

ROXANE WIRSCHUM SILVA

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Tayassu tajacu* (CATETO) E
Tayassu pecari (QUEIXADA) POR MEIO DA UTILIZAÇÃO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Genética, curso de
Pós Graduação em Genética, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro

Co-orientador: Prof. Dr. Thales R. O. de Freitas

CURITIBA

2006

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Silva, Roxane Wirschum

Avaliação da variabilidade genética em *Tayassu tajacu* (Cateto) e *Tayassu pecari* (Queixada) por meio da utilização de marcadores microssatélites./ Roxane Wirschum Silva. – Curitiba, 2006.
x; 76f. : il. ; 30cm.

Orientador: Ives José Sbalqueiro

Co-orientador: Thales R. O de Freitas

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética 2. *Tayassu tajacu* 3. *Tayassu pecari* I. Título II. Sbalqueiro, Ives José, 1947- III. Freitas, Thales, Renato Ochotorena de IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.

CDD(20.ed.) 575.1

AGRADECIMENTOS

Ao Curso e professores da Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio e contribuição dados à minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro, pela orientação, apoio, oportunidades de crescimento acadêmico/científico, amizade e conhecimentos transmitidos durante estes quase oito anos de convivência, os quais foram fundamentais para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas que, mesmo à distância, não exitou em me orientar e, quando precisei, me recebeu tão prontamente, abrindo as portas do Laboratório de Citogenética e Evolução de Vertebrados da UFRGS, no qual passei momentos muito importantes e decisivos para a conclusão desta dissertação.

Aos professores, Chirlei Glienke de Blanco e João Carlos Marques Magalhães, membros da banca de acompanhamento, pelas conversas, sugestões, correções, enfim, todas contribuições dadas ao longo da realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Adriana Gonela por toda a ajuda prestada, desde indicação de literatura a resolução de problemas técnicos enfrentados neste trabalho, sempre muito atenciosa, educada e com palavras positivas. Mesmo não nos conhecendo pessoalmente, nunca esquecerei o que fez por mim!

À doutoranda Cibele Biondo pela troca de experiências e auxílios prestados às pequenas dúvidas que me apareceram durante este percurso.

A todos os chefes dos Laboratórios do Departamento de Genética que cederam seus equipamentos, da autoclave à microcentrífuga. Sem eles, este trabalho não teria sido possível.

Aos funcionários e ex-funcionários do Departamento de Genética que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

A todas as pessoas e instituições que auxiliaram na obtenção de material biológico (sangue) dos catetos e queixadas e dedicaram parte de seu tempo para esta finalidade: Sr. Lucien Araújo Ribas (proprietário da Fazenda da Praia,

Tibagi/PR) e seus corajosos funcionários; funcionários do Parque Municipal das Araucárias; Dr^a Luciana M. Batalha, veterinária responsável pelo Setor de Animais Silvestres da Fazenda Experimental Gralha Azul (PUC/PR) que, sempre muito disposta, coletou sangue dos animais, demonstrando muita preocupação com o bem-estar deles (algo raro hoje em dia); Paulo que, da mesma forma, dedicou muito de seu tempo ficando horas em frente aos bretes para aprisionar os animais e, depois, para segura-los (tarefa nada fácil) para que fosse possível maneja-los; aos alunos estagiários da Dr^a Luciana que também participaram intensivamente das coletas, o meus sinceros agradecimentos. Também não posso esquecer a ajuda corajosa que minha prima Paula e seu namorado Rodrigo (futuros Veterinários) ofereceram quando precisei de alguém que coletasse o sangue dos animais.

Aos meus colegas de turma (Alessandro, Clarissa, Cristiane, Maria Claudia, Márcia, Manoela, Rafael Noletto e Rafael Vargas), pela convivência e amizade.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Citogenética Animal (os que estão e os que já saíram): saibam que os momentos mais divertidos (e os mais difíceis) da minha vida eu passei ao lado de vocês. Portanto, obrigada pela ajuda e alegria!

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Evolução de Vertebrados da UFRGS, especialmente à Nice, Ligia, Tatiane, Fabiano, Elise e Gislene que foram muito atenciosos comigo nas duas vezes em que estive em Porto Alegre.

À amiga e madrinha Maria Cristina da Silva Cortinhas, pela força e troca de experiências eternamente dadas a mim e, à sua mãe, Dona Clélia, que me recebeu tão bem quando estive em Porto Alegre. Eu nunca esquecerei o que vocês fizeram por mim!

À amiga e “irmã científica” Iris Hass que, mesmo do outro lado oceano Atlântico, sempre me apoiou, contribuindo com ajudas científicas e palavras de apoio em momentos difíceis.

À amiga Fátima Becker Guedes, pelo eterno apoio em laboratório e fora dele. Com você aprendi muito, principalmente que “duas cabeças pensam melhor do que uma” e a ter coragem de enfrentar as dificuldades!

À amiga Daniele Malheiros Ferreira que me ajudou muito a dar os primeiros passos no mundo da Biologia Molecular, incondicionalmente.

Ao Prof. Dr. José Fernando de Sousa Lima, pela amizade e incentivo dados durante todo o tempo em que convivemos juntos no “Projeto Catetos e Queixadas”.

À Soraya que, muito profissionalmente, me fez enxergar que o Ser é mais importante que o Ter e que todos nós somos pessoas capazes e especiais.

Aos meus pais, Juarez e Dirce e meus irmãos, Julianna e Cezar, pelo carinho, compreensão e eterno apoio dados desde o começo da minha existência.

Aos meus familiares por me lembrarem sempre que a família é um dom de Deus.

Aos meus sogros que fizeram e fazem tudo que está ao alcance deles para proporcionar-nos uma vida digna.

Ao meu eterno e grande amor, Fernando, simplesmente por existir em minha vida! Saiba que, sem você, eu não teria chegado até aqui.

Ao Bumer, meu cachorrinho que, como um anjinho, veio trazer alegria em nossas vidas com suas brincadeiras e sua companhia.

Aos animais que, sem compreender, literalmente “deram o sangue” para que pudéssemos compreender melhor a sua biologia. A vocês, o meu eterno respeito.

À Deus, por me dar a oportunidade de estar aqui, rodeada de coisas boas e com força para enfrentar momentos de dificuldade. Obrigada por tudo!

SUMÁRIO

continua

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 FAMÍLIA TAYASSUIDAE.....	1
1.1.1 <i>Tayassu tajacu</i>	2
1.1.2 <i>Tayassu pecari</i>	4
1.2 MARCADORES MOLECULARES EM ESTUDOS POPULACIONAIS E DE CONSERVAÇÃO.....	6
1.3 MICROSSATÉLITES.....	9
1.4 EXEMPLOS DE UTILIZAÇÕES DE MARCADORES MOLECULARES EM ARTIODACTYLA.....	11
1.5 EXEMPLOS DE UTILIZAÇÕES DE MARCADORES MOLECULARES NA FAMÍLIA TAYASSUIDAE.....	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 AMOSTRA.....	18
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	18
3.3 QUANTIFICAÇÃO E TESTE DE QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO.....	19
3.4 DILUIÇÃO DO DNA EXTRAÍDO.....	20
3.5 REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS LOCOS MICROSSATÉLITES.....	20
3.6 VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO.....	23
3.7 ANÁLISE DOS DADOS.....	24
4 RESULTADOS	27
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCOS MICROSSATÉLITES.....	27
4.1.1 Regiões de Amplificação.....	27
4.1.2 Locos Polimórficos, Freqüências Alélicas e Genotípicas.....	conclusão
4.1.2.1 Locos polimórficos.....	28

4.1.2.2	Freqüências alélicas e genotípicas.....	28
a)	Loco SW1408.....	28
b)	Loco SW857.....	30
c)	Loco SW2411.....	32
d)	Loco ACTG2.....	34
e)	Loco SW444.....	36
4.2	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA EM <i>Tayassu tajacu</i> E <i>Tayassu pecari</i>	38
4.2.1	Heterozigose Observada e Heterozigose Esperada.....	38
4.2.2	Conteúdo de Informações Polimórficas.....	39
4.2.3	Probabilidade de Exclusão de Paternidade (PE) e Probabilidade de Exclusão Combinada.....	40
4.2.4	Freqüências de Alelos Nulos.....	40
4.2.5	Estrutura Populacional.....	41
4.3	COMPARAÇÕES DE ESTRUTURA POPULACIONAL E DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE <i>T. tajacu</i> E <i>T. pecari</i>	42
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXOS	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	ESPÉCIES, NÚMERO DE INDIVÍDUOS, SEXO E LOCALIDADES DOS EXEMPLARES DE PORCOS-DO-MATO.....	18
TABELA 2 –	SEQÜÊNCIA DOS QUATRO LOCOS MICROSSATÉLITES ESCOLHIDOS ATRAVÉS DE COMPARAÇÕES DE BANDAS G – REGIÕES HOMEÓLOGAS – ENTRE <i>Sus scrofa scrofa</i> (javali), <i>Tayassu tajacu</i> E <i>Tayassu pecari</i> E LOCALIZAÇÃO NOS CROMOSSOMOS DE <i>Sus scrofa domestica</i>	21
TABELA 3 –	SEQÜÊNCIA DOS DOIS LOCOS MICROSSATÉLITES UTILIZADOS POR GONELA (2003) E LOCALIZAÇÃO NOS CROMOSSOMOS DE <i>Sus scrofa domestica</i>	22
TABELA 4 –	CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE MAGNÉSIO (MgCl ₂), QUANTIDADE DE DNA E TEMPERATURA DE HIBRIDAÇÃO DOS INICIADORES UTILIZADAS PARA OS DIFERENTES LOCOS.....	23
TABELA 5 –	COMPARAÇÃO ENTRE O TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS EM PARES DE BASE ENCONTRADOS EM <i>Sus scrofa domestica</i> , <i>Tayassu tajacu</i> E <i>Tayassu pecari</i>	27
TABELA 6 –	LOCOS POLIMÓRFICOS, NÚMERO DE ALELOS E AMOSTRA ANALISADA NAS DUAS ESPÉCIES DE PORCOS-DO-MATO.....	28
TABELA 7 –	LOCO SW1408 – ALELOS E SUAS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS EM <i>T. tajacu</i> E <i>T. pecari</i>	29
TABELA 8 –	LOCO SW857 – ALELOS E SUAS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS EM <i>T. tajacu</i> E <i>T. pecari</i>	31
TABELA 9 –	LOCO SW2411 – ALELOS E SUAS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS EM <i>T. tajacu</i> E <i>T. pecari</i>	33
TABELA 10 –	LOCO ACTG2 – ALELOS E SUAS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS EM <i>T. tajacu</i> E <i>T. pecari</i>	35
TABELA 11 –	LOCO SW444 – ALELOS E SUAS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS EM <i>T. tajacu</i> E <i>T. pecari</i>	37
TABELA 12 –	HETEROZIGOSE OBSERVADA (H _o) E HETEROZIGOSE ESPERADA (H _e) E VALORES DE p EM <i>T. tajacu</i> E <i>T. pecari</i>	39
TABELA 13 –	VALORES DE PIC PARA CADA LOCO EM <i>T. tajacu</i> E <i>T. pecari</i>	39
TABELA 14 –	PROBABILIDADES DE EXCLUSÕES DE PATERNIDADE (PE 1 E PE 2) E DE EXCLUSÃO COMBINADA (PEC) NAS DUAS ESPÉCIES DE PORCOS-DO-MATO.....	40
TABELA 15 –	FREQUÊNCIAS ESTIMADAS DE ALELOS NULOS NOS CINCO LOCOS EM <i>T. tajacu</i> E <i>T. pecari</i>	40
TABELA 16 –	VALORES INDIVIDUAIS E TOTAIS DE F _{st} NAS AMOSTRAS DE <i>T. tajacu</i> E <i>T. pecari</i>	41
TABELA 17 –	VALORES INDIVIDUAIS E TOTAIS DE F _{is} NA AMOSTRA DE <i>T. tajacu</i> E <i>T. pecari</i>	42
TABELA 18 –	VALORES DE F _{st} PARA CADA LOCO CONSIDERANDO AS DUAS ESPÉCIES DE PORCO-DO-MATO.....	42

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – <i>Tayassu tajacu</i> (CATETO).....	3
FIGURA 2 – <i>Tayassu pecari</i> (QUEIXADA).....	5
FIGURA 3 – DENDROGRAMA REPRESENTATIVO DAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE CATETOS E QUEIXADAS. OS NÚMEROS DOS NÓS SÃO OS VALORES DE <i>BOOTSTRAP</i> COM 10000 REPLICAÇÕES.....	43
GRÁFICO 1 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW1408 EM <i>T. tajacu</i>	29
GRÁFICO 2 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW1408 EM <i>T. pecari</i>	30
GRÁFICO 3 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW857 EM <i>T. tajacu</i>	31
GRÁFICO 4 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW857 EM <i>T. pecari</i>	32
GRÁFICO 5 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW2411 EM <i>T. tajacu</i>	33
GRÁFICO 6 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW2411 EM <i>T. pecari</i>	34
GRÁFICO 7 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO ACTG2 EM <i>T. tajacu</i>	35
GRÁFICO 8 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO ACTG2 EM <i>T. pecari</i>	36
GRÁFICO 9 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW444 EM <i>T. tajacu</i>	37
GRÁFICO 10 - NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW444 EM <i>T. pecari</i>	38

RESUMO

Os porcos-do-mato, catetos (*Tayassu tajacu*) e queixadas (*Tayassu pecari*), são nativos da fauna brasileira e possuem grande importância na alimentação das populações humanas, principalmente das indígenas, além dos criadouros com fins de manutenção, reprodução e exploração comercial. Nos últimos anos, estes animais estão sendo criados e comercializados, pois a carne é saborosa e, portanto, muito apreciada. Entretanto, existe pouca informação a respeito da genética populacional destes animais. O presente trabalho visou avaliar a variabilidade genética em populações de catetos e queixadas mantidas em cativeiro por meio da utilização de marcadores microssatélites. Para tal propósito, foram utilizados seis iniciadores desenvolvidos para porco doméstico (*Sus scrofa scrofa*), que amplificaram em ambas espécies. A visualização dos alelos foi realizada em gel de poliacrilamida não-desnaturante 10%, revelando a presença de cinco locos polimórficos e um monomórfico. Entre os locos polimórficos, foi observada alta diversidade alélica, sendo de quatro a dezesseis alelos em catetos e de três a dez alelos em queixadas. Porém, a variabilidade genética foi considerada baixa, tendo em vista a alta incidência de indivíduos homocigotos em ambas espécies e em todos os locos, exceto o loco ACTG2 (queixadas), o qual apresentou excesso de heterocigotos. Os valores do conteúdo de informações polimórficas (PIC), foram considerados, em ambas espécies e em todos os locos, altamente informativos. A probabilidade de exclusão combinada (PEC) foi considerada alta e satisfatória em catetos (99,48%) quando se conhece um dos parentais e, em queixadas, a probabilidade de exclusão combinada considerando toda a amostra, foi considerada alta quando se conhece um dos parentais (95,53%), porém não satisfatória para a realização deste tipo de teste. Através do cálculo de F_{st} , pôde-se verificar que as populações de catetos ($F_{st}=0,042$) e queixadas ($F_{st}=0,1387$) não estão estruturadas, ou seja, há fluxo gênico entre elas, sendo que a variabilidade encontrada está dentro e não entre as populações. Já quando comparadas as duas espécies, percebeu-se a estruturação, não havendo fluxo gênico entre elas. Os valores de F_{is} , exceto no loco ACTG2 (queixadas), o qual apresentou valor negativo (-0,0275), nos demais os locos e em ambas espécies (0,1985 a 0,9284 em catetos e 0,3621 a 0,4754 em queixadas), revelaram um alto índice de homocigose, causada, provavelmente, por endocruzamento. O presente trabalho constatou o sucesso da amplificação heteróloga em catetos e queixadas utilizando iniciadores de porco doméstico, confirmando os dados da literatura e fornecendo resultados inéditos a este respeito, bem como em relação à variabilidade genética encontrada nestes animais. Além disso, foram apresentadas proposições que visam a otimização da criação destes animais nos cativeiros.

Palavras-chave: Microssatélites; Variabilidade genética; *Tayassu tajacu*; *Tayassu pecari*

ABSTRACT

Wild pigs, Collared peccary (*Tayassu tajacu*) and White-lipped peccary (*Tayassu pecari*) are native species of Brazilian fauna which have high social and economic importance. Both are important as alimentary items among native human populations. In the last years, the meat from these animals has become much appreciated and so they have been utilized as a commercial product. However, little information regarding the population genetics of these animals exists. The goal of the present report was to analyze the genetic variability with microsatellites markers in White-lipped peccary and Collared peccary. Six primers developed for domestic pig (*Sus scrofa scrofa*) were successfully used regarding amplification, in both species. The visualization of the alleles was carried out on a not-denaturing 10% polyacrylamide gel, showing the presence of five polymorphic loci and one monomorphic locus. Among the polymorphic loci high allelic variability was observed in Collared peccary (from four to 16 alleles) and also in White-lipped peccary (from three to ten alleles). However the genetic variability was considered low due to the high frequency of homozygotes animals in both species and in all loci, except in the locus ACTG2 (White-lipped peccary). The values of the polymorphic information content (PIC) were considered highly informative in both species, in all the loci. The probability of paternity exclusion was considered high and satisfactory in Collared peccaries (99,48%), when one knows one of the parental individuals. In White-lipped peccaries, the probability of paternity exclusion taking all the sample was also considered high when one of the parental individuals is known (95,53%), however not satisfactory for performing this type of test. The F_{st} shows that populations of Collared peccary ($F_{st}=0,042$) and White-lipped peccaries ($F_{st}=0,1387$) are not structured, i.e. there is genetic flow among populations of each species resulting in a within-populations genetic variability. When compared the two species, however, there is no genetic flow between them. The values of F_{is} in both species and in all loci (0,1985 to 0,9284 in Collared and 0,3621 to 0,4754 in White-lipped peccaries), except in ACTG2 (White-lipped peccary), which presented negative value (-0,0275), revealed a high index of homozygotes observed, being this one probably caused for the inbreeding. The present study showed the success of the heterologous amplification in Collared and White-lipped peccaries using primers of domestic pig, confirming the results already in the literature and providing new data mainly in relation to the genetic variability in these animals. Moreover, we were able to propose some optimization for maintaining these animals in captivity.

Keywords: Microsatellites; Genetic variability; *Tayassu tajacu*; *Tayassu pecari*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA TAYASSUIDAE

A família Tayassuidae pertence à Ordem Artiodactyla, subordem Suiformes, superfamília Suoidea e possui dois gêneros e três espécies (GROVES e GRUBB, 1993): *Tayassu tajacu* (Linnaeus, 1758), *Tayassu pecari* (Link, 1795) e *Catagonus wagneri* (Rusconi, 1930). Apesar dos representantes desta família serem conhecidos como porcos-do-mato, estes não pertencem à família Suidae, que compreende, entre outros, o porco doméstico e o javali.

A separação dos Suoidea em duas famílias distintas – Tayassuidae e Suidae – deve-se a importantes diferenças anatômicas e genéticas entre estes animais.

O porco-do-mato difere do porco doméstico em algumas características como, por exemplo, estômago com dois compartimentos, pêlos mais compridos e rijos, cauda mais curta e abertura de uma glândula de cheiro nas costas, um pouco à frente da cauda. Possui pernas longas e finas; os pés anteriores apresentam quatro dedos, dos quais apenas dois tocam o chão; os posteriores portam três dedos (SILVA, 1984).

A sua distribuição normalmente está restrita ao Novo Mundo, sendo geralmente onívoros e normalmente encontrados em florestas. Alimentam-se de folhas, sementes, raízes, frutos, insetos, ovos de pássaros, lagartos e pequenos mamíferos. São mais ativos à noite e apresentam também um olfato extremamente sensível facilitando a localização de alimentos escondidos sob a vegetação, utilizando o focinho e as presas para cavar e cortar raízes.

