

---

ECOLOGIA

---

**TAMISSA GABRIELLE GODOI**

**MOVIMENTAÇÃO DE INDIVÍDUOS DE UMA POPULAÇÃO DE  
ANTAS (*Tapirus terrestris*) EM UMA PAISAGEM  
FRAGMENTADA NO CERRADO DO MATO GROSSO DO SUL**



Rio Claro  
2011

TAMISSA GABRIELLE GODOI

MOVIMENTAÇÃO DE INDIVÍDUOS DE UMA POPULAÇÃO DE ANTAS  
(*Tapirus terrestris*) EM UMA PAISAGEM FRAGMENTADA NO CERRADO  
DO MATO GROSSO DO SUL

Orientador: Alexandra Sanches

Co-orientador: Mauro Galetti

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

Rio Claro  
2011

599 Godoi, Tamissa Gabrielle  
G88m Movimentação de indivíduos de uma população de antas (*Tapirus terrestris*) em uma paisagem fragmentada no cerrado do Mato Grosso do Sul / Tamissa Gabrielle Godoi. - Rio Claro : [s.n.], 2011  
29 f. : il., figs., tabs., mapas

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

1. Mamífero. 2. Ecologia Molecular. 3. Microsatélites. 4.  
Identificação individual. 5. Diversidade genética. I. Título.

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

## AGRADECIMENTOS

À minha família, meu porto seguro, por acreditar em mim e me dar suporte em todos os momentos. Ao Mirtão por sempre compartilhar minhas conquistas com alegria e entusiasmo, à Mami pela doçura e colo nos momentos de estresse, à Jé pelas pitadas de antropologia que tanto enriqueceram minha visão sobre a Ecologia e sobre a vida, e ao Cadu por cada sorriso e abraço dado quando volto pra casa. Amo infinitamente!

À Lelê, minha orientadora, amiga e conselheira. Muito obrigada pela paciência, pelos conselhos, pela sinceridade e pela força sempre me incentivando a seguir em frente. Sem seu apoio seria muito difícil me manter confiante e persistente até o fim!

À Cibele, obrigadíssima pelo bom humor que sempre contagia a todos e faz o dia ser mais leve e a acreditarmos que “vai dar tudo certo!”. Às pessoas boas do LabEMIM: Sayzinha, Biz, Rootinha, Jack, Flávia, Coró e Crisinha (não me esqueci das biólogas queridas que tanto ajudaram!) pela agradável companhia. Aos queridos do Labic pelo clima agradável e trocas de experiências tão importantes. Ao Mauro Galetti pelas visões ecológicas no meu projeto e pela orientação.

Ao Paul, Elson e à Casa da Floresta Assessoria Ambiental Ltda, pelas coletas das fezes, parceria, empolgação e sugestões durante todo o projeto. Obrigada! À Fapesp pelo financiamento do projeto de iniciação científica.

Às minhas queridas orientais, minha família Tomba: Say e Biz! Obrigada pelos momentos em família, pelas conversas, pelos almoços e jantares, pela companhia, pela paciência e irmandade de sempre! Amo muito vocês!

Agradeço especialmente à minha queridíssima família Ecologia!! Aprendi tanto com vocês nestes anos! Agradeço principalmente à turma 2008, pela união de sempre, pela simplicidade e por momentos tão especiais vividos juntos! Momentos estes tão intensos e únicos que ficarão marcados pra sempre em mim. Cada um acrescentou, do seu modo, coisas muito especiais em minha vida! Citar nomes seria muito difícil, pois são muitas pessoas especiais, e me sinto privilegiada por ter tantas pessoas queridas ao meu redor! Dedico à Ecologia!!!

## RESUMO

A anta é um megamamífero vulnerável à extinção (IUCN), apresenta baixa taxa reprodutiva e é uma espécie de elevada importância na manutenção da estrutura das florestas, este estudo pretende avaliar a movimentação de indivíduos de anta em uma paisagem antropizada no cerrado do Mato Grosso do Sul. Dada a dificuldade de estudos com técnicas tradicionais de campo, estão sendo realizadas análises moleculares de amostras não-invasivas (fezes) com marcadores microssatélites, a fim de estimar o número de indivíduos que utilizam essa área, além de gerar informações genéticas que podem ser úteis para auxiliar programas de conservação para esta espécie. Para tal, foram coletadas e georreferenciadas 41 amostras de fezes da área de estudo. Através da distribuição das amostras é possível inferir que as antas utilizam a área de floresta plantada de acordo com a disponibilidade do ambiente. O DNA de todas as amostras foi extraído e os locos microssatélites de interesse foram testados. Dez locos microssatélites foram testados, sendo que deste total cinco se mostraram mais eficientes, ou seja, foi possível realizar sua amplificação na grande maioria das amostras utilizadas e a genotipagem apresentou uma boa qualidade, possibilitando uma identificação confiável dos alelos. As amostras com o genótipo definido para pelo menos três locos foram selecionadas e analisadas no programa GIMLET para identificação individual e estimativa da  $P_{ID}$  (Probabilidade de Identidade) e nos programas FSTAT e GenAlex para estimativa da diversidade genética. Dentre 23 amostras analisadas, foram identificados 20 indivíduos, sendo 14 machos, 3 fêmeas e 3 de sexo indeterminado. A recaptura de três indivíduos possibilitou a verificação da movimentação destes pela área. O presente estudo mostrou, então, que as antas (*Tapirus terrestris*) utilizam as florestas plantadas de *Eucalyptus* em uma paisagem antropizada. As recapturas também evidenciaram esse uso, mostrando inclusive que esta mancha funciona como passagem de um fragmento para outro de vegetação nativa. Então, embora haja uma preferência destes animais pela vegetação nativa, as antas não evitam a área de floresta plantada. A densidade populacional também se mostrou próxima à encontrada em outros estudos, sendo assim, podemos afirmar que as áreas de floresta plantada apresentam no mínimo um efeito neutro para esta população de antas. Pode-se, posteriormente, comparar estes dados com populações da Mata Atlântica e Pantanal, uma vez que a esta é uma população localizada geograficamente entre estes dois biomas.

**Palavras-chave:** microssatélites, identificação individual, diversidade genética.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	5
2. Justificativa e Objetivos .....	9
3. Material e Métodos .....	10
3.1. Área de Estudo .....	10
3.2. Coleta das fezes .....	11
3.3. Extração de DNA .....	11
3.4. Amplificação dos locos de microssatélites .....	12
3.5. Sexagem.....	12
3.6. Análises dos Dados .....	12
4. Resultados e Discussão .....	14
4.1. Distribuição das amostras.....	14
4.2. Sucesso de amplificação dos locos microssatélites e genotipagem .....	15
4.3. Identificação individual e movimentação de indivíduos.....	17
4.4. Determinação do sexo .....	20
4.5. Diversidade Genética.....	21
5. Discussão Geral e Conclusões .....	24
6. Referências Bibliográficas.....	26

## 1. Introdução

É fato que o crescimento exacerbado das populações humanas e a conseqüente expansão de suas atividades têm levado à redução dos biomas, bem como à redução da biodiversidade nestes locais. A fragmentação de habitats pode ter conseqüências diretas sobre as populações de plantas e animais, afetando parâmetros demográficos de natalidade e mortalidade (VIANA *et al.*, 1998). Do ponto de vista genético, a fragmentação pode impedir o fluxo gênico entre as populações, tornando-as mais susceptíveis aos processos de endogamia e deriva genética e provocando a perda de diversidade genética, o que reduziria significativamente o potencial evolutivo da espécie, ou seja, sua resposta a variações ambientais (FRANKHAM *et al.*, 2008).

