

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Bruno Henrique Saranholi

**POLIMORFISMO GENÉTICO-MOLECULAR DE
DIFERENTES POPULAÇÕES DE CATETO (MAMMALIA
- DICOTYLIDAE - *Tayassu tajacu*), BRASIL**

Botucatu

2009

Bruno Henrique Saranholi

**POLIMORFISMO GENÉTICO-MOLECULAR DE
DIFERENTES POPULAÇÕES DE CATETO (MAMMALIA
- DICOTYLIDAE - *Tayassu tajacu*), BRASIL**

Monografia apresentada junto ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Guaracy Tadeu Rocha

Coorientador: Prof. Dr. Celso Luis Marino

Botucatu

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Saranholi, Bruno Henrique.

Polimorfismo genético-molecular de diferentes populações de cateto
(Mammalia – Dicotyliidae – *Tayassu tajacu*), Brasil / Bruno Henrique
Saranholi. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: Guaracy Tadeu Rocha

Co-orientador: Celso Luis Marino

1. Evolução 2. Genética animal

Palavras-chave: Polimorfismo de RAPD; *Tayassu tajacu*; Variabilidade
genética

Dedico este trabalho a aqueles que possuem gosto pela leitura, tentando descobrir um pouco mais sobre a humanidade e sobre a natureza da qual fazemos parte, fazendo desse conhecimento uma importante ferramenta para preservação da vida.

Agradecimentos

Os agradecimentos vão primeiramente a aqueles que me deram todas as oportunidades para estudar e compreender melhor a tão complexa e delicada natureza. Obrigado pai! Obrigado mãe!

Agradecimento especial à minha melhor companhia. Aquela que me ajudou nos momentos de dúvida e ansiedade. Com muito amor e carinho, obrigado Carla!

Aos Profs. Guaracy Tadeu Rocha e Celso Luis Marino que me guiaram durante a execução deste trabalho e me forneceram elementos importantes para a compreensão da Biologia e entusiasmo pela Ciência.

Aos companheiros de laboratório, pela companhia, ajuda nas rotinas laboratoriais e esclarecimento das constantes dúvidas.

Obrigado a Deus, por permitir que todas essas pessoas cruzassem meu caminho, engrandecendo minha vida e o amor pela Ciência.

“Nunca o homem inventará nada mais simples nem mais belo do que uma manifestação da natureza. Dada a causa, a natureza produz o efeito no modo mais breve em que pode ser produzido.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

O estudo de populações naturais é imprescindível para compreendermos melhor a sua dinâmica, importância no ecossistema, necessidade de recursos, nível de preservação das espécies, entre outras. O cateto (*Tayassu tajacu*), apesar de possuir ampla distribuição geográfica e ocupar diversos tipos de habitats, pode sofrer alterações no equilíbrio de suas populações devido às grandes pressões sofridas pela caça e alterações ambientais. Vale lembrar que o sucesso reprodutivo de muitas espécies vegetais está ligado à disseminação de frutos e sementes realizada pelo cateto. Considerando a necessidade de preservação das espécies silvestres, a aplicação de metodologias moleculares é uma das formas de sabermos como se encontra a diversidade genética dessas populações e, a partir daí, criarmos medidas para trabalhos conservacionistas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi identificar o nível de polimorfismo genético-molecular entre diferentes populações de *Tayassu tajacu* no Brasil, demonstrando como essas populações, sujeitas a tantas interferências, encontram-se na natureza. Foram analisadas amostras de 17 indivíduos referentes a oito localidades do Brasil (Cascavel - PR, Foz do Iguaçu - PR, Cuiabá - MT, Ariquemes - RO, Rio Branco - AC, Manaus - AM, Belém - PA, e Carajás - PR). O polimorfismo foi identificado com marcadores de RAPD. Foram testados 38 primers, sendo que desses apenas nove forneceram as 30 marcas polimórficas para o estudo. Foi possível notar que a maioria dos indivíduos da mesma população ou de populações próximas não são os mais semelhantes entre si. Indivíduos de localidade distantes, como os de Foz de Iguaçu (PR) e Manaus (AM) mostraram-se mais semelhantes entre si do que com os animais das suas próprias populações. A variabilidade entre os indivíduos mostrou-se alta, no entanto não foi possível estabelecer uma correlação entre a similaridade polimórfica versus distanciamento geográfico, provavelmente, devido ao esforço amostral.

Sumário

Resumo.....	VI
1-Introdução.....	VIII
2-Objetivo.....	VIII
3-Material e Métodos.....	XI
3.1-Coleta e Conservação da Amostras.....	XI
3.2-Cultura de Linfócitos.....	XII
3.3-Extração do DNA.....	XIII
3.4-Análise do Polimorfismo.....	XIV
3.5-Análise dos Dados.....	XIV
4-Considerações Gerais.....	XV
5-Resultados.....	XVI
6-Referências Bibliográficas.....	XVI
Artigo.....	1
Resumo.....	1
Introdução.....	2
Objetivo.....	4
Material e Métodos.....	4
Resultados.....	5
Discussão.....	6
Referências.....	8

1. Introdução

Atualmente, a família Dicotylidae é representada por dois gêneros com três espécies: *Tayassu tajacu* (cateto), *Tayassu pecari* (queixada) e *Catagonus wagneri* (pecari-de-chaco) (Grubb *et al.*, 1993).

O cateto é o representante de menor porte (cerca de 30 Kg) e de maior distribuição geográfica da família Dicotylidae (Bodmer e Sowls, 1993). Ocupa diversos tipos de ambientes (florestas tropicais, florestas temperadas, desertos, pântanos, etc.) no Arkansas e Texas nos Estados Unidos, América Central e América do Sul, demonstrando ser uma espécie euritópica (Bodmer e Sowls, 1993; Cabrera e Yepes, 1960). São animais de hábito noturno e vivem em bandos com cerca de 30 indivíduos (Bodmer e Sowls, 1993). Seu hábito alimentar é onívoro e seu pré-estômago permite o consumo de itens alimentares bem diversos como frutos, legumes, pequenos vertebrados, insetos, entre outros (Pinheiro *et al.*, 2001). A estrutura crânio-mandibular dicotylidae e porcos (Suidae) permite a quebra de itens alimentares bem resistentes como sementes e legumes (Kiltie, 1981a).

Wright e Duber (2001) verificaram que a espécie *Tayassu tajacu* sofre grande pressão de caça em muitas regiões. Muitos animais são mortos, pois representam uma das únicas fontes de proteína para muitas populações (Parry *et al.*, 2009) e por atacarem áreas de plantações (Pérez e Pacheco, 2006), gerando grandes conflitos para os fins de preservação da espécie. A caça desses animais não interfere apenas na taxa de sobrevivência de suas populações (Chiarello, 1999), mas também na reprodução de algumas espécies vegetais, já que os catetos são considerados grandes dispersores de sementes (Wright e Duber, 2001), pois frutos e sementes representam grande parte de sua dieta. Kiltie (1981b) verificou que 71% do volume estomacal de catetos era composto por partes reprodutivas de vegetais. Apesar de alguns autores considerarem que a espécie possui hábito onívoro, Barreto *et al.* (1997) sugerem que seu hábito alimentar seja frugívoro devido às grandes proporções de frutos e sementes encontrados em seu estômago e fezes.

