

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**GENÉTICA DA REINTRODUÇÃO: O CASO DO
CERVO-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*) NA
ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE JATAÍ.**

Paula Ribas Soares Ferreira

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Outubro de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**GENÉTICA DA REINTRODUÇÃO: O CASO DO
CERVO-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*) NA
ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE JATAÍ.**

Paula Ribas Soares Ferreira

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Outubro de 2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULA RIBAS SOARES FERREIRA – casada, nascida na cidade de Ribeirão Preto, em 5 de outubro de 1984. É bióloga formada pela Universidade Estadual Paulista – FCAV – UNESP, campus de Jaboticabal, em 2009. Durante o curso de graduação foi bolsista de Iniciação Científica por 18 meses pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, na área de Genética, trabalho desenvolvido pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos – NUPECCE. Em agosto de 2009 iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento Animal pela mesma faculdade (FCAV – UNESP), sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte.

“Todo jardim começa com uma história de amor.
Antes que qualquer árvore seja plantada
ou um lago seja construído,
é preciso que eles tenham nascido dentro da alma.
Quem não planta jardins por dentro,
não planta jardins por fora
e nem passeia por eles.”

(Rubem Alves)

Dedico,

A todas aquelas pessoas que contribuíram para que esse trabalho se tornasse possível, sendo ele fruto do esforço de muitos que participaram do grande Projeto do Cervo-do Pantanal de Porto Primavera.
Considerem-se todos co-autores desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo milagre da vida.

Agradeço aos meus pais Renato e Maria Heloisa, pelo amor incondicional, por me fazerem compreender desde tão cedo, o quão importante é o conhecimento na vida de uma pessoa.

Agradeço à minha avó Haydée, pelos conselhos e incentivos que fizeram com que essa etapa da minha vida pudesse ser o mais proveitosa possível.

Agradeço à minha querida irmã Renata. Pelo amor, carinho, compreensão e, principalmente, por sua amizade de valor inestimável.

Agradeço ao meu irmão Arthur, pelo respeito, afeto, companheirismo e pela paciência que teve comigo a vida toda.

Agradeço ao meu afilhado Marcelo, por devolver a alegria a nossa família.

Agradeço ao meu orientador José Maurício Barbanti Duarte, pelo exemplo profissional e pela oportunidade de trabalhar no NUPECCE e poder fazer parte dessa Grande Família.

Agradeço a todos os integrantes do NUPECCE, pela ajuda, companheirismo, carinho, dedicação, conselhos, incentivos. Por proporcionarem um ambiente tão saudável de se trabalhar. De alguma forma, direta ou indireta, todos vocês contribuíram para a finalização desse trabalho.

Agradeço as minhas queridas amigas irmãs: Carolina, Sabrina e Muriel, pessoas tão importantes e que se fizeram presentes em todos os momentos da minha vida.

Agradeço à minha amiga Natália, a quem tive o prazer de conhecer no início da vida acadêmica, estando presente nos momentos mais importantes desde então. “A gente não faz amigos, reconhece-os” (Vinícius de Moraes).

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida durante os primeiros seis meses de mestrado.

Agradeço à FAPESP, pela bolsa concedida durante dezoito meses de mestrado.

Agradeço à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal pela oportunidade de realizar meu trabalho em uma das melhores universidades do país.

Agradeço às professoras Dra. Susana González e Dra. Kelly Zamúdio pela disponibilidade em participar da banca e pelas sugestões que enriqueceram de forma tão valiosa esse trabalho.

Agradeço ao meu marido Luiz Gustavo, pelo amor, carinho, companheirismo atenção e compreensão. Ao seu lado pude encontrar sentido na vida! Muito obrigada por tudo! Amo você! “Quando se ama não é preciso entender o que se passa lá fora, pois tudo passa a acontecer dentro de nós” (Clarice Lispector)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	14
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. O cervo do Pantanal (<i>Blastocerus dichotomus</i>).....	16
2.2. Projeto Experimental de Reintrodução do Cervo-do-Pantanal de Porto Primavera.....	18
2.3. Conseqüências genéticas do tamanho populacional pequeno.....	22
2.4. Verificação da variabilidade genética e determinação do parentesco.....	24
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Amostras.....	27
3.2. Processamento das amostras.....	29
3.3. Extração do DNA das amostras.....	30
3.4. Seleção dos iniciadores.....	30
3.5. Amplificação das amostras.....	31
3.6. Sequenciamento.....	32
3.7. Polimorfismo dos iniciadores.....	33
3.8. Genotipagem.....	33
3.9. Análise dos dados.....	34
3.10. Análise de viabilidade populacional.....	35
IV. RESULTADOS.....	37
4.1. Genotipagem.....	37
4.2. Análise dos dados.....	39
4.3 . Análise de viabilidade populacional (PVA).....	46
V. DISCUSSÃO.....	51
VI. CONCLUSÕES.....	57
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

GENÉTICA DA REINTRODUÇÃO: O CASO DO CERVO-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*) NA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE JATAÍ.

RESUMO - O Projeto de Reintrodução do Cervo-do-pantanal de Porto Primavera foi implementado pelos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Universidade Estadual Paulista, na Estação Ecológica de Jataí (E.E.J.), a fim de conservar a espécie no estado de São Paulo. Para que o sucesso de um programa de reintrodução seja atingido, vários fatores devem ser levados em consideração, entre eles possíveis problemas genéticos decorrentes do pequeno número de indivíduos fundadores, como a perda da diversidade genética devido à deriva genética e a perda do vigor devido à endogamia. Assim, a partir de 6 locos microssatélites nós estimamos os níveis de variabilidade genética dessa população e, juntamente com dados de campo foi possível reconstruir a genealogia da mesma. Foram analisados no total 42 indivíduos: 8 fundadores, 14 nascidos no local e 20 indivíduos da população original. O número total de alelos encontrados na população original foi de 30, perfazendo uma média de 5 alelos por loco, com locos variando de 4 a 7 alelos. Já, na população reintroduzida, o número total de alelos encontrados foi 21, com média de 3,5 alelos por loco, e locos variando de 1 a 4 alelos. A grande perda alélica observada aqui indica que a população reintroduzida passou por um forte gargalo genético em decorrência do efeito fundador sofrido durante sua formação. Em contrapartida, a partir da geração fundadora até a segunda geração da E.E.J., a perda de alelos foi visivelmente menor, apenas 4 alelos foram perdidos. Em acréscimo, dados de heterozigosidade mostram que a população esta mantendo os níveis de diversidade genética (geração fundadora $H=0,5$; segunda geração $H=0,625$). A endogamia é um mecanismo inevitável em pequenas populações, porem os índices encontrados até agora não apontam valores preocupantes (Geração fundadora $Fis=0,01$; segunda geração $Fis=-0,02$). A partir da reconstrução da genealogia, foi possível observar uma contribuição desigual dos fundadores, como por exemplo, o individuo 25 que não se reproduziu, visto o alelo específico que ele possui para o loco CA71. Simulações realizadas no programa Vórtex mostraram que a população da E.E.J., futuramente deverá sofrer os efeitos da depressão endogâmica se não houver conectividade com outras populações. Assim, o efeito

fundador é um processo que causa massiva perda alélica, que ao longo das gerações é acrescida da deriva genética e da seleção, levando à perda da heterozigose, endogamia e potencial efeito de depressão endogâmica. Como o alto custo de programas de reintrodução impede que um número grande de indivíduos seja reintroduzido nas áreas escolhidas, a reintrodução deve ser avaliada criteriosamente como medida de conservação e necessita estar revestida de medidas adicionais de proteção da erosão genética, como por exemplo, a manutenção de um constante fluxo gênico com outras populações, em especial as de cativeiro, com intuito de manter os padrões de diversidade genética dessa pequena população.

Palavras-Chave: *Blastocerus dichotomus*, microssatélites, genealogia, endogamia, variabilidade genética, viabilidade populacional

GENETICS OF REINTRODUCCION: THE CASE OF THE MARSH DEER (*Blastocercus dichotomus*) IN JATAÍ ECOLOGICAL ESTATION

ABSTRACT - The Reintroduced Project of marsh deer was implemented by the researchers from the Deer Research and Conservation Center (NUPECCE) of Unesp, in Jataí's Ecological Station (E.E.J.), to understand the process of colonization of small marshes patches that remain in the São Paulo state. In order to make a reintroduction project successful, several factors must be taken into account; among those, possible genetic problems arising from the small number of founding individuals, such as the loss of genetic diversity due to genetic drift and the loss of fitness due to inbreeding. Hence, from 6 microsatellite loci, we estimated the genetic variability levels of this population and, together with the field data, we were able to reconstruct the genealogy of the members. We analyzed 42 individuals: 8 founders, 14 individuals born into the reintroduced population and 20 individuals from the source population. The total number of alleles found in the original population was 30 (5 alleles per locus), with loci ranging from 4 to 7 alleles. In the reintroduced population, the total number of alleles found was 21 (3.5 alleles per locus) and loci ranging from 1 to 4 alleles. The major allelic loss observed indicates that the reintroduced population went through a strong genetic bottleneck resulting from the founding effect suffered during its establishment. On the other hand, in the generations of the reintroduced population of the E.E.J., the loss of alleles was noticeably smaller. Furthermore, heterozygosity data show that the population has been maintaining the levels of genetic diversity (Founder generation $H=0.5$; second generation $H=0.625$). Inbreeding is an inevitable mechanism in small populations; however, the indexes that have been found so far do not point to worrying values (Founder generation $Fis=0.01$; second generation $Fis=-0,02$). From the genealogy reconstruction, it was possible to observe an uneven contribution from the founders, as for instance, the individual 25, which did not procreate, on account of the specific allele that it possesses for the locus CA71. Simulations carried out in the program vortex showed that the E.E.J. population may suffer the effects of the inbreeding depression in the future if there is not connectivity with other populations. Thus, the founding effect is a process that causes a massive allelic loss which, throughout generations, is added to the genetic drift and selection, leading to heterozygosity

loss, inbreeding and a potential effect of inbreeding depression. As the high cost of reintroduction programs prevents a large number of individuals from being reintroduced in the chosen areas, the reintroduction must be critically evaluated as a measure of conservation, and needs to be surrounded by additional measures of genetic erosion protection, such as the maintenance of a constant gene flow with other populations, especially the captive ones, aiming at maintaining genetic diversity of this small population.

Keywords: *Blastocerus dichotomus*, microsatellites, genealogy, inbreeding, genetic variability, population viability

I. INTRODUÇÃO

O cervo-do-pantanal ocorria originalmente em quase todo o território brasileiro. Atualmente encontra-se classificado como “vulnerável” na lista dos animais ameaçados de extinção do IBAMA e da IUCN (IBAMA-2006; IUCN-2011). Isso se deve a vários fatores, entre eles a perda e fragmentação do seu habitat (TOMÁS et al., 1997), a aproximação com animais domésticos e doenças transmitidas por eles e à caça predatória (TOMÁS et al., 1997).

Dessa forma, projetos e ações que visam à conservação dessa espécie foram considerados necessários pelo grupo de pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), dentre eles o Experimento de Reintrodução do Cervo-do-pantanal de Porto Primavera na Estação Ecológica de Jataí (E.E.J.).

Vários fatores devem ser levados em consideração para que um programa de reintrodução seja bem sucedido, entre eles, possíveis problemas genéticos decorrentes do pequeno número de indivíduos usualmente utilizados, como é o caso da endogamia e do efeito fundador.

A endogamia ocorre devido a acasalamentos consangüíneos, resultando num nível anormal de defeitos relacionados com a expressão de genes recessivos, levando a uma perda considerável na variabilidade genética, o que posteriormente pode levar a um declínio e possível extinção da população. A consangüinidade pode ainda acarretar em outros prejuízos à variabilidade genética devido a depressão endogâmica, que é a queda da performance dos consangüíneos, mais pronunciadas em características de fertilidade e sobrevivência (FALCONER, 1989).

O efeito fundador ocorre quando um pequeno subgrupo de uma população maior se estabelece como uma entidade separada e isolada. Sua reserva gênica leva só uma fração da diversidade genética da população parental. Este é um processo que causa massiva perda alélica, que ao longo das gerações é acrescida da deriva genética e da seleção, levando a perda da heterozigose, endogamia e potencial efeito da depressão endogâmica (SHORROCKS, 1980).

Dentro desse contexto, o presente estudo analisou, através de marcadores moleculares microssatélites, a variabilidade genética da população original (doadora) da bacia do Rio Paraná e da população reintroduzida na Estação Ecológica de Jataí,

com o intuito de avaliar o quanto da diversidade genética a população fundadora trouxe para a população reintroduzida e o quanto dessa variabilidade foi mantida, ao longo das gerações existentes na Estação Ecológica de Jataí. Esses dados nos servirão como base para a conservação dessa população e para a realização de outros projetos dessa natureza, onde poderão nos informar, por exemplo, qual o número de indivíduos fundadores necessário para manter o tamanho de uma população reintroduzida acima de um nível crítico, de modo que uma porção mínima de variabilidade seja transmitida à população e essa consiga se manter, independente da endogamia e efeito fundador.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*)

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) é o maior cervídeo brasileiro, atingindo quando adulto uma altura média na cernelha de 1,3 m e um peso de 100 kg para fêmeas e 130 kg para machos (DUARTE,1997). É uma espécie característica de áreas inundáveis e outros tipos de áreas úmidas da América do Sul (TOMAS *et al.*, 1997). Originalmente, era encontrado em uma região que abrangia desde o sul da Floresta Amazônica e sudeste da região semi-árida da caatinga, oeste da Floresta Atlântica no sudeste e sul do Brasil, até o sul e sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul; chegando ainda à região dos Pampas Del Heath no Peru, e regiões leste da Bolívia, Paraguai, Nordeste da Argentina e extremo Norte do Uruguai (AZARA, 1902; CABRERA, 1961; NOGUEIRA, 1973; JUNGIUS, 1976; HOFMAN *et al.*, 1976) (FIGURA1).

Atualmente a distribuição desta espécie no Brasil encontra-se bastante reduzida e fragmentada, constituindo-se de populações residuais ocorrendo principalmente no Pantanal brasileiro (Estado de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), na região da Ilha do Bananal, Rio Araguaia (Estado de Mato Grosso e Tocantins), no Rio Guaporé (Estado de Rondônia) e nas várzeas remanescentes do Rio Paraná (Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo) (TOMÁS *et al.*, 1997) (FIGURA1).



Blastocercus dichotomus

range type

- native (resident)
- native (breeding)
- native (non breeding)
- reintroduced
- introduced
- origin uncertain
- possibly extinct
- extinct

- national boundaries
- subnational boundaries
- lakes, rivers, canals
- salt pans, intermittent rivers

data source:
IUCN (International Union for Conservation of Nature)

azimuthal equal area central point: 0°, 0°

map created 09/30/2008



Figura 1. Distribuição original e distribuição atual da espécie *Blastocercus dichotomus*. Fonte IUCN 2011.

Esta espécie ocupa ambientes alagáveis e outros tipos de áreas úmidas, que apresentam ciclos bem definidos de cheia e de seca (PIOVEZAN et al., 2001; MAURO et al., 1995). A construção de grandes usinas hidrelétricas causa a destruição deste tipo de ambiente e, conseqüentemente, a redução no número de áreas disponíveis para o estabelecimento de populações viáveis da espécie, já que as cheias artificiais afetam ecologicamente a população, reduzindo o sucesso reprodutivo, aumentando as taxas de mortalidade ao longo do tempo (PIOVEZAN et al., 2003), anulando assim, qualquer possibilidade de sobrevivência e sustentabilidade dessas populações em um longo prazo (CHATRITY et al., 1989). Além disso, as usinas hidroelétricas exercem impacto direto sobre as populações afetadas, causando mortes por afogamento, aumento das enfermidades, fome e interações agonísticas (DUARTE et al., 2003).