A fragmentação e perda de habitat é um dos fatores que mais afeta os mamíferos terrestres no Brasil. Das cerca de 532 espécies de mamíferos descritas, 66 são consideradas ameaçadas pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais), enquanto que a IUCN considera 74 espécies, ressaltando que lacunas de conhecimento provavelmente subestimam estes valores (COSTA *et al.*, 2005). Os mamíferos de médio e grande porte, também são muito afetados pela caça (COSTA *et al.*, 2005). A anta (*Tapirus terrestris*), última espécie de megafauna do Pleistoceno da América do Sul e Central (SIMPSON 1980; EISENBERG, 1981), que é abundante em muitas partes da Amazônia, tornou-se extremamente rara na Mata Atlântica devido à pressão de caça, perda, degradação e fragmentação de habitat (CULLEN *et al.*, 2000). No Cerrado, mesmo em locais com vastas áreas de criação de gado, ocorre a caça destes grandes animais (SANCHES *et al.*, 2011).

Até o momento, não se sabe o motivo pelo qual as antas podem ocorrer em alguns locais parcialmente perturbados e estar totalmente ausentes em outros, mas, é discutido que a espécie provavelmente não tolere a mudança de habitat em grande escala, bem como a pressão de caça (NAVEDA *et al.*, 2008). As antas são consideradas “Vulneráveis à extinção” pela IUCN (International Union for Conservation of Nature), categoria A2cde+3cde, devido à redução na população de cerca de 30% nas últimas três gerações (cerca de 33 anos). Além disso, dado o longo período de gestação, estes animais são ecologicamente mais propensos ao risco de extinção uma vez que sua baixa taxa reprodutiva torna difícil a recuperação de suas populações

(NAVEDA *et al.*, 2008). E ainda, a chance de encontro de pares para acasalamento é reduzida na mesma proporção da diminuição de suas populações.



**Figura 1.** *Tapirus terrestris* na Fazenda Barra do Moeda, Três Lagoas, MG

Ademais, pouco se sabe como a paisagem pode facilitar ou impedir o fluxo de indivíduos e, conseqüentemente, o fluxo gênico. As florestas plantadas, principalmente as monoculturas de *Eucalyptus* e *Pinnus*, podem compor uma importante barreira para o fluxo de animais em uma paisagem, no entanto, cada táxon responde de maneira diferente a esta barreira (BARLOW *et al.*, 2007). Diversas espécies entendem essa matriz de florestas plantadas como barreiras entre fragmentos de mata nativa, como aves de sub-bosque (VERGARA & SIMONETTI, 2006). Outros animais, como médios e grandes mamíferos, variam sua resposta com relação a estas florestas, sendo algumas espécies ausentes e outras freqüentemente presentes nestes locais (CIOCHETI, 2008). Ademais, estudos sugerem que florestas de espécies exóticas, desde que com um sub-bosque de espécies nativas, apresentam um número surpreendentemente elevado de espécies, que as utilizam como passagem ou habitat (BARLOW *et al.*, 2007). Vidolin, *et al.* (2009) verificaram que a anta ocorre em áreas de reflorestamento com espécies exóticas, mas não há uma seleção/preferência do animal por este tipo de ambiente, ela apenas utiliza o espaço de acordo com a sua disponibilidade.

Outro ponto importante é que a anta é um dos únicos frugívoros neotropicais capazes de dispersar sementes em paisagens onde há um grande número de fragmentos cujo isolamento não é muito acentuado (TÓFOLI, 2006) e a capacidade de

dispersão de sementes grandes parece ser única entre os dispersores neotropicais (GALETTI *et al.*, 2001; PIZO, 2004). Devido a isso, a presença dos ungulados é um importante determinante da estrutura da floresta e da diversidade de plantas (LICONA *et al.*, 2011) e, portanto, o declínio das populações de anta significa não somente a extinção de uma espécie, mas causa também a perda de interações que afetam as espécies vegetais produtoras de grandes frutos (PIZO, 2004; JORDANO *et al.*, 2010).

Por exibir um hábito solitário, noturno e ocorrer com maior frequência em florestas tropicais, os estudos populacionais de antas com as técnicas tradicionais de campo são dificultados (NORTON *et al.*, 2004). Estimativas de tamanho populacional de antas vêm sendo feitas com o uso de câmeras-trap, no entanto estas não se mostram muito eficazes devido ao fato de a espécie não possuir características fenotípicas que permitam a identificação individual com segurança (OLIVEIRA-SANTOS *et al.*, 2010). Outros métodos como telemetria e transecção linear também podem ser utilizados para fins de estimativa populacional. Entretanto, a telemetria, além de se tratar de um método invasivo, exige um grande esforço amostral para captura dos animais a fim de instalar os colares, enquanto que a transecção linear não se aplica a organismos elusivos e de hábitos noturnos como a anta e altera o comportamento dos animais durante a aproximação do pesquisador (MÉDICI, 2010). Neste sentido, os marcadores moleculares juntamente ao uso de fontes alternativas para a obtenção de DNA, como fezes e pêlos, são ferramentas recentes que possibilitam o estudo de populações ameaçadas em condições naturais (EIZIRIK, 1996), além de trazerem vantagens como logística simples, são relativamente econômicos e não há necessidade de ver ou perturbar o animal (BELLEMAIN *et al.*, 2005; MÉDICI, 2010). Ademais, as análises genéticas de populações ameaçadas são fundamentais para iniciativas de gestão e devem ser prioridade em programas de conservação destas espécies (COSTA *et al.*, 2005; EIZIRIK, 1996).

O presente trabalho propõe o estudo genético populacional de uma população de antas em uma paisagem antropizada, composta de áreas de cerrado e de plantações de *Eucalyptus* no Mato Grosso do Sul, a fim de avaliar o fluxo de indivíduos pela área e a variabilidade genética do maior mamífero brasileiro, a anta. Para tal, o tamanho mínimo populacional será estimado através de identificação individual, a diversidade será estimada para a análise da fragilidade genética da população estudada e os dados

genéticos unir-se-ão aos de paisagem para interpretação referente à sua movimentação e área de vida.

## 2. Justificativa e Objetivos

Considerando que a anta é um megamamífero vulnerável à extinção (IUCN), apresenta uma baixa taxa reprodutiva (NAVEDA *et al.*, 2008) e dada a importância deste animal na manutenção da estrutura da floresta (JORDANO *et al.*, 2010; LICONA *et al.*, 2011; PIZO, 2004), este estudo pretende avaliar a movimentação de indivíduos de anta em uma paisagem antropizada no cerrado do Mato Grosso do Sul. Tendo em vista a dificuldade de aplicação de técnicas tradicionais de campo para o estudo da anta (NORTON *et al.*, 2004), serão realizadas análises moleculares não-invasivas com marcadores microssatélites, utilizando amostras fecais como fonte de DNA, a fim de estimar o número mínimo de indivíduos que utilizam essa área, além de gerar informações genéticas que podem ser úteis para auxiliar programas de conservação para esta espécie.

