Danilo Aqueu Rufo

Parentesco e diferenciação genética em queixadas
(*Tayassu pecari*) do Pantanal Matogrossense (MS)

Relatedness and genetic differentiation of white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) from the Brazilian Pantanal

São Paulo
2012

1

2

1 - Queixada (*Tayassu pecari*). 2 - Grupo social de queixadas do Pantanal Matogrossense (MS). Fotos de armadilha fotográfica cedidas por Alexine Keuroghlian.

Danilo Aqueu Rufo

Parentesco e diferenciação genética em queixadas
(*Tayassu pecari*) do Pantanal Matogrossense (MS)

Relatedness and genetic differentiation of white-
lipped peccaries (*Tayassu pecari*) from the Brazilian
Pantanal

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo, para a obtenção de
Título de Mestre em Biologia, na Área de Genética e
Biologia Evolutiva.

Orientador(a): Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki

São Paulo
2012

Rufo, Danilo Aqueu
Parentesco e diferenciação genética
em queixadas (*Tayassu pecari*) do Pantanal
Matogrossense (MS)
Número de páginas: 58

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. Parentesco 2. Estrutura genética
populacional 3. *Tayassu pecari* 4.
Mamíferos I. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Cristina Yumi Miyaki
Orientador(a)

Aos meus pais, Divanir e Edson, com amor.

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

Certeza - Fernando Sabino

Agradecimentos

À Professora Dra. Cristina Yumi Miyaki por continuar me acolhendo em seu laboratório, por contribuir com discussões para este trabalho, por confiar em mim e por estar sempre disposta a parar tudo que está fazendo quando bato à sua porta.

À Professora Dra. Cibele Biondo, pessoa incrível e excelente pesquisadora, sempre acreditou e confiou em mim. Sou muito grato em tê-la como coorientadora e, principalmente, como amiga!

À Dra. Alexine Keuroghlian, americana doidinha que muito me ajudou ao longo do mestrado, com discussões, viagem a campo e por ceder as amostras.

Aos amigos de LGEMA: Adriana, Ana Cris, André, Bruno, Carol, Fábio, Flávia, Henrique, Marcos, Natália, Rafaella, Ricardo e Tiago. Grandes ajudas, muitas instruções, ricas discussões e muitas risadas. Vocês são demais!

Às amigas de faculdade, Gabriela Nardocci, Karina Giannotti e Patrícia Klinkers, que tanto tempo após o término da faculdade continuam a me aturar. Foram poucas amizades que sobraram, mas são verdadeiras. Espero que a nossa amizade perdure para sempre!

Aos amigos feitos na USP: Adam, Carol, Célia, Felipe, Juliana Jordão, Juliana Emilia, Mari, Renan, Rivi, e Rodrigo.

À Diva e Edson, pessoas humildes que me ensinaram a dar valor às pequenas coisas, além de contribuírem imensamente para a formação do meu caráter e comportamento perante a sociedade. Aprendi com vocês que momentos difíceis vêm e vão e que o importante é não desistir. Meus eternos orientadores. Amo Vocês!

À Daniele, eterna irmãzinha, que tanto apronta até hoje. A cada dia que passa temos menos contato mesmo morando na mesma casa. Quem foi que disse que é fácil ser adulto?! Conte sempre comigo. Amo-te!

Aos meus irmãos de quatro patas, Pitucha e Pipoca, sempre dispostos a me alegrar e como sabem fazer isso! Nada melhor do que este casal lindo latindo, pulando, lambendo e abanando o rabo de alegria quando chego em casa.

À Raquel Daffre, pequena grande amiga, que ressurgiu em minha vida trazendo muitas coisas boas.

À Amanda Talitha Rodrigues, pessoa incrível e muito especial que entrou em minha vida e que, mesmo sem saber, me deu muita força na fase final do mestrado. Que seja eterno enquanto dure! E que dure eternamente!

À FAPESP pela bolsa concedida e reserva técnica.

À CAPES, CNPq e WCS-Brasil, que também contribuíram financeiramente para o meu projeto.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Biodiversidade e Computação da Universidade de São Paulo (NAP BioComp).

A todos os demais que não foram citados anteriormente, mas que fizeram parte deste árduo percurso que ainda está longe de terminar.

Índice

I – Resumo.....	1
II - <i>Abstract</i>	2
III – Introdução.....	3
III.I - Estrutura social e parentesco.....	3
III.II - Estrutura genética populacional.....	5
III.III - Características gerais da espécie <i>Tayassu pecari</i>	6
IV - Objetivos.....	9
V - Material e Métodos.....	10
V.I - Área de estudo e amostragem.....	10
V.II - Extração do DNA.....	11
V.III - Microssatélites: amplificação e genotipagem.....	13
V.IV - Análise dos microssatélites.....	15
V.V - Análise de parentesco.....	16
V.VI - Análise de estrutura genética populacional.....	19
VI - Resultados.....	21
VI.I - Diversidade genética.....	21
VI.II - Parentesco.....	25
VI.III - Estrutura genética populacional.....	38
VII - Discussão.....	41
VII.I - Diversidade genética.....	41
VII.II - Parentesco.....	43
VII.III - Estrutura genética populacional.....	46
VIII - Conclusões.....	48
IX - Referências Bibliográficas.....	49

I - Resumo

Queixadas (*Tayassu pecari*) são mamíferos ungulados sociais que vivem em bandos que facilmente ultrapassam 100 indivíduos. Os objetivos do presente estudo foram: 1) avaliar se há relação entre o parentesco e a estrutura social das queixadas e 2) re-analisar se há diferenciação genética entre queixadas de duas localidades do Pantanal do Mato Grosso do Sul, utilizando maior amostragem de indivíduos e de marcadores microsatélites. Foram genotipadas 184 amostras de queixadas (53 da Fazenda Rio Negro, RN e 131 da Fazenda Santa Emília, SE) para 15 microsatélites. O número de alelos encontrados variou de 2 a 12, com média de 4,60 em RN e 5,07 em SE. Embora o número de alelos médio foi significativamente maior em SE do que em RN ($p < 0,05$), a riqueza alélica média (4,59 na RN e 4,69 na SE) e as heterozigosidades médias observada e esperada (0,50 e 0,53 na RN e 0,55 e 0,55 na SE, respectivamente) foram similares em ambas as localidades, ($p > 0,05$). A mediana do coeficiente de parentesco em ambas as localidades foi significativamente maior entre os indivíduos de mesmo grupo de coleta do que entre os indivíduos de grupos de coleta diferentes, tanto para a análise incluindo todos os indivíduos como para a análise sem os indivíduos jovens. Isso sugere que tal resultado não é influenciado por possível captura de um jovem com seu progenitor. De forma similar, a mediana do coeficiente de parentesco considerando o sexo dos indivíduos (macho/macho, macho/fêmea e fêmea/fêmea) dentro e entre os grupos de coleta foi significativamente maior entre as categorias dentro dos grupos de coleta do que entre os grupos de coleta, tanto com os indivíduos jovens como sem os indivíduos jovens. Tais resultados sugerem que o parentesco possui influência na formação dos grupos sociais. O valor de F_{ST} encontrado entre as localidades foi de 0,017 e significativamente diferente de zero e o valor de D_{EST} foi de 0,015. A análise Bayesiana, assumindo o modelo de mistura entre as populações e frequências alélicas correlacionadas, apontou o valor de $K=1$ como sendo o mais provável. Quando a localidade de coleta foi informada, o valor de K mais provável foi de 2 e os agrupamentos corresponderam exatamente às localidades amostradas. Esses resultados indicam que as queixadas das duas localidades estudadas compõem duas populações com alto fluxo gênico entre elas.

II - Abstract

White-lipped peccaries (*Tayassu peccary*) are social ungulates that live in herds of usually more than 100 individuals. The aims of the present study were: 1) to evaluate whether there is any correlation between relatedness and social structure of white-lipped peccaries and 2) to re-examine whether there is significant genetic differentiation in white-lipped peccaries from two adjacent locations of the Brazilian Pantanal, based on a larger sample of individuals and of microsatellite markers. In total, 184 peccaries (53 from Fazenda Rio Negro, RN and 131 from Fazenda Santa Emilia, SE) were genotyped for 15 microsatellites. The number of alleles observed per microsatellite varied from 2 to 12, with a mean of 4.60 in RN and 5.07 in SE. Although the mean number of alleles was significantly higher in SE than in RN ($p < 0.05$), the mean allelic richness (4.59 in RN and 4.69 in SE) and mean observed and expected heterozygosities (0.50 and 0.53 in RN and 0.55 and 0.55 in SE, respectively) were similar in both locations ($p > 0.05$). The median of the coefficient of relatedness in both locations was significantly higher between individuals captured together than between individuals from different capture groups, both for the analyses including all individuals as for the analyses without the youngsters. This suggests that this result is not influenced by the possible capture of a young with its parent. Similarly, the median of the coefficient of relatedness according to gender (male vs. male, male vs. female, and female vs. female) was significantly higher within than among capture groups, including or excluding young individuals. Those results suggest that relatedness has some importance in the social structure of white-lipped peccaries. The F_{ST} between the locations was 0.017 and significantly different from zero and the D_{EST} was 0.015. The Bayesian analysis, assuming the model of population mixture and correlated allele frequencies, showed that the most likely K was 1. When the collection site was included in the analysis, the most likely value of K was 2 and the clusters corresponded exactly to the locations of origin of the samples. Those results suggest that the white-lipped peccaries of the two sites studied comprise two populations with high levels of gene flow between them.

III - Introdução

III.I - Estrutura social e parentesco

Diversas espécies de mamíferos se organizam em grupos sociais (Storz, 1999). Van Horn *et al.* (2007) afirmam que em espécies onde os benefícios de se viver em grupo são maiores do que os custos, os indivíduos raramente ou nunca vivem sozinhos. Entre os benefícios, se encontram a rápida detecção e defesa contra predadores e melhora na estratégia de forrageamento (localização, obtenção e proteção do alimento); e entre os custos, a maior susceptibilidade à transmissão de doenças e de parasitas e maior competição por alimentos e outros recursos (Hughes, 1998; Alcock, 2011). Segundo Hamilton (1964), animais que vivem em grupos podem se beneficiar ainda mais quando se associam e cooperam com parentes próximos, do que com parentes distantes ou com indivíduos sem nenhum grau de parentesco, por conta da seleção de parentesco (no inglês, *kin selection*). A seleção de parentesco foi proposta com o intuito de explicar o comportamento altruísta (comportamento que gera uma diminuição – aparente – no sucesso reprodutivo do indivíduo que efetua tal comportamento e um aumento no sucesso reprodutivo do indivíduo que recebe o comportamento).

A associação de indivíduos aparentados pode gerar uma estruturação social promovendo estruturação genética e endocruzamento, já que os indivíduos tendem a se reproduzir dentro do grupo (Storz, 1999). Entretanto, mecanismos de reconhecimento dos indivíduos aparentados podem evitar a ocorrência de endogamia, já que acasalamentos endogâmicos devido à proximidade física dos irmãos, filhos e pais, geralmente são mais raros do que se espera pela proximidade (Frankham *et al.*, 2004). Além disso, o grau de estruturação genética em populações socialmente estruturadas sofre a influência de outros fatores comportamentais como, por exemplo, o sistema de acasalamento e o padrão de dispersão da espécie (Storz, 1999).

