



DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES PARA ESTUDO DEMOGRÁFICO DE POPULAÇÕES DE QUEIXADA (*TAYASSU PECARI*) DA MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DE SÃO PAULO

VECCHIA, A.C.D.¹

Biondo, C.²; Sanches, A.²; Keuroghlian, A.³; Miyaki, C.Y.⁴; Galetti Júnior, P.M.¹

1 Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Genética, Laboratório de Diversidade Molecular e Genética, Rodovia Washington Luiz, km 235, SP - 310, 13565 - 905, São Paulo, Brasil 55 16 3351 - 8689-karoldv@msn.com 2 Laboratório de Biologia da Conservação, Departamento de Ecologia, Universidade Estadual Paulista, UNESP - Rio Claro 3 Wildlife Conservation Society, Brasil 4 Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

INTRODUÇÃO

As queixadas (*Tayassu pecari*) possuem uma ampla distribuição, ocorrendo desde o sul do México até o norte da Argentina (Mayer e Wetzel, 1987). São animais principalmente frugívoros (Chapman 1936, Kiltie 1981, Kiltie e Terborgh 1983, Barreto *et al.*, 1997), que necessitam de uma grande área de vida e sua distribuição e movimentação têm sido relacionadas a disponibilidade de frutos no ambiente (Kiltie e Terborgh, 1983; Bodmer, 1990; SOWLS, 1984; Carrillo *et al.*, 2002; Keuroghlian *et al.*, 2004; Keuroghlian e Eaton, 2007). *T. pecari* pode formar bandos que facilmente excedem 100 indivíduos (Mayer e Wetzel, 1987; SOWLS, 1997) e, por ser a única espécie de ungulados neotropicais a formar bandos grandes, sua extinção representa uma grande perda na biodiversidade (Painter, 1998). Apesar de não constar na Lista Brasileira de Animais Ameaçados de Extinção, por ser abundante em algumas partes do país, como na Amazônia e no Pantanal, populações de queixada tem se tornado cada vez mais raras na Mata Atlântica, principalmente em virtude da pressão de caça e da fragmentação e destruição de habitats (Cullen *et al.*, 2000). Uma vez que possuem papel-chave na predação e dispersão de sementes, a perda dessa espécie pode ter severas implicações no padrão de regeneração das comunidades vegetais (Jordano *et al.*, 2006), sendo portanto, necessária a avaliação do seu status populacional, bem como o seu acompanhamento.

Os microssatélites são sequências curtas de DNA, de um a seis pares de base, repetidas em tandem (Tautz e Renz, 1984; Tautz, 1989) que se caracterizam por um alto grau de polimorfismo (Zane *et al.*, 2002). Essa característica permite que cada indivíduo de uma população seja identificado por um genótipo multilocus único, o que permite que a determinação do número de indivíduos amostrados, embasando

uma estimativa de tamanho populacional (Bellemain *et al.*, 2005; Miotto *et al.*, 2007).

Novas técnicas moleculares de extração de DNA de materiais como fezes, pêlos e ossos permitem acessar informações através de uma análise não invasiva dos indivíduos (Morin e Woodruff, 1996). Esses métodos, somados à utilização de marcadores moleculares, oferecem uma alternativa para a contagem e identificação individual em populações, além de permitir a determinação do sexo e o acompanhamento dos deslocamentos (Kohn e Wayne, 1997). Estudos não-invasivos são considerados métodos adequados de se monitorar populações ameaçadas, especialmente no caso de espécies elusivas e de difícil captura (Prugh *et al.*, 2005), uma vez que evitam os prejuízos causados pela captura ao indivíduo (Wayne e Morin, 2004).

OBJETIVOS

Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia, baseada na prospecção de microssatélites específicos para a espécie e na utilização de métodos de coletas não-invasivos, para estudar a demografia de *Tayassu pecari* na Mata Atlântica do Estado de São Paulo. As informações geradas poderão ser utilizadas para subsidiar planos de manejo e conservação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a prospecção dos microssatélites foi utilizada uma amostra de DNA extraída de sangue de acordo com a metodologia desenvolvida por Lahiri e Nurnberger (1991). Foi construída uma biblioteca genômica parcial enriquecida; tal metodologia baseia-se em três etapas princi-

pais: clivagem do DNA através de enzimas de restrição, hibridização dos fragmentos obtidos com sondas biotiniladas de seqüência repetitiva e motif tetranucleotídico e recuperação magnética dos híbridos através da utilização de partículas magnéticas cobertas com streptavidina (beads magnéticos) (HAMILTON *et al.*, 1999).