No Brasil, ocorrem duas espécies de taiassuídeos: *Tayassu tajacu*, conhecida como cateto e *Tayassu pecari*, conhecida como queixada. Ambas espécies estão sendo amplamente criadas em cativeiro devido à exploração econômica da carne destes animais, pois a mesma, em ambas espécies, além de ser muito saborosa apresenta o teor de gordura inferior à dos porcos domésticos. O couro destes animais é usado em confecções finas como luvas e bolsas (DEUTSCH e PUGLIA, 1990).

Portanto, há a necessidade de serem implementados programas de manejo e reprodução nos criadouros, uma vez que se tratam de animais silvestres que

requerem cuidados especiais. Quando atendidas estas condições básicas em um criadouro, a criação destes animais em cativeiro se torna uma atividade economicamente viável.

1.1.1 *Tayassu tajacu*

Das três espécies de taiassuídeos existentes, o cateto é o menor, mais abundante e mais amplamente distribuído, sendo encontrado do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. Ocorre em diversos tipos de habitat, de florestas tropicais úmidas a semidesertos (BODMER e SOWLS, 1993).

A ampla distribuição de *T. tajacu* faz dele um dos mamíferos terrestres com uma das maiores distribuições no continente americano. Ao longo das áreas de distribuição ocorrem numa ampla variedade de habitats: desertos, florestas de espinhos, *chacos*, caatinga, florestas de carvalho e florestas tropicais.

Além de ser encontrado no continente, ocorre também em ilhas próximas a ele, como nas do Caribe. Contudo, naquelas mais distantes não são encontrados naturalmente, exceto quando introduzidos, como, por exemplo, em Cuba (BODMER e SOWLS, 1993).

O cateto (fig. 1) pesa entre 18 a 25 Kg e sua altura varia de 40 a 50 cm, sendo os machos geralmente maiores que as fêmeas. Um espécime adulto mede, da cabeça à base da cauda, cerca de 1 m (DEUTSCH e PUGLIA, 1990; SOWLS, 1984 *apud* BODMER e SOWLS, 1993). Um tipo de colar branco amarelado, em frente às patas anteriores, largo inferiormente no peito e muito estreito no dorso, torna fácil o reconhecimento do cateto. O corpo é castanho escuro, quase preto, salpicado de branco devido à existência de pêlos brancos e pretos (SILVA, 1984). Porém, dentro desta espécie, são observadas variações no tamanho e cor de pelagem de acordo com o ambiente no qual estes indivíduos são encontrados.

Este tipo de variação tem levado alguns pesquisadores a declarar que a espécie *T. tajacu* é composta por subespécies. Segundo HALL (1981) *apud* BODMER e SOWLS (1993), seriam em torno de dez. Para esclarecer as possíveis confusões taxonômicas existentes neste táxon, GROVES e GRUBB (1993) acreditam na necessidade de haver uma melhor compreensão da genética e distribuição geográfica de *T. tajacu*.

Além disso, *T. tajacu* é considerada por alguns autores como uma espécie pertencente a um gênero distinto de *Tayassu* sendo identificada como *Pecari tajacu* (GRUBB, 1993; THEIMER e KEIM, 1998; GONGORA e MORAN, 2005). No intuito de contribuir para um maior entendimento da filogenia da família Tayassuidae THEIMER e KEIM (1998) e GONGORA e MORAN (2005), através da análise de seqüências de DNA mitocondrial (citocromo *b*), mostraram que *Tayassu pecari* e *Catagonus wagneri* são mais relacionadas entre si que com *Pecari tajacu*, sustentando, portanto, o cateto como um gênero separado dentro da família Tayassuidae (gênero *Pecari*). No entanto, ambos os trabalhos afirmam que há a necessidade de serem realizadas combinações entre análises moleculares e morfológicas nas amostras ao longo da distribuição geográfica e ambiental das espécies existentes de taiassuídeos, proporcionando um maior entendimento das origens e relações entre elas. Portanto, devido a esta nova classificação ser ainda controversa e haver a necessidade de se rever a taxonomia destes animais, adotou-se, no presente trabalho, o gênero e espécie *Tayassu tajacu* para identificar os catetos.

Os catetos possuem dieta de acordo com o habitat onde vivem, no qual os alimentos podem geralmente ser classificados como raízes, tubérculos, nozes e partes verdes comestíveis de plantas. Em florestas tropicais, a dieta dominante é baseada em frutos de palmeiras e suplementada com invertebrados. O padrão de atividade é crepuscular, alimentando-se nas primeiras horas da noite.

FIGURA 1 – *Tayassu tajacu* (CATETO)



FONTE: Ives José Sbalqueiro, 2002.

Como todos os taiassuídeos, *T. tajacu* é um animal altamente social, vivendo em bandos, os quais variam de pouco mais de seis até 30 indivíduos. São animais nômades e, muitas vezes, viajam vários dias, podendo percorrer grandes distâncias. À frente do bando vai o macho líder, seguido pelos machos mais velhos e experientes, e depois os jovens machos, as fêmeas e suas crias. A aproximação de um bando de catetos pode ser percebida pelo som característico que produzem: o bater dos dentes. A área ocupada pelo grupo pode variar de 60 a 400 ha, cuja extensão média é de 100 a 200 ha (DEUTSCH e PUGLIA, 1990). No bando, os indivíduos são mantidos juntos por vocalização e através de um forte odor emitido por uma glândula dorsal que é esfregada em troncos de árvores, rochas e nos próprios indivíduos (BYERS, 1980 *apud* BODMER e SOWLS, 1993).

O período de gestação varia de 142 a 145 dias, onde o tamanho da ninhada é, geralmente, de dois filhotes. Estes são precoces ao nascer, seguindo suas mães dentro de uma hora após o parto (SOWLS, 1966 *apud* BODMER e SOWLS, 1993).

O cariótipo de *T. tajacu* possui $2n=30$ e número de braços autossômicos (NA) de 46 (HUFTY, SEDGWICK e BENIRSCHKE, 1973; GIANNONI e FERRARI, 1976a,b,c,d, 1977; BENIRSCHKE e KUMAMOTO, 1989; ROCHA, 1993; VASSART et al., 1994; ANDREA et al., 2001; GUEDES et al., 2002; LIMA et al., 2002), mostrando-se altamente estável.

Estes animais têm sofrido ameaças para sua sobrevivência, dentre as quais destacam-se duas: a caça e a excessiva destruição dos habitats naturais. Estes fatores têm resultado na fragmentação de populações de catetos e, até mesmo, o desaparecimento deles em algumas regiões de sua distribuição (BODMER e SOWLS, 1993).

1.1.2 *Tayassu pecari*

A queixada (fig. 2) é o maior e mais agressivo dos porcos selvagens sul-americanos, atingindo 1,10 m de comprimento. Ele vive do sul do México ao nordeste da Argentina, Equador, Peru, leste da Bolívia, Paraguai até o Atlântico brasileiro (DEUTSCH e PUGLIA, 1990).

Apresenta pelagem das costas muito longa com uma coloração negro-pardacenta, possuindo uma grande quantidade de pêlos brancos na mandíbula e

focinho, característica que lhe confere o apelido de pecari do lábio branco e que o diferencia de outro pecari também comum na América do Sul, o cateto (*Tayassu tajacu*). Outra característica é a presença de uma glândula de cheiro nas costas que serve para identificar cada indivíduo e marcar seu território (GIANNONI, FERRARI e GIANNONI, 1982; BODMER e SOWLS, 1993).

FIGURA 2 – *Tayassu pecari* (QUEIXADA)



FONTE: Ives José Sbalqueiro, 2002.

Vive em grandes grupos, geralmente de 50 a 100 indivíduos, compostos por fêmeas e machos de todas as idades e em uma grande variedade de habitats, desde regiões de clima árido a florestas tropicais úmidas (seu habitat preferido), especialmente em áreas bem conservadas onde atinge sua grande abundância, pois sua tolerância a áreas desmatadas parece ser mínima, sendo facilmente caçado. Em florestas tropicais úmidas são predominantemente frugívoros, mas podem também se alimentar de animais (DEUTSCH e PUGLIA, 1990).

O período de gestação de uma fêmea dura de 156 a 162 dias, nascendo de um a três filhotes (MAYER e WETZEL, 1987).

O cariótipo desta espécie possui um $2n=26$ e $NA=46$ (HUFTY, SEDGWICK e BENIRSCHKE, 1973; GIANNONI e FERRARI, 1976a,b,c,d, 1977; BENIRSCHKE e KUMAMOTO, 1989; ROCHA, 1993; VASSART et al., 1994; ANDREA et al., 2001; GUEDES et al., 2002).

O *T. pecari* apresenta algumas características comportamentais muito parecidas às do *T. tajacu*, mas a forma como este repertório é revelado difere muito.

Pode-se diferenciar a queixada do cateto por seu comportamento mais expansivo (em intensidade de exibição), geralmente executado por todos os indivíduos, pela necessidade de marcação territorial e também pela grande agressividade. Quando acuado, bate forte o queixo e é valentíssimo (DUBOST, 1997 *apud* GONELA, 2003).

A queixada tem um papel muito importante no desenvolvimento econômico e cultural de muitas populações indígenas neotropicais, constituindo-se em uma importante fonte de alimento e renda para diversas tribos e populações rurais (MARCH, 1993).

Dentre as espécies de mamíferos encontradas em florestas neotropicais, o *T. pecari*, juntamente com o *T. tajacu*, são candidatas ao aproveitamento sustentável, mas uma das barreiras encontradas é a pouca informação sobre o comportamento, ecologia, habitat e biologia da população. Outro fator é a falta de dados sobre a genética populacional. Como a espécie necessita de uma vasta área para sobreviver (100 km² para um grupo de aproximadamente 100 animais) provavelmente ocorram problemas de consangüinidade (FRAGOSO, 1998).

O *T. pecari* está entre os animais em perigo de extinção devido à caça extensiva, problemas de saúde (especialmente doenças infecciosas) e desaparecimento das florestas onde vivem. Apresentando distribuição geográfica menor que a de *T. tajacu*, *T. pecari* mostra-se mais vulnerável à pressão de caça talvez por formarem grupos sociais maiores (BODMER e SOWLS, 1993).

A conservação do *T. pecari* e dos taiassuídeos em geral, deve ser considerada prioritária, pois, a redução dos níveis populacionais pode resultar em uma perda da fonte de proteína para comunidades rurais e a um desequilíbrio sobre o ecossistema das florestas. Para tanto, é necessária uma caracterização genética das populações, o que permitirá gerar informações sobre a diversidade genética (GONELA, 2003).

1.2 MARCADORES MOLECULARES EM ESTUDOS POPULACIONAIS E DE CONSERVAÇÃO

Os marcadores moleculares estão sendo amplamente utilizados, pois apresentam vantagens sobre os marcadores morfológicos, aplicados até a década de 60, para estudos de genética e melhoramento. A disponibilidade de marcadores

morfológicos era essencialmente restrita a poucas espécies de plantas utilizadas como sistemas modelo para o estudo da genética. A revolução neste quadro iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos e, mais tarde, aperfeiçoados com o surgimento de técnicas que detectam polimorfismo genético diretamente no DNA. Hoje, um número ilimitado de marcadores moleculares altamente polimórficos pode ser obtido em qualquer organismo por meio da utilização de diversas técnicas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microsatélite e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

As análises de DNA em estudos de populações têm várias vantagens significativas: (1) o genótipo é analisado diretamente; (2) uma ou mais seqüências apropriadas a uma questão específica podem ser selecionadas; (3) muitos métodos são gerais para algum tipo de DNA; (4) o DNA pode ser extraído de pequenas quantidades de tecido e é relativamente estável (GONELA, 2003).

Os sistemas de marcadores normalmente utilizados na análise populacional são polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), DNA mitocondrial, DNAs polimórficos amplificados ao acaso (RAPDs) e microsatélites (SSR). Logo que se obtém uma quantidade adequada de marcadores genéticos para uma determinada espécie pode-se estimar aspectos da estrutura populacional tais como subdivisões de populações, dispersão, fluxo gênico, tamanho populacional efetivo, estratégia de melhoramento e história evolutiva (ENGEL et al., 1996; ROED, 1998 *apud* GONELA, 2003).

Atualmente há uma crescente preocupação com a conservação de muitas espécies animais e vegetais. Em um esforço conjunto com ecologia e morfologia, os dados genéticos podem ser usados para definir as unidades que serão o alvo da conservação. As metas da conservação são, a longo prazo, evitar a endogamia em espécies que não são naturalmente endogâmicas e permitir a elas a manutenção do maior potencial evolutivo possível, ou seja, manter sua alta diversidade genética

independente de sua fragmentação atual. É possível fazer isso realizando a análise genética das populações, incluindo a identificação da sua estrutura genética e dos fatores que a afetam, como tamanho efetivo da população, fluxo gênico e sistemas de acasalamento (PEREZ-SWEENEY, RODRIGUES e MELNICK, 2004).

Segundo estes autores, a avaliação da estrutura genética populacional inclui medidas de endogamia, diversidade e diferenciação, fornecendo um retrato genético das populações. Os níveis de endogamia e de diversidade genética estão relacionados, sendo que se a endogamia é alta a heterozigose será baixa, e vice-versa. Um dos principais motivos para se evitar a endogamia é o de prevenir um aumento de indivíduos homocigotos para genes recessivos deletérios ou letais na população. Esses efeitos poderiam levar a população a sofrer os efeitos de um fenômeno conhecido como depressão endogâmica.

A determinação do grau de diferenciação entre as populações de uma determinada espécie é necessária por várias razões. Uma delas seria evitar que, durante o manejo, ocorra redução na diferenciação genética existente entre elas. O fluxo gênico é um processo evolutivo homogeneizador que minimiza a diferenciação genética entre as populações. Entretanto, deve-se tomar cuidado com casos em que a diferenciação entre elas é devida às alterações genéticas decorrentes da sua fragmentação recente e isolamento em pequenas subpopulações, o que as tornam mais susceptíveis aos efeitos negativos do pequeno número de fundadores e da endogamia. Nestes casos, o objetivo do manejo pode ser a recuperação da variabilidade perdida pela ação dos processos de endogamia e deriva genética, o que pode ser conseguido através da troca de indivíduos entre subpopulações com a conseqüente redução da diferenciação existente entre elas (PEREZ-SWEENEY, RODRIGUES e MELNICK, 2004). Um exemplo disto foi um estudo com focas que, apesar de décadas de proteção e esforços para aumentar as cinco populações conhecidas, o número de indivíduos sempre foi reduzido. Utilizando-se seqüenciamento da região controladora do mtDNA e minissatélites observou-se um baixíssimo nível de variabilidade dentro de cada população, mas uma alta diferenciação entre elas (KETZMANN et al., 1997 *apud* SOLÉ-CAVA, 2001). Desta forma, a nova política de proteção e tentativas de proliferação de suas populações seriam através do cruzamento de indivíduos de colônias diferentes, na tentativa de reverter a depressão endogâmica.

As implicações deste tipo de análise para estudos de conservação, principalmente no caso de espécies raras, são muito importantes: se uma espécie ameaçada, que ocupa uma determinada área, se apresenta estruturada, então a estratégia de conservação deve procurar preservar a diversidade da espécie naquela área, pois já podem existir adaptações locais que se perderiam no caso de a população ser misturada com outras. Por outro lado, se a população da espécie é homogênea ao longo de toda a área de ocorrência, então é viável concentrar a proteção da espécie em apenas uma área, usando indivíduos dessa área para a recolonização das outras quando necessário (HAIG, 1998 *apud* SOLÉ-CAVA, 2001).

A idéia geral, portanto, é que, ao se manejarem populações de espécies ameaçadas, deve-se procurar preservar também sua diversidade geográfica, a não ser nos casos de pouca diferenciação genética, ou seja, nos casos em que as populações estão pouco estruturadas.

A determinação do tamanho efetivo pode ser feita com estimativas do tamanho efetivo histórico e atual das populações. Essas estimativas auxiliam a prever a taxa de perda de variação genética com o passar do tempo e ainda ajudam na avaliação da variabilidade presente e futura das populações. Além disso, aspectos relacionados aos sistemas de acasalamento podem, até certo ponto, ser determinados a partir de dados genéticos através da avaliação da paternidade e do parentesco entre indivíduos nas populações. O conhecimento do sistema de acasalamento é muito importante para que as práticas de manejo implementadas em um projeto de conservação causem a menor perturbação possível na história natural da espécie manejada (PEREZ-SWEENEY, RODRIGUES e MELNICK, 2004).

1.3 MICROSSATÉLITES

Trechos curtos de seqüências simples ocorrem como elementos altamente repetitivos em *tandem* em todos os genomas eucariotos e, parcialmente, também em procariotos e eubactérias (TAUTZ, 1989). Estas seqüências, também conhecidas como microssatélites ou SSR ("*Simple Sequence Repeats*"), apresentam repetições das unidades nos diferentes locos que variam de um a cinco nucleotídeos em tamanho. Devido a grande variabilidade no número de repetições da maioria dos locos, os microssatélites são amplamente usados em aplicações forenses, estudos

genéticos de populações, mapeamento genético e físico de genomas e, conseqüentemente, têm se tornado o suporte principal de análises genômicas em diferentes organismos (RUBINSZTEIN et al., 1995).

Estes locos altamente polimórficos, amplificados via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), também foram denominados “STMS – Sítios de Microssatélites Marcados por Seqüências” e constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponíveis hoje, podendo ser rapidamente isolados em bibliotecas genômicas. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microssatélites, em sua maioria, são seqüências dinucleotídicas repetidas $(CA)_n/(GT)_n$ (STALLINGS, 1995). Microssatélites dinucleotídeos são encontrados freqüentemente em mamíferos como ratos, camundongos, porcos, ovinos e seres humanos e, menos freqüentemente, em bovinos (SUN e KIRKPATRICK, 1996).

Existem dois modelos que podem explicar as elevadas taxas de mutação nos microssatélites: *crossing-over* desigual entre as moléculas de DNA, resultando da recombinação entre cromossomos homólogos que não foram alinhados corretamente e o mecanismo do *slippage* durante a replicação do DNA, que é o mais aceito atualmente, ocorrendo em regiões do DNA que contêm seqüências curtas repetidas em *tandem*, ocasionado por uma elevada taxa de erros de pareamento decorrentes do escorregamento da fita durante a replicação do DNA (EISEN, 1999).

Muitos locos de microssatélites estão localizados entre genes ou dentro de íntrons, sendo extremamente abundantes (ENGEL et al., 1996). Entretanto, apesar de muito raros nas regiões codificadoras, no genoma humano são encontrados alguns tipos de repetições trinucleotídicas, que estão associadas a genes de doenças como a Síndrome do X-Frágil e a Corea de Huntington (RUBINSZTEIN et al., 1995).

Devido à distribuição preferencial nas regiões não codificadoras, os microssatélites podem não sofrer ação da seleção natural (LI et al., 2002), o que os torna um marcador seletivamente neutro muito útil para estudos da genética de populações naturais (GONELA, 2003). No entanto, alguns estudos demonstram que eles podem apresentar papel funcional com elementos codificantes ou reguladores, mostrando que a utilidade dos microssatélites vai além do papel de marcadores para estudos de genética de populações, relações evolutivas e mapeamento gênico.

Deste modo, um loco poderia mostrar um desvio da neutralidade se o microssatélite estivesse ligado a uma região genômica a qual é alvo da seleção natural (MACHADO, 2003 *apud* GONELA, 2003).

