



Universidade Federal  
de Ouro Preto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente

Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Biomas tropicais



Paula Teixeira Gomes

**ANÁLISE GENÉTICA DE UM BANDO DE CATETOS (*Pecari tajacu*)  
PROVENIENTES DE CATIVEIRO**

Ouro Preto

Minas Gerais/Brasil

2019

Paula Teixeira Gomes

**ANÁLISE GENÉTICA DE UM BANDO DE CATETOS (*Pecari tajacu*)  
PROVENIENTES DE CATIVEIRO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Biomas Tropicais do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Maykon Passos Cristiano

Ouro Preto

Minas Gerais/Brasil

2019

G633a

Gomes, Paula Teixeira.

Análise genética de um bando de catetos (Pecari tajacu) provenientes de cativeiro [manuscrito] / Paula Teixeira Gomes. - 2019.

37f.: il.: color; tabs; mapas.


Orientador: Prof. Dr. Maykon Passos Cristiano.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Biomas Tropicais .

Área de Concentração: Evolução e Funcionamento de Ecossistemas.

1. Caititu. 2. Animais silvestres em cativeiro. 3. Microssatélites (Genética)  
. I. Cristiano, Maykon Passos. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III.  
Titulo.

CDU: 599.731.1

	<p><b>Ministério da Educação</b> <b>Universidade Federal de Ouro Preto</b> <b>Programa de Pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais</b> <b>ICEB - Campus – Morro do Cruzeiro</b> <b>Ouro Preto – MG – CEP 35.400-000</b> <b>Fone: (031)3559-1747</b> <b>E-mail: biomas@ufop.edu.br</b></p>
---	--

**“Análise Genética de um Bando de Catetos (*Pecari tacaju*)  
Provenientes de Cativeiro.”**

***Autora: Paula Teixeira Gomes***

Dissertação defendida e aprovada, em 29 de março de 2019, pela banca examinadora constituída pelos professores:



---

**Professor Dr. Maykon Passos Cristiano**  
**Universidade Federal de Ouro Preto**



---

**Profa. Dra. Karla Suemy Clemente Yotoko**  
**Universidade Federal de Viçosa**



---

**Profa. Dra. Susanne Facchin**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por guiar todos os meus caminhos, por todas as bênçãos concedidas e por me permitir realizar mais uma grande conquista em minha vida.

Agradeço aos meus pais (Irani e José) e ao meu irmão (Tiago) por estarem sempre presentes, por todo carinho e por sempre acreditarem em meus propósitos e me ajudarem a concretizar cada um deles. A minha mãe Irani, agradeço em especial por todas as orações e por toda a preocupação. Amo vocês!

Ao Henrique, meu grande amor, por estar sempre presente, por compreender a minha ausência em muitos momentos, por sonhar junto e por todo amor que tem por mim. Te amo!

Aos meus familiares, avós, tios (as), primos (as) e amigos por todas as orações e por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso. Especialmente, aos meus tios (Ciria e Samuel) e aos meus primos (Atos e Bruno) por me receberem tão bem em sua casa durante o período em que estive em Belo Horizonte.

Ao meu orientador Prof. Maykon Passos por ter me concedido a oportunidade de trabalhar no Projeto Catetos e pela confiança em meu trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Genética Evolutiva e de Populações – UFOP, em especial a Brenda, Eloá, Ricardo e Vanessa, obrigada por todos os momentos compartilhados, pelos almoços no RU e pelo apoio nos momentos em que precisei de cada um de vocês.

À Carini por ter me ajudado na realização deste trabalho.

À Dani e a Heloiza pela ajuda que me deram em diversos momentos e pelas dúvidas que me tiraram.

Agradeço à UFOP pela estrutura oferecida e a todos os professores do DEBIO pela contribuição na minha formação, em especial ao Prof. Cristiano Schetini por ter me ajudado em todos os momentos em que necessitei e por todos os ensinamentos e ao Prof. Fábio Augusto pela amizade e por ser um professor sempre presente na vida dos seus alunos e ex-alunos. Agradeço ainda a Prof<sup>a</sup>. Patrícia de Abreu pelos ensinamentos no período em que fui sua aluna de iniciação científica, todo o conhecimento adquirido nesse período foi extremamente importante para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais pela oportunidade.

Ao secretário do programa (Rubens Modesto) pela simpatia e pelo profissionalismo.

À Marina Beirão por ser sempre tão atenciosa e pela ajuda com a estatística.

Ao Prof. Evanguedes Kalapothakis por seus ensinamentos e por abrir as portas do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares - UFMG, onde realizei uma parte dos experimentos deste trabalho. A todos os companheiros do laboratório que sempre foram muito atenciosos e me ajudaram muito.

Aos colegas da turma do mestrado 17/01 (Aline, Eloá, Luana, Marília, Natasha, Thomas, Vanessa e Vítor) pela amizade. Adorei conhecer vocês!

Agradeço a Capes pela concessão da bolsa de estudos, à Fundação Gorceix e a Vallourec pelo investimento e financiamento no Projeto Catetos.

Agradeço a todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

**Obrigada!**

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar”.

(Paulo Freire)

## RESUMO

Um grande número de espécies de vertebrados terrestres está sofrendo declínio populacional, causado principalmente pelas pressões antrópicas. No Brasil, 110 espécies de mamíferos estão em risco de extinção, no entanto, muitas espécies ameaçadas regionalmente, não foram incluídas, como por exemplo o *Pecari tajacu*, nesta lista. O *P. tajacu* (Tayassuidae), popularmente conhecido como cateto, é altamente social e distribuído por todos os biomas terrestres do Brasil, e se estende a toda região neotropical. No entanto, as populações dessa espécie estão sendo reduzidas localmente, como no estado de Minas Gerais, em consequência da fragmentação do habitat e da caça predatória. Assim, medidas para reestabelecer essas populações estão sendo adotadas nesse estado. Estudos genéticos, comportamentais, parasitológicos e etnozoológicos foram realizados em um grupo de catetos cativos, com intuito de reintroduzir esses indivíduos em seu habitat natural. Neste contexto, os estudos genéticos são essenciais, pois por meio deles é possível quantificar a diversidade genética, o parentesco, dentre vários outros parâmetros importantes para a reintrodução dos animais na natureza. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética de um grupo de 20 catetos nascidos em cativeiro de uma população com aproximadamente 70 indivíduos da Fazenda Engenho D'Água, localizada em São Bartolomeu, Minas Gerais, Brasil, por meio de marcadores microsatélites. Os dados genéticos gerados neste trabalho serão utilizados para avaliar a viabilidade de reintrodução dos catetos em seu habitat natural e também para propor medidas para o manejo e conservação dessa espécie. Foram utilizados oito microsatélites para caracterizar os indivíduos. Esse grupo apresentou uma alta diversidade genética, indicando que ele é geneticamente diverso. Os indivíduos fundadores da população de catetos da fazenda vieram de apreensões do IBAMA em seis regiões geográficas distintas, assim, quando foi formada a população da fazenda, cada um dos indivíduos trouxe a própria composição genética das populações de origem. Isso, pode explicar em partes os valores estimados para o grupo cativo, encontrados neste estudo. Não foi observado desequilíbrio de ligação significativo para os *loci* analisados, e seis *loci* microsatélites apresentaram desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os desvios encontrados estão relacionados as deficiências de heterozigotos, representadas pelos coeficientes de endocruzamento ( $F > 0$ ). Como o grupo estudado foi amostrado aleatoriamente da população de catetos da fazenda, possivelmente durante a amostragem ele foi formado por animais de diferentes subpopulações, pois os 70 indivíduos estavam todos localizados no mesmo recinto. Assim, o efeito Wahlund pode ser o responsável pelo desvio. Outro fator responsável pelo desvio ao equilíbrio de Hardy-Weinberg



foi o excesso de heterozigotos, provavelmente ocasionado pela mistura de indivíduos de origens distintas. Os resultados gerados com este trabalho indicaram que o grupo estudado possui uma composição genética para a reintrodução na natureza, mas a adoção de algumas estratégias antes e após a soltura dos animais na natureza são fundamentais, para que em longo prazo a sobrevivência dos indivíduos não seja comprometida.

Palavras-chave: Caititu. Estudos genéticos. Animais cativos. Microsatélites.

