µl de etanol 70%, centrifugar por 5 min.
7. Descartar o sobrenadante;
8. Deixar secar à temperatura ambiente *overnight*;
9. Adicionar 25 µl de TE e armazenar a 4°C.

Após as três primeiras amplificações e genotipagens para cada loco e amostra, fez-se novas extrações utilizando um kit de extração para amostras forenses, Invisorb Spin Forensic Kit (Invitek), de acordo com o manual do fabricante, visando melhorar a quantidade e qualidade do DNA obtido.

Após o processo de extração, foram amplificados por meio de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) oito locos polimórficos de microssatélites, desenvolvidos especificamente para queixadas e testados em catetos (Tpec3, Tpec4, Tpec5, Tpec10, Tpec12, Tpec16, Tpec17 e Tpec18, DALLA VECCHIA et al., 2011) e um desenvolvido para porcos domésticos e testado em queixadas (SW444, ROHRER et al., 1994). Os *primers forward* foram confeccionados com uma cauda 5'-M13 seguindo o método de marcação universal (5' CACGACGTTGTAAAACGAC 3'; BOUTIN-GANACHE et al., 2001). Para cada reação de PCR, foram usados 1,5 µl de DNA-alvo; 1,2 µl de tampão (10X – Invitrogen); 1 µl de trifosfatos desoxirribonucleotídeos (dNTPs, 2mM); 1,2 µl de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>, 50 mM); 0,1 µl de Platinum® *Taq* polimerase (5 U/µl - Invitrogen); 0,3 µl do *primer* R (10 mM); 0,2 µl do *primer* M13 (10 mM, marcado com fluorescências TET, HEX, FAM

ou NED – Applied Biosystems); 0,1 µl do *primer* F (10 mM) e 5,9 µl de água ultrapura, totalizando um volume de 12 µl. O programa de amplificação utilizado foi: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 45 ciclos de 94°C por 30 s, 48°C por 30 s e 72°C por 30 s, seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 min. Porém, após a quarta amplificação para todas as amostras e locos, esse programa sofreu uma alteração a fim de padronizar uma temperatura de anelamento que fosse mais adequada para obter um maior sucesso de amplificação e genotipagem, passando de 48°C para temperaturas que variavam de 40-45°C, dependendo do sucesso que era obtido levando em consideração o tamanho de cada loco analisado.

Para verificar a amplificação dos produtos de PCR, 2µl do produto foram submetidos ao processo de eletroforese em gel de agarose 2,0% em TBE 0,5X a 80 V. Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi adicionada uma amostra de 1µl de um marcador padrão de tamanho, *ladder* de 100 pares de bases (Invitrogen). Ambos, amostras e marcador padrão, foram carregados no gel com 1,5 µl de uma solução de tampão de aplicação e Gel Red (Biotium) na proporção de 1:1. Os produtos amplificados com sucesso foram genotipados no sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems) e analisados com o auxílio do programa GeneMarker (Softgenetics).

Repetições das PCRs foram realizadas para cada amostra usando-se o método de múltiplos tubos (TABERLET et al., 1996), com no mínimo três genotipagens independentes para homozigotos e duas para heterozigotos até obter um genótipo consenso. Estas repetições se fazem necessárias por se tratarem de amostras antigas, com DNA degradado e em pouca quantidade, o que aumenta as chances de erros de genotipagem.

Devido à necessidade de se realizar várias repetições das reações de PCR para cada amostra e como a quantidade de DNA disponível era pequena, foi empregado o método de PCR *multiplex* para os locos Tpec3/Tpec10, Tpec5/ Tpec16 e Tpec4/Tpec18 a fim de economizar DNA. Essa metodologia consiste em amplificar mais de um locos em uma mesma reação. Estes dois locos possuem tamanhos distintos, podendo seus genótipos ser facilmente identificados mesmo quando misturados na mesma reação. Para a reação *multiplex*, foram utilizados 2 µl de DNA-alvo; 2,4 µl de tampão (10X – Invitrogen); 2 µl de trifosfatos desoxirribonucleotídeos (dNTPs, 2mM); 2,4 µl de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>, 50

mM); 1,0 µl de BSA; 0,2 µl de Platinum® Taq polimerase (5 U/µl - Invitrogen); 0,3 µl do *primer* R1 e *primer* R2 (10 mM); 0,4 µl do *primer* M13 (10 mM, marcado com fluorescências TET, HEX, FAM ou NED – Applied Biosystems); 0,1 µl do *primer* F1 e *primer* F2 (10 mM) e 13,8 µl de água Milli Q, totalizando um volume de 25 µl. O programa de amplificação foi o mesmo descrito acima para a PCR de um único loco.

### **3.3 Análise de Dados**

Os genótipos consensos obtidos para cada loco foram analisados no programa MICRO-CHECKER (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) para verificação de possíveis erros de genotipagem devido a presença de alelos nulos, a *dropout* ou a *stuttering*. Essa análise prévia se faz necessária, pois as amostras utilizadas neste estudo, além de serem de pelos, material que possui pouca quantidade de DNA, foram armazenadas por um tempo longo, o que pode ter degradado o DNA; implicando em uma maior probabilidade de erros de genotipagem (WANDELER et al., 2003). Tais erros de genotipagem podem causar desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg, por conta de originar uma deficiência de heterozigotos, como resultado de alelos nulos por exemplo (SHAW et al., 1999).

A partir dos locos que não apresentaram evidências de erros de genotipagem, foram estimados o número de alelos e as heterozigosidades, esperada e observada, utilizando-se o programa GENALEX 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2006), um software muito utilizado para estudos de genética de populações, tanto de plantas como animais e microrganismos, por ser simples de ser manuseado e por acomodar uma ampla gama de marcadores genéticos, incluindo microssatélites. A riqueza alélica foi estimada no programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). Este mesmo programa foi utilizado também para calcular o coeficiente de endocruzamento  $F_{IS}$ , para cada loco e para as populações como um todo, bem como para testar se o coeficiente encontrado foi significativamente diferente de zero. Para este teste, o valor de  $p$  foi ajustado de acordo com a correção para múltiplas comparações proposta por Benjamini e Yekutieli (2001). O programa GENEPOP 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995) foi utilizado para avaliar os locos quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação através de um teste exato que utiliza o método da cadeia de Markov. Para estes testes, também foi utilizada a correção de Benjamini e Yekutieli (2001).