Hoje, o cervo-do-pantanal encontra-se na lista de animais ameaçados de extinção, sendo classificado como espécie “vulnerável” no Brasil (IUCN, 2011; IBAMA, 2006) e, mais especificamente, “criticamente em perigo” no estado de São Paulo (São Paulo – SMA, 1998). Isso se deve a uma acentuada retração na sua área de ocorrência, fato esse relacionado à drenagem das várzeas para a expansão das áreas agrícolas e à construção de grandes usinas hidrelétricas, além de outras ameaças como a caça predatória e o contato com doenças introduzidas por bovinos (PINDER & SEAL, 1995).

2.2. Projeto Experimental de Reintrodução do Cervo-do-Pantanal de Porto Primavera

A última população significativa de cervo-do-pantanal no estado de São Paulo ocupava as várzeas do Rio Paraná entre as barragens de Jupia e Porto Primavera (SCHALLER & VASCONCELOS, 1978). Porém, com a construção da usina hidrelétrica de Porto Primavera (1998), esta área foi inundada, formando um reservatório de aproximadamente 200.000 ha, numa área constituída praticamente de várzea, tendo como conseqüência um impacto direto sobre os cervos-do-pantanal ali existentes (PIOVEZAN et al., 2001).

Diante desta situação, o Projeto Cervo-do-pantanal de Porto Primavera foi implementado pelos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Universidade Estadual Paulista (UNESP – Jaboticabal), que consistiu em estudos concentrados na população que seria afetada pela Usina,

na tentativa de entender o efeito deste empreendimento na população de cervos-do-pantanal e conservar uma parcela dessa população. Assim sendo, durante dois anos, foram realizados intensos estudos sobre a movimentação da população durante e após o enchimento, e atualmente, trabalhos importantes de reintrodução e manejo em cativeiro estão em andamento (OLIVEIRA, 2005).

Nessa perspectiva foi elaborado o projeto de Reintrodução do Cervo-do-Pantanal, destinado a reintroduzir animais procedentes da população de Porto Primavera em áreas de várzea remanescentes do Estado, onde a população já estivesse extinta (TOMAS et al., 1997).

Reintrodução consiste em uma estratégia de manejo onde é feita a soltura de animais em ambiente natural apropriado, desde que ocorra dentro da área geográfica original da espécie e já tenha existido uma população de vida livre no local escolhido (CADE, 1988; IUCN, 1984; KONSTANT & MITTERMEIER, 1982). Basicamente, o objetivo final de um programa de reintrodução é o restabelecimento de populações viáveis na natureza (IUCN, 1984).

Um exemplo bem sucedido de estratégia de reintrodução está no programa de Conservação do Mico-Leão-Dourado, o primeiro e mais antigo projeto apoiado pelo Fundo Mundial para a Natureza (WWF) no Brasil, sendo executado pela AMLD – Associação Mico-Leão-Dourado, criada para coordenar todos os trabalhos de conservação da espécie. Em 1984, quando começaram as reintroduções, restavam apenas 200 indivíduos da espécie vivendo em vida livre. Depois de anos de cooperação internacional e um árduo trabalho de campo, a população de micos-leões atingiu uma importante conquista em março de 2001, quando o milésimo mico nasceu na natureza (FRANKHAM *et al.* 2004).

Nos últimos anos tem havido uma série de esforços de reintrodução, mas as dificuldades logísticas, o alto custo de programas dessa natureza e a carência de conhecimento a respeito da biologia e ecologia de muitas espécies, além da degradação e mesmo eliminação dos habitats naturais por ações antrópicas, vem dificultando o uso efetivo dessa técnica como estratégia para a conservação de espécies ameaçadas. No entanto, há condições sob as quais a reintrodução, associada a outras estratégias, torna-se uma ferramenta válida no esforço da conservação (KLEIMAN, 1998).

No Projeto experimental de reintrodução do Cervo-do-pantanal de Porto Primavera, os pesquisadores fizeram um levantamento das áreas de várzea

remanescentes dentro do estado de São Paulo, para escolher o local onde seriam feitas as reintroduções dos animais. De todas as áreas analisadas, apenas duas obtinham condições propícias para receber os animais: A Fazenda Continental, localizada no município de Colômbia (norte do estado) e a Estação Ecológica de Jataí (E.E.J.), localizada no município de Luis Antonio (nordeste do estado).

A E.E.J. é uma unidade de conservação criada pelo decreto lei nº 18997 em 15/06/82, sendo administrada pelo instituto florestal. Com área total de 5.532 ha, a E.E.J. encontra-se inserida no segundo maior domínio vegetacional brasileiro depois da floresta amazônica, o cerrado; representando um dos maiores remanescentes desse tipo de ecossistema no estado de São Paulo (DUARTE *et al.* 2000). Ela foi escolhida por ser uma área com condições potencialmente favoráveis para a implementação do projeto de reintrodução. Situa-se às margens do Rio Mogi-Guaçu, onde existem registros de ocorrência de cervos há 100 anos atrás.

Existem quatro várzeas na E.E.J.: Várzea Sapé-Patos (129 ha), Várzea Infernã-Óleo (190 ha), Várzea Beija-Flor (75 ha) e Várzea Cafundó (143 ha). Além destas, existe uma área de várzea cercada por extensos canaviais, localizada em uma propriedade particular adjacente à EEJ, denominada Várzea Capão-da-Cruz, com 1.512 ha. (FIGURA 2). Todas as cinco várzeas são adjacentes ao leito do rio e sofrem influência direta do regime de águas do mesmo (FIGUEIRA, 2002).

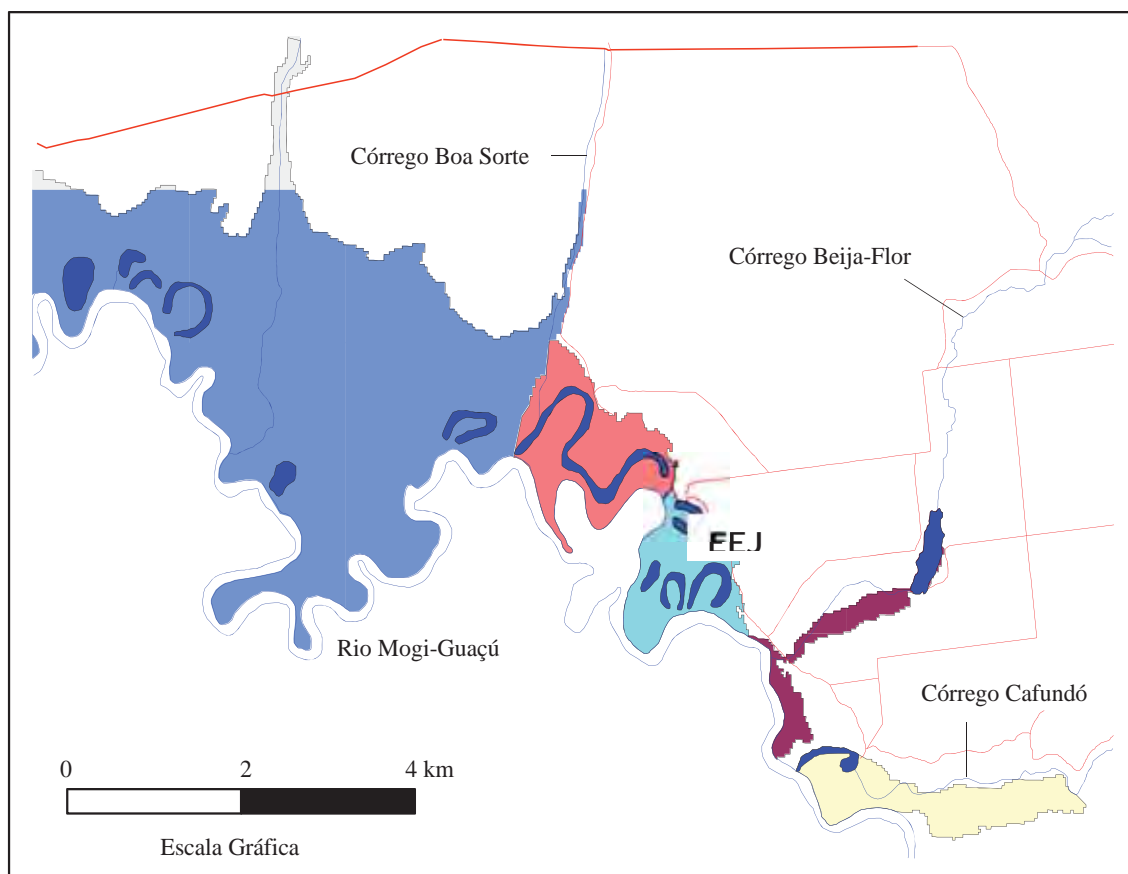


Figura 2. Várzeas pertencentes à Estação Ecológica de Jataí, Luís Antônio. Fonte: FIGUEIRA, 2002.

Os critérios de escolha dos animais para a reintrodução na E.E.J. foram os seguintes: animais que se adaptaram bem as condições de captura, quarentena e cativeiro e os que apresentavam as melhores condições sanitárias (DUARTE *et al.* 2000). Assim, em 1998 cinco animais (dois machos e três fêmeas) resgatados da área de influência da Usina Hidroelétrica de Porto Primavera (Rio Paraná), foram reintroduzidos na E.E.J. e monitorados entre dezembro de 1998 e abril de 2000 com a utilização de rádio-colares. Mais três animais foram reintroduzidos no local em agosto de 2001, sendo um macho e duas fêmeas. O macho veio a óbito um ano

após e as fêmeas ainda permaneciam vivas até os últimos monitoramentos realizados no ano de 2006.

Em julho de 2004, novembro de 2006 e junho de 2007 foram realizadas capturas de alguns indivíduos da população para a colocação de brincos transmissores e coleta de material biológico. Ao todo, foram capturados 22 animais, sendo que 14 destes eram novas capturas, ou seja, indivíduos nascidos no local.

Com base nestes dados, acredita-se que a população na Estação Ecológica de Jataí, reintroduzida inicialmente com oito animais, tenha hoje entre 15 e 20 indivíduos.

2.3. Conseqüências genéticas do tamanho populacional pequeno.

Durante o século 20, o declínio acentuado de diversas espécies de mamíferos levou a implementação de programas de reintrodução em larga-escala. Em muitas dessas reintroduções, as questões genéticas tem sido negligenciadas (MAUDET *et al.* 2002). No entanto, numerosos estudos recentes têm mostrado que a variabilidade genética é importante para a persistência da população, especialmente em populações fragmentadas, ou que sofreram gargalo genético, ou que perderam variabilidade genética rapidamente (SACCHERI *et al* 1998).

O alto custo de programas de reintrodução impede que um número grande de indivíduos seja reintroduzido nas áreas escolhidas. Assim, populações reintroduzidas, normalmente, têm início a partir de poucos indivíduos, estando sujeitas a problemas genéticos como o efeito fundador, endogamia (SARRAZIN & BARBAULT, 1996), perda de variabilidade genética e perda de potencial evolutivo (FRANKHAM 1995).

Segundo Shorrocks (1980), o efeito fundador pode ser considerado como um caso especial de deriva genética, na qual a variação aleatória das freqüências alélicas ao longo das gerações pode provocar a eliminação ou fixação casual de um alelo, independentemente de seu coeficiente seletivo (BEIGUELMAN, 1994). Assim, alguns alelos, especialmente os raros, podem não ser passados para as gerações seguintes e, conseqüentemente, desaparecer completamente da população (FRANKHAM *et al.*, 2002).

Essa amostragem dos gametas ao acaso, dentro de pequenas populações tem três conseqüências importantes: a) perda de diversidade genética e fixação de alelos dentro das populações com conseqüente redução no potencial evolutivo; b)

diversificação entre populações replicadas da mesma fonte original (por exemplo, populações fragmentadas); c) deriva genética sobrepujando a seleção natural (FRANKHAM *et al.*, 2008).

A perda da diversidade genética poderia ser pouco preocupante se ela fosse recuperada rapidamente por mutação. Porém, as taxas de mutação são muito baixas, de forma que os tempos de recuperação são longos. Uma vez que não podemos contar com as mutações para a recuperação da diversidade no espaço de tempo de interesse da conservação, todo esforço deve ser feito para preservar a diversidade genética existente (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Entretanto, a perda de diversidade genética acontece predominantemente por reduções prolongadas no tamanho populacional, ao invés de por gargalos que duram apenas uma única geração. O impacto do tamanho populacional ocorre em cada geração e as perdas acumulam-se com o tempo (FRANKHAM *et al.*, 2008).

O tamanho populacional reduzido também tem efeitos agudos resultantes da endogamia (FRANKHAM *et al.*, 2008). A endogamia ocorre devido a acasalamentos consangüíneos. Tem como principal efeito genético o aumento da homozigose e a expressão de genes recessivos que, geralmente, provocam alguma alteração na média do mérito individual. A medida do aumento da homozigose é dada pelo coeficiente de endogamia. O coeficiente de endogamia depende do tamanho efetivo da população e, quanto menor for o tamanho da população em gerações anteriores, maior será o número de ancestrais comuns e maior será o coeficiente de endogamia (BREDA *et. al.*, 2004).

Como conseqüência de taxas elevadas de endogamia, tem-se a perda parcial do ganho genético obtido por seleção e redução do valor fenotípico médio, evidenciado, principalmente, pelos caracteres relacionados à capacidade reprodutiva ou eficiência fisiológica, fenômeno conhecido por depressão endogâmica (BREDA *et. al.*, 2004). Nos guepardos (*Acinonyx jubatus jubatus*), exemplo clássico de baixa variabilidade genética, foi observada uma concentração espermática 10 vezes menor do que em outros felinos, além de 79% de malformações em embriões e assimetria bilateral do esqueleto – todos fenômenos comuns em espécies endocruzadas (O'BRIEN, 1994; O'BRIEN *et al.*, 1996). Da mesma forma, o leão asiático (*Panthera leo persica*), cuja população é muito reduzida (cerca de 250 animais, depois de um estrangulamento populacional que a reduziu a 20 indivíduos no início de século) possui concentração espermática 10 vezes menor que o leão da

Tanzânia (*Panthera leo*), que tem tamanhos populacionais muito mais elevados (MATIOLI, 2001). Anomalias nos espermatozóides, observadas em 25% das células no leão da Tanzânia, atingem 65% dos espermatozóides do leão asiático. Finalmente, os níveis de testosterona circulante nos leões asiáticos são 10 vezes menores (0,1 ng/ml) do que nos leões da Tanzânia (1,3 ng/ml) (MATIOLI, 2001). O endocruzamento de populações pode reduzir, portanto, a fecundidade das populações envolvidas (MATIOLI, 2001).

Com base nesses dados e outros resultados, foi sugerido que 10% na redução do tamanho da população, devido a depressão por endocruzamento, acarretaria uma redução de 10 a 25% no desempenho reprodutivo (FRANKLIN & SOULÉ, 1981; FRANKLIN & FRANKHAM, 1998). Isto por sua vez, pode causar uma redução no tamanho efetivo da população e, portanto, reduzir a habilidade de persistência dessa população ao longo do tempo, levando essa população à extinção (MATIOLI, 2001). Assim, fica evidente que um dos objetivos a serem buscados na conservação de espécies ameaçadas é a manutenção da heterozigosidade e diminuição do endocruzamento (AVISE & HAMRICK, 1996).

2.4. Verificação da variabilidade genética e determinação do parentesco.

Na última década, o desenvolvimento de poderosas técnicas moleculares tem melhorado as abordagens da genética molecular que podem ser usadas para estimar a diversidade genética em espécies de veados neotropicais (GONZALEZ *et al*, 2010).

Atualmente diversas técnicas estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética, e algumas delas, como os marcadores moleculares, permitem a detecção de polimorfismos genéticos diretamente no DNA (PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2003). Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. São eles: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), minissatélites e microsatélites (PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2003).

