
Ciências Biológicas

FLÁVIA MARIA APPOLINÁRIO DA SILVA

**ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
QUEIXADAS (*TAYASSU PECARI*) DA REGIÃO
DO TABOCO (CORGUINHO, MS)**



Rio Claro - SP
2012

FLÁVIA MARIA APPOLINÁRIO DA SILVA

ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE QUEIXADAS
(*TAYASSU PECARI*) DA REGIÃO DO TABOCO (CORGUINHO, MS)

Orientador: Profa. Dra. Cibeles 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
Licenciatura e Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2012

591.15 Silva, Flávia Maria Appolinário da
S586e Estimativa da diversidade genética de queixadas (*Tayassu pecari*) da região do Taboco (Corguinho, MS) / Flávia Maria Appolinário da Silva. - Rio Claro : [s.n.], 2012
35 f. : il., figs.

Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de
Rio Claro

Orientador: Cibele Biondo

Co-Orientador: Mauro Galetti Rodrigues

1. Genética animal. 2. *Tayassu pecari*. 3. Fragmentação. 4.
Diversidade genética. I. Título.

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

“O segredo é não correr atrás das borboletas, é cuidar do seu jardim para que elas venham até você.

No final das contas, você vai achar não quem você estava procurando, mas quem estava procurando por você.”

(Mário Quintana)

Dedico este trabalho as três Marias da minha vida:

Maria das Dores, que sempre me mostrou o quanto é importante lutar pelos seus sonhos;

Camila Maria, por estar sempre ao meu lado;

e Maria Eugenia Conti por me ensinar mesmo depois da sua partida que é importante ter fé na vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por te colocado anjos em minha vida que sempre me ajudaram.

À minha mãe, por ter sido minha mãe, meu pai, minha amiga durante toda a minha vida. Essa conquista é nossa. Amo-te.

À minha irmã Camila, por estar pertinho de mim e por termos aprendido muito com as brigas e conversas. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Aos meus tios Geni e José, os meus primos Cristian e Patrick e aos meus avós Maria e Paulo. Pois a família é o bem mais precioso que temos.

À Irla, minha irmã de alma. Obrigada por todos os momentos juntas, por ter me ensinado tanto e porque juntas descobrimos que nossa amizade é forte a tudo. Tudo mesmo.

À Jana por continuar sendo minha amiga, mesmo passando tanto tempo longe de mim, obrigada por fazer a minha vida mais feliz. Ao Robinho e ao Cinquinho, por serem amigos tão fiéis, carinhosos e preocupados comigo. E à Dani por ter compartilhado um ano de mudança que não conseguiria enfrentar sozinha. Amo vocês, meus amores.

À Camila Ribeiro e Vivi pela alegria e fé que contagia a minha vida. À Jéssica por ter sido uma ótima companhia me ajudando a amenizar o estresse do dia-a-dia. Vocês são lindas, amo vocês.

À Carol Gazoni por termos aprendido a conviver com as diferenças e com isso criamos uma boa relação, onde conseguimos trocar alegrias e tristezas.

À Aline Fernanda, Fernanda Damasceno e Marina Yumi, por terem me acolhido tão bem no grupo delas. Conhecer vocês deixou a minha vida mais alegre, com certeza. Ao André Vargas, por sempre me tratar tão bem e por fazer minha amiga feliz.

À Livia Tonelli, por ter me conquistado com sua alegria.

À Laís Alvarez por ter compartilhado momentos de angustias e medos nessa nova fase que estamos entrando, por ser uma amiga carinhosa e sempre disposta a ajudar. Amo-te muito.

À Tatiane Abe, companheira de festinhas e tentativas de caminhada e amiga, me ajudando sempre que eu precisava. À Amanda Barbosa por ser uma menina muito doce e dedicada, que me inspira. Vou sentir muita falta de vocês.

À Laís Nunes que entrou sem querer na minha vida e se tornou muito importante. À Luciana Eugênio que sempre foi tão presente na minha vida, até mesmo quando eu não percebia a amiga maravilhosa que ela é.

À Tarcila, Adriana e Mariana, amigas fiéis que sempre estiveram ao meu lado mesmo tão distante, e por me dar a certeza que não estou sozinha.

À Laura Pigossi e Fernanda Uliano, por fazer da minha infância a melhor de todas, vocês não imaginam a falta que me fazem.

À Naila Pigossi e Celina, por toda ajuda que me deram durante toda a minha vida. E ao Dr. Nelson, uma pessoa impossível de esquecer.

À minha querida orientadora Cibele Biondo, por ter sido tão presente mesmo longe, por toda dedicação, carinho, amizade e preocupação.

À Mariana Sayuri pela sua alegria que contagia, por me ajudar sempre que eu precisava (e olha que foram muitas vezes), pela sua dedicação que me inspira. Obrigada, você foi essencial nessa minha conquista.

À todas as pessoas que estão e passaram pelo LABEMIM e LABIC, pois o convívio com as pessoas são essenciais na formação de qualquer pessoa, com elas pude aprender muito, obrigada.

À Alexandra Sanches, um exemplo de pesquisadora e profissional, se eu tiver um pouquinho da sua garra e dedicação com aquilo que você faz, já fico feliz. Torço muito por você.

Ao professor Mauro Galetti por ter aceitado assinar a minha primeira bolsa, fazendo com que me abrisse muitas portas. E também por me co-orientar neste trabalho.

À professora Patrícia Parise, por ter sido minha primeira orientadora e ter me aceitado de braços abertos.

À Alexine, mesmo sem me conhecer, foi essencial na minha pesquisa, cedendo as amostras e dando sugestões pertinentes nas primeiras versões do projeto.

Ao Danilo Rufo, por ter cedido dados para a conclusão do meu TCC.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa. E à WCS-Brasil pelo financiamento de parte do projeto.

A todos os funcionários da UNESP: do departamento de Ecologia, da Biblioteca, do STI, as mulheres da limpeza, do RU, da cantina, da seção de Graduação, a Ciça da Vice-diretoria, a Mônica da Diretoria, Odair do SAEPE,

peessoas que estão tão presentes na nossa vida e às vezes não percebemos a importância deles.

À Comissão de Formatura, pelo convívio, risadas e aprendizados. Ao Centro Acadêmico da Biologia que foi essencial na minha formação como cidadã. E a minha turma de Ciências Biológicas (noturno) por cada momento que passamos juntos.

À moradia por ter me ensinado a conviver com as pessoas. Em especial a casa 6, onde conheci os meus melhores amigos e a casa 2 que me acolheu tão bem.

Aos meus professores: Euri, Mirtes, Marquinhos, Pascoal, Marcelo, Carla Beatriz, Janina, Olivia de Carle, Olivia Borges, Áída Furtado, Angela Lovizio, Daniela Teixeira, Iracema, pois os professores são essenciais na vida de qualquer pessoa. Em especial a professora Lúcia Fraga, que me abriu portas e ao professor Maurício que me fez sonhar. E a todos os professores que passaram até hoje pela minha vida.

Aos meus queridos amigos do Ensino Médio, que estão para sempre nas minhas melhores lembranças.

E a todos que não pude citar e que estiveram presente na minha vida. Cada um tem um lugarzinho no meu coração.

E hoje depois de cinco anos, vejo que foram os anos mais difíceis da minha vida, mas também foram os melhores.