Para verificar se as populações passaram por gargalo populacional em um passado recente, foi utilizado o programa BOTTLENECK (PIRY et al., 1999). Como um excesso de heterozigosidade pode ser um indicativo de gargalo populacional recente, o programa disponibiliza testes para verificar se ocorre tal excesso nas populações estudadas em relação ao que seria esperado sob o equilíbrio de mutação-deriva, baseando-se nas frequências alélicas observadas (CORNUET; LUIKART, 1996). Os testes podem ser feitos assumindo-se qualquer um dos seguintes modelos de mutação de microssatélites: *stepwise mutation* (SM), *infinite alleles* (IA), e *two-phase* (TP). O modelo SM (KIMURA; OHTA, 1975), muito utilizado para microssatélites, pressupõe que cada novo alelo resulta de uma perda ou um ganho de uma unidade de repetição, podendo haver homoplasia – presença na população de alelos iguais, mas que tiveram origens diferentes. O modelo IA (KIMURA, 1965) assume que cada mutação cria um novo alelo, não havendo homoplasia; ao contrário do modelo SM, este modelo permite mutações em que mais de uma unidade de repetição é simultaneamente ganhada ou perdida. O modelo TP (DI RIENZO et al., 1994), também utilizado com locos microssatélites, incorpora o modelo SM, mas também assume que certa fração das mutações se dá por perda ou ganho de múltiplas unidades de repetição. Neste trabalho, testou-se a ocorrência de gargalos populacionais utilizando-se os três modelos disponibilizados pelo programa. Para o modelo TP, os testes foram feitos assumindo-se uma proporção de 70% de mutações pelo modelo SM e 30% de mutações de mais de um passo. O teste utilizado foi o teste de Wilcoxon, por permitir o uso de menos de 20 locos de microssatélites (PIRY et al., 1999).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Testes de amplificação e genotipagem dos locos

Inicialmente, foi realizada uma primeira rodada de amplificações e genotipagens, utilizando-se todas as amostras, para os oito locos de microssatélites específicos para queixadas (Tpec3, Tpec4, Tpec5, Tpec10, Tpec12, Tpec16, Tpec17 e Tpec18). Nesta primeira rodada, para queixadas, o sucesso médio de amplificação (medido por meio da visualização de bandas do tamanho esperado em gel de agarose) foi de 43,99%, variando de 14,28% (Tpec17) a 75% (Tpec18); já para catetos o sucesso médio foi de 39,31%, variando de 5,26% (Tpec17) a 84,20% (Tpec18, Tabela 2). Com relação ao sucesso de genotipagem, para queixadas, o sucesso médio obtido foi de 57,14% variando de 18,75% (Tpec17) a 87,5% (Tpec4 e Tpec16); já para catetos o sucesso médio foi de 42,06%, variando do 5,55% (Tpec17) a 66,67% (Tpec16, Tabela 3).

Um sucesso médio de amplificação e genotipagem maior em queixadas era esperado, já que os *primers* de microssatélites utilizados foram desenvolvidos para esta espécie, o que facilitaria sua amplificação. Para ambas as espécies, o sucesso obtido foi além das expectativas, já que se tratam de amostras bastante antigas e, conseqüentemente, com DNA degradado e em pouca quantidade, o que dificulta a amplificação dos locos.

**Tabela 2-** Porcentagem de sucesso da primeira amplificação para cada loco de microssatélite analisado, utilizando-se todas as amostras obtidas para as espécies.

<b>Locos</b>	<b><i>Tayassu pecari</i></b>	<b><i>Pecari tajacu</i></b>
Tpec3	56,37	47,37
Tpec4	25,00	42,10
Tpec5	68,75	56,63
Tpec10	31,25	15,79
Tpec16	43,75	26,31
Tpec17	14,28	5,26
Tpec18	75,00	84,20

**Tabela 3-** Porcentagem do sucesso de genotipagem para cada loco de microssatélite analisado, utilizando-se todas as amostras obtidas para as espécies.

<b>Locos</b>	<b><i>Tayassu pecari</i></b>	<b><i>Pecari tajacu</i></b>
Tpec3	68,75	61,11
Tpec4	87,50	55,55
Tpec5	81,25	50,00
Tpec10	25,00	27,87
Tpec16	87,50	66,67
Tpec17	18,75	5,55
Tpec18	31,25	27,78

Após realizar essa a primeira genotipagem, observou-se que o loco Tpec12 estava apresentando genótipos inconsistentes, com picos muito destoantes do padrão esperado para locos dinucleotídeos (que é o caso); e que o loco Tpec17 havia apresentado baixo sucesso de amplificação e genotipagem, tanto para queixadas quanto para catetos. Assim, optou-se por excluir esses locos das análises subsequentes com o intuito de não exercer esforços sobre locos com pouco sucesso, tendo em vista a pouca quantidade de DNA disponível, ou que pudessem trazer resultados errôneos. Assim, as demais genotipagens foram feitas utilizando-se apenas os seis locos microssatélites com os quais se obteve os melhores resultados (Tpec3, Tpec4, Tpec5, Tpec10, Tpec16 e Tpec18). Porém, após a décima sexta rodada de genotipagem, verificou-se uma dificuldade em obter genótipos consenso para os locos Tpec10 e Tpec18 para ambas as espécies e optou-se também por excluir esses locos. Como restaram apenas quatro locos (Tpec3, Tpec4, Tpec5 e Tpec16), foram feitos testes de amplificação do loco heterólogo SW444, a fim de aumentar o número de locos para as análises subsequentes. Os sucessos de amplificação e genotipagem obtidos para este loco, para queixadas, foram 17,86% e 59,79%, respectivamente; e, para catetos, 17,29% e 39,76%.