Os microsatélites, também conhecidos como Sequências Simples Repetidas (SSR – Simple Sequence Repeats) consistem de pequenas seqüências com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas lado a lado (LITT & LUTY, 1989). As

regiões contendo microssatélites são amplificadas individualmente através da técnica *Polimerase Chain Reaction* (PCR) utilizando-se um par de iniciadores específicos (de 20 a 30 bases) complementares às seqüências únicas que flanqueiam a região repetida. Segmentos amplificados a partir destes sítios quase que invariavelmente apresentam um alto polimorfismo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos. Assim, cada loco de microssatélite, independentemente do elemento repetido (CA, TG, ATG, etc.) constitui um marcador codominante (identificação dos indivíduos heterozigotos) altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo, permitindo uma discriminação precisa mesmo de indivíduos proximamente relacionados. Cada segmento amplificado de tamanho diferente (geralmente de várias dezenas até algumas centenas de pares de bases) representa um alelo diferente do mesmo loco. Os fragmentos resultantes da amplificação de um loco de microssatélite via PCR podem ser separados e visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida ou, detectados utilizando-se seqüenciadores automáticos. Por serem detectáveis por PCR, pouco DNA para amplificação é necessário, o que torna a genotipagem e a determinação dos alelos nas amostras relativamente fácil (PEREZ-SWEENEY et al., 2003).

Os microssatélites têm se tornado marcador de escolha para muitos estudos de conservação devido a: (i) sua neutralidade esperada (eles são representativos de polimorfismos do genoma), (ii) sua abundância e ampla distribuição através de todo o genoma e (iii) ao fato de seu polimorfismo ser relativamente alto mesmo em populações que sofreram gargalo e nas espécies que apresentam pouco ou nenhum polimorfismo para aloenzimas (MAUDET et al 2002).

Nos últimos anos, os marcadores microssatélites tem sido amplamente utilizados na conservação de espécies em estudos como: hibridação intraespecífica (GOTTELLI et al., 1994; MILLER et al., 2003), análise da variabilidade genética em populações introduzidas e reintroduzidas (PARISOD et al., 2005; FORBES & BOYD, 1996; LE GOUAR et al., 2008), dentro e entre populações selvagens (TAYLOR et al., 1994; LUCCHINI et al., 2004), verificação de estruturação genética (LEDING, 2000; WORKLEY et al., 2004) verificação de endogamia e depressão endogâmica (SEBBENN & SEOANE, 2005; FOWLER & WHITLOCK, 1999; LIBERG et al., 2005) e determinação do sucesso reprodutivo e do parentesco (MORIN et al., 1994a,b;

CLINCH et al., 2004; LALOI et al., 2004; RASMUSSEN et al., 2008; OSTNER et al., 2008).

Um dos grandes entraves para a utilização destes marcadores é o grande volume de trabalho e o alto investimento financeiro para o desenvolvimento de iniciadores específicos para os locos de microssatélites de cada espécie. Porém, tem sido observado que ocorre conservação de sítios de hibridação de iniciadores para locos de microssatélite em espécies relacionadas (SCHLÖTTERER & PUMBERTON, 1994; RAFALSKI et al., 1996; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996; ZANE et al., 2002).

É possível, portanto, aproveitar iniciadores que foram desenvolvidos para uma determinada espécie, denominados heterólogos, e empregá-los em outras espécies relacionadas. Assim, o grande número de loci microssatélites mapeados atualmente publicados para o gado doméstico, ovinos e caprinos pode ser utilizado em espécies de ungulados silvestres, como o cervo-do-pantanal (MAUDET *et al.* 2002).

A conservação de locos de microssatélite entre espécies próximas tem sido mostrada entre primatas (MORIN & WOODRUFF, 1992), cães (ROY et al., 1994), cetáceos (SCHLÖTTERER et al., 1991) e tartarugas (FITZSIMMONS et al., 1995). Sendo que, de acordo com Glenn, (1998) a utilização de marcadores microssatélites é mais eficiente entre espécies da mesma família ou subfamília.

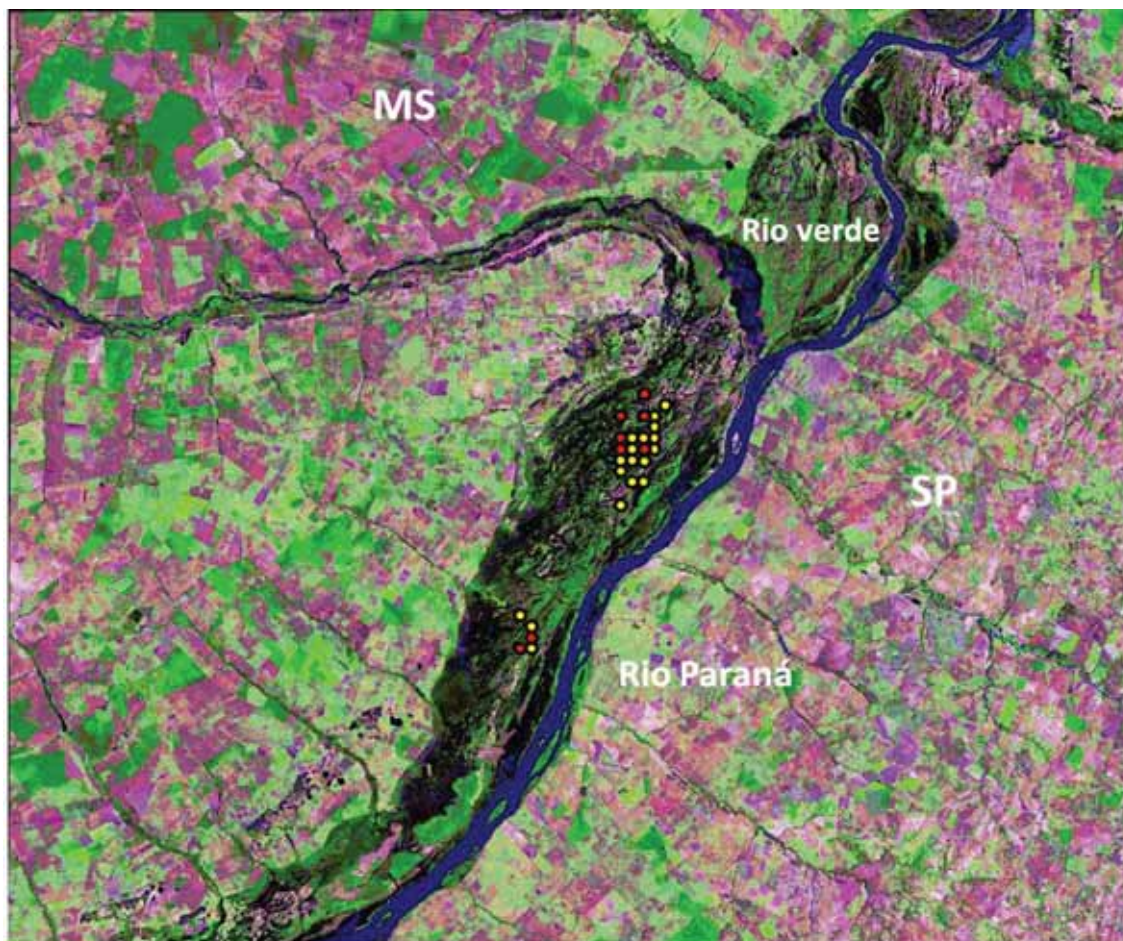
Assim, o presente estudo teve por objetivo analisar a variabilidade genética da população reintroduzida (E.E.J.) e de sua população original (Bacia do Rio Paraná), a fim de verificar o quão representativos da população original eram os indivíduos fundadores e se essa variabilidade foi mantida ao longo das gerações da população reintroduzida, como também verificar a viabilidade dessa população a longo prazo, com o intuito de pesquisar estratégias de manejo adequadas a conservação dessa espécie no estado de São Paulo.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

3.1.1. População Original (Bacia do Rio Paraná)

Foram escolhidas, de maneira aleatória, amostras de 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) originários da região de onde os animais fundadores da população reintroduzida foram retirados. Esta população estava localizada na margem direita do Rio Paraná entre o Rio Verde e a Hidrelétrica de Porto Primavera, como demonstrado na Figura 3. Todos os animais utilizados foram capturados pelo método Bulldog (DUARTE, 2008). A identificação de cada animal, o sexo e o local de captura são mostrados na tabela 1.



- Indivíduos amostrados da População Original
- Indivíduos utilizados na reintrodução (População Fundadora)

Figura 3. Área de amostragem dos animais da população original da Bacia do Rio Paraná de onde os animais fundadores da população reintroduzida da E.E.J. foram retirados.

Tabela 1. Amostras, identificação, sexo e local de captura dos animais da população original (Bacia do rio Paraná).

AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO	SEXO	LOCAL DE CAPTURA	
			Latitude	Longitude
1	23	Fêmea	21°50'823"	52°12'932"
2	27	Fêmea	21°50'906"	52°13'201"
3	30	Fêmea	21°49'790"	52°13'394"
4	35	Macho	21°51'487"	52°13'799"
5	45	Macho	22°03'784"	52°22'149"
6	57	Fêmea	21°48'483"	52°12'335"
7	58	Macho	21°48'874"	52°12'262"
8	62	Macho	21°50'176"	52°13'203"
9	63	Fêmea	21°50'518"	52°13'878"
10	66	Fêmea	21°49'942"	52°13'266"
11	71	Macho	21°50'793"	52°13'832"
12	73	Fêmea	21°54'702"	52°13'611"
13	90	Macho	22°04'942"	52°25'450"
14	103	Macho	21°50'306"	52°13'300"
15	106	Fêmea	21°50'595"	52°13'200"
16	127	Macho	21°51'073"	52°13'047"
17	128	Macho	21°51'857"	52°14'434"
18	132	Macho	21°51'448"	52°13'783"
19	133	Fêmea	21°49'943"	52°13'686"
20	136	Fêmea	21°48'416"	52°12'187"

3.1.2. População Reintroduzida (Estação Ecológica de Jataí).

Foram analisadas amostras de 22 cervos-do-pantanal da E.E.J. , sendo 8 de animais fundadores e 14 de animais nascidos no local. A identificação de cada animal, o sexo, o status na população (fundador ou nascido no local), a data de soltura dos fundadores, o nascimento estimado dos indivíduos nascidos no local, o método e o local de captura são mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Amostras, identificação, sexo, status na população, data de soltura e nascimento estimado, local e método de captura dos animais da E.E.J.

AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO	SEXO	STATUS	SOLTURA / NASCIM.	LOCAL DE CAPTURA		MÉTODO DE CAPTURA
					Latitude	Longitude	
1	25	Fêmea	Fundador	dez/98	21°49'612"	52°13'263"	bulldog ¹
2	82	Macho	Fundador	dez/98	22°07'393"	52°24'593"	bulldog ¹
3	100	Fêmea	Fundador	dez/98	21°50'206"	52°13'662"	bulldog ¹
4	111	Fêmea	Fundador	dez/98	22°04'001"	52°21'978"	bulldog ¹
5	129	Macho	Fundador	dez/98	21°50'931"	52°13'806"	bulldog ¹
6	216	Macho	Fundador	ago/01	21°46'19"	52°15'38"	bulldog ¹
7	215	Fêmea	Fundador	ago/01	21°45'02"	52°14'374"	bulldog ¹
8	202	Fêmea	Fundador	ago/01	21°45'299"	52°14'543"	bulldog ¹
9	62/307	Fêmea	Nascido no local	1999	21°35'216"	47°51'467"	bulldog ¹
10	283	Fêmea	Nascido no local	2003	celpav	Celpav	bulldog ¹
11	286	Fêmea	Nascido no local	2002	celpav	Celpav	bulldog ¹
12	282	Macho	Nascido no local	2002	-	-	netgun ²
13	284	Macho	Nascido no local	2004	21°34'329"	47°53'491"	bulldog ¹
14	285	Macho	Nascido no local	2004	celpav	celpav	bulldog ¹
15	302	Macho	Nascido no local	2006	21°34'291"	47°53'086"	bulldog ¹
16	303	Macho	Nascido no local	2005	-	-	bulldog ¹
17	304	Macho	Nascido no local	2002	21°35'114"	47°51'362"	netgun ²
18	305	Macho	Nascido no local	2006	21°35'056"	47°51'454"	bulldog ¹
19	306	Macho	Nascido no local	2000	21°34'363"	47°53'422"	netgun ²
20	309	Fêmea	Nascido no local	2002	21°34'263"	47°52'527"	-
21	314	Macho	Nascido no local	2001	21°34'241"	47°54'134"	netgun ²
22	315	Macho	Nascido no local	2001	21°34'526"	47°52'247"	netgun ²

¹DUARTE, 2008.

²CHARDONNET & CHARITY, 1992

Todas as amostras, constituídas por sangue, estão armazenadas em nitrogênio líquido e fazem parte do banco de células do NUPECCE, do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Jaboticabal.

3.2. Processamento das amostras

Após capturar o animal, foram coletados dez mililitros de sangue em tubos heparinizados. O sangue foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos, e, em seguida, mantido a 4°C por 15 a 30 minutos (até que houvesse a separação do anel leucocitário). Logo após, o anel leucocitário foi retirado (\pm 1 ml) com uma pipeta

Pasteur e depositado em 4 ml de meio de congelamento, composto de 3 ml de meio Mc Coy's, 0,8 ml de soro eqüino inativado, 0,25 ml de DMSO, 400 mg de PVP, 0,4 mg de estreptomicina e 400 UI de penicilina. Após a homogeneização do anel leucocitário com o meio de congelamento, a solução foi transferida para dez palhetas de congelamento de sêmen, de 0,5 ml e mantidas a 4°C por 4 horas. Após a estabilização, as palhetas foram colocadas por 30 min sobre vapor de nitrogênio líquido (1 a 2 cm acima do nível do nitrogênio). Posteriormente, o material foi acomodado em raques e essas, por sua vez, em canecas devidamente identificadas, dentro de botijões de nitrogênio líquido, os quais foram armazenados no banco de células do NUPECCE, onde permaneceram até que fossem retiradas para realização da extração de DNA.

3.3. Extração do DNA das amostras

Os procedimentos para extração de DNA foram realizados segundo o protocolo de ZADWORNY & KUHLEIN (1990), com adaptações (Apêndice A). Após as extrações, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% para verificar o sucesso na extração e a qualidade do material obtido. Em seguida as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (NANODROP).

3.4. Seleção dos iniciadores

Para utilização no presente estudo, dispunha-se de 17 iniciadores heterólogos. Três deles, NVHRT01, NVHRT03 e NVHRT16 já haviam sido testados para *Blastocerus dichotomus* por Colevatti et al (2007). Outro iniciador, o BM757 havia apresentado transferibilidade para *Ozotocerus bezoarticus* em estudo realizado por Cosse et al (2007) e os outros 13 iniciadores sabiam-se serem transferíveis para espécies brasileiras do gênero *Mazama*, obtidos por Mantellatto et al (2010).

Diversos parâmetros referentes à concentração dos reagentes, ciclos de temperatura da PCR e temperatura de ligação dos iniciadores foram testados. Foi possível obter sucesso na amplificação para 13 deles (TABELA 3).

Tabela 3. Relação dos 13 iniciadores heterólogos cuja padronização foi satisfatória, em Cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), mostrando a seqüência dos iniciadores, a temperatura de ligação (T), e a espécie para a qual foram descritos.

