



PERSPECTIVAS PARA ESTUDOS POPULACIONAIS NÃO - INVASIVOS DE ANTAS (*TAPIRUS TERRESTRIS*): COMPARAÇÃO DO SUCESSO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA FECAL NO CERRADO E PANTANAL.

Paola Mandetta Tokumoto

Tamissa G. Godoi; Mauro Galetti; Alexandra Sanches

Departamento de Ecologia Laboratório de Biologia da Conservação Rio Claro, SP, Brasil

INTRODUÇÃO

Os grandes mamíferos são os primeiros a serem afetados pelas freqüentes perturbações antrópicas e tendem a um rápido declínio populacional (Cardillo, 2005). A obtenção de estimativas de tamanho populacional e suas tendências ao longo do tempo são essenciais para definir ações prioritárias na conservação das espécies (Oliveira - Santos et. al, 2010). A anta, *Tapirus terrestris* (Linnaeus, 1758) é um dos grandes mamíferos vulnerável à extinção devido à pressão de caça, perda e degradação de habitats (Cullen et al., 000). Por possuir hábito noturno e solitário, é raramente visualizada em seu habitat natural, dificultando a obtenção de informações de comportamento ou censo populacional por meio de métodos tradicionais de campo. Câmeras traps são ineficazes em estimativas de tamanho populacional, pois a anta não apresenta características fenotípicas que diferenciem os indivíduos com confiabilidade (Oliveira - Santos et. al, 2010). Medici (2010) também discorre a respeito do alto grau de invisibilidade de estudos de *T. terrestris* com telemetria, que além de possuir alto esforço amostral e custo financeiro, os animais precisam ser capturados e imobilizados no momento da colocação dos colares. Além disso, o transecto linear pode afetar o comportamento dos animais durante a aproximação, e por essa espécie ter hábitos noturnos, os indivíduos são dificilmente avistados (Medici, 2010). Frente a cenários como estes, a aplicação de métodos moleculares desenvolvidos para amostragem não - invasiva torna - se de grande valia a estudos populacionais em genética da conservação, já que estes são relativamente baratos, não

exigem um trabalho de logística complexa e um contato direto com o animal a ser estudado (Putman, 1984; Cleveger, 1993). O DNA proveniente de amostras de fezes, pêlos, penas e outros materiais biológicos somado à aplicação de marcadores microssatélites (sequências de 1 - 5 pb repetidas em *tandem* altamente variáveis quanto ao número de repetições; Frankham et al., 008) constituem importantes ferramentas para o monitoramento de populações (Taberlet et al., 1996). Estudos mostram que as antas podem defecar em latrinas (Galetti et al., 001) e, portanto as suas fezes são amostradas facilmente. Entretanto, nas fezes há pequena quantidade de DNA, muitas vezes exposta a condições extremas do meio ambiente. Sendo assim, a análise do material genético de amostras não - invasivas só é possível com a utilização da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), que permite a amplificação *in vitro* de seqüências de nucleotídeos de interesse em poucas horas e com baixo custo financeiro (Dálen, Gothersstrom & Angerbjorn, 2002). Esse trabalho compara o sucesso de amplificação do DNA fecal de *T. terrestris* em uma região do Cerrado e outra do Pantanal. Estas informações são essenciais para o planejamento de futuros estudos com genética de amostra não invasiva, uma importante ferramenta para o manejo e conservação de espécies de hábito elusivo como a anta.

OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi comparar o sucesso de amplificação em quatro locos de microssatélites de amos-

tras fecais de antas coletadas no Pantanal e Cerrado, levando em conta as condições ambientais de cada bioma e o tamanho (pares de base pb) de cada loco amplificado.

MATERIAL E MÉTODOS

As fezes coletadas foram estocadas em etanol 80% e mantidas a 20° C até o momento da extração de DNA, a qual foi feita com a utilização do *Spin Stoll DNA Kit*. Na PCR usamos um conjunto de quatro locos de microssatélites desenvolvidos para a espécie por Sanches *et al.*, (2009): Tter4(260pb),Tter5(130pb),Tter10(234pb),Tter13(300pb). As amostras do Pantanal foram coletadas em salinas na região de Nhecolândia, na Fazenda Barranco Alto (19°34'39.19"S; 56° 9'1.65"O), MS e as amostras do Cerrado na Fazenda Barra da Moeda, da Fibria Sul Matogrossense, em Três Lagoas, MS, em parceria com as empresas Casa da Floresta Assessoria Ambiental e Fibria.