Ao final de 19 rodadas de genotipagem, foi possível obter genótipos consensos para 17 amostras de catetos (das 19 amostras iniciais) e para todas as 16 amostras de queixadas. O número de genótipos consenso obtidos para cada loco variou de seis (loco Tpec16) a 12 amostras (loco SW444) para queixadas e de cinco (loco Tpec4) a 18 (loco Tpec5) para catetos (Tabela 4).

**Tabela 4-** Número de genótipos consenso obtido para cada loco de microssatélite para cada espécie.

<b>Locos</b>	<b><i>T.pecari</i></b>	<b><i>P. tajacu</i></b>
Tpec 3	10	11
Tpec 4	8	5
Tpec5	11	18
Tpec 16	6	6
Sw 444	12	7

#### **4.2 Estimativa de diversidade genética, endocruzamento e gargalo populacional recente**

Com base nos genótipos consenso obtidos, foram calculados o número de alelos e as heterozigosidades esperada e observada para cada loco em cada espécie (Tabela 5). Para ambas as espécies os locos foram polimórficos com número médio de alelos de 2,60 para queixadas e de 2,80 para catetos. As riquezas alélicas médias obtidas foram similares aos números de alelos médios nas duas espécies: 2,39 para queixadas e 2,54 para catetos. As heterozigosidades médias, observada e esperada, foram de 0,50 e 0,41 para queixadas e de 0,48 e 0,38 para catetos, respectivamente. Comparando-se as duas espécies, não foram encontradas diferenças significativas para riqueza alélica ( $Z = -0,13$ ;  $p = 0,89$ ), número de alelos ( $Z = -0,58$ ;  $p = 0,56$ ), heterozigosidade esperada ( $Z = -0,4$ ;  $p = 0,69$ ) e observada ( $Z = 0,00$ ;  $p = 1,00$ ), indicando que os níveis de diversidade genética foram similares nas duas espécies.

**Tabela 5-** Descrição do número de indivíduos ( $N$ ) utilizados na análise, do número de alelos ( $Na$ ), da riqueza alélica ( $Ra$ ), das heterozigosidades observada ( $H_o$ ) e a esperada ( $H_e$ ) e do valor de  $p$  do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $pHW$ ) para as duas espécies para os cinco locos de microssatélites analisados.

Loco	<i>Tayassu pecari</i>						<i>Pecari tajacu</i>					
	$N$	$Na$	$Ra$	$H_o$	$H_e$	$pHW$	$N$	$Na$	$Ra$	$H_o$	$H_e$	$pHW$
<b>Tpec3</b>	10	2	2,00	0,60	0,42	0,17	11	2	1,93	0,18	0,30	0,20
<b>Tpec4</b>	8	2	1,75	0,12	0,12	0,85	5	3	3,00	0,80	0,58	0,42
<b>Tpec5</b>	11	2	1,92	0,09	0,24	0,04	16	2	1,80	0,25	0,22	0,57
<b>Tpec16</b>	6	3	3,00	0,67	0,65	0,06	6	2	1,83	0,17	0,15	0,82
<b>SW444</b>	12	4	3,96	1,00	0,61	0,05	7	5	4,14	1,00	0,67	0,63
<b>Média (EP)</b>	9,40 (1,07)	2,60 (0,40)	2,52 (0,42)	0,50 (0,17)	0,41 (0,10)	-	9,00 (2,02)	2,80 (0,58)	2,54 (0,46)	0,48 (0,17)	0,38 (0,10)	-

Não foram observados desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg para ambas as espécies ( $p > 0,02$ , de acordo com a correção de Benjamini e Yekutieli, 2001; Tabela 5), com exceção do loco SW444 para *T. pecari* ( $p = 0,0034$ ). Isso pode ter ocorrido devido ao excesso de heterozigotos observado para este loco ( $H_o = 1,00$  e  $H_e = 0,61$ ). Não foi possível realizar o teste para o loco Tpec4 em queixadas e para o loco Tpec16 em catetos pelo fato de ambos os locos apresentarem apenas dois alelos e um deles ter sido manifestado apenas uma vez e em heterozigose. Nenhuma evidência para alelos nulos ou para outros erros de genotipagem (devido a *dropout* e *stuttering*) foi encontrada para os locos analisados em ambas as espécies. Também não houve desvio significativo ao equilíbrio de ligação nas duas espécies ( $p > 0,01$ , de acordo com a correção de Benjamini & Yekutieli, 2001).

O coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) obtido para queixadas foi de -0,16, variando de -0,62 (loco SW444) a 0,64 (loco Tpec5) e para catetos, de -0,18, variando de -0,42 (loco SW444) a 0,50 (loco Tpec3; Tabela 6). Para ambas as espécies, não houve evidência de  $F_{IS}$  positivo e significativamente diferente de zero, nem para a população como um todo ( $p > 0,02$ , de acordo com a correção de Benjamini & Yekutieli, 2001), nem para cada um dos locos analisados ( $p > 0,05$ ). O loco SW444 em queixadas apresentou um  $F_{IS}$  negativo e significativamente diferente

de zero ( $p = 0,01$ ), o que deve ter ocorrido pelo fato deste loco, como dito anteriormente, possuir um excesso de heterozigotos ( $H_o = 1,00$  e  $H_e = 0,61$ ).

**Tabela 6-** Valor do coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) para os cinco locos de microssatélites analisados para as duas espécies.

Locos	<i>Tayassu pecari</i>	<i>Pecari tajacu</i>
Tpec3	-0,38	0,50
Tpec4	0,00	-0,28
Tpec5	0,64	-0,11
Tpec16	0,07	0,00
SW444	-0,62	-0,42
Total	-0,16	-0,18

Os resultados dos testes de gargalo populacional para excesso de heterozigosidade estão apresentados na Tabela 7. Para catetos, não houve evidência de gargalo populacional recente para nenhum dos modelos assumidos (teste de Wilcoxon,  $p > 0,05$ ). Para queixadas, entretanto, para os modelos de IA e TP, os testes mostraram evidência de gargalo (teste de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ) enquanto para SM não (teste de Wilcoxon,  $p > 0,05$ ).