Outro fator que pode interferir na dinâmica dessas populações é a fragmentação do hábitat (Altrichter e Boaglio, 2003). A quebra da continuidade dos ambientes altera a abundância de espécies do meio devido à redução da área e pelo distanciamento entre os fragmentos florestais remanescentes (Chiarello, 1999). Animais que possuem dietas ricas em frutos e sementes necessitam de uma área maior de forrageamento, pois os frutos apresentam grande sazonalidade de tempo e espaço (Milton e May, 1976). Assim, a disponibilidade e a qualidade desse item alimentar sofrem grande variação (Gentry e

Emmons, 1987). Além disso, a fragmentação diminui a dispersão de sementes e consequentemente a diversidade de frutos (Wright e Duber, 2001; Tabarelli *et al.*, 2004). Tal fato obriga-os a explorarem grandes territórios, com área domiciliar chegando a 800 hectares em grupos de *T. tajacu* (Sowls, 1984).

A procura por áreas remanescentes pode levar a sobreposição de nichos ecológicos entre diferentes espécies. As espécies *Tayassu tajacu*, *Tayassu pecari* e *Sus scrofa* apresentam adaptações na morfologia crânio-mandibular que auxiliam no consumo de frutos de cascas rígidas, no entanto a espécie *Tayassu pecari* possui ainda maior capacidade de incluir itens alimentares de alta resistência em sua dieta, levando à sobreposição dos nichos ecológicos (Sicuro e Oliveira, 2002). Por isso, a preservação do habitat é de fundamental importância para a permanência em longo prazo das populações de pecaris (Keuroghlian e Eaton, 2008) e para manter a disponibilidade de recursos essenciais a essa espécie, evitando o seu deslocamento para outras áreas, o que ocorre em casos de escassez de recursos.

A fragmentação dos habitats modifica cinco componentes abióticos do meio: fluxo de ar, luminosidade, temperatura, umidade do ambiente e umidade do solo (Freideburg, 1998). Essas mudanças afetam as populações de diversas formas: menor disponibilidade de alimento, mudanças comportamentais, redução do cruzamento entre populações (menor fluxo gênico) e outras. Assim, a fragmentação do meio e o isolamento das populações fazem com que essas sofram pressões ambientais diferentes, podendo gerar adaptações que se mantidas ao longo das gerações, levaram a divergência entre elas.

Alguns estudos já demonstraram um princípio de divergência entre populações de cateto, principalmente no que se refere ao conjunto cromossômico. Santos *et al.* (1995) ao comparar o cariótipo de espécimes do Brasil com aqueles já descritos para exemplares do Estados Unidos (Bernirschke e Kumamoto, 1989) e da Guiana-francesa (Vassart *et al.*, 1994) verificou mudanças na morfologia dos cromossomos entre os indivíduos das três localidades. Tais modificações podem ter sido causadas por inversões ou translocações cromossômicas, reduzindo o potencial reprodutivo desses indivíduos devido a falhas durante o pareamento dos cromossomos na meiose ou produção de gametas desbalanceados. Comparando indivíduos de diferentes localidades do Brasil Santos *et al.* (1995) também encontraram modificações cromossômicas. Em indivíduos de Carajás (PA), notou-se que o cromossomo sexual Y apresentava uma morfologia diferente quando comparado com o mesmo cromossomo de indivíduos de outras 8 localidades do Brasil.

Para tentar minimizar os efeitos da predação e da fragmentação de habitats, alguns autores como Santos *et al.* (2009) defendem a criação de animais silvestres em

cativeiro como uma medida de preservação do ambiente e das espécies, evitando a caça e diminuindo o desmatamento. A espécie *Tayassu tajacu* já se destacou pelo seu valor zootécnico (Santos *et al.*, 2009), no entanto, o manejo em cativeiro desses animais deve adotar medidas rigorosas, pois após anos de isolamento e melhoramento desses indivíduos, uma invasão desses no ambiente geraria um grande desequilíbrio nas populações naturais, devido à competição por recursos, introdução de doenças, etc., criando ainda mais problemas para a conservação da espécie. Além disso, se animais de populações de cativeiro forem oriundas de populações que já apresentam divergência genética, como as citadas acima, corre-se o risco de produzir animais híbridos, com baixo potencial reprodutivo ou de aumentar a frequência dos rearranjos cromossômicos na população, gerando ainda mais descendentes com baixa contribuição genética às futuras gerações. Lima *et al.* (2004) já verificaram a ocorrência de rearranjos cromossômicos de catetos criados em cativeiro (Ponta Grossa - PR), reforçando o cuidado que se deve ter com o manejo.

Todas as pressões sofridas pelas espécies silvestres, principalmente as causadas por interferência humana sobre o ambiente ou diretamente sobre as espécies, quebram o equilíbrio das populações. Na tentativa de restabelecer este equilíbrio torna-se necessário sabermos como essas populações encontram-se na natureza e, assim, podermos criar planos de manejo.

Uma das ferramentas para a conservação é a aplicação de metodologias moleculares de genética. Dessa forma, podemos saber como se encontra a diversidade genética das populações e qual é o seu potencial evolutivo e, a partir daí, criarmos medidas que evitem a endogamia e aumente o fluxo gênico (Perez-Sweeney *et al.*, 2006). Populações que possuem maior troca de material genético têm maiores chances sobre as restrições ambientais (Knapp e Dyer, 1998). A variabilidade genética da espécie permite a sua ocupação em um habitat novo e também a sua permanência em situação de alteração ambiental. Cada população constitui um patrimônio genético único, importantíssimo para a reserva adaptativa da espécie (Araujo, 2007). Além disso, os níveis de variabilidade e endogamia estão diretamente relacionados. Evitar a endogamia diminui a frequência de homozigose, livrando a população do efeito endogâmico, causado, por exemplo, pelo aumento de alelos recessivos deletérios em homozigose. Portanto, conhecer os níveis genéticos das populações é o primeiro grande passo de qualquer trabalho de conservação (Knapp e Dyer, 1998).

Técnicas moleculares de genética tem demonstrado ser uma importante ferramenta para a conservação (Haig, 1998; Perez-Sweeney *et al.*, 2006), buscando encontrar principalmente a variabilidade genética entre as populações. Desde a sua criação por Williams

et al. (1990), a técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) mostrou ser uma técnica de genética molecular muito útil para estudos conservacionistas (Hadrys *et al.*, 1992; Fritsch e Riesberg, 1996; Perez-Sweeney *et al.*, 2006). Hadrys *et al.* (1992) destacam a sua importância na identificação da taxonomia dos organismos, fluxo gênico, hibridização, relações de parentesco, etc. Todas essas aplicações fornecem dados importantes para trabalhos conservacionistas. O RAPD fornece fragmentos que são observados em gel de agarose. O polimorfismo das bandas representam eventos de mutações, permitindo agrupar os indivíduos por sua similaridade polimórfica e obter a variabilidade das populações (Perez-Sweeney *et al.* 2006; Fritsch e Riesberg, 1996).

