UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

ECOLOGIA

Paola Mandetta Tokumoto

Ecologia molecular como ferramenta no estudo populacional do último megamamífero sulamericano: a anta (*Tapirus terrestris*) no Pantanal de Nhecolândia, MS

Rio Claro
2012

PAOLA MANDETTA TOKUMOTO

ECOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA NO ESTUDO POPULACIONAL DO ÚLTIMO MEGAMAMÍFERO SULAMERICANO: A ANTA (*Tapirus terrestris*) NO PANTANAL DE NHECOLÂNDIA, MS

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
2012

591.15 Tokumoto, Paola Mandetta
T646e Ecologia molecular como ferramenta no estudo populacional do último megamamífero sulamericano: a anta (Tapirus terrestris) no Pantanal de Nhecolândia, MS / Paola Mandetta Tokumoto. - Rio Claro : [s.n.], 2012
29 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

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

1. Genética animal. 2. Microssatélites. 3. Diversidade genética. 4. Identificação individual. 5. Análise não-invasiva. I. Título.

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

Dedico este trabalho à minha família,
orientadora e à turma de Ecologia – 2008.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente aos meus pais e avôs, que sempre me deram segurança, incentivaram minhas escolhas, minhas conquistas e me deram forças para continuar. Tenho certeza que sem eles não chegaria aqui.

À minha orientadora e amiga Lelê, por todas as lições aprendidas (que vão além da academia) e ao co-orientador Mauro Galetti.

Aos administradores da tão agradável Fazenda Barranco Alto, Lucas e Marina pela força e apoio ao trabalho e por reconhecerem a importância da pesquisa na conservação da Biodiversidade e à Luisa, pelas coletas e pela companhia nos dias que passamos em campo.

Às minhas *Tombas-sisters (rs)*: Say e Issa, que me ensinaram muito e com as quais vivi momentos de muita alegria, companheirismo, amizade, sendo as infelicidades tão ínfimas na minha memória...

Agradeço à turma Ecologia 2008, pelos momentos intensos de alegrias, compartilhamento de situações das mais variadas... uma família (ora irmãos, ora pais e até mesmo avôs, rs) da qual sempre me orgulhei. Aprendi a valorizar coisas simples, como simplesmente estarmos juntos!

Ao Urucum, por me dar força para continuar e que cada vez mais admiro seu caráter único.

Agradeço ao Miltinho, por principalmente ter me mostrado um lado humano de pesquisar, além as diversas abordagens paisagísticas apaixonantes.

Aos professores que me ensinaram a Ecologia, cada uma na sua especialidade e personalidade, me dando essa formação pessoal e profissional tão abrangente e única.

A todas as pessoas que passaram na minha vida nessa fase maravilhosa e que de alguma forma fizeram diferença no que sou hoje.

Por fim... De-**dí**-co à Ecologia!!

“Queremos saber, queremos viver confiantes no futuro.
Por isso se faz necessário prever qual o itinerário da ilusão
A ilusão do poder
Pois se foi permitido ao homem tantas coisas conhecer
É melhor que todos saibam o que pode acontecer
Queremos saber, queremos saber
Queremos saber, todos queremos saber.”

(Gilberto Gil)

Resumo

Impactos antrópicos são os principais causadores da atual e acelerada taxa de extinção. Os grandes vertebrados são os mais susceptíveis a essas perturbações e tendem a um rápido declínio populacional. A anta, *Tapirus terrestris,* último representante dos megamamíferos da América do Sul, está ameaçada na maioria da sua distribuição geográfica pela pressão de caça e a perda, degradação e fragmentação dos habitats. Principalmente as grandes áreas podem sustentar populações viáveis de grandes mamíferos. Uma dessas áreas é o Pantanal brasileiro, o qual possui um potencial habitat para a sobrevivência da espécie. Por possuir hábito noturno e solitário, a anta é raramente visualizada em seu habitat natural, tornando difícil a obtenção de informações de estrutura e censo populacional por meio de métodos e técnicas tradicionais de campo. O DNA proveniente de amostras fecais, somado à aplicação de marcadores microssatélites para a identificação individual constituem importantes ferramentas para o monitoramento de populações. Neste trabalho aplicamos métodos não-invasivos para estimar o tamanho populacional e a distribuição espacial de antas em uma área do Pantanal de Nhecolândia. Obtivemos um sucesso na análise de 23% das amostras, identificamos 12 indivíduos em uma área de 18 km^2 (0,66 antas/ km^2). Ao levantarmos outros estudos populacionais com rádio telemetria, armadilha fotográfica, identificação de pegadas e transecto linear, a densidade de *T. terrestris* variou de 0.34 a 0.68 antas/ $km^{2.}$ Também comparamos o sucesso obtido nesse estudo com outro realizado em uma área de cerrado, relacionando-os com as diferentes condições ambientais em que as fezes estavam expostas. Através desta concluímos que para o planejamento de um trabalho de genética não-invasiva, é essencial levarmos em conta a as características do meio em que as amostras estão dispostas e os locos de microssatélites utilizados para o tipo de DNA encontrado.

Palavras-chave: microssatélites, identificação individual, diversidade genética

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO. 5
2. OBJETIVOS. 9
3. MATERIAL E MÉTODOS. 10
3.1. Área de Estudo 10
3.2.Coleta 10
3.3.Extração de DNA. 11
3.4.PCR e marcadores de microssatélites 11
3.5.Genotipagem. 12
3.6. Forma de análise dos dados 12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 13
4.1. Tamanho mínimo populacional. 13
4.1.1. Sucesso de amplificação e genotipagem 13
4.1.2. Identificação individual e distribuição espacial dos indivíduos .. 14
4.2. Diferentes métodos para estudos de densidade populacional de *T. terrestris*. 16
4.3. Diversidade genética. 18
4.4. Efetividade do uso de genética não-invasiva em estudos populacionais de antas sob diferentes condições ambientais. 20
5. CONCLUSÃO. 24
6. REFERÊNCIAS 25

1 Introdução

Os impactos antrópicos, cada vez mais freqüentes, estão entre os principais causadores de extinções (PIMM; MOULTON; JUSTICE, 1994; FLANNERY, 2001). Evolutivamente, os grandes vertebrados, por possuírem características biológicas determinantes de fragilidade, tais como apresentar densidades populacionais e taxas reprodutivas reduzidas, são os primeiros a serem afetados por essas perturbações e tendem a um rápido declínio populacional (CARDILLO et al, 2005), resultando em sérias conseqüências ao ecossistema (WRIGHT et al, 2007).

Entre 10 e 50 mil anos atrás (final do Pleistoceno) parte dos maiores herbívoros da América do Sul chegavam a pesar mais de sete toneladas (HANSEN; GALETTI, 2009). A anta, *Tapirus terrestris* (Figura 1), último representante destes organismos, pesa em torno de 300 kg e é o maior mamífero terrestre da América do Sul cis-andina (MARTIN; KLEIN, 1995, EISENBERG; REDFORD, 1999).

Figura 1 - Anta (*Tapirus terrestris*) com filhote em salina na Fazenda Barranco Alto, MS.