RESUMO

A fauna brasileira vem sendo constantemente ameaçada pelos desmatamentos e fragmentação das florestas. Em decorrência disso, muitas populações se tornam isoladas e pequenas o que pode trazer impactos na diversidade genética das mesmas, tornando-as mais propensas a extinção do que populações grandes e estáveis. Nesse trabalho, foi estimada a diversidade genética de queixadas (*Tayassu pecari*) na região do Taboco, Corguinho (MS), uma área fragmentada; e as estimativas geradas foram comparadas com estimativas prévias obtidas para duas populações do Pantanal Sul-Matogrossense, bioma considerado mais bem preservado e onde a espécie não está ameaçada. Um total de 18 amostras de sangue e de 72 de pelos tiveram seu DNA extraído e amplificado para cinco locos polimórficos de microssatélites. Uma vez identificados os indivíduos, estimativas de indicadores de diversidade genética (como número de alelos, riqueza alélica, heterozigosidades esperada e observada) e o coeficiente de endogamia F_{IS} foram calculados. Além disso, para verificar se as populações passaram por gargalo populacional recente, foram utilizados os testes implementados no programa Bottleneck. A população analisada da região do Taboco não apresentou evidências de gargalo populacional recente ($p > 0,05$) e nem de estar sofrendo com a endogamia ($F_{IS} = 0,008$; $p > 0,022$). Além disso, os níveis de diversidade genética nesta população (número médio de alelos = 2,60; riqueza alélica média = 2,56; heterozigosidades observada e esperada médias = 0,45 e 0,47, respectivamente) foram estatisticamente similares aos encontrados previamente para as duas populações do Pantanal Sul-Matogrossense ($p > 0,05$); embora a região do Taboco seja mais impactada e a do Pantanal mais preservada. O fato de não ter sido evidenciada perda de diversidade genética não significa que a população não esteja sofrendo com a fragmentação. O que pode estar ocorrendo é que não houve tempo suficiente para que as mudanças pudessem ser detectadas ou que esteja havendo fluxo gênico com populações de fragmentos próximos, o que manteria os níveis de diversidade. Assim, medidas de conservação tanto do habitat, quanto da espécie devem ser implantadas visando manter os níveis de diversidade genética observados.

Palavras-chave: *Tayassu pecari*, fragmentação, diversidade genética

ABSTRACT

The Brazilian fauna has been constantly threatened by deforestation and forest fragmentation. As a result, many populations become isolated and small which negatively impacts their genetic diversity, putting them at a higher risk of extinction than large and stable populations. The aim of this work was to estimate the genetic diversity of white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) in the region of Taboco (Corguinho, MS), a fragmented area; and to compare these estimates with that obtained previously for two populations from Brazilian Pantanal, which is considered a relatively well-preserved biome and where the species is not threatened. A total of 18 blood and 72 hair samples of white-lipped peccaries had their DNA extracted and amplified for five polymorphic microsatellite loci. With the individuals identified, genetic diversity indicators (such as number of alleles, allelic richness, expected and observed) and the inbreeding coefficient F_{IS} were calculated. In addition, to verify if the population suffered a recent population bottleneck, we used the tests implemented in the program Bottleneck. The population of Taboco showed no evidence of recent population bottleneck ($p > 0.05$) or inbreeding ($F_{IS} = 0.008$; $p > 0.022$). In addition, the levels of genetic diversity in this population (mean number of alleles = 2.60; mean allelic richness = 2.56 mean observed and expected heterozygosities = 0.45 and 0.47, respectively) were statistically similar to those found previously for the two populations from Pantanal ($p > 0.05$); although the region of Taboco is more impacted than the Pantanal. Even though we showed no evidence of loss of genetic diversity, it does not mean that the population is not suffering with fragmentation; but that there was not sufficient time to evidence the genetic changes. In addition, may be occurring gene flow with populations of nearby fragments, which is maintaining the levels of diversity. Therefore, conservation actions should be implemented to maintain the levels of genetic diversity observed to this species in the area.

Keywords: *Tayassu pecari*, fragmentation, genetic diversity.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
1.1 Caracterização da espécie.....	11
2. Objetivo.....	14
3. Metodologia.....	15
3.1 Área de estudo.....	15
3.2 Amostragem e procedimento laboratorial.....	15
3.3. Análises de dados.....	18
4. Resultados.....	20
4.1 Sucesso de amplificação e genotipagem e identificação individual das amostras.....	20
4.2 Estimativa de diversidade genética, endocruzamento e gargalo populacional recente.....	21
5. Discussão.....	24
6. Conclusões.....	26
7. Referências.....	27

1. Introdução

Grande parte da fauna brasileira vem sendo constantemente ameaçada pelos desmatamentos e fragmentação das florestas. Tais ameaças ocasionam perda e mudança na configuração do habitat (Fahrig, 2003). A configuração do habitat ou sua alteração influencia na presença, abundância (Verboom *et al.*, 1991; Villard *et al.*, 1995), movimento (Sutcliffe e Thomas, 1996) e persistência (Hanski *et al.*, 1995) das espécies. A preocupação com essas alterações é maior em relação aos mamíferos de grande e médio porte que necessitam de grandes áreas para sobreviver e são mais suscetíveis à caça (Pardini *et al.*, 2006). Isso porque, com a fragmentação do habitat, suas populações também se tornam fragmentadas, o que pode trazer impactos na diversidade genética dessas populações. A extensão desse impacto depende de alguns fatores, tais como: número de populações fragmentadas, distribuição geográfica dessas populações, distância entre os fragmentos, habilidade de dispersão das espécies e taxa de extinção e recolonização nos fragmentos (Frankham *et al.*, 2004). Com a fragmentação, o tamanho populacional pode se tornar reduzido, o que coloca em risco a sobrevivência da população; já que populações pequenas ou em declínio são mais propensas a extinção do que populações grandes e estáveis (Frankham *et al.*, 2004).

O efeito gargalo, que é a redução drástica do tamanho de uma população, pode ocasionar perda de diversidade genética. Somado a isso, a ação da deriva genética, que é mais pronunciada em populações pequenas, pode levar tanto a fixação quanto à perda de alelos reduzindo ainda mais a diversidade genética (Primack e Rodrigues, 2001; Frankham *et al.* 2004). Outro aspecto importante a ser considerado, é que a redução no tamanho populacional aumenta as chances de endogamia (cruzamento entre parentes próximos). Em populações grandes existem mecanismos que evitam a endogamia, como por exemplo, a dispersão dos indivíduos do seu local de nascimento e a inibição de cruzamento entre parentes devido à emissão de odores; entretanto, em populações pequenas a endogamia é inevitável devido às poucas possibilidades de acasalamento (Primack e Rodrigues, 2001). O acasalamento entre parentes próximos reduz a variabilidade genética da população e pode levar à depressão endogâmica, que é frequentemente caracterizada por uma redução no número e na viabilidade da prole produzida (Ralls

et al., 1988); já que alelos nocivos presentes na geração parental podem ser mais facilmente herdados pela prole neste caso (Barret e Kohn, 1991).

Assim, populações que estão em risco de extinção podem ter sofrido gargalo populacional no passado e/ou passaram um longo período com tamanho populacional pequeno e estão mais sujeitas à ação da deriva genética e à endogamia, o que diminui sua diversidade genética. Todos esses fatores reduzem o potencial de evolução da população, deixando-a mais vulnerável a flutuações demográficas devido a variações nas taxas de mortalidade e nascimento; e a flutuações ambientais devido a variações na pressão de predação, competição, incidências de doenças, suprimimentos de alimentos e catástrofes naturais (Primack e Rodrigues, 2001; Frankham *et al.* 2004). Segundo Spielman *et al.* (2004), são poucos os casos em que uma população se extingue sem antes sofrer impactos de fatores genéticos.

Portanto, é de extrema importância estimar a ocorrência de gargalos no passado e medidas de taxa de endogamia e diversidade genética para que se possam realizar planos de manejo e conservação adequados (Frankham 2003). Para a realização de tais estimativas, podem ser utilizados os marcadores moleculares. Neste projeto, serão utilizados os marcadores microsatélites (Tautz e Renz, 1984; Tautz, 1989), que são sequências de DNA repetitivo “*em tandem*”, com unidades de repetição muito curtas, de 2 a 6 nucleotídeos, como por exemplo, CA, CAAC, GGAACC. Nesses marcadores, a variação se dá no número de repetições dessas unidades (Queller *et al.*, 1993). São marcadores bastante indicados para identificação individual e estimativas de diversidade genética, que são os objetivos deste estudo, por serem muito polimórficos, tendendo a ter muitos alelos e alta taxa de heterozigosidade (Queller *et al.*, 1993).