**Tabela 7-** Valores de  $p$  resultantes dos testes de Wilcoxon para excesso de heterozigosidade para cada um dos modelos assumidos: IA (*infinite alleles*), SM (*stepwise mutation*) e TP (*two-phase*). Para este último, foi assumida uma proporção de 70% de mutações pelo modelo SM (% de SM).

Espécie	Modelo	% de SM	$p$
<i>T. pecari</i>	IA	-	0,01
	SM	-	0,11
	TP	70	0,03
<i>P. tajacu</i>	IA	-	0,40
	SM	-	0,97
	TP	70	0,89

## 5. DISCUSSÃO

A população de queixadas e a população de catetos de Estação Ecológica de Caetetus (EEC) apresentaram níveis similares de diversidade genética, contrariando a hipótese inicial de que a diversidade seria maior em catetos do que em queixadas. Uma possível explicação para isso estaria relacionada a amostragem dos bandos de catetos. Além de terem sido amostrados poucos indivíduos por bando na maioria dos bandos amostrados, nem todos os bando presentes na EEC foram amostrados. Isso poderia ter aumentado as chances de alelos raros na população não terem sido amostrados.

Os níveis médios de diversidade genética obtidos neste estudo para queixadas (riqueza alélica = 2,39, heterozigosidade observada = 0,50 e heterozigosidade esperada = 0,41) foram similares aos obtidos por Rufo (2012) para os mesmos locos de microssatélites (riqueza alélica = 2,8, heterozigosidade observada = 0,42 e heterozigosidade esperada = 0,44). Vale ressaltar que Rufo (2012) estudou duas populações de queixadas do Pantanal Sul-matogrossense, em áreas tidas como bem conservadas e onde a espécie não é considerada ameaçada. Já em estudos anteriores, realizados para queixadas por Biondo et al. (2011) e para catetos por Cooper et al. (2010), os valores encontrados para riqueza alélica, e para heterozigosidade observada e esperada foram um pouco superiores do que os encontrados neste estudo. Biondo et al. (2011) encontraram, em duas populações de queixadas do Pantanal Sul-matogrossense e para sete locos microssatélites, riqueza alélica de 4,97, heterozigosidade observada de 0,59, e heterozigosidade esperada de 0,57. Cooper et al. (2010) encontraram em três populações de catetos do Texas (EUA) e para 11 locos microssatélites, riqueza alélica de 5,9, heterozigosidade observada de 0,61, e heterozigosidade esperada de 0,65, ao passo que neste estudo, foram encontrados valores de riqueza alélica de 2,54, heterozigosidade observada de 0,48 e heterozigosidade esperada de 0,38 para esta mesma espécie. Porém, deve-se ter cuidado ao comparar esses valores com os do presente estudo, pois os locos utilizados foram diferentes, tanto os do estudo de Cooper et al. (2010) quanto os do estudo de Biondo et al. (2012).

Ao contrário do que se esperaria para populações isoladas em fragmentos florestais e novamente contrariando a hipótese inicialmente proposta, não foi

encontrada evidência de endogamia para ambas as espécies. A ocorrência de endogamia pode estar associada à gargalos populacionais, que diminuem o número de indivíduos na população diminuindo também as possibilidades de acasalamento entre indivíduos não aparentados (FRANKHAM et al., 2008). *Pecari tajacu* não apresentou resultados positivos para gargalo populacional, portanto, na ausência de acasalamentos preferenciais, era de se esperar que não fossem encontradas evidências de endogamia. Além disso, o fato de haverem vários bandos da espécie na área e a possibilidade de fluxo gênico entre eles poderia diminuir as chances de eventos reprodutivos entre indivíduos aparentados.

Entretanto, *Tayassu pecari* apresentou evidência de gargalo recente para dois dos modelos de mutação testados (IA e TP). A ocorrência de gargalo em queixada, mas não em cateto pode estar de acordo com as diferenças comportamentais e ecológicas das espécies. As queixadas se movimentam pela paisagem em uma escala muito maior do que catetos (FRAGOSO, 1999), além de como dito anteriormente, possuírem uma área de vida maior (de 1.500 a 20.000 ha – KILTIE; TERBORH, 1983; FRAGOSO, 1998; CARRILO et al., 2002; KEUROGHLIAN et al., 2004; enquanto catetos apresentam área de vida de 50 a 700 ha – SOWLS, 1984; JUDAS; HENRY, 1999; KEUROGHLIAN et al., 2004). Por conta disso, as queixadas podem ter sofrido mais os impactos da fragmentação da área do que catetos, apresentando uma redução no tamanho populacional. A área da EEC é de 2.178 ha e, segundo Chiarello et al., (2000), reservas de ~2000 ha não são suficientemente grandes para manter populações de espécies de mamíferos de grande porte, como o caso das queixadas. Além disso, na EEC, o único bando de queixadas presente utiliza quase toda a área da Unidade (cerca de 85%, segundo KEUROGHLIAN et al., 2004). Pode ser então, que realmente fosse necessária uma área maior para que a população mantivesse suas necessidades ecológicas.

Outro fator que também poderia estar contribuindo para uma redução perceptível no tamanho populacional em queixadas, mas não em catetos, seria a caça; já que há registros de caça na área (TABANEZ et al., 2005) e de que catetos seriam mais resistentes a essa ameaça do que queixadas. Isso se deve ao fato de catetos não serem tão socialmente coesos como as queixadas (SOWLS, 1997), o que os torna menos susceptíveis à caça, pois menos indivíduos seriam mortos ao

mesmo tempo, ao contrário das queixadas em que já foi documentada a morte de 80 indivíduos de uma única vez durante um evento de caça (PERES, 1996).

Porém, embora tenha sido observado que as queixadas podem ter sofrido um gargalo populacional de fato, não houve evidência de endogamia para esta espécie. Isto poderia estar relacionado ao fato de estar sendo verificado um gargalo que ocorreu recentemente e pode ser que ainda não tenha dado tempo suficiente de aparecerem evidências da perda de heterozigotos na população relacionada à endogamia.