Lawson-Handley e Perrin (2007) discutem que existem pressões seletivas que favorecem ou não a dispersão. Dentre as que não favorecem a dispersão se encontram: (i) indivíduos que dispersam podem estar sujeitos a custos significativos de mortalidade por cruzarem habitats

desfavoráveis até encontrarem um local apropriado; (ii) familiaridade com o local natal é importante quando a aquisição de recursos envolve interações complexas com o ambiente, gerando desvantagem para o migrante na região nova em que ele se instala; e (iii) os benefícios com a cooperação entre indivíduos aparentados promove vantagem adicional para os indivíduos residentes em relação ao imigrante recém chegado. Estas pressões são importantes nas espécies sociais que possuem um bom reconhecimento dos indivíduos aparentados (Lawson-Handley & Perin, 2007). Dentre as pressões que favorecem a dispersão pode-se citar: (i) deixar o local natal quando os recursos estão esgotados; (ii) evitar competição por recursos ou por parceiros com indivíduos aparentados; e (iii) evitar a endogamia e, portanto, a depressão endogâmica (Greenwood, 1980; Dobson, 1982; Wolff, 1993; Lawson-Handley e Perrin, 2007).

Geralmente, indivíduos de um dos sexos dispersam do grupo natal, enquanto os do sexo oposto permanecem no grupo onde nasceram (Greenwood, 1980). Segundo Lawson-Handley e Perin (2007), a dispersão do grupo natal para procriar é um dos aspectos mais importantes na história de vida do organismo. Nas espécies poligínicas e na maioria das espécies promíscuas de mamíferos, os machos enfrentam intensa competição por parceiras sendo, portanto, o sexo que dispersa e as fêmeas são filopátricas. Já nas espécies monogâmicas, a competição por parceiros é mais equilibrada entre os sexos e ambos dispersam com frequência semelhante (Dobson, 1982).

Nas espécies onde indivíduos de apenas um dos sexos dispersam, indivíduos do sexo que é filopátrico podem se organizar em grupos sociais que promovem um reforço contra a pressão de dispersão, favorecendo ainda mais a manutenção da dispersão diferencial entre os sexos (Lawson-Handley e Perrin, 2007). Entretanto, alguns resultados fogem do padrão comumente observado: Douadi *et al.* (2007), estudando gorilas (*Gorilla gorilla gorilla*) não encontraram nível de dispersão diferente entre os sexos, mesmo os gorilas formando grupos com um macho e três fêmeas adultas. Hammond *et al.* (2006) encontraram dispersão das fêmeas em uma espécie poligínica de babuíno (*Papio hamadryas hamadryas*).

Estimar o grau de parentesco permitiria compreender melhor como e se este fator influencia o padrão de dispersão e a composição dos grupos sociais de uma determinada espécie. Metodologias moleculares permitem mensurar a similaridade genética entre indivíduos e, com isso, inferir relações de parentesco (Berg *et al.*, 2009). Os marcadores moleculares mais utilizados para este fim são os microssatélites, devido ao seu alto grau de polimorfismo (Queller *et al.*, 1993). A estimativa de parentesco é influenciada pela heterozigosidade, número de microssatélites utilizados, frequência alélica e as relações de parentesco em questão a serem analisadas (Wang, 2002).

Assim, inferir relações de parentesco é de fundamental importância para inúmeros tipos de estudos como, por exemplo, comportamento de dispersão (ex.: Radespiel *et al.*, 2008), sistema de acasalamento (ex.: Di Fiore e Fleischer, 2005), papel da seleção de parentesco nas relações sociais (Sutherland *et al.*, 2005), bem como o sucesso reprodutivo de cada indivíduo (Hughes, 1998).

III.II - Estrutura genética populacional

Há diversas definições para descrever uma população baseadas em diferentes enfoques: ecológico, evolutivo, entre outros (revisão em Waples e Gaggiotti, 2006). A definição de população que adotaremos aqui é: um grupo de organismos, geralmente sexuais que inter cruzam e compartilham um conjunto gênico (totalidade de genes de uma população, em um determinado momento; Ridley, 2006).

As populações naturais podem mudar de tamanho, composição e densidade; e, em função do espaço, podem se fragmentar em subpopulações ou até mesmo se fundir com outras (Hey e Machado, 2003). Duas populações recentemente separadas no espaço podem iniciar um processo de diferenciação genética (estruturação genética populacional), ou seja, dado o devido tempo é possível que as frequências alélicas das populações se diferenciem por deriva e/ou seleção (Hartl e Clark, 2010). Nesse processo, outros fatores importantes são a distância geográfica separando os grupos de organismos e a própria biologia da espécie (Hartl e Clark, 2010). Por exemplo, espécies com grande poder de dispersão, podem manter o fluxo gênico mesmo entre grupos isolados por

grandes distâncias. Como exemplo, Bryja *et al.* (2009) encontraram fraca estrutura genética populacional em duas espécies de morcegos (*Pipistrellus pipistrellus* e *P. pygmaeus*), que são amplamente distribuídos pela Europa, e explicam tal resultado por um possível comportamento migratório. Luca *et al.* (2009) também encontraram baixa, porém significativa, estruturação no norte do oceano Atlântico em uma espécie de golfinho (*Delphinus delphis*), com distribuição em águas temperadas a tropicais. Essa caracterização da estrutura populacional de uma determinada espécie é necessária para identificar possíveis barreiras contemporâneas e históricas para a dispersão efetiva, para estudar especiação ecológica e para delinear unidades de manejo na biologia da conservação (Haasl e Payseur, 2011).

A utilização de marcadores moleculares para se avaliar a estrutura genética populacional vem sendo amplamente empregada e, entre os marcadores mais utilizados estão os microssatélites e os SNPs (do inglês *single nucleotide polymorphisms*). Haasl e Payseur (2011) avaliaram que microssatélites são em geral mais eficientes em relação aos SNPs para analisar estruturação genética contemporânea, exigindo um menor número de marcadores, devido à taxa mutacional mais elevada. Além disso, uma amostragem representativa também é necessária para auxiliar na identificação de estruturação genética populacional (Hubisz *et al.*, 2009).

III.III - Características gerais da espécie *Tayassu pecari*

As queixadas (*Tayassu pecari*), conhecidas popularmente como porcos-do-mato, pertencem à família Tayassuidae. Esta família é formada pelas queixadas, catetos (*Pecari tajacu*) e taguás (*Catagonus wagneri*), e juntamente com a família Suidae (porcos verdadeiros), forma a subordem Suiformes (Classe Mammalia, Ordem Cetartiodactyla – Price *et al.*, 2005).

As queixadas possuem um padrão de pelagem que varia de marrom escura à negra com a região do queixo branca (Mayer e Brandt, 1982). Possuem uma ampla distribuição que se estende desde Veracruz e Oaxaca, no sul do México, até Entre Rios, no norte da Argentina, e estão principalmente associadas a florestas tropicais úmidas (Mayer e Wetzel, 1987). São

preferencialmente frugívoras, embora possam consumir alguns produtos animais, como insetos e pequenos vertebrados (Sowls, 1984). A reprodução não é sazonal, nascimentos ocorrem durante todos os meses do ano e o período de gestação tem duração média de 250 dias e o tamanho da ninhada varia de um a três filhotes, com média de 1,67 ($\pm 0,53$) filhotes (Gottdenker e Bodmer, 1998).

As queixadas são animais sociais que vivem em bandos que facilmente ultrapassam 100 indivíduos (Kiltie e Terborgh, 1983; Altrichter e Almeida, 2002; Keuroghlian *et al.*, 2004). Esses bandos são constituídos de animais de diferentes faixas etárias e de ambos os sexos (Sowls, 1984) e ocupam grandes áreas de vida, em torno de 1.500 a 20.000 ha (Kiltie e Terborgh, 1983; Fragoso, 1998; Carrillo *et al.*, 2002; Keuroghlian *et al.*, 2004). O tamanho e o uso da área de vida podem variar sazonalmente. Na Amazônia Peruana, essas variações parecem ocorrer em resposta à inundação sazonal da bacia Amazônica (Bodmer, 1990). Outros estudos apontam que a disponibilidade sazonal de frutos influencia os movimentos dos bandos de queixadas (Carrillo *et al.*, 2002; Keuroghlian *et al.*, 2004). Keuroghlian *et al.* (2004) relataram que os bandos são subdivididos em sub-bandos que se fundem e se dividem periodicamente e que pode haver troca de indivíduos entre os sub-bandos durante os ciclos de fissão-fusão. Esses autores sugerem que a disponibilidade sazonal dos frutos pode favorecer também esse padrão de fissão-fusão dos bandos de queixadas. Mais recentemente, Biondo *et al.* (2011) encontraram fraca diferenciação genética entre dois bandos de queixadas no Pantanal do Mato Grosso do Sul distantes em cerca de 80 quilômetros. Além disso, ao contrário do padrão observado na maioria das espécies de mamíferos, Biondo *et al.* (2011) sugerem, baseados em dados genéticos, que há dispersão de ambos os sexos.

Pouco se sabe a respeito da composição dos bandos de queixada em termos de parentesco e da influência dessa variável na estrutura social dessa espécie bem como no padrão de dispersão. Assim, a determinação do grau de parentesco entre os indivíduos dentro dos bandos é de fundamental importância para um melhor entendimento sobre seu comportamento social e acrescentar informações ao que já se sabe a respeito da biologia da espécie.

As queixadas estão quase ameaçadas de extinção segundo a IUCN (*International Union for Conservation of Nature*). Embora as queixadas não sejam consideradas ameaçadas pela IUCN, a diminuição no tamanho populacional em algumas localidades e extinções locais, como é o caso da Floresta Atlântica, devido à pressão de caça e fragmentação do habitat, vêm ocorrendo (Chiarello, 1999, Cullen Jr *et al.*, 2000, Galetti *et al.*, 2009); tanto que estão incluídas no Apêndice II da CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagem em Perigo de Extinção), indicando que há alguma preocupação quanto à sua conservação. No Brasil, o *status* de conservação das queixadas foi analisado de forma separada para cada um dos principais biomas (Keuroghlian *et al.*, 2012). Mesmo o Pantanal sendo considerado um bioma relativamente bem conservado, Keuroghlian *et al.* (2012) classificaram as queixadas do Pantanal como quase ameaçadas, devido a evidências de que no futuro algumas ameaças como, perda de habitat de floresta contínua, caça, fogo e efeitos de doenças infecciosas, possam colocar as queixadas em risco na região.

IV - Objetivos

O presente estudo tem como objetivos gerais avaliar se existe relação entre o parentesco e a estrutura social de queixadas (*Tayassu pecari*) de duas localidades no Pantanal (MS) e re-analisar o nível de diferenciação genética entre queixadas dessas duas localidades.