Devido a sua expressão codominante e ao multialelismo, os microssatélites são os marcadores que apresentam o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e, por isso, qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento, não sendo mais necessário fazer a escolha da população com base na maximização da distância genética, e sim visando a população mais informativa do ponto de vista das características biológicas ou econômicas de interesse (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A descoberta de que locos de microssatélites dinucleotídeos são conservados através dos genomas de mamíferos (SUN e KIRKPATRICK, 1996) indicou que iniciadores desenvolvidos para amplificar repetições em uma espécie podem amplificar locos em outras espécies. A utilização de iniciadores heterólogos (amplificam dentro de um mesmo gênero, família ou ordem) pode eliminar tempo e despesas envolvidos no isolamento de marcadores microssatélites para cada espécie de interesse tais como, construção de biblioteca genômica de DNA, seqüenciamento do DNA e determinação dos iniciadores (ENGEL et al., 1996).

Dentro da ordem Artiodactyla existem exemplos da utilização de iniciadores heterólogos amplificando em diferentes espécies, assim como em outros taxa como primatas e tartarugas (GONELA, 2003).

A utilização dos microssatélites tem aumentado significativamente em estudos sobre comparações da variabilidade genética entre espécies e populações, história evolutiva e estrutura populacional (ENGEL et al., 1996; GEMMELL et al., 1997; SLATE et al., 1998; MARTÍNEZ et al., 2000; GONGORA et al., 2002; LOWDEN et al., 2002).

1.4 EXEMPLOS DE UTILIZAÇÕES DE MARCADORES MOLECULARES EM ARTIODACTYLA

Os marcadores microssatélites estão sendo amplamente utilizados em rebanhos de artiodátilos de interesse econômico como bovinos, caprinos e suínos,

para avaliar a variabilidade genética, especialmente para fins de melhoramento e em outros artiodátilos, como cervídeos e taiassuídeos, para estudos de estrutura populacional e conservação.

Dentre os artiodátilos de interesse econômico, trabalhos com bovinos como o realizado por CURI (2000), no qual o objetivo principal foi a realização de testes de paternidade em animais da raça Gir, por meio da amplificação de regiões microssatélites do DNA. No experimento foram utilizadas amostras de sangue de quarenta famílias de animais da raça Gir, puros de origem e nove seqüências iniciadoras recomendadas, para testes de paternidade em bovinos, pela Sociedade Internacional de Genética Animal (ISAG). Para a população estudada, somente dois dos nove microssatélites utilizados apresentaram alto polimorfismo e, conseqüentemente, probabilidades de exclusão (PE) adequadas para se proceder a um teste de paternidade. Além disso, a probabilidade de exclusão combinada (PEC) de 0,9789 não atingiu o valor considerado como adequado para Testes de Paternidade (0,99). Portanto, outros marcadores microssatélites devem ser adicionados para se atingir a PEC pretendida.

SLATE et al. (1998) testaram 174 *primers* de microssatélites bovinos em duas espécies de cervídeos – *Cervus elaphus* e *Cervus nippon* – e em uma espécie de carneiro, *Ovis aries*. Neste, 73,4% dos marcadores apresentaram produtos de amplificação sendo 42,5% polimórficos. Em *C. elaphus*, 74,1% dos marcadores amplificaram e destes, 55,8% apresentaram-se polimórficos, ao passo que em *C. nippon*, 73,7% apresentaram produtos, sendo 37,3% polimórficos. Os resultados mostraram que a proporção dos locos microssatélites de bovinos conservados entre as espécies de Artiodactyla foi significativamente maior neste trabalho do que nos previamente relatados, tal como em ENGEL et al. (1996).

Os dados de MARTÍNEZ et al. (2000), utilizando 25 locos de microssatélites na determinação da estrutura genética de nove variedades de porco Ibérico (*Sus scrofa* sp.), mostraram que todos os locos eram polimórficos e o número de alelos variando de quatro a 20. A heterozigose por contagem direta (H), variou de 0,028 a 0,736 e a diversidade para todos os animais (H_T), de 0,055 a 0,9071. Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram observados em 19 locos em toda a amostra, porém, dentro das variedades, os desvios foram muito baixos. Os resultados indicaram que os porcos Ibéricos apresentavam alto grau de diversidade

genética através dos locos microssatélites. Os valores de F_{st} indicaram subdivisão da população devido à deriva ou efeito gargalo de garrafa através do isolamento reprodutivo de populações pequenas. A árvore individual mostra não somente que os animais foram corretamente classificados, mas também sustentam a separação em três grupos tradicionais de porcos Ibéricos (vermelho, preto e pintado). Já a árvore *neighbour-joining* não estabeleceu claramente a topologia entre as variedades. Os resultados mostraram, portanto, o potencial uso dos microssatélites para estudos de biodiversidade em porcos e revelaram uma clara diferenciação entre populações.

1.5 EXEMPLOS DE UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA FAMÍLIA TAYASSUIDAE

Devido à necessidade de desenvolvimento de iniciadores espécie-específicos para análises com microssatélites, estudos com estes marcadores na família Tayassuidae são escassos. Porém, este problema está sendo solucionado com a descoberta de que locos microssatélites são conservados através dos genomas de mamíferos (MOORE et al., 1991), conforme comentários anteriormente expressados. Desta forma, tem sido mostrado que a amplificação heteróloga de locos microssatélites de porco doméstico, *Sus scrofa domestica*, está correspondendo satisfatoriamente em *T. tajacu* (LOWDEN et al., 2002; GONGORA et al., 2002) e *T. pecari* (GONELA, 2003).

LOWDEN et al. (2002) utilizaram 31 *primers* de microssatélites de porco doméstico em sete espécies de porcos selvagens, dentre elas, *T. tajacu*, na qual sete *primers* amplificaram e o número de alelos variou de um a três.

GONGORA et al. (2002) avaliaram a amplificação interespecífica de marcadores microssatélites utilizando *primers* de porco em *T. tajacu*. Dezoito *primers* foram testados em seis indivíduos de *T. tajacu*, sendo que dezesseis amplificaram com sucesso. Isso sugere, relativamente, baixo nível de divergência nucleotídica entre estas linhagens. Os microssatélites de porco doméstico prometem ser de uso considerável em estudos populacionais e filogenéticos de taiassuídeos.

GONELA (2003) trabalhou com seis locos microssatélites de porco doméstico em queixada (*T. pecari*) e porco monteiro (*Sus scrofa* sp). Em uma das análises

concluiu que iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* podem ser utilizados com sucesso em *Tayassu pecari*, sendo altamente informativos e podendo ser úteis nas análises populacionais, estudos filogenéticos e, posteriormente, no melhoramento genético. Entre os seis locos analisados, quatro foram polimórficos (66,7%). Porém, quando se trabalha com iniciadores heterólogos é de se esperar que haja uma redução no número de alelos observados, podendo variar de drástica a suave. No caso específico deste trabalho, em cinco locos foi observada uma redução drástica (mais de 50%) no número de alelos, sendo que a única exceção foi observada em um loco, no qual houve redução de apenas um alelo. Esse fato pode ter duas explicações. A primeira estaria relacionada ao comportamento de *T. pecari*, o qual necessita de uma vasta área para sobreviver e os indivíduos de um bando não cruzam com os de outro bando, o que pode favorecer a endogamia e efeito do fundador. A segunda estaria relacionada à presença de alelos nulos¹, já registrada em muitas espécies (JONES et al., 1998 *apud* GONELA, 2003).

A presença de alelos nulos poderá ocorrer em homozigose e, neste caso, será confundida com falha na PCR (ausência do produto da PCR). Quando ocorrer em heterozigose, os heterozigotos poderão aparecer como homozigotos, implicando em excesso de homozigotos na população, o que poderá causar erros nas análises estatísticas que dependem das freqüências alélicas (CALLEN et al., 1993; ENGEL et al., 1996).

Em outra análise, GONELA (2003) estimou as freqüências alélicas dos mesmos seis locos microssatélites em *Sus scrofa* sp e *Tayassu pecari*, observando uma considerável variação na distribuição das freqüências alélicas entre os locos microssatélites. A distribuição das freqüências de cada microssatélite em cada espécie foi significativamente diferente. Em quatro locos, os alelos observados foram típicos para cada espécie, ou seja, eles identificaram claramente as duas espécies. Para *Sus scrofa* sp o número médio de alelos por loco (N_a) foi de 4,67, a proporção de locos polimórficos (P) foi igual a 1,00, a heterozigose média observada (\bar{H}_o) foi de $0,52 \pm 0,09$, a heterozigose média esperada (\bar{H}_e) foi de $0,50 \pm 0,09$, F_{is} e índice de fixação de Wright (F) foi de -0,04 e -0,11, respectivamente. Já para *Tayassu*

¹ Segundo CALLEN et al. (1993), alelo nulo seria qualquer mutação que ocorre na seqüência de DNA complementar do oligonucleotídeo iniciador, que pode impedi-lo de ligar-se, resultando em redução ou perda completa de produto.

pecari, o número médio de alelos por loco (Na) foi de 3,17, a proporção de locos polimórficos (P) foi igual a 0,67, a heterozigose média observada (\bar{H}_o) foi de $0,35 \pm 0,04$, a heterozigose média esperada (\bar{H}_e) foi de $0,34 \pm 0,04$, F_{IS} e índice de fixação de Wright (F) foram de -0,02 e -0,03, respectivamente.

Estes resultados indicaram a conservação das regiões de microssatélites entre genomas de mamíferos e demonstraram a viabilidade da utilização de iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* na análise de outras espécies da subordem Suiformes.

THEIMER e KEIM (1998), baseando-se em outro tipo de marcador molecular – seqüências de citocromo *b* de DNA mitocondrial –, estudaram as relações filogenéticas dos taiassuídeos comparando 1.047 pares de bases das três espécies existentes de taiassuídeos (*Catagonus wagneri*, *Tayassu pecari* e *Pecari tajacu*, sinônimo de *Tayassu tajacu*), tendo como grupo de fora três espécies de suínos (*Sus scrofa domestica*, *Phacochoerus aethiopicus* e *Babyrousa babyrousa*). A análise filogenética, usando a parcimônia e probabilidade máxima, resultou em árvores que colocaram *Catagonus wagneri* e *Tayassu pecari* num clado separado de *Pecari tajacu*. Estimativas do tempo de divergência, baseadas em citocromo *b*, sugerem que *Tayassu* e *Catagonus* divergiram no antigo Plioceno, talvez concomitantemente com a invasão da América do Sul pelos taiassuídeos. A divergência da linhagem de *P. tajacu* das outras duas espécies foi estimada em $3,4\text{--}7,4 \times 10^6$ anos atrás, suportando a hipótese que estes dois clados divergiram na América do Norte antes de cada um dos dois clados colonizarem a América do Sul. Os resultados obtidos neste trabalho suportam a classificação das três espécies existentes de taiassuídeos dentro de três gêneros: *Pecari tajacu*, *Tayassu pecari* e *Catagonus wagneri*.

Um outro trabalho visando uma melhor compreensão da filogenia da família Tayassuidae (GONGORA e MORAN, 2005), através da análise de seqüências de DNA nuclear e mitocondrial, revelou que *Catagonus wagneri* e *Tayassu pecari* estão mais relacionados entre si do que com *Tayassu tajacu*. Estes achados sustentam a proposta de que esta espécie comporta um outro gênero dentro da família (*Pecari tajacu*), corroborando com os resultados encontrados por THEIMER e KEIM (1998).

TELLES et al. (2003) avaliaram o padrão de amplificação de marcadores RAPD em bandos de queixada (*T. pecari*) do Parque Nacional das Emas. Foram amplificados com sucesso, 30 dos 40 *primers* testados, a partir do DNA de 18 indivíduos de dois bandos, fornecendo um total de 203 locos, com uma média de sete locos por *primer*. Considerando os dois bandos analisados, cerca de 72% dos locos foram polimórficos. A análise de variância molecular (AMOVA), para todos os locos, mostrou que existe uma tendência de estruturação da variabilidade genética dos bandos, com um F_{st} igual a 0,081 ($p=0,07$). Uma análise de coordenadas principais confirma esses resultados, sugerindo que a espécie tende a formar bandos que podem ser unidades reprodutivas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Visando orientações de manejo e reprodução em criadouros de espécies silvestres, este trabalho objetivou caracterizar a variabilidade genética em nível molecular das espécies *Tayassu tajacu* (cateto) e *Tayassu pecari* (queixada) criadas em cativeiro utilizando marcadores moleculares microssatélites.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar os locos microssatélites quanto ao tamanho das regiões de amplificação;
- Determinar os locos polimórficos, freqüências alélicas e genotípicas;
- Determinar os valores da Heterozigose Observada e Heterozigose Esperada e Conteúdo de Informações Polimórficas (PIC);
- Verificar os valores de PEC (Probabilidade de Exclusão Combinada) com a finalidade de determinação de paternidade;
- Analisar a estrutura populacional e fluxo gênico entre elas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

A amostra foi composta por 49 catetos (24 machos e 25 fêmeas) e 25 queixadas (16 machos e 9 fêmeas), todos criados em cativeiro. Deste total, 12 catetos foram coletados no criadouro da Fazenda da Praia, localizada no município de Tibagi, Paraná (BR 376, Km 454), cinco catetos e 14 queixadas no Parque Municipal das Araucárias, na cidade de Guarapuava, Paraná e 32 catetos e 11 queixadas na Fazenda Experimental Gralha Azul (PUC-PR), localizada no município de Fazenda Rio Grande, região metropolitana de Curitiba (tabela 1).

TABELA 1 – ESPÉCIES, NÚMERO DE INDIVÍDUOS, SEXO E LOCALIDADES DOS EXEMPLARES DE PORCOS-DO-MATO

TAXA	MACHOS	FÊMEAS	TOTAL	LOCALIDADE
<i>Tayassu tajacu</i>	7	5	12	Tibagi/PR
	3	2	5	Guarapuava/PR
	14	18	32	Fazenda Rio Grande/PR
<i>Tayassu pecari</i>	11	3	14	Guarapuava/PR
	5	6	11	Fazenda Rio Grande/PR

De cada animal foi coletado aproximadamente 3 mL de sangue em seringa esterilizada contendo o anticoagulante EDTA. Após a coleta, o sangue foi armazenado a -20°C em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Animal, no Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA das amostras coletadas foi realizada através do método *salting out*, segundo o protocolo descrito por MEDRANO, AESEN e SHARROW (1990), que consistiu em:

- colocar 300 a 400 μL de sangue em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL;
- adicionar 800 μL de STE (NaCl 5 M, Tris 1 M; EDTA 0,5 M) e centrifugar durante 5 minutos a 8000 rpm;

- descartar o sobrenadante, adicionar 800 μL de STE com 11 μL de TRITON e centrifugar durante 5 minutos a 8000 rpm;
- descartar o sobrenadante, adicionar 500 μL de STE e centrifugar durante 5 minutos a 8000 rpm;
- retirar bem o STE e adicionar na seqüência:
- 550 μL solução de lise (NaCl 100 mM, Tris 50 mM, EDTA 50 mM, pH=8,0), 27,5 μL de SDS 20%, 2,5 μL de β -mercaptofenol 2%, 11 μL de proteinase K e agitar;
- colocar em banho-maria a 55°C por 2 horas, adicionando-se 5,5 μL de RNase-A uma hora antes de tirar os tubos do banho-maria;
- retirar do banho-maria, adicionar 600 μL de NaCl a 5 M e passar no agitador por 20 segundos;
- centrifugar por 30 minutos a 13000 rpm e transferir o sobrenadante para três tubos de microcentrífuga de 1,5 mL deixando 390 μL do material em cada tubo;
- adicionar 700 μL de etanol absoluto e gelado (-20°C) em cada tubo e deixar *overnight*, em geladeira a 4°C;
- centrifugar por 30 minutos a 13000 rpm;
- descartar o sobrenadante e lavar o DNA com 700 μL de etanol a 70%;
- centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm, descartando o sobrenadante;
- repetir as duas etapas anteriores;
- descartar o sobrenadante e inverter o tubo aberto em papel absorvente para retirar todo o etanol;
- colocar os tubos em estufa a 37°C por 30 minutos;
- adicionar 30 μL de TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH=8,0) e deixar em banho-maria a 37°C por 30 minutos para que o DNA fique em suspensão;
- juntar a suspensão de DNA em um único tubo de microcentrífuga e estocar a -20°C.

3.3 QUANTIFICAÇÃO E TESTE DE QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO

A integridade das moléculas de DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 1X (Tris 0,089 M, ácido bórico 0,089 M e EDTA 0,5 M), por 30 minutos a 3 V/cm, com aplicação de 3 a 5 μL de DNA total com 1 μL de azul

de bromofenol 3%. A detecção de bandas de alto peso molecular foi evidenciada através de coloração com brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ em água destilada durante 15 minutos (solução estoque 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e visualizadas sob luz UV.

As amostras que apresentaram banda de alto peso molecular foram quantificadas em espectrofotômetro (Gene Quant pro, Amersham Pharmacia Biotech), para verificação de densidade ótica em $\text{ng}/\mu\text{L}$. A espectrofotometria de massa mostrou uma boa quantidade de DNA extraído, sendo que as amostras iniciais de DNA apresentaram concentrações semelhantes e em quantidade suficiente (cerca de 80 $\text{ng}/\mu\text{L}$). As amostras de DNA foram estocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e armazenadas em geladeira à temperatura de 4°C, até o momento da diluição.

3.4 DILUIÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

As amostras iniciais de DNA foram diluídas em água Mili-Q autoclavada a fim de se obter amostras de DNA de trabalho, de concentração aproximada de 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Após diluição, as amostras de DNA foram estocadas em tubos de microcentrífuga de 0,6 mL e armazenadas a -20°C, até o momento da amplificação.

3.5 REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS LOCOS MICROSSATÉLITES

Dos 17 oligonucleotídeos iniciadores de porco doméstico (*Sus scrofa domestica*) escolhidos para a realização deste trabalho conseguiu-se, após vários testes, padronizar as condições de amplificação, tanto para *T. tajacu* quanto para *T. pecari*, para seis deles: SW1408, SW1407, SW857, SW2411, ACTG2 e SW444. Os demais locos foram descartados ou por não apresentarem um padrão de bandas que permitisse identificar a região microssatélite de interesse (S0008, SW2435, SWR1928 e S0086) ou por não ter havido tempo hábil para testá-los (SW378, SW1416, SW335, CGA, IGF-1, TNFB e ALOX12A).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente trabalho foram objetos de dois processos distintos de escolhas. Um deles, envolvendo quatro pares de iniciadores (tabela 2), teve por base comparações de bandeamento cromossômico

G, utilizando-se os de *T. tajacu* (cateto), *T. pecari* (queixada) e *Sus scrofa scrofa* (javali) e identificadas as regiões de homeologia entre eles. Por ser uma subespécie do porco doméstico, o javali possui o cariótipo muito semelhante ao do suíno doméstico permitindo, portanto, este tipo de comparação. O material cromossômico das duas espécies de porcos-do-mato faz parte da amostra do presente trabalho, enquanto que a do javali é do acervo do Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Uma vez determinada esta homeologia, recorreu-se a um banco de dados localizado no endereço eletrônico <http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/panel.htm> (2003), no qual encontram-se as distribuições dos microssatélites ao longo do genoma do porco doméstico e escolheram-se os pares de iniciadores microssatélites localizados nos cromossomos que correspondiam às regiões homeólogas determinadas. Com este tipo de escolha, aumentam-se as chances de amplificação positiva nas duas espécies de taiassuídeos em estudo.