1.1. Caracterização da espécie

As queixadas (*Tayassu pecari*) são conhecidas popularmente como porcos do mato e estão classificadas em uma família distinta da dos porcos domésticos devido a diferenças morfológicas e genéticas (Silva, 1984). Pertencem à família Tayassuidae (Ordem Cetartiodactyla, Classe Mammalia) e distribuem-se geograficamente desde o sul do México até o norte da Argentina (Mayer e Wetzel, 1987). Vivem em bandos que podem exceder 100 indivíduos ocupando áreas de

vida de 1.500 a 20.000 hectares (Altrichter e Almeida, 2002; Keuroghlian *et al.*, 2004).

Os adultos podem medir 1,11 m de comprimento e de 0,40 a 0,50 m de altura e apresentam a pelagem das costas com uma coloração negro-parda, com uma grande quantidade de pêlos brancos nas mandíbulas e focinho (Fig. 1; Sows, 1984; Keuroghlian e Desbiez, 2010). A espécie é considerada nos trópicos como preferencialmente frugívora (Desbiez *et al.*, 2009; Keuroghlian e Eaton, 2009), embora possa se alimentar de invertebrados em determinadas situações (Altrichter *et al.*, 2001). Queixadas desempenham uma importante função ecológica, sendo predadoras de sementes e dispersoras em potencial (Keuroghlian e Eaton, 2008) e, também, parte da dieta de grandes felinos (Cavalcanti e Geese, 2010); por esse motivo, o seu declínio pode interferir na sobrevivência de outras espécies.



Figura 1 – Representação da queixada (*Tayassu pecari*).

As queixadas são vulneráveis ao impacto da caça e uma possível explicação para isso é que seus bandos costumam ser bastante coesos (Cullen *et al.*, 2000) e, quando ameaçadas, se juntam e enfrentam ao invés de fugirem prontamente (Fragoso, 1994). Por viverem em bandos grandes e que necessitam de uma área grande para sobreviver, as queixadas também estão sujeitas aos impactos da fragmentação florestal (Redford e Robinson, 1991; Lovejoy *et al.*, 1986; Chiarello *et al.*, 1999; Keuroghlian *et al.*, 2004).

Embora as queixadas não estejam classificadas pela IUCN como ameaçadas de extinção, suas populações vêm declinando e extinções locais estão ocorrendo (Chiarello *et al.*, 1999, Cullen Jr *et al.*, 2000, Azevedo e Conforti, 2008, Galetti *et al.*, 2009). Recentemente, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) as classificou como vulneráveis no Brasil como um todo. Em alguns biomas, a situação é mais delicada: na Mata Atlântica, foram classificadas como criticamente ameaçadas e no Cerrado (que é o bioma foco deste estudo), como ameaçadas (Keuroghlian *et al.*, 2012), além de ter poucos estudos nesse bioma. Este cenário demonstra a necessidade de elaboração de planos de manejo para a conservação desses animais. E a avaliação da diversidade genética de suas populações teria uma aplicação direta na elaboração adequada de tais planos.

Até o momento, poucos estudos avaliaram o grau de diversidade genética de populações naturais de queixadas. Como exemplo, podemos citar o estudo de Biondo *et al.* (2011) que encontrou diversidade alélica de 5,0 e heterozigosidades médias observada e esperada de 0,59 e 0,58, respectivamente, em duas populações de queixadas do Pantanal da Nhecolândia, região onde a espécie ainda não é tida como ameaçada, para sete locos de microssatélites.

2. OBJETIVO

Esse estudo teve como objetivo estimar a diversidade genética (número de alelos, riqueza alélica, heterozigosidades esperada e observada), o grau de endogamia e avaliar a possível ocorrência de gargalo populacional recente em uma população de queixadas (*Tayassu pecari*) da região do Taboco, município de Corguinho – MS, localizada no planalto que circunda a bacia Pantaneira.

Como a região do Taboco é bastante impactada por atividades humanas e pertence ao bioma Cerrado, em que a espécie é classificada como ameaçada, esperava-se encontrar evidências de gargalo populacional recente e endogamia, além de baixos níveis de diversidade genética. Para verificar se os índices de diversidade obtidos realmente eram baixos, as estimativas geradas foram comparadas com as estimativas de Rufo (2012) para duas populações do Pantanal Sul-Matogrossense, bioma considerado mais bem preservado e onde a espécie não está ameaçada.

Por fim, espera-se que os dados aqui gerados possam ser úteis para determinar a fragilidade dessa população bem como para elaboração de planos de manejo e conservação adequados para a espécie na área.

3. METODOLOGIA

3.1. Área de estudo

O distrito de Taboco pertence ao município de Corguinho, que se localiza no estado do Mato Grosso do Sul. Corguinho possui uma área de aproximadamente 528 km². É uma região de cerrado localizada no planalto que circunda o Pantanal e onde nasce o rio Taboco e o Rio Negro, dois principais afluentes do Rio Paraguai que fluem para o Pantanal. Durante os últimos 50 anos, cerca de 60% do cerrado da região foi devastado para dar lugar às culturas agrícolas e pastagens (Harris *et al.*, 2005; MMA, 2009). O resultado é uma paisagem fragmentada que pode ter um impacto negativo tanto na fauna quanto na flora da região. Alguns fragmentos grandes persistem na região e abrigam populações de espécies de paisagem (e.g. queixadas, onças pardas, araras azuis, etc), consideradas importantes para a conservação, por ocuparem grandes áreas de vida. Conservando essas espécies, várias outras que ocupam a mesma área são conservadas como consequência.

3.2. Amostragem e procedimento laboratorial

Amostras de sangue foram coletadas na região do Taboco, município de Corguinho, MS, pela equipe da Dra. Alexine Keuroghlian da WCS-Brasil. O processo de captura dos animais para coleta de amostras foi facilitado pela instalação de cevas em área que as queixadas costumam frequentar. Caixa-armadilhas e chiqueiros portáteis (250 x 170 cm) foram colocados nessas áreas e iscados com sal, milho, mandioca e frutos nativos. Os animais foram anestesiados na armadilha com zolazepam e tiletamina (Zoletil, 0.9ml/10kg) aplicados com uma zarabatana. Para cada animal, foram determinados o sexo, a idade (baseando-se na arcada dentária, Keuroghlian & Desbiez 2010) e instalado um microchip (subcutaneamente), para identificação de recapturas. As amostras de sangue (cerca de 4 ml) foram coletadas em tubos a vácuo contendo EDTA e congelados a -20°C. Essas amostras tiveram seu DNA extraído por meio de um protocolo com proteinase K e fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). Um total de 18 amostras foi coletado.