Como objetivos específicos, pretende-se:

- Utilizar os dados de microssatélites para obter índices de parentesco médios entre indivíduos capturados em uma mesma armadilha (aqui denominado como grupo de coleta) e entre indivíduos de diferentes grupos de coleta. Assumindo-se que os indivíduos capturados juntos são mais próximos na estrutura social, se houver influência do parentesco na formação dos grupos sociais, espera-se encontrar coeficiente de parentesco médio significativamente maior entre indivíduos de mesmo grupo de coleta do que entre indivíduos de diferentes grupos de coleta.
- Avaliar se a análise de mais 112 indivíduos e de oito microssatélites confirmam resultados de Biondo *et al.* (2011) que indicam baixa diferenciação genética entre queixadas das duas localidades.

V - Material e Métodos

V.I - Área de estudo e amostragem

Amostras de sangue ou pêlo de queixadas foram coletadas pela Dra. Alexine Keuroghlian (WCS-Brasil) de dois bandos na região da Nhecolândia no Pantanal do Mato Grosso do Sul (Figura 1): Fazenda Rio Negro, no baixo Rio Negro (RN - S 19°34'52"; W 56°14'74") e Fazenda Santa Emília, no alto Rio Negro (SE - S 19°32'41"; W 55°33'46"). As duas localidades encontram-se distantes em aproximadamente 80 km em linha reta. Segundo a Dra. Keuroghlian, cada localidade corresponde a um bando de queixadas. A Fazenda Rio Negro abrange uma área de 7.647ha onde cerca de 7.000ha corresponde a uma reserva privada destinada a pesquisa e ecoturismo e o restante é utilizado para criação de gado. A região é caracterizada por florestas, algumas áreas abertas associadas a vazantes, e diversos lagos. A região aqui denominada genericamente de Fazenda Santa Emília é formada por três fazendas: Fazenda Campo Lourdes com 5.700ha, Fazenda Santa Maria Pica Pau com 4.400ha e Fazenda Santa Emília com 2.600ha e possui um misto de áreas muito bem preservadas com áreas altamente alteradas.

A Dra. Keuroghlian coletou 184 amostras, sendo 53 provenientes de RN (19 machos e 34 fêmeas) e 131 de SE (47 machos e 84 fêmeas). Os animais foram capturados em armadilhas que consistiam em um cercado contendo alimento em seu interior. Os indivíduos que foram capturados juntos em uma armadilha foram considerados como pertencentes a um grupo de coleta. Cada animal foi sedado com zolazepam–tiletamine (Zoletil, 0,9 ml/10 kg) usando-se uma zarabatana para permitir a coleta de amostras, a identificação do sexo e a estimativa da idade baseado no desgaste dos dentes (Keuroghlian e Desbiez, 2010). As amostras de sangue (cerca de 4 ml) foram coletadas em tubos a vácuo contendo EDTA e congelados a -20°C. Os pêlos (cerca de 30 de cada animal) foram armazenados em envelopes individuais. As amostras foram então encaminhadas ao Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves, no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, onde foram armazenadas a -20°C até serem processadas.

Figura 1: Mapa da região do Pantanal indicando as duas localidades amostradas, Fazenda Rio Negro e Fazenda Santa Emília. Fonte: Don Eaton.

V.II - Extração do DNA

As amostras de sangue (53 de RN e 64 de SE) tiveram seu DNA extraído por meio de um protocolo com proteinase K e fenol-clorofórmio (modificado de Sambrook *et al.*, 1989). O protocolo resumido está descrito a seguir.

- 1 - misturar 200 µl da amostra de sangue com 1 ml de *Bloodlysis* 1X (NH_4Cl 155mM, KHCO_3 10mM e EDTA 1mM pH 7,4) e deixar no gelo por 30-40 min.;
- 2 - centrifugar a 12.000 rpm por 15 min. e descartar o sobrenadante;
- 3 - adicionar 400 µl de *Bloodlysis* 1X e homogeneizar;
- 4 - repetir os passos 2 e 3 até obter um precipitado claro;
- 5 - adicionar ao precipitado 60 µl de *Nucleolysis* 1X (TrisHCl 10mM pH 8,0, NaCl 400mM e EDTA 2mM pH 8,2) e homogeneizar;

- 6 - adicionar 20µl de Proteinase K (20 mg/ml) e 13 µl SDS 25% e misturar cuidadosamente;
- 7 - deixar em estufa a 37°C por uma noite;
- 8 - adicionar um volume de Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizar;
- 9 - centrifugar a 12.000 rpm por 10 min., recolher o sobrenadante e transferir para outro tubo;
- 10 - adicionar ao sobrenadante dois volumes de Etanol absoluto;
- 11 - centrifugar a 12.000 rpm por 10 min. e descartar o sobrenadante;
- 12 - adicionar ao precipitado 300 µl de Etanol 70%;
- 13 - centrifugar a 12.000 rpm por 10 min. e descartar o sobrenadante;
- 14 - secar o precipitado com centrifugação a vácuo por cerca de 20 min.;
- 15 - dissolver em 100 µl de TE (TrisHCL 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 7,6);
- 16 - conservar a 4°C.

Após as extrações, foi realizada a quantificação da concentração do DNA. Para isso, 1,0 µl de cada amostra foi carregado em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X a 100 V, junto com três padrões de DNA de concentrações conhecidos de 62,5; 125; 250 ng/µl, utilizados para estimar a quantidade de DNA presente nas amostras por comparação da intensidade das bandas. Tanto as amostras, quanto os padrões, foram carregadas no gel com 2,0 µl de uma solução de tampão de aplicação e Gel Red (Biotium). A visualização das bandas foi feita em transiluminador UV e o gel foi fotografado para consultas posteriores. Uma alíquota de cada amostra de DNA foi diluída em água Milli Q para 20 a 30 ng/µl para utilização nas reações de PCR.

As amostras de pêlo (67 de SE) foram extraídas de acordo com o seguinte protocolo:

- 1 - colocar cinco pêlos de um indivíduo em 250 µl de tampão de digestão [169,75 µl de água Milli Q, 2,5 µl de TrisHCl (1M), 20 µl de NaCl (5M), 50 µl de EDTA (0,5M), 6,25 µl de SDS (20%), 1,5 µl de RNase (0,1mg/mL)];
- 2 - adicionar 25 µl de Proteinase K, 10 µl de Dithiothreitol 1M, homogeneizar e deixar a 55°C por uma noite;
- 3 - adicionar 360 µl de NaCl 5M e homogeneizar;

- 4 - centrifugar a 12.000 rpm por 30 min., recolher o sobrenadante e transferi-lo para outro tubo;
- 5 - adicionar ao sobrenadante um volume de Isopropanol, homogeneizar e incubar as amostras a 20°C por uma hora;
- 6 - centrifugar a 12.000 rpm por 20 min. e descartar o sobrenadante;
- 7 - adicionar ao precipitado 300 µl de Etanol 70%;
- 8 - centrifugar a 12.000 rpm por 5 min. e descartar o sobrenadante;
- 9 - secar a temperatura ambiente por uma noite;
- 10 - dissolver em 25 µl de TE (para 100 ml de solução: 1 ml de TrisHCL 1M pH 8,0; 0,5 ml de EDTA 0,2M pH 7,6);
- 11 - conservar a 4°C.

Devido à pequena quantidade de DNA proveniente das amostras de pêlo, não foram realizadas quantificações para estimar a concentração de DNA extraído de cada indivíduo e as amostras foram utilizadas nas reações de PCR sem diluição prévia.

V.III - Microssatélites: amplificação e genotipagem

Foram amplificados por PCR 15 microssatélites (Tabela 1): seis originalmente descritos para porcos domésticos, *Sus scrofa*, e que foram previamente padronizados para queixadas (ACTG2, IGF1, SW444, SW857, SW240 e SW957; Rohrer *et al.*, 1994, 1996); um que foi desenvolvido para catetos, *Pecari tajacu*, e padronizado para queixadas (PT0226; Biondo *et al.*, 2011) e oito desenvolvidos especificamente para queixadas (Tpec3, Tpec4, Tpec5, Tpec6, Tpec10, Tpec12, Tpec16 e Tpec18; Dalla Vecchia *et al.*, 2011). Todos os *primers* F (*forward*) continham uma cauda M13 na extremidade 5' (5' CACGACGTTGTAAAACGAC 3') para serem utilizados de acordo com um método de marcação universal (Boutin-Ganache *et al.*, 2001).

Para cada reação foram usados 1,5 µl de DNA (20-30 ng/µl); 1,2 µl de tampão (10X – Pharmacia); 1 µl de dNTPs (2mM – Pharmacia); 0,4 µl de MgCl₂ (25 mM – Pharmacia); 0,1 µl de *Taq* polimerase (5 U/µl - Pharmacia); 0,3 µl do *primer* R (10 mM - Invitrogen); 0,2 µl do *primer*

M13 (10 mM, marcado com fluorescências TET, HEX ou FAM – Invitrogen); 0,1 µl do *primer* F (10 mM - Invitrogen) e 7,2 µl de água Milli Q (Millipore Corporation), totalizando um volume de 12 µl. A amplificação foi feita a 95°C por 5 min.; 35 ciclos de 94°C por 30 seg., TH por 30 seg., 72°C por 30 seg.; e 72°C por 10 min. TH é a temperatura de hibridação dos *primers* (Tabela 1).

Tabela 1: Microssatélites utilizados, sequências e temperaturas de hibridação (TH) dos *primers* e suas referências. F: *forward*; R: *reverse*.