Fonte: Lucas Leuzinger

Hansen e Galetti (2009) mostram que há uma estreita ligação entre o tamanho do herbívoro e sua função no ecossistema como dispersor/ predador de

sementes. Deste modo, a anta apresenta funções ecológicas extremamente importantes (JANZEN,1981; EISENBERG, 1990) como a dispersão e predação de sementes, especialmente de grandes sementes, já que nenhum outro animal é capaz de dispersar sementes de grande porte e em grandes quantidades (BODMER, 1990; FRAGOSO, 1997; GALETTI et al, 2001).

No Brasil, esses animais são abundantes somente em partes da Amazônia e Pantanal, mas são extremamente raros na Mata Atlântica (CULLEN et al, 2000; FLESHER, 2005; ARAÚJO et al, 2008), já que possuem extensa área de vida, hábito solitário e apresentam um longo período de gestação (em torno de 383 dias) com o nascimento de apenas um filhote (PADILLA; DOWLER, 1994; EISENBERG; REDFORD, 1999).

Uma avaliação recente do estado de conservação de várias espécies de ungulados foi realizada para a anta considerando cada bioma separadamente de modo a fundamentar políticas públicas de conservação apropriadas à espécie e a cada região do país (MÉDICI et al, 2012). Enquanto que no Brasil a anta foi classificada como vulnerável pelos critérios A2bcd+A3bcd (função da redução populacional). Foi classificada como menos preocupante na Amazônia, em perigo na Mata Atlântica, regionalmente extinta na Caatinga, em perigo no Cerrado e quase ameaçada no Pantanal (MÉDICI et al, 2012).

Principalmente as grandes áreas podem sustentar populações viáveis de grandes mamíferos (CARDILLO et al, 2005). Uma dessas áreas é o Pantanal brasileiro (MILLER, 1930; TROLLE et al., 2008), uma das maiores planícies inundáveis do mundo. Esse abriga em torno de 124 de espécies de mamíferos, sendo um refúgio e proteção para diversas espécies ameaçadas em outros ecossistemas, garantindo sua viabilidade (HARRIS et al, 2005). Trolle (2003) sugeriu que essas áreas alagadas são uma fortaleza para a anta brasileira. No terceiro Workshop para a Conservação da Anta (TABER et al., 2006) estimou-se que os mais de 120,000 km² do Pantanal possuem um potencial habitat para a espécie, representando uma Unidade de Conservação para Anta (TCU, ‘*Tapir Conservation*

Unit'). Todavia, há escassez de estudos da densidade populacional (TROLLE et al, 2008) e ausência de trabalhos genéticos de *T. terrestris* em áreas naturais do Pantanal, os quais são importantes para planos de conservação, além de uma melhor compreensão do papel do Pantanal na proteção da anta brasileira (TROLLE et al, 2008).

Por possuir hábito noturno e solitário, é raramente visualizada em seu habitat natural, tornando difícil a obtenção de informações de comportamento ou de estrutura e censo populacional por meio de métodos e técnicas tradicionais de campo.

Frente a cenários como estes, a aplicação de métodos moleculares desenvolvidos para amostragem não-invasiva torna-se de grande valia a estudos populacionais em genética da conservação, já que estes possuem uma logística simples e não exigem um contato direto com o animal a ser estudado (PUTMAN, 1984; CLEVENGER, 1993). O DNA proveniente de amostras de fezes, pêlos, penas e outros materiais biológicos somado à aplicação de marcadores microssatélites (sequências de 1-5 pb repetidas em *tandem* altamente variáveis quanto ao número de repetições; FRANKHAM et al, 2008) constituem importantes ferramentas para o monitoramento de populações, localização dos indivíduos e variabilidade genética (TABERLET et al, 1996). Estudos mostram que as antas podem defecar em latrinas (GALETTI et al, 2001; TÓFOLI, 2006) e portanto as suas fezes são amostradas facilmente.

Esse trabalho pretende cobrir uma lacuna, adicionando o método genético no conhecimento de como amostrar espécies pouco visualizadas como as antas. Analisaremos, através de genética não-invasiva junto a marcadores microssatélites, amostras fecais de antas coletadas na Fazenda Barranco Alto, uma região remota com poucos distúrbios, no Pantanal de Nhecolândia, o que possibilita a identificação dos indivíduos que depositaram as fezes e, com isso, permite a obtenção de estimativas do tamanho populacional e a variabilidade genética.

Relacionaremos esses dados genéticos com a estrutura da paisagem, a qual é caracterizada pela presença de grande quantidade de lagoas existentes na área (baías e salinas), fornecendo informações úteis para a conservação da espécie em áreas naturais.

2 Objetivos

Objetivo geral do presente projeto é:

- Estimar o número mínimo populacional, analisar a diversidade genética e buscar entender a distribuição espacial de antas em uma região do Pantanal de Nhecolândia com a utilização de marcadores microssatélites em amostras fecais coletadas em campo.

Sendo assim, os objetivos específicos são:

- Mapear as amostras coletadas em campo;
- Analisar geneticamente as amostras fecais de anta coletadas com a utilização de marcadores microssatélites;
- Genotipar as amostras coletadas para a identificação individual e estimar o tamanho mínimo populacional de antas na área de estudo;
- Determinar o nível de variabilidade genética da população estudada;
- Relacionar os dados genéticos obtidos com a paisagem estudada.

3 Material e métodos

3.1 Área de estudo

O Pantanal brasileiro, uma das maiores planícies inundáveis do mundo, apresenta fauna e flora influenciadas pela Amazônia, Cerrado, Chaco e Mata Atlântica (ADÁMOLI, 1982). Caracteriza-se por apresentar mosaicos de vegetação condicionados, principalmente, pelo pulso de inundação, que varia de ano para ano e por variações locais no relevo e tipo de solo (HAMILTON et al, 1996; JUNK; SILVA, 1999).