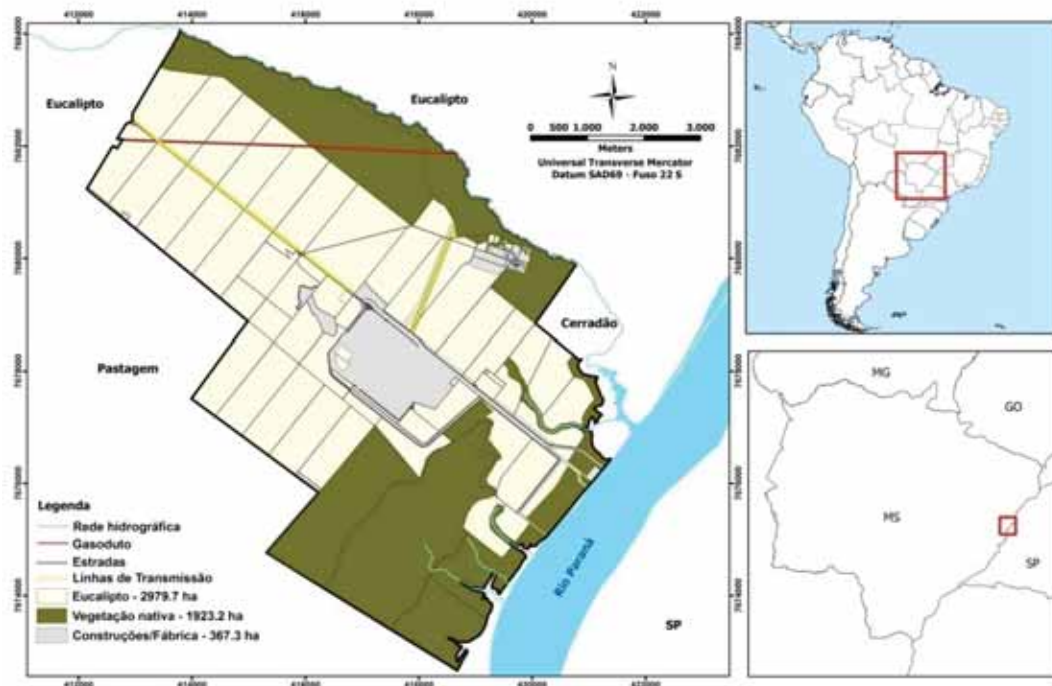
Dada a situação problema descrita, o presente estudo pretende, através das análises genéticas de fezes de anta:

- realizar identificação individual a partir de amostras fecais de *Tapirus terrestris* coletadas na Fazenda Barra do Moeda – Fibria Sul Mato-Grossense (Três Lagoas, MS) para estimar o tamanho mínimo populacional;
- estimar a diversidade, possibilitando análise da fragilidade genética da população estudada;
- mapear os indivíduos e unir os dados genéticos com os dados de paisagem, analisando assim sua movimentação e área de vida;
- gerar dados para comparação com outras populações, uma vez que a população de estudo se localiza entre as populações do Pantanal e da Mata Atlântica, as quais estão sendo estudadas em projetos paralelos.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Área de Estudo

O estudo foi realizado nos limites da Fazenda Barra do Moeda (Zona UTM 22, 417.618W, 767.7994S) pertencente à Fibria Celulose S/A - Unidade Três Lagoas, MS (Figura 2). A fazenda possui 5270,2 ha e fica localizada à margem Oeste do Rio Paraná. A cobertura vegetal e uso do solo na fazenda é composta predominantemente por plantações de eucalipto (2979,7 ha, 56,54% da área da fazenda), com a presença de dois grandes fragmentos de cerrado nativo (somando 1923,2 ha, 36,49% do total), correspondente às áreas de Reserva Legal (RL) e Áreas de Preservação Permanente (APPs) da propriedade. O restante da área é composto por construções da empresa (Figura 2). O uso do solo no entorno da fazenda, além das áreas de vegetação nativa (como extensas várzeas na margem do Rio Paraná) é composto por pastagem e plantações de eucalipto (Figura 2). Em uma escala regional, o uso é predominantemente de pastagens.



**Figura 2.** Localização e cobertura da paisagem na Fazenda Barra do Moeda (Fibria Celulose S/A - Unidade Três Lagoas, MS)

### 3.2. Coleta das fezes

Entre agosto de 2009 e fevereiro de 2011, a cada três meses, foram coletadas e georreferenciadas um total de 41 amostras de fezes da área de estudo. A coleta das fezes (Figura 3) foi realizada em colaboração com a Casa da Floresta Assessoria Ambiental Ltda pelo método de busca ativa realizada por mastozzólogos (Paul François Colas-Rosas e Elson Fernandes Lima). As fezes foram acondicionadas em tubos de 50 mL contendo etanol 100%, sendo posteriormente mantidas em freezer até a extração do DNA. As coordenadas dos pontos de coleta foram obtidos com o auxílio de GPS (Global Positioning System), sendo os mesmos plotados para interpretação referente à movimentação e área de vida dos animais.



**Figura 3.** Fezes frescas coletadas em parceria com a Casa da Floresta Assessoria Ambiental Ltda

### 3.3. Extração de DNA

As extrações de DNA das amostras fecais foram realizadas com a utilização dos kits comerciais “QIAmp DNA Stool Mini Kit” (Quiagen) e “PSP Spin Stool DNA” (Invitex), específicos para este tipo de material. O protocolo para extração do DNA seguiu recomendações feitas pelo fabricante.

A extração de todas as amostras coletadas foi realizada, a princípio, logo que amostrada, rendendo um total de 200  $\mu$ l de extrato de DNA por amostra. Como são necessários diversos testes para a padronização de cada loco microssatélite utilizado, algumas amostras tiveram que ser re-extraídas, a fim de possibilitar a realização de mais reações de PCR, necessárias para a confirmação dos genótipos de cada amostra.

### 3.4. Amplificação dos locos de microssatélites

Os genótipos das amostras de DNA foram obtidos através da utilização dos marcadores microssatélites desenvolvidos para a anta (SANCHES *et al.*, 2009). Para as PCRs, foi utilizado um método que utiliza três primers para a incorporação de uma marcação fluorescente ao fragmento amplificado (SCHUELKE, 2000), possibilitando a genotipagem em sequenciador automático. Cada reação de PCR contém tampão da reação 1x, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 8 µg de BSA, 125 µM de dNTP, 2 pmol do primer forward, 8 pmol do primer reverse, 8 pmol do primer contendo a fluorescência, 1 U de Taq, em um volume final de 12 µl. A reação é iniciada com uma desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 48-56° C por 1 minuto, 72° C por 45 segundos e uma extensão final de 72° C por 10 minutos.

A identificação dos alelos foi realizada por serviços de terceiros em seqüenciador automático ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) e os alelos foram escoreados por meio do programa GeneMarker (demo version). As genotipagens foram realizadas em réplicas, de forma a minimizar erros comuns a amostras não invasivas (HÁJKOVÁ *et al.*, 2006). Cada loco é amplificado no mínimo duas vezes para heterozigotos e três vezes para homozigotos, garantindo a diminuição destes erros.