Além disso, amostras de pelos também foram coletadas a partir da instalação de armadilhas de pelos em lugares onde os animais costumam frequentar. As armadilhas foram instaladas, conforme descrito em Biondo *et al.* (2010), também pela equipe da Dra Keuroghlian. Tais amostras foram conservadas a -20°C em

envelopes de papel até o momento da extração de DNA. Um total de 72 pêlos com raiz foi coletado. Os primeiros 49 pelos coletados tiveram seu DNA extraído seguindo o seguinte protocolo:

- 1- Colocar em um tubo de 1,5 mL devidamente rotulado, o bulbo de um pêlo
- 2- Adicionar 250 µl de tampão de digestão (163,5µl de H₂O, 2,5 µl de TrisHC 1M, 20 µl de NaCl 5M, 50 µl de EDTA 0,5M, 12,5 µl de SDS 10%, 1,5 µl de RNAase 0,1mg/ml), 25 µl de proteinase K e 10 µl de ditioneitol (DTT);
- 3- Vortexar e deixar 55°C overnight ou até que esteja completamente digerido;
- 4- Adicionar 360 µl de NaCl 5M e vortexar bem;
- 5- Centrifugar por 30 minutos na velocidade máxima;
- 6- Recuperar o sobrenadante e transferir para um tubo de 1,5mL devidamente rotulado, adicionar igual volume de isopropanol gelado;
- 7- Incubar as amostras a -20°C por 1h;
- 8- Centrifugar por 20 minutos na velocidade máxima e descartar o sobrenadante;
- 9- Adicionar 300 µl de etanol 70%;
- 10-Centrifugar por 5 minutos, descartar o sobrenadante e deixar secar na estufa de um dia para o outro ou até estar completamente seco;
- 11-Adicionar 25 µl de TE e armazenar a -4°C

Como o sucesso de amplificação dessas primeiras amostras foi baixo, visando aumentar o sucesso de amplificação, os 23 pelos restantes tiveram seu DNA extraído utilizando-se um kit comercial especial para extração de amostras forenses, ou seja, com DNA bastante degradado e em pouquíssima quantidade. O kit usado foi o Invisorb Spin Forensic Kit (Invitek) e as extrações foram feitas de acordo com o protocolo sugerido pelo do fabricante.

Para verificar o sucesso das extrações e quantificar o DNA das amostras de sangue, 1,0 µl de cada amostra foi carregado em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X a 100 V, junto com três padrões de DNA de concentrações conhecidos de 62,5; 125; 250 ng/µl. As amostras e os padrões foram carregadas no gel com 2,0 µl de uma solução de tampão de aplicação e Gel Red (1:500, Biotium) na proporção de 1:1. A visualização das bandas foi feita em transiluminador UV. Uma alíquota de

cada amostra de DNA foi diluída em água Milli Q para 20 a 30 ng/μl para utilização nas reações de PCR. Como no caso das extrações das amostras de pelo, a quantidade de DNA obtida foi pequena, não foi realizada essa quantificação, sendo que as amostras foram utilizadas diretamente nas reações de PCR, sem diluição.

Cinco locos polimórficos de microsatélites com *primers* desenvolvidos para queixadas foram amplificados pela técnica de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*): Tpec3, Tpec4, Tpec5, Tpec16 e Tpec18 (Dalla Vecchia *et al.*, 2011). Esses locos foram selecionados, dentre os disponíveis para a espécie, por serem os que amplificam com maior facilidade em amostras de pelos (C. Biondo, Comunicação Pessoal). Os *primers forward* foram confeccionados com uma cauda 5'-M13 de acordo o método de marcação universal (5'CACGACGTTGTAAACGAC 3'; Boutin-Ganache *et al.*, 2001).

Para as reações de PCR das amostras de sangue, foram usados 1,5 μl de DNA (20-30 ng/ μl); 1,2 μl de tampão (10X – Pharmacia); 1 μl de dNTPs (2mM cada); 0,4 μl de MgCl₂ (25 mM); 0,1 μl de *Taq* polimerase (5 U/ μl - Pharmacia); 0,3 μl do *primer* R (10 mM); 0,2 μl do *primer* 14 M13 (10 mM, marcado com fluorescências TET, HEX ou FAM; Applied Biosystems); 0,1 μl do *primer* F (10 mM) e 7,2 μl de água Milli Q, totalizando um volume de 12 μl. A amplificação foi feita a 95°C por 5 min.; 35 ciclos de 94°C por 30 seg., TH por 30 seg., 72°C por 30 seg.; e 72°C por 10 min. TH é a temperatura de hibridação dos *primers* e foi de 58°C para os locos Tpec3, Tpec4 e Tpec5, de 52°C para o Tpec16 e de 54°C para o Tpec18.

Para as reações de PCR das amostras de pelos, para o loco Tpec3, foi utilizado um volume de 12 μl contendo: 1,5 μl de DNA, 1,2 μl de tampão de PCR (10x, Invitrogen), 1,0 μl de dNTPs (2 mM cada), 1,2 μl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 μl de BSA, 0,3 μl de *primer reverse* (10 mM), 0,2 μl de *primer* M13 fluorescente (10 mM; FAM, HEX, TET ou NED; Applied Biosystems), 0,1 μl de *primer forward* (10 mM), 0,1 μl de *Platinum Taq* DNA polimerase (5 U/ml, Invitrogen) e 5,9 μl de água MilliQ. O programa de amplificação foi: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 45 ciclos de 94°C por 30 s, 45°C por 30 s e 72°C por 30 s, seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 min. Como o volume de DNA obtido por extração de pelo é pequeno, a fim de economizar DNA, as PCRs para os locos Tpec5/Tpec16 e os locos Tpec4/Tpec18 foram feitas em *multiplex* em volumes de 25 μl contendo: 2,0 μl de DNA, 2,4 μl de tampão de PCR (10x, Invitrogen), 2,0 μl de dNTPs (2 mM cada),

2,4 µl de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µl de BSA, 0,3 µl de *primer reverse* 1 (10 mM), 0,3 µl de *primer reverse* 2 (10 mM), 0,4 µl de *primer* M13 fluorescente (10 mM; FAM; Applied Biosystems), 0,1 µl de *primer forward* 1 (10 mM), 0,1 µl de *primer forward* 2 (10 mM), 0,2 µl de *Platinum* Taq DNA polimerase (5 U/ml, Invitrogen) e 13,8 µl de água MilliQ. O programa de amplificação utilizado foi o mesmo descrito acima para o loco Tpec3.

Após a amplificação, 2µl do produto foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% em TBE 0,5X a 80V. Para verificar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi adicionada uma amostra de 1ul de um marcador padrão de tamanho, *ladder* de 100 pares de bases (Invitrogen). Tanto as amostras, quanto o marcador padrão, foram carregados no gel com 1,5 µl de uma solução de tampão de aplicação e Gel Red (1:500, Biotium) na proporção de 1:1. Os produtos amplificados com sucesso foram genotipados no sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems) e tiveram seus alelos identificados pelo programa GeneMarker (Softgenetics). Para as amostras de pelos, por se tratar de uma técnica não invasiva, foi utilizada a técnica de múltiplos tubos (Taberlet *et al.*, 1996), para minimizar os efeitos dos erros de genotipagem. No mínimo três amplificações e genotipagens independentes para cada amostra foram realizadas.

3.3. Análises de dados

Como não se sabe ao certo de que indivíduos as amostras de pelo obtidas são provenientes, utilizou-se o programa GIMLET 1.3.3 (Valière, 2002) para identificar genótipos idênticos. Quando foram encontradas amostras com o mesmo genótipo em todos os locos, elas foram classificadas como um mesmo indivíduo e apenas uma delas foi utilizada nas análises subsequentes. Esta análise foi feita com todas as amostras incluídas, tanto as de sangue quanto as de pelo. Com os indivíduos identificados, os genótipos obtidos para cada loco foram analisados, inicialmente, no programa MICRO-CHECKER (van Oosterhout *et al.*, 2004) para verificação de possíveis erros de genotipagem devido a presença de alelos nulos, *dropout* ou *stuttering*.

Os indicadores de diversidade genética (número de alelos, heterozigosidades esperadas e observadas) foram calculados no programa GENALEX 6.1 (Peakall e Smouse, 2006). O programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002) foi utilizado para calcular

a riqueza alélica e o coeficiente de endogamia F_{IS} e também para testar se o coeficiente encontrado foi significativamente diferente de zero. Para este teste, foi utilizada a correção para múltiplas comparações proposta por Benjamini e Yekutieli (2001). O programa GENEPOP 3.4 (Raymond e Rousset, 1995) foi utilizado para avaliar se os locos utilizados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e de ligação, por meio de um teste exato que utiliza o método da cadeia de Markov. Para estes testes, também foi aplicada a correção de Benjamini e Yekutieli (2001).