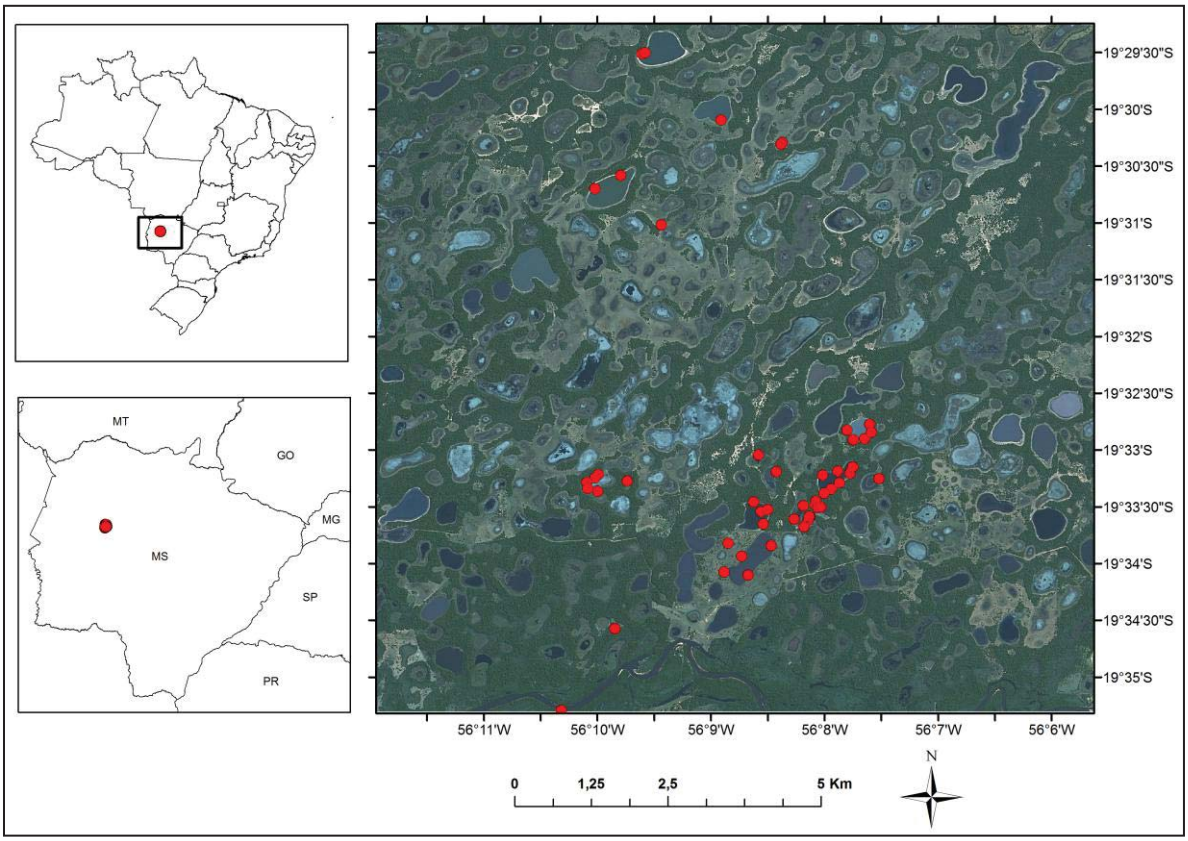
Da Silva & Abdon (1998) dividiram o Pantanal em 11 sub-regiões. Uma delas, talvez a de maior importância para a fauna e a pecuária da região, é a Nhecolândia. Há numerosas lagoas com características espaciais, físicas, químicas e biológicas muito variadas, denominadas localmente de baías, quando hipossalinas, e de salinas, quando com águas salobras. A Fazenda Barranco Alto (19°34' S; 56° 9' O) fica a 250 km da capital do estado de Mato Grosso do Sul, próxima à cidade Aquidauana (Figura 2).

3.2 Coleta

As fezes foram coletadas ativamente de agosto de 2009 a julho de 2010 em salinas e em algumas latrinas, mediante as autorizações concedidas (IBAMA n° 13418-4 e IF n° 42.654/2007). A distribuição das amostras coletadas na área de estudo (18 km^2) pode ser visualizada na Figura 2.

As amostras foram estocadas em etanol 80% e mantidas a 20° C até o momento de extração de DNA. Além disso, cada amostra foi georreferenciada com um GPS Garmin 60 cSX.

Figura 2 – Localização da Fazenda Barranco Alto (Mato Grosso Sul) e distribuição das amostras coletadas.



3.3 Extração de DNA

O DNA das amostras fecais das antas foi extraído com a utilização dos kits comerciais "*Quiamp DNA Stool Mini Kit" (Quiagen)* e *Spin Stoll DNA Kit*, desenvolvidos para esse tipo de material.

3.4 PCR e marcadores microssatélites

Para a identificação individual das amostras coletadas foi utilizado um conjunto de locos de microssatélites desenvolvidos para a espécie por Sanches et al. (2009). As PCRs foram testadas e re-padronizadas para a amplificação dos locos

em amostras de DNA provenientes de fezes. As condições das reações estão de acordo com Sanches et al. (2009).

3.5 Genotipagem

Determinamos os genótipos por meio do software *GeneMarker 1.85*, após serviço terceirizado de genotipagem em seqüenciador automático *ABI 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems). No entanto, para a determinação dos genótipos, foram realizadas pelo menos duas réplicas de cada indivíduo/loco, de modo a diminuir o ruído devido a erros de genotipagem típicos de amostras não-invasivas (KOHN & WAYNE, 1997). Os genótipos homozigotos foram confirmados somente em uma terceira amplificação (EGGERT et al, 2003).

3.6 Forma de análise dos dados

Através dos genótipos, cada um dos indivíduos amostrados foram identificados e assim, a abundância e o tamanho mínimo populacional da espécie foi estimada para a região de estudo.A identificação individual foi conduzida com o auxílio do programa GIMLET (Valiére, 2002) em que os genótipos obtidos para os diferentes *loci* analisados podem ser analisados em conjunto. Ainda nesse programa foi estimada a probabilidade de identidade, i.e., a probabilidade de dois indivíduos aleatoriamente amostrados compartilharem os mesmos genótipos para os loci analisados (PAETKAU et al, 1998; WAITS et al, 2001) conferindo maior confiabilidade aos resultados.

A partir dos dados moleculares das amostras fecais da anta, foi estimado o nível de variabilidade da população (número de alelos, riqueza alélica, heterozigosidade, equilíbrio de Hardy-Weinberg) utilizando os programas GENEPOP (RAYMOND & ROUSSET, 1995) e FSTAT (GOUDET, 1995).

Para todos os testes múltiplos de significância foi adotada a correção de Bonferroni (NARUM, 2006).

4 Resultados e Discussão

4.1 Tamanho mínimo populacional

4.1.1Sucesso de amplificação e genotipagem

Foram coletadas 61 amostras fecais de antas, sendo 28 coletadas em 2009 e 33 em 2010 (Figura 2). O DNA destas foi extraído e reação de PCR foi padronizada. No entanto, as amostras coletadas no ano de 2009 não amplificaram após quatro PCRs do loco de maior sucesso de amplificação (Tter10), sendo então desconsideradas na análise.

Das 33 amostras restantes, o sucesso de amplificação (número de amostras amplificadas para determinado loco/ número total PCRs para o mesmo loco) e de genotipagem (número de amostras que confirmaram o mesmo genótipo em pelo menos duas genotipagens/ número total de amostras genotipadas mais de uma vez) e a repetibilidade dos genótipos (a repetição de um genótipo na réplica ou tréplica de sua genotipagem/número total de repetições de genotipagens para cada amostra e loco) para oito locos analisados podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1- Sucesso de Amplificação e Genotipagem para os locos utilizados

Loco	Sucesso de Amplificação	Sucesso de Genotipagem	Repetibilidade dos Genótipos
Tter10	0,81	0,66	0,57
Tter11	0,58	0,27	0,12
Tter13	0,60	0,25	0,33
Tter18	0,57	0,47	0,27
Tter4	0,57	0,33	0,37
Tter5	0,54	0,36	0,25
Tter9	0,54	0,16	0,09
Média	0,60	0,36	0,28