Nome	Seqüência	T°C	Espécie
Ca71	TGCACACCCCCAGTCTGGT GTCTCACCTTTCCCATCAGC	59	<i>Cervus axis</i>
RT09	TGAAGTTTAATTTCCACTCT CAGTCACTTTTCATCCACAT	55	<i>Rangifer tarandus</i>
RT30	CACTTGGCTTTTGGACTTA CTGGTGTATGTATGCACACT	55	<i>Rangifer tarandus</i>
RT01	TGCCTTCTTTTCATCCAACAA CATCTTCCCATCCTCTTTAC	55	<i>Rangifer tarandus</i>
RT13	GCCCAGTGTTAGGAAAGAAG CATCCCAGAACAGGAGTGAG	53	<i>Rangifer tarandus</i>
RT07	CCTGTTCTACTCTTCTCCTC GAATCTGACACGACTGAAGC	55	<i>Rangifer tarandus</i>
RT05	CAGCATAATTCTGACAAGTG AATTCCATGAACAGAGGAG	55	<i>Rangifer tarandus</i>
NVHRT01	TGCACACCCCCAGTCTGGT GTCTCACCTTTCCCATCAGC	50	<i>Rangifer tarandus</i>
NVHRT03	TGCACACCCCCAGTCTGGT GTCTCACCTTTCCCATCAGC	58	<i>Rangifer tarandus</i>
NVHRT16	ATTCTAAGCCCAAATAATCTT TCTAAGGGGTCTGTGTCTT	56	<i>Rangifer tarandus</i>
BM757	TGGAAACAATGTAAACCTGGG TTGAGCCACCAAGGAACC	57	<i>Bos sp.</i>
Mber710B	TATGGCTTGGGTCTCCTCAG GAATCTGACACGACTGAAGC	59	<i>Moschus berezovskii</i>
Mber99B	AGAAGTGAATGGCAACCC CAGAGACTGTCCTAGTTCAAAC	60	<i>Moschus berezovskii</i>

3.5. Amplificação das amostras

Com relação à composição das reações de PCR, estas foram padronizadas para um volume final de 15µL contendo 1,3µL de tampão *Taq* (10mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl, 2mM MgCl₂), 1,3µL de dNTP, 1,0µL de cada *primer* (0,16mM), 0,8µL de *Taq* polimerase e 60ng de DNA genômico.

Todos os iniciadores seguiram um mesmo protocolo de temperaturas e tempos (TABELA 4), variando apenas a temperatura de ligação. Após a realização das PCRs os produtos de amplificação foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, para verificar a eficiência da reação.

Tabela 4. Ciclo de temperatura utilizado para a amplificação dos locos microssatélites em cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*).

PASSOS	TEMPERATURAS	TEMPO
1.Desnaturação	94 °C	5 minutos
2.Desnaturação	94 °C	1 minuto
3.Ligação dos iniciadores	Temperatura de ligação	1 minuto
4. Extensão *Repetir o passo de 2 a 4, 35 vezes	72 °C	1 minuto
5. Extensão final	72 °C	10 minutos

3.6. Sequenciamento

Nesta etapa foram utilizados apenas os 10 locos para os quais não havia sido comprovada a transferibilidade para a espécie *Blastocerus dichotomus*. Assim, os iniciadores NHRT01, NVHRT03 e NVHRT16, não participaram desse processo.

Após a amplificação dos 10 locos por meio da PCR, os produtos foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose 1%, corados com GelRed™ (Biotium). A partir da visualização dos fragmentos amplificados, foi verificado se o tamanho do produto coincidia com o tamanho do loco microssatélite descrito na literatura para o iniciador em questão.

Em seguida foi feita uma corrida em gel de poliacrilamida, na tentativa de selecionar um animal homozigoto para que fosse procedido o seqüenciamento sem que houvesse interferência das variações no número de repetições de animais heterozigotos. Logo apos, tais amostras foram levadas ao seqüenciador automático ABI xl 3730 (Applied Biosystems) para comprovar a homologia da região amplificada da espécie original para a qual o iniciador foi desenvolvido, na espécie *Blastocerus dichotomus*.

(Applied Biosystems). As fluorescências utilizadas foram FAM (RT01, NVHRT03, BM575), NED (NVHRT01) e HEX (CA71, RT30).

As amostras das duas populações foram genotipadas para os seis iniciadores selecionados de acordo com a padronização da PCR.

As genotipagens foram realizadas no seqüenciador *ABI xl 3730* da Applied Biosystems, pertencente ao centro de seqüenciamento BCC, coordenado pelo professor Jesus Aparecido Ferro, localizado no Campus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP. A fim de excluir possíveis erros relacionados à pipetagem e à leitura do seqüenciador, foram realizadas réplicas das genotipagens para todas as amostras, e, quando observada alguma incoerência, era feita a tréplica. A análise das imagens e a determinação do tamanho dos fragmentos foram feitas por meio do pacote computacional GeneMarker® v.1.91 Demo.

3.9. Análise dos dados

A partir dos dados obtidos no presente estudo, juntamente com dados de campo, datas estimadas de nascimento e datas de óbito dos animais, foi possível construir a genealogia da população reintroduzida da E.E.J. pelo método de exclusão de paternidade, e dividi-la de acordo com suas gerações. Tal processo foi feito da seguinte maneira: indivíduos filhos de pais fundadores foram considerados de primeira geração. Indivíduos filhos de pais da primeira geração foram considerados de segunda geração. Indivíduos filhos de pais da segunda geração foram considerados de terceira geração. Quando um indivíduo era filho de pais de gerações diferentes, por exemplo, o pai pertencente à primeira geração e a mãe pertencente à segunda geração, ele foi considerado pertencente à geração antecedente, por exemplo, no caso citado, o filho foi considerado pertencente à segunda geração.

Os cálculos das frequências alélicas, do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, da heterozigosidade e do coeficiente de endogamia (Fis) foram realizados através do programa Genepop (RAYMOND e ROUSSET, 1995). O programa Pedigree (KINGHORN, 1994) foi utilizado para calcular a endogamia real da população, através da árvore genealógica da mesma. Os cálculos de PIC (Conteúdo de informação polimórfica) e análise para alelos nulos foram realizados através do programa Cervus versão 3.0.

3.10. Análise de Viabilidade Populacional (PVA)

Por fim, foi realizada uma análise de viabilidade para a população reintroduzida da E.E.J., através do programa Vórtex®. Inicialmente o programa foi rodado com os dados disponíveis de 10 anos de monitoramento dessa população e também aqueles encontrados na literatura (PINDER & SEAL, 1994), para averiguar se o resultado ia condizer com o status atual da população. Após feita essa validação, o programa foi rodado para os próximos 100 anos, com intuito de analisar: probabilidade de sobrevivência, de extinção, número de indivíduos, endogamia e níveis de diversidade genética. Foram criados diversos cenários a fim de pesquisar estratégias de manejo adequadas para manutenção da viabilidade dessa população a longo prazo.

Foram utilizados dois valores para equivalentes letais: 3,14 e 1,57. Não existem estudos com essa população que indicam qual seu valor exato de equivalentes letais. Para a maioria das espécies de mamíferos tem-se usado o valor 3,14, baseado em um estudo realizado com 40 populações de mamíferos em cativeiro (RALLS *et al.* 1988). Porém, já foi comprovado por Márquez et al. 2006 que a população de cervo-do-pantanal da Bacia do Rio Paraná passou por um forte gargalo genético há aproximadamente 28 milhões de anos, no pleistoceno, sendo que posteriormente sofreu uma rápida expansão demográfica. Assim, essa população provavelmente passou por um processo de expurgo de alelos deletérios, o que possivelmente levou a uma diminuição do valor de seus equivalentes letais. A fim de sustentar essa hipótese, optamos por rodar alguns cenários utilizando a metade do valor empregado usualmente (1,57).

Quanto ao sistema reprodutivo da espécie, os poucos dados disponíveis indicam que esta espécie é geralmente solitária, com uma percentagem de animais solitários variando de 32 a 84%. Pequenos grupos são compostos principalmente por fêmeas e seus respectivos filhotes. Embora os dados genéticos sugiram um sistema de acasalamento poligâmico em cervo do pantanal, os machos desta espécie, aparentemente, não estabelecem haréns de fêmeas (PIOVEZAN et al 2010).

De acordo com Pinder e Seal 1994, a idade da primeira prole para fêmeas é de 2 anos e para macho 3 anos. A idade máxima para a reprodução gira em torno dos 10 anos, sendo que as fêmeas de cervo-do-panatanal apresentam apenas um filhote por gestação e uma cria por ano (PEREIRA, 2010).

As taxas de mortalidade foram estipuladas de acordo com a observação de campo durante os 10 anos de monitoramento. Apesar de existirem potenciais predadores no local, como a onça parda (*Puma concolor*), nunca foi encontrado um animal predado durante os anos de monitoramento. A caça era bem controlada na E.E.J., sendo que para apenas um indivíduo foi confirmado a morte por caça (DUARTE, 2000). Todos os parâmetros utilizados no programa encontram-se na tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros utilizados na análise de viabilidade da população reintroduzida da E.E.J.

Parâmetros Vórtex	
Interações	1000
Intervalo tempo	10/100 anos
Definição de extinção	resta somente 1 sexo
Equivalentes letais	3,14/1,57
% devida a letais recessivos	50
Sistema reprodutivo	poliginia
Idade primeira próle para fêmeas	2 anos
Idade da primeira prole para machos	3 anos
Idade máxima de reprodução	10 anos
Número de crias por ano	1
Número máximo de progênies por cria	1
Razão sexual de nascimento (macho/fêmea)	50%
Reprodução depende da densidade?	não
% de fêmeas adultas reproduzindo	90
VA na %	5
Taxas de mortalidade para fêmeas de 0 a 1 anos	25%
Desvio padrão	5%
Taxas de mortalidade para fêmeas de 1 a 2 anos	10%
Desvio padrão	5%
Taxas de mortalidade para fêmeas depois dos 2 anos	5%
Desvio padrão	3%
Taxas de mortalidade para machos de 0 a 1 anos	25%
Desvio padrão	5%
Taxas de mortalidade para machos de 1 a 2 anos	20%
Desvio padrão	5%
Taxas de mortalidade para machos de 2 a 3 anos	20%
Desvio padrão	5%
Taxas de mortalidade para machos depois dos 3 anos	5%
Desvio padrão	2%
Capacidade suporte	25%
Desvio padrão	5%

IV. RESULTADOS

4.1. Genotipagem

Ao realizar a genotipagem das 42 amostras da população reintroduzida da E.E.J. foi possível observar um aumento no número de alelos encontrado para cada loco microssatélite, em relação ao teste de polimorfismo realizado na poliacrilamida para os dez indivíduos provenientes do cativeiro. Os iniciadores BM757, RT30 e NVHRT03 foram os que apresentaram a maior quantidade de alelos: 7, 6 e 5 respectivamente. Os iniciadores RT01, NVHRT01 e CA71 apresentaram 4 alelos cada. A figura 5 ilustra uma genotipagem bem sucedida. Os genótipos encontrados para cada indivíduo situam-se na tabela 7.

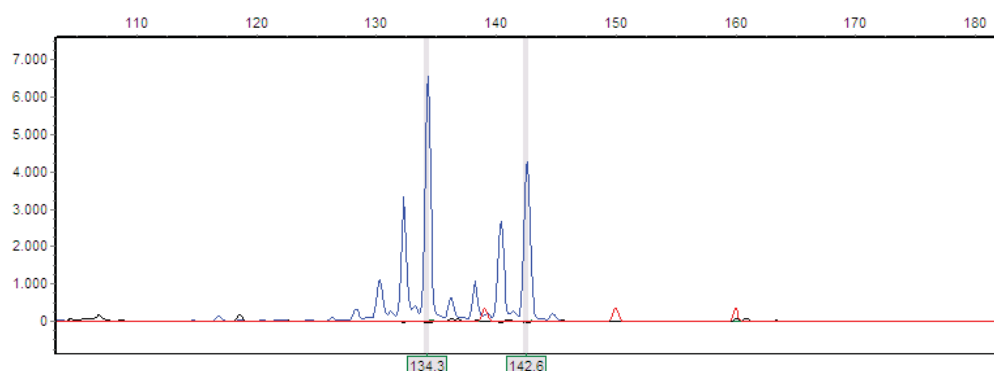


Figura 5. Padrão de picos de um indivíduo heterozigoto para o loco NVHRT03.

Para alguns locos específicos de certos indivíduos não foi obtido sucesso na genotipagem, mesmo após várias tentativas da mesma. Assim, alguns desses genótipos puderam ser inferidos após a construção da genealogia da população. Esses genótipos encontram-se marcados com * e, para alguns deles foi possível inferir apenas um alelo (proveniente do pai ou da mãe), os quais estão marcados com o símbolo ?.

Tabela 7. Genótipo dos indivíduos analisados a partir dos 6 locos microssatélites estudados

		LOCOS MICROSSATÉLITES						
		RT01	RT30	CA71	BM757	NV01	NV03	
POPULAÇÃO ORIGINAL	23	220	198/208	309/313	192/196	244	134/138	
	27	220	198/204	307/309	192/196	244	134	
	30	220	198	303/309	192/196	244	134/142	
	35	212/220	198	303/309	190/196	236/244	134	
	45	220/222	198/204	309/313	196	236/244	134/142	
	57	220/222	198/204	303/309	192/198	228	134	
	58	220	192/204	307/309	192/196	244	134/142	
	62	220	204/208	309/313	196	244	134/138	
	63	220	204/208	309	194/202	244	142/144	
	66	220	192/198	303/309	192/196	244	134/142	
	71	220	198/204	307/309	192/196	244	134/144	
	73	220/222	204	309/313	196	214	138	
	90	220	194/208	303/309	194/198	228	138/144	
	103	-	192/198	-	192/200	236/244	-	
	106	220	198/208	307/309	192	236	134/142	
	127	220/222	204/208	309/313	194/198	244	134/142	
	128	220	198/204	309/313	192/196	236	134	
	132	220/222	198	303/309	194/198	236/244	134/142	
133	220	198/204	309/313	192/196	236	134		
136	220	192/204	303/309	196	244	138/142		
POPULAÇÃO REINTRODUZIDA (E.E.J.)	População Fundadora	25	220/222	198/204	307	196	228	112/134
		82	220	196/198	303/309	192/196	228/244	112/138
		100	220	198/204	309/313	192/196	244	134
		111	218/220	198/204	309/313	196	236/244	134
		129	220	198	303/309	196/198	236	134/142
		202	218/220	192/204	309	196	244	138
		215	220/222	194/204	309/313	192	228	138
		216	220	204	309/313	192/196	244	*134/138
	1ª Geração	62	218/220	196/198	303/309	196	236/244	134/138
		282	220/222	194/204	309/313	192	228/244	134/138
		314	*220	198/204	309	196	236/244	*138/?
		309	220	198/204	303/309	196/192	228/244	*138/?
		283	220/222	194/204	309/313	192	228/244	134/138
		304	220	198/204	309/313	192/196	244	134
	2ª Geração	285	220/222	194/198	309/313	192/196	228/244	134
		286	218/220	198/204	303/309	196/198	236/244	138/134
		306	*220/?	198/204	309/313	198/196	244	134
		284	220	204	309	192	228/244	134
		303	220/222	204	309/313	192/196	228/244	134
		302	220	204	309	192/196	228/244	-
3ª Ger.	315	220	-	309	196/198	236/244	134	
	305	*220/?	198	303/309	196/198	236	*134/?	

4.2. Análise dos dados

4.2.1. Árvore Genealógica

A partir da construção da genealogia da população reintroduzida da E.E.J. (FIGURA 6) pode-se notar que sete dos oito indivíduos reintroduzidos fundaram efetivamente essa população. O indivíduo que não se reproduziu foi a fêmea 25, visto que ela apresenta um alelo exclusivo em homozigose para o loco CA71.