TABELA 2 – SEQÜÊNCIA DOS QUATRO LOCOS MICROSSATÉLITES ESCOLHIDOS ATRAVÉS DE COMPARAÇÕES DE BANDAS G – REGIÕES HOMEÓLOGAS – ENTRE *Sus scrofa scrofa* (javali), *Tayassu tajacu* E *Tayassu pecari* E LOCALIZAÇÃO NOS CROMOSSOMOS DE *Sus scrofa domestica*

LOCO	SEQÜÊNCIA DO INICIADOR	CROMOSSOMO
SW1408	Primer F: CAGCCCTGTCACTTGAGTAGC Primer R: TTCTGCTCTACAGCAAAGCG	2
SW1407	Primer F: AGCCACTAGGGAAC TTCAAATG Primer R: CCCACTTTTTCTCTCAAGCTG	13
SW857	Primer F: TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC Primer R: GATCCTCCTCCAAATCCCAT	14
SW2411	Primer F: CCTGGACTCATTCTTGCTTTG Primer R: TTCCTATTCTGTCCTGCCTTG	16

NOTA: Primer F = primer forward; Primer R = primer reverse

Pelo outro procedimento de escolha, os dois pares de oligonucleotídeos iniciadores restantes, também de porco doméstico, teve por base os iniciadores utilizados por GONELA (2003) em *T. pecari* (tabela 3).

TABELA 3 – SEQÜÊNCIA DOS DOIS LOCOS MICROSSATÉLITES UTILIZADOS POR GONELA (2003) E LOCALIZAÇÃO NOS CROMOSSOMOS DE *Sus scrofa domestica*

LOCO	SEQÜÊNCIA DO INICIADOR	CROMOSSOMO
ACTG2	<i>Primer F:</i> CATCTTCCTCTTCCCTTCCC <i>Primer R:</i> TGTGGACTCAAGGCTGTAAGC	3
SW444	<i>Primer F:</i> ATAGTTTCGGTTGGCCAG <i>Primer R:</i> CTTAAGCCTCAAGCTAACAGGC	8

As condições de amplificação de cada loco foram as mesmas para as duas espécies. Para todos os locos, a reação de amplificação foi feita em um volume final de 15 µL utilizando-se 1,0 µM de cada iniciador (*primer*); 1X Tampão Sulfato (670 mM Tris-HCl pH=8,8; 160 mM (NH₄)₂SO₄; Tween 0,1% (p/v)); 200 µM de cada dNTP e 0,75 U de *Taq* DNA polimerase. A concentração de Cloreto de Magnésio, a quantidade de DNA e a temperatura de hibridação dos iniciadores variaram conforme o loco (tabela 4). Em três deles (SW1407, SW857 e SW2411) as condições de amplificação consistiram de cinco passos: (1) desnaturação inicial da fita dupla a 95°C por 5 minutos; (2) desnaturação a 95°C por 30 segundos; (3) hibridação dos iniciadores entre 58°C e 62°C, dependendo da constituição dos mesmos, por 40 segundos; (4) extensão a 72°C por 40 segundos e (5) extensão final a 72°C por 10 minutos. Os passos 2, 3 e 4, constituem um ciclo, que foi repetido por 35 vezes. Já para os locos SW1408, ACTG2 e SW444 houve a necessidade de submetê-los a decréscimos de temperatura de hibridação denominado *touchdown* que consiste nos seguintes passos: (1) desnaturação inicial da fita dupla a 94°C por 5 minutos; (2) desnaturação a 94°C por 30 segundos; (3) hibridação do iniciador de 62°C a 54°C diminuindo um grau a cada ciclo até chegar em 54°C, por 30 segundos; (4) extensão a 72°C por 40 segundos. Os passos 2, 3 e 4 são repetidos 22 vezes após atingida a temperatura de 54°C e (5) extensão final a 72°C por 10 minutos.

Durante a realização das amplificações, tomou-se o cuidado de sempre amplificar juntamente com as amostras de *T. tajacu* e *T. pecari* um exemplar de *Sus scrofa domestica* para controle positivo da reação.

TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE MAGNÉSIO (MgCl₂), QUANTIDADE DE DNA E TEMPERATURA DE HIBRIDAÇÃO DOS INICIADORES UTILIZADAS PARA OS DIFERENTES LOCOS

Loco	MgCl ₂ (mM)	DNA (ng)	T°C
SW1408	3,0	100	62 a 54
SW1407	1,5	50	60
SW857	1,5	60	62
SW2411	3,0	50	58
ACTG2	2,0	50	62 a 54
SW444	2,0	100	62 a 54

Os seis locos microssatélites padronizados amplificaram em toda a amostra de *T. tajacu* e *T. pecari*, exceto os locos SW1408 e SW2411 que não amplificaram em 12% e 2%, respectivamente, na amostra de *T. tajacu*. Em ambos os casos foram feitas repetições aumentando-se a quantidade de DNA na reação. Esta falha na amplificação provavelmente se deve à baixa qualidade/quantidade de DNA extraído destes indivíduos.

Comparando-se as condições de amplificação obtidas para catetos e queixadas com as descritas na literatura para porco doméstico, observou-se que as temperaturas de hibridação foram idênticas nas três espécies para os locos SW1407 (60°C) e SW2411 (58°C); aumentou em dois graus para o loco SW857 em catetos e queixadas e para os demais locos, que foram submetidos à reação *touchdown*, as temperaturas descritas para porco doméstico estiveram presentes (60°C para o loco SW1408, 58°C para o loco ACTG2 e 60°C para o loco SW444).

3.6 VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poli-acrilamida, a fim de determinar a qualidade do produto gerado em cada indivíduo e, posteriormente, para tipagem dos locos microssatélites. Para tais finalidades, foi utilizado gel de poli-acrilamida nativo (não desnaturante) 10% em placas de 23 cm X 25 cm.

Após a polimerização, os poços foram lavados com água destilada para retirar o excesso de solução não polimerizada de poli-acrilamida. Na seqüência, o gel foi fixado em cuba vertical contendo tampão TBE 1X e os produtos de amplificação

foram aplicados juntamente com corante azul de bromofenol, na proporção de 7 μ L de produto de PCR para 5 μ L de corante. A eletroforese foi realizada durante 4 horas a 300 V e 40 mA.

Terminada a eletroforese, o gel foi fixado em solução de etanol 10% e ácido acético 0,5% por 3 minutos e, em seguida, impregnado em solução de nitrato de prata 0,2%. Após esta etapa, o gel foi revelado em solução de hidróxido de sódio 2,75% e formaldeído 1% e fixado novamente em solução fixadora por 5 minutos. Após este processo, o gel foi conservado entre folhas de papel celofane (TEGELSTROM, 1992, com modificações).

O tamanho dos alelos foi determinado pela comparação com marcador de peso molecular (Ladder) de 25 pb (Invitrogen).

3.7 ANÁLISE DOS DADOS

A partir do padrão de bandas obtido para cada loco de microssatélites foram calculados os índices de diversidade em cada população estudada. A variabilidade genética foi estimada através de uma estatística descritiva que determinou o número de locos polimórficos, número de alelos por loco, heterozigose observada (H_o) e esperada (H_e) através do programa GDA (Genetic Data Analysis, LEWIS e ZAYKIN, 2001). A heterozigose observada (H_o) é uma medida da variabilidade genética das populações e reflete a quantidade de indivíduos heterozigotos para um determinado loco. A heterozigose esperada (H_e) é a medida que reflete a quantidade de indivíduos heterozigotos que é esperada de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para testar os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg em cada loco nas duas espécies de porcos-do-mato, foi utilizado o teste exato de Fisher, através do método de embaralhamento de alelos (20.000 *shufflings*) utilizando o programa GDA (LEWIS e ZAYKIN, 2001).

Para determinar a diferenciação entre as populações e entre as espécies foi usada a estatística F (WRIGHT, 1951) através da estimativa F_{st} (WEIR e COCKERHAM, 1984) a partir da Análise da Variância Molecular, AMOVA (EXCOFFIER, SMOUSE e QUATTRO, 1992), utilizando o Programa ARLEQUIN 2.1 (SCHNEIDER et al., 2000). A análise dos valores de F_{st} foi feita considerando-se a

classificação de NEI (1978) *apud* GIACOMONI (2002) onde: valores de F_{st} menores que 0,05 são considerados baixos, entre 0,05 e 0,15 são médios e maiores que 0,15 são considerados altos, indicando estruturação populacional baixa, média e alta, respectivamente. Para avaliar o efeito do endocruzamento sobre os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi calculado o F_{is} (WRIGHT, 1951) utilizando o programa GDA (LEWIS e ZAYKIN, 2001), sendo este programa também utilizado para o cálculo da distância genética entre populações (NEI, 1972) e das frequências alélicas. Com o auxílio do programa NTSYSpc 2.1 (RHOLF, 2000) os valores das distâncias foram utilizados na construção de um dendrograma, empregando-se o método UPGMA (SNEATH e SOKAL, 1973), bem como os valores da correlação cofenética. A confiabilidade dos nós foi testada a partir do procedimento de reamostragem (10000 *bootstraps*) através do programa BOOD 3.03 (COELHO, 2000).

O conteúdo de informações polimórficas (PIC) para um determinado marcador refere-se à parcela da progênie na qual é possível determinar, exatamente, de qual progenitor os alelos provieram. O PIC é dependente do número de alelos por loco e da distribuição das frequências desses alelos na amostra. De acordo com BOTSTEIN et al. (1980) os valores de PIC são classificados em três níveis: a) altamente informativo ($PIC > 0,5$); b) moderadamente informativo ($0,5 > PIC > 0,25$) e c) pouco informativo ($PIC < 0,25$).

Os alelos nulos são originados por uma mutação no sítio de hibridação de pelo menos um dos oligonucleotídeos iniciadores do microssatélite a ser amplificado. Este fato leva à detecção de um excesso de aparentes homozigotos, resultando em estimativas incorretas de frequências alélicas, superestimando coeficientes de endocruzamento. A frequência estimada de alelos nulos é calculada usando um algoritmo iterativo baseado na diferença entre homozigotos esperados e observados (SUMMERS e AMOS, 1997 *apud* MARSHALL et al., 1998). Segundo MARSHALL et al. (1998), na ausência do alelo nulo, a frequência estimada será próxima de zero ou até mesmo negativa.

A probabilidade de exclusão (PE) representa a probabilidade de um animal, aleatoriamente escolhido, não ser o pai/mãe de um determinado filhote. A PE é dependente do número de alelos por loco e da distribuição das frequências desses alelos na amostra. A PE 1 é a probabilidade de exclusão quando não se conhece os

pais e a PE 2 é a probabilidade de exclusão quando um dos pais é conhecido. Já a probabilidade de exclusão combinada (PEC) representa a probabilidade de, através de um conjunto de locos, excluir um animal aleatoriamente escolhido, da paternidade/maternidade de um filhote (CURI, 2000).

O conteúdo de informações polimórficas (PIC), a frequência estimada de alelos nulos e as probabilidades de exclusão de paternidade foram calculados utilizando o programa CERVUS 2.0 (MARSHALL et al., 1998).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCOS MICROSSATÉLITES

4.1.1 Regiões de Amplificação

O tamanho dos fragmentos amplificados dos seis locos microssatélites em *Tayassu tajacu* e *Tayassu pecari* são evidenciados na tabela 5, na qual contém, além destes, dados da literatura referentes aos tamanhos de fragmentos em *Sus scrofa domestica*.

TABELA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE O TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS EM PARES DE BASE ENCONTRADOS EM *Sus scrofa domestica*, *Tayassu tajacu* E *Tayassu pecari*

LOCO	TAMANHO DOS FRAGMENTOS ENCONTRADOS (pb)		
	<i>Sus scrofa domestica</i> (a)	<i>T. tajacu</i> (b)	<i>T. pecari</i> (b)
SW1408	179 – 189	124 – 158	130 – 138
SW1407	138 – 178	112	114
SW857	145 – 159	128 – 156	130 – 140
SW2411	194 – 216	189 – 207	186 – 228
ACTG2	109 – 142	120 – 162	118 – 134
SW444	92 – 124	103 – 115	98 – 106

FONTES: <http://www.animalgenome.org/pig.html>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

NOTAS: a) dados da literatura; b) dados do presente trabalho.

Em *T. tajacu*, analisando os seis locos, foram encontrados 52 alelos variando de 103pb (SW444) a 207pb (SW2411). Já em *T. pecari*, foram encontrados 30 alelos diferentes, variando de 98pb (SW444) a 228pb (SW2411).

4.1.2 Locos Polimórficos, Frequências Alélicas e Genotípicas

4.1.2.1 Locos polimórficos

A análise dos seis marcadores para verificar a variabilidade genética nas duas espécies de porcos-do-mato, revelou as presenças de um loco monomórfico

(SW1407) e cinco polimórficos (83%) em ambas. O monomórfico apresentou fragmentos de 112pb em *T. tajacu* e 114pb em *T. pecari* (Anexo 2).

Na tabela 6 observa-se, considerando-se apenas os locos polimórficos, que a amostra de *T. tajacu* apresentou 51 alelos e *T. pecari*, 29.

TABELA 6 – LOCOS POLIMÓRFICOS, NÚMERO DE ALELOS E AMOSTRA ANALISADA NAS DUAS ESPÉCIES DE PORCOS-DO-MATO

LOCOS	N°DE ALELOS		N (AMOSTRA)	
	<i>T. tajacu</i>	<i>T. pecari</i>	<i>T. tajacu</i>	<i>T. pecari</i>
SW1408	11	4	43	25
SW857	13	5	49	25
SW2411	4	10	48	25
ACTG2	16	7	49	25
SW444	7	3	49	25
TOTAL	51	29		

4.1.2.2 Frequências alélicas e genotípicas

a) Loco SW1408

A distribuição das frequências alélicas neste loco (tabela 7) foi mais homogênea em catetos (0,0116 a 0,2326) que em queixadas (0,04 a 0,56), havendo uma tendência à fixação do alelo de 132pb em queixadas. Em catetos, os genótipos mais frequentes foram 126/126pb e 158/158pb (gráfico 1) e, em queixadas, 132/132pb (gráfico 2). Um fato interessante observado foi o compartilhamento dos alelos de 130pb, 132pb e 136pb deste loco entre as duas espécies de porcos-do-mato. Alguns padrões de bandas deste loco em *T. tajacu* e *T. pecari* são apresentados no Anexo 2.

TABELA 7 – LOCO SW1408 – ALELOS E SUAS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS EM *T. tajacu* E *T. pecari*

ALELOS (pb)	<i>T. tajacu</i>	<i>T. pecari</i>
124	0,0930	
126	0,2326	
128	0,0116	
130	0,0814	0,2800
132	0,1279	0,5600
134	0,1395	
136	0,0116	0,0400
138		0,1200
150	0,0233	
154	0,0814	
156	0,0233	
158	0,1744	

GRÁFICO 1 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW1408 EM *T. tajacu*

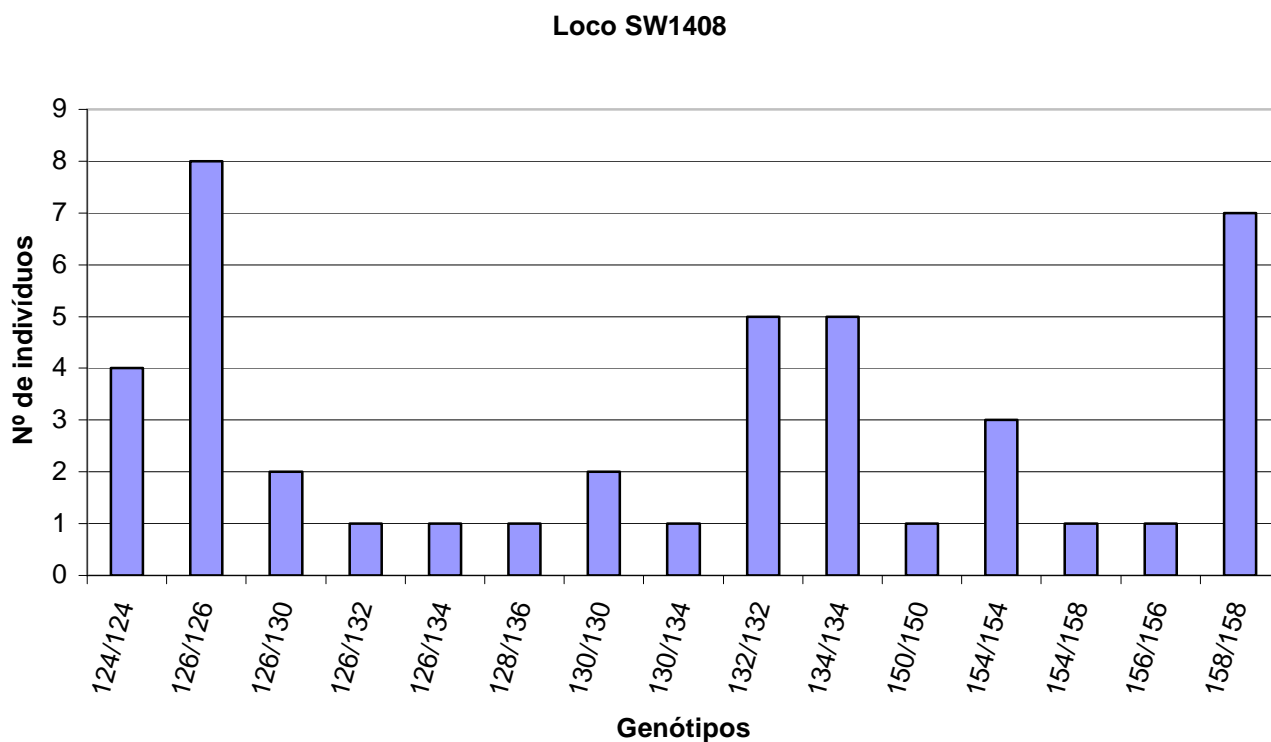
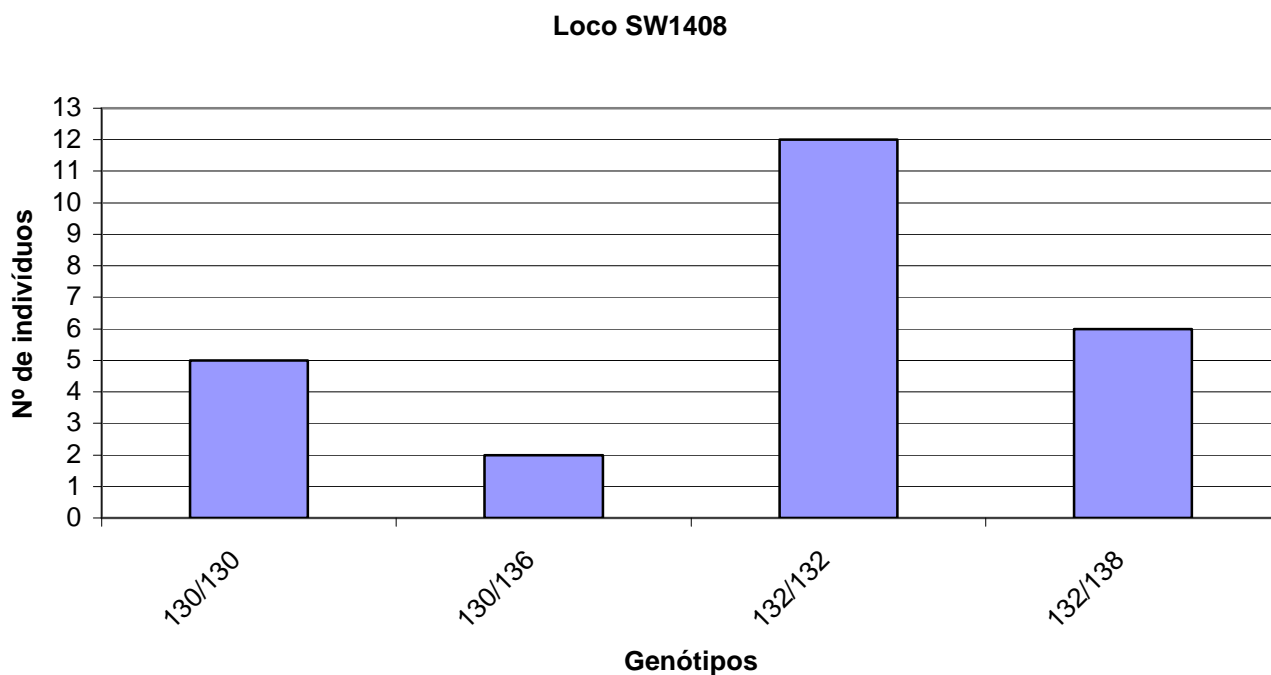


GRÁFICO 2 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW1408 EM *T. pecari*



b) Loco SW857

Este loco apresentou distribuição das freqüências alélicas (tabela 8) mais homogênea em catetos (0,0102 a 0,2347) que em queixadas (0,04 a 0,36), não havendo tendência à fixação de nenhum deles. Em catetos, os genótipos mais freqüentes foram 130/152pb, 144/144pb e 144/148pb (gráfico 3) e, em queixadas, 130/130pb (gráfico 4). Um fato interessante observado foi o compartilhamento dos alelos de 130pb, 136pb e 140pb deste loco entre as duas espécies de porcos-do-mato. Alguns padrões de bandas deste loco em *T. tajacu* e *T. pecari* são apresentados no Anexo 2.