O sucesso de amplificação em amostras não-invasivas pode ser reduzido como resultado de artefatos, como por exemplo não amplificação de alelos existentes (*dropout*), causada pela má qualidade do DNA, pelo tempo de

armazenamento e a idade das fezes no momento da coleta (POMPANON et al, 2005). Outro estudo com análise genética de fezes mostrou um sucesso de amplificação em torno de 70% (BELEMAIN et al, 2005). Neste trabalho encontramos um sucesso de amplificação em torno de 60%, indicando nas primeiras etapas a viabilidade do estudo. Além disso, pela pouca quantidade de DNA e pela má qualidade do material, na genotipagem pode ocorrer a amplificação de alelos falsos (TABERLET et al, 1999). Dentre os locos testados até então, o loco com maior sucesso foi o Tter 10 (81% de amplificação e 66% de genotipagem), sendo o com melhor performance para esse tipo de estudo. O loco Tter 9 apresentou sucessos de amplificação, genotipagem e repetibilidade do genótipo muito baixo, sendo, por isso, foi retirado da análise. Vale ressaltar que um número menor de PCRs foi realizado com este loco, e o sucesso de genotipagem e repetibilidade de determinado loco é aumentado com o número de repetições da PCR.

4.1.2 Identificação individual e distribuição espacial dos indivíduos

Para realizarmos a identificação individual das amostras, só analisamos aquelas que tiveram seu genótipo confirmado para no mínimo três locos. As demais amostras foram descartadas, pois consideramos que apenas um ou dois locos genotipados não traz informação suficiente para a identificação e diferenciação dos indivíduos. A tabela abaixo (Tabela 2) mostra os valores de Probabilidade de Identidade (PI), é uma estimativa da probabilidade média de dois indivíduos da mesma população terem os mesmos genótipos, calculada no programa GeneAlex (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

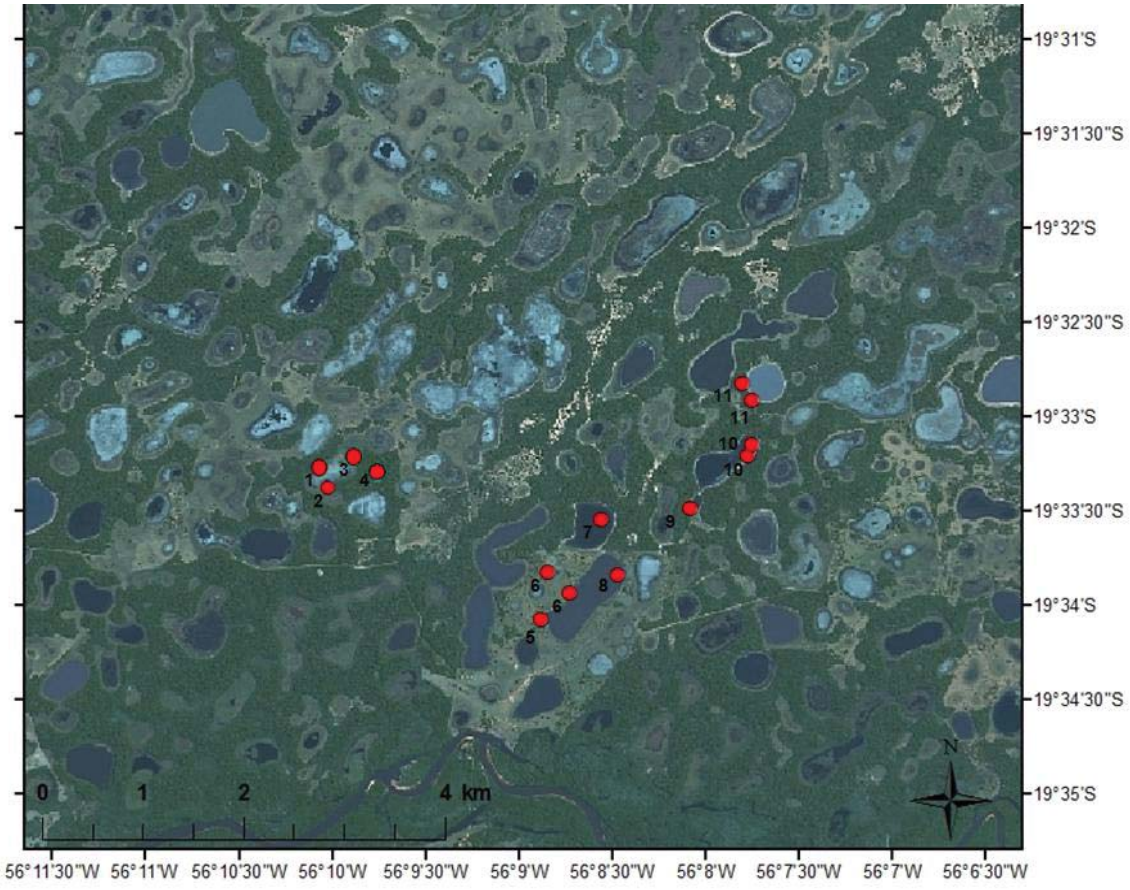
Tabela 2 - Probabilidade de identidade (PI) dos seis locos de microssatélites de T. terrestris utilizados no estudo.

Loco	**Tter10**	**Tter4**	**Tter5**	**Tter18**	**Tter11**	**Tter13**	**TOTAL**
PI	$1,8X10^{-1}$	$3,2X10^{-2}$	$1,5X10^{-1}$	$1,3X10^{-1}$	$7,4X10^{-2}$	$5,8X10^{-2}$	$5,0X10^{-7}$

Quando analisamos a Probabilidade de Identidade total, obtida pela multiplicação da PI de todos os locos (WAITS, et al, 2001), notamos que a probabilidade de dois indivíduos compartilharem o mesmo genótipo é extremamente baixa ($5,0X10^{-7}$) e que, portanto, o poder de identificação individual dos locos utilizados em conjunto é alto.

Sendo assim, das 33 amostras analisadas, foi possível realizarmos a identificação individual de 14 amostras. Foram encontrados 11 genótipos distintos, sendo cada genótipo diferente correspondente a um indivíduo. Podemos afirmar então que a população de estudo possui um mínimo de 11 indivíduos, sendo que três deles foram recapturados, evidenciado pelo genótipo idêntico correspondentes à amostras fecais diferentes (Figura 3).

Figura 3- Localização dos 11 indivíduos da população estudada (os indivíduos 6, 10 e 11 foram recapturados).



Em relação à distribuição espacial das recapturas, podemos constatar um padrão detectado para diversas espécies de mamíferos (GORMAN, 1990; GORMAN; TROWBRIDGE, 1989; GOSLING, 1982; MACDONALD, 1980), que é o comportamento de utilização de latrinas, definido como a seleção de locais não-aleatórios para defecação (IRWIN et al, 2004), podendo ser utilizadas para comunicação química olfativa (GORMAN, 1990; GORMAN & TROWBRIDGE, 1989), definição de território (GORMAN & TROWBRIDGE, 1989), reduzindo a chance de transmissão de parasitas (GILBERT, 1997) e de ataque de predadores (BOONSTRA et al, 1996).