Assim, seria interessante saber em quantas gerações é possível notar mudanças significativas na diversidade genética em decorrência de eventos estocásticos para catetos e queixadas; pois pode ser que não tenham sido encontrados resultados como os esperados para pequenas populações, neste trabalho, apenas pelo fato de ainda ter dado tempo suficiente para que tais diferenças pudessem ser notadas. Além disso, os parâmetros genéticos podem variar de espécie para espécie dependendo do sistema de acasalamento, estrutura social, modo de distribuição e modo de dispersão (SILVA, 2007). Portanto, uma reamostragem na área (pelo menos 16 anos depois da primeira amostragem) seria de grande importância para entender o tempo e o número de gerações necessárias para que as mudanças na diversidade genética se manifestem nestas espécies.

Os resultados obtidos podem estar relacionados também com histórico que envolve a área de estudo. A ocupação do Estado de São Paulo ocorreu em função da chamada marcha do café, em direção ao interior (SILVA, 1990). Nos últimos 20 anos do século XIX, o oeste paulista, muito conhecido por suas terras férteis, já era uma região muito famosa pela grande produção de café, como é o caso das cidades do entorno da EEC (PEREIRA, 1990). A ocupação da região em função da agricultura cafeeira levou ao desmatamento de uma porção significativa de mata nativa, alterando as configurações da paisagem. Um dos grandes produtores de café da região na época era Olavo Amaral Ferraz, que comprou terras na chamada Fazenda Paraíso, atual EEC. Na época, a área adquirida foi de 3.028 alqueires (aproximadamente 7.315 ha). Pelo fato de Olavo ser um amante da caça esportiva ele deixou cerca de 30% (aproximadamente 2.187 ha) da mata inicial para que pudesse ser praticada a caça. Se for levado em consideração que o estudo foi realizado entre o período de 1994 a 1996, pode-se afirmar que a fragmentação

ocorreu a aproximadamente 67 anos daquela data. Quanto ao efeito da fragmentação, não se sabe ao certo se ela causou o isolamento das populações já nos primeiros anos; pois não se sabe se haviam restados fragmentos próximos que possibilitassem o fluxo de indivíduos entre esses fragmentos e a EEC. Apenas se sabe que houve uma redução da área de mata em relação ao total que foi adquirido por Olavo Ferraz. E em caso de ter havido mesmo esses fragmentos próximos, não se sabe até quando eles se mantiveram intactos e permitindo o fluxo gênico com a EEC.

Atualmente, sabe-se de um fragmento (Fazenda Rio Claro) com registro de presença de catetos (CULLEN et al., 2000) a aproximadamente 50 km em linha reta da EEC; porém, não se tem registro de que indivíduos da espécie sejam capazes de cruzar a matriz e chegar até este fragmento e vice-versa. Para queixadas, a situação é mais drástica, sendo que o fragmento mais próximo em que existe registro de sua ocorrência está a aproximadamente 160 km em linha reta da EEC (na Fazenda Barreiro Rico, ANTUNES; ESTON, 2009). Embora se saiba que queixadas andem em torno de 5-10 km por dia (ALTRICHTER et al., 2002; KILTIE; TERBORGH, 1983) e sejam capazes de manter fluxo gênico entre populações distantes em 80 km em linha reta em regiões bem conservadas (BIONDO et al., 2011), também não se tem registro de que esta espécie possa usar a matriz perturbada do entorno da EEC para chegar a outros fragmentos. Embora hoje a EEC seja considerada um fragmento isolado para estas espécies (A. Keuroghlian, Comunicação Pessoal), não se sabe até quando a matriz do entorno da Estação foi favorável ao fluxo gênico dessas espécies, por exemplo, com os fragmentos citados acima. Então, pode ser que o isolamento completo da área não tenha se dado imediatamente há 67 anos antes da data de amostragem, mas em um tempo mais atual, não permitindo ainda a identificação dos sinais genéticos relacionados à ausência de fluxo gênico e a redução no tamanho populacional.

É importante deixar claro que o fato de não ter sido evidenciado gargalo populacional em catetos e ocorrência de endogamia em ambas as espécies, não se pode afirmar que essas populações não estejam sofrendo com efeitos da fragmentação. Conforme discutido acima, pode não ter havido tempo suficiente para que essas evidências se manifestassem, ou ainda que a amostragem não tenha sido suficiente para que elas fossem detectadas.

De todo modo, este trabalho é um ponto de partida na avaliação da diversidade genética dos Tayassuídeos presentes na ECC e pode contribuir para um monitoramento genético de longo prazo destas populações; que se trata de uma comparação entre medidas obtidas através de dados coletados no passado com dados recentes, o que pode nos fornecer informações a cerca de mudanças na variabilidade genética ao longo do tempo (SCHWARTZ, 2007). Além disso, estudos avaliando a estrutura populacional genética dos fragmentos restantes no oeste paulista em que ainda se tem registro de catetos e queixadas e a EEC seriam de grande valia para verificar se essas populações encontram-se diferenciadas geneticamente ou não. Se não estiverem diferenciadas, as populações desses outros fragmentos podem ser fontes para a translocação de indivíduos para a EEC e vice-versa. Esse fluxo gênico artificial poderia manter ou mesmo melhorar os níveis de diversidade genética nessas populações.

## 6. CONCLUSÃO

Ambas as espécies apresentaram níveis similares de diversidade genética, contrariando a hipótese inicial de que catetos teriam uma diversidade maior do que queixadas. Esse resultado pode estar relacionado com a amostragem de poucos bandos de catetos, dentre os vários possivelmente existentes na área, e de poucos indivíduos por bando; o que pode ter aumentado as chances de alelos mais raros na população não terem sido amostrados.