TABELA 8 – LOCO SW857 – ALELOS E SUAS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS EM *T. tajacu* E *T. pecari*

ALELOS (pb)	<i>T. tajacu</i>	<i>T. pecari</i>
128	0,0204	
130	0,0918	0,3600
132		0,3000
134		0,1800
136	0,0612	0,1200
138	0,0204	
140	0,0612	0,0400
142	0,0612	
144	0,2347	
146	0,0816	
148	0,0918	
150	0,1327	
152	0,1020	
154	0,0306	
156	0,0102	

GRÁFICO 3 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW857 EM *T. tajacu*

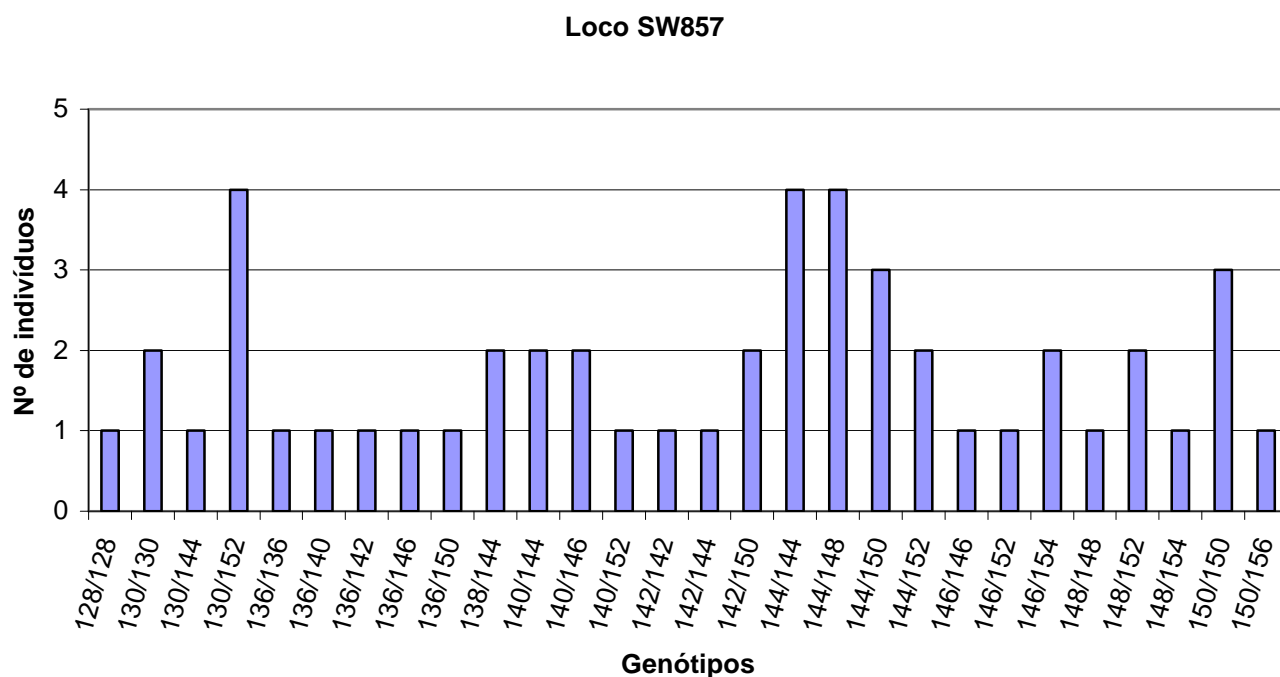
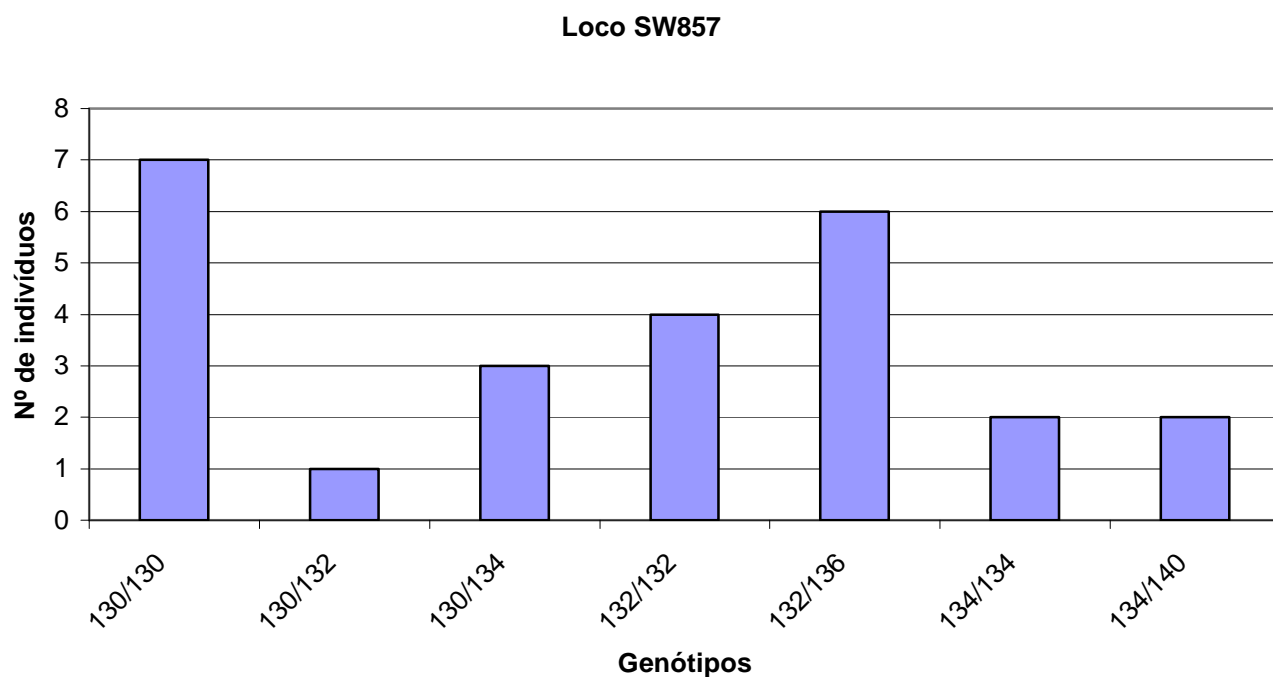


GRÁFICO 4 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW857 EM *T. pecari*



c) Loco SW2411

A distribuição das freqüências alélicas observadas neste loco (tabela 9) foi mais homogênea em queixadas (0,02 a 0,22) que em catetos (0,0208 a 0,5833), havendo tendência à fixação do alelo de 207pb. Em catetos, o genótipo mais freqüente foi 207/207pb (gráfico 5) e, em queixadas, 222/222pb (gráfico 6). Alguns padrões de bandas deste loco em *T. tajacu* e *T. pecari* são apresentados no Anexo 2.

TABELA 9 – LOCO SW2411 – ALELOS E SUAS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS EM *T. tajacu* E *T. pecari*

ALELOS (pb)	<i>T. tajacu</i>	<i>T. pecari</i>
186		0,0400
188		0,2000
189	0,0208	
196		0,0800
198		0,1400
200		0,1200
203	0,1250	
205	0,2708	
207	0,5833	
212		0,0200
220		0,0600
222		0,2200
224		0,1000
228		0,0200

GRÁFICO 5 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW2411 EM *T. tajacu*

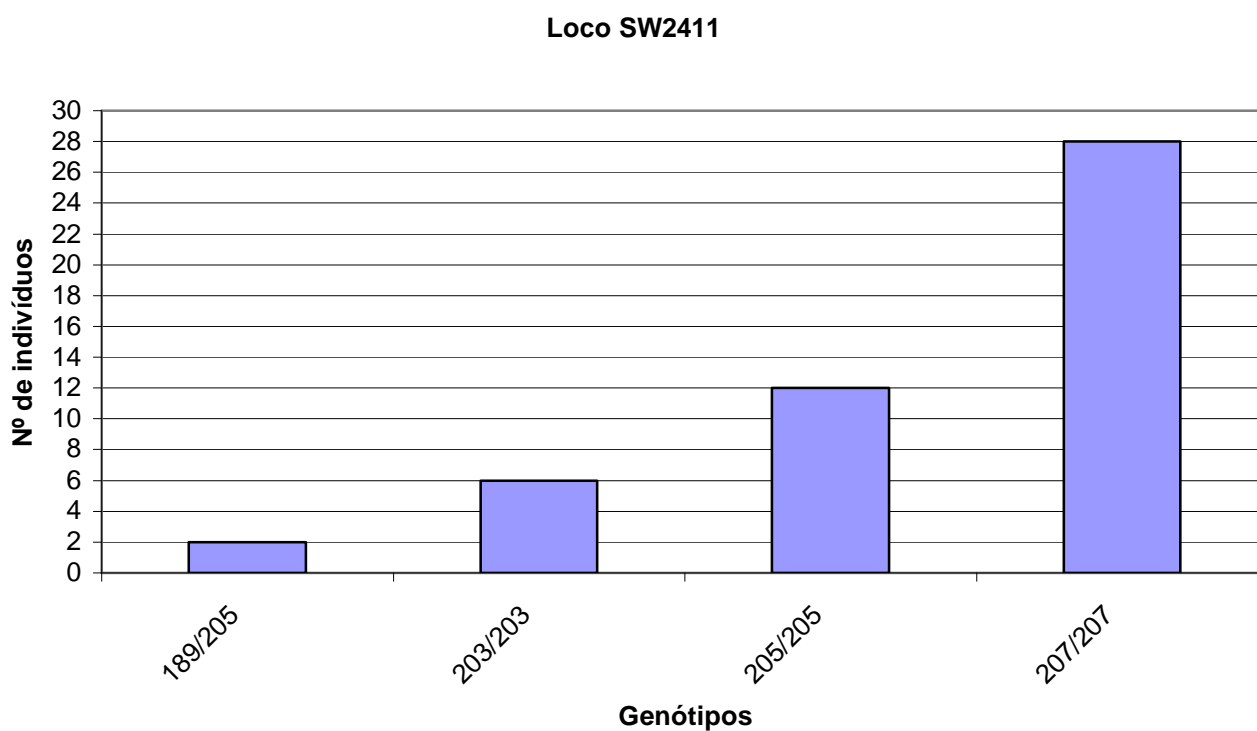
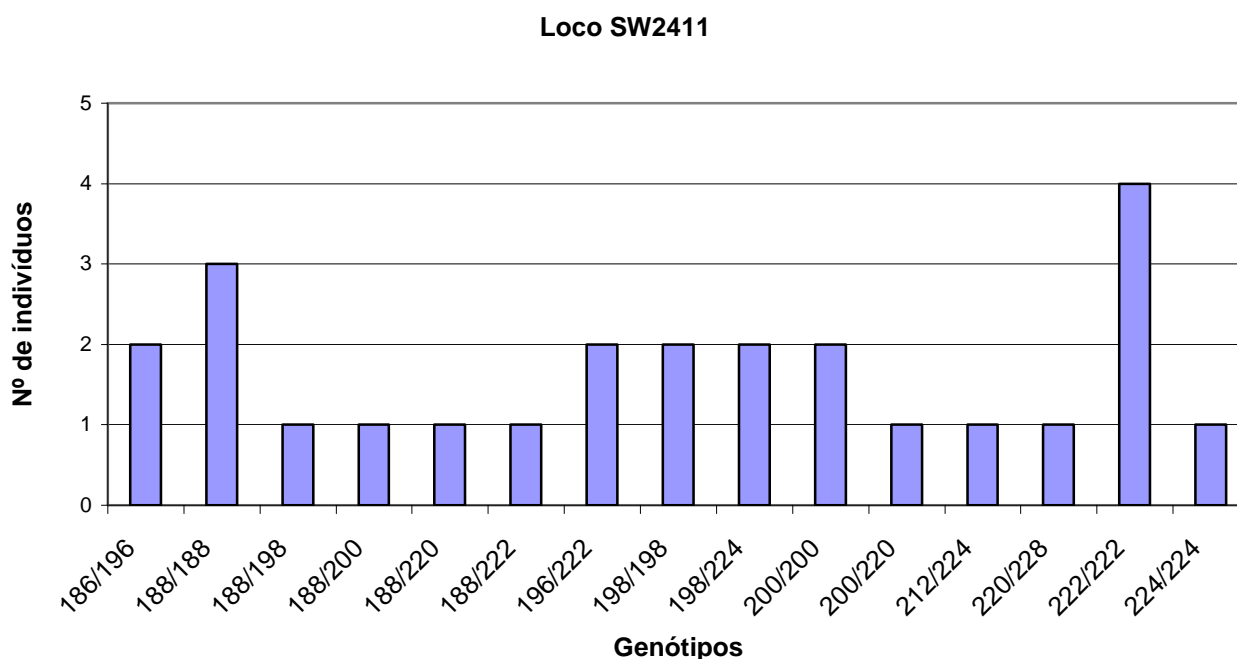


GRÁFICO 6 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW2411 EM *T. pecari*



d) Loco ACTG2

Este loco apresentou distribuição das freqüências alélicas (tabela 10) mais homogênea em catetos (0,0102 a 0,1633) que em queixadas (0,2 a 0,66), sendo que o alelo de 130pb tendeu à fixação em queixadas. Em catetos o genótipo mais freqüente foi 120/120pb (gráfico 7) e, em queixadas, 130/130pb (gráfico 8). Um fato interessante observado foi o compartilhamento dos alelos de 120pb, 132pb e 134pb deste loco entre as duas espécies de porcos-do-mato. Alguns padrões de bandas deste loco em *T. tajacu* e *T. pecari* são apresentados no Anexo 2.

TABELA 10 – LOCO ACTG2 – ALELOS E SUAS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS EM *T. tajacu* E *T. pecari*

ALELOS (pb)	<i>T. tajacu</i>	<i>T. pecari</i>
118		0,0200
120	0,1633	0,1400
122		0,0800
124		0,0400
130		0,6600
132	0,0306	0,0400
134	0,0102	0,0200
138	0,0816	
140	0,0204	
142	0,0918	
144	0,0102	
146	0,0408	
148	0,0306	
150	0,0612	
152	0,1224	
154	0,0408	
156	0,1020	
158	0,0714	
160	0,0306	
162	0,0918	

GRÁFICO 7 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO ACTG2 EM *T. tajacu*

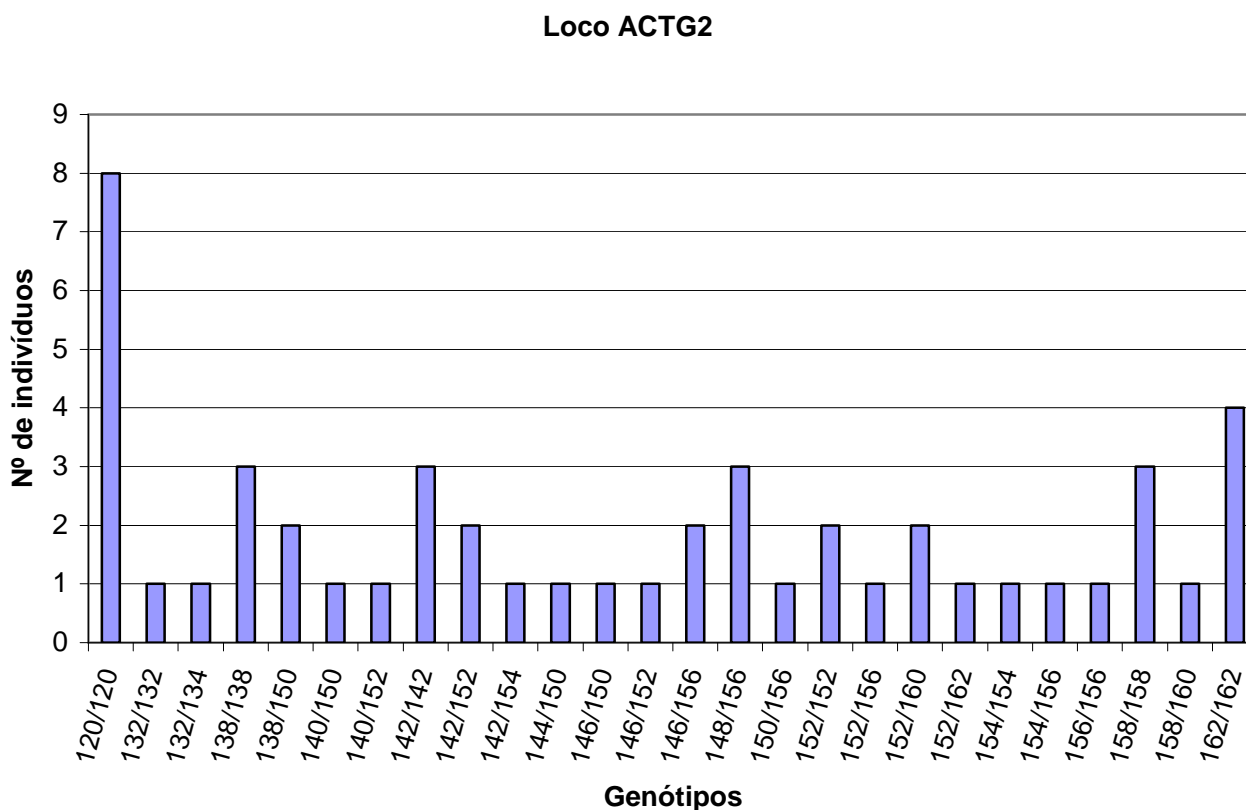
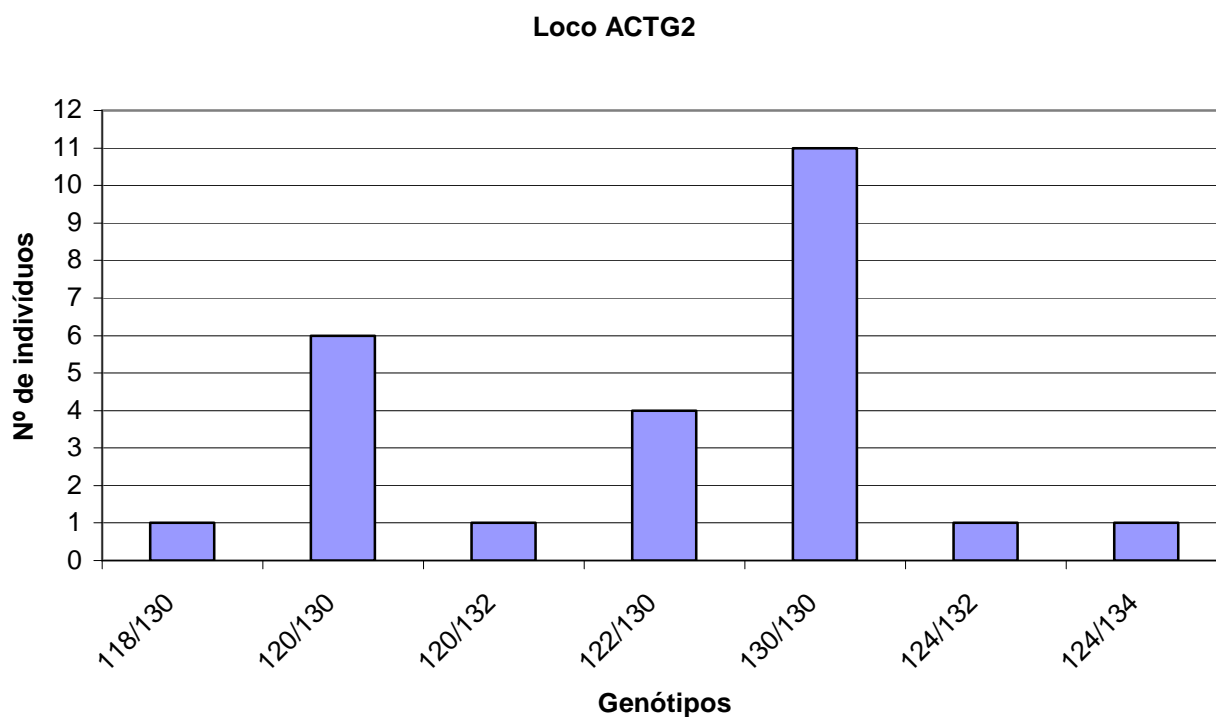


GRÁFICO 8 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO ACTG2 EM *T. pecari*



e) Loco SW444

A distribuição das freqüências alélicas observadas neste loco (tabela 11) foi mais homogênea em queixadas (0,16 a 0,56), com tendência à fixação do alelo de 98pb, que em catetos (0,0204 a 0,5918), havendo tendência à fixação do alelo de 107pb. Em catetos, o genótipo mais freqüente foi 107/107pb (gráfico 9) e, em queixadas, 98/98pb (gráfico 10). Alguns padrões de bandas deste loco em *T. tajacu* e *T. pecari* são apresentados no Anexo 2.