Uma das principais vantagens da técnica é a utilização de primers de sequência aleatória, sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência do DNA do organismo, além de um custo menor comparado a outras técnicas (Hadrys *et al.*, 1992; Perez-Sweeney *et al.* 2006). Dentre as desvantagens, está a limitação de se detectar apenas indivíduos dominantes, impedindo diferenciar indivíduos homozigotos e heterozigotos (Perez-Sweeney *et al.* 2006), além da co-migração de bandas de mesmo peso molecular, diminuindo o polimorfismo encontrado no gel de agarose (Hadrys *et al.*, 1992).

Considerando a importância da conservação de populações naturais e resultados de trabalhos que já verificaram divergência genética em populações de *Tayassu tajacu*, o objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética de espécimes de *Tayassu tajacu* representantes de 8 populações (Cascavel - PR, Foz do Iguaçu - PR, Cuiabá - MT, Ariquemes - RO, Rio Branco - AC, Manaus - AM, Belém - PA, e Carajás - PR) do Brasil analisando o polimorfismo das amostras de DNA.

2. OBJETIVOS

-*Objetivo Geral:* Avaliar o polimorfismo genético-molecular de diferentes populações de *Tayassu tajacu*.

-*Objetivos específicos:* 1) A partir do estudo do polimorfismo, estabelecer a similaridade entre os indivíduos das diferentes populações. 2) Correlacionar polimorfismo *versus* distanciamento entre as populações.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e conservação das amostras

Foram coletadas amostras de sangue total de 17 exemplares mantidos por instituições em oito localidades diferentes do Brasil (Figura 1). Essas foram retiradas dos

vasos periféricos dos animais com seringas de 10 mL esterilizadas e heparinizadas. O sangue total foi mantido nas seringas sob condições de baixa temperatura e o restante do procedimento deu-se em condições laboratoriais estéreis. Todas as amostras receberam uma identificação de acordo com sua localidade e a qual população pertencia (Tabela 1).

Em laboratório, o sangue foi centrifugado a 1000 rpm para obtenção do anel leucocitário, o qual foi removido com pipetas Pasteur esterilizadas e colocados em meio de cultura com solução crio-preservante de DMSO. O material de cada animal foi depositado em 10 palhetas de 0,5mL, devidamente identificadas e vedadas com álcool polivinil. As palhetas foram imersas em nitrogênio líquido para a preservação.

3.2 Cultura de leucócitos

Antes de realizarmos a extração do DNA, foi feita a tentativa de cultura de leucócitos com o material, levando-se em conta que o material encontrava-se crio-preservado há 15 anos. Assim, seria possível manter as amostras para estudos futuros. O protocolo utilizado para a cultura é foi o descrito por Moorhead *et al.* (1960), feitas algumas modificações:

1-Colocar 4,5 mL de meio de cultura 199, 0,5 mL de soro fetal bovino, 0,1 mL de fitohemaglutinina e 0,1 mL de antibiótico em um frasco para cultura;

2-Adicionar as células a serem “cultivadas” e deixá-las se dividindo em uma estufa a 37°C por 96 horas;

3-Transcorridas 95 horas e 30 minutos de cultura, adicionar uma gota de Colchicina 0,0016%. Manter em estufa até que se completem as 96 horas;

4-Centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos e desprezar o sobrenadante;

5-Adicionar ao precipitado 5 mL de KCl 0,075M. Homogeneizar e manter a 37°C por 30 minutos;

6-Centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos e desprezar o sobrenadante;

7-Adicionar ao precipitado 5 mL de solução fixadora preparada a partir de 3 volumes de metanol para 1 volume de ácido acético. Homogeneizar, centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos e desprezar o sobrenadante;

8-Repetir a operação acima por mais duas ou três vezes;

3.3 Extração do DNA

Para a extração do DNA, foram utilizadas duas palhetas, totalizando 1 mL de cada animal. A extração foi baseada em protocolos de fenol e proteinase sugeridos por Sambrook e Russell (2001). O protocolo utilizado é apresentado a seguir:

1-Adicionar em cada alíquota 800 µl de 1XSSC e homogeneizar por inversão. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos. Remover 1 mL do sobrenadante;

2-Adicionar 1 mL de 1XSSC, homogeneizar bem e centrifugar durante 5 minutos. Deve-se ter especial cuidado para não remover o pellet;

3-Ao pellet adicionar: 375 µl de acetato de sódio 0,2M, 25 µl de SDS 10%, 10 µl de proteinase (10 mg/mL em H₂O ultra pura). Agitar em Vortex e incubar durante 3 horas a 56°C;

4-Adicionar 120 µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Agitar no Vortex durante 30 segundos e centrifugar durante 2 minutos a 12000 rpm;

5-Remover a fase aquosa (parte superior) cuidadosamente e transferir para um novo tubo de microcentrífuga. Não remover a camada de proteínas precipitada que fica na interface;

6-Adicionar 1,0 mL de álcool etílico absoluto gelado. Misturar por inversão. Manter o tubo durante 15 minutos a -20°C. Centrifugar durante cinco minutos a 12000 rpm, em seguida, descartar o sobrenadante e secar o pellet a vácuo;

7-Adicionar ao pellet seco 180 µl de TE e esperar a dissolução total. Incubar por 10 minutos a 56°C;

8-Adicionar 20 µl de acetato de sódio 2M e inverter o tubo suavemente durante alguns segundos;

9-Adicionar 500 µl de álcool etílico absoluto gelado. Inverter suavemente até a precipitação do DNA. Centrifugar durante 5 minutos a 12000rpm;

10-Lavar o pellet com 1 mL de etanol 70%. Centrifugar, desprezar o sobrenadante e secar o DNA;

11-Dissolver o DNA em TE até completar 50 µl.

Após extração do DNA, as amostras foram submetidas a um gel de agarose 0,8% para verificação da integridade do material genético. Somente as amostras com DNA íntegro foram empregadas na análise. A quantificação do DNA e verificação da presença de contaminantes foi feita em espectrofotômetro (NanoDrop®-ND100).

3.4 Análise do polimorfismo

Para a análise da variabilidade genética dos indivíduos das diferentes populações, foi empregada a técnica de RAPD, através da qual foram amplificadas regiões aleatórias do material genético com a utilização de 38 primers (Invitrogen): H03, H10, H11, H13, H14, H16, J01, J10, J15, K08, K10, K12, K15, M03, M05, M10, M11, M16, M17, M19, M20, Q06, Q09, Q12, Q20, R03, W12, W15, X03, X05, X06, X08, X11, X14, X17, Y04, Y06 e Y09. As reações foram compostas de 15 ng de DNA; tampão para PCR; 0,8 mM de DNTP; 1,923 mM de $MgCl_2$; 0,36% de Albumina de Soro Bovino (BSA); 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 0,3 mM de primer e água deionizada autoclavada resultando num volume final de 13 μ l. A reação foi feita em um termociclador (MJ Research/ PT 100 TM). Na amplificação foi utilizado o seguinte programa: 3 minutos a 96°C para desnaturação das fitas de DNA e, em seguida, um ciclo que se repete 40 vezes formado por 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 35°C, 2 minutos a 72°C, 5 minutos a 72°C para extensão final das fitas. Após o término da amplificação, o material é mantido a 4°C.