### 3.5. Sexagem

A identificação sexual é uma ferramenta que auxilia a identificação individual, além de fornecer informações sobre a estrutura sexual da população de estudo. Para a determinação do sexo dos indivíduos, foi realizada uma reação de PCR utilizando-se de um par de primer para a amplificação do gene ZFX/ZFY, presente em ambos os cromossomos sexuais (AASEN e MEDRANO, 1990), e outro par de primers para a amplificação do gene SRY, presente apenas no cromossomo sexual masculino (POMP *et al.*, 1995).

### 3.6. Análises dos Dados

A partir dos genótipos são realizadas as identificações individuais das amostras a fim de se obter uma estimativa do tamanho mínimo populacional da espécie na área de

estudo. A identificação individual foi feita com a utilização do programa GIMLET (VALIÉRE, 2002) onde os genótipos obtidos para os diferentes *loci* são analisados em conjunto. Ainda nesse programa foi estimada a probabilidade de identidade ( $P_{ID}$ ), i.e., a probabilidade de dois indivíduos aleatoriamente amostrados compartilharem os mesmos genótipos para os loci analisados. Isto permite quantificar o poder de discriminação dos indivíduos por meio dos locos de microssatélites analisados (PAETKAU *et al.*, 1998, WAITS *et al.*, 2001). Para tal, consideramos os genótipos que são repetidos em PCRs independentes (por três repetições) e selecionamos somente as amostras com pelo menos três locos com genótipo já definido.

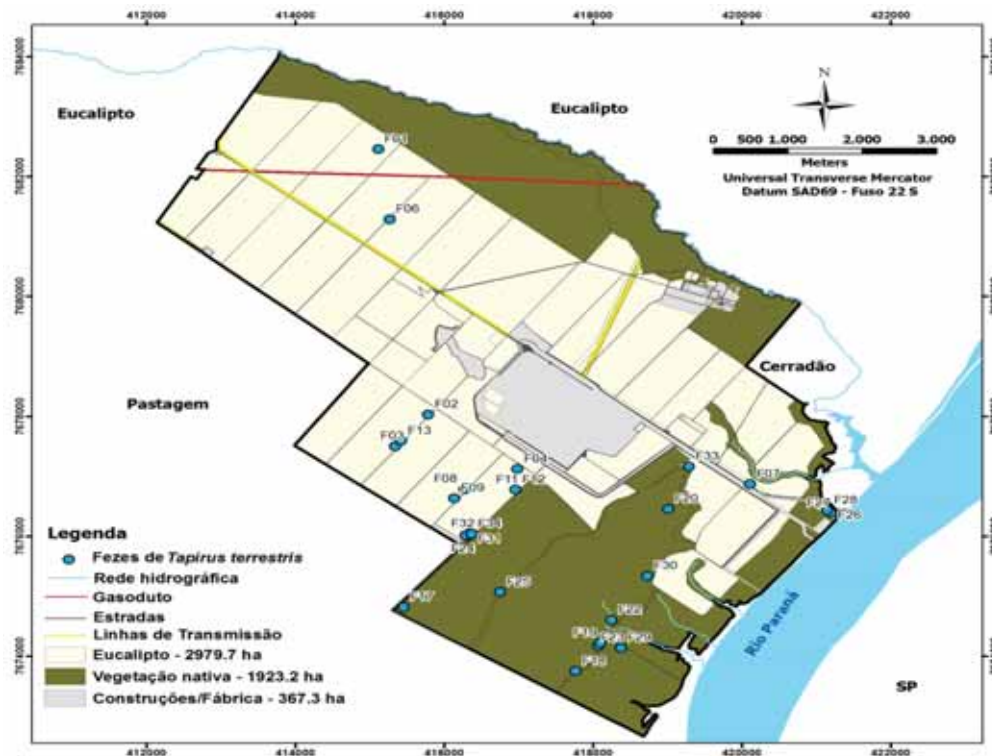
Foi calculada também a taxa de erro por loco ( $e_l$ ), que se trata de uma relação entre os locos genotipados ( $m_l$ ) e a repetibilidade destes genótipos ( $nt$ ) (POMPANON *et al.*, 2005). Este dado nos mostra qual dos locos tem a genotipagem mais confiável em comparação aos demais utilizados.

Os genótipos também foram utilizados para estimar a diversidade genética, utilizando o número e riqueza de alelos, heterozigosidade esperada e observada e coeficiente de parentesco, dados estes obtidos por meio do programa GenAlex (PEAKALL & SMOUSE, 2006) e FSTAT (GOUDET, 1995).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Distribuição das amostras

Analisando-se a distribuição das amostras de fezes (Figura 4) é possível observar que as antas utilizam a área de floresta plantada de acordo com a quantidade desta área disponível no ambiente, ou seja, não demonstram preferência por este tipo de habitat, como encontrado por Vidolin *et al.*, 2009. No presente trabalho, encontramos 53,66% das amostras coletadas em áreas de *Eucaliptus*, 43,9% em áreas de vegetação nativa e 2,44% na área construída da fazenda (correspondente a uma amostra). Como a proporção de amostras encontradas na área de floresta plantada se aproxima da proporção desta área disponível no ambiente (56,54%), podemos inferir que a anta utiliza este tipo de ambiente, porém sem indícios de preferência pelo mesmo. Já a proporção encontrada nas áreas de vegetação nativa é um pouco maior que a disponibilidade (36,49%). Uma possível explicação é que a área de vegetação nativa também é composta por áreas de várzea, e esta última é selecionada pela anta (VIDOLIN *et al.*, 2009), podendo então aumentar o uso desta área pelo animal.



**Figura 4.** Distribuição das amostras de fezes coletadas na Fazenda Barra do Moeda – Fibria Celulose S/A

#### 4.2. Sucesso de amplificação dos locos microssatélites e genotipagem

Um total de 10 locos microssatélites polimórficos foi testado na amplificação de todas as amostras. O sucesso na amplificação de cada loco foi examinado a fim de se avaliar a viabilidade da utilização dos mesmos para o estudo, além de nos indicar a qualidade do DNA presente em cada amostra. Por se tratar de amostragem não invasiva, o DNA presente é de baixa qualidade ou está presente em baixa quantidade. Farrell *et al.*, 2000, encontraram maior sucesso de amplificação por PCR para amostras de fezes de felinos coletadas em época seca comparadas às amostras coletadas em época chuvosa. Isso se deu devido às condições climáticas, pois fortes chuvas podem remover as células do cólon das fezes, diminuindo sua quantidade, e o clima quente e úmido de certas épocas do ano podem ter favorecido o crescimento de fungos nas fezes, aumentando a degradação do DNA presente. Essa baixa qualidade de DNA pode causar erros de genotipagem, podendo gerar alelos falsos (TABERLET *et al.*, 1999) ou causar a não amplificação de alelos existentes - dropout (GAGNEUX *et al.*, 1997; POMPANON *et al.*, 2005), afetando assim a identificação individual e a obtenção

de estimativas de tamanho populacional (CREEL *et al.*, 2003), diversidade genética, estrutura genética populacional, entre outras (TABERLET *et al.*, 1999). Assim, adotamos uma medida para minimizar esses erros. Amostras que não foram amplificadas para nenhum ou poucos locos microssatélites foram descartadas das análises devido à sua baixa qualidade/quantidade de DNA. Onze amostras foram retiradas das análises este motivo.