TABELA 11 – LOCO SW444 – ALELOS E SUAS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS EM *T. tajacu* E *T. pecari*

ALELOS (pb)	<i>T. tajacu</i>	<i>T. pecari</i>
98		0,5600
100		0,2800
103	0,1531	
105	0,1327	
106		0,1600
107	0,5918	
109	0,0408	
111	0,0408	
113	0,0204	
115	0,0204	

GRÁFICO 9 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW444 EM *T. tajacu*

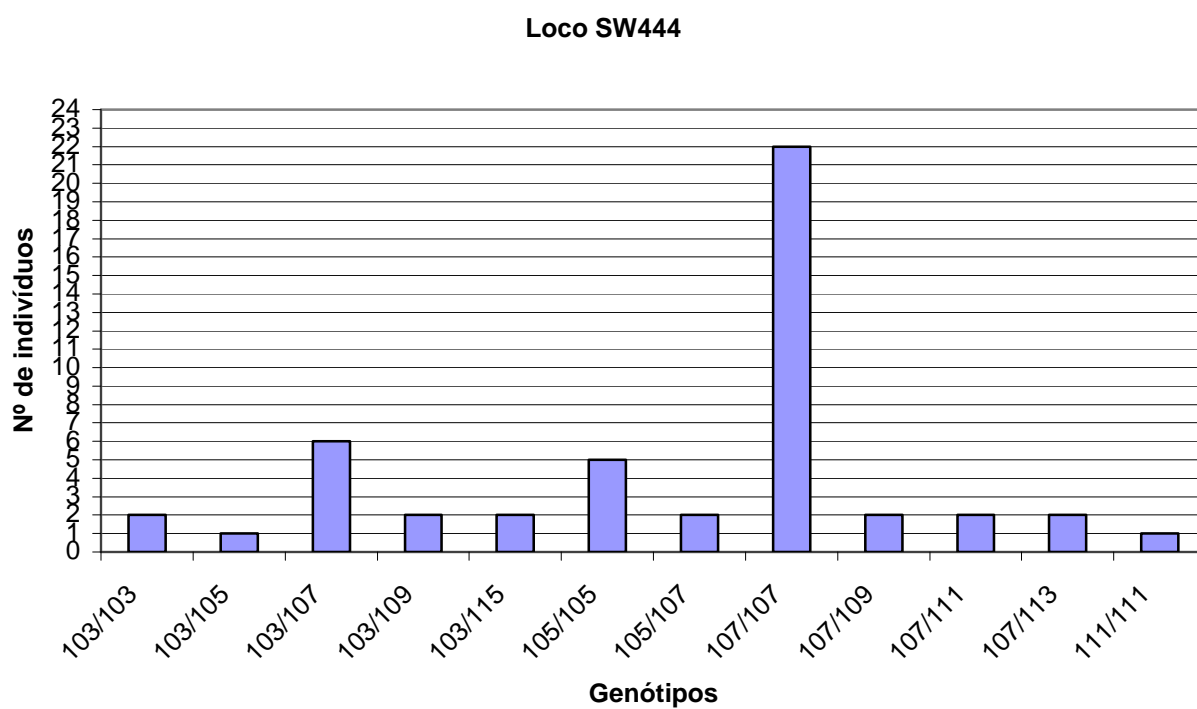
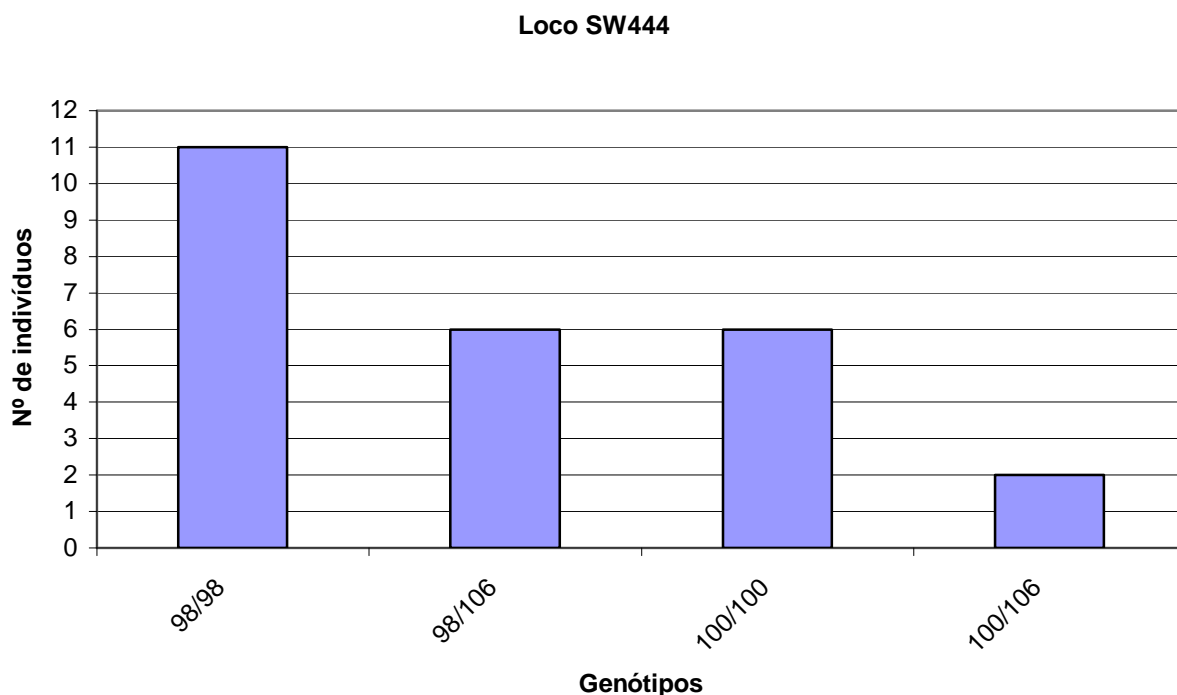


GRÁFICO 10 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS NO LOCO SW444 EM *T. pecari*



4.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA EM *Tayassu tajacu* E *Tayassu pecari*

4.2.1 Heterozigose Observada e Heterozigose Esperada

Os valores das heterozigoses observada (H_o), esperada (H_e), valores de p e os valores médios para todos os locos em *T. tajacu* são apresentados na tabela 12. Em *T. tajacu*, os valores da heterozigose observada foram significativamente menores que a esperada em todos os locos, sendo que em *T. pecari* somente o loco ACTG2 apresentou heterozigose observada maior que a esperada.

TABELA 12 – HETEROZIGOSE OBSERVADA (H_o) E HETEROZIGOSE ESPERADA (H_e) E VALORES DE p EM *T. tajacu* E *T. pecari*

LOCO	<i>Tayassu tajacu</i>			<i>Tayassu pecari</i>		
	H_o	H_e	p	H_o	H_e	p
SW1408	0,163	0,866	0,000000	0,320	0,604	0,000000
SW857	0,714	0,889	0,000250	0,480	0,747	0,000000
SW2411	0,042	0,576	0,000000	0,520	0,873	0,000000
ACTG2	0,469	0,918	0,000000	0,560	0,545	0,065000
SW444	0,388	0,611	0,000050	0,320	0,594	0,000050
MÉDIA	0,355	0,772		0,440	0,673	

$p < 0,05$ (significativo)

Estes valores sugerem que, exceto o ACTG2 em queixadas, os demais não estariam em equilíbrio conforme o Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Entretanto, como cada loco é polimórfico o que não é levado em consideração no cálculo da significância (p), então, introduz-se um erro e, através da aplicação o Teste de Bonferroni, este nível de significância é corrigido. Esta correção é feita elevando-se o nível de significância (0,05) ao número de locos considerados (neste caso, 5), sendo o novo valor 0,0000003125. Logo, nos dados acima todos os valores de p ficaram acima do valor de significância, ou seja, são compatíveis à hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4.2.2 Conteúdo de Informações Polimórficas (PIC)

Os valores obtidos relativos ao conteúdo de informações polimórficas (PIC) foram considerados altos nos cinco locos em ambas espécies de porcos-do-mato (tabela 13).

TABELA 13 – VALORES DE PIC PARA CADA LOCO EM *T. tajacu* E *T. pecari*

LOCO	<i>Tayassu tajacu</i>	<i>Tayassu pecari</i>
SW1408	0,840	0,530
SW857	0,870	0,686
SW2411	0,507	0,839
ACTG2	0,902	0,508
SW444	0,572	0,513

4.2.3 Probabilidade de Exclusão de Paternidade (PE) e Probabilidade de Exclusão Combinada

A tabela 14 apresenta as estimativas dos valores das probabilidades de exclusão de paternidade – quando nenhum dos parentais é conhecido (PE 1) e quando um dos parentais é conhecido (PE 2) – em cada loco e em cada uma das espécies de porcos-do-mato. Pode-se verificar que o loco mais informativo foi o ACTG2 em catetos e, SW2411, em queixadas.

As probabilidades de exclusão combinada (PEC) obtidas através dos cinco sistemas em conjunto foram altas em *T. tajacu* (PE 1 e PE 2) e em *T. pecari* (PE 2).

TABELA 14 – PROBABILIDADES DE EXCLUSÕES DE PATERNIDADE (PE 1 E PE 2) E DE EXCLUSÃO COMBINADA (PEC) NAS DUAS ESPÉCIES DE PORCOS-DO-MATO

LOCO	<i>Tayassu tajacu</i>		<i>Tayassu pecari</i>	
	PE 1	PE 2	PE 1	PE 2
SW1408	0,551	0,713	0,184	0,333
SW857	0,615	0,763	0,318	0,493
SW2411	0,168	0,311	0,548	0,711
ACTG2	0,689	0,816	0,164	0,337
SW444	0,214	0,392	0,170	0,310
PEC	0,965	0,995	0,826	0,955

4.2.4 Frequência de Alelos Nulos

A frequência de alelos nulos foi estimada para os cinco locos nas duas espécies de porcos-do-mato e os valores são apresentados na tabela 15.

TABELA 15 – FREQUÊNCIAS ESTIMADAS DE ALELOS NULOS NOS CINCO LOCOS EM *T. tajacu* E *T. pecari*

LOCO	<i>Tayassu tajacu</i>	<i>Tayassu pecari</i>
SW1408	0,6807	0,3144
SW857	0,1032	0,2216
SW2411	0,8675	0,2514
ACTG2	0,3218	-0,0104
SW444	0,2269	0,3028

Em ambas espécies foram observados altos valores estimados de freqüências de alelos nulos, exceto para o loco ACTG2 (em queixadas) que apresentou valor negativo.

4.2.5 Estrutura Populacional

A tabela 16 apresenta os valores de Fst considerando as três amostras populacionais de catetos (Tibagi/PR, Guarapuava/PR e Fazenda Rio Grande/PR) e as duas de queixadas (Guarapuava/PR e Fazenda Rio Grande/PR) em cada loco e os valores totais.

TABELA 16 – VALORES INDIVIDUAIS E TOTAIS DE Fst NAS AMOSTRAS DE *T. tajacu* E *T. pecari*

LOCO	<i>Tayassu tajacu</i>	<i>Tayassu pecari</i>
SW1408	- 0,0032	0,0842
SW857	0,0305	0,1947
SW2411	0,0201	0,1514
ACTG2	0,0666	0,0972
SW444	0,1029	0,1385
TOTAL	0,0420	0,1387

Com os resultados obtidos de Fst, pôde-se observar que, de toda a amostra de catetos e queixadas, os valores de Fst foram 0,042 e 0,1387, respectivamente. Estes valores, para ambas espécies, indicam ausência de estruturação, ou seja, a variabilidade genética se encontra dentro e não entre as amostras populacionais havendo fluxo gênico entre elas. Tendo em vista estes valores, as amostras populacionais, tanto de cateto como queixada, foram reunidas, respectivamente, em uma única amostra para o cálculo das freqüências alélicas, heterozigose observada (H_o), heterozigose esperada (H_e), teste para verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, conteúdo de informações polimórficas (PIC), probabilidades de exclusão de paternidade (PE e PEC), coeficiente de endocruzamento (Fis) e freqüência estimada de alelos nulos.

Os valores de Fis (coeficiente de endocruzamento) de *T. tajacu* e *T. pecari* em todos os locos e os valores totais são apresentados na tabela 17.

TABELA 17 – VALORES INDIVIDUAIS E TOTAIS DE Fis NA AMOSTRA DE *T. tajacu* E *T. pecari*

LOCO	<i>Tayassu tajacu</i>	<i>Tayassu pecari</i>
SW1408	0,8139	0,4754
SW857	0,1985	0,3621
SW2411	0,9284	0,4091
ACTG2	0,4914	-0,0275
SW444	0,3675	0,4667
TOTAL	0,5428	0,3506

Observa-se nesta tabela que, em ambas espécies, os valores de Fis obtidos são muito altos, 0,5 (catetos) e 0,35 (queixadas), exceto no loco ACTG2 em queixadas, com valor negativo.

4.3 COMPARAÇÕES DE ESTRUTURA POPULACIONAL E DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE *T. tajacu* E *T. pecari*

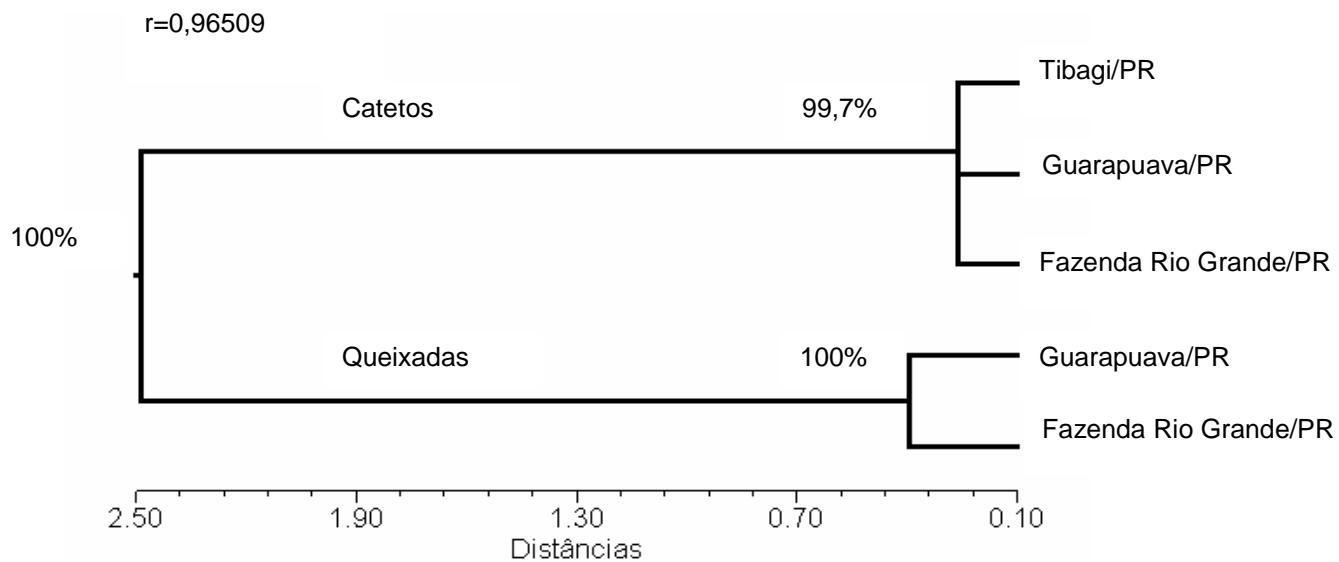
O parâmetro Fst foi estabelecido comparando as duas espécies de porcos-do-mato (tabela 18) observando-se o valor de 0,2086, o que indica estruturação entre as espécies.

TABELA 18 – VALORES DE Fst PARA CADA LOCO CONSIDERANDO AS DUAS ESPÉCIES DE PORCO-DO-MATO

LOCO	Fst
SW1408	0,1291
SW857	0,1424
SW2411	0,2410
ACTG2	0,1982
SW444	0,3408
TOTAL	0,2086

As distâncias genéticas, conforme preconizado por NEI (1972), entre as espécies, mostram uma separação bastante evidente entre elas, sendo o ramo superior o que compõe as populações de catetos e o ramo inferior o que compõe as populações de queixadas (fig. 3).

FIGURA 3 – DENDROGRAMA REPRESENTATIVO DAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE CATETOS E QUEIXADAS. OS NÚMEROS DOS NÓS SÃO OS VALORES DE *BOOTSTRAP* COM 10000 REPLICAÇÕES



2 DISCUSSÃO

A amplificação de regiões microssatélites, utilizando oligonucleotídeos iniciadores de porco doméstico em espécies aparentadas, é extremamente trabalhosa porque, além dos poucos trabalhos existentes na literatura, se tratam de diferentes locos situados em cromossomos diferentes.

Contudo, os microssatélites são marcadores conservados na classe Mammalia (MOORE et al., 1991; SUN e KIRKPATRICK, 1996), principalmente entre espécies mais relacionadas evolutivamente, o que vem a ser uma alternativa que facilita estudos utilizando estes marcadores, através de amplificação heteróloga. A maior limitação da tecnologia de microssatélites é a grande demanda de tempo para o desenvolvimento prévio dos oligonucleotídeos iniciadores, o qual envolve várias etapas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Existem vários relatos na literatura que comprovam o sucesso da amplificação heteróloga envolvendo microssatélites, tais como os trabalhos de GEMMELL et al. (1997); SLATE et al. (1998); LOWDEN et al. (2002); GONGORA et al. (2002); GONELA (2003) e LAU et al. (2004). Em todos estes, houve mais de 50% de eficiência na amplificação. Porém, mesmo com as dificuldades inerentes à amplificação heteróloga, estima-se que com os dados publicados de locos microssatélites, desenvolvidos através de uma variedade de projetos genoma, seria possível estudar mais de 30% de todas as espécies de mamíferos (ENGEL et al., 1996).