3.5 Análise dos dados

A separação dos fragmentos obtidos na reação foi feita com gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. As marcas polimórficas mais evidentes foram selecionadas para a avaliação do polimorfismo e montagem do dendograma no software PopGene 1.32. Os animais foram analisados individualmente e também agrupados por localidade, esses foram considerados como uma população.



Fig. 1: Pontos de coleta das amostras sanguíneas. 1-Foz do Iguaçu; 2-Cascavel; 3-Cuiabá; 4-Ariquemes; 5-Rio Branco; 6-Manaus; 7-Belém; 8-Carajás.

Tab. 1: Identificação dos indivíduos por localidade e população a qual pertencem.

Localidade	População	Indivíduos
Foz do Iguaçu-PR	POP. 1	CAT. 1 e CAT. 2
Cascavel-PR	POP. 2	CAT. 3
Cuiabá-MT	POP. 3	CAT. 4, CAT. 5 e CAT. 6
Ariquemes-RO	POP. 4	CAT. 7 e CAT. 8
Rio Branco-AC	POP. 5	CAT. 9 e CAT. 10
Manaus-AM	POP. 6	CAT. 11 e CAT. 12
Belém-PA	POP. 7	CAT. 13 e CAT. 14
Carajás-PA	POP. 8	CAT. 15, CAT. 16 e CAT. 17

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A coleta das amostras deu-se em 1994 com o objetivo de fazer a caracterização cromossômica da espécie e identificar eventos de polimorfia cromossômica. A criopreservação foi feita considerando que as coletas deram-se em locais distantes dentro do território brasileiro e à intervalos de semanas entre elas. Assim, a análise do material foi realizada em laboratório somente após meses de coleta. Daí a necessidade da criopreservação até que fosse possível ter as devidas condições para o manuseio do material.

Na época, não se cogitava a análise molecular do material devido a falta de estrutura laboratorial e devido, à época, serem outros os objetivos do estudo. Contudo, parte do material foi mantida, o que permitiu as análises feitas no presente trabalho.

Visando otimizar a utilização das amostras, parte do material foi submetido a cultura de linfócitos que seriam usados para as análises moleculares. Em essa tendo sucesso, o material à disposição para a análise molecular teria sido multiplicado.

O mesmo procedimento já havia sido feito anos atrás e as células apresentaram capacidade de divisão celular, contudo a tentativa adotada para manter o material dos animais para futuros estudos através da cultura de leucócitos não possibilitou a multiplicação das células. Mesmo com a diminuição do metabolismo e das reações de degradação celular promovidos pela criopreservação, o material mostrou ter perdido seu potencial de divisão. Após o longo tempo de estocagem (15 anos) pode ter ocorrido mudanças no meio extracelular, resultando também em modificações no meio intracelular (Grout *et al.* 1990). Além disso, alguns autores citam a apoptose como uns dos principais problemas encontrados na criopreservação (Baust *et al.*, 2000). A morte celular ocorre devido à ativação de genes em resposta a situações de stress (Cheng *et al.*, 1998) como mudanças bruscas de temperatura. Assim, a extração do DNA deu-se somente com o material existente.

Foram testados dois protocolos para a extração do DNA. O primeiro protocolo não se mostrou eficiente, pois a presença de DMSO (crio-preservante) inibiu a atividade dos tampões de lise de célula branca. Assim, foi adotado o segundo protocolo de extração baseado em fenol/clorofórmio (Sambrook e Russell, 2001), o qual se mostrou mais eficaz para a obtenção do DNA.

No espectrofotômetro, o material extraído revelou ser de boa qualidade quanto aos aspectos: quantidade e ausência de contaminantes. Porém, em gel de agarose, dois indivíduos (CAT. 2 e CAT. 11) revelaram estar com o material genético altamente degradado, provavelmente devido ao grande tempo estocado, impossibilitando assim a análise desses indivíduos.

Para se conseguir o número suficiente de marcas polimórficas, foi testado um total de 38 primers, pois muitos primers não forneciam polimorfismos ou as bandas obtidas em gel eram de difícil análise, podendo gerar resultados duvidosos.

A técnica de RAPD mostrou-se eficaz para identificarmos o polimorfismo entre os indivíduos, no entanto não foi possível verificar uma correlação significativa entre a semelhança polimórfica e a distância entre as populações, talvez pelo baixo esforço amostral. Além disso, algumas deficiências da técnica relatadas na literatura (Hadrys *et al.*, 1992; Perez-Sweeney *et al.*, 2006) como tamanho padrão do primer, co-migração e identificação de apenas marcas dominantes podem ter limitado o número de bandas no gel de agarose, dificultando a coleta de dados para a análise da polimorfia e estabelecimento de uma padrão distancia das populações versus similaridade polimórfica.

Uma das grandes dificuldades de trabalhos com mamíferos deve-se justamente pela dificuldade amostral. A densidade desses animais na natureza é muito baixa quando comparamos com outras classes de vertebrados como peixes e mais ainda com invertebrados ou plantas, limitando o esforço amostral para estudos genéticos.

5. RESULTADOS

Os resultados e a discussão são apresentados no artigo a seguir.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTRICHTER, M; BOAGLIO, G. I. Distribution and relative abundance of peccaries in the Argentine Chaco: associations with human factors. *Biological Conservation*, v.115, n. 2, p.217-225, abr. 2003.

ARAÚJO, M. A. R. Unidades de Conservação no Brasil: da República à Gestão de Classe Mundial. Belo Horizonte. Ed. SEGRAC, 2007.

BARRETO, G. R.; HERNANDEZ, O.E.; OJASTI, J. Diet of peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*) in a dry forest of Venezuela. *Journal of Zoology*, v. 241, n. 2, p. 279-284, fev. 1997.

BAUST, J. M.; BUSKIRK, R. V.; BAUST, J. G. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.--Animal*. v. 36, p. 262-270, april 2000.

BERNIRSCHKE, K.; KUMAMOTO, A.T. Further studies on the chromosomes of three species of peccary. *Advances in Neotropical Mammalogy*. p. 309-316, 1989.

BODMER, R. E.; SOWLS, L. K. The Neotropical Tayassuids: *Tayassu* e *Catagonus*. In: OLIVER, W. L. R. (Ed.). *Pigs, peccaries, and hippos: status survey and conservation action plan*. IUCN, 1993. p. 5-40

CABRERA, A.; YEPES, J. *História Natural Ediar: Mamíferos Sul-americanos*. Buenos Aires: Cia. Argentina de Editores, 1960, 370 p.

CHENG, Y.; DESHMUKH, M.; D'COSTA, A.; DEMARO, J. A.; GIDDAY, J. M.; SHAH, A.; SUN, Y.; JACQUIN, M. F.; JOHNSON Jr., E. M.; HOLTZMAN, D. M. Caspase Inhibitor Affords Neuroprotection with Delayed Administration in a Rat Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *J. Clin. Invest.* v. 101, n.9, p. 1992–1999, may 1998.

CHIARELLO, A. G. Effects of fragmentation of the Atlantic Forest on mammal communities in south-eastern Brazil. *Biological Conservation*, v. 89, n. 1, p. 71-82, jul. 1999.