## ABSTRACT

A large number of species of terrestrial vertebrates are suffering population decline, caused mainly by anthropic pressures. In Brazil, 110 species of mammals are in danger of extinction, however, many species threatened regionally, were not included, such as *Pecari tajacu*, in this list. *P. tajacu* (Tayassuidae), popularly known as collared peccary, is highly social and distributed throughout Brazil's terrestrial biomes, and extends throughout the neotropical region. However, the populations of this species are being reduced locally, as in the state of Minas Gerais, as a consequence of habitat fragmentation and predatory hunting. Thus, measures to reestablish these populations are being adopted in this state. Genetic, behavioral, parasitological and ethnozoological studies were carried out in a group of captive collared peccaries, in order to reintroduce these individuals into their natural habitat. In this context, genetic studies are essential, because through them it is possible to quantify genetic diversity, kinship, among several other important parameters for the reintroduction of animals in nature. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of a group of 20 collared peccaries born in captivity from a population of approximately 70 individuals from Fazenda Engenho D'Água, located in São Bartolomeu, Minas Gerais, Brazil, by means of markers microsatellites. The genetic data generated in this work will be used to evaluate the feasibility of reintroduction of collared peccaries in their natural habitat and also to propose measures for the management and conservation of this species. Eight microsatellites were used to characterize the individuals. This group showed a high genetic diversity, indicating that it is genetically diverse. The founding individuals of the farm collared peccaries population came from IBAMA seizures in six distinct geographic regions, thus, when the population of the farm was formed, each one of the individuals brought the own genetic composition of the populations of origin. This may explain in part the estimated values for the captive group found in this study. No significant linkage disequilibrium was observed for the loci analyzed, and six microsatellite loci showed significant deviations to the Hardy-Weinberg equilibrium. The deviations found are related to the deficiencies of heterozygotes, represented by the inbreeding coefficients ( $F > 0$ ). The studied group was randomly sampled from the collared peccaries population of the farm, probably during the sampling of subpopulations, because the 70 individuals were all located in the same enclosure. Thus, the Wahlund effect may be responsible for the deviation. Another factor responsible for the deviation to the balance of Hardy Weinberg was the excess of heterozygotes, probably caused by the mixing of individuals of different origins. The results generated with this work indicated that the studied group has a genetic composition for the

reintroduction in the nature, but the adoption of some strategies before and after the release of animals in nature are fundamental, so that in the long term the survival of individuals is not compromised.

Keywords: Caititu. Genetic studies. Captive animals. Microsatellite.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1.** (A) *Pecari tajacu* e (B) Indivíduos de *Pecari tajacu* em cativeiro na Fazenda Engenho D'Água.....14

**Figura 2.** Mapa de distribuição do cateto, *Pecari tajacu*, evidenciando as regiões nas quais ele está presente e nas quais ele é considerado extinto.....14

### MANUSCRITO

**Figura 1.** Localização dos indivíduos de *P. tajacu* amostrados na Fazenda Engenho D'Água.....24

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

<b>Tabela 1-</b> Descrição dos catetos analisados.....	25
<b>Tabela 2-</b> Relação de marcadores microssatélites selecionados para o <i>screening</i> .....	26
<b>Tabela 3</b> - Estimativas de diversidade genética para o grupo de <i>Pecari tajacu</i> em cativeiro, utilizando dados de oito <i>loci</i> microssatélites.....	28

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
REFERÊNCIAS.....	18
APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	21
MANUSCRITO.....	22
ANEXOS.....	35
A - Frequências alélicas dos <i>loci</i> microssatélites utilizados para a caracterização da diversidade genética.....	36
B – Genótipos dos animais para os <i>loci</i> microssatélites analisados.....	37

## INTRODUÇÃO GERAL

As ações antrópicas têm causado consequências drásticas sobre a biodiversidade do planeta e muitas espécies têm sofrido com o declínio populacional, como consequência da perda do seu habitat natural (RALLS & BALLOU, 1986). Estima-se que cerca de 3000 espécies de vertebrados terrestres irão necessitar de reprodução em cativeiro nos próximos 200 anos para que as suas populações sejam reestabelecidas (FRANKHAM et al., 2008). Partindo do pressuposto, que as populações cativas na maioria das vezes são fundadas com poucos indivíduos, estudos de biologia populacional são necessários, principalmente, aqueles que compreendam as estimativas genéticas desses indivíduos (RALLS & BALLOU, 1986).

Nesse contexto, as abordagens moleculares estão exercendo um papel fundamental na conservação de um grande número de espécies, pois uma grande parte das técnicas existentes fornecem dados de forma rápida e eficiente (HEDRICK, 2001; DESALLE & AMATO, 2004). O uso dessas ferramentas nos permite compreender vários processos envolvidos na evolução das espécies, pois por meio delas podemos estimar o grau de parentesco entre os indivíduos, a diversidade genética, o grau de endogamia da população e ainda obter informações sobre o tamanho populacional, sobrevivência, dispersão, mutação, migração, dentre outros (ALLENDORF et al., 2010; FRANKHAM et al., 2008). Todos esses parâmetros são extremamente importantes para a conservação e manejo de espécies ameaçadas de extinção (FRANKHAM et al., 2008).

No Brasil, segundo o livro vermelho da fauna ameaçada de extinção, um total de 110 espécies de mamíferos estão sob risco iminente de extinção (ICMBIO, 2018). Ainda, algumas espécies ameaçadas regionalmente, não constam na lista nacional, como é o caso do cateto, *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758) (CHIARELLO et al., 2008), que no estado de Minas Gerais encontra-se “vulnerável” a extinção (COPAM, 2010).

O *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758) também conhecido popularmente como cateto ou caítitu (Figura 1A e 1B), é um mamífero ungulado da ordem Cetartiodactyla, da família Tayassuidae e está distribuído em todos os biomas terrestres do Brasil (PAGLIA et al., 2012), além de ser encontrado em toda a área que compreende desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (Figura 2) (DESBIEZ et al., 2012).



**Figura 1-** (A) *Pecari tajacu* (Fonte: Carlos Magno de Faria, 2016) e (B) Indivíduos de *Pecari tajacu* em cativeiro na Fazenda Engenho D'Água (Fonte: Carlos Magno de Faria, 2016).



**Figura 2** – Mapa de distribuição do cateto, *Pecari tajacu*, mostrando as regiões nas quais a espécie está presente e nas quais ela é considerada extinta (Fonte: IUCN, 2011).

Os catetos são conhecidos por serem altamente sociais (BYERS & BEKOFF, 1981; REIS et al., 2006), territorialistas e viverem em grupos compostos por machos e fêmeas, abrangendo entre 5 a 25 integrantes aproximadamente (BISSONETE, 1982). Os catetos, podem formar grupos maiores para fins de alimentação (REIS et al., 2006). As características da espécie são: possuem um corpo robusto, patas curtas, pelagem marrom ou negra, salpicada de branco, com um colar branco no pescoço e nos ombros (REIS et al., 2006) e seu peso varia



entre 17 e 35 quilogramas (PAGLIA et al., 2012). Quando adultos, os catetos podem medir de 78 a 106 cm de comprimento (MAYER & BRANDT, 1982).

Os hábitos alimentares dos catetos podem variar de acordo com o local e a disponibilidade do alimento, sendo classificados como frugívoros/herbívoros (SOWLS, 1997), embora, eventualmente, também podem se alimentar de restos de animais (KILTIE, 1981). O período de gestação dos catetos é mais ou menos de 145 dias, podendo gerar no máximo 4 filhotes (REIS et al., 2006). Comportamentos de coesão e relações amigáveis são observados nesses indivíduos (BIONDO et al., 2014; BYERS & BEKOFF, 1981; DA SILVA et al., 2016), logo, o grau de parentesco pode promover a coesão entre os catetos (BIONDO et al., 2014), além do mais, a proximidade espacial entre os parentes pode favorecer na defesa contra predadores (REIS et al., 2006). Biondo et al. (2014), estudando a relação entre o parentesco e a estrutura social em catetos cativos, observaram que as relações amigáveis e agonísticas não são previstas pelo grau de parentesco, mas por outros fatores como o sexo, idade e a familiaridade, assim como já foi descrito para outros grupos de mamíferos. Os catetos podem se dispersar em distâncias relativamente curtas, ou seja, entre os rebanhos vizinhos e essa dispersão ocorre mais entre os machos e de forma moderada entre as fêmeas (COOPER et al., 2010b).

Cooper et al. (2011) demonstraram que em um único bando de catetos a paternidade dos filhotes pode ser designada a mais de um macho, indicando que o sistema de acasalamento que ocorre nessa espécie é a poliginandria. Tem sido demonstrado que esse tipo de acasalamento pode aumentar as taxas de diversidade genética em várias espécies de mamíferos (WOLFF & MACDONALD, 2004). No caso do *P. tajacu*, alguns estudos relataram níveis de diversidade genética moderados a altos (BIONDO et al., 2014; COOPER et al., 2010b; COOPER et al., 2011), o que pode ser uma consequência desse sistema de promiscuidade.