Para verificar se população estudada passou por gargalo populacional recente, foi utilizado o programa BOTTLENECK (Piry *et al.*, 1999). Neste programa, os testes podem ser feitos assumindo-se três modelos de mutação: *infinite alleles* (IAM; Kimura e Crow, 1964), *stepwise* (SMM; Ohta e Kimura 1973) e *two-phase* (TPM; Di Rienzo *et al.*, 1994). Como os modelos SMM e TPM têm sido descritos como mais apropriados para microssatélites (Di Rienzo *et al.*, 1994; Luikart e Cornuet, 1998), neste trabalho, o teste de gargalo populacional foi feito assumindo esses modelos. No caso do modelo TPM, assumiu-se uma proporção de 70% de mutações de um único passo e 30% de mutações de mais de um passo. Dentre os testes disponibilizados pelo programa, utilizou-se o teste de Wilcoxon por ser mais apropriado e robusto para conjuntos de dados com menos de 20 locos (Piry *et al.*, 1999).

Os indicadores de diversidade genética obtidos para a população estudada foram comparados com os obtidos por Rufo (2012), para os mesmos locos de microssatélites para duas populações do Pantanal Sul-Matogrossense, usando o teste não paramétrico de Friedman, calculado no programa estatístico SPSS 13.0 (SPSS Inc.).

4. RESULTADOS

4.1. Sucesso de amplificação e genotipagem e identificação individual das amostras

Todas as 18 amostras de sangue obtidas foram extraídas com sucesso e puderam ser genotipadas para os cinco locos de microssatélites. Já no caso das amostras de pelos, em que o DNA encontra-se, geralmente, em pequena quantidade e bastante degradado, não foi possível amplificar e genotipar com sucesso todas as 72 amostras obtidas. Inicialmente, como modo de avaliar o sucesso de amplificação dos pelos, as amostras foram amplificadas e genotipadas para o loco Tpec5. Este loco foi escolhido para isso por ser um loco que produz fragmentos pequenos e, portanto, com maior sucesso de amplificação em amostras não invasivas. As amostras que apresentaram sucesso neste primeiro teste foram então amplificadas para os outros locos. Nesse teste inicial, o sucesso de amplificação e genotipagem para esse loco foi relativamente baixo, sendo de 37,5% (27 amostras em 72).

A partir das 27 amostras que amplificaram com sucesso na primeira rodada de genotipagem para o loco Tpec5, foram feitas mais rodadas de amplificação e genotipagem para este loco e a primeira rodada para os demais locos. Com estes resultados, foi possível verificar que algumas amostras, embora tenham amplificado na primeira rodada para o loco Tpec5, não amplificaram nas outras rodadas para este loco e nem na primeira rodada para os demais locos. Com o intuito de não desperdiçar esforço laboratorial em amostras com baixíssimo sucesso de amplificação, dez amostras foram excluídas das demais rodadas de amplificação e genotipagem para todos os locos. Assim, a partir das 17 amostras restantes, foi possível calcular o sucesso de amplificação na primeira rodada de genotipagem para cada um dos demais locos analisados. O sucesso de amplificação foi de 23,52% (quatro amostras em 17) para o loco Tpec3; 41,17% (sete amostras em 17) para o loco Tpec4; 17,64% (três amostras em 17) para o loco Tpec16 e 41,17% (sete amostras em 17) para o loco Tpec18.

Ao total, foram realizadas quatro rodadas de amplificação e genotipagem para cada loco e amostra para determinação dos genótipos consenso. O sucesso de obtenção de genótipos consenso para cada um dos locos foi: 17,64% (três amostras em 17) para o loco Tpec3; 23,52% (quatro amostras em 17) para o loco Tpec4;

52,94% (nove amostras em 17) para o loco Tpec5; 23,52% (quatro amostras em 17) para o loco Tpec16; e 11,76% (duas amostras em 17) para o loco Tpec18. Embora tenha sido exercido um grande esforço laboratorial na amplificação e genotipagem das amostras de pelos, o sucesso de obtenção de genótipos consenso foi baixo, o que pode ser atribuído ao fato de serem amostras não invasivas, com DNA degradado e em pouca quantidade, o que dificulta o sucesso dos procedimentos laboratoriais.

Para as análises subsequentes, foram selecionadas apenas três amostras de pelo em que foi possível obter genótipos consensos para pelo menos três dos cinco locos analisados. Os genótipos dessas amostras juntamente com os das 18 amostras de sangue (totalizando 21 amostras) foram submetidos à análise de identificação de indivíduos no programa GIMLET. A partir dessas 21 amostras, foi possível identificar 19 indivíduos, que foram utilizados para as estimativas de diversidade genética e endogamia e o teste de gargalo populacional.

4.2. Estimativa de diversidade genética, endocruzamento e gargalo populacional recente

Todos os cinco locos analisados foram polimórficos, com número de alelos variando de 2,00 (Tpec3, Tpec4 e Tpec18) a 4,00 (Tpec16) e com média de 2,60; e riqueza alélica variando de 1,99 (Tpec18) a 4,00 (Tpec16) e com média de 2,56 (Tabela 1). As heterozigotidades esperadas variaram de 0,28 (Tpec18) a 0,62 (Tpec16), com média de 0,45; e as observadas, de 0,33 (Tpec18) a 0,58 (Tpec4), com média de 0,47 (Tabela 1). Os valores médios obtidos para esses parâmetros de diversidade genética para a população do Taboco foram similares aos observados por Rufo (2012) para as duas populações do Pantanal Sul-matogrossense para os mesmos locos de microssatélites (Tabela 2). O teste de Friedman não apontou diferenças significativas entre as três populações para os parâmetros analisados: número de alelos, $\chi^2 = 2,00$, gl = 2, $p = 0,368$; riqueza alélica, $\chi^2 = 2,60$, gl = 2, $p = 0,273$; heterozigotidade observada, $\chi^2 = 1,60$, gl = 2, $p = 0,449$; heterozigotidade esperada, $\chi^2 = 1,20$, gl = 2, $p = 0,549$.

Tabela 1- Descrição do número amostral (N), do número de alelos (Na), da riqueza alélica (Ra), das heterozigosidades observada (Ho) e esperada (He) e do coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) para a população de queixadas da região do Taboco, utilizando cinco locos de microssatélites.

Loco	N	Na	Ra	Ho	He	F_{IS}
Tpec3	17	2,000	2,000	0,471	0,484	0,059
Tpec4	19	2,000	2,000	0,579	0,478	-0,186
Tpec5	18	3,000	2,753	0,500	0,397	-0,234
Tpec16	9	4,000	4,000	0,444	0,617	0,333
Tpec18	15	2,000	1,994	0,333	0,278	-0,167
Média	-	2,600	2,549	0,465	0,451	-
Desvio padrão	-	0,894	0,874	0,089	0,125	-

Tabela 2- Descrição do número amostral (N), do número de alelos (Na), da riqueza alélica (Ra), das heterozigosidades observada (Ho) e esperada (He) para duas populações de queixadas do Pantanal Sul-matogrossense: Fazenda Rio Negro (RN) e Fazenda Santa Emília (SE), utilizando cinco locos de microssatélites (dados gerados por Rufo, 2012).

Loco	RN					SE				
	N	Na	Ra	Ho	He	N	Na	Ra	Ho	He
Tpec3	51	2,000	2,000	0,294	0,327	128	2,000	2,000	0,508	0,438
Tpec4	48	2,000	2,000	0,458	0,430	125	2,000	2,000	0,496	0,441
Tpec5	51	3,000	3,000	0,510	0,527	128	3,000	3,000	0,398	0,434
Tpec16	48	4,000	4,000	0,458	0,557	123	4,000	3,947	0,577	0,559
Tpec18	50	3,000	2,960	0,280	0,299	126	3,000	2,761	0,349	0,372
Média	-	2,800	2,792	0,400	0,428	-	2,800	2,742	0,466	0,449
Desvio padrão	-	0,838	0,834	0,105	0,115	-	0,837	0,809	0,092	0,068

Os locos analisados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,02190$, de acordo com a correção de Benjamini e Yekutieli, 2001) e em equilíbrio de ligação ($p > 0,02190$, de acordo com a correção de Benjamini e Yekutieli, 2001). De acordo com os resultados obtidos no programa MICRO-CHECKER, não houve evidência da presença de alelos nulos ou de erros de genotipagem devido a *dropout* ou *stuttering* para nenhum dos locos.

O coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) obtido para a população do Taboco foi de 0,008 (variando de -0,234, para o Tpec5, a 0,333, para o Tpec16; Tabela 1), não

sendo positivo nem significativamente diferente de zero ($p > 0,02190$, de acordo com a correção de Benjamini & Yekutieli, 2001), o que indica que a população não está sofrendo endocruzamento. Também não houve evidência de gargalo populacional recente para os modelos assumidos: *stepwise mutation* (SMM, teste de Wilcoxon, $p = 0,50$) e two-phase (TPM, teste de Wilcoxon, $p = 0,08$).

5. DISCUSSÃO

Ao contrário da hipótese proposta inicialmente, a população analisada da região do Taboco não apresentou evidências de gargalo populacional recente e nem de estar sofrendo com a endogamia. Além disso, os níveis de diversidade genética nesta população foram estatisticamente similares aos encontrados por Rufo (2012) para duas populações do Pantanal Sul-Matogrossense; embora a região do Taboco seja mais impactada e a do Pantanal mais preservada. É interessante notar que os níveis obtidos aqui para o Taboco e os obtidos por Rufo (2012) para os mesmos locos de microssatélites, foram menores do que os obtidos por Biondo et al. (2011, diversidade alélica = 5,0 e heterozigosidades médias observada e esperada de 0,59 e 0,58, respectivamente) para as mesmas populações analisadas por Rufo (2012). Porém, isso se deve ao fato de que Biondo et al. (2011) utilizaram locos de microssatélites diferentes dos aqui analisados, o que limita então essa comparação entre os níveis de diversidade obtidos neste trabalho com os obtidos pelo trabalho citado.

Pelo fato da região do Taboco ser fragmentada, esperar-se-ia que a população de queixadas da região estivesse sofrendo com os impactos dessa fragmentação, apresentando perda de diversidade genética e sinais de endogamia e gargalo populacional recente. Entretanto, a partir dos resultados obtidos, a fragmentação parece não estar afetando os parâmetros genéticos da população de queixadas.

Por mais que a população do Taboco ainda não pareça estar sofrendo com perda de diversidade genética, é importante que se implante medidas de conservação para que esse quadro não se altere. Isso porque as queixadas são vulneráveis a fragmentação do habitat por precisarem de grandes áreas para manter a população viável (March, 1993; Keuroghlian & Eaton, 2008b). A fragmentação do habitat e a caça são as principais ameaças para a diversidade biológica (Wilcox and Murphy 1985). E para muitas espécies esses dois processos estão relacionados com uma menor disponibilidade de recursos (comida, abrigo), com a mortalidade (Fahrig 2002) e tem efeitos negativos na qualidade do ambiente (Dykstra 2004). Por isso, embora a população de queixadas do Taboco esteja em uma situação relativamente estável em termos de diversidade genética, não se pode prever até

quando ela continuará nessa mesma posição devido ao fato de que a região continua sendo impactada por atividades humanas.

Além disso, as queixadas interagem com o meio em que elas vivem. A perda das interações entre espécie-chaves é uma ameaça para a estrutura e função do meio ambiente (Soule, et al., 2003), principalmente para o declínio da biodiversidade (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2010). O comportamento das queixadas afeta a sobrevivência, o recrutamento e a distribuição das plantas, por conta de seu papel como predadoras/dispersoras de sementes e de engenheiras do ecossistema (Beck, 2005, 2006; Desbiez et al., 2009; Keuroghlian & Eaton, 2009); portanto medidas de conservação para esta espécie, seriam importantes não só para elas, como para o ambiente como um todo.

Deve-se ter em mente, que as alterações nas populações naturais, em termos de tamanho, composição, densidade e de diversidade genética, são um processo dinâmico e contínuo. E muitas vezes, os efeitos dessas alterações só podem ser percebidos em longo prazo.

Entretanto a fragmentação pode não estar afetando a população devido a alguns fatores. Um desses fatores, é que pode não ter dado tempo suficiente para que as mudanças genéticas decorrentes da diminuição do tamanho populacional imposta pela fragmentação pudessem ser detectadas. Nesse sentido, seria interessante fazer novas coletas, com certo intervalo de tempo entre elas, para poder estimar quanto tempo é preciso para que as mudanças genéticas em uma população que sofre algum impacto possam ser detectadas.

Outro fator é que pode estar ocorrendo fluxo gênico entre essa população do Taboco com as populações de outros fragmentos próximos. Portanto, essa população de queixadas pode não estar isolada e, dessa maneira, estar mantendo sua diversidade genética por conta de fluxo gênico. Uma análise preliminar feita com as amostras de sangue do Taboco e as amostras das duas populações do Pantanal Sul-Matogrossense (utilizadas aqui para a comparação da diversidade genética e que estão distantes em linha reta da região do Taboco em 45 (SE) a 100 km (RN)), não demonstrou diferenciação genética entre as três populações, o que pode ser um indicio de que esteja ocorrendo fluxo gênico entre elas (C. Biondo, Comunicação Pessoal). Assim, pode ser que os níveis similares de diversidade genética dessas populações estejam sendo mantidos pelo fluxo gênico. Se isso realmente estiver

ocorrendo, uma forma de manter essa diversidade seria preservar a conexão entre as populações por meio da implantação de corredores ecológicos; facilitando a dispersão dos indivíduos entre as áreas e mantendo assim o fluxo gênico.

Por tudo que foi citado, são necessários estudos de longo prazo visando um monitoramento populacional, em termos demográfico e genético, são necessários, para que medidas apropriadas de conservação possam ser tomadas. Dentre as medidas possíveis, pode-se citar: mudanças nas políticas públicas visando a proteção do habitat (por instalação de reservas, por exemplo) e o controle da caça (Galetti et al., 2009).

6. CONCLUSÕES

É possível concluir que, embora a população de queixadas do Taboco esteja aparentemente em um estágio estável em termos de diversidade genética, um monitoramento de longo prazo dessa população se faz necessário pelo fato de que essa população está em um habitat que continua sofrendo pressões devido à ação humana. No atual estado em que o habitat e a espécie se encontram, talvez a medida mais imediata possa ser a implementação de políticas públicas para conter a fragmentação e a caça; visto que o estado de conservação da área tem influência não só nas queixadas, mas também em toda a fauna e flora da região.

O fato de não ter sido evidenciada perda de diversidade genética na população não significa que ela não esteja sofrendo a ação da fragmentação. O que pode estar ocorrendo é que não houve tempo suficiente para que as mudanças pudessem ser detectadas ou que esteja ocorrendo fluxo gênico com as populações de fragmentos próximos, o que manteria os níveis de diversidade. Assim, seria de grande importância fazer uma nova coleta de amostras depois de certo intervalo de tempo para que se possa determinar quanto tempo é necessário para que as mudanças nos parâmetros genéticos decorrentes das perturbações no habitat sejam percebidas para a espécie. Além disso, seria interessante também comparar geneticamente a população de Taboco com as populações de áreas próximas para que se possa determinar se ocorre diferenciação genética entre elas ou se está ocorrendo fluxo gênico. Se houver fluxo, uma importante medida conservacionista

seria a implantação de corredores ecológicos visando a manutenção desse fluxo e consequentemente da diversidade genética das populações envolvidas.