FREIDEBURG, L. K. Physical effects of habitat fragmentation. In: FIELDER, P. L.; KAREIVA, P. M. (Eds.) *Conservation Biology: for the coming decade*. 2^a ed. New York: Chapman & Hall, c1998. p. 66-79.

FRITSCH, P.; RIESBERG, L. H. The use of Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) in Conservation Genetics. In: SMITH, T. B.; WAYNE, T. R. K. (Ed.). *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. New York: Oxford University Press, 1996, p. 54-73.

GENTRY, A. H.; EMMONS, L. H. Geographical variation in fertility, phenology, and composition of the understory of Neotropical forests. *Biotropica*, v. 19, n. 3, p. 216-227, 1987.

GROUT, B.; MORRIS, J.; MCLELLAN, M. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. *Trends Biotechnol.* v.8, p. 293-297, 1990.

GRUBB P.; GROVES C. P.; MARCH, I. J. The Neotropical Tayassuids: *Tayassu e Catagonus*. In: OLIVER, W. L. R. (Ed.). *Pigs, peccaries, and hippos: status survey and conservation action plan*. IUCN, 1993. p. 5-40.

HADRYIS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol.* v. 1, n. 1, 1992, p. 55-63, may 1992.

HAIG, S. M. Molecular contributions to conservation. *Ecology*. v. 79, n. 2, p. 413-425, 1998.

KEUROGHLIAN, A.; EATON, D. P. Importance of rare habitats and riparian zones in a tropical forest fragment: preferential use by *Tayassu pecari*, a wideranging frugivore. *Journal of Zoology*, v. 275, p. 283-293, 2008.

KILTIE, R. A. The Function of Interlocking Canines in Rain Forest Peccaries (Tayassuidae). *Journal of Mammalogy*, v. 62, n. 3, p. 459-469, aug. 1981a.

KILTIE, R. A. Stomach Contents of Rain Forest Peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*). *Biotropica*, v. 13, n. 3, p. 234-236, set. 1981b.

KNAPP, E. E.; DYER, A. R. When do genetic considerations requires especial approaches to ecological restoration? In: FIELDER, P. L.; KAREIVA, P. M. (Eds.)

Conservation Biology: for the coming decade. 2^a ed. New York : Chapman & Hall, c1998. p. 345-363.

LIMA, J. F. S.; GUEDES, F. B.; SILVA, R. W.; HASS, I.; CAVALLI, I. J.; SILVA, J.; FREITAS, T. R.; SBALQUEIRO, I. J. Unexpected chromosomal alterations in *Tayassu tajacu* (Artiodactyla: Tayassuidae) in captivity. *Braz J vet Res anim Sci*. v. 41, n. 1, p. 10-13, 2004.

MILTON, K.; MAY, M. Body weight, diet and home range area in primates. *Nature*, v. 259, p. 459–462, feb. 1976.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, v. 20, p. 462-466, 1960.

PARRY, L.; BARLOW, J.; PERES, C. A. Hunting for Sustainability in Tropical Secondary Forests. *Conservation Biology*, v. 23, n. 5, p. 1270–1280, jan. 2009.

PINHEIRO, M. J. P.; DA SILVA, F. N.; AZEVÊDO, C. M. S. Avaliação de parâmetros reprodutivos em catetos (*Tayassu tajacu*) criados em cativeiro [Evaluation of reproductive traits in peccary (*Tayassu tajacu*) raised in captivity]. *Caatinga*, Mossoró-RN, v. 14, n. 1/2, p. 71-74, dez. 2001.

PÉREZ, E.; PACHECO, L. F. Damage by large mammals to subsistence crops within a protected area in a montane forest of Bolivia. *CROP PROTECTION*. v. 25, n. 9, p. 933-939, sep. 2006.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. In: Metodologias Moleculares utilizadas em genética da conservação. CULLEN JUNIOR, L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. (Orgs.). *Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre*. Curitiba: Ed. UFPR, 2006, p. 343-382.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Preparation and Analysis of Eukaryotic Genomic DNA. In: SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, v. 1, p.6.4-6.70, 2001.

SANTOS, D. O.; MENDES, A.; NOGUEIRA, S. Criação comercial de caititus (*Pecari tajacu*): uma alternativa para o agronegócio. *Rev. Bras. Saúde Prod.*, v. 10, n. 1, p. 1-10, jan/mar, 2009.

SANTOS, P. A.; ROCHA, G. T.; LUCCA, E. J. Análise Citogenética da Espécie *Tayassu tajacu* (Cateto-Mammalia). *Journal of Genetics*. v. 18, suppl.3, p.495, 1995.

SICURO, F. L.; OLIVEIRA L. F. B. Coexistence of peccaries and feral hogs in the brazilian pantanal wetland: an ecomorphological view. *Journal of Mammalogy*, v. 83, n. 1, p. 207-217, 2002.

SOWLS, L. K. Reproduction in the collared peccary (*Tayassu tajacu*). In: ROWLANDS, I. W. (Ed.). *Comparative Biology of Reproduction in Mammals*. London: Zoological Society of London, 1984, p. 155-172.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C.; GASCON, C. Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of neotropical forests. *Biodiversity and Conservation*, v. 13, p. 1419–1425, 2004.

VASSART, M., PINTON, A.; SÉGUÉLA, A.; DUTERTRE, C. New data on chromosomes of peccaries. *Mammalia*. v.58, n.3, p.504-507, 1994.

WILLIAMS, J. G. K; KUBELIK, A. R.; LIVAK K. J.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WRIGHT, S. J.; DUBER, H. C. Poachers and Forest Fragmentation Alter Seed Dispersal, Seed Survival, and Seedling Recruitment in the Palm *Attalea butyraceae*, with Implications for Tropical Tree Diversity. *Biotropica*, v. 33, n. 4, p. 583-595, dec. 2001.

POLIMORFISMO GENÉTICO-MOLECULAR DE DIFERENTES POPULAÇÕES DE CATETO (MAMMALIA - DICOTYLIDAE - *Tayassu tajacu*), BRASIL

GENETIC-MOLECULAR POLYMORPHISM OF DIFFERENT POPULATIONS OF CATETO (MAMMALIA - DICOTYLIDAE - *Tayassu tajacu*), BRAZIL

Bruno Henrique Saranholi¹, Celso Luis Marino¹, Guaracy Tadeu Rocha¹

¹ Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, Brasil.

Resumo

As populações de cateto (*Tayassu tajacu*) podem sofrer grandes alterações no seu equilíbrio, devido à grande pressão causada pela caça e pelas modificações ambientais. É importante ressaltar que o sucesso reprodutivo de muitas espécies vegetais é devido à dispersão de frutos e sementes pelos catetos. Considerando a importância da manutenção da vida selvagem, o objetivo deste trabalho foi avaliar o polimorfismo genético-molecular entre diferentes populações de *Tayassu tajacu*. Foram analisadas amostras de 17 indivíduos de oito localidades no Brasil. O polimorfismo foi identificado com marcadores RAPD. Um total de 38 primers foi testado, e desses, apenas sete forneceram as 30 marcas polimórficas para o estudo. O nível de polimorfismo encontrado foi elevado (50% das bandas). Observou-se que a maioria dos indivíduos da mesma população ou populações vizinhas não são os mais semelhantes entre si. A técnica RAPD foi eficiente para detectar o polimorfismo entre os indivíduos, mas não foi possível estabelecer a correlação do polimorfismo versus localização geográfica, provavelmente devido ao esforço amostral.