Essa eficiência na amplificação se repetiu nos seis locos analisados no presente trabalho, confirmando os achados de GONGORA et al. (2002) e LOWDEN et al. (2002) para o loco SW857 em *Tayassu tajacu* (cateto) e de GONELA (2003) para os locos ACTG2 e SW444 em *Tayassu pecari* (queixada). Além destes, os resultados aqui apresentados com os locos SW1407, SW1408 e SW2411 em catetos e queixadas, SW857 em queixadas e ACTG2 e SW444 em catetos, são relatos inéditos na literatura.

Estimativas do tempo de divergência entre suínos e taiassuídeos datam de 37 milhões de anos (THEIMER e KEIM, 1998), o que é considerado satisfatório para se conseguir uma eficiência de, pelo menos, 50% no caso de amplificação heteróloga. Provavelmente este tempo de divergência permitiu a utilização de iniciadores desenvolvidos para porco doméstico com bons resultados (GONELA, 2003), devido

à constatação da eficiência da amplificação destes nas duas espécies de taiassuídeos aqui estudadas.

No presente trabalho, dos seis locos analisados, tanto em *T. tajacu* quanto em *T. pecari*, cinco foram polimórficos (SW1408, SW857, SW2411, ACTG2 e SW444) e um monomórfico (SW1407).

Em *T. tajacu*, comparativamente ao porco doméstico, houve uma redução no tamanho dos fragmentos analisados, exceção aos locos ACTG2 e SW444, sendo SW1408 o que apresentou a maior redução (55pb considerando o fragmento menor e 31pb considerando o fragmento maior).

Em *T. pecari*, à semelhança em *T. tajacu*, os locos SW1408, SW1407 e SW857 sofreram redução do tamanho dos fragmentos, onde SW1408 apresentou a maior redução (49pb considerando o fragmento menor e 51pb considerando o fragmento maior). Já os demais locos (SW2411, ACTG2 e SW444), apresentaram redução no tamanho dos fragmentos quando comparados ao porco doméstico. Entre *T. tajacu* e *T. pecari*, as amplitudes de tamanho foram menores do que as encontradas entre estas espécies e o porco doméstico.

Com relação ao número de alelos, comparativamente ao porco doméstico (sete em SW1408, onze em SW1407, sete em SW857, quinze em SW2411, nove em ACTG2 e quatorze em SW444 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), somente em *T. pecari* foi observado redução no número de alelos em todos os locos (quatro em SW1408, um em SW1407, cinco em SW857, dez em SW2411, sete em ACTG2 e três em SW444), sendo que em *T. tajacu* esta ocorreu apenas nos locos SW1407, SW2411 e SW444 (um, quatro e sete, respectivamente) e aumento nos demais (onze em SW1408, treze em SW857 e dezesseis em ACTG2). Segundo GONELA (2003), quando se trabalham com iniciadores heterólogos, a redução pode variar de drástica a suave comparativamente à espécie original. Conforme ainda este autor, dos seis locos analisados em *T. pecari*, cinco apresentaram redução de mais de 50% no número de alelos e em um deles, de apenas um alelo, sugerindo, neste caso, duas explicações aos valores observados. Pela primeira, que fala a respeito do comportamento destes animais, onde indivíduos de um bando não cruzam com os de outros, haveria o favorecimento da endogamia e do efeito fundador. Enquanto que na segunda explicação, a redução estaria relacionada à presença de alelos nulos, os quais representam um problema quando se utilizam iniciadores de uma

espécie em outra. Se os alelos nulos ocorrerem em homozigose será considerado falha na reação de amplificação e se ocorrerem em heterozigose, os heterozigotos serão considerados como homozigotos, subestimando, desta forma, o número de alelos.

De todos os locos estudados em catetos, apenas o SW857, ACTG2 e SW444 possuem relatos na literatura. Em um trabalho com porco ibérico, MARTÍNEZ et al. (2000) encontraram sete alelos para o loco SW857. Já em trabalhos envolvendo catetos, GONGORA et al. (2002), estudando uma amostra de seis indivíduos, encontrou, para o mesmo loco, quatro alelos, variando de 138pb a 158pb, valores estes próximos ou iguais aos encontrados no presente trabalho. LOWDEN et al. (2002) encontraram numa pequena amostra de três catetos, apenas um alelo de 144pb, sendo este número reduzido devido ao tamanho da amostra avaliada. Este alelo também foi encontrado na amostra de catetos avaliada no presente trabalho.

Com queixadas, dos locos estudados, apenas o ACTG2 e SW444 possuem relatos na literatura (GONELA, 2003). Este trabalho envolveu uma amostra de 84 exemplares de queixadas de uma população natural e seis locos microssatélites, dentre os quais, quatro foram polimórficos e dois monomórficos. Dentre os polimórficos, encontram-se os dois locos citados anteriormente, os quais revelaram oito alelos para o loco ACTG2 e cinco no loco SW444. O primeiro possui alelos variando de 116pb a 130pb, dos quais cinco coincidiram com os alelos observados no presente trabalho. Já o segundo possui alelos variando de 96pb a 108pb, dos quais apenas um coincidiu com os do presente trabalho. Estes achados confirmam a identificação correta das regiões de amplificação, processo este bastante trabalhoso uma vez que se tratam de amplificações heterólogas.

Para complementar a avaliação da variabilidade genética em catetos e queixadas foram calculados a heterozigose observada, a heterozigose esperada e o conteúdo de informações polimórficas (PIC).

Na amostra de catetos, considerando cada loco separadamente, foi observado elevado número de indivíduos homozigotos, sendo a heterozigose observada menor que a esperada e, portanto, baixa variabilidade genética. Em queixadas, situação semelhante foi observada sendo a única exceção o loco ACTG2, o qual apresentou este valor maior do que a esperada, indicando, neste loco, excesso de heterozigotos. Em seu trabalho com queixadas, GONELA (2003),

não encontrou diferenças significativas entre as heterozigoses observada e esperada em nenhum dos locos estudados.

Tanto em catetos quanto em queixadas, os valores encontrados para o conteúdo de informações polimórficas (PIC), foram considerados altamente informativos (BOTSTEIN et al., 1980) para todos os locos. No trabalho de GONELA (2003), os valores de PIC na população de queixadas para o loco ACTG2 e SW444 foram, respectivamente, altamente e moderadamente informativos. Segundo CURI (2000), o número de alelos encontrados influencia diretamente na heterozigose esperada e no PIC. Logo, um pequeno número de alelos fornecerá uma pequena heterozigose esperada e um PIC de médio a baixo.

Com relação às freqüências estimadas de alelos nulos em ambas espécies, estas apresentaram freqüências consideradas altas, indicando excesso de homozigotos. A exceção observada foi o loco ACTG2 em queixadas, com valor negativo, sendo isto mais um indicativo do excesso de heterozigotos para este loco. Porém, para afirmar que este excesso de homozigotos é devido à presença de alelos nulos, seria necessário, além das estimativas das freqüências, uma análise de segregação alélica, exigindo, portanto, um acompanhamento da história familiar destes animais (GONELA, 2003). Este mesmo autor estimou a freqüência de alelos nulos nos locos ACTG2 e SW444 em queixadas e encontrou valores negativos, próximos de zero, para ambos os locos, atribuindo tais achados ao excesso de heterozigotos na população.

No presente trabalho, a freqüência de alelos nulos foi estimada usando algoritmo iterativo baseado na diferença entre homozigotos esperados e observados (SUMMERS e AMOS, 1997 *apud* MARSHALL et al, 1998). Segundo MARSHALL et al. (1998), na ausência do alelo nulo, a freqüência estimada será próxima de zero ou até mesmo negativa. Valores negativos implicam em excesso de genótipos heterozigotos observados. Um loco com freqüência de alelos nulos altamente positiva, em relação aos outros locos analisados, indica excesso de homozigotos, mas não necessariamente implica que o alelo nulo esteja presente.

Na literatura poucos são os trabalhos que fazem menção aos alelos nulos, sugerindo que a deficiência de heterozigotos observada nas populações estudadas poderia também estar relacionada à suas presenças, como são os casos de FOLTZ (1986), com alozimas em bivalves marinhos, NEUMANN e WETTON (1996),

TREUREN (1998), com microssatélites em pássaros e GONELA (2003) com microssatélites em *Sus scrofa* sp. e *Tayassu pecari*.

Em catetos, a probabilidade de exclusão combinada (PEC) foi considerada alta quando nenhum dos parentais é conhecido (96,48%), o mesmo se verificando quando se conhece um dos parentais (99,48%), sendo esta uma probabilidade de exclusão desejável. Em queixadas, estas probabilidades foram, respectivamente, 82,57% (baixa) e 95,53% (alta), sendo que nenhuma delas atingiu um valor desejável. Portanto, o conjunto dos cinco locos polimórficos apresentou, em catetos, alto potencial para a utilização destes em testes de paternidade ou maternidade. Em queixadas, no entanto, um fator que possivelmente influenciou as probabilidades obtidas foi o número de alelos observados, que, na maioria dos locos, esteve inferior ao número observado em catetos. Neste caso, então, é sugestivo a utilização de novos marcadores e o aumento da amostra estudada.

Saliente-se que esta foi a primeira estimativa a respeito de teste de paternidade já realizada em taiassuídeos, o que consideramos importante, tendo em vista que os trabalhos envolvendo testes de exclusão de paternidade estão mais direcionados a rebanhos de notável interesse econômico, tais como eqüinos e bovinos.

Desta forma, GIACOMONI (2002), através de um conjunto de quatro locos microssatélites, observou uma probabilidade de exclusão combinada de 93% em cavalos Pantaneiros, considerada satisfatória. Já para cavalos Crioulos, a probabilidade de exclusão combinada foi de 74%, considerada baixa, tendo em vista que métodos ultrapassados, como tipagem sanguínea, mostram resultados semelhantes a este valor, podendo apresentar erros. CURI (2000), estudando a viabilidade de aplicação de determinados locos microssatélites para testes de paternidade em bovinos da raça Gir, observou que a PEC de 0,9789 não atingiu o valor considerado como adequado para testes de paternidade (0,99), e propôs que outros marcadores microssatélites devam ser adicionados para se atingir a PEC pretendida.

Em relação à estrutura genética, o índice F_{st} reflete a proporção da variabilidade genética encontrada entre populações, ou seja, devido à subdivisão populacional. Segundo NEI (1978) *apud* GIACOMONI (2002), valores de F_{st} menores que 0,05 são considerados baixos, entre 0,05 e 0,15 são médios e maiores

que 0,15 são considerados altos, indicando estruturação populacional baixa, média e alta, respectivamente. Em catetos, o valor de F_{st} obtido, da comparação entre as amostras oriundas de três localidades diferentes, foi baixo (0,042), revelando ausência de estruturação, ou seja, há pouca diferenciação entre as populações, não havendo fluxo gênico entre elas e a variabilidade genética encontrada está dentro e não entre as populações. Este resultado foi concordante com os valores de distância genética, que variou de 0,2614 a 0,2638, os quais se mostraram muito semelhantes entre as três localidades de coleta. Em queixadas observou-se o mesmo fenômeno, ou seja, o valor de F_{st} igual a 0,1387, resultante da comparação entre amostras de duas localidades, indicando, ainda, que não há estruturação apesar do valor ser mais elevado que em catetos (0,042).

Estes valores já eram esperados, pois as populações de cativoiro são consideradas artificiais, recentemente formadas, não havendo, portanto, tempo para diferenciarem-se. Quando as duas espécies foram comparadas em relação aos cinco locos polimórficos, verificou-se alta estruturação (F_{st} igual a 0,2086), ou seja, uma subdivisão entre elas, fato este também esperado pelo isolamento reprodutivo existente.

O índice F_{is} , que representa o coeficiente de endogamia, foi alto em toda a amostra, tanto de catetos em todos os locos (0,1985 a 0,9284), como em queixadas (0,3621 a 0,4754), exceto no loco ACTG2, o qual apresentou um valor negativo (-0,0275). Estes altos valores indicam excesso de homocigotos nas populações o que se atribui, provavelmente, ao endocruzamento existente pelo fato de serem populações de cativoiro. Já o valor negativo, indica excesso de heterocigotos.

Uma das possíveis explicações para a alta taxa de homocigose, poderia ser atribuída à origem e comportamento dos indivíduos que compõem as amostras das duas espécies de porcos-do-mato. Como se tratam de populações de cativoiro, formadas recentemente, talvez não mais que dez anos e constantemente recebendo novos elementos, há uma heterogeneidade e incertezas com relação à procedência dos mesmos, ou seja, são grupos de animais originários de diferentes localidades, podendo ser naturais ou nascidos no próprio criadouro. Comportamentalmente, animais de mesma origem tendem a se cruzarem entre si (GONELA, 2003), o que contribui ao endocruzamento. Além disso, segundo o Instituto Ambiental do Paraná – IAP (MIKICH e BÉRNILS, 2004), as populações naturais de catetos e queixadas

estão na lista dos animais ameaçados de extinção no Estado, fato este causado, principalmente, pela devastação dos seus habitats naturais. Desta forma, é provável que as populações destas espécies, devido a essa forte pressão seletiva, tenham reduzido os seus tamanhos efetivos, o que estaria, conseqüentemente, favorecendo o endocruzamento ou a deriva genética. Além do endocruzamento, outras fontes também podem estar envolvidas ou serem igualmente responsabilizadas pelo excesso de homozigotos observados em catetos e queixadas, como erros na genotipagem dos indivíduos e presença de alelos nulos, como já mencionado anteriormente. Conforme ALDRICH et al. (1998) *apud* CONTE (2004), algumas distorções nas freqüências genótípicas podem ser geradas na interpretação do padrão de bandas no gel, onde são considerados homozigotos no lugar de heterozigotos quando alelos possuem tamanhos muito próximos entre si e não podem ser distinguidos uns dos outros, principalmente na presença de bandas duplicadas (*stutter bands*).

Portanto, diante deste panorama surgem pelo menos duas questões básicas, importantes em suas resoluções, com implicações sócio-econômicas, tais como: a) Estaria esta alta taxa de homozigose implicando na redução das ninhadas, em abortos, em natimortos, perda de peso corporal, fragilidade dos híbridos, entre outros? ou b) As populações, apesar da homozigose, estariam bem adaptadas às condições ambientais atuais e, por conseguinte, não causando prejuízos econômicos?

Com relação à segunda colocação, a possível perda da heterozigose, devida à ameaça de extinção talvez não seja tão problemática, pois os animais podem estar bem adaptados, como conseqüência de um processo seletivo tipo “gargalo de garrafa”, no qual os alelos detrimenais já teriam sido previamente selecionados. Exemplos disso foram observados em elefantes marinhos, castores da Escandinávia e do tordo (uma ave) que, no século passado, devido a ações antropogênicas, enfrentaram redução drástica no número de indivíduos e conseqüente perda de heterozigose (SOLÉ-CAVA, 2001). Nestes três exemplos observou-se que, apesar da baixa variabilidade, os animais conseguiram escapar das crises de endocruzamento e, atualmente, são saudáveis e se reproduzem normalmente, indicando que a baixa variação gênica não parece estar prejudicando suas chances de sobrevivência. Segundo este autor, uma possível explicação para tal sucesso é

que no passado as populações iniciais destes animais eram muito grandes e com poucos alelos levemente deletérios, o que diminuiria a chance de fixação por deriva.

Para atendermos as duas questões levantadas e pelo fato de não sabermos ainda como respondê-las convenientemente, há premência na elaboração de programas complementares ao estudo iniciado no presente trabalho.

Pelo menos duas abordagens básicas devem ser geradas: pela primeira, um levantamento em termos de manutenção e reprodução monitoradas, cujo objetivo seria o de verificar a real situação nestes cativeiros, ou seja, se está de fato ocorrendo uma perda significativa de animais, seja pelo baixo número de filhotes por gestação; baixo peso ao nascer, natimortos, fragilidade dos filhotes, produção de leite, tamanho dos animais, susceptibilidade a doenças, entre outros.

Enquanto que à segunda abordagem, seria um programa a nível estadual patrocinado institucionalmente ou promovido por uma associação de criadores de animais silvestres, no caso, de catetos e/ou queixadas igualmente de manutenção e reprodução monitoradas em cativeiro. Esta difere da anterior, pois seria um programa envolvendo medidas extremamente rígidas quanto às origens dos animais, sendo todos catalogados e tipados através de algum marcador molecular adequado para tal finalidade. Assim, quando da aquisição de uma nova matriz para seu criadouro, o proprietário seria adequadamente orientado sobre qual ou quais animais a serem adquiridos tendo em vista o seu rebanho já previamente identificado.

6 CONCLUSÕES

Comprovou-se a eficiência da amplificação heteróloga através do uso de marcadores microssatélites desenvolvidos para porco doméstico (*Sus scrofa scrofa*) e aplicados em catetos (*Tayassu tajacu*) e queixadas (*Tayassu pecari*).

Dos seis locos padronizados, cinco foram polimórficos e um monomórfico para ambas espécies. No total, foram observados 52 alelos em catetos e 30 alelos em queixadas.

A diversidade alélica encontrada entre os locos polimórficos foi registrada em maior número nos locos SW1408, SW857 e ACTG2 em catetos e SW2411 em queixadas.

Houve excesso de homozigotos nas populações de catetos e queixadas, considerando todos os locos, exceto no loco ACTG2, em queixadas, que apresentou excesso de heterozigotos. Portanto, a variabilidade genética encontrada para estes locos foi baixa, porém, considerada uma parcela bastante representativa da variabilidade genética das populações naturais, pelo menos em relação a estes marcadores.

Os valores do conteúdo de informações polimórficas (PIC), revelaram que todos os locos em ambas espécies são altamente informativos.

A probabilidade de exclusão combinada (PEC) igual a 99,48%, quando se conhece um dos parentais em catetos, é considerada alta e satisfatória, indicando ser informativo para este tipo de teste. Já em queixadas, apesar desta probabilidade ser considerada também alta (95,53%), não foi satisfatória, pois o valor mínimo de exclusão de paternidade deve ser igual ou superior a 99%, não sendo, pois, informativo para este tipo de teste.

Através do cálculo de F_{st} , percebe-se que as populações de catetos ($F_{st}=0,042$) e queixadas ($F_{st}=0,1387$) não estão estruturadas, ou seja, a variabilidade encontrada está dentro e não entre as populações. Já quando comparadas as duas espécies, percebeu-se a estruturação, ou seja, não há fluxo gênico entre as espécies.

Os valores totais de F_{is} (0,5428 para catetos e 0,3506 para queixadas) indicam excesso de homozigotos observados em ambas espécies, sendo uma das explicações o endocruzamento existente nos cativos.

A presença de alelos nulos e distorções nas frequências genotípicas geradas na interpretação do padrão de bandas no gel, também podem, de alguma forma, estarem envolvidos no alto índice de homozigotos.

Duas proposições são discutidas e apresentadas para avaliar os efeitos da homozigose nos criadouros de animais silvestres, em especial nos de catetos e queixadas, ambas com repercussões sócio-econômicas significativas.