Microssatélite	Sequência do <i>primer</i> (5'→ 3')	TH (°C)	Referência
ACTG2	(F) CATCTTCCTCTTCCCTTCCC (R) TGTGGACTCAAGGCTGTAAGC	62	Rohrer <i>et al.</i> , 1996
IGF1	(F) GCTTGGATGGACCATGTTG (R) CACTTGAGGGGCAAATGATT	58	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
SW444	(F) ATAGTTTCGGTTGGCCCAG (R) CTTAAGCCTCAAGCTAACAGGC	58	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
SW857	(F) TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC (R) GATCCTCCTCCAAATCCCAT	58	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
SW240	(F) AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG (R) AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA	50	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
SW957	(F) AGGAAGTGAGCTCAGAAAGTGC (R) ATGGACAAGCTTGGTTTTCC	62	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
PT0226	(F) ACACACATAAATACACACACAAG (R) CAGAATAAAAAGCTCCACGAGAG	55	Biondo <i>et al.</i> , 2011
Tpec3	(F) ACCTGTCTCCTGTAGGCAC (R) TGAACAGTTTAGAAACGCTG	58	Dalla Vecchia <i>et al.</i> , 2011
Tpec4	(F) CAGTGGACCAGAGAAAACAT (R) GGTAATAGCTAAACTTGCCT	58	Dalla Vecchia <i>et al.</i> , 2011
Tpec5	(F) TAGTGTGCCAGTTTCAGATG (R) TTTTGTGATGAGCTATGGG	58	Dalla Vecchia <i>et al.</i> , 2011
Tpec6	(F) GGGTCAGCAGATCAAGATAC (R) GCAGTGAGAATAGCTTTAAGAG	58	Dalla Vecchia <i>et al.</i> , 2011
Tpec10	(F) AGACTAGATCTCATGTTAAGTGTTT (R) AGGGTATAGAGTCCAGGAGC	58	Dalla Vecchia <i>et al.</i> , 2011
Tpec12	(F) CTAGCTGCATCCCTGTTACT (R) CTATCTGGACGAAACCGTAG	58	Dalla Vecchia <i>et al.</i> , 2011
Tpec16	(F) TAGTTGTCACTCAGCATCCA (R) CTTCCAAGAAATCAACCTCA	52	Dalla Vecchia <i>et al.</i> , 2011
Tpec18	(F) CTGGGAAGGTATCTCAGCA (R) ACCAGGTGGATACCAAGTTA	54	Dalla Vecchia <i>et al.</i> , 2011

Para verificar a qualidade e quantidade do produto de amplificação, 2 µl foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% em TBE 0,5X a 100 V. Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi adicionado no gel 1 µl de *ladder* de 100 pares de bases (Pharmacia). Tanto as amostras, quanto o padrão de peso molecular, foram carregadas no gel com 2,0 µl de uma solução de tampão de aplicação e Gel Red. Os produtos amplificados com sucesso foram genotipados no sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems) e analisados com o auxílio do programa GeneMarker (SoftGenetics).

Parte das amostras (72 no total, 41 de RN e 31 de SE) já haviam sido genotipadas previamente para os locos heterólogos (ACTG2, IGF1, SW444, SW857, SW240, SW957 e PT0226) por Biondo *et al.* (2011).

V.IV - Análise dos microssatélites

Os genótipos obtidos para cada um dos 15 microssatélites foram analisados no programa MICRO-CHECKER (van Oosterhout *et al.*, 2004) para verificação de possíveis erros de genotipagem (alelo nulo, fuga de alelos e *stuttering*). Além disso, foi estimada uma média de erro de genotipagem por erros na PCR ou análise humana dos eletroferogramas para todos os 15 microssatélites. Por exemplo: I – se um indivíduo foi genotipado três vezes para um determinado microssatélite obtendo os genótipos A/A, A/B e A/A, assumindo-se que o genótipo consenso seja AA, temos que a taxa de erro por alelo é 1/6, pois de todos os seis alelos encontrados, um foi diferente dos alelos em consenso; II – se um indivíduo foi genotipado quatro vezes para um determinado microssatélite obtendo os genótipos A/B, A/A, B/B e A/B, assumindo-se que o genótipo consenso seja A/B, temos que a taxa de erro por alelo é 2/8, ou 1/4, pois de todos os oito alelos encontrados, dois foram diferentes dos alelos em consenso (Pompanon *et al.*, 2005). Cerca de 25% das amostras de sangue (28 de 117 amostras, escolhidas aleatoriamente de ambas as localidades) e todas as amostras de pêlo foram genotipadas ao menos duas vezes para todos os microssatélites até que fossem encontrados dois genótipos idênticos para o indivíduo analisado para

o respectivo microssatélite. No caso das amostras de pêlo esse cuidado foi tomado devido à baixa quantidade e qualidade de DNA encontrada neste tipo de amostra (Pompanon *et al.*, 2005).

Foram estimados o número de alelos e as heterozigosidades esperada e observada, utilizando o programa GENEALLEX 6 (Peakall e Smouse, 2006). A riqueza alélica foi calculada no programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002). Estas medidas foram comparadas entre as localidades utilizando o Teste de Wilcoxon realizado no programa estatístico SPSS 13.0 (SPSS Inc.). Os testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) e desequilíbrio de ligação foram realizados no programa GENEPOP 3.4 (Raymond e Rousset, 1995) por meio de um teste exato que utiliza o método da cadeia de Markov. Para estes testes, foi aplicada ao valor crítico P a correção de Benjamini e Yekutieli (BY - Benjamini e Yekutieli, 2001) que, segundo Narum (2006), acomoda melhor os erros de tipo I (rejeitar a hipótese nula sendo ela verdadeira, ou seja, aceitando uma diferença que de fato não existe) e II (não rejeitar a hipótese nula sendo ela falsa, ou seja, existia uma diferença que não foi reconhecida) do que a correção de Bonferroni (o valor crítico após correção de Bonferroni se aproxima rapidamente de zero, aumentando a probabilidade de cometer um erro de tipo II).

V.V - Análise de parentesco

Somente os microssatélites independentes e que não desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada localidade foram utilizados [RN (ACTG2, IGF1, SW444, SW857, PT0226, SW240, SW957, Tpec3, Tpec5, Tpec6, Tpec12, Tpec16 e Tpec18) e SE (ACTG2, SW444, SW240, SW957, Tpec3, Tpec4, Tpec5, Tpec6, Tpec10, Tpec12, Tpec16 e Tpec18)]. O coeficiente de parentesco, obtido por máxima verossimilhança, foi calculado entre os pares de indivíduos no programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.*, 2006). O método implementado neste programa acomoda a presença de alelos nulos e, segundo Wagner *et al.* (2006), é melhor utilizar esses microssatélites do que excluí-los devido ao fato de eles serem também informativos. Para esta análise foram utilizados todos os indivíduos, independente do número de locos genotipados com sucesso, pois as frequências alélicas são importantes para a estimativa de parentesco.

Como o valor de F_{ST} previamente estimado para queixadas entre as localidades estudadas foi baixo, mas significativamente diferente de zero, o que indica leve diferenciação genética (Biondo *et al.*, 2011), a estimativa de parentesco foi realizada para cada localidade separadamente. Foi realizado o teste de normalidade de Kolmogorov—Smirnov com correção de Lilliefors, para decidir se seriam usadas estatísticas paramétricas (para conjunto de dados com distribuição normal) ou não paramétricas (para conjunto de dados sem distribuição normal), utilizando o programa estatístico SPSS 13.0. Como os dados não seguiram distribuição normal, eles foram descritos e testados de forma não paramétrica. A mediana dos coeficientes de parentesco dentro de cada grupo de coleta e entre os grupos de coleta de cada localidade foram calculadas e comparadas usando o teste de Mann-Whitney U no programa estatístico SPSS 13.0. Para esta análise foram utilizados apenas os indivíduos que tiveram ao menos oito microssatélites genotipados. Assumimos que os indivíduos que foram coletados juntos, ou seja, que pertencem ao mesmo grupo de coleta são socialmente mais próximos. Para a comparação da mediana do coeficiente de parentesco dentro e entre os grupos de coleta foram excluídos indivíduos coletados sozinhos, ou seja, apenas grupos de coleta com dois ou mais indivíduos foram utilizados. A seguir, foram retirados os indivíduos jovens e repetida a análise nas mesmas condições citadas anteriormente. Tal análise foi realizada para verificar se a presença dos jovens influencia no resultado, ou seja, se uma possível captura de pares de progenitor-filhote aumenta a mediana do parentesco dentro dos grupos de coleta ou se tal fator não modifica o resultado da análise.

O teste estatístico de Mann-Whitney U também foi utilizado para comparar os valores das medianas do grau de parentesco entre as localidades, tanto entre indivíduos de mesmo grupo de coleta quanto entre indivíduos de grupos de coleta diferentes. Esta análise também foi realizada com e sem os indivíduos jovens. Em seguida, outras duas análises foram conduzidas, dessa vez comparando-se a mediana do coeficiente de parentesco em seis classes estabelecidas de acordo com o sexo e o grupo de coleta (Tabela 2), para verificar se há estruturação dentro dos grupos de coleta de acordo com o sexo, ou seja, para verificar se machos mais próximos no espaço são mais

aparentados entre si do que com machos mais distantes e o mesmo para as fêmeas. Nessa análise foram considerados todos os indivíduos, exceto os que foram coletados sozinhos, e, em seguida os jovens foram retirados. Inicialmente, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis H, realizado no programa estatístico SPSS, para verificar se havia diferença significativa nas medianas do coeficiente de parentesco entre as seis classes da Tabela 2. Como este teste indicou que havia alguma diferença, foi realizado, posteriormente, o teste de Mann-Whitney U, no mesmo programa, para verificar em quais pares, dentre as seis classes da Tabela 2, havia diferença significativa nas medianas do coeficiente de parentesco. A Figura 2 resume as análises conduzidas.

Tabela 2: Descrição das classes estabelecidas de acordo com o sexo e os grupos de coleta para as quais as medianas dos coeficientes de parentesco entre os indivíduos foram comparadas.

Classe	Pares de indivíduos comparados
1	Macho-Macho de Mesmo Grupo de Coleta
2	Macho-Macho de Grupos de Coleta Diferentes
3	Fêmea-Fêmea de Mesmo Grupo de Coleta
4	Fêmea-Fêmea de Grupos de Coleta Diferentes
5	Macho-Fêmea de Mesmo Grupo de Coleta
6	Macho-Fêmea de Grupos de Coleta Diferentes

Para cada localidade foram gerados dois dendrogramas, um com todos os indivíduos e o outro sem os jovens, com base nos coeficientes de parentesco entre os indivíduos utilizando o método de UPGMA (do inglês *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*); para facilitar a visualização da relação entre os indivíduos amostrados. Para construir tais dendrogramas, inseriu-se no *website* <http://genomes.urv.cat/UPGMA/> a matriz de coeficientes de parentesco estimados no programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.*, 2006). Este *website* converte a matriz de coeficientes de parentesco em uma matriz de similaridade conforme descrito no artigo de Garcia-

Vallve *et al.* (1999), possibilitando a construção de dendrogramas. O programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) foi utilizado para construir os dendrogramas para cada uma das localidades.

Figura 2: Esquema ilustrando as análises realizadas com as medianas dos coeficientes de parentesco para cada bando (localidade). Flechas contínuas mostram a sequência das análises; flechas pontilhadas indicam os testes estatísticos realizados.