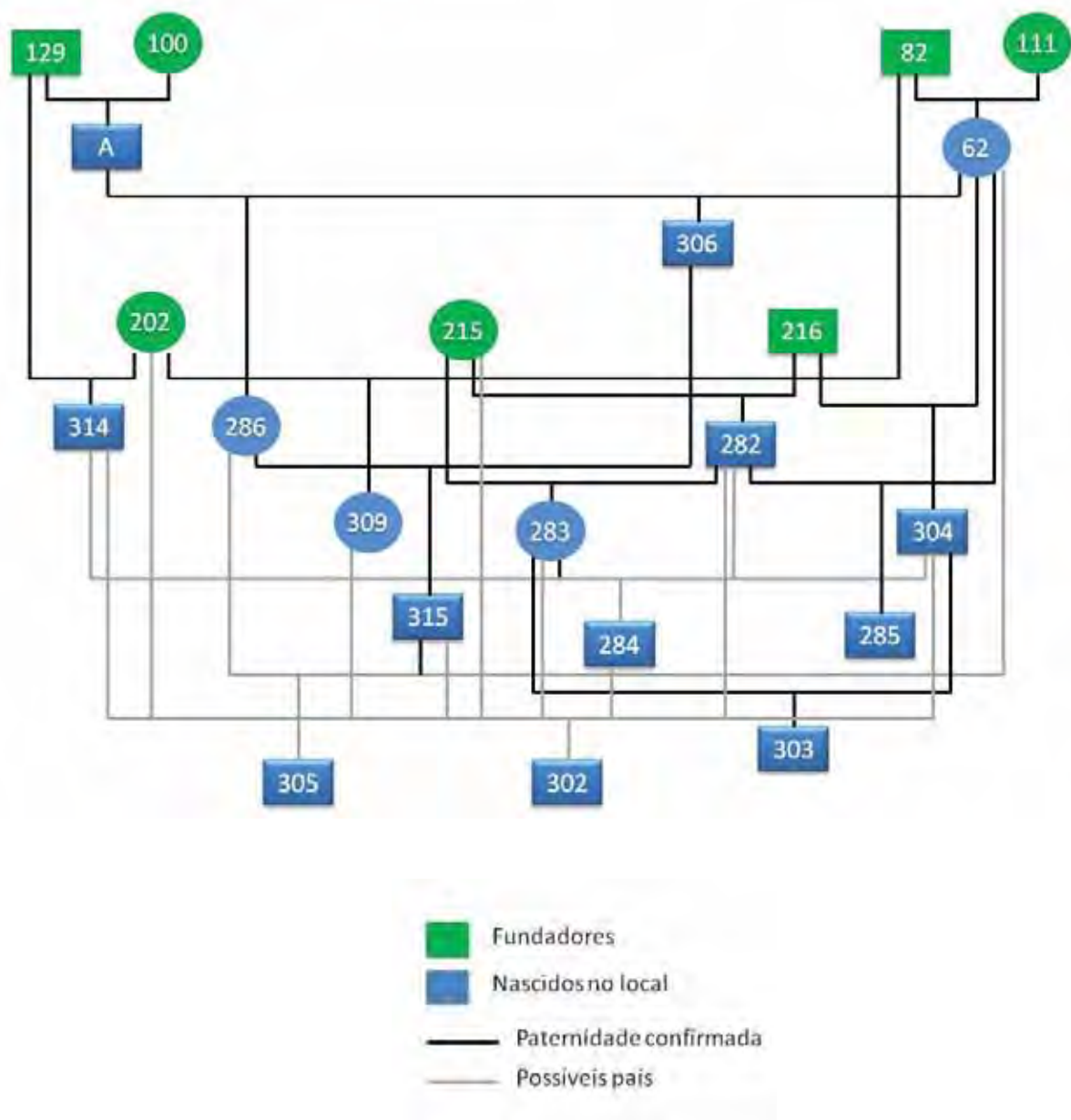


Figura 6. Genealogia da população reintroduzida de cervos-do-pantanal da E.E.J.

Os alelos determinados pelos marcadores microssatélites demonstraram que o genótipo presente no indivíduo 286 era incompatível com o genótipo presente nos

animais machos (supostos pais). Assim, nós criamos a hipótese de que o pai do 286 seria um indivíduo, chamado de A, supostamente nascido no local, mas que não teria sido amostrado nas capturas. Seu genótipo foi estipulado (TABELA 8), de forma que ele pudesse ser filho dos animais 129 e 100, e pai do indivíduo 286.

Tabela 8. Genótipo estipulado para o indivíduo macho A.

	RT01	RT30	CA71	BM757	NVHRT01	NVHRT03
A	220	198/204	303/313	196/198	236/244	134/134

Para três indivíduos ainda resta dúvida acerca de paternidade. As linhas em cinza levam aos possíveis pais e mães. O caso mais inconsistente é o do indivíduo 302, que não tem nenhum dos pais confirmados. Diferente do 284 e 305, onde se sabe a maternidade (fêmea 283) e paternidade (macho 315), respectivamente.

4.2.2. Diversidade Alélica

O número total de alelos encontrados, considerando-se as duas populações estudadas foi trinta, resultando em um número médio de cinco alelos por loco.

A população original apresentou maior diversidade alélica, com vinte e sete alelos no total e uma média de 4,5 alelos por loco. A população fundadora e as três gerações da E.E.J. (1ª, 2ª e 3ª) apresentaram respectivamente vinte e um, dezoito, dezessete e doze alelos no total, respectivamente (TABELA 9).

Tabela 9. Comparação entre o número de alelos por loco encontrado para as populações estudadas.

Original		E.E.J. (fundadores)		E.E.J. (1ª geração)		E.E.J. (2ª geração)		E.E.J. (3ª geração)	
Iniciadores	Alelos	Iniciadores	Alelos	Iniciadores	Alelos	Iniciadores	Alelos	Iniciadores	Alelos
BM757	7	BM757	3	BM757	3	BM757	3	BM757	3
RT30	5	RT30	4	RT30	4	RT30	3	RT30	2
NVHRT01	4	NVHRT01	3	NVHRT01	3	NVHRT01	3	NVHRT01	3
CA71	4	CA71	4	CA71	3	CA71	3	CA71	2
NVHRT03	4	NVHRT03	4	NVHRT03	2	NVHRT03	2	NVHRT03	1
RT01	3	RT01	3	RT01	3	RT01	3	RT01	1
Total	27	Total	21	Total	18	Total	17	Total	12
Média	4,5	Média	3,5	Média	3	Média	2,83	Média	2

Esses resultados apontam uma visível perda de diversidade alélica da população fundadora da E.E.J. em relação à população original. É possível observar também uma leve perda de alelos ao longo das gerações da E.E.J.

4.2.3. Frequências alélicas.

As frequências alélicas para os 6 locos estudados foram organizadas em tabelas de acordo com cada loco, comparando a população original da bacia do rio Paraná, com a população fundadora e as 3 gerações da população reintroduzida de E.E.J. (TABELAS 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

Tabela 10. Comparação das frequências alélicas do loco BM757 entre a população Original da Bacia do rio Paraná, a população Fundadora e as 3 gerações da população da E.E.J. de *Blastocerus dichotomus*.

	BM757						
	190	192	194	196	198	200	202
Original	0,025	0,300	0,100	0,425	0,100	0,025	0,025
Fundadora	0,000	0,312	0,000	0,625	0,062	0,000	0,000
1ªgeração	0,000	0,429	0,000	0,500	0,071	0,000	0,000
2ªgeração	0,000	0,400	0,000	0,400	0,200	0,000	0,000
3ªgeração	0,000	0,167	0,000	0,500	0,333	0,000	0,000

Tabela 11. Comparação das frequências alélicas do loco RT30 entre a população Original da Bacia do rio Paraná, a população Fundadora e as 3 gerações da população da E.E.J. de *Blastocerus dichotomus*.

	RT30					
	192	194	196	198	204	208
Original	0,100	0,025	0,000	0,400	0,325	0,150
Fundadora	0,062	0,062	0,062	0,375	0,438	0,000
1ªgeração	0,000	0,143	0,071	0,357	0,429	0,000
2ªgeração	0,000	0,100	0,000	0,300	0,600	0,000
3ªgeração	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,000

Tabela 12. Comparação das frequências alélicas do loco NVHRT03 entre a população Original da Bacia do rio Paraná, a população Fundadora e as 3 gerações da população da E.E.J. de *Blastocerus dichotomus*.

	NVHRT03				
	112	134	138	142	144
Original	0,000	0,526	0,158	0,237	0,079
Fundadora	0,125	0,438	0,375	0,062	0,000
1ªgeração	0,000	0,700	0,300	0,000	0,000
2ªgeração	0,000	0,900	0,100	0,000	0,000
3ªgeração	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000

Tabela 13. Comparação das freqüências alélicas do loco NVHRT01 entre a população Original da Bacia do rio Paraná, a população Fundadora e as 3 gerações da população da E.E.J. de *Blastocerus dichotomus*.

	NVHRT01			
	214	228	236	244
Original	0,050	0,100	0,250	0,600
Fundadora	0,000	0,312	0,188	0,500
1ªgeração	0,000	0,214	0,214	0,571
2ªgeração	0,000	0,300	0,100	0,600
3ªgeração	0,000	0,167	0,500	0,333

Tabela 14. Comparação das freqüências alélicas do loco CA71 entre a população Original da Bacia do rio Paraná, a população Fundadora e as 3 gerações da população da E.E.J. de *Blastocerus dichotomus*.

	CA71			
	303	307	309	313
Original	0,184	0,105	0,526	0,184
Fundadora	0,125	0,125	0,562	0,188
1ªgeração	0,214	0	0,5	0,286
2ªgeração	0,1	0	0,6	0,3
3ªgeração	0,167	0	0,833	0

Tabela 15. Comparação das freqüências alélicas do loco RT01 entre a população Original da Bacia do rio Paraná, a população Fundadora e as 3 gerações da população da E.E.J. de *Blastocerus dichotomus*.

	RT01			
	212	218	220	222
Original	0,026	0,000	0,842	0,132
Fundadora	0,000	0,125	0,750	0,125
1ªgeração	0,000	0,071	0,786	0,143
2ªgeração	0,000	0,125	0,625	0,250
3ªgeração	0,000	0,000	1,000	0,000

Essas tabelas demonstram novamente a perda alélica descrita no item anterior (diversidade alélica). Verifica-se aqui quais alelos de cada loco microssatélite foram perdidos ao longo do processo de reintrodução dessa população. Por exemplo, o loco BM757 perdeu os quatro alelos: 190, 194, 200 e 202 no processo de reintrodução, pois o grupo reintroduzido (fundador) na E.E.J., já não apresentou esses alelos. Em compensação, as próximas gerações mantiveram os

outros 3 alelos existentes na fundadora. Já o loco RT01 apresentou perda alélica apenas da segunda para a terceira geração, onde teve 2 alelos eliminados.

Os alelos 218, 112 e 196 dos locos RT01, NVHRT03 e RT30, respectivamente, aparecem como exclusivos da população fundadora, pois a nossa amostra da população de origem não contém esses alelos.

4.2.4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A tabela 16 apresenta os valores para equilíbrio de Hardy-Weinberg. É possível observar que a heterosigozidade observada se manteve próxima ou superior a esperada na maioria dos locos e que apenas três locos (CA71, BM757 e NVHRT01) na população original e um loco (NVHRT01) na população reintroduzida apresentaram valores significativos ($<0,05$) para desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Esses resultados informam que a maior perda de diversidade genética ocorreu no evento da reintrodução, provavelmente devido ao gargalo genético sofrido na formação dessa nova população. Já, as três gerações existentes na E.E.J. não apresentaram desvio para equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que nos leva a acreditar que, apesar de observarmos uma leve perda alélica ao longo das suas gerações, está havendo uma certa estabilidade nos níveis de diversidade genética dessa população.

Tabela 16. Valores encontrados para Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($E(H-W)$) para os 6 locos utilizados no estudo das populações de *Blastocerus dichotomus*.

	Original			E.E.J. Fundadora			E.E.J. 1ª geração			E.E.J. 2ª geração			E.E.J. 3ª geração		
	$E(W-H)$	H_o	H_e	$E(W-H)$	H_o	H_e	$E(W-H)$	H_o	H_e	$E(W-H)$	H_o	H_e	$E(W-H)$	H_o	H_e
	RT01	1,0000	0,3158	0,2802	1,0000	0,5000	0,4333	1,0000	0,4286	0,3846	1,0000	0,7500	0,6072	–	0,0000
RT30	0,7730	0,8000	0,7192	1,0000	0,7500	0,7000	0,1997	1,0000	0,7143	0,6180	0,6000	0,6000	0,3327	0,0000	0,6650
CA71	0,0157*	0,9474	0,6615	0,0977	0,6250	0,7000	1,0000	0,8571	0,6703	1,0000	0,8000	0,6000	–	0,3333	0,3333
BM575	0,0053*	0,7500	0,7256	1,0000	0,5000	0,5416	0,4341	0,4286	0,6044	0,4924	0,6000	0,7111	1,0000	1,0000	0,7333
NVHRT01	0,0000*	0,2000	0,5795	0,0424*	0,1250	0,6583	0,6646	0,8571	0,6264	1,0000	0,8000	0,6000	1,0000	0,6667	0,7333
NVHRT03	0,4425	0,6842	0,6529	0,5836	0,5000	0,6917	1,0000	0,6000	0,3333	–	0,2000	0,2000	–	0,0000	0,0000

*locos para os quais o desvio do equilíbrio (H-W) foi significativo (<0,05)

A tabela 17 apresenta uma comparação da diversidade alélica, da heterozigosidade média e do coeficiente de endogamia (Fis) entre a população original, a população fundadora e as três gerações da população reintroduzida da E.E.J. Aqui, pode-se observar novamente a perda de alelos ocorrida desde a população original até a última geração da população da E.E.J. A heterozigosidade média oscilou nas primeiras gerações, porém a última geração apresentou um grande declínio. O coeficiente de endogamia (Fis) oscilou entre valores negativos e positivos, todos bem próximos de zero, não evidenciando o aumento da endogamia esperado para uma população pequena. O coeficiente médio de endogamia da população, calculado pelo Pedigree foi de 0,02, coincidindo com o valor de Fis encontrado pelo Genepop para a terceira geração da E.E.J.

Tabela 17. Tamanho da amostra de cada população (n), número médio de alelos (k), heterozigosidade média (H.M.) e coeficiente de endogamia (Fis).

	<i>N</i>	<i>k</i>	<i>H. M.</i>	<i>Fis</i>
Original	20	4,5	0,616	-0,02
Fundadora	8	3,5	0,5	0,01
1ª geração	7	3	0,695	-0,02
2ª geração	6	2,83	0,625	-0,02
3ª geração	2	2,17	0,333	0,02

Aqui é possível observar que a terceira geração da E.E.J. é composta por apenas dois indivíduos (bastante inferior ao número de indivíduos das outras gerações que se situa em torno de sete). Isso nos levou à excluí-la de nossas análises, visto que os valores apresentados por ela poderiam causar uma distorção na análise e comparação dos resultados.

A Tabela 18 apresenta os valores encontrados para cálculo de PIC e de alelos nulos em cada um dos seis locos microssatélites utilizados. É possível observar que o loco RT01 apresentou baixo valor de PIC (<0,05) e que apenas o loco NV03 apresentou valor significativo para presença de alelos nulos.

Tabela 18. Valores de PIC e alelos nulos encontrados para a população reintroduzida.

Locos	PIC	Alelos Nulos
RT01	0,337	-0,1178
RT30	0,542	-0,0414
CA71	0,512	-0,1396
BM757	0,519	0,0313
NV01	0,531	0,0215
NV03	0,528	0,0829*

* Valor significativo para presença de alelos nulos(acima de 0,05)

4.3. Análise de viabilidade populacional (PVA)

Os resultados encontrados para 10 primeiros anos da população reintroduzida foram condizentes com seu status em 2007 (último ano de monitoramento). Não houveram diferenças entre o cenário rodado com valores de 3,14 e 1,57 para equivalentes letais. Eles apresentaram alta probabilidade de sobrevivência, número de indivíduos aumentando até aproximadamente 25 e diversidade genética estável (FIGURA 7).