Os resultados de identificação individual revelaram a utilização de uma latrina por um mesmo indivíduo em eventos de defecação diferentes, bem como o compartilhamento com a existência de fezes de mais de um indivíduo utilizando uma mesma latrina. Para *T. terrestris*, não há estudos voltados ao comportamento de defecação em latrinas. Não sabemos se há um sentido biológico-ecológico ou se ela geralmente é utilizada por mais de um indivíduo. Entretanto, esse comportamento deve influenciar o padrão de dispersão de sementes por esses frugívoros, e possivelmente o controle populacional das espécies vegetais.

4.2 Diferentes métodos para estudos de densidade populacional de *Tapirus terrestris*

Comparações de métodos para determinar densidade populacional de antas vêm sendo realizadas em alguns estudos (TROLLE et al, 2008; MÉDICI, 2010; NOSS et al, 2003).

Estudos preliminares realizados no Pantanal encontraram uma densidade de antas de 0.58 antas/km^2 através de armadilhas fotográficas e 0.55 antas/km^2 utilizando transecto-linear (TROLLE et. al, 2008). No presente estudo, foi identificado um número mínimo de 11 indivíduos dentro de uma área de 18 km^2, 0.61 antas/ Km^2(Tabela 3). Os resultados semelhante com ao obtido pelos outros métodos pode indicar uma densidade populacional de antas bastante próxima do

real, em habitats conservados como o Pantanal. Entretanto, é importante levar em consideração os diferentes métodos utilizados, as diferentes regiões e áreas amostradas. Porém, visto que as coletas não foram realizadas de forma padronizada a população pode estar sub-amostrada, podendo haver um número maior de indivíduos na área.

Médici (2010) comparou três métodos de amostragem populacional de *T. terrestris* no Pontal do Paranapanema, obtendo 0.34 antas/ km^2 com Rádio Telemetria, 0.43 antas/km^2 através de Identificação de pegadas e 0.64 antas/ km^2 em transectos lineares (Tabela 3).

Outro trabalho com genética não-invasiva vêm sendo realizado (Godoi et al, dados não publicados) e foi encontrado 0.38 antas/ km^2 em uma área de Cerrado (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação de estimativas de tamanho populacional de *T.terrestris* por diferentes métodos.

Método	Localidade	Área (km^2)	Densidade Populacional (Antas/ km^2)	Referência
Telemetria	Pontal do Paranapanema/ Chaco Boliviano	433/33,4	0.34/ 0.71	Medici, 2010/ Noss et al, 2003
Identificação de pegadas	Pontal do Paranapanema	433	0.43	Medici, 2010
Transecto linear noturno	Pontal do Paranapanema	433	0.64	Medici, 2010
Armadilha fotográfica	Pantanal/ Chaco Boliviano	54/33,4	0.58/ 0.29	Trolle et. al, 2008/ Noss et al, 2003
Transecto linear diurno	Pantanal	1063	0.55	Trolle et. al, 2008
Genética não-invasiva	Cerrado	52.70	0.38	Godoi et al (não publicado)
Genética não-invasiva	*Pantanal*	*18*	*0.61*	*Este estudo*

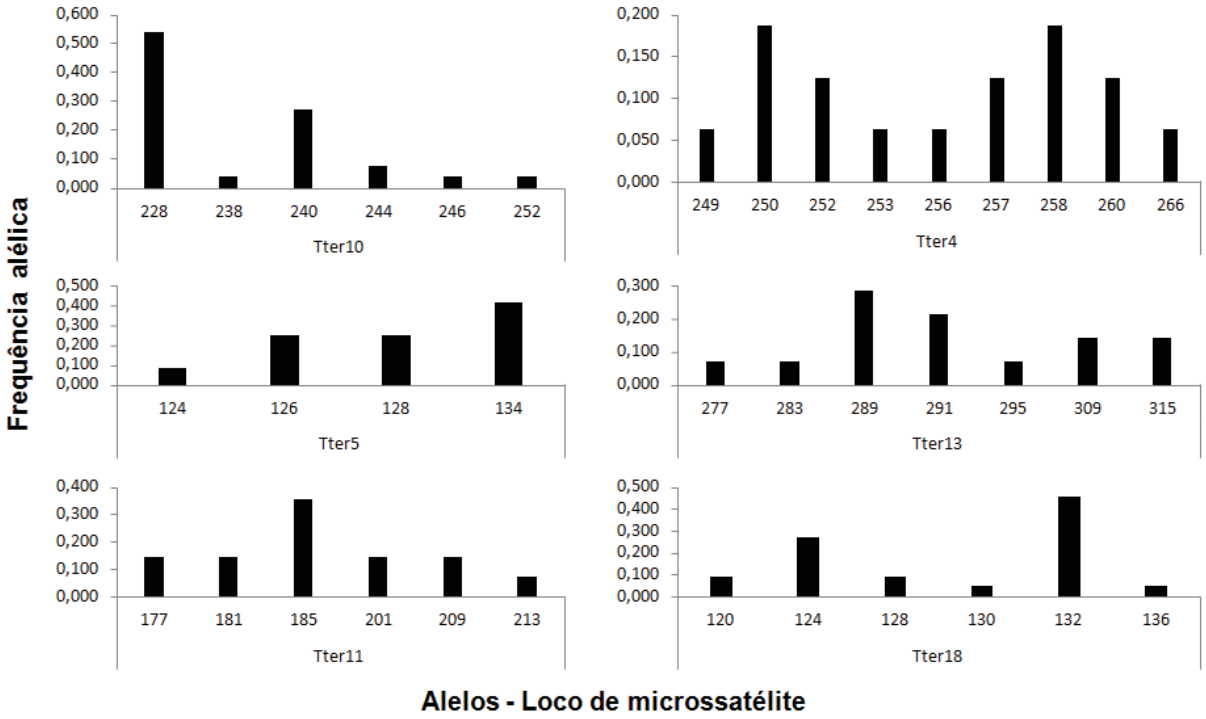
Armadilhas fotográficas não são consideradas muito confiáveis pelo fato da anta não apresentar características fenotípicas que promovam identificação dos diferentes indivíduos com confiabilidade (OLIVEIRA-SANTOS et al., 2010). Médici (2010) também discorre a respeito do alto grau de invasibilidade de estudos de *T. terrestris* com telemetria, que apesar de possuir uma maior credibilidade no que diz respeito a identificação individual e a definição de *home-rang*e, possui um alto custo financeiro, o esforço amostral é bastante grande e os animais precisam ser capturados e imobilizados no momento da colocação dos colares, causando um alto nível de stress. Já o transecto linear pode afetar o comportamento dos animais durante a aproximação e por essa espécie ter hábitos noturnos, os indivíduos são dificilmente avistados. (MÉDICI, 2010; DESBIEZ et al., 2010; DESBIEZ; TOMAS, 2003).

Qualquer método para estimativas populacionais tem seus erros embutidos e suas vantagens. Análises moleculares não-invasivas, como as realizadas nesse estudo, são consideradas uma importante adicional ferramenta, já que estes possuem uma logística simples e não exigem um contato direto com o animal a ser estudado (PUTMAN, 1984; CLEVENGER, 1993)

4.3. Diversidade Genética

Medimos a diversidade genética da população de estudo com a utilização dos dados de genotipagem por microssatélites e assim verificamos a freqüência alélica em cada loco, que se refere à frequencia relativa de um alelo por loco. (Figura 4)

Figura 4 - Frequência alélica e número de alelos para cada loco de microssatélite de T. terrestris no Pantanal.