RESULTADOS

A partir de 96 clones sequenciados (94.042 pb), foram obtidos 38 microssatélites. Dos locos identificados, 12 (31,6%) são tetranucleotídeos; um (2,6%) trinucleotídeo; sete (18,4%) dinucleotídeos; oito (21,1%) mononucleotídeos e dez (26,3%) compostos. Foi possível a construção de primers para 13 dos locos. Estes marcadores serão utilizados na análise demográfica das populações de queixadas do Parque Estadual da Serra do Mar e da Ilha do Cardoso.

CONCLUSÃO

A utilização de técnicas moleculares pode ser uma ferramenta útil na resolução de incertezas demográficas. Aliadas a métodos de coleta não invasivos, tornam-se métodos especialmente apropriados ao estudo de espécies elusivas e/ou ameaçadas de extinção. O delineamento dos primers de microssatélites consiste num primeiro passo que permite que tais estudos possam ser realizados para a espécie em questão. Além disso, trata-se de marcadores potencialmente úteis para diversos outros estudos genéticos não só das queixadas mas também das outras espécies de peçarídeos.

REFERÊNCIAS

Barreto, G.R., Hernández, O.E. e Ojasti, J. Diet of peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*) in a dry forest of Venezuela. *J. Zool. Lond.*, n.1, p.241 - 256. 1997.

Bellemain, E.; Swenson, J.E.; Tallmon, D.; Brunberg, S.; Taberlet, P. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter - collected feces: four methods for brown bears. *Conservation Biology*, n.19, v.1, p. 150 - 161. 2005.

Bodmer, R.E. responses of Ungulates to seasonal inundations in the Amazonian floodplain. *Journal of Tropical Ecology*, n.6, p.191 - 201. 1990.

Carrillo, E.; Saenz, J.C.; Fuller, T.K. Moviments and activities of white - lipped peccaries in Corcovado National Park, Costa Rica. *Biological Conservation*, n.108, p. 317 - 324. 2002.

Chapman, F.M. White lipped peccary. *Natur. Hist.*, n.38, p.408 - 412. 1936.

Cullen Jr., L.; Bodmer, R.E. e padua, C.V. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. *Biological Conservation*, n.95, p.49 - 56. 2000.

Hamilton, M.B.; Pincus, E.L.; Di Fiore, A.; Fleischer, R.C. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA

libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, v.27, p.500 - 507. 1999.

JORDANO, P. Fruits and frugivory, p. 125 - 166. Em: FENNER, M. (ed.). *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. Commonwealth Agricultural Bureau International, Wallingford, UK. 2000.

Keuroghlian, A, Eaton, DP (2008) Fruit availability and peccary frugivory in an isolated Atlantic forest fragment: effects on peccary ranging behavior and habitat use. *Biotropica* 40:62-70

Keuroghlian, A., D. P. Eaton, and W. S. Longland. 2004. Area use by white - lipped and collared peccaries (*Tayassu pecari* and *Tayassu tajacu*) in a tropical forest fragment. *Biol. Conserv.* 120: 411-425.

Kiltie, R.A. e Terborgh, J. Observations on the behavior of rain forest Peccaries in Peru: Why do white - lipped peccaries form herds? *Z. Tierpsychol.*, n.62, p.241 - 255. 1983.

Kiltie, R.A. Stomach contents of rain forest peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*). *Biotropica*, n.13, p.234 - 236. 1981.

Kohn, M.H. e Wayne, R.K. Facts From Feces Revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, n.12, p.223 - 227. 1997.

Lahiri, D. K. e Nurnberger, J. I. Jr. A rapid non - enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, n.19, p.5444. 1991.

Mayer, J.J. e Wetzel, R.M. *Tayassu pecari*. *Mammalian Species*, n.293, p.1 - 7.1987.

Miotto, R.A.; Pacheco, F.P.; Ciocheti, G. e Galleti Jr, P.M.G. Determination of the minimum population size of pumas (*Puma concolor*) through fecal DNA analysis in two protected Cerrado areas in the Brazilian Southeast. *Biotropica*, n.39, v.5, p.647 - 654. 2007.

Morin, P.A. e Woodruff, P.S. Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. *Molecular Approaches in Conservation*. Oxford University, New York, p.298 - 313. 1996.

Prugh LR, Ritland CE. Molecular testing of observer identification of carnivore feces in the field. *Wildlife Society Bulletin*.2005

Sowls, L.K. *Javalinas and other Peccaries their Biology, Management and Use*. 2nd Edn. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona. 1997.

Sowls, L.K. *The peccaries*. Univ. Arizona Press, Tucson, Arizona. 1984.

Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids*, v.17, p.6364 - 6471. 1989.

Tautz, D. e Renz, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids*, v.12, p.4126 - 4138. 1984.

Wayne, R.K. e Morin, P.A. Conservation genetics in the new molecular age. *Front Ecology Environment*, n.2, p.89 - 97.2004.