Embora o *P. tajacu* tenha uma ampla distribuição, as suas populações têm sofrido um declínio populacional, em consequência das ações antrópicas (KEUROGHLIAN et al., 2004). Alguns fatores como a caça predatória, a fragmentação de habitat, doenças infecciosas, introdução de espécies exóticas e ainda os eventos estocásticos, como secas e queimadas têm ameaçado as populações dessa espécie (DESBIEZ et al., 2012; KEUROGHLIAN et al., 2004). Neste contexto, medidas conservacionistas foram adotadas no estado de Minas Gerais, e estão sendo desenvolvidos estudos genéticos, comportamentais (DE FARIA et al., 2018), parasitológicos e etnozoológicos a cerca de um bando de catetos cativos, com o intuito de minimizar os riscos que têm levado essa espécie ao declínio e, conseqüentemente, aumentado os riscos de extinção local.

Os estudos genéticos são fundamentais para aprimorar os programas de conservação e reprodução de espécies em cativeiro, pois por meio deles é possível criar estratégias de manejo para garantir a persistência das espécies ao longo do tempo (NIELSEN; PERTOLDI; LOESCHCKE, 2007). Uma vez que o objetivo de muitos programas vai além da sobrevivência de alguns indivíduos e seus descendentes, e visam também a manutenção de níveis adequados de diversidade genética a longo prazo, com o intuito de possibilitar futuras reintroduções nos habitats naturais (RAMIREZ et al., 2006). Considerando que a diversidade genética é um fator preponderante para a evolução adaptativa, a sua perda afeta diretamente a capacidade de sobrevivência das populações (NIELSEN; PERTOLDI; LOESCHCKE, 2007; REED et al., 2003).

Os marcadores moleculares microssatélites, também conhecidos como simples sequências repetidas (*Simple sequence repeats* – SSRs) (GUICHOUX et al., 2011; JACOB et al., 1991), são amplamente utilizados em estudos de genética da conservação, pois são eficazes em fornecer informações sobre a diversidade genética, a endogamia, o parentesco e a estrutura populacional (KAPLANOVÁ et al., 2012). Eles são caracterizados por motivos de repetições em *tandem* de 1 a 6 pares de bases (pb) e podem ser encontrados em genomas de organismos procariotos e eucariotos (ELLEGREN et al., 1997; ZANE et al., 2002). O fato de possuírem unidades de repetições variáveis entre os genótipos dos indivíduos torna esses marcadores altamente polimórficos (ZALAPA et al., 2012). Os microssatélites possuem outros atributos, como o fato de serem altamente mutáveis, hipervariáveis, abundantes no genoma e codominantes (ELLEGREN, 2004).

As regiões flanqueadoras dos marcadores microssatélites, diferentemente das repetições de microssatélites, geralmente são conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie e até mesmo em espécies diferentes, o que torna possível a transferência de *primers* entre espécies relacionadas filogeneticamente (HODEL et al., 2016; SELKOE & TOONEN, 2006). Assim, o grande número de características encontradas nos microssatélites torna esses marcadores os mais populares nos estudos de genética populacional (GUICHOUX et al., 2011).

Até o presente momento, foram desenvolvidos poucos estudos com *loci* microssatélites para a espécie *P. tajacu*. Isso pode estar relacionado à dificuldade no desenvolvimento específico desses marcadores, processo considerado caro e demorado (RICO et al., 2013; ZANE et al., 2002). Contudo, a evolução biotecnológica vem tornando esse procedimento menos laborioso (RICO et al., 2013; ZALAPA et al., 2012).

Uma alternativa para estudos envolvendo os marcadores microssatélites é a transferibilidade de marcadores entre espécies relacionadas filogeneticamente. Em mamíferos,

a transferência de marcadores polimórficos pode ser bem-sucedida dentro e entre os gêneros, e também entre famílias (BARBARÁ et al., 2007). Estudos de transferibilidade foram realizados com êxito em *P. tajacu*, utilizando marcadores desenvolvidos para as espécies *Sus scrofa* (porco-doméstico) e *Tayassu pecari* (queixada) (BIONDO et al., 2014; COOPER et al., 2010b; COOPER et al., 2011; DALLA VECCHIA et al., 2011; SILVA et al., 2010).

Alguns estudos moleculares foram desenvolvidos para o *P. tajacu*, com o intuito de compreender a dispersão sexual nessa espécie (COOPER et al., 2010b), entender como o parentesco influencia na estrutura social dos catetos (BIONDO et al., 2014), compreender como o monomorfismo sexual influencia na reprodução (COOPER et al., 2011) e ainda, para avaliar a diversidade genética de uma população de catetos em cativeiro (SILVA et al., 2010). No entanto, este é o primeiro estudo molecular desenvolvido com o *P. tajacu* que faz parte de um programa de conservação e reintrodução dessa espécie no seu habitat natural.

Diante disto, a presente dissertação teve como objetivo avaliar a diversidade genética de um grupo de *P. tajacu* cativos. Além disso, os dados genéticos gerados neste trabalho serão utilizados para avaliar a viabilidade de reintrodução dos catetos em seu habitat natural, e, por fim, para propor medidas para o manejo e conservação dessa espécie.

## REFERÊNCIAS

- ALLENDORF, F.W.; HOHENLOHE, P.A.; LUIKART, G. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 10, p. 697–709, 2010.
- BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Mol Ecol**, v. 16, p. 3759–3767, 2007.
- BIONDO, C.; IZARA P.; MIYAKI, C. Y.; BUSSAB, V. S. R. Social structure of collared peccaries (*Pecari tajacu*): Does relatedness matter? **Behavioural Processes**, v. 109, p. 0376–6357, 2014.
- BISSONETE, J. A. Ecology and social behavior of the collared peccary in Big Bend National Park. **National Scientific Monograph Series**, v. 16, p. 85–95, 1982.
- BYERS, J. A.; BEKOFF, M. Social, Spacing, and Cooperative Behavior of the Collared Peccary, *Tayassu tajacu*. **Journal of Mammalogy**, v. 62, n. 4, p. 767–785, 1981.
- CHIARELLO, A. G.; AGUIAR L. M. S.; CERQUEIRA, R.; MELO F. R.; RODRIGUES, F. H. G.; SILVA, V. M. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção: mamíferos ameaçados de extinção do Brasil**. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, 2008.
- COOPER, J. D.; WASER, P. M.; GOPURENKO, D.; HELLGREN, E. C.; GABOR, T. M.; DEWOODY, J. A. Measuring sex-biased dispersal in social mammals: comparisons of nuclear and mitochondrial genes in collared peccaries. **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 6, p. 1413–1424, 2010b.
- COOPER, J. D.; WASER, P. M.; HELLGREN, E. C.; GABOR, T. M.; DEWOODY, J. A. Is sexual monomorphism a predictor of polygyny? Evidence from a social mammal, the collared peccary. **Behav. Ecol. Sociobiol**, v. 65, p. 775–785, 2011.
- COPAM. DELIBERAÇÃO NORMATIVA COPAM Nº 147, DE 30 DE ABRIL DE 2010. Aprova a Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna do Estado de Minas Gerais. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, Minas Gerais. Disponível em: <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=13192>. Acesso em: 02/02/2019.
- DALLA VECCHIA, A. C. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci for white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and cross-amplification in collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 1, p. 151–154, 2011.
- DA SILVA, S. DO S. B. et al. Dominance relationships between collared peccaries *Pecari tajacu* (Cetartiodactyla: Tayassuidae) in intensive breeding system. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 184, p. 117–125, 2016.
- DE FARIA, C. M. et al., Captive-born collared peccary (*Pecari tajacu*, Tayassuidae) fails to discriminate between predator and non-predator models. **Acta Ethologica**, v. 21, n. 3, p. 175–184, 2018.
- DESALLE, R; AMATO, G. The expansion of conservation genetics. **Nature**, v. 5, p 702–712, 2004.

DESBIEZ A. L. J.; KEUROGHLIAN A.; BEISIEGEL B. M., MEDICI E. P.; GATTI A.; MENDES PONTES A. R.; CAMPOS C. B.; TÓFOLI C. F.; MORAES JUNIOR E. A.; AZEVEDO F. C.; PINHO G. M.; CORDEIRO J. L. P.; JÚNIOR T. S. S.; MORAIS A. A.; MANGINI P. R.; FLESHER K.; RODRIGUES L. F.; ALMEIDA L. B. Avaliação do risco de extinção do cateto *Pecari tajacu* Linnaeus, no Brasil. **Biodiv Bras**, v. 3, p. 74–83, 2012.

ELLEGREN, H.; MOORE, S.; ROBINSON, N.; BYRNE, K.; WARD, W.; SHELDON, B. C. Microsatellite evolution - a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, p. 854-860, 1997.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 6, p. 435-45, 2004.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos da Genética da Conservação**. SBG, 2008. 259 p.

GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LÉGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T. et al. Current trends in microsatellite genotyping. **Mol Ecol Resour**, v. 11, n.4, p. 591-611, 2011.

HEDRICK, P. W. Conservation genetics: where are we now? **TRENDS in Ecology & Evolution**, v. 16, n.11, p. 629-636, 2001.