REFERÊNCIAS

- ANDREA, M.V.; OLIVEIRA, C.; ROCHA, G.T.; FORESTI, F. Cytogenetical and histological studies in testis of *Tayassu tajacu* (Cateto), *Tayassu pecari* (Queixada) and a natural interspecific hybrid. **J. Anim. Breed. Genet.**, v.118, p.125-133, 2001.
- BENIRSCHKE, K.; KUMAMOTO, A.T. Further studies on the chromosomes of three species of peccary. **Advances in Neotropical Mammalogy**, p.309-316, 1989.
- BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL (BLAST). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Acesso em Agosto de 2005.
- BODMER, R.E.; SOWLS, L.K. 1993. **The Collared Peccary (*Tayassu tajacu*)**. Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Conservation Action Plan. Disponível em <http://www.iucn.org/themes/ssc/sgs/pphsg/APchap2-2.htm>> Acesso em: 30 ago. 2004.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, n.32, p.314-331, 1980.
- CALLEN, D.F.; THOMPSON, A.D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H.A.; RICHARDS, R.I.; MULLEY, J.C.; SUTHERLAND, G.R. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellites markers. **American Journal of Human Genetics**, n.52, p.922-927, 1993.
- COELHO, A.S.G. **BOOD**: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Goiânia: UFG, 2000. 1 disquete.
- CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites**. Piracicaba, 2004. 124p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo.
- CURI, R.A. **Teste de paternidade por microssatélites em bovinos da raça Gir**. Botucatu, 2000. 89p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- DEUTSCH, L.A.; PUGLIA, L.R. **Os animais silvestres – Proteção, doenças e manejo**. São Paulo: Globo, 2ª ed., 191p., 1990.
- EISEN, J.A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D.B.; Schlötterer, C. (eds), **Microsatellites - evolution and applications**, Oxford University Press, Oxford, UK, cap. 4, p.34-48, 1999.
- ENGEL, S.R.; LINN, R.A.; TAYLOR, J.F.; DAVIS, S.K. Conservation of microsatellite locos across species of artiodactyls: implications for population studies. **Journal of Mammalogy**, v.77, n.2, p.504-518, 1996.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.474-491, 1992.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores em análise genética**. Brasília: Embrapa – Cenargem, 3ª ed., 220p., 1998.

FOLTZ, D.W. Null alleles as a possible cause of heterozygote deficiencies in the oyster *Crassostrea virginica* and other bivalves. **Evolution**, v.40, n.4, p.869-870, 1986.

FRAGOSO, J.M.V. Home range and movement patterns of white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) herds in the northern Brazilian Amazon. **Biotropica**, v.30, n.3, p.458-469, 1998.

GEMMELL, N.J.; ALLEN, P.J.; GOODMAN, S.J.; REED, J.Z. Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v.6, p.661-666, 1997.

GIACOMONI, E.H. **Variabilidade genética em duas raças de eqüinos (*Equus caballus* – Equidae) – Crioulo e Pantaneiro – Avaliada através do marcador de DNA microssatélite**. Porto Alegre, 2002. 65p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GIANNONI, M.A.; FERRARI, I. Padrões de formação de G-bandas dos cromossomos da espécie *Tayassu tajacu*. I- Análise dos pares cromossômicos números 1 a 7. **Científica**, v.4, n.1, p.72-7, 1976a.

GIANNONI, M.A.; FERRARI, I. Padrões de formação de G-bandas dos cromossomos da espécie *Tayassu tajacu*. I- Análise dos pares cromossômicos números 8 a 15. **Científica**, v.4, n.1, p.78-81, 1976b.

GIANNONI, M.A.; FERRARI, I. Padrões de formação de G-bandas dos cromossomos da espécie *Tayassu albirostris*. **Ciência e Cultura**, v.28, n.7, p.779-785, 1976c.

GIANNONI, M.A.; FERRARI, I. Estudo biométrico do cariótipo da espécie *Tayassu albirostris*. **Ciência e Cultura**, v.28, n.7, p.779-785, 1976d.

GIANNONI, M.A.; FERRARI, I. Estudo biométrico do cariótipo da espécie *Tayassu tajacu*. **Científica**, v.5, n.2, p.191-198, 1977.

GIANNONI, M.A.; FERRARI, I.; GIANNONI, M.L. Possible relations among the nucleolus organizer regions of the species *Tayassu albirostris*, *Sus scrofa scrofa*, and *Sus scrofa*. **Rev. Brasil. Genet.**, v.5, n.2, p.339-144, 1982.

GONELA, A. **Aplicação de marcadores microssatélites de *Sus scrofa domestica* na caracterização genética de populações de *Sus scrofa* sp (porco-Monteiro) e *Tayassu pecari* (queixada)**. Ribeirão Preto, 2003. 88p. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

GONGORA, J.; CHEN, Y.; BERNAL, J.E.; NICHOLAS, F.W.; MORAN, C. Interspecific amplification of peccary microsatellite markers using porcine primers. **Animal Genetics**, v.33, p.312-327, 2002.

GONGORA J.; MORAN, C. Nuclear and mitochondrial evolutionary analyses of Collared, White-lipped, and Chacoan peccaries (Tayassuidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n.34, p.181-189, 2005.

GROVES, C.P.; GRUBB, P, 1993. **The suborder Suiformes**. Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Conservation Action Plan. Disponível em <<http://www.iucn.org/themes/ssc/sqs/pphsq/Apchap1.htm>> Acesso em 30 ago. 2004.

GRUBB, P. Order Artiodactyla. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. **Mammal species of the world – A taxonomy and geographic reference**. Boston: Smithsonian Institution Press, 1993. p.315-317.

GUEDES, F. B.; SILVA, R. W.; HASS, I.; LIMA, J. F. S.; SBALQUEIRO, I. J. Estudo da variabilidade genética – cromossômica e molecular – em porcos do mato – catetos – da região sul do Brasil. In: EVINCI, 10., 2002, Curitiba. **Anais do 10º Evento de Iniciação Científica**. Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 2002. p.113.

HUFTY, M.P.; SEDGWICK, C.J.; BENIRSCHKE, K. The karyotypes of the white-lipped and collared peccaries. Aspects of their chromosomal evolution. **Genen. Phaenen**, v.16, n.3, p.81-86, 1973.

INSTITUTE NACIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE. **Panel of markers for diversity studies**. Disponível em: <<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/panel.htm>> Acesso em Março 2003.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c)**. 2001. Programa distribuído livremente pelos autores no site < <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html2001>>. Windows 95/NT.

LAU, J.; FERNANDEZ-DUQUE, E.; EVANS, S.; DIXSON, A.; RYDER, O.A. Heterologous amplification and diversity of microsatellite loci in three owl monkey species (*Aotus azarai*, *A. lemurinus*, *A. nancymae*). **Conservation Genetics**, v. 5, p.727-731, 2004.

LI, YOU-CHUN; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, n.11, p.2453-2465, 2002.

LIMA, J.F.S.; GUEDES, F.B.; SILVA, R.W.; HASS, I.; ROCHA, D.C.; SBALQUEIRO, I.J. Novos dados citogenéticos em *Tayassu tajacu* (ARTIODACTYLA: TAYASSUIDAE) do estado do Paraná. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., 2002, Águas de Lindóia. **Anais do 48º Congresso Nacional de Genética**. Águas de Lindóia: Digito S/C Ltda., 2002. p.242. 1 CD-ROM.

LOWDEN, S.; FINLAYSON, H.A.; MACDONALD, A.A.; DOWNING, A.C.; GOODMAN, S.J.; LEUS, K.; KASPE, I.; WAHYUNI, E.; ARCHIBALD, A.I. The application of *Sus scrofa* microsatellite markers to wild suiformer. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v.3, p.347-350, 2002.

MARCH, I.J. 1993. **The White-lipped Peccary (*Tayassu pecari*)**. Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Conservation Action Plan. Disponível em <<http://www.iucn.org/themes/ssc/sqs/pphsg/APchap2-3.htm>> Acesso em 30 ago. 2004.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUIK, L.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood – based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v.7, n.5, p.639-655, 1998.

MARTINEZ, A.M.; DELGADO, J.V.; RODERO, A.; VEJA-PLA, J.L. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. **Animal Genetics**, v.31, p.295-301, 2000.

MAYER, J.J.; WETZEL, R.M. *Tayassu pecari*. **Mammalian Species**, n.293, p.1-7, 1987.

MEDRANO, J.F.; AESEN, E.; SHARROW, L. DNA extraction from nucleated red blood cells. **Biotechniques**, v.8, n.1, p.43, 1990.

MIKICH, S.B.; BÉRNILS, R.S. **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná**, 2004. Disponível em <<http://www.pr.gov.br/iap>> Acesso em: 10 jan. 2006.

MOORE, S.S.; SARGEANT, L.L.; KING, T.J.; MATTICK, J.S.; GEORGES, M.; HETZEL, D.J.S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v.10, p.654-660, 1991.

NAGRP PIG GENOME COORDINATION PROGRAM. Supported in part by the USDA-CSREES National Animal Genome Research Program. Disponível em <<http://www.animalgenome.org/pig.html>>. Acesso em Junho de 2005.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v.106, p.238-292, 1972.

NEUMANN, K.; WETTON, J.H. Highly polymorphic microsatellites in the house sparrow *Passer domesticus*. **Molecular Ecology**, n.5, p.307-309, 1996.

PEREZ-SWEENEY, B.M.; RODRIGUES, F.P.; MELNICK, D.J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: CULLEN JR., L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. **Métodos de Estudos em Biologia da Conservação da Vida Silvestre**. Curitiba: Editora da UFPR, 2004. p.343-380.

ROCHA, G.T. **Aplicações da citogenética na preservação de animais silvestres. Botucatu**. Botucatu, 1993. 204p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. New York: Exeter Software, 2000. 98p.

RUBINSZTEIN, D.C.; AMOS, W.; LEGGO, J.; GOODBURN, S.; JAIN, S.; LI, S.; MARGOLIS, R.L.; ROSS, C.A.; FERGUSON-SMITH, M.A. Microsatellite evolution – evidence for directionality and variation in rate between species. **Nature Genetics**, v.10, p.337-343, 1995.

SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J-M; ROESLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2.1: A software for population genetic data analysis**. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SILVA, F. **Mamíferos silvestres do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 1984.

SLATE, J.; COLTMAN, D.W.; GOODMAN, S.J.; MACLEAN, I.; PEMBERTON, J.M.; WILLIAMS, J.L. Bovine microsatellite locos are highly conserved in red deer (*Cervus elaphus*), sika deer (*Cervus nippon*) and Soay sheep (*Ovis aries*). **Animal Genetics**, v.29, p.307-315, 1998.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco, 573 p. 1973.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.171-192.

STALLINGS, R.L. Conservation and evolution of (CT)_n/(GA)_n microsatellites sequences at orthologous positions in diverse mammalian genomes. **Genomics**, n.25, p.107-113, 1995.

SUN, H.; KIRKPATRICK, B.W. Exploiting dinucleotide microsatellite conserved among mammalian species. **Mammalian Genome**, n.7, p.128-132, 1996.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acid Research**, v.17, n.16, p.6463-6471, 1989.

TEGELSTROM, H. Detection of mitochondrial DNA fragment. In: Hoelzel, A.R. (ed.) **Molecular Genetic Analysis of Populations. A practical approach**. Oxford: Irl Press, 1992. p.89-113.

TELLES, M.P.C.; RESENDE, L.V.; SOARES, T.N.; RODRIGUES, F.M.; JÁCOMO, A.T.A.; SILVEIRA, L. Avaliação do padrão de amplificação de marcadores RAPD em bandos de queixada (*Tayassu pecari*) do Parque Nacional das Emas. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.1, p.7-14, 2003.

THEIMER, T.C.; KEIM, P. Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome B DNA sequences. **Journal of Mammalogy**, v.79, n.2, p.566-572, 1998.

TREUREN, R.V. Estimating null allele frequencies at a microsatellite locus in the oystercatcher (*Haematopus ostralegus*). **Molecular Ecology**, n.7, p.1413-1417, 1998.

VASSART, M.; PINTON, A.; SÉGUÉLA, A.; DUTERTRE, C. New data on chromosomes of peccaries. **Mammalia**, v.58, n.3, p.500-507, 1994.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, n.38, p.1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annual Eugenics**, n.15, p.323-354, 1951.

ANEXOS

ANEXO 1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	61
ANEXO 2 – PADRÃO DE BANDAS NOS SEIS LOCOS MICROSSATÉLITES EM CATETOS E QUEIXADAS ANALISADAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA NÃO-DESNATURANTE 10%.....	66

ANEXO 1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES

ANEXO 1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES

a) Tampão de Lise pH=8,0 (Vf=400mL)

2,4228 g de Tris-Base
7,444 g de EDTA
2,3376 g de NaCl
Completar o volume com água Mili-Q autoclavada

Acertar o pH, autoclavar e armazenar em geladeira a 4°C.

b) Tampão STE pH=8,0 (Vf=200mL)

0,2423 g de Tris-Base
0,0745 g de EDTA
1,17 g de NaCl
Completar o volume com água Mili-Q autoclavada

Acertar o pH, autoclavar e armazenar em geladeira a 4°C.

c) Tampão TE pH=8,0 (Vf=200mL)

2,4228 g Tris-Base
0,0744 g EDTA
Completar o volume com água Mili-Q autoclavada

Acertar o pH, autoclavar e armazenar em geladeira a 4°C.

d) Tampão TBE 10X (2L)

218,0 g de Tris-Base
110,0 g de Ácido Bórico
14,6 g de EDTA

Completar o volume com água destilada

e) SDS 20% (100mL)

20 g de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)

Completar o volume com água destilada, aquecer a 70°C e guardar à temperatura ambiente. Não autoclavar.

f) NaCl 5M (100mL)

29,2 g de NaCl

Completar o volume com água Mili-Q autoclavada, autoclavar e armazenar em geladeira a 4°C.

g) RNAse-A

Dissolver a RNAse (10 mg/mL) no tampão (Tris 10 mM, NaCl 15 mM pH=7,5) e colocar o tubo em água fervente por 15 minutos. Deixar esfriar à temperatura ambiente. Aliquotar e estocar a -20°C.

h) Proteinase K

Dissolver 10 mg para cada mL de água Mili-Q autoclavada. Aliquotar e estocar a -20°C.

i) Azul de Bromofenol (3%) para agarose

Estoque:

10 ml de água destilada

0,300 g bromofenol

Uso:

Água 11 mL

Glicerol 10,35 mL

j) Gel de Agarose 0,8%

0,8 g de agarose em pó

Completar para 100 mL com Tampão TBE 0,5X e dissolver em microondas (potência máxima por 1 minuto).

k) Gel de poliacrilamida não-desnaturante 10% (30 mL)

Solução-mãe de acrilamida 30% (29:1)

145 g de acrilamida

5 g bisacrilamida

Completar para 500 mL de água destilada.

Preparo:

10 mL de solução de acrilamida 30%
2,1mL de glicerol
14,57 mL água destilada
3,0 mL TBE 10X
40 µL de APS (10%)
400 µL de TEMED
Misturar rapidamente e aplicar imediatamente entre as placas de vidro.

l) APS 10%

1 g de persulfato de amônio
Completar 10 mL de água destilada
Aliquotar em microtubos de 1,5 mL e armazenar a -20°C.

m) Ladder de 25pb – diluição para aplicação no gel

0,5 µL de Ladder 25pb
6 µL de água Mili-Q
5 µL de corante azul de bromofenol

n) Soluções para fixar e corar gel de poliacrilamida

Solução fixadora:

120 mL de álcool ([] final 10%)
6 mL de ácido acético
Completar o volume com água até atingir 1200 mL de solução.

Solução de nitrato de prata (80%):

40 g de nitrato de prata
Completar para 50 mL de água destilada

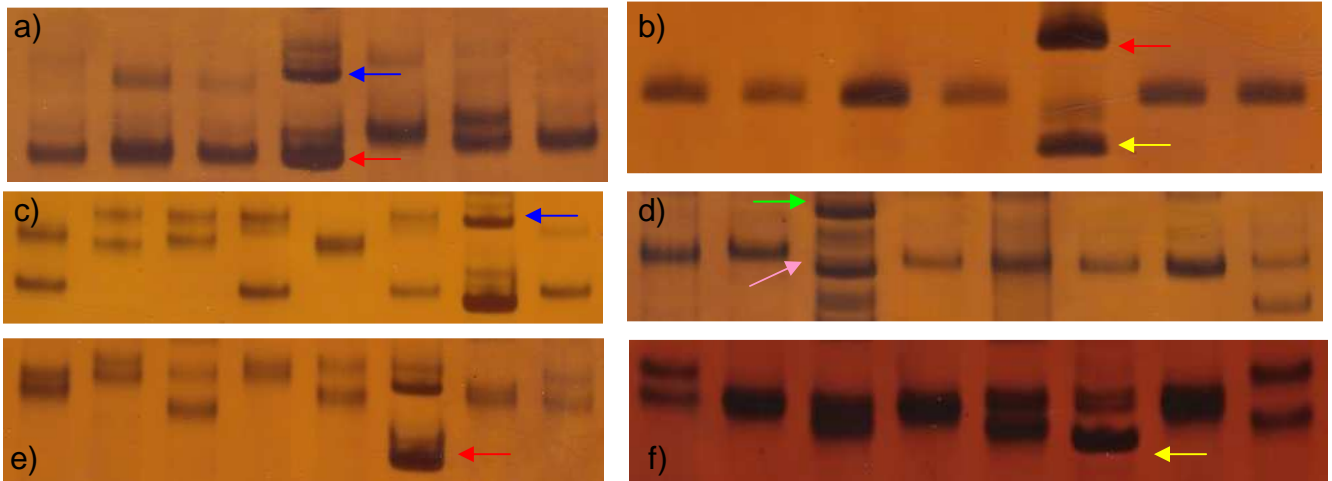
Solução reveladora:

400 ml de água destilada
9 g de NaOH
Agitar a mistura.

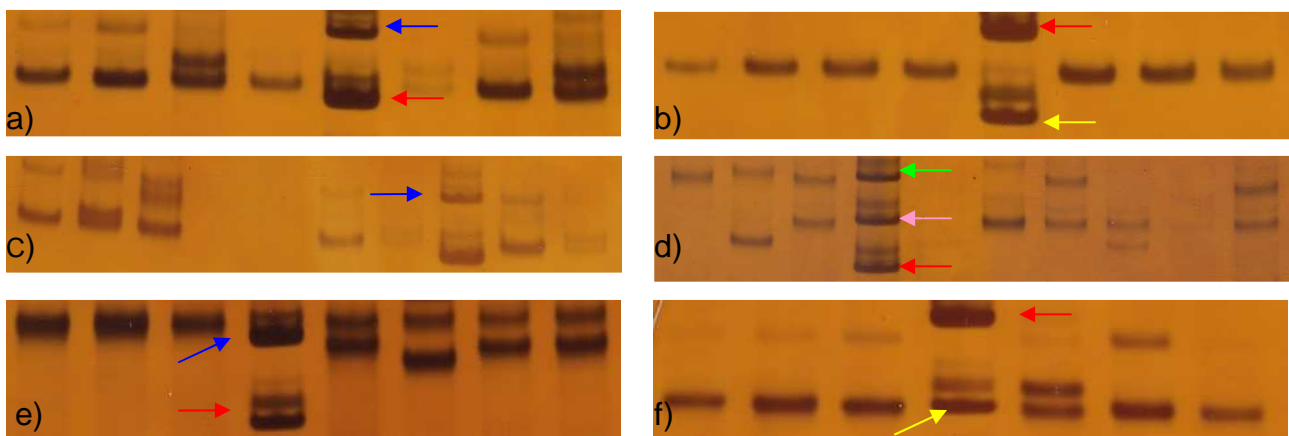
**ANEXO 2 – PADRÃO DE BANDAS NOS SEIS LOCOS MICROSSATÉLITES EM
CATETOS E QUEIXADAS ANALISADAS EM GEL DE
POLIACRILAMIDA NÃO-DESNATURANTE 10%**

ANEXO 2 - PADRÃO DE BANDAS NOS SEIS LOCOS MICROSSATÉLITES EM
 CATETOS E QUEIXADAS ANALISADAS EM GEL DE
 POLIACRILAMIDA NÃO-DESNATURANTE 10%

CATETOS



QUEIXADAS



a) Loco SW1408; b) Loco SW1407; c) Loco SW857; d) SW2411; e) Loco ACTG2; f) Loco SW444

Setas (Ladder 25pb): 225pb; 200pb; 175pb; 150pb; 125pb; 100pb