Além disso, estimamos o número e riqueza de alelos, heterozigosidade esperada e observada, F_{IS}, um índice que nos mostra o grau de endogamia da população (FRANKHAM et al, 2008) e o Equilíbrio de Hardy & Weinberg (H&W), evidenciado pelo valor de P. (Tabela 4)

Tabela 4 - Número de alelos, Riqueza alélica, Heterozigosidade observada e esperada, F_{IS} e P, para o teste de equilíbrio de H&W.

Loco	Número de alelos	Riqueza alélica	Ho	He	Fis	P
Tter10	6	2,986	0,615	0,627	0,019	0,3006
Tter4	9	4,946	0,375	0,867	0,568	*0*
Tter5	4	3,311	0,500	0,694	0,280	0,5881
Tter18	6	3,387	0,273	0,698	0,609	*0,002*
Tter11	6	4,170	0,286	0,786	0,636	*0,0008*
Tter13	7	4,447	0,286	0,816	0,650	*0*
Média	6,3	3,875	0,389	0,748	0,460	--------

O número de alelos da população de estudo teve uma média de 6,3, variando de 4 a 7 alelos por loco e a riqueza alélica média foi de 3,875. A He média prevê a heterozigosidade da população, com base na frequência alélica conhecida. Já a Ho média foi obtida pela média aritmética das Ho para cada loco. Nesse estudo a Ho se mostra menor que a He, além do F_{IS} (mede o grau de endocruzamento dentro da população) ser menor que 0 em todos os locos, indicando déficit de heterozigotos. Porém, não é possível assumir que a população apresente um endocruzamento, dado o pequeno tamanho da amostra. Os locos com maior diferença entre He e Ho são aqueles que de acordo com a correção de Bonferroni (NARUM, 2006), apresentaram $P < 0.00714$ e estão em desequilíbrio de H&W (Tter4, Tter18, Tter11, Tter13).

4.4 Efetividade do uso de genética não-invasiva em estudos populacionais de antas sob diferentes condições ambientais

Em trabalhos com genética não-invasiva devemos levar em conta as características ambientais nas quais as amostras estão submetidas (umidade, temperatura, salinidade etc). Farrell et al (2000) ao estudarem uma população de felinos, obtiveram um maior sucesso de amplificação por PCR para amostras de

fezes coletadas em época seca, do que para aquelas coletadas em época chuvosa. As chuvas intensas podem remover o cólon das fezes, lavando ou degradando o DNA. Além disso, pode haver o crescimento de fungos, ocasionados pelo clima quente e úmido de algumas épocas do ano. Esses fatores diminuem e degradam a pequena quantidade de DNA contido nas fezes do animal estudado.

Além disso, a baixa quantidade de DNA, muitas vezes submetidas à condições adversas do meio, pode ocasionar erros de genotipagem, tais como bandas espúrias e alelos falsos (TABERLET et al, 1999; POMPANON et al, 2005).

Nesse sentido, comparamos a repetibilidade de genótipos e o sucesso de amplificação deste estudo com outro realizado em outra área, com diferentes condições ambientais, utilizando o mesmo método de coleta e latoratório para os mesmos locos de microssatélites, sendo possível relacionar com algumas características nítidas dos ambientes distintos (Figura 5 e 6, respectivamente).

O Estudo com o qual comparamos (Godoi, não publicado) se refere a uma análise realizada nos limites da Fazenda Barra da Moeda (UTM – 22K, 417618W, 7677994S) pertencente à Fibria Celulose S/A - Unidade Três Lagoas, MS. A fazenda possui 5270 hectares e fica localizada à margem Oeste do Rio Paraná. A vegetação 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. As fezes foram coletadas por busca ativa, realizadas por funcionários com frequência, já que a área é de grande acessibilidade.

Já este estudo foi realizado em áreas naturais do Pantanal de Nhecolândia, a qual é caracterizada pela presença de grande quantidade de lagoas existentes na área (baías e salinas). As fezes foram coletadas por principalmente em salinas, através de buscas ativas em intervalos de 15 dias, dada a inacessibilidade da área.

No entorno das salinas há ausência de vegetação arbóreo-arbustiva e na maioria das vezes as fezes se encontravam submersas nessas salinas.

Figura 5. Comparação da Repetibilidade dos Genótipos obtidos no estudo em Três Lagoas e no Pantanal de Nhecolândia.

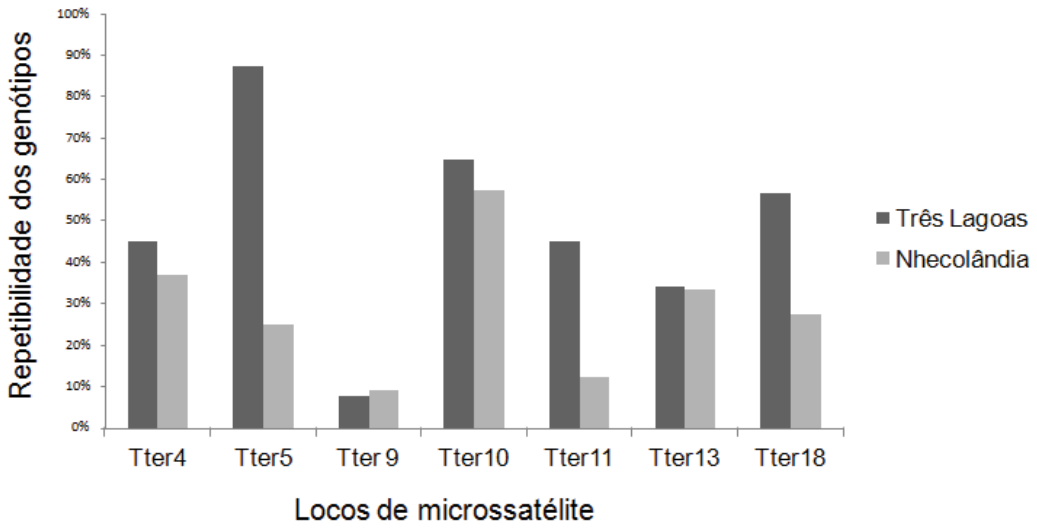
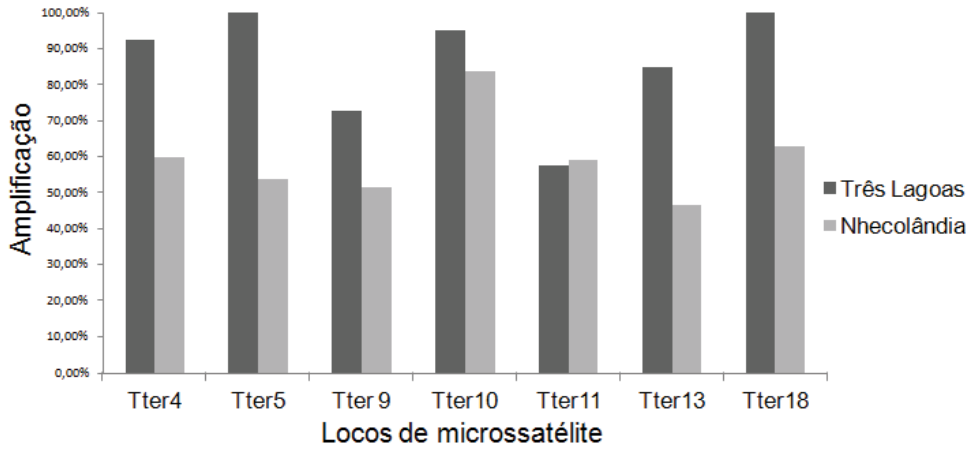


Figura 6. Comparação do Sucesso de amplificação obtidos no estudo em Três Lagoas e no Pantanal de Nhecolândia.