HODEL, R. G. J.; SEGOVIA-SALCEDO, M. C.; LANDIS, J. B.; CROWL, A. A.; SUN, M.; LIU, X.; GITZENDANNER, M. A.; DOUGLAS, N. A. et al. The report of my death was an exaggeration: a review for researchers using microsatellites in the 21st Century. **Appl Plant Sci**, v. 4, n. 6, p. 1600025, 2016.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília/DF: MMA, 2018.

JACOB, H. J. L.; KLAUS.; LINCOLN, STEPHEN E.; KUSUMI, KENRO; BUNKER, RUTH K.; MAO, YI-PEI; GANTEN, DETLEV; DZAU, VICTOR J.; LANDER, ERIC S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, v. 67, n. 1, p. 213-224, 1991.

KAPLANOVÁ, K.; PUTNOVÁ, L.; BRYNDOVÁ, M.; BARTOŇOVÁ, P.; VR TKOVÁ, I.; DVORÁK, J. Microsatellite variability in nutria (*Myocastor coypus*) genetic resource in the Czech Republic. **Czech J. Anim. Sci.**, v. 57, n. 4, p. 171–177, 2012.

KEUROGHLIAN, A.; EATON, D. P.; LONGLAND, W. S. Area use by white-lipped and collared peccaries (*Tayassu pecari* and *Tayassu tajacu*) in a tropical forest fragment. **Biological Conservation**, v. 120, n. 3, p. 411–425, 2004.

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

MAYER, J. J.; BRANDT, P. N. **Identity, distribution, and natural history of the peccaries, Tayassuidae**. In: Mammalian biology in South America (Ed. by M. A. Maies & H. H. Genoway). Linesville: Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh, v. 1, p. 433-455, 1982

NIELSEN, R. K.; PERTOLDI, C.; LOESCHCKE, V. Genetic evaluation of the captive breeding program of the Persian wild ass. **Journal of Zoology**, v. 272, n. 4, p. 349–357, 2007.

- PAGLIA, A.P.; FONSECA, G.A.B. DA; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. DA C.; MITTERMEIER, R. A. & PATTON J. L. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2ª Edição / 2nd Edition. **Occasional Papers in Conservation Biology**, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76p, 2012.
- RALLS, K.; BALLOU, J. D. Proceedings of the workshop on genetic management of captive populations. **Zoo Biology**, v. 5, n. 2, 1986.
- RAMIREZ, O. et al. Genetic assessment of the Iberian wolf *Canis lupus signatus* captive breeding program. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 6, p. 861–878, 2006.
- REED, D. H. et al. Correlation between Fitness and Genetic Diversity Correlation between Fitness and Genetic Diversity. **Conservation Biology**, v. 17, n. 1, p. 230–237, 2003.
- REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 2nd Edition. Londrina.PR: Universidade Estadual do Paraná, 2006.
- RICO, C.; NORMANDEAU, E.; DION-COTE, A. M.; RICO, M. I.; COTE, G.; BERNATCHEZ, L. Combining next-generation sequencing and online databases for microsatellite development in non-model organisms. **Sci Rep**, v. 3, p. 3376, 2013.
- SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecol Lett**, v. 9, n. 5, p. 615-29, 2006.
- SILVA, R. W.; FREITAS, T. R.O.; SBALQUEIRO, I. J. Evaluation of genetic variability in the collared peccary *Pecari tajacu* and the white-lipped peccary *Tayassu pecari* by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 62-67, 2010.
- SOWLS, L.K. **Javelinas and other peccaries: their biology, management, and use**. Texas A e M University Press. College Station: 1997, 20 eds. 325 p.
- WOLFF, J. O.; MACDONALD, D. W. Promiscuous females protect their offspring. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 3, p. 127–134, 2004.
- ZALAPA, J. E.; CUEVAS, H.; ZHU, H.; STEFFAN, S.; SENALIK, D.; ZELDIN, E.; MCCOWN, B.; HARBUT, R. et al. 2012. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. **Am J Bot**, v. 99, n. 2, p. 193-208.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review. **Mol Ecol**, v. 11, n. 1, p. 1-16.

## APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

O presente trabalho é constituído de um capítulo que corresponde a um artigo científico gerado com base nos resultados obtidos. O artigo “Diversidade genética em catetos cativos (*Pecari tajacu*, Tayassuidae): implicações para a sua conservação e reintrodução” está em preparação e será submetido ao periódico *Animal Biodiversity and Conservation*. Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética dos indivíduos em cativeiro utilizando marcadores microssatélites. Os dados genéticos gerados serão utilizados para avaliar a viabilidade de reintrodução desse grupo cativo em seu habitat natural e, por fim, para propor medidas para o manejo e conservação dessa espécie.

## **Diversidade genética em catetos cativos (*Pecari tajacu*, *Tayassuidae*): implicações para a sua conservação e reintrodução**

### **Resumo**

*Diversidade genética em catetos cativos (Pecari tajacu, Tayassuidae): implicações para a sua conservação e reintrodução.* O *Pecari tajacu* (*Tayassuidae*), conhecido como cateto, está distribuído na região Neotropical, entretanto, essa espécie está sofrendo declínio populacional devido as pressões antrópicas. Neste estudo utilizamos oito *loci* microsatélites para caracterizar um grupo de 20 catetos nascidos em cativeiro, com a finalidade de reintroduzi-los na natureza. Encontramos altos índices de diversidade genética, que indicaram que o grupo é geneticamente diverso. Foram observados desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg em seis *loci*, como consequência da deficiência de heterozigotos, provavelmente provocada pelo efeito Wahlund. E, também, pelo excesso de heterozigotos, que pode ter sido ocasionado pela mistura de indivíduos de origens distintas. Assim, concluímos que o grupo estudado possui uma composição genética para a reintrodução na natureza, mas a adoção de estratégias antes e após a soltura dos animais na natureza são fundamentais para a sua persistência.

Palavras-chave: Caititu, animais de cativeiro, microsatélites.

### **Introdução**

Com o aumento das ameaças sobre as populações naturais, um grande número de espécies tem sofrido declínio populacional (Frankham, 2003). No entanto, o estabelecimento de populações cativas para uma variedade de espécies ameaçadas, tem sido uma forma de minimizar esses impactos e garantir a conservação dessas espécies (McPhee, 2003). Para alguns programas de conservação, as populações cativas têm como finalidade produzir animais para a reintrodução na natureza (Frankham et al., 2008; Tavecchia et al., 2009). Assim, um dos objetivos desses programas é preservar a diversidade genética nas populações (Sakthivel et al., 2019), uma vez que a perda de diversidade genética reduz o potencial de evolução das populações, impedindo que as mesmas se adaptem frente as mudanças ambientais (Arif & Khan, 2009; Charpentier, 2008; Frankham et al., 2003). Para populações a serem reintroduzidas é de extrema importância que os níveis adequados de diversidade genética sejam conservados, pois elas serão usadas para fundar ou suplementar populações silvestres (Frankham et al., 2008; Ralls & Ballou, 1986).

Neste sentido, a aplicação de técnicas de genética molecular nos programas de conservação e reintrodução contribui para o monitoramento e manejo de espécies ameaçadas (Frankham et al., 2008). Ademais, os estudos de genética populacional fornecem informações valiosas, tanto em nível biológico, quanto em nível comportamental (Burland & Wilmer, 2001; Emmanuvel Rajan & Marimuthu, 2006), que podem auxiliar na redução dos riscos de extinção que assombram uma grande variedade de espécies atualmente.



O cateto (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) é um animal social (Byers & Bekoff, 1981; Reis et al., 2006), territorialista e que vive em grupos compostos por machos e fêmeas, variando entre 5 a 25 integrantes aproximadamente (Bissonete, 1982). Ele está presente em todos os biomas terrestres do Brasil (Paglia et al., 2012), além de ser encontrado desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina (Desbiez et al., 2012). Essa espécie de ungulado da família Tayassuidae possui uma dieta bem variada, alimentando-se de frutos, folhas, raízes, bulbos, dentre outros alimentos (Sowls, 1997). O fato de possuírem uma dieta em sua maior parte frugívora, os tornam dispersores e predadores de um grande número de sementes de espécies vegetais, sendo assim, possuem um papel fundamental na manutenção das florestas tropicais (Bodmer, 1991; Keuroghlian et al., 2009). No entanto, a pressão da caça e a fragmentação do habitat têm aumentado os riscos de extinção para essa espécie (Desbiez et al., 2012). Ademais, em algumas regiões do Brasil os animais dessa espécie podem ser encontrados tanto em áreas isoladas como próximas aos povoados e cidades, e isso, permite que eles sofram represálias por parte dos agricultores, já que ao entrarem em lavouras os catetos podem causar prejuízos (Desbiez et al., 2012). Embora o cateto ainda não tenha sido citado na Lista Nacional das Espécies Ameaçadas, em alguns estados do Brasil ele já é considerado ameaçado de extinção, inclusive no estado de Minas Gerais (Chiarello et al., 2008; Desbiez et al., 2012).