Quanto à viabilidade da utilização de cada loco, foram avaliados dois fatores: o sucesso de amplificação para a maioria das amostras utilizadas e a qualidade da genotipagem, que deve ser de fácil interpretação e se confirmar nas repetições realizadas. Dos 10 locos testados, quatro obtiveram um baixo sucesso de amplificação (Tter6, Tter14, Tter17) e três não apresentaram uma boa repetibilidade na genotipagem (Tter9, Tter11 e Tter17), como mostra a Tabela 1. Como sucesso de amplificação, foi considerado a proporção das amostras que foram amplificadas para o loco de interesse dentre todas as amostras submetidas à reação de PCR. Já a repetibilidade dos genótipos foi entendida como a repetição de um genótipo na réplica ou tréplica de sua genotipagem, sendo que os genótipos não repetidos foram considerados de baixa qualidade/confiabilidade. No caso onde não houve repetições da genotipagem (Tter6), esta se deu pela não amplificação de uma mesma amostra por mais de uma vez, visto que o sucesso de amplificação foi baixo e, portanto, não se tornou possível a repetição da genotipagem.

**Tabela 1.** Sucesso de amplificação, genotipagem e seleção dos melhores locos para análise dos dados

Locos testados	Sucesso de amplificação	Repetibilidade dos genótipos obtidos	Loco utilizado para análises?
Tter4	92,50%	45,0%	Sim
Tter5	100%	87,5%	Sim
Tter6	25,45%	Sem repetições	Não
Tter 9	72,72%	7,69%	Não
Tter10	95,12%	65,0%	Sim
Tter11	57,50%	45,0%	Não
Tter13	85%	34,29%	Sim
Tter14	0,00%	-	Não
Tter17	27,50%	0,0%	Não
Tter18	100%	56,66%	Sim

De acordo com estes parâmetros, cinco locos estão presentes nas análises, que apresentaram um sucesso de amplificação e/ou repetibilidade dos genótipos altos. São eles: Tter4, Tter5, Tter10, Tter13 e Tter18. Todos esses cuidados que devem ser tomados com amostras não-invasivas justificam todo o elevado consumo financeiro e de tempo, quando comparado a estudos que utilizam amostras invasivas.

#### 4.3. Identificação individual e movimentação de indivíduos

Das 30 amostras com boa qualidade, 23 tiveram os genótipos definidos para pelo menos três locos, o que possibilitou a identificação dos indivíduos. Não utilizamos as demais amostras, pois consideramos que apenas um ou dois locos genotipados não traz informação suficiente para a identificação e diferenciação dos indivíduos. A Tabela 2 mostra os valores de Probabilidade de Identidade ( $P_{ID}$ ) corrigidos para amostras com pequeno número de indivíduos como a nossa, chamado de  $P_{ID}$  unbiased (VALIERE, 2002), e para populações onde existam muitos indivíduos aparentados, como irmãs-irmãos, chamado de  $P_{ID}$  sibs (WAITS *et al.* 2001).

**Tabela 2.** Probabilidade de Identidade dos locos utilizados

Loco	PI unbiased / locus	PI sibs / locus
Tter4	$6,91 \times 10^{-2}$	$4,13 \times 10^{-1}$
Tter5	$4,94 \times 10^{-2}$	$3,75 \times 10^{-1}$
Tter10	$9,05 \times 10^{-2}$	$4,43 \times 10^{-1}$
Tter13	$6,41 \times 10^{-2}$	$3,85 \times 10^{-1}$
Tter18	$3,53 \times 10^{-2}$	$3,58 \times 10^{-1}$
$P_{ID}$ Total	$7,01 \times 10^{-7}$	$9,48 \times 10^{-3}$

Quando analisamos o  $P_{ID}$  total, obtido pela multiplicação do  $P_{ID}$  de todos os locos (WAITS, *et al.*, 2001), notamos que a probabilidade de dois indivíduos compartilharem os mesmo genótipos é extremamente baixa e que, portanto, o poder de identificação individual dos locos é alto.

O cálculo da taxa de erro nos mostra que quanto menor o valor, menor o erro e maior a confiabilidade do loco (Tabela 3). Então, de acordo com esta perspectiva, os locos que contém menor e maior taxa de erro, respectivamente, são o Tter5 e Tter13.

**Tabela 3.** Taxa de erro por loco

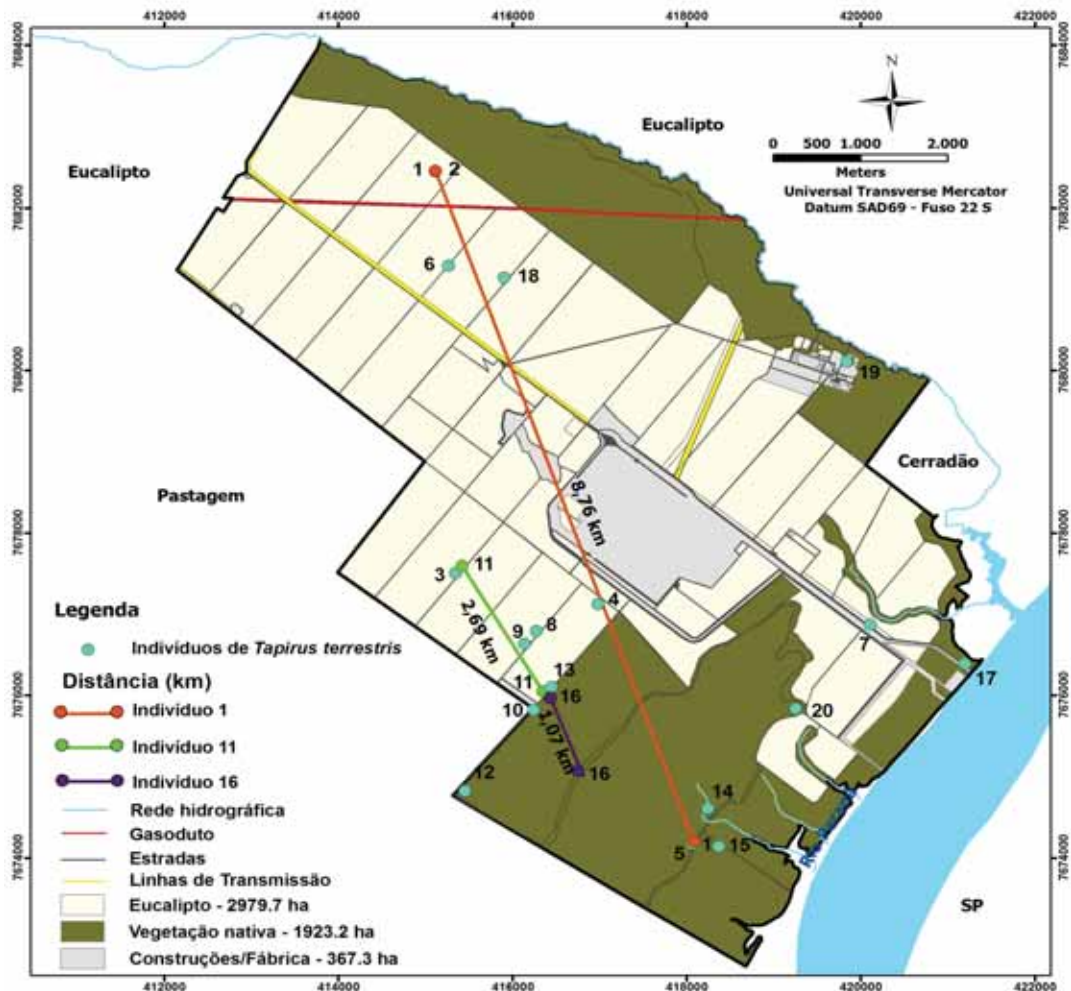
Loco	Taxa de erro ( $e_i = m_i/nt$ )
Tter4	2,22
Tter5	1,14
Tter10	1,54
Tter13	2,92
Tter18	1,76