Palavras chaves: polimorfismo de RAPD; variabilidade genética; *Tayassu tajacu*.

Abstract

The populations of collared peccary (*Tayassu tajacu*) may undergo several changes in its balance because of the great pressure caused by hunting and by environmental modifications. It's important to highlight that the reproductive success of many plant species is due the dispersal of fruits and seeds by the collared peccary. Considering the importance of maintaining the wildlife, the aim of this work was to estimate the molecular-genetic polymorphism among different populations of *Tayassu tajacu*. Samples were analyzed of 17 individuals from eight locations in Brazil. The polymorphism was identified with RAPD

markers. A total of 38 primers were tested, and only seven provided the 30 polymorphic marks for the study. The level of polymorphism found was high (50% of the bands). It was observed that most individuals of the same population or nearby populations are not the most similar to each other. The RAPD technique was efficient to detect the polymorphism among the individuals, but wasn't possible to establish the correlation polymorphism versus geographic localization, probably due the sampling effort.

Key words: RAPD polymorphism; genetic variability; *Tayassu tajacu*.

Introdução

Atualmente, a família Dicotylidae é representada por dois gêneros com três espécies: *Tayassu tajacu* (cateto), *Tayassu pecari* (queixada) e *Catagonus wagneri* (pecari-de-chaco) (Grubb *et al.*, 1993).

Na família Dicotylidae, o cateto é a espécie de maior distribuição geográfica. Ocorre no Arkansas e Texas nos Estados Unidos, América Central e América do Sul (Bodmer e Sowls, 1993). Seu hábito alimentar é onívoro, incluindo itens bem diversos como frutos, legumes, pequenos vertebrados, insetos, entre outros (Pinheiro *et al.*, 2001). Barreto (1997) sugere que seu hábito alimentar seja frugívoro devido às grandes proporções de frutos e sementes encontrados em seu estômago e fezes.

Wright e Duber (2001) verificaram que a espécie *Tayassu tajacu* sofre grande pressão de caça em muitas regiões. A caça desses animais não interfere apenas na taxa de sobrevivência de suas populações (Chiarello, 1999), mas também na reprodução de algumas espécies vegetais, já que os catetos são considerados grandes

dispersores de sementes (Wright e Duber, 2001).

Outro fator que pode interferir na dinâmica dessas populações é a fragmentação do habitat (Altrichter e Boaglio, 2003). A quebra da continuidade dos ambientes altera a abundância de espécies do meio devido à redução da área e pelo distanciamento entre os fragmentos florestais remanescentes (Chiarello, 1999).

As modificações causadas no meio devido à fragmentação do habitat (Freideburg, 1998) afetam as populações de diversas formas: menor disponibilidade de alimento, mudanças comportamentais, redução do cruzamento entre populações (menor fluxo gênico) e outras. Assim, a fragmentação do meio e o isolamento das populações fazem com que essas sofram pressões ambientais diferentes, podendo gerar adaptações que se mantidas ao longo das gerações, levarão a divergência entre elas.

Alguns estudos já demonstraram um princípio de divergência entre

populações de cateto, principalmente no que se refere ao conjunto cromossômico. Santos *et al.* (1995) ao comparar o cariótipo de espécimes do Brasil com aqueles já descritos para exemplares do Estados Unidos (Bernirschke e Kumamoto, 1989) e da Guiana-francesa (Vassart *et al.*, 1994) verificou mudanças morfológicas dos cromossomos entre os indivíduos das três localidades. Em indivíduos de Carajás-PA, Santos *et al.* (1995) também encontrou alterações na morfologia do cromossomo Y quando comparado com o mesmo cromossomo de indivíduos de outras oito localidades do Brasil.

Lima *et al.* (2004) já verificaram a ocorrência de rearranjos cromossômicos de catetos criados em cativeiro (Ponta Grossa - PR). Esses resultados reforçam os cuidados que devem ser tomados no manejo das populações de cateto.

A criação de animais silvestres em cativeiro é defendida por alguns autores como Santos *et al.* (2009) como uma medida de preservação das espécies, pois evitaria a caça. No entanto, o manejo em cativeiro desses animais deve adotar medidas rigorosas, pois após anos de isolamento e melhoramento desses indivíduos, uma invasão desses no ambiente geraria um grande desequilíbrio nas populações naturais, devido à competição por recursos, introdução de doenças, hibridação, etc.

Todas as pressões sofridas pelas espécies silvestres, principalmente as causadas por interferência humana, quebram o equilíbrio das populações. Na tentativa de restabelecer este equilíbrio torna-se necessário sabermos como essas populações encontram-se na natureza para, assim, criarmos medidas para a conservação das espécies.

Uma das ferramentas para a conservação é a aplicação de metodologias moleculares de genética. Dessa forma, pode-se saber como se encontra a diversidade genética das populações e qual é o seu potencial evolutivo e, a partir daí, criarmos medidas que evitem a endogamia e aumente o fluxo gênico (Perez-Sweeney *et al.*, 2006). Populações que possuem maior troca de material genético têm maiores chances sobre as restrições ambientais (Knapp e Dyer, 1998). Portanto, conhecer os níveis genéticos das populações é o primeiro grande passo de qualquer trabalho de conservação (Knapp e Dyer, 1998).

Desde a sua criação por Williams *et al.* (1990), a técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) mostrou ser uma técnica de genética molecular muito útil para estudos conservacionistas, fornecendo o status da variabilidade genética das populações naturais (Hadrys *et al.*, 1992; Fritsch e Riesberg, 1996; Perez-Sweeney *et al.*, 2006). Uma das

principais vantagens da técnica é a utilização de primers de sequência aleatória, sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência do DNA do organismo (Hadrys *et al.*, 1992; Perez-Sweeney *et al.*, 2006).

Considerando a importância da conservação de populações naturais e resultados de trabalhos que já verificaram divergência genética em populações de cateto, o objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética de espécimes de *Tayassu tajacu* representantes de 8 localidades do Brasil. A partir dessas informações, estabelecer a similaridade entre os indivíduos das diferentes populações e fazer a correlação entre similaridade polimórfica e o distanciamento das populações.

Material e métodos

Foram coletadas amostras de sangue total de 17 exemplares mantidos por instituições de oito localidades diferentes do Brasil (Figura 1). Todas as amostras receberam uma identificação de acordo com sua localidade. Indivíduos de uma mesma localidade foram considerados de uma mesma população (Tabela 1).

Com seringas de 10 mL previamente esterilizadas e heparinizadas, retirou-se o sangue total de vasos periféricos dos membros posteriores dos animais.

Em seguida, o sangue foi centrifugado a 1000 rpm para obtenção do anel leucocitário. Esse foi removido com pipetas Pasteur esterilizadas e colocados em meio de cultura com solução criopreservante de DMSO. O material de cada animal foi depositado em 10 palhetas de 0,5mL, devidamente identificadas e vedadas com álcool polivinil. As palhetas foram imersas em nitrogênio líquido para a preservação.