Evidências de endogamia não foram detectadas para ambas as espécies. Em *Pecari tajacu*, isso pode ser resultado de não ter sido observada ocorrência de gargalo populacional, além do fato de haverem vários bandos na área o que diminui chances de acasalamentos entre indivíduos aparentados, se houver fluxo entre os bandos. Já *Tayassu pecari* apresentou evidência de gargalo recente, o que pode estar relacionado com sua maior vulnerabilidade a fragmentação e à caça, em relação aos catetos, por conta de suas características ecológicas e comportamentais (formação de bandos grandes e coesos e que necessitam de grandes áreas de vida para sobreviver). Entretanto, esta espécie não apresentou evidência de endogamia, o que pode estar relacionado ao fato de que foi testado um gargalo populacional recente e que ainda não tenha dado tempo suficiente de aparecerem evidências da perda de heterozigotos na população relacionada à endogamia.

O fato de não ter sido encontrada evidência de gargalo populacional em *Pecari tajacu* e endogamia em ambas as espécies, não leva a afirmação de que as populações não estejam sofrendo com o efeito da fragmentação. Como discutido anteriormente, pode apenas não ter havido tempo suficiente para que essas evidências se manifestassem, ou ainda que a amostragem não tenha sido suficiente para que elas fossem detectadas.

Este trabalho é um ponto de partida para estudos de diversidade genética e para o monitoramento genético de longo prazo destas populações na Estação Ecológica de Caetetus. E novos estudos seriam de grande importância para saber em quantas gerações é possível notar mudanças significativas na diversidade genética em decorrência de eventos estocásticos para catetos e queixadas. E, também para avaliar a estrutura populacional genética dos fragmentos restantes no oeste paulista em que ainda se tem registro de catetos e queixadas e a EEC, para

verificar se essas populações encontram-se diferenciadas geneticamente ou não, para que no futuro possa ser realizado o manejo genético destas espécies nestes fragmentos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTRICHTER, M.; ALMEIDA, R. Exploitation of white-lipped peccaries *Tayassu pecari* (Artiodactyla: Tayassuidae) on the Osa Peninsula, Costa Rica. *Oryx*, 36: 126-132. 2002.
- ANTUNES, A. Z.; ESTON, M., R. Mamíferos (Chordata: Mammalia) Florestais de médio e grande porte registrados em Barreiro Rico, Anhembi, e São Paulo, *Instituto florestal*. 21: 201-215. 2009.
- AWADE, M.; METZGER, J. P. Using gap-crossing capacity to evaluate functional connectivity of two Atlantic rainforest birds and their response to fragmentation. *Austral Ecology*, 33: 863-871. 2008.
- AZEVEDO, F. C. C.; CONFORTI, A. C.. Decline of peccaries in a protected subtropical forest of Brazil: toward conservation issues. *Mammalia*, 72: 82-88. 2008.
- BECK, H. A review of peccary-palm interactions and their ecological ramifications across the Neotropics. *Journal of Mammalogy*, 87: 519–530. 2006.
- BENJAMINI, Y.; YEKUTIELI, D. The control of false discovery rate under dependency. *Annals of Statistics*, 29: 1165-1188. 2001.
- BIGLER, W. J. Seasonal movements and activity patterns of the collared peccary. *Journal of Mammalogy*, 55: 851-855. 1974.
- BODMER, R.E. Responses of ungulates to seasonal inundations in the Amazon flood plain. *Journal of Tropical Ecology*, 6: 191–201. 1990.
- BODMER, R. E. Strategies of seed dispersal and seed predation in Amazonian ungulates. *Biotropica*, 23: 255–261. 1991.
- BODMER, R.E.; SOWLS, L.K. The Collared Peccary (*Tayassu tajacu*). Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Conservation Action Plan. Disponível em <http://www.iucn.org/themes/ssc/sgs/pphsg/APchap2-2.htm>> Acesso em: 15 de janeiro 2011. 1993.
- BIONDO, C.; KEUROGHLIAN, A.; GONGORA, J. & MIYAKI, C. Y. Population genetic structure and dispersal in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) from the Brazilian Pantanal. *Journal of Mammalogy*, 92(2):267–274. 2011.
- BOUTIN-GANACHE, I.; RAPOSO, M.; RAYMOND, M.; DESCHEPPER, C. F. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques*, 31: 24-27. 2001.

- BROOKS, T.M., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., da FONSECA, G.A.B., RYLANDS, A.B., KONSTANT, W.R., FLICK, P., PILGRIM, J., OLDFIELD, S., MAGIN, G., HILTON-TAYLOR, C. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology*, 16: 909–923. 2002.
- CALAÇA, A. M. A utilização da paisagem fragmentada por mamíferos de médio e grande porte e sua relação com a massa corporal na região do entorno de Aruanã, Goiás. 2009. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução), Universidade Federal de Goiás, Goiás. 2009.
- CAPOBIANCO, J.P.R. Dossiê Mata Atlântica, Instituto Socioambiental. 1: 286-305. 2001.
- CARRILLO, E.; SAENZ, J. C.; FULLER, T. K. Movements and activities of white-lipped peccaries in Corcovado National Park, Costa Rica. *Biological Conservation*, 108: 317-324. 2002.
- CEBALLOS, G.; EHRLICH, P.R. Global mammal distributions, biodiversity hotspots, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 19374–19379. 2006.
- CHIARELLO, A.G. Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammal communities in south-eastern Brazil. *Biological Conservation*, 89: 71–82. 1999.
- COOPER, J. D., et al. Quantifying male-biased dispersal among social groups in the collared peccary (*Pecari tajacu*) using analyses based on mtDNA variation. *Heredity*, 104:79–87. 2010.
- CORNUET, J.M.; LUIKART G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001-2014. 1996.
- CULLEN JR., L.; BODMER, R. E.; PADUA, C. V. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. *Biological Conservation*, 95: 49-56. 2000.
- CULLEN Jr., L.; BODMER, R.E., VALLADARES-PÁDUA, C. Ecological consequences of hunting in Atlantic forest patches, São Paulo, Brazil. *Oryx*, 35: 137–144. 2001.
- CULLEN Jr., L.; BODMER, R.E.; VALLADARES-PÁDUA, C., BALLOU, J.D. *Mammalian densities and species extinctions in Atlantic forest fragments*. In: Silvius, K.M., Bodmer, R.E., Fragoso, J.M. (Eds.), *People in Nature: Wildlife Conservation in South and Central America*. Columbia University Press, New York, 1: 211–226. 2004.