De acordo com estes valores, podemos selecionar quais locos podemos confiar mais para a realização da identificação individual, uma vez que os locos com uma maior taxa de erro podem conter mais falsos alelos ou alelos dropout (POMPANON *et al.*, 2005), prejudicando assim a estimativa do tamanho mínimo populacional. As taxas de erro mais elevadas encontradas para os locos Tter4 e Tter13, podem estar relacionadas ao fato de se tratarem dos loci com maior tamanho, cerca de 260 e 298, aproximadamente. A utilização de locos de tamanho grande em amostras não invasivas é dificultada, já os DNAs obtidos são degradados. Estes loci exigem um maior cuidado para a definição dos genótipos.

Para as 23 amostras analisadas, foram encontrados 20 genótipos distintos, ou seja, cada genótipo diferente é correspondente a um indivíduo. Podemos afirmar então que a população de estudo possui um mínimo de 20 indivíduos, sendo que três deles foram recapturados, evidenciado pelo genótipo idêntico correspondentes à amostras fecais diferentes (Figura 5).

A partir deste número mínimo populacional podemos realizar uma comparação com estudos de densidade populacional de antas já realizados. Em um estudo não-publicado citado por (MÉDICI, 2010), verificou-se que a densidade de antas obtida por transecção linear e câmeras-trap em uma área de transição Cerrado-Pantanal na Bacia do Rio Paraguai é em média de 2,19 antas/ km<sup>2</sup>, enquanto que o presente estudo encontrou 0,38 antas/km<sup>2</sup>. Já em um trabalho realizado no Pantanal (TROLLE *et al.*, 2008), foi estimada uma densidade de 0,58 antas/km<sup>2</sup> através de câmeras-trap e 0,55 antas/km<sup>2</sup> através de transecto linear. Observamos então que a densidade populacional encontrada no presente estudo se aproxima à densidade encontrada em locais onde a paisagem não é fragmentada, como é o caso do Pantanal. Vale ressaltar que estas

diferenças de densidade podem ser reflexos de diferenças metodológicas para obtenção do número de indivíduos.



**Figura 5.** Distribuição dos indivíduos identificados e distância linear entre as recapturas.

Podemos também verificar a movimentação dos indivíduos pela paisagem através das recapturas obtidas. Nota-se, na Figura 5, que três indivíduos tiveram suas fezes coletadas mais de uma vez: os indivíduos 1, 11 e 16. As distâncias entre as recapturas foram, respectivamente, 8,76; 2,69 e 1,07 km. Esta grande diferença entre a distância de recaptura do indivíduo 1 para os outros dois possivelmente se deu pela diferença no intervalo de tempo entre as coletas/recapturas. A recaptura do indivíduo 1 foi realizada 14 meses após a primeira coleta, já as recapturas dos indivíduos 11 e 16 foram realizadas, respectivamente, após 2 e 4 meses.

Ao analisarmos a distribuição dos indivíduos pela paisagem, somando-se a preferência da anta pela vegetação nativa (citado no item 4.1), podemos inferir que a presença dos talhões de eucalipto não impede a anta de se deslocar de um fragmento para o outro de Cerrado na área de estudo, evidenciado principalmente pela recaptura do indivíduo 1. É possível afirmar, então, que a anta utiliza bem toda essa paisagem, e possivelmente as plantações de eucalipto no entorno da fazenda, ao longo do tempo, uma vez que encontramos uma distância de 8,76 km entre recapturas de um mesmo indivíduo após pouco mais de um ano.

#### **4.4. Determinação do sexo**

A reação de sexagem foi realizada para todas as 30 amostras consideradas com boa qualidade e/ou quantidade de DNA (citado no item 4.2). Dentre estas amostras, foi possível identificar o sexo para 25 delas, sendo três amostras do sexo feminino e 22 do sexo masculino. Considerando os 20 indivíduos identificados, podemos afirmar que existem pelos menos 14 machos, três fêmeas e outros três indivíduos de sexo indeterminado na população de estudo. As amostras onde não foi possível a determinação do sexo podem ser potencialmente fêmeas, uma vez que o fragmento do cromossomo X é maior e, portanto, de mais difícil amplificação em DNA de baixa qualidade como os obtidos por amostragem não-invasiva. Como os machos foram identificados apenas pela amplificação do fragmento do cromossomo Y, ou seja, mesmo sem a amplificação do fragmento do cromossomo X, foi possível a determinação do sexo masculino mesmo com a baixa qualidade do DNA.

Podemos notar que a proporção de machos amostrados é bem maior que a de fêmeas, pois mesmo se os três indivíduos não identificados fossem fêmeas, teríamos pelo menos o dobro de machos com relação as fêmeas. Não podemos afirmar, entretanto, que a razão sexual na população segue as proporções encontradas na amostragem, uma vez que padrões comportamentais em mamíferos geralmente se apresentam de formas diferentes entre machos e fêmeas. Em outras espécies de mamíferos, os padrões de territorialidade e de defecação em latrinas, por exemplo, são diferentes entre os sexos (ROPER *et al.*, 1993). Devido a essa diferença de comportamento, a amostragem das fezes pode ser tendenciosa para um dos sexos,

não possibilitando considerar a razão sexual encontrada para amostragem de estudo para a de toda a população.

#### 4.5. Diversidade Genética

A fim de avaliar a diversidade genética da população de estudo, utilizamos os dados de genotipagem por microssatélites para verificar a frequência alélica em cada loco (Tabela 4), estimar o número e riqueza de alelos, heterozigosidade esperada e observada e o  $F_{IS}$ , um índice que nos mostra o grau de endogamia da população, uma vez que o endocruzamento reduz a heterozigosidade da mesma (FRANKHAM *et al.*, 2008).

**Tabela 4.** Número de alelos e frequência alélica em cada loco

Alelo /Loco	Tter4	Tter5	Tter10	Tter13	Tter18
1	0,038	0,050	0,056	0,091	0,067
2	0,077	0,100	0,500	0,091	0,067
3	0,111	0,100	0,083	0,045	0,100
4	0,077	0,050	0,083	0,318	0,033
5	0,038	0,025	0,028	0,273	0,167
6	0,462	0,225	0,056	0,182	0,033
7	0,115	0,075	0,028	-	0,033
8	0,038	0,0375	0,167	-	0,167
9	0,038	-	-	-	0,333

As amostras utilizadas para estas análises foram apenas aquelas identificadas individualmente ( $n=23$ ). As demais amostras (com um ou dois locos genotipados) não foram utilizadas pois, uma vez que não se sabe com certeza quais destas amostras são repetições de um mesmo indivíduo, a frequência e riqueza alélicas estariam superestimadas.