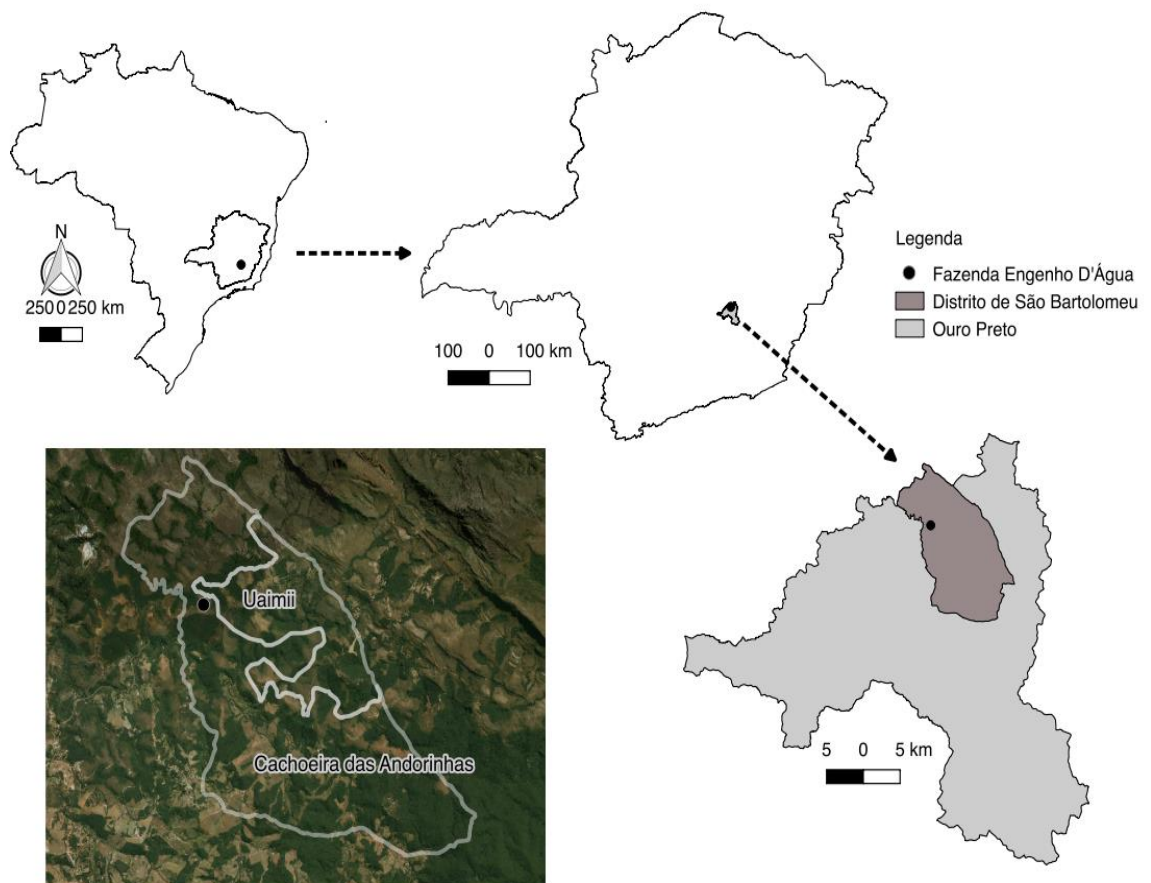
Neste sentido, a tentativa de reintrodução de catetos nascidos em cativeiro, em área de proteção ambiental, no seu habitat natural está sendo adotada no estado de Minas Gerais (Projeto Cateto, financiado pela empresa Vallourec, em parceria com a Universidade Federal de Ouro Preto, Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade de Salford (Reino Unido) e Instituto Estadual de Florestas em Minas Gerais), a fim de minimizar os riscos de extinção dessa espécie na região. No entanto, para que o processo de reintrodução seja bem-sucedido, além dos estudos genéticos, foram também desenvolvidos estudos comportamentais (Faria et al., 2018), parasitológicos e etnozoológicos, o que tornou esse processo mais completo, abrangendo vários aspectos importantes para a reintrodução de animais.

Considerando o declínio populacional que o *P. tajacu* vem sofrendo no estado de Minas Gerais, este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética dos indivíduos em cativeiro utilizando marcadores microssatélites. Os dados genéticos gerados serão utilizados para avaliar a viabilidade de reintrodução desse grupo cativo em seu habitat natural e, por fim, para propor medidas para o manejo e conservação dessa espécie.

## Material e Métodos

### Área de estudo e amostragem

Para o presente estudo foram obtidas amostras de sangue de 20 catetos cativos. Esses indivíduos foram amostrados de uma população com cerca de 70 catetos, todos nascidos em cativeiro, provenientes do criatório de animais silvestres da Fazenda Engenho D'Água, localizada no distrito de São Bartolomeu (20°15'41" S, 43°36'34" W), em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil (Figura 1). A fazenda está localizada na Área de Proteção Ambiental das Andorinhas e seu limite faz divisão com a Floresta Estadual Uaimií, sendo cadastrada no IBAMA sob o nº 002/2003, processo 02015.002962/2003-02 como uma Área de Soltura de Animais Silvestres (ASAS).



**Figura 1** - Localização dos indivíduos de *P. tajacu* amostrados na Fazenda Engenho D'Água.

Para a coleta da amostra biológica, os animais estudados foram sedados com a associação de acepromazina, na dose de 0,2 mg/Kg, diazepam (0,5 mg/Kg) e cetamina (5 mg/Kg), por aproximadamente 30 minutos. Os procedimentos de sedação foram realizados pelo profissional médico veterinário. Posteriormente, os animais foram pesados, sexados, marcados

com brincos plásticos, microchips e tinta sobre a pelagem. E, as amostras de sangue foram coletadas e estocadas à -20°C no Laboratório de Genética Evolutiva e de Populações da Universidade Federal de Ouro Preto para as análises genéticas. Após esses procedimentos os catetos foram separados em dois subgrupos e ficaram localizados em dois recintos de 625 m<sup>2</sup> cada, cercados com tela de arame e distanciando-se um do outro por cerca de 10 metros. Cada subgrupo foi composto por 10 indivíduos, 7 fêmeas e 3 machos (Tabela 1). Os catetos estudados representam a 11<sup>a</sup> geração nascida em cativeiro.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFOP) sob o número de protocolo 070/2015. A coleta de material biológico foi autorizada pelo SisBio sob o número 49492-1 e o acesso ao patrimônio genético dos catetos foi autorizado pelo SisGen sob o número de cadastro AD40BEE.

**Tabela 1** – Descrição dos catetos analisados. \*Equivale ao número do brinco do animal.

Subgrupo	Identificação*	Sexo	Faixa etária
1	1	Fêmea	Adulta
1	2	Macho	Adulta
1	3	Fêmea	Adulta
1	4	Macho	Adulto
1	5	Fêmea	Adulta
1	6	Macho	Subadulto
1	7	Fêmea	Adulta grávida
1	8	Fêmea	Jovem
1	9	Fêmea	Adulta (leite)
1	10	Fêmea	Subadulta
2	11	Macho	Jovem
2	12	Macho	Adulta
2	13	Fêmea	Adulta
2	14	Fêmea	Adulta
2	15	Fêmea	Adulta grávida
2	16	Fêmea	Jovem
2	17	Fêmea	Subadulta
2	18	Fêmea	Adulta
2	19	Fêmea	Adulta
2	20	Macho	Adulto

#### *Extração do DNA, amplificação e genotipagem*

O DNA genômico de cada indivíduo foi extraído utilizando o kit de extração DNeasy Blood & Tissue (Quiagen®, Hilden, Germany), seguindo ao protocolo de extração do fabricante. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídio (0,3 mg/ml). As concentrações das amostras de DNA foram determinadas no Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) e a pureza foi verificada no NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Para definir os

marcadores que iriam ser utilizados para a análise da diversidade genética do grupo de catetos, foi realizado um *screening* com 12 primers de *loci* microssatélites (Tabela 2) descritos na literatura para as famílias Tayassuidae (*P. tajacu* - Biondo et al., 2011 e *Tayassu pecari* – Dalla Vecchia et al., 2011) e Suidae (*Sus scrofa* - Rohrer et al., 1994).

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) foram conduzidas com volume final de 20,0µL contendo 4µL de 1X do tampão (Promega), 0,4µL de dNTPs (10mM de cada), 1,8µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1,0µL de cada *primer* (10µM), 0,5µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL - Promega) e 1,0µL de DNA (20ng/µL). Para as amplificações, o termociclador (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) foi programado com as seguintes condições: uma desnaturação inicial à 95°C por 3 minutos, seguida de 32 ciclos de amplificação, 95°C por 1 minuto, 55-64°C por 1 minuto para pareamento dos *primers* (de acordo com a temperatura de pareamento de cada primer – Tabela 2), e 72°C por 1 minuto para extensão e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Todas as reações de PCR foram realizadas com controles negativos.