Com isso, é necessário incentivo, principalmente governamental, para que novas pesquisas sejam realizadas com o intuito de fornecer dados para a implantação de planos de manejo para conservar a diversidade biológica da área, tanto do habitat, como das espécies que nele habitam.

Referências

- ALTRICHER, M.; TABER, A.; BECK, H.; HURTADO-REYNA, R.; LIZARRAGA, L.; KEUROGHLIAN, A.; SANDERSON, E.W. 2012. Rangewide declines of a key Neotropical ecosystem architect, the Near Threatened whitelipped peccary *Tayassu pecari*. **Oryx** **46**: 87-98.
- ALTRICHER, M.; ALMEIDA, R. 2002. Exploitation of white-lipped peccaries *Tayassu pecari* (Artiodactyla: Tayassuidae) on the Osa Peninsula, Costa Rica. **Oryx** **36**: 126–132.
- ALTRICHER, M.; CARRILLO, E.; SAENZ, J.; FULLER, T. 2001. White lipped peccary (*Tayassu pecari*) diet and fruit availability in a Costa Rican rain forest. **Biol. Trop.** **49**: 1105–1114.
- AZEVEDO, F. C. C.; CONFORTI, V. C. 2008. Decline of peccaries in a protected subtropical forest of Brazil: toward conservation issues. **Mammalia** **72**: 82–88.
- BARRET, S. C. H.; KOHN, J. R. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: Implications for conservation. In: FALKAND, D. A.; HOLSINGER, K. E. (eds.), **Genetics and Conservation of Rare Plants**: 3-30. Oxford University Press, New York.
- BECK, H. (2005) Seed predation and dispersal by peccaries throughout the Neotropics and its consequences: a review and synthesis. In **Seed Fate: Predation, Dispersal and Seedling Establishment** (eds P.M. Forget, J.E. Lambert, P.E. Hulme & S.B. Vander Wall), pp. 77–115. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- BECK, H. (2006) A review of peccary–palm interactions and their ecological ramifications across the Neotropics. **Journal of Mammalogy**, **87**: 519–530.
- BERGL, R.A.; BRADLEY, B.J.; NSUBUGA, A.; VIGILANT, L. 2008. Effects of habitat fragmentation, population size and demographic history on genetic diversity: the Cross River gorilla in a comparative context. **Am J Primatol** **70**:848–859.
- BENJAMINI, Y.; YEKUTIELI, D. 2001. The control of false discovery rate under dependency. **Annals of Statistics**, **29**: 1165-1188.
- BIONDO, C.; GONÇALVES, H. S.; BERNADO, C.; GALETTI, M. 2010. Hair trap efficacy to sample white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). **Suiform Soundings** **10**: 24-27.

- BIONDO, C.; KEUROGHLIAN, A.; GONGORA, J.; MIYAKI, C. Y. 2011. Population genetic structure and dispersal in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) from the Brazilian Pantanal. **Journal of Mammalogy** **92**: 267-274.
- BODMER, R.E. (1989) Frugivory in Amazonian Artiodactyla: evidence for the evolution of the ruminant stomach. **Journal of Zoology** **219**: 457–467.
- BROQUET, T.; MENÁRD, M.; PETIT, E. 2007. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. **Conservation Genetic** **8**: 249-260.
- CAVALCANTI, S.; GEESE, E.M.. 2010. Kill rates and predation patterns of jaguars (*Panthera onca*) in the southern Pantanal, Brazil. **Journal of Mammalogy** **91**: 722–736.
- CHIARELLO, A.G. 1999. Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammal communities in south-eastern Brazil. **Biological Conservation** **89**: 71–82.
- CULLEN Jr., L.; BODMER, R. E.; PADUA, C. V. 2000. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. **Biological Conservation** **95**: 49-56.
- DALLA VECCHIA, A. C.; BIONDO, C.; SANCHES, A.; KEUROGHLIAN, A.; MIYAKI, C.Y.; GALETTI, M.; GALETTI Jr., P.M. 2011. 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.
- DESBIEZ, A. L. J.; BODMER, R. E.; SANTOS, S. A. 2009. Wildlife habitat selection and sustainable resources management in a Neotropical wetland. **International Journal of Biodiversity and Conservation** **1**: 11-20.
- Di Rienzo A.; Peterson A.C.; Garza JC.; Valdes AM.; Slatkin M.; Freimer NB. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proc Natl Acad Sci USA** **91**:3166–3170.
- DYKSTRA, P. R. 2004. Thresholds in habitat supply: a review of the literature. Ministry of Sustainable Resource Management, Victoria, British Columbia, Canada, **Wildlife Report R-27**:1–117.

- FAHRIG, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution and System** **34**: 487- 515.
- FAHRIG, L. 2002. Effect of habitat fragmentation on the extinction threshold: a synthesis. **Ecological Applications** **12**:346–353.
- FRAGOSO, J.M. 1994. **Large mammals and the community dynamics of an Amazonian rain forest**. Tese de doutorado. University of Florida, Gainesville, FL.
- FRAGOSO, J.M.V. (1997) Desapariciones locales del baquiro labiado (*Tayassu pecari*) en la Amazonia: migración, sobre-cosecha o epidemia. In Manejo de Fauna Silvestre en la Amazon (eds T.G. Fang, R.E. Bodmer, M.H. Aquino & M. Valqui), pp. 309–312. UNAP, University of Florida, UNDP/GEF and the Instituto de Ecología, La Paz, Bolivia.
- FRAGOSO, J.M.V. (2004) A long-term study of white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) population fluctuation in Northern Amazonia. In People in Nature: Wildlife Conservation in South and Central America (eds K.M. Silvius, R.E. Bodmer & J.M.V. Fragoso), pp. 286–296. Columbia University Press, New York, USA.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. 2004. **A primer of conservation genetics**: 52-75. Cambridge University press, New York.
- FRANTZ, A. C.; POPE, L. C.; CARPENTER, P. J.; ROPER, T.J.; WILSON, G. J.; DELAHAY, R. J.; BURKE, T. 2003. Reliable microsatellite genotyping of Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. **Molecular Ecology** **12**: 1649-1661.
- 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. 2009. Priority areas for the conservation of Atlantic forest large mammals. **Biological Conservation** **142**: 1229–1241.
- GOOSSENS, B.; CHIKHI L.; ANCRENAZ, M.; LACKMAN-ANCRENAZ, I.; ANDAU, P.; BRUFORD, MW. 2006. Genetic signature of anthropogenic population collapse in orang-utans. **PLoS Biol** **4**:285–291.

- GOUDET, J. 2002. FSTAT, version 2.9.3.2. University of Lausanne, Lausanne, Switzerland. www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html. Acessado em abril de 2012.
- HANSKI, I.; PAKKALA, T.; KUUSSAARI, M.; LEI, G. Metapopulation persistence of an endangered butterfly in a fragment landscape. 1995. **Oikos** **72**: 21-28.
- HARRIS, M. B., ARCANGELO, C., PINTO, E.C.T., CAMARGO, G., RAMOS NETO, M.B., SILVA, S. M. 2005. **Estimativas de perda da área natural da Bacia do Alto Paraguai e Pantanal Brasileiro**. Relatório técnico não publicado.
- KEUROGHLIAN, A.; DESBIEZ, A. L. J. 2010. Biometric and age estimation of live peccaries in the Southern Pantanal, Brazil. **Suiform Soundings** **9**: 24-35.
- KEUROGHLIAN, A.; DESBIEZ, A.L.J.; BEISIEGEL, B.M.; MEDICI, E.P.; GATTI, A.; MENDES PONTES, A.R.; CAMPOS, C.B.; TÓFOLI, C.F.; MORAES JR., E.A.; AZEVEDO, F.C.; PINHO, G.M.; CORDEIRO, L.P.; SANTOS JR., T.S.; MORAIS, A.A.; MANGINI, P.R.; FLESHER, K.; RODRIGUES, L.F.; ALMEIDA, L.B. 2012. Avaliação do Risco de Extinção do queixada, *Tayassu pecari* (Link, 1795), no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**: 84-102. Ano II, N°3
- KEUROGHLIAN, A.; EATON, D. P. 2009. 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**: 1733–1750.
- KEUROGHLIAN, A. & EATON, D.P. (2008a) Importance of rare habitats and riparian zones in a tropical forest fragment: preferential use by *Tayassu pecari*, a wide-ranging frugivore. **Journal of Zoology** **275**: 283–293.
- KEUROGHLIAN, A.; EATON, D.P. (2008b) Fruit availability and peccary frugivory in an isolated Atlantic forest fragment: effects on peccary ranging behavior and habitat use. **Biotropica** **40**: 62– 70.
- KEUROGHLIAN, A.; EATON, D. P.; LONGLAND, W. S. 2004. Area use by white-lipped and collared peccaries (*Tayassu pecari* and *Tayassu tajacu*) in a tropical forest fragment. **Biological Conservation** **120**: 411–425.
- KILTIE, R.A. & TERBORGH, J. (1983) Observations on the behavior of rain forest peccaries in Peru: why do white-lipped peccaries form herds? **Zeitschrift für Tierpsychologie** **62**: 241–255.