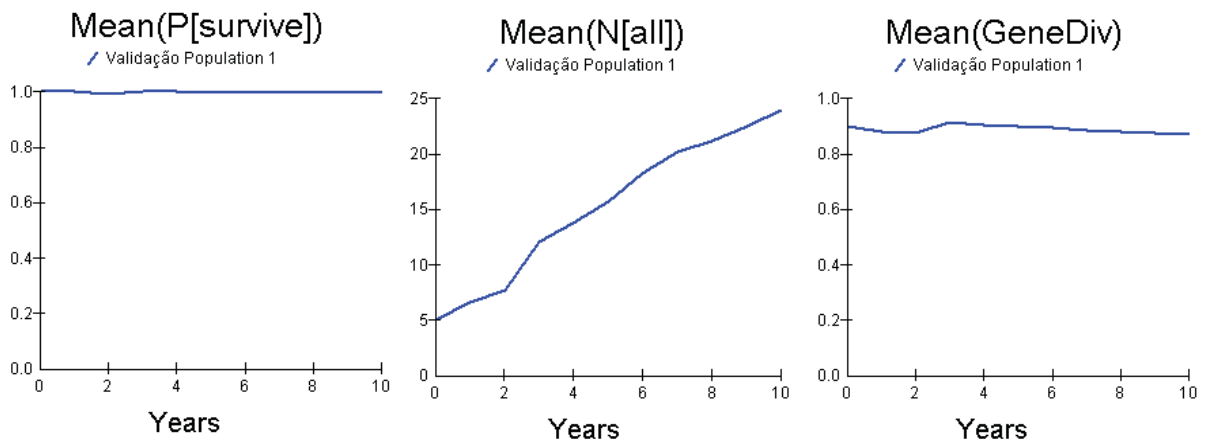


Figura 7. Probabilidade de sobrevivência, número de indivíduos e diversidade genética da população da E.E.J. durante os primeiros 10 anos de sua existência.

Posteriormente, utilizando os mesmos parâmetros empregados para o cenário de validação, o programa foi rodado para os próximos 100 anos (a partir de 2007), sem adicionar catástrofes. Aqui, os cenários rodados com valores distintos

para equivalentes letais (3,14 e 1,57) apresentaram diferenças. As mais notáveis foram nos índices de Probabilidade de Sobrevivência, Número de Indivíduos e Taxa de Extinção (FIGURA 8). Diversidade genética e endogamia não apresentaram diferenças (TABELA 8).

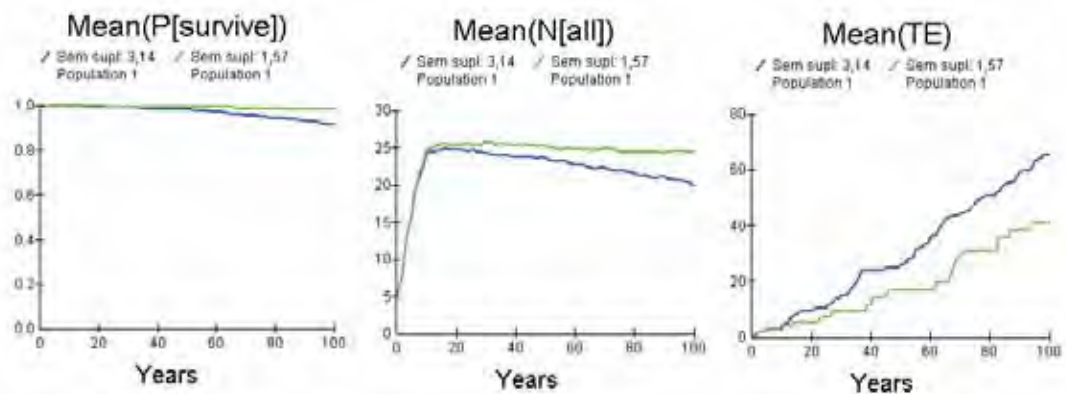


Figura 8. Comparação da probabilidade de sobrevivência, do número de indivíduos e da taxa de extinção entre os cenários rodados para os próximos cem anos, com valores de equivalentes letais distintos (verde: 1,57 / azul: 3,14) , na população reintroduzida da E.E.J.

Assim, quando usado o valor 3,14 para equivalentes letais, os resultados encontrados apontaram uma leve diminuição na probabilidade de sobrevivência, no número de indivíduos da população e um aumento da probabilidade de extinção. Deste modo, foram rodados diversos cenários com suplementação, a fim de encontrar qual a melhor estratégia de manejo, fazendo-se o menor número de intervenções possíveis na população. O cenário que apresentou os melhores resultados foi o que sugeria a translocação de 2 a 3 indivíduos jovens, num intervalo de 3 em 3 gerações.

Os gráficos abaixo (todos utilizando 3,14 para equivalentes letais) mostram a diferença entre o cenário sem suplementação (azul) e o cenário com suplementação (verde) para: probabilidade de sobrevivência (FIGURA 9), diversidade genética (FIGURA 10), a endogamia (FIGURA 11) e taxa de extinção (FIGURA 12). Os resultados encontrados para todos os cenários rodados encontram-se na Tabela 19.

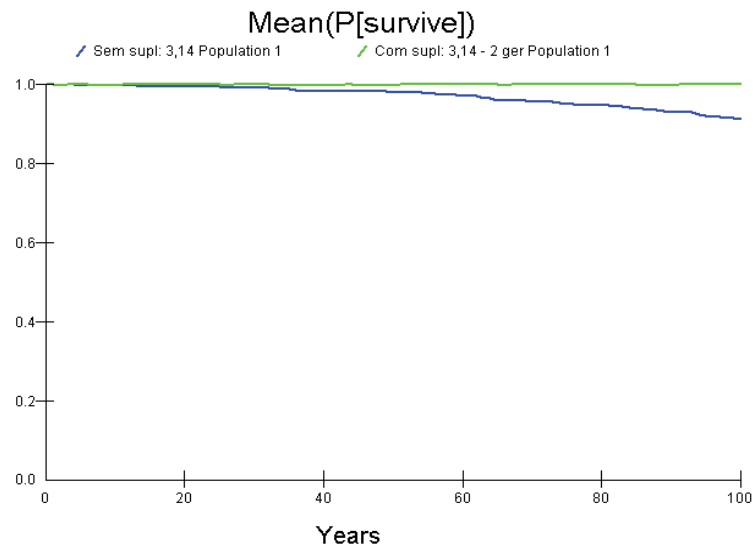


Figura 9. Comparação entre os cenários sem suplementação (azul) e com suplementação (verde) para a probabilidade de sobrevivência da população da E.E.J. para os próximos 100 anos, a partir do último ano de monitoramento (2007).

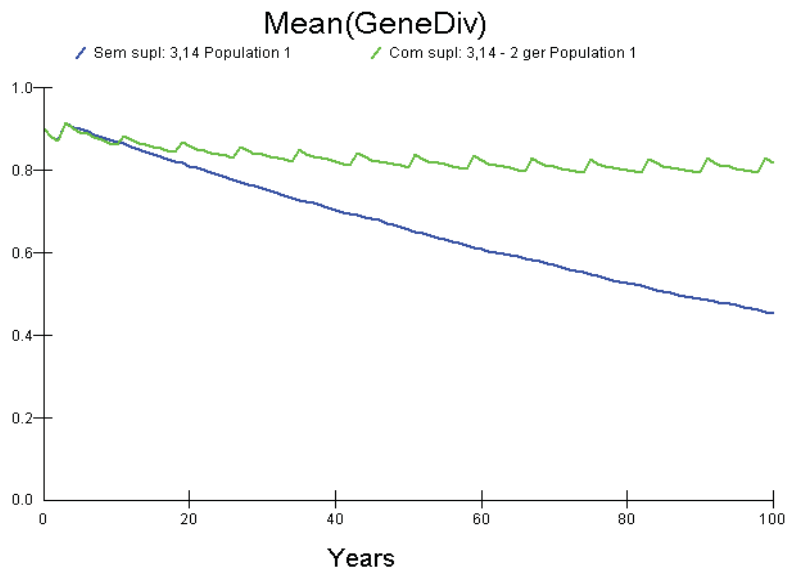


Figura 10. Comparação entre os cenários sem suplementação (azul) e com suplementação (verde) para a média da diversidade genética na população da E.E.J. para os próximos 100 anos, a partir do último ano de monitoramento (2007).

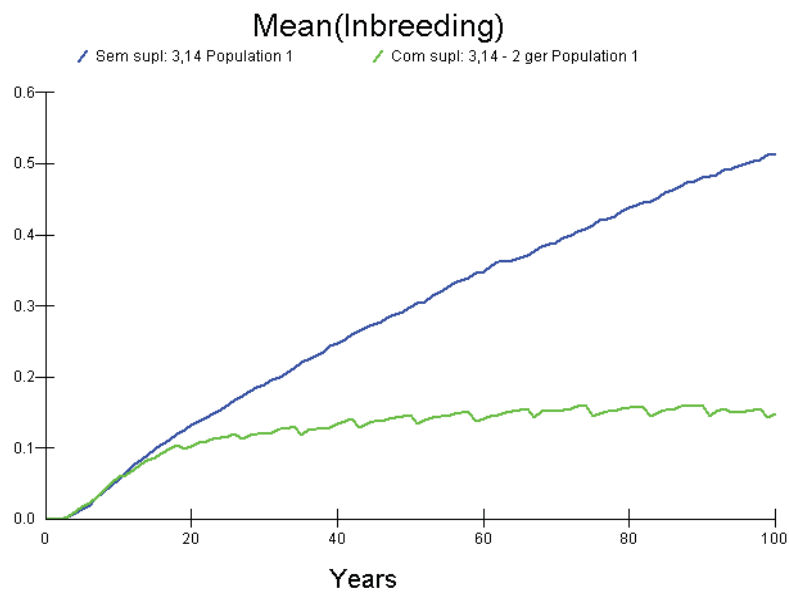


Figura 11. Comparação entre os cenários sem suplementação (azul) e com suplementação (verde) para endogamia na população da E.E.J. para os próximos 100 anos, a partir do último ano de monitoramento (2007).

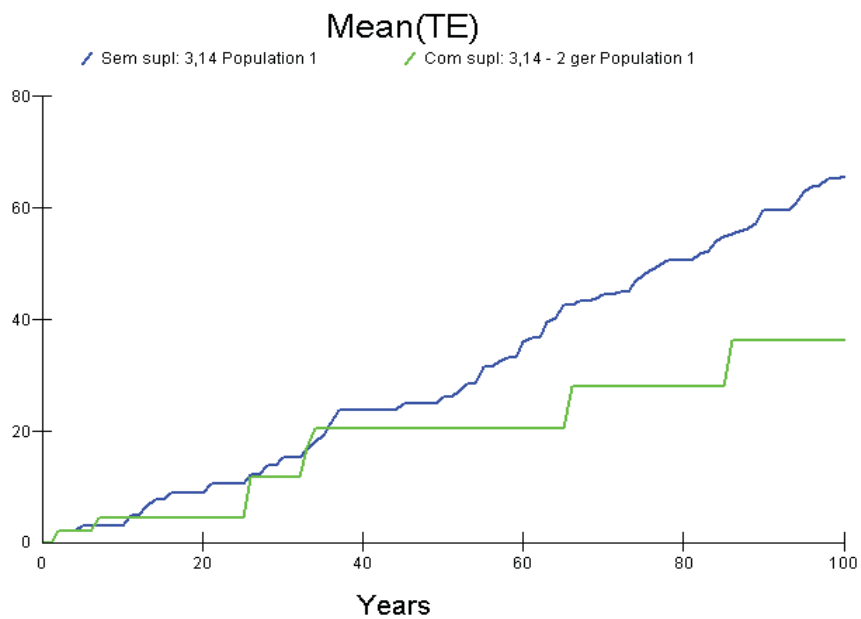


Figura 12. Comparação entre os cenários sem suplementação (azul) e com suplementação (verde) para a taxa de extinção na população da E.E.J. para os próximos 100 anos, a partir do último ano de monitoramento (2007).

Tabela 19. Cenários rodados no estudo de viabilidade mostrando o intervalo de tempo projetado (Int. Anos), o valor para equivalentes letais utilizado (Eq. Let.), se foi realizada suplementação (Supl), o intervalo de gerações que foi sugerido para as suplementações (Int. Ger.) o valor de r determinístico (r-det.), o valor de r estocástico (r-stc), o número de indivíduos encontrados no fim da projeção (N-all), a diversidade genética (Div. Gen) e a probabilidade de extinção (P.E).

Scenário	Int. Anos	Eq. Let.	Supl.	Int. Ger	r-det	r-stc	N-all	Div. Gen.	P.E.
1	10	3,14	não	-	0,1350	0,1800	24,17	0,8703	0,0020
2	10	1,57	não	-	0,1350	0,1810	24,40	0,8704	0,0060
3	100	3,14	não	-	0,1350	0,0740	20,05	0,4608	0,0830
4	100	1,57	não	-	0,1350	0,1020	24,58	0,4635	0,0180
5	100	3,14	sim	1	0,1350	0,1380	26,69	0,8712	0,0000
6	100	1,57	sim	1	0,1350	0,1470	26,90	0,8638	0,0010
7	100	3,14	sim	2	0,1350	0,1140	26,19	0,8192	0,0000
8	100	1,57	sim	2	0,1350	0,1290	26,55	0,7994	0,0000
9	100	3,14	sim	3	0,1350	0,1040	25,90	0,7772	0,0000
10	100	1,57	sim	3	0,1350	0,1200	26,16	0,7414	0,0000
11	100	3,14	sim	4	0,1350	0,0980	24,95	0,7429	0,0000
12	100	1,57	sim	4	0,1350	0,1170	26,11	0,7060	0,0000
13	100	3,14	sim	5	0,1350	0,0940	24,37	0,6698	0,0010
14	100	1,57	sim	5	0,1350	0,1120	25,32	0,6363	0,0040
15	100	3,14	sim	6	0,1350	0,0900	24,69	0,7010	0,0050
16	100	1,57	sim	6	0,1350	0,1120	25,73	0,6628	0,0050

V. DISCUSSÃO

Segundo Frankhan (2004), populações pequenas e isoladas sofrem endogamia acelerada e perda de diversidade genética, o que leva a um vigor reprodutivo reduzido (depressão endogâmica) e menor habilidade para evoluírem em resposta a mudanças ambientais.

Em populações fechadas pequenas, o acasalamento entre indivíduos aparentados é inevitável (FRANKHAN et al. 2008). Com o tempo, todos os indivíduos tornam-se relacionados, de tal maneira que acasalamentos entre indivíduos não relacionados se torna impossível. A endogamia é de profunda importância na biologia da conservação uma vez que ela leva a reduções na heterozigosidade, a redução da reprodução e sobrevivência e ao aumento no risco de extinção (FRANKHAN et al. 2008). Os dados apresentados aqui mostram índices de *Fis* (endogamia) oscilando entre valores negativos e positivos, porém bem próximos de zero (Pop. Original *Fis* = - 0,02 / Pop. Fundadora *Fis* = 0,01 / Primeira geração da E.E.J. *Fis* = - 0,02/ Segunda geração da E.E.J. *Fis* = -0,02). A média do índice de endogamia (*F*) calculado para cada indivíduo da população, pelo programa Pedigree foi de 0,02, bem próximo aos valores de *Fis* encontrados. Essa estabilidade nos índices de endogamia nos mostra que, a endogamia existe, é inevitável em pequenas populações, porém não apresentou aumento expressivo até a segunda geração da população reintroduzida.

Em virtude da depressão endogâmica, a endogamia é frequentemente vista como algo deletério para uma população (TEMPLETON, 2011). Essa idéia de que endogamia é deletéria levantou diversas preocupações para espécies ameaçadas, uma vez que estas frequentemente têm seu tamanho populacional reduzido, gerando altos índices de endogamia rapidamente (TEMPLETON, 2011). Estudos sobre depressão endogâmica demonstraram que essas preocupações são válidas, e que as aplicações da genética da conservação devem focar em como lidar com a endogamia em seus vários sentidos e conseqüências (TEMPLETON, 2011).

Entretanto, a endogamia pode nem sempre ser deletéria. O endocruzamento aumenta a homozigosidade, expondo os alelos deletérios recessivos à seleção.