**Tabela 2** - Relação de marcadores microssatélites selecionados para o *screening*.

<i>Locus</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'- 3')	Motivos de repetição	T (°C)	Referência
<b>PT0226</b>	F – ACA CAC ATA AAT ACA CAC ACA AG R – CAG AAT AAA AAG CTC CAC GAG AG	(CA) <sub>12</sub>	55	Biondo et al., 2011
<b>TPEC2</b>	F – GGT GTT GGG AAA ATT GGA R – GGA GTT TTA TGG CTT CAT GT	(AGAA) <sub>13</sub> ...(AGGA) <sub>5</sub> ...(GAAG) <sub>5</sub>	62	Dalla Vecchia et al., 2011
<b>TPEC3</b>	F – AAC TGT CTC CTG TAG GCA C R – TGA ACA GTT TAG AAA CGC TG	(AAGG) <sub>5</sub>	60	Dalla Vecchia et al., 2011
<b>TPEC4</b>	F – CAG TGG ACC AGA GAA AAC AT R – GGT AAA TAG CTA AAC TTG CCT	(AGAA) <sub>7</sub>	60	Dalla Vecchia et al., 2011
<b>TPEC9</b>	F – TCT TTG GAG AAT CGT CTG TT R – CAC TGG CAA GGG ATT AAT C	(TTTG) <sub>6</sub>	50	Dalla Vecchia et al., 2011
<b>TPEC10</b>	F – GAC TAG ATC TCA TGT TAA GTG TTT R – AGG GTA TAG AGT CCA GGA GC	(AC) <sub>14</sub>	64	Dalla Vecchia et al., 2011
<b>TPEC12</b>	F – CTA GCT GCA TCC CTG TTA CT R – CTA TCT GGA CGA AAC CGT AG	(GT) <sub>16</sub>	60	Dalla Vecchia et al., 2011
<b>TPEC13</b>	F – GCA TAG TTG TTT AGT TCT ACT CC R – CTA ATA CCT ATC TTG CTG GGA	(AAAC) <sub>5</sub>	60	Dalla Vecchia et al., 2011
<b>TPEC14</b>	F – TTT TCC AAC TGG ACT GAT TC R – TGA TAA ACC GTA TGG GAA AG	(TGAA) <sub>5</sub>	55	Dalla Vecchia et al., 2011
<b>TPEC18</b>	F – CTG GGA AGG TAT CTC AGG A R – ACC AGG TGG ATA CCA AGT TA	(TCTA) <sub>7</sub> (CCTA) <sub>7</sub>	60	Dalla Vecchia et al., 2011
<b>SW857</b>	F – TGA GAG GTC AGT TAC AGA AGA CC R – GAT CCT CCT CCA AAT CCC AT	(CA) <sub>22</sub>	60	Rohrer et al., 1994
<b>IGF1</b>	F – GCT TGG ATG GAC CAT GTT G R – CAC TTG AGG GGC AAA TGA TT	(CA) <sub>10</sub>	57	Rohrer et al., 1994

Sequências dos *primers*, motivos de repetição, temperatura de pareamento (T °C) e as referências dos primers. F: *forward*; R: *reverse*.

Os *amplicons* foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corados com nitrato de prata (Sambrook, 2001), durante quatro horas à 60 W. O processo de eletroforese

para cada microssatélite foi realizado pelo menos três vezes, para evitar possíveis erros durante essa etapa. O marcador de peso molecular *ladder* DNA de 100 pb (Kasvi, Brasil) foi empregado em todos os géis para estimar o tamanho dos fragmentos e os resultados foram comparados aos descritos na literatura (Biondo et al., 2011, Dalla Vecchia et al., 2011 e Rohrer et al., 1994). Os géis foram fotografados para determinação dos alelos e das análises estatísticas. Os marcadores que se mostraram polimórficos foram selecionados para o estudo da diversidade genética dos indivíduos em cativeiro. Os genótipos dos catetos foram determinados visualmente para cada *loci* microssatélite, aplicando a técnica de contagem dos alelos.

### *Diversidade genética*

O teste para verificar a frequência de alelos nulos foi realizado no FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007). A diversidade genética da população foi estimada por meio da caracterização do número de alelo por *locus* ( $N_a$ ), o número efetivo de alelos ( $N_e$ ), a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o índice de fixação ( $F$ ) no GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado no Cervus 3.0.3 (Marshall et al., 1998). O Genepop 4.7.0 (Raymond & Rousset, 1995) foi utilizado para calcular os desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação entre os pares de microssatélites. A correção de Benjamini e Yekutieli (BY - Benjamini & Yekutieli, 2001) foi aplicada ao valor  $P$  em ambos os testes.

### **Resultados**

O total de 12 marcadores microssatélites foram utilizados para a caracterização genética dos catetos (*P. tajacu*), e quatro desses marcadores foram monomórficos (PT0226, TPEC3, TPEC9 e TPEC13) e removidos das análises posteriores. Sendo assim, as análises foram realizadas com base em oito marcadores (TPEC2, TPEC4, TPEC10, TPEC12, TPEC14, TPEC18, SW857 e IGF1). Foram encontradas evidências de alelos nulos em quatro *loci* (TPEC2, TPEC4, TPEC14 e TPEC18). O número de alelos ( $N_a$ ) por *locus* variou de 4 a 11, com uma média de 8,0 alelos. O *locus* TPEC14 teve o menor número de alelos efetivos ( $N_e = 3,265$ ), enquanto SW857 foi o *locus* com o maior número de alelos efetivos ( $N_e = 8,0$ ); a média de alelos efetivos foi de 6,030 (Tabela 3).

O valor médio para a heterozigosidade observada foi 0,775, com os marcadores TPEC10, TPEC12, SW857 e IGF1 apresentando os maiores valores ( $H_o=1,00$ ) e o marcador TPEC2 o menor valor ( $H_o=0,300$ ). A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variou de 0,694 a 0,875 e a média para todos os *loci* foi de 0,823. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) variou

de 0,645 a 0,862, com o valor médio de 0,800. Os coeficientes de endocruzamento (F) variaram de -0,190 a 0,633, com o valor médio de 0,063 (Tabela 3). Seis marcadores apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy–Weinberg (TPEC2, TPEC4, TPEC12, TPEC18, SW857 e IGF1,  $P < 0,01840$ , após correção de BY). Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os pares de microssatélites ( $P < 0,01273$ , após correção de BY).

**Tabela 3** - Estimativas de diversidade genética para o grupo de *Pecari tajacu* em cativeiro, utilizando dados de oito *loci* microssatélites.

<i>Locus</i>	Na	Ne	Ho	He	PIC	F
<b>TPEC2*</b>	8,000	5,479	0,300	0,818	0,792	0,633
<b>TPEC4*</b>	8,000	5,298	0,650	0,811	0,789	0,199
<b>TPEC10</b>	9,000	6,250	1,000	0,840	0,822	-0,190
<b>TPEC12*</b>	8,000	6,557	1,000	0,848	0,829	-0,180
<b>TPEC14</b>	4,000	3,265	0,600	0,694	0,645	0,135
<b>TPEC18*</b>	8,000	7,143	0,650	0,860	0,843	0,244
<b>SW857*</b>	11,000	8,000	1,000	0,875	0,862	-0,143
<b>IGF1*</b>	8,000	6,250	1,000	0,840	0,820	-0,190
<b>Média</b>	8,000	6,030	0,775	0,823	0,800	0,063

Número de alelos (Na), número efetivo de alelos (Ne), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e índice de fixação (F).

\**Locus* desviando do equilíbrio HWE após correções de BY ( $p < 0,01840$ ).

## Discussão

No presente estudo, foram utilizados oito marcadores microssatélites para caracterizar geneticamente o grupo de catetos em cativeiro. Os marcadores apresentaram altos índices de diversidade genética, demonstrando que esse grupo é geneticamente diverso. O fato de os indivíduos fundadores da população de catetos da Fazenda Engenho D'Água terem vindo de seis regiões geográficas distintas, Ubá (oito indivíduos), Juiz de Fora (um indivíduo), Varginha (12 indivíduos), Passa Tempo (nove indivíduos), Três Pontas (um indivíduo), Montes Claros (um indivíduo), Minas Gerais, Brasil, de apreensões distintas realizadas pelo IBAMA, pode explicar os valores que indicaram os altos índices de diversidade genética encontrada nesse grupo, pois antes de serem levados para a fazenda os indivíduos não se acasalavam, portanto, cada um deles tinha a sua linhagem evolutiva distinta.