V.VI - Análise de estrutura genética populacional

Para avaliar se ocorre diferenciação genética entre as duas localidades foi utilizado o método Bayesiano implementado no programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000), estimado o valor de F_{ST} utilizando o programa GENEPOP 3.4 (Raymond e Rousset, 1995) e o D_{EST} (Jost, 2008) no programa SMOGD (Crawford, 2010). O D_{EST} foi estimado pois, segundo Jost (2008), este parâmetro confere um resultado mais robusto do que o G_{ST} , estimativa comumente usada em estudos com microssatélites, juntamente com o F_{ST} . Para estimar a significância do valor de F_{ST} encontrado, foi realizado, também no programa GENEPOP 3.4, um teste de diferenciação populacional baseado na diferenciação gênica, que utiliza o log da probabilidade estatística (Teste

G). Para todas estas análises, foram utilizados apenas os 10 microssatélites independentes, que não desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg e que não apresentaram evidências de erros de genotipagem inferidos pelo MICRO-CHECKER nas duas localidades (ACTG2, SW444, SW240, SW957, Tpec3, Tpec4, Tpec5, Tpec12, Tpec16 e Tpec18). Na análise Bayesiana, foi utilizado o modelo que assume mistura entre as populações e frequências alélicas correlacionadas por ser considerado mais adequado em situações onde pode haver uma estruturação genética sutil entre as populações (Falush *et al.*, 2003; Evanno *et al.*, 2005). Foram adotados 30.000 passos de *burn-in* e 1.000.000 de iterações de MCMC (Cadeia de Markov e Monte Carlo) e com o número possível de populações (K) variando de 1 a 6 (para o caso de haver alguma estruturação dentro de cada localidade). A análise adotando cada valor de K foi replicada 20 vezes. Como Biondo *et al.* (2011), utilizando parte das amostras aqui analisadas e um menor número de microssatélites, encontraram F_{ST} significativamente diferente de zero, porém baixo, e $K=1$ como mais provável para as mesmas localidades (resultados indicativos de fraca diferenciação), conduziu-se uma segunda análise utilizando-se o modelo LOCPRIOR em adição ao modelo descrito acima. Esse modelo utiliza a informação da localidade de coleta de cada amostra para auxiliar o agrupamento dos indivíduos e é recomendado para conjuntos de dados onde o sinal de estrutura é relativamente fraco. A análise dos resultados foi conduzida utilizando o *website* STRUCTURE HARVESTER (www.taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/index.php - Earl e Vonholdt, 2011). Para determinar o melhor valor de K estimou-se o $Pr(K|X)$ segundo Pritchard *et al.* (2000) e o ΔK (Evanno *et al.*, 2005). Este último só foi utilizado em situações onde o K mais provável foi igual ou superior a dois, já que o ΔK não pode discriminar o melhor K se $K=1$. Ao contrário do ΔK , o $Pr(K|X)$ permite identificar quando o K mais provável é $K=1$. E tanto para o ΔK quanto para o $Pr(K|X)$, o valor mais alto é que determina qual o valor de K mais provável. O programa CLUMPP 1.1.2b (Jakobsson e Rosenberg, 2007) foi utilizado para gerar uma média das corridas realizadas no programa STRUCTURE para cada K , quando o número de K mais provável foi igual ou superior a dois.

VI - Resultados

VI.1 - Diversidade genética

Foram analisadas 184 amostras, sendo 53 em RN e 131 em SE. Para cada um dos 15 microssatélites estudados, pelo menos 90% dos indivíduos foram genotipados. O número de alelos encontrados na RN variou de 2 a 10 com média de 4,60 alelos por microssatélite (Tabela 3) e na SE, de 2 a 12 com média de 5,07 (Tabela 4). Foram encontrados três alelos exclusivos em RN (um no microssatélite SW957, um no Tpec12 e um no Tpec18) e dez em SE (três no microssatélite SW957, dois no ACTG2 e Tpec12 e um em cada um dos seguintes microssatélites: IGF1, Tpec10 e Tpec18). A riqueza alélica em RN variou de 2 a 10 com média de 4,59 (5,27 para os microssatélites amplificados com *primers* heterólogos e 3,99 para os microssatélites específicos) e em SE variou de 2 a 11,20 com média de 4,69 (5,59 para os microssatélites de *primers* heterólogos e 3,91 para os microssatélites específicos). Embora o número médio de alelos tenha sido significativamente maior em SE do que em RN ($Z = -2,070$; $P < 0,05$), a riqueza alélica foi similar em ambas as localidades ($Z = -0,533$; $P > 0,05$).

As heterozigosidades médias, observada e esperada, em RN foram de 0,50 e 0,53 (Tabela 3) e em SE, de 0,55 e 0,55 (Tabela 4), respectivamente. Em RN, as heterozigosidades médias, observada e esperada, para os microssatélites de *primers* heterólogos, foram 0,57 e 0,57 e, para os específicos, 0,45 e 0,50, respectivamente. Em SE, as heterozigosidades médias, observada e esperada, para os microssatélites de *primers* heterólogos, foram 0,59 e 0,59 e, para os específicos, foram 0,50 e 0,52, respectivamente. As heterozigosidades médias esperadas e observadas não apresentaram diferença estatística entre as duas localidades analisadas ($Z = -1,363$; $P > 0,05$ e $Z = -1,533$; $P > 0,05$, respectivamente).

Tabela 3: Resultados obtidos da análise de 15 microssatélites em queixadas da região da Fazenda Rio Negro (RN). N – número de indivíduos genotipados. A – número de alelos. R – riqueza alélica. T – intervalo de tamanho dos alelos em pares de bases. H_o e H_e – heterozigosidades observada e esperada, respectivamente. P - valor de P corresponde ao teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW). Média het. – Média dos microssatélites de *primers* heterólogos. Média esp. – Média dos microssatélites específicos. Média tot. – Média total. * microssatélite em desequilíbrio de HW após correção de BY ($P < 0,01507$).

Microssatélites	N	A	R	T	H_o	H_e	P
ACTG2	50	9	8,919	132-148	0,800	0,822	0,510
IGF1	50	3	3.000	250-254	0,440	0,491	0,360
SW444	49	3	3.000	120-126	0,388	0,344	0,863
SW857	49	3	3.000	148-152	0,531	0,497	0,840
PT0226	50	7	6.999	141-153	0,760	0,798	0,481
SW240	51	2	2.000	127-129	0,216	0,192	1,000
SW957	48	10	10.000	133-165	0,833	0,861	0,136
Tpec3	51	2	2.000	202-206	0,294	0,327	0,419
Tpec4	48	2	2.000	245-249	0,458	0,430	0,749
Tpec5	51	3	3.000	119-125	0,510	0,527	0,483
Tpec6*	48	3	3.000	229-237	0,292	0,455	0,004
Tpec10	48	6	6.000	254-264	0,583	0,596	0,324
Tpec12	51	9	9.000	226-248	0,725	0,803	0,116
Tpec16	48	4	4.000	248-260	0,458	0,557	0,019
Tpec18	50	3	2.960	284-292	0,280	0,299	0,683
Média het.	-	5,286	5,274	-	0,567	0,572	-
Média esp.	-	4	3,995	-	0,450	0,499	-
Média tot.	-	4,60	4,592	-	0,505	0,533	-

Tabela 4: Resultados obtidos da análise de 15 microssatélites em queixadas da região da Fazenda Santa Emília (SE). N – número de indivíduos genotipados. A – número de alelos. R – riqueza alélica. T – intervalo de tamanho dos alelos em pares de bases. H_o e H_e – heterozigosidades observada e esperada, respectivamente. P - valor de P corresponde ao teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW). Média het. – Média dos microssatélites de *primers* heterólogos. Média esp. – Média dos microssatélites específicos. Média tot. – Média total. * microssatélite em desequilíbrio de HW após correção de BY ($P < 0,01507$).

Microssatélites	N	A	R	T	H_o	H_e	P
ACTG2	126	11	9,583	132-162	0,905	0,860	0,600
IGF1*	122	4	3,952	248-254	0,533	0,603	0,000
SW444	128	3	2,997	120-126	0,227	0,207	0,830
SW857	131	3	3,000	148-152	0,565	0,554	0,126
PT0226	130	7	6,369	141-153	0,815	0,810	0,565
SW240	118	2	2,000	127-129	0,229	0,216	1,000
SW957	123	12	11,202	145-167	0,878	0,864	0,300
Tpec3	131	2	2,000	202-206	0,504	0,436	0,109
Tpec4	125	2	2,000	245-249	0,496	0,441	0,222
Tpec5	131	3	3,000	119-125	0,389	0,435	0,076
Tpec6*	121	3	3,000	229-237	0,207	0,397	0,000
Tpec10	123	7	6,316	252-264	0,675	0,656	0,070
Tpec12	126	10	8,291	228-248	0,833	0,828	0,580
Tpec16	124	4	3,947	248-260	0,581	0,562	0,957
Tpec18	127	3	2,761	284-312	0,354	0,375	0,591
Média het.	-	6	5,586	-	0,593	0,588	-
Média esp.	-	4,25	3,914	-	0,505	0,516	-
Média tot.	-	5,07	4,694	-	0,546	0,549	-

Apenas o Tpec6 apresentou probabilidade significativa de apresentar alelo nulo em ambas as localidades. Para os demais microssatélites, não houve evidência de erros de genotipagem. Em RN, apenas um microssatélite apresentou desvio do equilíbrio de HW (Tpec6, $P < 0,01507$, após correção de BY – Tabela 3). Além disso, os pares de microssatélites SW857/Tpec4, SW957/Tpec10, Tpec3/Tpec10, e Tpec6/Tpec10 apresentaram desequilíbrio de ligação ($P <$

0,009549, após correção de BY). Em SE, dois microssatélites apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (IGF1 e Tpec6, $P < 0,01507$, após correção de BY – Tabela 4) e os pares de microssatélites SW857/SW957, SW857/Tpec4, SW857/Tpec16, PT0226/SW957, PT0226/Tpec12, e PT0226/Tpec18 apresentaram desequilíbrio de ligação ($P < 0,009549$, após correção de BY).

A taxa de erro de genotipagem por alelo para os 15 microssatélites (Tabela 5) variou de zero até 0,076 nas amostras de sangue e de zero até 0,163 nas amostras de pêlos. Três microssatélites apresentaram média igual à zero para ambos os tipos de amostras (SW240, Tpec3 e Tpec5) e três apresentaram média superior à zero em ambos os tipos de amostras (ACTG2, IGF1 e Tpec18). Os microssatélites SW444, PT0226 e Tpec4 apresentaram média superior à zero apenas para as amostras de sangue e os demais microssatélites apresentaram média superior à zero apenas para as amostras de pêlos.

Tabela 5: Taxas de erro de genotipagem (número de alelos erroneamente genotipados pelo total de alelos observados) para cada microssatélite.

Microssatélites	Amostras de sangue	Amostras de pêlo
ACTG2	0,017	0,007
IGF1	0,076	0,163
SW444	0,033	0
SW857	0	0,007
PT0226	0,047	0
SW240	0	0
SW957	0	0,021
Tpec3	0	0
Tpec4	0,017	0
Tpec5	0	0
Tpec6	0	0,022
Tpec10	0	0,014
Tpec12	0	0,014
Tpec16	0	0,007
Tpec18	0,017	0,027

VI.II - Parentesco

Para as análises de parentesco, foram utilizados os 13 microssatélites para RN e os 12 para SE que não desviaram do equilíbrio de HW e que não apresentaram desequilíbrio de ligação (ver a relação dos microssatélites utilizados na sessão V.V). Para RN, foram analisados 45 indivíduos distribuídos em 13 grupos de coleta variando de 2 a 7 indivíduos por grupo de coleta. Após excluir os indivíduos jovens, restaram 35 indivíduos distribuídos em 12 grupos de coleta variando de 2 a 4 indivíduos por grupo de coleta. Para SE, foram analisados 113 indivíduos distribuídos em 21 grupos de coleta variando de 2 a 16 indivíduos por grupo de coleta. Após excluir os indivíduos jovens, restaram 65 indivíduos distribuídos em 17 grupos de coleta variando de 2 a 8 indivíduos por grupo de coleta. A quantidade de grupos de coleta por quantidade de indivíduos e por análise encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6: Quantidade de grupos de coleta por quantidade de indivíduos em cada uma das análises realizadas no programa estatístico SPSS para ambas as localidades. RN e SE – quantidade de grupos de coleta utilizados na análise com todos os indivíduos; RN-sem jovens e SE-sem jovens – quantidade de grupos de coleta utilizados na análise com todos os indivíduos, exceto os jovens.