O número de alelos encontrados variou de 6 a 9, com uma média de 8 alelos por loco, e a riqueza alélica (que considera o tamanho amostral) variou de 6,0 a 8,345, com uma média de 7,248 (Tabela 5). A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) média nos mostra uma diversidade genética relativamente elevada, porém menor que a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ). Alguns locos, porém, apresentam uma diferença maior entre  $H_o$  e  $H_e$ , evidenciado por um valor de  $F_{IS}$  maior que zero. Exemplos são os locos Tter10 e

Tter13, que apresentam os maiores valores de  $F_{IS}$  e, conseqüentemente, uma menor heterozigosidade observada com relação à esperada. A média do valor de  $F_{IS}$  nos indica endocruzamento na população de estudo, visto que o valor se apresentou positivo e com um  $p=0,01$ , indicando que o valor é significativamente maior que zero.

**Tabela 5.** Número de alelos, riqueza alélica, heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigozidade esperada ( $H_e$ ) e  $F_{IS}$

Loco	Número de alelos	Riqueza alélica	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
Tter4	9	8,345	0,615	0,743	0,210
Tter5	8	7,008	0,700	0,778	0,125
Tter10	8	6,830	0,444	0,701	0,390
Tter13	6	6,000	0,455	0,773	0,451
Tter18	9	8,057	0,600	0,811	0,292
Média	8	7,248	0,563	0,761	0,293

Analizamos também o parentesco entre os indivíduos através de um coeficiente que relaciona os indivíduos par a par, formando uma matriz de parentesco (LYNCH & RITLAND, 1999). O nível de parentesco entre dois indivíduos é a probabilidade de que dois alelos escolhidos aleatoriamente sejam idênticos por descendência (FRANKHAM *et al.*, 2008), então, estimativas negativas indicam ausência de parentesco entre os indivíduos (LYNCH & RITLAND, 1999). Como o parentesco médio de uma população é inversamente proporcional à sua diversidade genética (FRANKHAM *et al.*, 2008), trata-se de outro índice importante para avaliar a diversidade genética de uma população, além de indicar relações de parentesco entre indivíduos específicos. Encontramos uma estimativa de parentesco média negativa (-0,036), indicando ausência de parentesco entre a maior parte dos indivíduos (em 72,49% das combinações). Entretanto, encontramos uma proximidade grande entre alguns indivíduos, indicando prováveis relações como pai-filho ou irmão-irmão (coeficiente  $\sim 0,5$ ), meio-irmão ou avô-neto ( $\sim 0,25$ ) e primos ou bisavô-bisneto ( $\sim 0,125$ ). Estes indivíduos e seus coeficientes de parentesco estão representados na Tabela 6. Estas relações mais próximas de parentesco podem ter resultado no  $F_{IS}$  significativamente maior que zero.

**Tabela 6.** Coeficiente de parentesco e relações prováveis de parentesco entre os indivíduos mais aparentados

Indivíduos	Coeficiente de parentesco	Parentesco provável
2 e 3	0,111	primos / bisavô-bisneto
5 e 6	0,500	pai-filho / irmãos
9 e 10	0,214	meio-irmãos / avô- neto
6 e 13	0,100	primos / bisavô-bisneto
7 e 15	0,206	meio-irmãos / avô- neto
8 e 15	0,109	primos / bisavô-bisneto
6 e 16	0,152	primos / bisavô-bisneto
8 e 16	0,308	meio-irmãos / avô- neto
8 e 17	0,254	meio-irmãos / avô- neto
10 e 19	0,135	primos / bisavô-bisneto
12 e 19	0,328	meio-irmãos / avô- neto
16 e 19	0,157	primos / bisavô-bisneto

## 5. Discussão Geral e Conclusões

A influência humana sobre os ambientes naturais, como a caça e a agricultura, podem afetar seriamente a variedade de respostas ecológicas dos organismos (JORDANO *et al.*, 2010; FAHING *et al.*, 2011). Pode haver perda de interações como a mudança no ciclo de regeneração natural de plantas pela perda de frugívoros (JORDANO *et al.*, 2010) ou alguns animais podem ser localmente extintos mesmo em áreas de florestas devido à existência de matriz agropecuária extensiva ao redor (MAZOLLI, 2006).

Dentro das manchas presentes em uma paisagem antropizada, as matrizes podem ter efeitos negativos, neutros ou benéficos para uma espécie ou grupo de espécies (FAHING *et al.*, 2011). As manchas com efeito negativo, em geral, não contêm recursos e ainda trazem riscos à espécie, como vulnerabilidade à caça por exemplo; as neutras não fornecem recursos mas também não trazem riscos à espécie, enquanto que as benéficas fornecem recursos e podem ter funções adicionais, como abrigo no inverno, sítio de reprodução, ou servir de passagem para os animais (FAHING *et al.*, 2011), funcionando como elementos de conectividade entre manchas de habitat.

O presente estudo mostrou, através da localização das amostras de fezes coletadas, que as antas (*Tapirus terrestris*) utilizam as florestas plantadas de *Eucalyptus* em uma paisagem antropizada. As recapturas também evidenciaram esse uso, mostrando inclusive que estas manchas funcionam como passagem de um fragmento para outro de vegetação nativa. Então, embora haja uma preferência destes animais pela vegetação nativa, as antas fazem algum nível de uso da floresta plantada. A densidade populacional também se mostrou próxima à encontrada em outros estudos, sendo assim, podemos afirmar que as áreas de floresta plantada apresentam no mínimo um efeito neutro para esta população de antas.

Quanto à diversidade genética, mesmo havendo um certo grau de endogamia presente na população, esta mostra-se alta se analisarmos a heterozogidade observada e o coeficiente de parentesco da população. Os resultados nos levam a crer, juntamente com o uso da paisagem observado através das recapturas, que a população de antas presente na fazenda Barra do Moeda não está sendo prejudicada, até o momento, pela plantação de eucaliptos presente.

Além disso, a partir deste estudo é possível realizar uma comparação com os genótipos de outras populações, verificando-se assim a estrutura genética populacional bem como a existência de fluxo gênico com outras populações. Pode-se, por exemplo, comparar estes dados com populações da Mata Atlântica e Pantanal, uma vez que a esta é uma população localizada geograficamente entre estes dois biomas.