Conseqüentemente, uma população endogâmica teria seus alelos deletérios removidos (ou expurgados) mais rapidamente do que ocorreria sob acasalamento ao acaso (FRANKHAN et al. 2008). Assim, deve-se tomar cuidado ao afirmar que populações endogâmicas estão fadadas a extinção. O ideal seria que houvesse monitoramento dessas populações e, quando percebidos sinais de depressão endogâmica (como diminuição no número de nascimentos e aumento na mortalidade de filhotes), é que devem ser tomadas providências, fazendo-se o manejo necessário para a diminuição dessa endogamia na população.

Quanto aos índices de diversidade genética, é possível observar igual estabilidade (População original $HM=0,616$ / Segunda geração E.E.J. $HM=0,625$) sendo que a maior perda ocorreu da população original ($HM = 0,616$) para a população fundadora ($HM = 0,5$), devido provavelmente ao efeito fundador sofrido na formação dessa nova população.

O efeito fundador é um caso particular de deriva genética, descrito por Ernest Mayr. Ocorre quando um pequeno grupo de indivíduos, não representativos da população, isola-se e funda uma nova população que, por erro amostral, é diferente da população de origem. Assim, esta poderá ser bem diferente da população a qual vieram os indivíduos, uma vez que, dificilmente, os poucos migrantes, teriam toda a variabilidade da população inicial (SENE, F.M., 2009). A tabela 7 (diversidade alélica) confirma que a grande diminuição da diversidade genética ocorreu no evento da reintrodução, com uma perda total de 6 alelos da População Original (27 alelos) para a População Fundadora (21 alelos).

Sene ainda frisa que a diferença entre as populações (no caso a original e a reintroduzida) poderá ser maior ainda se os indivíduos fundadores possuírem algumas características que eram raras na população inicial e que se tornaram freqüentes na nova população pelo fato de estarem presentes nos fundadores. Dentro desse contexto, ao analisar as tabelas 11, 12 e 15 é possível observar que alguns alelos existentes na população fundadora não estão presentes na nossa amostra da população original (alelos 196, 112 e 218 dos locos RT30, NVHRT03 e RT01, respectivamente). Todavia, o fato de nossa amostragem da população original ter sido relativamente pequena (foram amostrados 20 indivíduos de uma população onde acredita-se ter sido composta por aproximadamente 1500 cervos-

do-pantanal), pode ter contribuído para essa exclusividade de alelos na população fundadora.

A deriva genética é erro amostral, decorrente do fato de o conjunto de zigotos que dará origem a geração seguinte, não conter o mesmo patrimônio genético da geração anterior (SENE, F.M., 2009). Apesar da perda alélica nas gerações da E.E.J. ter sido substancialmente menor (em média 2 alelos por geração) do que a sofrida no evento da reintrodução (6 alelos), podemos observar que a deriva genética é uma força atuante nessa população.

A partir da construção da árvore genealógica foi possível observar que o indivíduo 25 não se reproduziu, visto que apresentou o alelo 307 do loco CA71 em homozigose, o qual não aparece em nenhum outro indivíduo da população da E.E.J. Deste modo, 88,5% dos indivíduos reintroduzidos cruzaram e deixaram descendentes. Essa informação terá grande importância para futuros projetos dessa natureza, pois será utilizada para calcular quantos indivíduos devem ser reintroduzidos para que se consiga um número esperado de animais efetivamente fundadores.

Apesar de não ter sido possível chegar à paternidade de 3 dos 22 indivíduos da população reintroduzida da E.E.J., os locos utilizados nesse estudo foram bastante informativos, sendo possível realizar todas as análises propostas. O número de locos necessários para resolver inequivocamente o parentesco dentro de um dado nível de confiança depende de vários fatores, como: a) variação em cada loco (medida pela heterozigosidade), b) número de pais candidatos a serem distinguidos, c) Amostragem de todos os possíveis pais, e d) conhecimento dos dados genéticos de um dos pais (MARSHALL, 1998). Na presente situação, a única alternativa viável para resolver o restante dos parentescos de maneira inequívoca seria aumentar o número de locos analisados. Mesmo assim, segundo Slate (2000), temos que aceitar que uma proporção importante dos testes de paternidade realizados permanecerá sem solução.

O número total de alelos encontrados para os 6 locos estudados foi 30, perfazendo uma média de 5 alelos por loco, com locos variando de 4 a 7 alelos. Dados da literatura sugerem que o número de alelos por loco microsatélite situa-se entre 5 e 10 (FRANKHAM et al. 2002). Nossos resultados encontram-se abaixo da

média descrita na literatura, porém, esse resultado já era esperado, visto que, estudos anteriores com populações de cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) já haviam mostrado que essa espécie possui uma baixa variabilidade genética. Oliveira et al. (2005) utilizou isoenzimas como marcador molecular em 147 indivíduos de três populações do rio Paraná. Dos 17 locos analisados, apenas 6 foram polimórficos, sendo que o mais polimórfico apresentou apenas 4 alelos. Outro estudo, também realizado por Oliveira et al (2009), utilizando 9 locos microssatélites em 50 indivíduos apresentou uma média de 5,93 alelos por loco, bem próxima a média encontrada em nosso estudo.

Estudos citogenéticos mostraram que cervo do pantanal não tem variação cariotípica (MARQUEZ et al. 2006). Marquez et al. 2006, utilizando DNA mitocondrial em 127 indivíduos também encontraram baixa variabilidade genética para a espécie. Nesse estudo foi sugeriu que as populações de cervo-do-pantanal próximas ao Brasil central (incluindo a população da bacia do rio Paraná) passaram por um forte gargalo genético há cerca de 25 - 28 milhões de anos (Pleistoceno), com posterior expansão demográfica dessa população (MARQUEZ et al 2006). Essa baixa variação genética exibida pelo cervo do pantanal é similar à daquelas espécies também teriam passado por uma rápida expansão demográfica após serem submetidas a um forte gargalo genético no refugio do pleistoceno (MARQUEZ et al 2006).

Outro entrave que poderia justificar o baixo polimorfismo encontrado neste trabalho seria o fato de todos os locos utilizados aqui não se tratarem de locos específicos, ou seja, não foram desenvolvidos para *Blastocerus dichotomus* e sim para outras espécies filogeneticamente próximas, os chamados iniciadores heterólogos. Alguns estudos já detectaram baixos níveis de polimorfismos em outras espécies utilizando iniciadores heterólogos (FRANCISCO et al. 2006, TAVARES et al., 2007, LOPES et al. 2010). Porém, apenas o loco NVHRT03 apresentou valor significativo para a presença de alelos nulos, o que comprova a eficácia dos outros utilizados nesse estudo.

Assim, os locos utilizados nesse trabalho, apesar de apresentarem polimorfismo abaixo da media descrita na literatura, foram bastante adequados para a realização do estudo proposto, sendo que, a utilização de apenas mais um ou dois

locos, com aproximadamente 3 alelos cada, seria suficiente para solucionar as dúvidas acerca da paternidade dos três indivíduos restantes.

Para realizar a análise de viabilidade populacional foi necessário utilizar taxas de mortalidade inferiores às descritas na literatura, pois quando essas eram utilizadas no programa, a população reintroduzida da E.E.J. se extinguiu antes dos 10 primeiros anos de sua existência. As taxas de mortalidade descritas na literatura foram estimadas ao se monitorar a população da bacia do rio Paraná, a qual sofria forte impacto de predação e caça. Em contrapartida, os dados de monitoramento da população reintroduzida da E.E.J. mostraram que, naquele local, a pressão de predação era praticamente zero, apesar da existência de potenciais predadores na área. Assim como a pressão de caça, a qual era relativamente controlada, visto que a E.E.J. encontra-se numa área de reserva ambiental. Dessa forma, pudemos suportar a hipótese de uma baixa taxa de mortalidade para os primeiros 10 anos dessa população.

De acordo com nossos estudos de viabilidade da população reintroduzida da E.E.J. há uma grande diferença nas taxas de extinção, de acordo com os valores de equivalentes letais utilizados. A maior probabilidade de extinção encontrada foi de 0,083, apresentada pelo cenário rodado para os próximos cem anos, sem que fossem realizadas suplementações e considerando-se valor de 3,14 para equivalentes letais. Quando o mesmo cenário foi rodado com metade do valor de equivalentes letais, essa probabilidade caía para 0,018. Assim, a carga genética dessa população parece ser o fator que mais afetaria a sobrevivência dessa população a longo prazo, já que a endogamia é inevitável em populações de tamanho reduzido. Entretanto, não existem trabalhos que indicam qual o valor exato de equivalentes letais dessa população. Dessa forma, o ideal seria que houvesse um constante monitoramento da mesma, a fim de verificar se a endogamia está levando à depressão endogâmica e, se a resposta for positiva, a translocação de 2 a 3 indivíduos a cada 4 gerações (cerca de 12 anos) seria uma estratégia de manejo suficiente para manter a diversidade genética dessa população suficientemente alta nos próximos cem anos, de acordo com nossos estudos de viabilidade.

Para projetos futuros, o ideal seria que fossem reintroduzidos números maiores de indivíduos fundadores, a fim de diminuir a endogamia e aumentar o pool

gênico que será inserido na nova população. Porém, o Estado de São Paulo, não possui grandes várzeas que possibilitem a manutenção de uma população geneticamente sustentável de cervos-do-pantanal. Seria necessária uma área de várzea contínua de pelo menos 100.000 ha, para que fosse possível a manutenção de uma população de 500 animais. A inexistência dessas áreas no Estado direciona o esforço conservacionista para a implantação de pequenas populações nos poucos fragmentos de várzea existentes (DUARTE et al, 2000).

Portanto, desde que haja acompanhamento, com monitoramento constante e, a partir daí, sejam realizadas estratégias de manejo que visem à manutenção da diversidade genética dessas populações, projetos de reintrodução como esse podem ser viáveis. Dessa forma, o Projeto de Reintrodução do Cervo-do-Pantanal de Porto Primavera deve servir de exemplo para criação de outras populações dessa espécie no estado de São Paulo.

VI. CONCLUSÕES

- ✓ Os locos utilizados aqui se mostraram eficientes para a realização das análises propostas, mesmo todos se tratando de iniciadores heterólogos;
- ✓ A população reintroduzida apresentou grande perda de diversidade genética, em relação a sua população de origem, devido provavelmente ao gargalo genético sofrido na formação dessa nova população;
- ✓ Os índices de diversidade genética e endogamia da população reintroduzida apresentaram valores estáveis até o momento;
- ✓ A partir do estudo de viabilidade dessa, foi sugerida a inserção de 2 a 3 indivíduos num intervalo de 4 em 4 gerações, a fim de evitar que a população venha a sofrer depressão por endogamia futuramente;
- ✓ No projeto do cervo-do-pantanal de Porto Primavera, a reintrodução mostrou-se uma ferramenta válida no esforço para a conservação da espécie no estado de São Paulo, devendo servir como exemplo para outros projetos dessa natureza.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVISE, J.C.; HAMRICK, J.L. Conservation genetics. Chapman & Hall, London. 1996
apud SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da
conservação. In: MATIOLI, S. R. (ed) Biologia Molecular e Evolução. 202p.,
2001.
- AZARA, F. Apuntamientos para la história natural de los cuadrúpedes del Paraguay
y Rio de Plata. Imprenta de la Viuda de Ibarra, Madrid, v 1, p 1-389, 1902
- BEIGUELMAN, B. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. Soc. Bras.
Gen. Ribeirão Preto, p 472, 1994.
- BREDA, F. C.; EUCLYDES, R. C.; PEREIRA, C. S.; TORRES, R. A.; CARNEIRO, P.
L. S.; SARMENTO, J. L.R.; FILHO, R. A. T.; MOITA, A. K. F. Endogamia e
Limite de Seleção em Populações Seleccionadas Obtidas por Simulação.
Revista Brasileira Zootecnia. v 33, p.2017-2025, (Supl. 2), 2004.
- CABRERA, A. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. Revista del Museo
Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”. v 4, 309-732, 1961.
- CADE, T. J. Using science and technology to reestablish species lost in nature. In:
Biodiversity. ed. Washington: National Academic Press, p. 279-288, 1988.
- CHARDONNET, P.; CHARITY, S. A marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) capture
experiment in Brazil using a net-gun from a helicopter. *OngulesUngulates* 91,
1992.
- CHATRITY, S. E.; TOMÁS, W.; BUSCHINELLI, M. C. P. Plano de manejo e
conservação para o cervo-do-pantanal *Blastocerus dichotomus* – U.H.E. Três
Irmãos. CESP, São Paulo. 1989.
- CLINCHY, M.; TAYLOR, A. C.; ZANETTE, L. Y.; KREBS, C. J.; JARMAN, P. J. Body
size, age and paternity in common brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*).
Molecular Ecology, n.1, v.13, p.195-202. 2004.
- COLLEVATTI, R. G.; MENEGASSO, T. R.; LEITE, K. C. E.; TOMAS, W. M.;
DUARTE, J. M. B. Transferability of microsatellite loci from Cervidae species
to the endangered Brazilian marsh deer, *Blastocerus dichotomus* *Genetics
and molecular research*, v 6, n 2, 2007.

- COSSE, M.; GONZALEZ, S.; MALDONADO, J. E. 2007. Cross-amplification tests of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Genetics and Molecular Research*, v.6, p.1118-1122
- DUARTE J. M. B. (ed.), *Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. FUNEP, Jaboticabal, 1997.
- DUARTE J.M.B.; *Relatório final de pesquisa: Projeto cervo do pantanal de Porto Primavera (Blastocerus dichotomus)* Funep, 2000.
- DUARTE, J.M.B. A technique for the capture of free-ranging marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39(4): 596–599, 2008.
- DUARTE, J. M. B; RAMOS, H. G. C.; TORRES, H. A.; LEMES, M. R. S. Efeito da usina hidroelétrica de Porto Primavera sobre a mortalidade de cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) em diferentes áreas da bacia. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Mastozoologia*, 2, Belo Horizonte, 282p. 2003.
- FALCONER, D. S. *Introduction to quantitative genetics*. Harlow, Longman Scientific & Technical, 438 p. 1989.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 220p,1996.
- FIGUEIRA, C.J.M. *Reintrodução de cervos-do-pantanal (Blastocerus dichotomus): uso do espaço e área de vida dos animais*. São Carlos. Dissertação (mestrado). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, UFScar, 66p., 2002.
- FITZSIMMONS, N.N.; MORITZ, C.; MOORE, S.S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, v. 12, p.432-440,1995.
- FORBES, S.H.; BOYD, D. K. Genetic structure and migration in native and reintroduced Rocky Mountain wolf populations. *Conserv Biol* 11:1226–1234, 1997.
- FOWLER, K. ; WHITLOCK, M. C. The variance in inbreeding depression and recovery of fitness in bottlenecked populations. *Proc. Royal Society Lond.* 266, p. 2061-2066, 1999.

- FRANCISCO, F.O.; BRITO, R.M.; ARIAS, M.C. Allele number and heterozygosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Neotropical Entomology* n. 35, p. 638-643, 2006.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press, 617p. 2002.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. *Fundamentos da genética da conservação*. Editora SBG, 2008.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Genetic consequences of small population size. *A Primer of Conservation Genetics*. p 53-75, 2004.
- FRANKLIN, I. R.; FRANKHAM, R. How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation*, 1, p. 69-70 apud SOLÉ-CAVA, A. M. *Biodiversidade molecular e genética da conservação*. In: MATIOLI, S. R. (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. 202p., 2001.
- FRANKLIN, O. H.; SOULÉ, M. E. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge. 1981 apud SOLÉ-CAVA, A. M. *Biodiversidade molecular e genética da conservação*. In: MATIOLI, S. R. (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. 202p., 2001.
- GLENN, T.C.; DESSAUER, H.D.; BRAUN, M.J. Characterization of microsatellite DNA loci in American Alligators. *Copeia*, Austin, p.591-601, 1998.
- GONZALEZ, S.; DUARTE, J.M.B.; MALDONADO, J.E. Molecular Phylogenetics and Evolution. In: DUARTE, J.M.B. & GONZALES, S. Eds. *Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer*. Jaboticabal, Funep/IUCN. p.12-17, 2010.
- GOTTELLI, D.; SILLERO-ZUBIRI, C.; APPLEBAUM, G. D.; ROY, M. S.; GIRMAN, D. J.; GRACIA-MORENO, J.; OSTRANDER E. A.; WAYNE, R. K. Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian Wolf, *Canis simensis*. *Molecular Ecology*. v.3, p.301-312. 1994.
- HOFMAN, R. C.; PONCE DEL PRADO, C. F.; OTTE, K. C. Registrato de dos nuevas especies de mamíferos para el Perú, *Odocoileus dichotomus* (Liliger, 1811) y *Crysocyon brachyurus* (Liliger, 1811), con notas sobre su habitat. *Revista Florestal del Perú*, v 5, p 61-81, 1976.

- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Lista nacional das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2006.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES .The IUCN position statement on translocation of living organisms: introductions, re-introductions and re-stocking. IUCN position statement. Gland, Switzerland, 1984.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. 2006 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Acesso em 02 de Fev. de 2011.
- JUNGIUS, H. Status and distribution of threatened deer species in South America. Report to the SSC/IUCN Deer Specialist Group. Reprinted from the World Wildlife Yearbook, p 203-217, 1976.
- KINGHORN B. P. Pedigree viewer — a graphical utility for browsing pedigreed data sets. In: 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (eds Smith C, Gavora JS, Benkel B et al.), pp. 85–86. University of Guelph, Ontario, Canada, 1994.
- KLEIMAN, B. G. Reintroduction of captive mammals for conservation. *Bioscience* n.39, p. 152-161, 1989.
- KONSTANT, W. R.; MITTERMEIER, M. A. Introduction, reintroduction, and translocation of neotropical primates: past experiences and future possibilities. *International Zoo Yearb.* v.22, p.69-77. 1982.
- LALOI, D.; RICHARD, M.; LECOMTE, J.; MASSOT, M.; CLOBERT, J. Multiple paternity in clutches of common lizard *Lacerta vivipara*: data from microsatellite markers. *Mol. Ecol.* v 13, p 719-724, 2004.
- LE GOUAR, P.; RIGAL, F.; Boisselier-Dubayle, M-C., Sarrazin, F., Arthur, C., Choisy, J.P., Hatzofe. O., Henriquet, S., Lécuyer, P., Tessier, C., Susic, G., & Samadi, S. Genetic variation in a network of natural and reintroduced populations of Griffon vulture (*Gyps fulvus*) in Europe. *Conservation Genetics* 9 : P. 349-359, 2008
- LEDING, F. T. Founder effects and the genetic structure of coulter pine. *The American genetic association* 91, 307-315, 2000.

- LIBERG, O.; ANDREN, H.; PEDERSEN, H. C.; SAND, H.; SEIBERG, D.; WABAKKEN, P.; AKESSON, M.; BENSCH, S. Severe inbreeding depression in a wild wolf population *Canis lupus*. *Biology Letters*, n.1, p. 17-20, 2005.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A. Hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* v.44, p.397-401. 1989.
- LOPES, D.N.; CAMPOS, L.A.O.; FERNANDES SALOMAO, T.M. TAVARES, M.G. Comparative study on the use of specific and heterologous microsatellite primers in the stingless bees *Melipona rufiventris* and *M. mondury* (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and Molecular Biology*, N. 33, v. 2, p. 390-393, 2010.
- LUCCHINI, V.; GALOV, A.; RANDI, E. Evidence of genetic distinction and longterm population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Mol. Ecol.* v 13(3), p 523-526, 2004.
- MANTELLATTO, A.M.B.; CARNELOSSI, E.A.G.; DUARTE, J.M.B. Transferability of microsatellite loci from exotic Cervidae to Brazilian brocket deer (*Mazama* spp, Mammalia: Cervidae). *Genetics and Molecular Research*, 9(1) 277-282. 2010.
- MÁRQUEZ, A., MALDONADO, J.E., GONZÁLEZ, S., BECCACECI, D., GARCIA, J.E., DUARTE, J.M.B. Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh Deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Rio de la Plata Basin. *Conservation Genetics* (2006) 7:563-575, 2006.
- MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. v.7, p.639-655. 1998.
- MAUDET, C.; MILLER, C.; BASSANO, B.; BREITENMOSER-WURSTEN, C.; GAUTHIER, D.; OBEXER-RUFF, G.; MICHALLET, J.; TABERLET, P.; LUIKART, G. Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [*Capra ibex*(ibex)]. *Molecular Ecology*, v11, p 421-436, 2002.
- MATIIOLI, S. R. (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. 202p., 2001.
- MAURO, R. A.; MOURÃO, G. M.; SILVA, M. P.; COUTINHO, M. E.; TOMÁS, W. M.; MAGNUSSON, W. E. Influência do habitat na densidade e distribuição de

- cervo (*Blastocerus dichotomus*) durante a estação de seca no pantanal Mato-Grossense. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 55, n.4, p.745-751. 1995.
- MILLER, C. R.; ADAMS, J. R.; WAITS, L. P. Pedigree-based assignment tests for reversing coyote (*Canis latrans*) introgression into the wild red wolf (*Canis rufus*) population. *Molecular Ecology*. v.12, p.3287-3303. 2003.
- MORIN, P. A.; MOORE, J. J.; CHAKRABORTY, R.; JIN, L.; GOODALL, J.; WOODRUFF, D. S. Kin selection, social structure, gene flow and evolution of chimpanzees. *Science*. v 265, p 1193-1201, 1994a.
- MORIN, P. A.; WALLIS, J.; MOORE, J. J.; WOODRUFF, D. S. Paternity exclusion in a community of wild chimpanzees using hypervariable simple sequence repeats. *Mol. Ecol.* v 3, p 469-478, 1994b.
- MORIN, P.A.; WOODRUFF, D.S. Paternity exclusion using multiple hypervariable microsatellite loci amplified from nuclear DNA of hair cells. In: R.D. Martin, A.F. Dixson, and E.J. Wickings. (Ed.). *Paternity in primates: genetic tests and theories*. Switzerland: Karger AG, 287 p. ,1992.
- NOGUEIRA, P. N. A criação de animais indígenas vertebrados. Tecnapis, São Paulo, p. 291-295, 1973.
- O'BRIEN, S. J. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: p. 5748-5755. 1994 apud SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. 202p., 2001.
- O'BRIEN, S. J.; MARTENSON, J. S.; MITHTHAPALA, S.; JANCZEWSKI, D.; PECON-SLATTERY, J.; JOHNSON, W.; GILBERT, D. A.; ROELKE, M.; PACKER, C.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Conservation genetics of the felidae. In: AVISE J. C. e HAMRICK, J. L. (eds) *Conservation genetics*. Chapman and Hall, New York, p. 50-74. 1996 apud SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. 202p., 2001.
- OLIVEIRA, E.J.F.; CONTEL, E.P.B.; GARCIA, J.E.; DUARTE, J.M.B. Genetic Structure of *Blastocerus dichotomus* Populations in the Paraná River Basin (Brazil) Based on Protein Variability. *Biochemical Genetics*, v. 43, n. 5, p. 211-222, 2005.

- OLIVEIRA, E.J.F.; GARCIA, J.E.; DUARTE, J.M.B; CONTEL, E.P.B. Development and characterization of microsatellite loci in the marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Conservation Genetics*, v. 10, n. 5, p. 1505-1506, 2009.
- OSTNER, J.; NUNN, C. L.; SCHULKE, O. Female reproductive synchrony predicts skewed paternity across primates. *Behavioral Ecology*, n.19, p. 1150-1158, 2008.
- PARISOD, C.; TRIPPI, C.; GALLAND, N. Genetic Variability and Founder Effect in the Pitcher Plant *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae) in Populations Introduced into Switzerland: from Inbreeding to Invasion. *Annals of botany* 95: 277-286, 2005.
- PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. p.343-380, In: CULLEN JR, L.; RUDRAN, R. & VALLADARES-PADUA, C. Métodos de Estudos em Biologia da Conservação & Manejo da Vida Silvestre. Ed. da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- PINDER, L.; SEAL, U.S. Population and habitat Viability Assessment Report for Marsh deer *Blastocerus dichotomus* (PHVA). IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN, USA., 1995.
- PIOVEZAN, U.; JACOB, A. A.; ANDRIOLO, A.; PARANHOS da COSTA, M.J.R.; DUARTE, J.M.B. Estudo preliminar dos efeitos da inundação provocada pela UHE Sérgio Motta (Porto Primavera) na sobrevivência e na definição de áreas de moradia do Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) nas proximidades da foz do rio do Peixe, Estado de São Paulo, Brasil, 2001a.. In: Duarte J.M.B. O cervo-do-pantanal de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa. Cd- Rom, FUNEP, Jaboticabal, 2001.
- PIOVEZAN, U.; LEMES, M. R. S.; TORRES, H. A. T.; RAMOS, H. G. C.; COSTA, M. J. R. P.; DUARTE, J. M. B. Área de vida do cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) na região de influência da usina hidroelétrica de Sérgio Motta, bacia do rio Paraná, Brasil. Relatório final do projeto cervo-do-pantanal de Porto Primavera. UNESP, Jaboticabal, 2003.
- PIOVEZAN, U.; TIEPOLO, L.M.; TOMAS, W.M.; DUARTE, J.M.B; VARELA, D.; MARINHO-FILHO, J.S. Marsh deer *Blastocerus dichotomus* (Illiger 1815). In:

- DUARTE, J.M.B. & GONZALES, S. Eds. Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer. Jaboticabal, Funep/IUCN. p.66-76, 2010.
- PEREIRA, R.J.G. Male reproduction. In: DUARTE, J.M.B. & GONZALES, S. Eds. Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer. Jaboticabal, Funep/IUCN. p.12-17, 2010.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F.; Genepop Version 1.2: population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249, 1995
- RAFALSKI, J.A.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; VOGEL, J.M.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA makers in plants In: Birren, B. And Lai, E. (Ed.). *Analysis of non mammalian genomes: a practical guide*, New York: Academic Press, p. 75-133, 1996.
- RALLS, K., BALLOU, J.D., TEMPLETON. A.R.. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conservation Biology* 2:185-93,1988.
- RASMUSSEN, H. B.; OKELLO, J. B. A.; WITTEMEYER, G.; SIEGISMUND, H. R.; ARCTANDER, P.; VOLLRATH, F.; HAMILTON, I. D.; Age- and Tactic- related paternity success in male African elephants. *Behavioral Ecology*. n.19, p. 9-15, 2008.
- ROY, M. S.; GEFFEN, E.; SMITH, D.; OSTRANDER, O.; WAYNE, R. K. Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 11, p. 553-570, 1994.
- SACHHERI, I.M.; KUUSSAARI, M.; KANKARE M.; VIKMAN, P.; FORTELIUS, W.; HANSKI, I. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, 392, p 491-494 (1998).
- SÃO PAULO – SMA. Fauna Ameaçada no Estado de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo SMA/CED. Série Documentos Ambientais. PROBIO p 59, 1998.
- SARRAZIN, F.; BARBAULT, R. Reintroduction: challenges and lessons for basic ecology. *Trends Ecol. Evol.* n.11, p. 474–478, 1996.
- SCHALLER, G. B.; VASCONCELOS, J. M. A marsh deer census in Brazil. *Oryx*. V 14, p 345-351, 1978.

- SCHLÖTTERER, C., Amos, B.; TAUTZ, D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, Londres, v. 354, p. 63–64.,1991.
- SCHLÖTTERER, C. e PEMBERTON, J. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. In: SCHIERWATER, B., STREIT, B., WAGNER, G.P., DeSALLE, R. (Ed.). *Molecular ecology and evolution: approaches and applications*, p.203-214, 1994.
- SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S. Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.29, n.1, p.1-7, 2005.
- SENE, F. M. . Cada Caso, um Caso... Puro Acaso - Os processos de evolução biológica dos seres vivos. 1. ed. Ribeirão Preto-SP: Sociedade Brasileira de Genética, 252 p. 2009.
- SHORROCKS, B. A Origem da Diversidade. Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo. p 181,1980.
- SLATE, J.; MARSHALL, T. C.; Pemberton, J. M. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program Cervus. *Molecular Ecology*. v.9, p.801-808. 2000.
- TAVARES, M.G.; DIAS, L.A.S.; BORGES, A.A.; LOPES, D.M.; BUSSE, A.H.P.; COSTA, R.G.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; CAMPOS, L.A.O. Genetics divergence between population of the stingless bee urucu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais? *Genetic and Molecular Biology*, v.30, p. 667-675, 2007.
- TAYLOR, A. C.; SHERWIN, W. B.; WAYNE, R. K. Genetic variation of simple sequence loci in a bottlenecked species: The decline of the northern hairy-nosed wombat (*Lasiorninus krefftii*). *Mol. Ecol.* v 3, p 277-290, 1994.
- TEMPLETON, A.R. *Genética de populações e teoria microevolutiva*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto-SP,705p. 2011.
- TOMAS, W. M.; BECCACECI, M. D.; PINDER, L. Cervo-do-Pantanal. In: J. M. B. Duarte (ed) *Biologia e Conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama*. FUNEP, Jaboticabal, 1997.

- WORLEY, K.; STROBECK, C.; ARTHUR, S.; CAREY, J.; SCHWANTJE, H.; VEITCH, A.; COLTMAN, D. W. Population genetic structure of North American thinhorn sheep (*Ovis dalli*). *Molecular Ecology*, n.13, p.2545-2556, 2004.
- ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. *Theor Appl Genetic* 80, p. 631-634, 1990.
- ZANE, L. BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 11, n.1, p. 1-16, 2002.
- GONZALEZ, S.; DUARTE, J.M.B.; MALDONADO, J.E. Molecular Phylogenetics and Evolution. In: DUARTE, J.M.B. & GONZALES, S. Eds. *Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer*. Jaboticabal, Funep/IUCN. p.12-17, 2010.

APÊNDICE A

Os procedimentos para extração de DNA foram realizados segundo o protocolo de ZADWORNY & KUHLEIN (1990), com adaptações.

1. Descongelar as amostras, alíquotar 500 μ L de sangue e transferir para um microtubo de 2 mL.
2. Adicionar 120 μ L de SDS (0,5%) ou NONIDET P-40 (12,5%) as amostras, completar o volume (2 mL) com Tampão TKM 1, e homogeneizar no vórtex;
3. Centrifugar por 15 minutos- 10.000 RPM – Temperatura ambiente (22- 25°C), descartar o sobrenadante;
4. Adicionar 900 μ L de tampão TKM 1 para dissolução do pellet em vórtex, e completar volume com TKM 1 (2 mL);
5. Centrifugar por 10 minutos – 10.000 RPM - Temperatura ambiente (22- 25°C), descartar o sobrenadante. Repetir este passo até obter precipitado de coloração clara.
6. Adicionar 1.000 μ L de TKM 2 e 100 μ L de SDS (20%), e agitar em vórtex para dissolução do “pellet”.
7. Incubar em banho-maria a 55-62 °C por 1 hora;
8. Adicionar 400 μ L de NaCl (6M) e agitar no vórtex;
9. Centrifugar por 20 minutos – 14 000 RPM - Temperatura ambiente (22- 25°C), e transferir o sobrenadante para novo microtubo de 1,5 mL.
10. Adicionar 700 μ L de Etanol absoluto gelado e misturar vagarosamente para precipitação do DNA.
11. Centrifugar por 15 minutos – 14 000 RPM – 4 °C, e descartar sobrenadante.
12. Adicionar 700 μ L de Etanol 70% gelado e misturar vagarosamente para precipitação do DNA.
13. Centrifugar por 5 minutos – 14 000 RPM – 4 °C, e descartar sobrenadante.
14. Secar o pellet por inversão (2 a 3 horas);
15. Adicionar 50 μ L de tampão TE (1:10) e agitar por 12 horas em temperatura ambiente.
16. Armazenar as amostras em refrigerador (4 °C) ou em freezer.