Número de indivíduos	RN	RN-sem jovens	SE	SE-sem jovens
2	4	5	8	6
3	5	3	1	4
4	1	4	3	1
5	1	-	3	3
6	1	-	-	-
7	1	-	1	2
8	-	-	1	1
11	-	-	1	-
12	-	-	1	-
13	-	-	1	-
16	-	-	1	-
Total	13	12	21	17

Em RN, a mediana dos coeficientes de parentesco entre pares de indivíduos (r) do mesmo grupo de coleta foi significativamente maior do que entre indivíduos de grupos de coleta diferentes, tanto para a análise com os indivíduos jovens (0,1729 e 0,0000; $Z = -8,091$; $P < 0,05$ – Figura 3a) como para a análise que não incluiu os indivíduos jovens (0,1799 e 0,0000; $Z = -5,698$; $P < 0,05$ – Figura 3b). De maneira similar, em SE, a mediana dos coeficientes de parentesco entre indivíduos do mesmo grupo de coleta também foi significativamente maior do que entre indivíduos de grupos de coleta diferentes, tanto para a análise com os indivíduos jovens (0,1324 e 0,0000; $Z = -12,413$; $P < 0,05$ – Figura 4a) como para a análise que não utilizou os indivíduos jovens (0,1431 e 0,0000; $Z = -7,273$; $P < 0,05$ – Figura 4b).

O valor das medianas para os indivíduos de mesmo grupo de coleta, entre RN e SE não foram estatisticamente diferentes (com os jovens: $Z = -1,824$; $P > 0,05$; sem os jovens: $Z = -1,021$; $P > 0,05$). Entretanto, ao analisar o valor das medianas para os indivíduos de diferentes grupos de coleta, entre RN e SE, o teste de Mann-Whitney U acusou diferença estatística (com os jovens: $Z = -3,933$; $P < 0,05$; sem os jovens: $Z = -2,803$; $P < 0,05$).

Para as análises que envolveram as seis classes da Tabela 2, o teste de Kruskal-Wallis H indicou diferença entre as medianas das classes em todas as quatro análises, RN com e sem jovens e SE com e sem jovens ($P < 0,05$; Tabela 7). Foram então conduzidos testes entre pares das seis classes para as quatro análises citadas acima. À exceção de comparações da classe 1 (macho-macho de mesmo grupo de coleta) com as demais classes, que só foi realizada para SE com os jovens, pois para as outras três análises o número amostral foi pequeno, o que gerou baixo poder estatístico.

(a)

(b)

Figura 3: Distribuição dos coeficientes de parentesco entre indivíduos (r) de mesmo grupo de coleta e entre indivíduos de grupos de coleta diferentes em RN. (a) com indivíduos jovens e (b) sem indivíduos jovens. A barra preta horizontal corresponde à mediana. O retângulo bege indica o intervalo interquartil (50% central dos valores analisados). Os asteriscos e círculos (*outliers*) correspondem a valores de parentesco entre pares de indivíduos que se encontram acima de 50% do valor superior ou inferior do interquartil (barra vertical).

Figura 4: Distribuição dos coeficientes de parentesco entre indivíduos (r) do mesmo grupo de coleta e entre indivíduos de grupos de coleta diferentes em SE. (a) com indivíduos jovens e (b) sem indivíduos jovens. A barra preta horizontal corresponde à mediana. O retângulo bege indica o intervalo interquartil (50% central dos valores analisados). Os asteriscos e círculos (*outliers*) correspondem a valores de parentesco entre pares de indivíduos que se encontram acima de 50% do valor superior ou inferior do interquartil (barra vertical).

Tabela 7: Valores das medianas das quatro análises que levam em conta os grupos de coleta e o sexo dos indivíduos. RN e SE – análises com todos os indivíduos. RN-sem jovens e SE-sem jovens – análises sem os jovens. M – macho. F – fêmea. Os valores entre parênteses correspondem ao número amostral.

Classes	RN	RN-sem jovens	SE	SE-sem jovens
1 - MM-Mesmo Grupo	0,0354 (7)	0,006 (2)	0,0788 (42)	0 (7)
2 - MM-Grupos Diferentes	0 (113)	0,0116 (43)	0 (777)	0 (183)
3 - FF-Mesmo Grupo	0,1907 (31)	0,2356 (22)	0,1726 (197)	0,168 (69)
4 - FF-Grupos Diferentes	0 (375)	0 (278)	0 (2360)	0 (921)
5 - MF-Mesmo Grupo	0,1996 (34)	0,1751 (14)	0,1024 (188)	0,1277 (48)
6 - MF-Grupo Diferente	0 (430)	0 (236)	0 (2764)	0 (852)

De um modo geral, observou-se que, independentemente do sexo, quando se compara uma classe de mesmo grupo de coleta com uma classe de grupos de coleta diferentes, a primeira possui mediana estatisticamente maior que a segunda e que, quando se compara classes de mesmo grupo de coleta ou classes de grupos de coleta diferentes, não há diferença estatística entre as classes comparadas (Tabelas 8 e 9). Entretanto, para SE na análise com todos os indivíduos, a mediana da classe fêmea-fêmea de mesmo grupo de coleta (classe 3) foi significativamente maior do que as a mediana das classes macho-macho de mesmo grupo de coleta (classe 1) e macho-fêmea de mesmo grupo de coleta (classe 5); o que não se repetiu após a retirada dos indivíduos jovens da análise. Salvo esta exceção, de forma geral, os resultados das análises sem os indivíduos jovens foram similares aos das análises incluindo todos os indivíduos em ambas as localidades.

Tabela 8: Resultados dos testes de Mann-Whitney para os pares das classes da Tabela 2 em RN com e sem jovens. Abaixo da diagonal encontram-se os valores de Z (estatística do teste) para os testes com os jovens e acima da diagonal, para os testes sem os jovens. As comparações envolvendo a classe 1 não foram feitas (-) devido o baixo número amostral desta classe. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Classe	1 - MM- Mesmo Grupo	2 - MM- Grupos Diferentes	3 - FF- Mesmo Grupo	4 - FF- Grupos Diferentes	5 - MF- Mesmo Grupo	6 - MF- Grupos Diferentes
1 - MM-Mesmo Grupo		-	-	-	-	-
2 - MM-Grupos Diferentes	-		-3,489***	-0,948	-2,717**	-0,673
3 - FF-Mesmo Grupo	-	-4,884***		-4,825***	-0,212	-4,615***
4 - FF-Grupos Diferentes	-	-0,042	-5,386***		-3,712***	-0,460
5 - MF-Mesmo Grupo	-	-5,287***	-0,251	-5,935***		-3,594***
6 - MF-Grupos Diferentes	-	-0,076	-5,432***	-0,042	-5,989***	

Tabela 9: Resultados dos testes de Mann-Whitney para os pares das classes da tabela 2 em SE com e sem jovens. Abaixo da diagonal encontram-se os valores de Z para os testes com os jovens e acima da diagonal, para os testes sem os jovens. As comparações envolvendo a classe 1 na análise sem os jovens não foram feitas (-) devido o baixo número amostral desta classe. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Classe	1 - MM- Mesmo Grupo	2 - MM- Grupos Diferentes	3 - FF- Mesmo Grupo	4 - FF- Grupos Diferentes	5 - MF- Mesmo Grupo	6 - MF- Grupos Diferentes
1 - MM-Mesmo Grupo		-	-	-	-	-
2 - MM-Grupos Diferentes	-2,270**		-6,404***	-1,290	-3,769***	-1,145
3 - FF-Mesmo Grupo	-3,347**	-11,034***		-6,666***	-1,899	-6,665***
4 - FF-Grupos Diferentes	-1,765	-1,654	-10,905***		-3,462**	-0,190
5 - MF-Mesmo Grupo	-1,254	-6,692***	-3,209**	-6,199***		-3,431**
6 - MF-Grupos Diferentes	-1,798	-1,379	-11,073***	-0,454	-6,341***	

Os dendrogramas gerados para RN e SE por meio do método de UPGMA encontram-se nas figuras 5 a 11, e permitiram visualizar a distribuição dos indivíduos segundo seus coeficientes de parentesco, com agrupamentos que podem indicar núcleos familiares. Em ambas as localidades, tanto para os dendrogramas com todos os indivíduos como para os dendrogramas sem os indivíduos jovens, os agrupamentos não foram formados de acordo com o grupo de coleta, sendo que um mesmo agrupamento pode conter tanto indivíduos de mesmo grupo de coleta como de grupos de coleta diferentes. Além disso, também não se observou nenhuma influência do sexo dos indivíduos, ou seja, os agrupamentos formados se constituíram de indivíduos de ambos os sexos, tanto nos dendrogramas com todos os indivíduos incluídos na análise como nos dendrogramas que não incluíram os indivíduos jovens.

Figura 5: Dendrograma com indivíduos de RN gerado a partir da matriz de coeficientes de parentesco entre os pares de indivíduos. F – fêmea. M – macho. O número na frente do sexo corresponde ao grupo de coleta ao qual o indivíduo pertence.

Figura 6: Visão geral do dendrograma com indivíduos de SE gerado a partir da matriz de coeficiente de parentesco entre os pares de indivíduos. a à d correspondem às porções do dendrograma que estão ampliadas nas Figuras 7 e 8.

Figura 7: Ampliação das porções a e b do dendrograma com indivíduos de SE. F – fêmea. M – macho. O número na frente do sexo corresponde ao grupo de coleta ao qual o indivíduo pertence.

Figura 8: Ampliação das porções c e d do dendrograma com indivíduos de SE. F – fêmea. M – macho. O número na frente do sexo corresponde ao grupo de coleta ao qual o indivíduo pertence.

Figura 9: Dendrograma de RN sem indivíduos jovens, gerado a partir da matriz de coeficientes de parentesco entre os pares de indivíduos. F – fêmea. M – macho. O número na frente do sexo corresponde ao grupo de coleta ao qual o indivíduo pertence.

Figura 10: Visão geral do dendrograma de SE sem indivíduos jovens, gerado a partir da matriz de coeficientes de parentesco entre os pares de indivíduos. a e b correspondem às porções do dendrograma que estão ampliadas na Figura 11.

Figura 11: Ampliação das porções a e b do dendrograma de SE sem os indivíduos jovens. F – fêmea. M – macho. O número na frente do sexo corresponde ao grupo de coleta ao qual o indivíduo pertence.