- LOVEJOY, T.E., BIERREGAARD, R.O., RYLANDS, A.B., MALCOLM, J.R., QUINTELA, C.E., HARPER, L.H., BROWN Jr, K.S., POWELL, A.H., POWELL, G.V.N., SCHUBART, H.O.R., HAYS, M.B., 1986. Edge and other effects of isolation on Amazon forest fragments. In: Soulé, M.E. (Ed.), **Conservation Biology, the Science of Scarcity and Diversity**: 257-285. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- LUCCHINI, V., FABBRI, E.; MARUCCO, F.; RICCI, S.; BOITANI, L.; RANDI, E. 2002. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. **Molecular Ecology** **11**: 119-123.
- LUIKART, G.; CORNUET, J. M. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology** **12**: 228-237.
- MARCH, I. (1993) The white-lipped peccary (*Tayassu pecari*). In **Pigs, Peccaries, and Hippos: Status Survey and Conservation Action Plan** (ed. W.L.R. Oliver), pp. 13–22. Gland, Switzerland. IUCN.
- MAYER, J. & WETZEL, R. 1987. *Tayassu pecari*. **Mammalian Species** **293**: 1-7.
- MERGEY, M.; HELDER, R.; ROEDER, J. J. 2011. Effect of forest fragmentation on space-use patterns in the European pine marten (*Martes martes*). **Journal of Mammalogy**, **92(2)**:328-335.
- MMA. 2009. **Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no Cerrado**. PPCerrado. Brasília, DF.
- MURPHY, M. A.; WAITS, L. P.; KENDALL, K. C. 2000. Quantitative evaluation of fecal drying methods for brown bear DNA analysis. **Wildlife Society Bulletin** **28**: 951-957.
- _____.; _____.; _____.; WASSER, S. K.; HIGBEE, J. A.; BOGDEN, R. 2003. An evaluation of long-term preservation of brown bear (*Ursus arctos*) fecal DNA samples. **Conservation Genetics** **3**: 435-440.
- NERI, F. M. **Ecologia e conservação de catetos, *Tayassu tajacu*, (Linnaeus, 1758) (Artiodactyla, Tayassuidae) em áreas de Cerrado do Estado de São Paulo**. 2004. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos. 148f.

- OHTA, T.; KIMURA, M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. **Genetical Research** **22**: 201-204.
- PARDINI, R.; DITT, E. H.; CULLEN Jr., L.; BASSI, C.; RUDRAN, R. 2006. Levantamento rápido de mamíferos terrestres de médio e grande porte. In: Cullen Jr., L.; Rudran, R.; Padua, C. V (Org.). **Métodos de Estudos em Biologia da Conservação da Vida Silvestre**: 181-202. Curitiba: Editora Universidade Federal do Paraná.
- PARGA, J.A.; SAUTHER, M.L.; CUOZZO, F.P.; JACKY, I.A.Y.; LAWLER, R.R. 2012. Evaluating Ring-Tailed Lemurs (*Lemur catta*) From Southwestern Madagascar For a Genetic Population Bottleneck. *American Journal of Physical Anthropology* **147**:21–29
- PEAKALL, R., SMOUSE, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, **6**: 288-295.
- PERES, C. A. 1997. Population status of white-lipped *Tayassu pecari* and collared peccaries *T. tajacu* in hunted and unhunted Amazonian forests. **Biological Conservation** **77**: 115-123.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; COURNUET, J.M. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**: 90:502– 503.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. 2002. **Biologia da Conservação**. pp. 136-198. Vozes Editora: Londrina.
- QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E. & HUGHES, C. R. 1993. Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology & Evolution** **8**: 285-288.
- RALLS, K. J.; BALLOU, J.; TEMPLETON, A. 1988. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. **Conservation Biology** **2**: 185-193
- REDFORD, K.H., ROBINSON, J.G., 1991. 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**: 227-234. University of Oklahoma Press, Norman, OK.

- REYNA-HURTADO, R. (2007) Social ecology of the white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) in Calakmul forest, Campeche, Mexico. PhD thesis, University of Florida. Gainesville, USA.
- ROHRER, G.A; ALEXANDER, L. J.; HU, Z.; SMITH, T. P.; KEELE, J.W.; BEATTIE, C. W. 1996. **A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Research* 6:371-391.**
- ROHRER, G.A; ALEXANDER, L. J.; KEELE, J.W.; SMITH, T. P.; BEATTIE, C. W. 1994. A microsatellite linkage map of the porcine genome. ***Genetics* 136: 231-245.**
- RUFO, D. A. **Parentesco e diferenciação genética em queixadas (*Tayassu pecari*) do Pantanal Matogrossense (MS).** 2012. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Evolutiva). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 58f.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SECRETARIAT OF THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY (2010) Global Biodiversity Outlook 3. Montreal, Canada.
- SOULE, M., ESTES, J.A., BERGER, J. & MARTINEZ DEL RIO, C. (2003) Ecological effectiveness: conservation goals for interacting species. ***Conservation Biology* 17: 1238–1250.**
- SOWLS, L. K. 1984. **The Peccaries.** The University of Arizona Press, Tuscon.
- SPIELMAN, D.; BROOK, B. W.; FRANKHAM, R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. ***PNAS* 101: 15261–15264.**
- SUTCLIFFE, O.; THOMAS, C.D. 1996. Open corridors appear to facilitate dispersal by Ringlet Butterflies (*Aphantopus hyperantus*) between woodland clearings. ***Conservation Biology* 10: 1359- 1365.**
- TABERLET, P.; GRIFFIN, S.; GOOSSENS, B.; QUESTIAU, S.; MANCEAU, V.; ESCARAVAGE, N.; WAITS, L. P.; BOUVET, J. 1996. Reliable genotyping of small samples with very low DNA quantities using PCR. ***Nucleic Acids Research* 26: 3189-3194.**
- TAUTZ, D., RENZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Acids. Res* 12: 4126-4138.

- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequence as general source of polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res* 17: 6364-6471.
- VERBOOM, J.; SCHOTMAN, A.; OPDAM, P.; METZ, J.A.J. 1991. European Nuthatch metapopulation in a fragment agriculture landscape. **Oikos** 61: 149-156.
- VILLARD, M. A.; MERRIAM, G.; MAURER, B.A. 1995. Dynamics in subdivided population of Neotropical migratory birds in a temperate fragment forest. **Ecology** 76: 27-40.
- WAITS, L.P.; PAETKAU, D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for a accurate data collection. **Journal of Wildlife Management** 69: 1419-1433.
- WILCOX, B. A., MURPHY, D.D. 1985. Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. **American Naturalist** 125:879-887.