Para a extração do DNA, foram utilizadas duas palhetas, totalizando 1 mL de cada animal. A extração foi baseada em protocolos de fenol e proteinase sugeridos por Sambrook e Russell (2001).

Após extração do DNA, as amostras foram submetidas a um gel de agarose 0,8% para verificação da integridade do material genético. Somente as amostras com DNA íntegro foram empregadas na análise. A quantificação do DNA e verificação da presença de contaminantes foi feita em espectrofotômetro (NanoDrop®-ND100).

Para a análise da variabilidade genética dos indivíduos das diferentes populações, foi empregada a técnica de RAPD, através da qual foram amplificadas regiões aleatórias do material genético com a utilização de 38 primers (Invitrogen): H03, H10, H11, H13, H14, H16, J01, J10, J15, K08, K10, K12, K15, M03, M05, M10, M11, M16, M17, M19, M20, Q06,

Q09, Q12, Q20, R03, W12, W15, X03, X05, X06, X08, X11, X14, X17, Y04, Y06 e Y09.

A separação dos fragmentos obtidos na reação RAPD foi feita em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. As marcas polimórficas mais evidentes foram selecionadas para a avaliação do polimorfismo e montagem do dendograma no software PopGene 1.32. Os animais foram analisados individualmente e, também, agrupados por localidade.



Figura 1 - Pontos de coleta das amostras sanguíneas: 1-Foz do Iguaçu; 2-Cascavel; 3-Cuiabá; 4-Ariquemes; 5-Rio Branco; 6-Manaus; 7-Belém; 8-Carajás.

Tabela 1 - Identificação dos indivíduos por localidade e população a qual pertencem.

Localidade	População	Indivíduos
Foz do Iguaçu-PR	POP. 1	CAT. 1 e CAT. 2
Cascavel-PR	POP. 2	CAT. 3
Cuiabá-MT	POP. 3	CAT. 4, CAT. 5 e CAT. 6
Ariquemes-RO	POP. 4	CAT. 7 e CAT. 8
Rio Branco-AC	POP. 5	CAT. 9 e CAT. 10
Manaus-AM	POP. 6	CAT. 11 e CAT. 12
Belém-PA	POP. 7	CAT. 13 e CAT. 14
Carajás-PA	POP. 8	CAT. 15, CAT. 16 e CAT. 17

Resultados

Após a extração do DNA, verificou-se que o material genético de um dos indivíduos (CAT. 4) encontrava-se degradado, mesmo tendo sido adotadas todas as medidas necessárias para a conservação do DNA. Dessa forma, essa amostra foi retirada do estudo.

Dos 38 primers testados, nove deles apresentaram sucesso na amplificação do DNA das amostras. Esses primers foram: J01, K12, K15, M10, M16, W15, X03, X17 e Y09, fornecendo 30 fragmentos polimórficos para o estudo. O número de fragmentos polimórficos variou de três a nove por primer, totalizando 60 fragmentos. As marcas polimórficas

obtidas com a amplificação de um dos primers estão demonstradas na figura 2.

Na figura 3, o dendograma mostra a similaridade entre indivíduos analisados um a um. Já na figura 4, os indivíduos foram agrupados por localidade, como representantes de uma população. Deste modo, temos a comparação da polimorfia nas oito localidades amostradas.

Na análise dos dendogramas é possível notar que a maioria dos indivíduos da mesma população ou de populações próximas não são os mais semelhantes entre si.

Por exemplo, CAT. 1 (Foz do Iguaçu - PR) e CAT. 12 (Manaus - AM), mostraram-se mais semelhantes entre si do que com indivíduos de suas próprias localidades.

No entanto, nos exemplares de Carajás - PA pôde-se notar que esses permanecem agrupados por apresentarem um alto grau de similaridade.

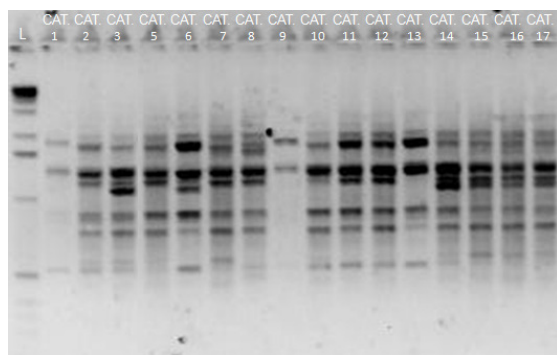


Figura 2 - Gel de agarose 1,5% com as marcas polimórficas obtidas com a amplificação do primer K12 (Invitrogen). L=Ladder 1Kb (Invitrogen).

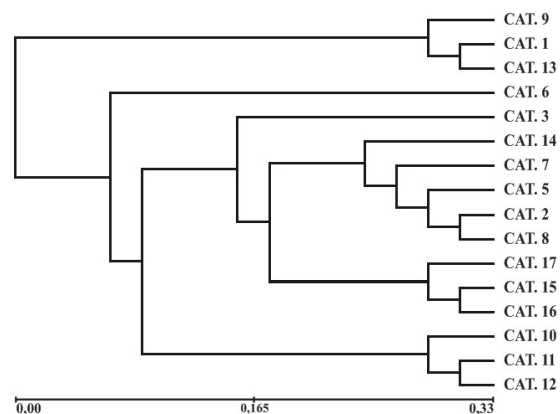


Figura 3 - Dendograma dos indivíduos analisados separadamente.

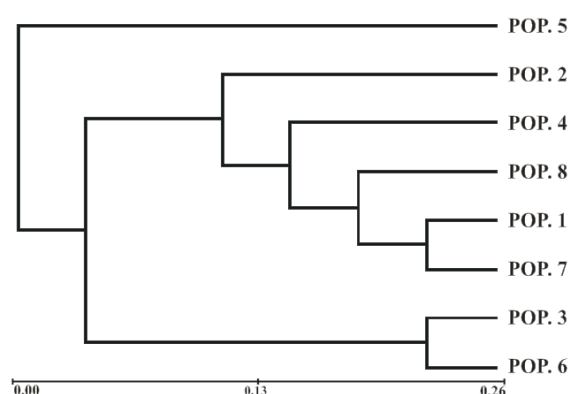


Figura 4 - Dendograma dos indivíduos agrupados por localidade.

Discussão

Considerando o número total de bandas encontradas e o número de marcas polimórficas, pode-se considerar que o nível de polimorfismo entre os indivíduos foi alto, já que 50% do total das bandas foi polimórfico.

A técnica de RAPD mostrou-se eficiente para detectar o polimorfismo entre os indivíduos. Levando-se em conta os poucos estudos realizados com a espécie e a ausência de primers específicos para *Tayassu tajacu*, a vantagem da utilização de primers aleatórios para a amplificação

dos fragmentos de DNA por RAPD (Hadrys *et al.*, 1992; Fritsch e Riesberg, 1996; Perez-Sweeney *et al.*, 2006) mostrou ser uma importante técnica para obtenção de dados iniciais quanto a variabilidade genética das populações.