O maior sucesso em Três Lagoas pode estar relacionado às características do meio: 1) as fezes são coletadas sob uma cobertura florestal mais densa

(cerradão ou Eucaliptus), a qual bloqueia a incidência solar direta nas amostras, ocasionando uma menor degradação do DNA; 2) as fezes foram coletadas fora d'água, a qual poderia carrear o DNA das fezes; 3) houve uma facilidade na seleção de fezes frescas para serem amostradas; 3) As fezes eram coletadas em intervalos de dias.

No caso deste estudo (Nhecolândia), 1) as fezes foram coletadas submersas ou no entorno de Salinas, nas quais não há cobertura arbóreo-arbustiva. A alta concentração de sal somada à incidência direta do sol podem tornar o DNA de anta contido nas fezes mais degradado; 2) Houve uma maior dificuldade na distinção das fezes frescas das mais velhas, já que a exposição direta ao sol as resseca em poucas horas quando na beira das salinas, e quando submersas, aparentam serem mais novas do que são.

Sendo assim, em futuros estudos populacionais com genética não-invasiva de antas em ambientes como o deste estudo, recomenda-se amostrar um número maior de fezes do que no estudo de Três Lagoas, já que espera-se um menor sucesso de amplificação e genotipagem.

5 Conclusão

No presente estudo encontramos um mínimo de 11 indivíduos em uma área de 18 km^2 do Pantanal da Nhecolândia. Podemos observar que o uso de ferramentas genéticas não-invasiva em estimativas de tamanho mínimo populacional é de grande valia para o estudo de espécies elusivas como a anta.

Entretanto, é importante ressaltar que o planejamento de um trabalho de ecologia molecular não-invasiva deve considerar a área de estudo (condições em que as fezes estão expostas), bem como os locos a serem utilizados, cujo sucesso pode ser analisado em projetos pilotos para a seleção dos locos apropriados para o tipo de DNA obtido. Estes estudos preliminares são de extrema importância para o planejamento, já que, como visto neste estudo, dependendo da área estudada, o número de amostras e tempo necessários para a caracterização de populações pode variar amplamente.

Posteriormente, esses resultados serão utilizados para uma análise mais ampla, em uma comparação com populações do Cerrado e da Mata Atlântica, as quais estão sendo estudadas em projetos em andamento.

6 Referências Bibliográficas

ADÁMOLI, J. O Pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados: discussão sobre o conceito de complexo do Pantanal. In: Anais do 32º Congresso Nacional da Sociedade Botânica do Brasil. Universidade Federal do Piauí, Teresina. 109-119. 1982.

ARAÚJO, R. M. ; SOUZA, M. B.; RUIZ-MIRANDA C. R . Densidade e tamanho populacional de mamíferos cinegéticos em duas Unidades de Conservação do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Iheríngia Ser Zool. 98: 391-396. 2008.

BELLEMAIN, E.; SWENSON, J.E.; TALLMON, D.; BRUNBERG, S.; TABERLET, P. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears. Conservation Biology, 19 (1): 150-161. 2005.

BODMER R.E. Fruit patch size and frugivory in the lowland tapir (*Tapirus terrestris*). J. Zool. 222: 121- 128. 1990.

CARDILLO, M.; MACE, G. M.; JONES, K. E.; BIELBY, J.; BININDA-EMONDS, O. P.; SECHREST, W.; ORME, C. D. L.; PURVIS, A. Multiple Causes of High Extinction Risk in Large Mammal Species. Science. 309: 1239-1241. 2005

CLEVENGER A.P. 1993. Sign survey as an important tool in carnivore conservation research and management programmes. In: Seminar on the Management of Small Populations of Threatened Mammals. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats (Bern Convention). Strasbourg; France. 36-46. 2005.

CULLEN, Jr L.; BODMER, R. E.; PÁDUA, C. V. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. Biol Conserv 95:49-56. 2000.

DA SILVA, J. D.; ABDON, M. D. Delimitation of the Brazilian Pantanal and its subregions. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 33:1703–11. 1998.

DESBIEZ, A. L. J.; BODMER, R. E.; SANTOS, S. A. Wildlife habitat selection and sustainable resources management in a Neotropical wetland. International Journal of Biodiversity and Conservation. 1(1): 011-020. 2009.

DESBIEZ, A. L. J.; TOMAS, W. M. Aplicabilidade do método de amostragem de distâncias em levantamentos de médios e grandes vertebrados no Pantanal. Embrapa Pantanal. 1o ed. 16p. 2003.

EGGERT, L.S.; EGGERT, J.A.; WOODRUFF, D.S. Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. Mol. Ecology, 12:1389-1402. 2003.

EISEMBERG; J.F. Neotropical mammal communities. In: Gentry A., ed., Four Neotropical rainflorests. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA. P358 – 368. 1990.

EISENBERG, J. F. & REDFORD, K.H. Mammals of the Neotropics. The Central Neotropics. Chicago, University of Chicago Press, vol. 3, X + 609p. 1999.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto, Sp: Sociedade Brasileira de Genética. 280 p. 2008.

FLANNERY, T. The Eternal Frontier. New York: Atlantic Monthly Press. 2001.

FLESHER K. Tapir extinction in the Atlantic Forests between the Rio das Contas and the Rio Paraguaçu. Tapir Conservation 14:13-15. 2005.

FRAGOSO, J.M.V. Tapir-generated seed shadows: scale-dependent patchiness in the Amazon rain forest. Journal of Ecology. 85: 519-529. 1997.

GALETTI, M.; KEUROGHLIAN, A.; HANADA, L.; MORATO, M.I.V. Frugivory and seed dispersal by the Lowland Tapir (*Tapirus terrestris*) in Southeast Brazil. Biotropica, 33 (4): 723-726. 2001.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. J Hered. 86(6): 485-486. 2005.

HAMILTON, S.K.; SIPPEL, S.J. & MELACK, J.M. Inundation patterns in the Pantanal Wetland of South America determined from passive microwave remote sensing. Archives hydrobiology 137(1): 1-23. 1996.

HANSEN, D. M.; GALETTI, M. The Forgotten Megafauna. Science. 3: p 42-43. 2009.