Mesmo representando a 11ª geração nascida em cativeiro na Fazenda Engenho D'Água, a média de alelos por *locus* encontrada neste estudo foi alta (Na=8,0), assim como os valores médios de heterozigosidade observada e esperada (Ho=0,775 e He=0,823). Marcadores que apresentam níveis de heterozigosidades iguais ou superiores a 70% são considerados altamente

polimórficos (Ott, 1992). O número de alelos encontrado neste estudo para os microssatélites SW857 e IGF1 (Na=11 e Na=8, respectivamente) foi superior ao encontrado por Biondo (2006) (Na=7 e Na=7, respectivamente). Os valores para as heterozigosidades observadas e esperadas também diferenciaram nos dois estudos, sendo que Biondo (2006) encontrou (SW857: Ho=0,94, He=0,87; IGF1: Ho= 0,65 e He=0,71) contra (SW857: Ho=1,00 e He=0,875; IGF1: Ho=1,00 e He=0,840) do presente estudo. Assim, esses resultados demonstram que apesar de ambos os microssatélites serem de *primers* heterólogos, desenvolvidos para a espécie *S. scrofa*, eles foram polimórficos nos dois estudos. Porém, no presente estudo eles foram mais polimórficos.

O valor médio do conteúdo de informação polimórfica (PIC=0,800) obtido neste trabalho, demonstra que os microssatélites empregados são informativos. Segundo Botstein et al. (1980), valores de PIC superiores a 0,5 indicam que os marcadores utilizados são altamente informativos. Dalla Vecchia (2011), estudando a variação genética em catetos, também encontraram valores de PIC (>0,5) para os *loci* (TPEC2, TPEC4, TPEC10, TPEC12, TPEC14 e TPEC18; valores entre 0,531 a 0,815), assim como foi encontrado neste estudo. Sendo assim, os resultados encontrados nos dois estudos demonstram que esses marcadores foram altamente informativos para a caracterização genética em ambos os estudos, entretanto, os valores aqui encontrados foram mais altos.

Desvios significativos ao equilíbrio de Hard-Weinberg foram observados em seis dos oito *loci* microssatélites. Os desvios nos marcadores TPEC2, TPEC4 e TPEC18 estão relacionados aos coeficientes de endocruzamento positivos ( $F > 0$ ) encontrados nesses microssatélites, e que evidenciaram um excesso de alelos em homozigose presente nesses *loci*. A deficiência de heterozigotos encontrada nos marcadores em questão pode ter sido provocada por fatores como tamanho populacional pequeno, endocruzamento ou em consequência da existência de subdivisões na população (efeito Wahlund) (Brookfield, 1996; Guan et al., 2009). Ainda, essa deficiência pode ter sido causada pela presença de alelos nulos, gerados como consequência de erros de genotipagem, um reflexo da metodologia aplicada ou por mutações na região de pareamento dos *primers* (López-Márquez et al., 2016).

Entretanto, no presente estudo, o efeito Wahlund pode ser o responsável pelo desvio apresentado nesses *loci*, dado que esse efeito ocorre quando subpopulações com frequências alélicas diferentes são agrupadas involuntariamente durante a amostragem, assim, mesmo que cada subpopulação esteja em equilíbrio, ao serem agrupadas elas não estarão, e isso acarretará numa deficiência de heterozigotos em toda a amostra (Dharmarajan et al., 2013). Como os catetos são indivíduos sociais e vivem em grupos que podem conter entre cinco a 25 integrantes,

provavelmente o grupo estudado ao ser amostrado da população de catetos da fazenda foi formado por indivíduos de diferentes subpopulações, já que a amostragem foi realizada aleatoriamente. Além do mais, os 70 indivíduos estavam todos localizados no mesmo recinto antes da captura dos animais estudados.

Por outro lado, nos *loci* TPEC12, SW857 e IGF1 a causa do desvio ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi o excesso de heterozigotos ( $F < 0$ ). O efeito Wahlund ou quebra do isolado, também pode ocasionar o aumento de heterozigotos em uma população, uma vez que esse efeito possui inúmeras consequências (Ridley, 2006). Sendo assim, o excesso de heterozigotos apresentado por esses *loci* pode ser atribuído a mistura de populações que estavam completamente isoladas e que tinham frequências alélicas diferentes, com a junção das populações (quebra do isolado) a frequência de homozigotos é reduzida e consequentemente a de heterozigotos é aumentada (Ebrahimi et al., 2017; Hartl & Clark, 2010; Ridley, 2006). Considerando que a população de catetos da Fazenda Engenho D'Água é formada por indivíduos que vieram de origens distintas, provavelmente a mistura desses indivíduos foi a responsável pelo excesso de heterozigose encontrada nesses *loci*.

Até então, nenhuma análise genética havia sido realizada com os catetos cativos aqui estudados, quando este estudo foi iniciado a população já estava estabelecida. Portanto, as análises moleculares desenvolvidas neste estudo foram fundamentais para o conhecimento do perfil genético de cada indivíduo e do grupo de catetos como um todo. Mas, apesar dos resultados obtidos neste trabalho serem representativos apenas de uma parte do *pool* gênico da população de catetos da fazenda, eles indicaram que o grupo estudado possui uma composição genética para fundar uma nova população silvestre.

No entanto, para que esse grupo persista após a reintrodução, é de fundamental importância que ele seja autossustentável, assim vários aspectos devem ser levados em consideração antes e após a soltura desses animais na natureza. É importante escolher um habitat ideal para esses indivíduos, técnicas para preparação dos animais, treinamento dos animais após o lançamento, alguns indivíduos devem ser equipados com rádio colares para acompanhamento dos movimentos do grupo, bem como o monitoramento dos nascimentos, mortes e relações de parentesco (*studbook*), dentre outros aspectos (Kleiman, 1989).

Considerando o declínio populacional que tem afetado a espécie *P. tajacu*, a implementação de ações direcionadas para a sua conservação são extremamente importantes, assim a recuperação de áreas degradadas, a proteção do habitat ocupado por essa espécie, medidas de proteção contra a caça predatória, bem como a implementação de mais programas



de reintrodução da espécie em ambientes onde ela se encontra ameaçada ou extinta são essenciais para a sua sobrevivência.

## Conclusões

Com este trabalho geramos dados genéticos a partir de marcadores moleculares microsatélites para uma espécie que se encontra ameaçada de extinção em alguns estados do Brasil, inclusive no estado de Minas Gerais, sendo que, o grau de ameaça pode variar de acordo com a região em que essa espécie se encontra inserida.

A partir deste estudo concluímos que a 11<sup>a</sup> geração de catetos nascida em cativeiro possui altos índices de diversidade genética, ou seja, esse grupo é geneticamente diverso. No entanto, os resultados encontrados representam apenas parte do *pool* gênico da população em cativeiro na Fazenda Engenho D' Água.

Os resultados gerados com este trabalho indicaram que o grupo estudado possui uma composição genética para a reintrodução na natureza, no entanto, a adoção de algumas estratégias antes e após a soltura dos indivíduos na natureza são fundamentais, para que em longo prazo o sucesso reprodutivo, a sobrevivência desses indivíduos e das próximas gerações não sejam comprometidos. Além do mais, este estudo em conjunto com os estudos comportamentais, parasitológicos e etnozoológicos, que juntos formaram o Projeto Catetos, podem se tornar modelo de manejo para espécies a serem reintroduzidas.

## Referências

- Arif, I. A. & Khan, H. A., 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32.1: 9–17.
- Benjamini, Y., Yekutieli, D., 2001. The control of false discovery rate under dependency. *Annals of Statistics*, 29: 1165-1188.
- Biondo, C., 2006. Estrutura social e alo-amamentação de catetos (*Tayassu tajacu*) em cativeiro. PhD thesis, Universidade de São Paulo.
- Biondo, C., Keuroghlian, A., Gongora, J., Miyaki, C. Y., 2011. Population genetic structure and dispersal in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) from the Brazilian Pantanal. *Journal of Mammalogy*, 92: 267-274.
- Bissonete, J. A., 1982. Ecology and social behavior of the collared peccary in BigBend National Park. *National Scientific Monograph Series*, 16: 85-95.
- Bodmer, R. E., 1991. Influence of digestive morphology on resource partitioning in Amazonian ungulates. *Oecologia*, 85: 361-365.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W., 1980. *Am J Hum Gen*, 32:314–331.