- DALLA VECCHIA, A. C. D.; BIONDO, C.; SANCHES, A.; KEUROGHLIAN, A.; MYAKI, C. Y.; GALETTI JR, P. M.; GALETTI, M. Isolation and characterization of microsatellite loci for white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and cross-amplification in collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Conservation Genetics Resources*, 3: 151-154. 2011.
- DESBIEZ, A. L. J.; KEUROGHLIAN, A.; BEISIEGEL, B. M.; MÉDICI, E. P.; GATTI, A.; PONTES, A. R. M.; CAMPOS, C. B.; TÓFOLI, C. F.; MORAES, E. A. Jr.; AZEVEDO, F. C.; PINHO, G. M.; CORDEIRO, J. L. C.; SANTOS, T. S. Jr.; MORAIS, A. A.; MANGINI, P.R.; FLESHER, K.; RODRIGUES, L. F.; ALMEIDA, L. B. Avaliação do risco de extinção do cateto Pecari tajacu Linnaeus, 1758, no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, 3: 74-83. 2012.
- DI RIENZO, A., PETERSON, A. C., GARZA, J. C., VALDES, A. M., SLATKIN, M., FREIMER, N. B. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91: 3166-3170.1994.
- ELLISOR, J. E.; HARWELL, W. E. Mobility and home range of collared peccary in southern Texas. *Journal of Wildlife Management*, 33: 425-427. 1969.
- FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology. Evolution and System*, 34: 487- 515. 2003.
- FRAGOSO, J. M. V. Home range and movement patterns of white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) herds in the northern Brazilian Amazon. *Biotropica*, 30: 458-469. 1998.
- FRAGOSO, J. M. V. Perception of scale and resource partitioning by peccaries: Behavioral cases and ecological implications. *Journal of Mammalogy*, 80: 993–1003. 1999.
- FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies*, 326: S22-S29. 2003.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto, SP: SBG (Sociedade Brasileira de Genética). Título em inglês: *A Primer of Conservation Genetics*. Tradução de M. R. Francisco e I. P. Farias. Organização P. M. Galetti Jr. 2008.
- FREELAND, J. R. Molecular Markers in Ecology. *Molecular Ecology*. Chichester. John Wiley & Sons. 1: 1-287. 2005.
- GALETTI, M.; H. GIACOMINI; R. S. BUENO; C. S. S. BERNARDO; R. M. MARQUES; R. S. BOVENDORP; C. E. STEFFLER; P. RUBIM; S. K. GOBBO; C. I. DONATTI; R. A. BEGOTTI; F. MEIRELLES; R. A. NOBRE; A. G. CHIARELLO & C. A. PERES. Priority areas for the conservation of Atlantic forest large mammals. *Biological Conservation*, 142: 1229–1241. 2009.

- GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. *The Atlantic forest of South America: Biodiversity Status. Threats and Outlook*. Island Press, Washington. 2003.
- GOTTDENKER, N.L.; BODMER, R.E. Reproduction and productivity of white-lipped and collared peccaries in the Peruvian Amazon. *Journal of Zoology*, 245: 423-430. 1998.
- GOUDET, J. 2002. FSTAT, version 2.9.3.2. University of Lausanne, Lausanne, Switzerland. [www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html](http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html). Acessado em abril de 2012.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. *Mapa de vegetação do Brasil*. Escala 1: 50.000. Brasília, DF. 1988.
- JUDAS, J.; HENRY, O. Seasonal variation of home range of collared peccary in tropical rain forests of French Guiana. *Journal of Wildlife Management*, 63: 546-555. 1999.
- KEUROGHLIAN, A.; EATON, D. P.; LONGLAND, W. S. Area use by white-lipped and collared peccaries (*Tayassu pecari* and *Tayassu tajacu*) in a tropical forest fragment. *Biological Conservation*, 120: 411-425. 2004.
- KEUROGHLIAN, A.; EATON D. P. Fruit availability and peccary frugivory in an isolated Atlantic forest fragment: effects on peccary ranging behavior and habitat use. *Biotropica*: 40:62-70. 2008.
- KEUROGHLIAN, A.; EATON, D.P. Removal of palm fruits and ecosystem engineering in palm stands by white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and other frugivores in an isolated Atlantic Forest fragment. *Biodiversity and Conservation*. 18 (7), 1733-1750. 2009.
- KEUROGHLIAN, A.; DESBIEZ, A. L. J.; BEISIEGEL, B. M.; MÉDICI, E. P.; GATTI, A.; PONTES, A. R. M.; CAMPOS, C. B., TÓFOLI, C. F.; MORAES, E. A. Jr.; AZEVEDO, F. C.; PINHO, G. M.; CORDEIRO, J. L. C.; SANTOS, T. S. Jr.; MORAIS, A. A.; MANGINI, P.R.; FLESHER, K.; RODRIGUES, L. F.; ALMEIDA, L. B. Avaliação do risco de extinção do Queixada *Tayassu pecari* Link, 1795, no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*. 3: 84-102. 2012.
- KILTIE, R. A. Stomach contents of rain forest peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*). *Biotropica*, 13: 234–236. 1981.
- KILTIE, R. A.; TERBORGH, J. Observations on the behavior of rainforest peccaries in Peru: why white-lipped peccaries form herds. *Zeit Tierpsychology*, 62: 241-255. 1983.
- KIMURA, M. Attainment of quasi-linkage equilibrium when gene frequencies are changing by natural selection. *Genetics*. 52: 875–890. 1965.