VI.III - Estrutura genética populacional

O valor de F_{ST} observado entre as localidades foi de 0,017 e significativamente diferente de zero ($P < 0,05$) e o valor do D_{EST} , de 0,015. A análise Bayesiana, sem a utilização das informações de localidade *a priori* (LOCPRIOR), resultou em um número mais provável de populações igual a um, segundo a estimativa do $Pr(K|X)$ ($K=1$; Tabela 10). Entretanto, utilizando-se o modelo

LOCPRIOR, o número mais provável de populações foi de dois, tanto de acordo com a estimativa do $\Pr(K|X)$ quanto do ΔK ($K=2$; Tabela 10 e Figuras 12 e 13). O agrupamento dos indivíduos pelo STRUCTURE em $K=2$ correspondeu exatamente às localidades amostradas (Figura 13).

Tabela 10: Média (desvio padrão) do log das probabilidades *a posteriori* [$L(K)$] e estimativa do número mais provável de populações [$\Pr(K|X)$], sem e com o uso das localidades *a priori* (LOCPRIOR) para cada K (número de populações).

K	Sem LOCPRIOR		Com LOCPRIOR	
	$L(K)$	$\Pr(K X)$	$L(K)$	$\Pr(K X)$
1	-3769,43 (0,15)	1,0000	-3769,43 (0,16)	0,0000
2	-3936,11 (56,09)	0,0000	-3721,92 (3,99)	1,0000
3	-4374,60 (199,03)	0,0000	-3753,03 (14,29)	0,0000
4	-5043,46 (350,70)	0,0000	-3768,48 (26,70)	0,0000
5	-5406,94 (435,76)	0,0000	-3759,74 (23,97)	0,0000
6	-5422,06 (500,37)	0,0000	-3762,45 (28,77)	0,0000

Figura 12: Valor de ΔK em função de K . Gráfico gerado na página da internet STRUCTURE HARVESTER (www.taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/index.php - Earl e Vonholdt, 2011) mostrando $K=2$ como número mais provável de populações considerando o modelo LOCPRIOR.

Figura 13: Histograma gerado a partir dos agrupamentos identificados na análise Bayesiana, considerando $K=2$ e modelo LOCPRIOR. As duas populações sugeridas com este modelo, ilustradas aqui nas cores verde e vermelho, coincidem exatamente com as localidades amostradas, sendo 1 (vermelho) correspondente à RN e 2 (verde), à SE.

VII - Discussão

VII.I - Diversidade genética

O número de alelos em SE foi estatisticamente maior do que em RN, o que pode ter sido um efeito do maior tamanho amostral da primeira localidade, já que a comparação entre as riquezas alélicas, medida que corrige o número de alelos de acordo com o número amostral, não resultou em diferença estatística. Além da riqueza alélica, os valores de heterozigosidade esperada e observada também não diferiram estatisticamente, demonstrando que ambas as localidades possuem níveis de diversidade genética similares, o que pode ser uma consequência das altas taxas de fluxo gênico entre elas, conforme sugerido por Biondo *et al.* (2011).

As riquezas alélicas médias do presente estudo para os microssatélites de *primers* heterólogos foram superiores às encontradas por Biondo *et al.* (2011): 5,274 contra 4,96 em RN e 5,586 contra 4,98 em SE. Como os microssatélites comparados foram os mesmos, esse aumento foi possivelmente decorrente do aumento do número de amostras por localidade. No entanto, os valores encontrados de heterozigosidade média observada e esperada foram semelhantes, sendo 0,57 e 0,57 em RN no presente estudo contra 0,56 e 0,57 encontrado por Biondo *et al.* (2011) e 0,59 e 0,59 em SE contra 0,62 e 0,58, respectivamente.

Embora, geralmente, microssatélites tendam a ser mais polimórficos na espécie para a qual foram isolados (ver, por exemplo, Ellegren *et al.*, 1997), no presente estudo os valores de heterozigosidades médias, observada e esperada, para os microssatélites de *primers* heterólogos, bem como número médio de alelos e riqueza alélica média, foram maiores do que para os microssatélites específicos em ambas localidades. Além disso, dos três microssatélites mais polimórficos, apenas um é específico (Tpec12) e dois são heterólogos (ACTG2 e SW957). Uma possível explicação para tal resultado seria que os microssatélites de *primers* heterólogos utilizados são todos de dinucleotídeos, enquanto apenas dois dos microssatélites específicos são de dinucleotídeos (Tpec10 e Tpec12), um é de trinucleotídeo (Tpec5) e os demais são de tetranucleotídeos. Entretanto, ao comparar as médias de riqueza alélica entre os microssatélites de

primers heterólogos de dinucleotídeos e os específicos de dinucleotídeos observa-se valor maior para os específicos, tanto em RN (7,50 dos específicos contra 5,27 dos heterólogos) como em SE (7,30 dos específicos contra 5,59 dos heterólogos). É importante ressaltar que foram comparados sete microssatélites de *primers* heterólogos contra apenas dois específicos. Em humanos, Chakraborty *et al.* (1997) observaram que microssatélites que não estão relacionados a doenças possuem diferentes taxas de mutação em relação ao tamanho da unidade de repetição, sendo os de dinucleotídeos os que possuem maior taxa de mutação. De forma similar, Schug *et al.* (1998) observaram em populações naturais de *Drosophila* que microssatélites de dinucleotídeos possuíam taxa de mutação cerca de quatro vezes maior do que os microssatélites com unidades de repetição maiores.

Nas duas localidades, foi encontrado ao menos um microssatélite com desvio do equilíbrio de HW. O desvio do microssatélite Tpec6 nas duas localidades possivelmente se deve pelo fato de haver evidência de alelo nulo, identificada pela análise no programa MICRO-CHECKER (van Oosterhout *et al.*, 2004). Além do Tpec6, o microssatélite IGF1 desviou do equilíbrio de HW em SE, o que pode ser devido a uma amostragem não representativa da população para esse microssatélite. Os desvios do equilíbrio de ligação em ambas as localidades podem ser decorrentes de: erro de amostragem, dispersão entre os bandos de estudo ou outros bandos, cruzamentos não aleatórios, ligação física com pouco tempo para que a recombinação elimine o desequilíbrio de ligação ou por deriva aleatória com o aumento de determinados alelos de forma a surgir desequilíbrio entre dois ou mais microssatélites (Ridley, 2006). Dado que os microssatélites são considerados seletivamente neutros, o desequilíbrio de ligação devido à seleção não parece ser uma justificativa plausível para o resultado aqui encontrado.

Os resultados encontrados para a taxa de erro de genotipagem por alelo sugerem que as amostras de pêlos sejam mais susceptíveis a erros de genotipagem na PCR, pois para as amostras de sangue, de todos os 15 microssatélites, apenas seis microssatélites apresentaram taxa superior à zero, enquanto que para as amostras de pêlo nove microssatélites apresentaram taxa superior à zero.

Estes resultados eram esperados, pois as amostras de pêlo possuem menor quantidade e qualidade de DNA, tornando as repetições das genotipagens uma etapa importante para contornar o problema relacionado a pouca quantidade e qualidade do DNA nesse tipo de amostra. Os erros de genotipagem não podem ser negligenciados pelo pesquisador, principalmente em estudos vinculados à identificação individual; entretanto, em estudos onde a frequência alélica é utilizada, os erros de genotipagem não possuem impacto nos resultados se a amostragem da população for representativa a ponto de minimizar esses erros (Pompanon *et al.*, 2005). No presente estudo, assumiu-se que a amostragem obtida é representativa o suficiente para evitar impactos dos erros de genotipagem nos resultados, ainda mais porque eles foram encontrados em baixas taxas (menores que 0,076 para as amostras de sangue e que 0,163 para as amostras de pêlo).

VII.II - Parentesco

Embora o número de microssatélites aqui utilizado seja pequeno comparado ao sugerido na literatura para estimar parentesco (30 a 40 microssatélites; Blouin, 2003; Kalinowski *et al.*, 2006), estudos com populações selvagens de animais utilizam geralmente menos microssatélites. Uma das razões é a ausência de marcadores específicos para cada espécie e outro fator é que nem sempre o uso de marcadores heterólogos gera informações semelhantes às geradas nas espécies para as quais os marcadores foram descritos (frequentemente há marcadores heterólogos que são monomórficos na espécie-alvo; Ellegren *et al.*, 1997). Trabalhos recentes que se baseiam em microssatélites para estimar parentesco entre os indivíduos utilizaram de cinco a 12 marcadores (para exemplos ver Granjon e Cosson, 2008; Vonhof *et al.*, 2008; Frentiu *et al.*, 2008; Vidya *et al.*, 2009; Buston *et al.*, 2009; Gobush *et al.*, 2009; Maher, 2009; Duncan *et al.*, 2010; Ahlering *et al.*, 2011; Austin *et al.*, 2011; Costa-Urrutia *et al.*, 2012; Rollins *et al.*, 2012), tornando o uso de 12 e 13 microssatélites, número aqui utilizado, dentro do usual para estudos de parentesco com populações selvagens de animais. Além disso, segundo Blouin (2003), o uso de menos que 30 marcadores ainda é eficiente para estimar o parentesco médio entre grupos de indivíduos, o que foi o foco do presente estudo. E

também, alguns dos microssatélites utilizados, tanto para RN quanto para SE, possuem número de alelos e heterozigosidade relativamente altos, como, por exemplo, o ACTG2, SW957 e Tpec12, o que é desejável em análises de parentesco.

Em ambas as localidades a mediana do coeficiente de parentesco entre indivíduos de mesmo grupo de coleta foi superior e significativamente diferente da mediana do coeficiente de parentesco entre indivíduos de grupos de coleta diferentes. O mesmo aconteceu para a análise sem os indivíduos jovens. Essa última análise foi realizada para avaliar se haveria influência de uma possível proximidade física (e, portanto, captura na mesma armadilha) de progenitores e filhotes, já que isso elevaria a mediana do coeficiente de parentesco entre indivíduos de mesmo grupo de captura. Entretanto, foi observado que a presença dos indivíduos jovens nas análises não alterou a observação geral de maior parentesco entre indivíduos de mesmo grupo de coleta.