## 6. Referências Bibliográficas

- AASEN, E. AND J.F. MEDRANO. 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 8: 1279–1281.
- BARLOW, J., T. A. GARDNER, I. S. ARAUJO, T. C. AVILA-PIRES, A. B. BONALDO, J. E. COSTA, M. C. ESPOSITO, L. V. FERREIRA, J. HAWES, M. M. HERNANDEZ, M. S. HOOGMOED, R. N. LEITE, N. F. LO-MAN-HUNG, J. R. MALCOLM, M. B. MARTINS, L. A. M. MESTRE, R. MIRANDA-SANTOS, A. L. NUNES-GUTJAHR, W. L. OVERAL, L. PARRY, S. L. PETERS, M. A. RIBEIRO-JUNIOR, M. N. F. DA SILVA, C. D. MOTTA, AND C. A. PERES. 2007. Quantifying the biodiversity value of tropical primary, secondary, and plantation forests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:18555-18560.
- BELLEMAIN, E.; SWENSON, J.E.; TALLMON, D.; BRUNBERG, S.; TABERLET, P. 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears. *Conservation Biology*, 19 (1): 150-161.
- CIOCHETI, G. 2008. Uso de habitat e padrão de atividade de médios e grandes mamíferos e nicho trófico de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), onça-parda (*Puma concolor*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*) numa paisagem agroflorestal, no estado de São Paulo. São Paulo, Universidade de São Paulo. Dissertação de mestrado, 78p.
- COSTA, L.P.; YURI, R.L.R.; MENDES, S.L.; ALBERT, D.D. 2005. Mammal Conservation in Brazil. *Conservation Biology*, 19 (3): 672-679.
- CREEL, S.; SPONG, G.; SANDS, J.L.; ROTELLA, J.; ZEIGLE, J; JOE, L; MURPHY, K.M.; SMITH, D. 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*, 12, 2003–2009.
- CULLEN, L.JR.; BODMER, R.E.; PADUA, C.V. 2000. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. *Biological Conservation*, 95: 49-56.
- EIZIRIK, E. 1996. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. *Brazilian Journal of Genetics*, 19 (4): 23-29.
- FAHRIG, L.; BAUDRY, J.; BROTONS, L.; BUREL, F.G.; CRIST, T.O.; FULLER, R.J.; SIRAMI, C.; SIRIWARDENA, G.M.; MARTIN, J. 2011. Functional landscape heterogeneity and animal biodiversity in agricultural landscapes. *Ecol. Lett.*, 14, 100–111.
- FARRELL, L.E.; ROMAN, J.; SUNQUIST, M.E. 2000. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology*, 9, 1583–1590.

- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto, Sp: Sociedade Brasileira de Genética. 280 p.
- GAGNEUX, P.; BOESCH, C.; WOODRUFF, D.S. 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology*, 6, 861–868.
- GALETTI, M.; KEUROGHLIAN, A.; HANADA, L.; MORATO, M.I. 2001. Frugivory and seed dispersal by the lowland tapir (*Tapirus terrestris*) in southeast Brazil. *Biotropica* 33: 723–726.
- GOUDET, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics *Journal of Heredity*, 86: 485-486.
- HAJKOVA, P.; ZEMANOVA, B., BRYJA, J. 2006. Factors affecting success of PCR amplification of microsatellite loci from otter faeces. *Molecular Ecology Notes*, 6, 559–562.
- JORDANO, P. ; FORGET, P.M.; LAMBERT, J.E.; BOHNING-GAESE, K.; TRAVESET, A.; WRIGHT, S.J. 2010. Frugivores and seed dispersal: mechanisms and consequences for biodiversity of a key ecological interaction. 321-323.
- LICONA, M.; MCCLEERY, R.; COLLIER, B.; BRIGHTSMITH, D.J.; LOPEZ, R. 2011. Using ungulate occurrence to evaluate community-based conservation within a biosphere reserve model. *Animal Conservation*. 14: 206–214.
- LYNCH, M.; RITLAND, K. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, v.152, p.1753-1766.
- MAZZOLLI, M. 2006. Persistência e riqueza de mamíferos focais em sistemas agropecuários no planalto meridional brasileiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 108pp.
- MÉDICI, E. P. 2010. Assessing the Viability of Lowland Tapir Populations in a Fragmented Landscape. 2010. 292 f. Tese (Doutorado) - University Of Kent, Canterbury.
- NAVEDA, A., DE THOISY, B., RICHARD-HANSEN, C., TORRES, D.A., SALAS, L., WALLANCE, R., CHALUKIAN, S. & DE BUSTOS, S. 2008. *Tapirus terrestris*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. <<http://www.iucnredlist.org/>>. Downloaded on 25 March 2010.
- NORTON, J.E.; ASHLEY, M.V. 2004. Genetic variability and population structure among wild Baird's tapirs. *Anim Cons* 7:211–20.
- OLIVEIRA-SANTOS, L. G.R.; ZUCCO, C. A.; ANTUNES, P.C.; CRAWSHAW JR., P.G. 2010. Is it possible to individually identify mammals with no natural markings using camera-traps? A controlled case-study with lowland tapirs. *Mamm. biol.* 75: 375–378.

- PAETKAU, D.; WAITS, L.P.; CLARKSON, P.L.; CRAIBGHEAD, L.; VYSE, E.; WARD, R.; STROBRCK, C. 1998. Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. *Conservation Biology*, 12(2): 418-429.
- 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.
- PIZO, M.A. 2004. Frugivory and habitat use by fruit-eating birds in a fragmented landscape in southeast Brazil. *Ornitologia Neotropical*, 15 (suppl.): 117-126.
- POMP, D.; GOOD, B.A.; GEISERT, R.D.; CORBIN, C.J.; CONLEY, A.J. 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *J Anim Sci* 73:1408-1415.
- POMPANON, F.; BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; TABERLET, P. 2005. Genotyping errors: causes consequences, and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 6, 847–859.
- ROPER, T.J.; CONRADT, L.; BUTLER, J.; CHRISTIAN, S.E. 1993. Territorial marking with faeces in badgers (*Meles meles*): a comparison of boundary and hinterland latrine use. *Behaviour*, 127, 289.
- SANCHES, A.; FIGUEIREDO, M.G.; HATANAKA, T.; PAULA, F.F.P.; SILVEIRA, L.; JÁCOMO, A.T.A.; GALETTI JR., P.M. 2009. Microsatellite loci isolated from the lowland tapir (*Tapirus terrestris*), one of the largest Neotropical mammal. *Conservation Genet Resour*, 1:115–117.
- SANCHES, A.; PEREZ, W.A.M; FIGUEIREDO, M.G.; ROSSINI, B.C.; CERVINI, M.; GALETTI JR., P.M.; GALETTI, M. 2011. Wildlife forensic DNA and lowland tapir (*Tapirus terrestris*) poaching. *Conservation Genet Resour*, 3:189-193.
- SCHUELKE, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR products. *Nat. Biotechnol.* 18: 233–234.
- TABERLET, P.; WAITS, L.; LUIKHART, G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecological Evolution*, 14, 323–327.
- TÓFOLI, C. F. Frugivoria e dispersão de sementes por *Tapirus terrestris* (Linnaeus, 1758) na paisagem fragmentada do Pontal do Paranapanema, São Paulo. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado) em Ecologia, Departamento de Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- TROLLE, M; NOSS, A.J.; CORDEIRO, J.L.P.; OLIVEIRA, L.F.B. 2008. Brazilian Tapir Density in the Pantanal: A Comparison of Systematic Camera-Trapping and Line-Transect Surveys. *Biotropica*, 40 (2):211-217.

- VALIERE, N. 2002. GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, 2: 377-379.
- VERGARA, P.M., SIMONETTI, J.A. 2006. Abundance and movement of understory birds in a Maulino Forest fragmented by pine plantations. *Biodiversity Conserv.* 15, 3937–3947.
- VIANA, V. M. & PINHEIRO, L. A. F. V. 1998. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. *Série Técnica IPEF* 12 (32): 25-42.
- VIDOLIN, G. P.; BIONDI, D.; WANDEMBRUCK, A. 2009. Seletividade de habitats pela anta (*Tapirus terrestris*) e pelo queixada (*Tayassu pecari*) na Floresta com Araucária. *Sci. For.*, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 447-458
- WAITS, L.P.; LUIKART, G.; TARBELET, P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10: 249-256.