No entanto, não foi possível estabelecer uma relação entre variabilidade genética e proximidade entre indivíduos da mesma população ou populações geograficamente próximas. Essa mesma situação foi encontrada por Lage *et al.* (2008) com grupos de queixada (*Tayassu peccari*).

As marcas eventualmente não detectadas devido a co-migração de bandas e identificação de apenas *loci* dominantes em RAPD poderiam ter sido importantes para poder estabelecer um agrupamento mais evidente entre os indivíduos e as populações e, também, estabelecer a correlação entre similaridade polimórfica e localização geográfica.

Considerando a característica euritópica da espécie *Tayassu tajacu* (Bodmer e SOWLS, 1993; Cabrera e Yepes, 1960) e a sua ampla distribuição geográfica, o fluxo gênico é um fator que também deve ser levado em conta para tentar compreender a variabilidade genética observada dentro e entre as populações (Hutchison e Templeton, 1999). Assim, a possibilidade de cruzamento entre indivíduos de bandos

vizinhos realizaria, ao longo do tempo, um maior fluxo gênico entre as populações, permitindo, conseqüentemente, uma maior similaridade genética entre indivíduos ou populações que não pertencem a mesma localidade.

Em indivíduos de Carajás - PA (CAT. 15, CAT. 16 e CAT. 17) é possível notar que esses permanecem juntos, formando um único grupo no dendograma. Diferentemente dos outros indivíduos, esses foram os espécimes que mostraram um maior grau de similaridade genética dentro de uma mesma população. Uma possível explicação é que a população pode ter sido formada a partir de poucos indivíduos, efeito do fundador, (Wang *et al.*, 1998) e mantida relativamente isolada das demais populações (sofrendo menos influência do fluxo gênico). Dessa forma, esses indivíduos estariam mantendo uma maior similaridade genética quando comparados com os demais espécimes, formando um único agrupamento no dendograma.

Essa hipótese encontraria apoio nas observações feitas por Santos *et al.* (1995), que verificaram alterações na morfologia do cromossomo sexual Y de indivíduos de Carajás-PA quando comparado com o mesmo cromossomo de catetos de outras 8 localidades do Brasil. Segundo Santos *et al.* (1995) a população de Carajás-PA já

apresentaria certa divergência genética em relação as demais.

Os resultados obtidos sugerem que mais investigações sejam feitas, explorando principalmente a população de Carajás-PA e levando-se em conta também outros aspectos da biologia da espécie (ecológicos, reprodutivos, comportamentais, busca por recursos, entre outros), para podermos compreender melhor o padrão de distribuição e fluxo gênico (Lage *et al.*, 2008), permitindo inferir uma relação entre proximidade geográfica e a polimorfia genética observada.

Além disso, aumentar o número de primers ou a aplicação de outras marcas também poderiam ajudar a fornecer mais dados quanto ao padrão de variabilidade genética existente na espécie.

Referências

- Altrichter M e Boaglio GI (2003) Distribution and relative abundance of peccaries in the Argentine Chaco: associations with human factors. *Biological Conservation* 115(2): 217-225.
- Barreto GR, Hernandez OE e Ojasti J (1997) Diet of peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*) in a dry forest of Venezuela. *Journal of Zoology* 241(2): 279-284.
- Bernirschke K e Kumamoto AT (1989) Further studies on the chromosomes of three species of peccary. *Advances in Neotropical Mammalogy* pp 309-316.
- Bodmer RE, e Sowls LK (1993) The Neotropical Tayassuids: *Tayassu* e *Catagonus*. In: Oliver WLR (ed) *Pigs, peccaries, and hippos: status survey and conservation action plan*. IUCN, pp 5-40.
- Cabrera A e Yepes J (1960). *História Natural Ediar: Mamíferos Sul-americanos*. Buenos Aires, Cia. Argentina de Editores, 370 pp.
- Chiarello AG (1999) Effects of fragmentation of the Atlantic Forest on mammal communities in south-eastern Brazil. *Biological Conservation* 89(1): 71-82.
- Freideburg, LK (1998) Physical effects of habitat fragmentation. In: Fielder PL e Kareiva PM (eds) *Conservation Biology: for the coming decade* (2^a ed). New York, Chapman & Hall, pp 66-79.
- Fritsch P e Riesberg LH (1996) The use of Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) in Conservation Genetics. In: Smith TB e Wayne TRK (eds) *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. New York, Oxford University Press, pp 54-73.
- Grubb P, Groves CP e March IJ (1993) The Neotropical Tayassuids: *Tayassu* e *Catagonus*. In: Oliver WLR (ed) *Pigs,*

- peccaries, and hippos: status survey and conservation action plan. IUCN, pp. 5-40.
- Hadrys H, Balick M e Schierwater B (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* 1(1): 55-63.
- Hutchison DW e Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53(6): 1898-1914.
- Knapp EE e Dyer AR (1998) When do genetic considerations requires especial approaches to ecological restoration? In: Fielder PL e Kareiva PM (eds) *Conservation Biology: for the coming decade* (2^aed). New York, Chapman & Hall, pp 345-363.
- Lage EAS, Telles MPC, Soares TN, Reende LV, Jácomo ATA e Silveira L (2008) Variabilidade genética em bandos de queixada (*Tayassu pecari*) do Parque Nacional das Emas utilizando marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). *Neotropical Biology and Conservation* 3(3): 126-134.
- Lima JFS, Guedes FB, Silva RW, Hass I, Cavalli IJ, Silva J, Freitas TR e Sbalqueiro IJ (2004) Unexpected chromosomal alterations in *Tayassu tajacu* (Artiodactyla: Tayassuidae) in captivity. *Braz J vet Res anim Sci.* 41(1): 10-13.
- Perez-Sweeney BM, Rodrigues FP e Melnick DJ (2006) Metodologias Moleculares utilizadas em genética da conservação. In: Cullen Junior L, Rudran R e Valladares-Padua C (orgs) *Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre*. Curitiba, Ed. UFPR, pp 343-382.
- Sambrook J e Russell DW (2001) Preparation and Analysis of Eukaryotic Genomic DNA. In: Sambrook J e Russell DW *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3^a ed) New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1: 6.4-6.70.
- Santos DO, Mendes A e Nogueira S (2009) Criação comercial de caititus (*Pecari tajacu*): uma alternativa para o agronegócio. *Rev. Bras. Saúde Prod.* 10(1): 1-10.
- Santos PA, Rocha GT e Lucca EJ (1995) Análise Citogenética da Espécie *Tayassu tajacu* (Cateto-Mammalia). *Journal of Genetics* 18(suppl.3): 495
- Vassart M, Pinton A, Séguéla A e Dutertre C (1994) New data on chromosomes of peccaries. *Mammalia* 58(3): 504-507.
- Wang J, Caballero A, Keightley, PD, Hill WG (1998) Bottleneck Effect on Genetic Variance: A Theoretical

- Investigation of the Role of Dominance. *Genetics* 150: 435–447.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ e Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Wright SJ e Duber HC (2001) Poachers and Forest Fragmentation Alter Seed Dispersal, Seed Survival, and Seedling Recruitment in the Palm *Attalea butyraceae*, with Implications for Tropical Tree Diversity. *Biotropica* 33(4): 583-595.