- Brookfield, J., 1996. A Simple New Method for Estimating Null Allele Frequency from Heterozygote Deficiency. *Mol Ecol*, 5:453–455.
- Burland, T. M., Wilmer, J. W., 2001. Seeing in the dark: molecular approaches to the study of bat populations. *Biological Review*, 76: 389–409.
- Byers, J. A., Bekoff, M., 1981. Social, Spacing, and Cooperative Behavior of the Collared Peccary, *Tayassu tajacu*. *Journal of Mammalogy*, 62(4): 767-785.
- Chapuis, M. P., Estoup, A., 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Ecology*, 24: 621–631.
- Charpentier, M. J. E., Williams, C. V., Drea, C. M., 2008. Inbreeding depression in ring-tailed lemurs (*Lemur catta*): genetic diversity predicts parasitism, immunocompetence, and survivorship. *Conserv Genet*, 9: 1605–1615.
- Chiarello, A. G., Aguiar, L. M. S., Cerqueira, R, Melo, F. R., Rodrigues, F. H. G., Silva, V. M., 2008. *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção: mamíferos ameaçados de extinção do Brasil*. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- Desbiez, A. L. J., Keuroghlian, A, Beisiegel, B. M., Medici, E. P., Gatti, A., Mendes Pontes A. R., Campos, C. B., Tófoli, C. F., Moraes Junior E. A., Azevedo F. C., Pinho G. M., Cordeiro, J. L. P., Júnior, T. S. S., Mornais A. A., Mangini, P. R., Fleisher, K., Rodrigues, L. F., Almeida, L. B., 2012. Avaliação do risco de extinção do cateto *Pecari tajacu* Linnaeus, no Brasil. *Biodiv Bras*, 3: 74–83.
- Dalla Vecchia, A. C., 2011. Variação genética em *Tayassu pecari* e em *Pecari tajacu*. Uma contribuição para a conservação dessas espécies. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Carlos.
- Dalla Vecchia, A. C., Biondo, C., Sanches, A., et al., 2011. Isolation and characterization of microsatellite loci for white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and cross-amplification in collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Conserv Genet Resour*, 3:151–154.
- Dharmarajan, G., Beatty, W. S., Rhodes, O. E., 2013. Heterozygote deficiencies caused by a Wahlund effect: Dispelling unfounded expectations. *J Wildl Manage*, 77:226–234.
- Ebrahimi, A., Zarei, A. K., McKenna, J. R., et al., 2017. Genetic diversity of Persian walnut (*Juglans regia*) in the cold-temperate zone of the United States and Europe. *Sci Hortic*, 220:36–41.
- Emmanuel Rajan, K. & Marimuthu, G., 2006. A Preliminary examination of genetic diversity in the Indian false vampire bat *Megaderma lyra*. *Animal Biodiversity and Conservation*, 29.2: 109–115.
- Faria, C. M., Sá, F. S., Costa, D. D. L., Silva, M. M., Silva, B. C., Young, R. J., Azevedo, C. S., 2018. Captive-born collared peccary (*Pecari tajacu*, Tayassuidae) fails to discriminate between predator and non-predator models. *Acta ethologica*, 21: 175-184.
- Frankham, R., 2003. Genetics and conservation biology. *Comptes rendus Biologies*, 326: S22–S29.

- Frankham, R.; Ballou, J. D., Briscoe, D. A., 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação*. SBG. 259 pp.
- Guan, T. L., Zeng, B., Peng, Q. K., et al., 2009. Microsatellite analysis of the genetic structure of captive forest musk deer populations and its implication for conservation. *Biochem Syst Ecol*, 37:166–173.
- Hartl, D. L., Clark, A. G., 2010. *Princípios de genética de populações*. 4<sup>rd</sup> ed. Sunderland MA: Sinauer Associates.
- Keuroghlian, A., Eaton, D. P., Desbiez, A.L.J., 2009. The response of a landscape species, white-lipped peccaries, to seasonal resource fluctuations in a tropical wetland, the Brazilian Pantanal. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 1 (4): 87-97.
- Kleiman, D. G., 1989. Reintroduction of Captive Mammals for Conservation: Guidelines for reintroducing endangered species into the wild Devra. *Bioscience*, 39:152–161.
- López-Márquez, V., Garcia-Jiménez, R., Templado, J., Machordom, A., 2016. Development and characterization of 26 novel microsatellite loci for the trochid gastropod *Gibbula divaricata* (Linnaeus, 1758), using Illumina MiSeq next generation sequencing technology. *PeerJ*, 4: e1789.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B., Pemberton, J. M., 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7: 639-655.
- McPhee, M. E., 2003. Generations in captivity increases behavioral variance: considerations for captive breeding and reintroduction programs. *Biological Conservation*, 115: 1–77.
- Ott, J., 1992. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am J Hum Genet*, 51:283–90.
- Paglia, A.P., Fonseca, G. A. B. da, Rylands, A. B., Herrmann, G., Aguiar, L. M. S., Chiarello, A. G., Leite, Y. L. R., Costa, L. P., Siciliano, S., Kierulff, M. C. M., Mendes, S. L., Tavares, V. da C., Mittermeier, R. A. & Patton J. L., 2012. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2<sup>a</sup> Edição / 2nd Edition. *Occasional Papers in Conservation Biology*, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76pp.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2012. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6, 288–295.
- Ralls, K., Ballou, J. D., 1986. Proceedings of the workshop on genetic management of captive populations. *Zoo Biology*, 1: 19-22.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Reis, N. R., Peracchi, A. L., Pedro, W. A., Lima, I. P., 2006. *Mamíferos do Brasil*. 2<sup>rd</sup> Edition. Londrina.PR: Universidade Estadual do Paraná.
- Ridley, M., 2006. *Evolução*. Editora Artmed, São Paulo.
- Rohrer, G.A., Alexander, L.J., Keele, J.W., Smith, T.P., Beattie, C.W., 1994. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics*, 136-231.

- Sakthivel, M., Tamilmani, G., Abdul Nazar, A. K., Jayakumar, R., Sankar, M., Rameshkumar, P., Anikuttan, K. K., Samal, A. K., Anbarasu, M., Gopakumar, G. 2019. Genetic variability of a small captive population of the cobia (*Rachycentron canadum*) through pedigree analyses. *Aquaculture*, 498: 435–443.
- Sambrook, J., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sowls, L. K., 1997. *Javelinas and other peccaries: their biology, management, and use*. Texas A e M University Press, College Station.
- Tavecchia, G., Viedma, C., Martínez-Abraín, A., et al., 2009. Maximizing re-introduction success: Assessing the immediate cost of release in a threatened waterfowl. *Biol Conserv*, 142:3005–3012.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

**Frequências alélicas dos *loci* microssatélites utilizados para a caracterização da diversidade genética**

Alelo	<i>Locus/Frequência</i>							
	TPEC2	TPEC4	TPEC10	TPEC12	TPEC14	TPEC18	SW857	IFG1
1	0,025	0,325	0,025	0,200	0,150	0,125	0,025	0,200
2	0,250	0,200	0,275	0,225	0,450	0,150	0,075	0,150
3	0,025	0,100	0,150	0,125	0,175	0,150	0,075	0,175
4	0,200	0,100	0,150	0,100	0,225	0,100	0,125	0,225
5	0,175	0,100	0,050	0,050		0,175	0,025	0,075
6	0,075	0,100	0,125	0,125		0,125	0,125	0,075
7	0,050	0,050	0,050	0,125		0,150	0,125	0,050
8	0,200	0,025	0,125	0,050		0,025	0,025	0,050
9			0,050				0,050	
10							0,200	
11							0,150	

## ANEXO B

Genótipos dos animais para os *loci* microsatélites analisados

Indivíduo	<i>Locus</i>							
	TPEC2	TPEC4	TPEC10	TPEC12	TPEC14	TPEC18	SW857	IFG1
1	3/4	6/6	6/7	3/4	3/3	7/3	6/7	1/2
2	4/4	6/6	4/2	7/8	1/2	7/3	4/7	3/4
3	5/5	7/8	2/3	3/4	1/2	7/3	2/3	1/2
4	5/2	2/4	4/2	1/2	3/3	5/5	4/7	1/4
5	7/7	2/4	4/5	7/8	1/1	5/5	6/7	1/2
6	4/4	7/4	2/3	7/6	2/2	3/3	2/4	3/4
7	1/2	2/5	8/2	7/6	2/2	7/8	10/4	5/6
8	5/5	5/5	4/6	3/4	2/2	5/5	10/3	3/4
9	2/2	2/3	4/6	7/6	1/2	1/3	10/11	1/2
10	6/6	1/1	6/3	1/2	1/2	5/6	5/6	1/2
11	8/8	1/4	1/2	1/2	3/2	2/4	6/7	1/2
12	8/8	1/1	4/5	3/2	3/2	1/2	10/11	1/4
13	8/8	1/1	2/3	5/6	3/2	1/2	10/11	5/6
14	5/2	5/3	9/3	1/2	4/4	6/6	10/11	3/4
15	4/4	1/2	8/9	1/2	4/4	6/6	9/6	5/6
16	8/8	1/2	8/2	1/2	2/4	1/2	10/11	3/4
17	2/2	1/3	8/2	5/6	2/4	2/4	10/11	3/4
18	4/2	1/2	8/2	1/2	2/4	2/4	8/4	3/4
19	5/6	1/1	2/3	3/4	2/4	7/7	9/3	7/8
20	2/2	2/3	6/7	1/2	2/4	1/4	1/2	7/8