RESULTADOS

O sucesso de amplificação, considerando o conjunto dos locos, foi de 75% no Pantanal e 92,56% no Cerrado. O maior sucesso no Cerrado pode estar relacionado às características do meio: 1) as fezes são coletadas sob uma cobertura florestal mais densa (cerradão), a qual bloqueia a incidência solar direta nas amostras, ocasionando uma menor degradação do DNA; 2) as fezes foram coletadas fora d'água, a qual pode levar o DNA das fezes; 3) houve uma facilidade na seleção de fezes frescas para serem amostradas. Já no Pantanal 1) as fezes foram coletadas submersas ou no entorno de Salinas, nas quais não há cobertura arbóreo - arbustiva. A alta concentração de sal somada à incidência direta do sol podem tornar o DNA de anta contido nas fezes mais degradado; 2) Houve uma maior dificuldade na distinção das fezes frescas das mais velhas, já que a exposição direta ao sol as resseca em poucas horas quando na beira das salinas, e quando submersas, aparentam serem mais novas do que são. O sucesso de amplificação em cada loco foi inversamente proporcional ao tamanho dos locos de microssatélite: Tter4 (76,19% no Pantanal e 92,5% no Cerrado); Tter5 (85,71% no Pantanal, 100% no Cerrado); Tter10 (80,95% no Pantanal e 95,12% no Cerrado); Tter13 (57,14% no Pantanal e 85% no Cerrado). Visto que o DNA proveniente das fezes é degradado e sequencias longas de DNA são dificilmente preservadas nas condições em que as amostras encontram - se no meio.

CONCLUSÃO

Em futuros estudos populacionais com genética não - invasiva de antas no Pantanal recomenda - se amostrar um número maior de fezes que no Cerrado, já que espera - se um menor sucesso de amplificação. O uso de locos mais curtos de microssatélites em trabalhos desse tipo é mais indicado já que o DNA obtido é fragmentado, porém é preciso considerar a eficiência destes para genotipagem, pois muitos locos podem ser mais propensos a diversos tipos de erros (alelos nulos, *stutters*, alelos *dropout*). Desta forma, o planejamento de um trabalho de análise genética não - invasiva deve considerar a área de estudo (condições em que as fezes estão expostas), bem como os locos a serem utilizados, cujo sucesso pode ser analisado em projetos pilotos para a seleção dos locos apropriados para o tipo de DNA obtido.

REFERÊNCIAS

- CARDILLO M., MACE G. M., JONES K. E., BIELBY J., BININDA - EMONDS O. P., SECHREST , ORME C. D. L., PURVIS A. 2005. Multiple Causes of High Extinction Risk in Large Mammal Species. *Science*. 309: 1239 - 1241.
- CLEVENGER A.P. 1993. Sign survey as an important tool in carnivore conservation research and management programmes. In: Seminar on the Management of Small Populations of Threatened Mammals. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats (Bern Convention). Strasbourg, France. 36 - 46.
- CULLEN Jr L., BODMER R. E., PÁDUA C. V. 2000. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. *Biol Conserv* 95:49 - 56.
- DÁLEN L.,GOTHERSTROM A,TANNERFELDT M.,ANGERBJORN A.2002.Is the endangered Fennoscadian arctic fox (*Alopex lagopus*) population genetically isolated?. *Biolog. Conservation*.105:171 - 178.
- FRANKHAM R., BALLOU J. D., BRISCOE D. A. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. ed. CBG. Ribeirão Preto. SP. 280p.
- GALETTI M., KEUROGHLIAN A., HANADA L.; MORATO M.I.V. 2001. Frugivory and seed dispersal by the Lowland Tapir (*Tapirus terrestris*) in Southeast Brazil. *Biotropica*, 33 (4): 723 - 726.
- MEDICI E. P. 2010. Lowland Tapir Populations in a Fragmented Landscape. 2010. PhD Dissertation. Durrel Institute of Conservation and Ecology (DICE). University of Kent. Caterbury, United Kingdom.
- OLIVEIRA - SANTOS L. G. R., ZUCCO C. A., ANTUNES P. C., CRAWSHAW Jr P. G. 2010. Is it possible to individually identify mammals with no natural markings using camera - traps? A controlled case - study with lowland tapirs. *Mamm. biol.* 75: 375378.

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

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

SANCHES A., FIGUEIREDO M. G., HATANAKA T., de PAULA F. F. P., SILVEIRA L., JÁCOMO A. T. A., GALETTI Jr. P. M. 2009. Microsatellite loci isolated from the lowland tapir (*Tapirus terrestris*), one of the largest Neotropical mammal. *Conservation Genet Resour.* 1:115117.