HARRIS, M. B.; TOMAS, W. M.; MOURÃO, G.; SILVA, C. J.; GUIMARÃES, E.; SONODA, F.; FACHIM, E. Desafios para proteger o Pantanal brasileiro: ameaças e iniciativas em conservação. Megadiversidade 1(1): 156-164. 2005.

IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2. <www.iucnredlist.org>.

JANSEN, D. H. Digestive seed predation by Costa Rica Baird´s Tapir. Biotropica, 13 (suppl.): 59-63. 1981.

JUNK, W.J.; DA SILVA, C.J. O "Conceito do pulso de inundação" e suas implicações para o Pantanal de Mato Grosso. pp:17-28. In: Anais do 2º Simpósio sobre Recursos Naturais e Socioeconômicos do Pantanal. Manejo e Conservação. Corumbá, Brasil. 1999.

KOHN M.; WAYNE R.K. Facts from feces revisited. Tree, 12: 223-227. 1997.

MARTIN P.S.; KLEIN R.G. Quaternary extinction. A prehistoric revolution. 3a Ed., University of Arizona Press, Tucson, London. Neotropical Rainforests. New Haven, Yale Univ .Ribeirão Preto: Ed. SBG, 2008. , Press pp. 358-368. 1995.

MÉDICI, E. P. et al. Avaliação do risco de Extinção da Anta brasileira no Brasil. Biodiversidade Brasileira Ano II, Nº 3, 103-116. 2012.

MÉDICI, E. P. Lowand Tapir Populations in a Fragmented Landscape. 292f. Tese (Doutorado em Manejo da Biodiversidade) - Durrel Institute of Conservation and Ecology (DICE). University of Kent. Caterbury, United Kingdom, 2010.

MILLER, F. W. Notes on some mammals of southern Mato Grosso, Brazil. J. Mammal. 11: 10-22. 1930.

NARUM, S.R. Beyond Bonferroni: Less conservative analyses for conservation genetics. Conservation Genetics. 7:783-787. 2006.

NOSS, A.J;CUÉLLAR, R.L.;BARRIENTOS, J.; CUÉLLAR, E.; ARISPE, R.; RÚMIS, D.; RIVERO, K. A câmera trapping and radio telemetry study of lowand tapir (Tapirus terrestris) in Bolivian dry forests. Tapir Conservation: The Newsletter of the IUCN/ SSC Tapir Specialist Group (TSG) 12: 24-32. 2003.

OLIVEIRA-SANTOS, L. G. R.; ZUCCO, C. A.; ANTUNES, P. C.; CRAWSHAW, Jr P. G. 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. 2010.

PADILLA, M.; DOWLER, R.C. *Tapirus terrestris*. Mamm. Species 481: 1-8. 1994.

PAETKAU, D.; WAITS, L.P.; Clarkson, P.L.; CRAIBGHEAD, L.; VYSE, E.; WARD, R.; STROBRCK, C. Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. Conservation Biology, 12(2): 418-429. 1998.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. 6, 288-295. 2006.

PIMM, S. L.; MOULTON, M.P.; JUSTICE, L.J. Bird extinctions in the central Pacific. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. 344: 27-33. 1994.

POMPANON, F.; BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; TABERLET, P. Genotyping errors: causes consequences, and solutions. Nature Reviews Genetics, 6, 847–859. 2005.

PUTMAN, R. J. Facts from faeces. Mammal Review. 14:79-97. 1984.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): a population genetic software for exact test and ecumenism. Journal of Heredity, 86: 248-249. 1995.

SANCHES, A.; FIGUEIREDO, M. G.; HATANAKA, T.; de PAULA, F. F. P.; SILVEIRA L.; JÁCOMO, A. T. A.; GALETTI, Jr. P. M. Microsatellite loci isolated from the lowland tapir (Tapirus terrestris), one of the largest Neotropical mammal. Conservation Genet Resour. 1:115–117. 2009.

TABER, A. S.; CHALUKIAN; MINKOWSKY; SANDERSON, E.; ALTRICHTER, M.; ANTÚNEZ, M.; AYALA, G.; BECK, H.; BODMER, R.; CARTES; J.L.; GOMEZ, C.; GÓMES H.; de THOISY B.; EMMONS L.; ESTRADA N.; FLAMARION de Oliviera L.; FRAGOSO J.; GARCIA R.; GOLDSTEIN.; GÓMEZ H.; KEUROGHLIAN A.; LEDESMA K.; LIZÁRRAGA L.; LIZCANO D.; LOZANO C.; MEDICI P.; MONTENEGRO O.; MORAES E.A.; NERIS N.; NOSS A.; PALACIO V. J.A.; PAVIOLO A.; PEROVIC P.; REYNA-HURTADO R.; RADASHOWSKY J.; RODRIGUEZ O. J.; RUMIZ D.; SALAS L.; SARMIENTO DUEÑAS A.; SARRIA PEREA J.; SCHIAFFINO K.; TOBLER M.; UTRERAS V.; VARELA D.; VENTINCINQUE E.; WALLACE R.; ZAPATA RIOS G.A. 2006. A range-wide status analysis of lowand tapir (Tapirus terrestris) and white-lipped pecaries (Tayassu pecari): Preliminary results for lowand tapirs and conservation implications. In: THIRD INTERNATIONAL TAPIR SYMPOSIUM. 26-31; Buenos Aires, Argentina. January 2006.

TABERLET, P.; GRIFFIN, S.; GOOSSENS, B.; QUESTIAU, S.; MANCEAU, V.; ESCARAVAGE, N; WAITS, L. P.; BOUVET, J. Realiable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. Oxford Universit Press. Nucleic Acids Research. Paris. France. 1996.

TÓFOLI, C.F. Frugivoria e dispersão de sementes por Tapirus terrestris (Linnaeus; 1758) na paisagem fragmentada do Pontal do Paranapanema; São Paulo. M. Sc. Dissertation. Universidade de São Paulo (USP); São Paulo; Brazil. 89p. 2006.

TROLLE, M. Mammal survey in the southeastern Pantanal; Brazil. Biodivers. Cons. 12: 823-836. 2003.

TROLLE, M.; NOSS, A. J.; CORDEIRO, J. L.P.; OLIVEIRA, L. F. B. Brazilian Tapir Density in the Pantanal: A Comparison of Systematic Camera-Trapping and Line-Transect Surveys. *Biotropica*. 40(2): 211–217. 2008.

VALIÈRE, N.; BONEFANT, C.; TOIGO, C.; LUIKART, G.; GAILLARD, J.M.; KLEIN, F. Importance of a pilot study for non-invasive genetic sampling: genotyping errors and population size estimation in red deer. Conservation Biology. 8: 69-78. 2007.

WAITS, L.P.; LUIKART, G.; TARBELET, P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. Molecular Ecology. 10: 249-256. 2001.

WRIGHT, S. J.; STONER, K. E.; BECKMAN, N.; CORLETT, R. T.; DIRZO, R.; MULLER-LANDAU, H. C.; NUÑEZ-ITURRI, G.; PERES, C. A.; WANG, B. C. Biotropica. 39 (3): 289-291. 2007.