- KIMURA, M.; OHTA, T. Distribution of allelic frequencies in a finite population under stepwise production of neutral alleles. *Genetics*, 72: 2764-2764. 1975.
- MAYER, J. J.; BRANDT, P. N. *Identity, distribution, and natural history of the peccaries, Tayassuidae*. In: Mammalian biology in South America (Ed. by M. A. Maies & H. H. Genoway). Linesville: Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh, 1: 433-455. 1982.
- MAYER, J.; WETZEL, R. *Tayassu pecari*. *Mammalian Species*, 293: 1-7. 1987.
- MCNAB, B.K. Bioenergetics and the determination of home range size. *American Naturalist*, 97: 133-140. 1963.
- MAZZOLLI, M. Persistência e riqueza de mamíferos focais em sistemas agropecuários no planalto meridional brasileiro. 105f. Tese (Doutorado em Ecologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. . 2006.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853–858. 2000.
- NOWAK, D. M.; PARADISO, J. L. *Walker's Mammals of the World*. 2<sup>nd</sup> ed. The John Hopkins University Press, EUA. 1983.
- OLDENBURG, P.W.; ETTESTAD, P. J.; GRANT, W. E. & DAVIS, E. D. Size, overlap, and temporal shifts of the collared peccary herd territories in South Texas. *Journal of Mammalogy*, 66: 378-380. 1985.
- OLIVER, W.L.R. Pigs, peccaries and hippos. IUCN, Gland, Switzerland. 1: 202 . 1993.
- ORME, C.D.L.; DAVIES, R.G.; BURGESS, M.; EIGENBROD, F.; PICKUP, N.; OLSON, V.A.; WEBSTER, A.J.; DING, T.S.; RASMUSSEN, P.C.; RIDGELY, R.S.; STATTFIELD, A.J.; BENNETT, P.M.; BILACKBURN, T.M.; GASTON, K.J.; OWENS, I.P.F. Global hotspots of species richness are not congruent with endemism or threat. *Nature*, 436: 1016–1019. 2005.
- PARDINI R.; SOUZA S. M.; BRAGA-NETO R.; METZGER J. P. The role of forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. *Biology Conservation*, 124: 253-66. 2005.
- PAINTER, L. R. E. Gardeners of the forest: Plant-animal interactions in a Neotropical forest ungulate community. Dissertation (Ph. D.). University of Liverpool, Liverpool, UK. 1998.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295. 2006.

- PEREIRA, V. A. Formação política de Marília: terra e poder na frente pioneira paulista (1924 - 1937). 232 f. Dissertação (Mestrado em História) - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Assis. 1990.
- PERES, C. A. Primate responses to phenological changes in an Amazonian terra-firme forest. *Biotropica* 26: 98–112. 1994.
- PERES, C.A., Population status of white-lipped *Tayassu pecari* and collared peccaries *Tayassu tajacu* in hunted and unhunted Amazonian forests. *Biological Conservation*, 77: 115-123. 1996.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; COURNUET, J.M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90: 502– 503. 1999.
- RAYMOND M.; ROUSSET F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249. 1995.
- REDFORD, K.H.; ROBINSON, J.G. *Park size and the conservation of forest mammals in Latin America*. In: Mares, M.A., Schmidly, D.J. (Eds.), *Latin American Mammalogy, History, Biodiversity, and Conservation*. University of Oklahoma Press, Norman, OK and London, 1: 227-234. 1991.
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.; HIROTA, M.M. Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142: 1141–1153. 2009.
- ROHRER, G.A; ALEXANDER, L. J.; KEELE, J.W.; SMITH, T. P.; BEATTIE, C. W.. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics*, 136: 231-245. 1994.
- SHAW P.W.; PIERCE G.J.; BOYLE P.R. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 8: 407–417. 1999.
- SCHWEINSBURG, R. E. Home range, movements and herd integrity of the collared peccary. *Journal of Wildlife Management*, 35: 455-460. 1971.
- SILMAN, M. R.; TERBORGH, J. W. & KILTIE, R.A. Population regulation of a dominant rain forest tree by a major seed predator. *Ecology*, 84: 431–438.
- SILVA, F. *Mamíferos silvestres do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. 1984.
- SILVA, L. M. O. A lei da terra – um estudo sobre a história da propriedade da terra no Brasil. 558 f. Tese (Doutorado em Ciências Sociais) - Faculdade de Ciências Sociais, Pontifícia Universidade Católica, São Paulo. 1990.

- SILVA, A.G. Causes of spatial genetic structure in mammals: a case study in the Atlantic forest. 196 f. Tese (Doutorado em Filosofia) – Columbia University, New York. 2007.
- SOWLS, L. K. *The peccaries*. Tucson, Arizona: The University of Arizona Press. 1984.
- SOWLS, L. K. Javelinas and other peccaries: their biology, management, and use. Texas A e M University Press. College Station. 20: 325 . 1997.
- SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; WAPLES, R. S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *TRENDS in Ecology and evolution*. 22 (1): 25-33. 2007.
- TABANEZ, M. F. *et al. Plano de Manejo da Estação Ecológica dos Caetetus*. São Paulo: Instituto Floretal, São Paulo, 29: 1-104. 2005
- TABARELLI, M.; BAIDER C. & MANTOVANI W. Efeitos da fragmentação na floresta Atlântica da bacia de São Paulo. *Hoehnea*, 25: 169-186. 1998.
- TABERLET P.; GRIFFIN S.; GOOSSENS B. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 24: 3189–3194. 1996.
- TAYLOR P. D.; FAHRIG L.; HENEIN K.; MERRIAM G. Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos*, 68: 571-3. 1993.
- URBAN, D. L.; SHUGART JR, H. H. Avian demography in mosaic landscapes: modeling paradigm and preliminary. In: *Wildlife 2000. Modeling Habitat Relationships of terrestrial Vertebrates* (eds M. L. VERNER; M. L. MORRINSON & C. J. RALPH). The University of Wisconsin Press Madison, WI, 1: 273-279. 1986.
- WANDELER, P.; SMITH, S.; MORIN, P.A.; PETTIFOR, R.A.; FUNK, S.M. Patterns of nuclear DNA degeneration over time — a case study in historic teeth samples. *Molecular Ecology*, 12: 1087–1093. 2003.
- WILLIS, E. O. The composition of avian communities in remanescent woodlots in southern Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 33: 1-25. 1979.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538. 2004.