As análises que consideraram os grupos de coleta e o sexo dos indivíduos foram congruentes com os resultados descritos acima, mostrando, de forma geral, que os indivíduos são mais aparentados com indivíduos de mesmo grupo de coleta, independente do sexo. Todas as classes baseadas no sexo (Tabela 2) resultaram em parentesco maior dentro de mesmo grupo de coleta do que entre grupos de coleta diferentes. De forma geral, fêmeas são igualmente aparentadas tanto com fêmeas de mesmo grupo de coleta como com machos de mesmo grupo de coleta. Entretanto, em SE (onde o número amostral é mais representativo), na análise com todos os indivíduos, observou-se que fêmeas de mesmo grupo de coleta apresentaram parentesco significativamente maior do que machos de mesmo grupo de coleta e machos e fêmeas de mesmo grupo de coleta. Esse resultado é um indicativo de que fêmeas aparentadas estão mais associadas entre si do que machos aparentados, o que poderia estar relacionado a uma dispersão diferencial de machos dentro dos bandos. Embora Biondo *et al.* (2011) não encontraram dispersão diferencial de um dos sexos entre os bandos, foi constatado por Keuroghlian *et al.* (2004) que os bandos de queixadas se subdividem periodicamente, podendo haver troca de indivíduos entre os sub-bandos formados. Se a troca de indivíduos entre os sub-bandos for mais comum para machos do que para fêmeas, isso poderia

explicar o menor parentesco entre machos do que entre fêmeas de mesmo grupo de coleta. Dispersão de machos do grupo natal é uma característica comum a várias espécies de mamíferos (Greenwood, 1980; Dobson, 1982), porém, nada se sabe sobre a ocorrência de dispersão diferencial dentro de grupos sociais que sofrem fissão-fusão. Assim, mais estudos se fazem necessários para confirmar esta hipótese para as trocas de indivíduos entre os sub-bandos de queixadas.

Embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre as classes citadas acima na análise para mesmo grupo de coleta após a retirada dos jovens, a mediana da classe fêmea-fêmea teve valor maior do que macho-fêmea e macho-macho, assim como na análise com todos os indivíduos. O fato de a diferença não ter sido significativa pode ser dependente do número amostral de cada uma dessas classes nesta análise, já que após a retirada dos indivíduos jovens o número de cada uma delas reduziu em cerca de 3 a 4 vezes.

Os dendrogramas gerados por UPGMA com base no grau de parentesco entre os indivíduos demonstraram que os agrupamentos não corresponderam aos grupos de coleta nem em RN, nem em SE; havendo sempre indivíduos de mesmo grupo de coleta agrupados com indivíduos de grupos de coleta diferentes. Uma possível explicação para isso seria devido à metodologia de coleta, que utiliza armadilhas em forma de cercados em que o mecanismo de disparo para fechar a porta se dá pelo próprio animal e não pelo pesquisador. Assim, não se pode garantir que todo um sub-bando seja capturado. Possivelmente, um núcleo familiar pode ter sido inteiramente coletado, porém em diferentes armadilhas, ocasionando a fragmentação desse núcleo familiar em diferentes grupos de coleta. Além disso, a troca de indivíduos entre sub-bandos também diminuiria as chances de captura de indivíduos aparentados em um mesmo grupo de coleta. Assim, esse resultado poderia ser devido a um viés da forma que as amostras foram coletadas associado a uma dinâmica complexa dentro dos grupos sociais, como já citado por Keuroghlian *et al.*, (2004), com a divisão dos bandos em sub-bandos havendo troca de indivíduos entre eles.

Além disso, os dendrogramas baseados no parentesco não demonstraram a formação de agrupamentos de indivíduos aparentados de acordo com o sexo dentro dos bandos, ou seja, não se

observou agrupamentos exclusivos nem de fêmeas nem de machos. Esse resultado pode estar associado com o padrão de dispersão observado por Biondo *et al.* (2011) entre os bandos aqui estudados, com machos e fêmeas dispersando. A ausência de filopatria de um dos sexos e também a troca de indivíduos entre sub-bandos poderiam ser fatores que impedissem a formação de agrupamentos de indivíduos aparentados exclusivos de um dos sexos.

De um modo geral, os resultados obtidos indicam que o parentesco deve influenciar a proximidade espacial entre os indivíduos na formação dos grupos sociais de queixadas. A influência do parentesco na estrutura social já foi confirmada em diversas espécies de mamíferos, entre elas: porcos selvagens (*Sus scrofa* – Garbor *et al.*, 1999), roedores (*Octodon degus* – Ebensperger *et al.*, 2004), primatas (*Papio cynocephalus* – Van Horn *et al.*, 2007; *Pongo pygmaeus wurmbii* – van Noordwijk *et al.*, 2012), hienas (*Crocuta crocuta* – Watts *et al.*, 2012), elefantes marinhos (*Mirounga leonina* – Fabiani *et al.*, 2006), marmotas (*Marmota monax* – Maher, 2009). Em alguns primatas, o parentesco elevado entre as fêmeas nos grupos está vinculado a um comportamento cooperativo de suporte em conflitos contra grupos de fêmeas não aparentados (Silk *et al.*, 2009; 2010). Em hienas, a explicação é a defesa de território (Watts *et al.*, 2012). Em catetos, o grau de parentesco entre os indivíduos está diretamente ligado à proximidade espacial e às interações amigáveis (Biondo, 2006). Em queixadas, a proximidade espacial entre indivíduos aparentados poderia estar vinculada a comportamentos cooperativos como, proteção dos indivíduos jovens, vigilância coletiva e encontro de alimentos de forma mais rápida. Defesa de território não seria uma hipótese plausível, pois as queixadas estão sempre se deslocando por grandes áreas (Kiltie e Terborgh, 1983; Fragoso, 1998; Carrillo *et al.*, 2002; Keuroghlian *et al.*, 2004) e não existem evidências de que defendam territórios.

VII.III - Estrutura genética populacional

Os valores de F_{ST} e D_{EST} encontrados (0,017 e 0,015, respectivamente) foram baixos, o que indica uma estruturação leve entre as duas localidades. Estes resultados são congruentes com o que

foi encontrado por Biondo *et al.* (2011) com queixadas amostradas nessas mesmas localidades, mas utilizando um menor número de indivíduos e de microssatélites. Além disso, a análise Bayesiana sem utilizar as localidades como *prior* apontou $K=1$ como sendo o mais provável, do mesmo modo como encontrado por Biondo *et al.* (2011). O baixo grau de estruturação encontrado pode ser devido a uma separação recente das populações, não tendo havido tempo suficiente para chegar à diferenciação significativa; ou a um alto fluxo gênico entre elas. Biondo *et al.* (2011) encontraram que mais de 30% dos indivíduos desses dois bandos podem ser migrantes, o que explicaria a fraca diferenciação encontrada no presente estudo e no estudo de Biondo *et al.* (2011).

Segundo Hubisz *et al.* (2009), quando os dados são pouco informativos ou quando a diferenciação é sutil, utilizar as localidades das amostras como *prior* pode auxiliar a identificar a estruturação. Entretanto, vale salientar que tal modelo não tenta encontrar estruturação onde não existe (Hubisz *et al.*, 2009). De acordo com o valor do F_{ST} encontrado aqui e por Biondo *et al.* (2011), indicando uma leve estruturação genética, a utilização do modelo LOCPRIOR poderia auxiliar a indicar estruturação entre as localidades caso haja. De fato, utilizando o modelo LOCPRIOR, o programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) inferiu que o número mais provável de populações (K) seria dois, correspondendo às localidades amostradas. Conforme recomendado por Hubisz *et al.* (2009), esses resultados devem ser analisados concomitantemente com informações de campo em busca de congruência entre eles. O resultado de $K=2$ encontrado pela análise Bayesiana utilizando o modelo LOCPRIOR e o resultado encontrado por Biondo *et al.* (2011) com cerca de 30% dos indivíduos como sendo migrantes poderia indicar que cada um dos bandos aqui analisados corresponde a uma população com alto fluxo gênico entre elas.

VIII - Conclusões

- Dentre os microssatélite específicos utilizados no presente estudo, os de dinucleotídeos se mostraram mais polimórficos em relação aos de tri e tetranucleotídeos, como já foi encontrado em outros estudos;
- Os microssatélites específicos de dinucleotídeos utilizados no presente estudo se mostraram mais polimórficos em relação aos microssatélites de *primers* heterólogos de dinucleotídeos;
- As amostras de pêlo se mostraram mais susceptíveis a erros de genotipagem na PCR em relação às amostras de sangue;
- Indivíduos capturados juntos, ou seja, que estão mais próximos na estrutura social espacial, são mais aparentados do que os que foram capturados separados, mesmo sem considerar os indivíduos jovens nas análises. Assim, o parentesco parece ter um papel importante na estrutura social das queixadas;
- Fêmeas mais próximas no espaço são mais aparentadas entre si do que com outras fêmeas do bando. Entre os machos, tal relação não é observada, o que pode sugerir que haja dispersão mais frequente de machos entre os sub-bandos. Mais estudos são necessários para confirmar a dispersão dos machos entre os grupos sociais;
- As duas localidades analisadas no presente estudo parecem constituir duas populações com alto fluxo gênico entre elas e com níveis similares de diversidade genética.

IX - Referências Bibliográficas

- AHLERING, M. A.; HEDGES, S.; JOHNSON, A.; TYSON, M.; SCHUTTLER, S. G.; EGGERT, L. S. 2011. Genetic diversity, social structure, and conservation value of the elephants of the Nakai Plateau, Lao PDR, based on non-invasive sampling. *Conservation Genetics*, 12, 413-422.
- ALCOCK, J. 2011. *Comportamento Animal: uma Abordagem Evolutiva*. 9ª ed. Pp. 457-505. Porto Alegre: Artmed.
- ALTRICHTER, M.; ALMEIDA, R. 2002. Exploitation of white-lipped peccaries *Tayassu pecari* (Artiodactyla: Tayassuidae) on the Osa Peninsula, Costa Rica. *Oryx*, 36, 126-132.
- AUSTIN, J. D.; GORMAN, T. A.; BISHOP, D. 2011. Assessing fine-scale genetic structure and relatedness in the micro-endemic Florida bog frog. *Conservation Genetics*, 12, 833-838.
- BENJAMINI, Y.; YEKUTIELI, D. 2001. The control of false discovery rate under dependency. *Annals of Statistics*, 29, 1165-1188.
- BERG, E. C.; EADIE, J. M.; LANGEN, T. A.; RUSSELL, A. F. 2009. Reverse sex-biased philopatry in a cooperative bird: genetic consequences and a social cause. *Molecular Ecology*, 18, 3486-3499.
- BIONDO, C. 2006. Estrutura social e alo-amamentação de catetos (*Tayassu tajacu*) em cativeiro. Tese de Doutorado. Instituto de Psicologia. Universidade de São Paulo, Brasil.
- 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.
- BLOUIN, M. S. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 503-511.
- BODMER, R. E. 1990. Responses of ungulates to seasonal inundations in the Amazon floodplain. *Journal of Tropical Ecology*, 6, 191-201.

- BOUTIN-GANACHE, I.; RAPOSO, M.; RAYMOND, M.; DESCHEPPER, C. F. 2001. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques*, 31, 24-27.
- BRYJA, J.; KANUCH, P.; FORNUSKOVÁ, A.; BARTONICKA, T.; REHAK, Z. 2009. Low population genetic structuring of two cryptic bat species suggests their migratory behaviour in continental Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 96, 103-114.
- BUSTON, P. M.; FAUVELOT, C.; WONG, M. Y. L.; PLANES, S. 2009. Genetic relatedness in groups of the humbug damselfish *Dascyllus aruanus*: small, similar-sized individuals may be close kin. *Molecular Ecology*, 18, 4707-4715.
- CARRILLO, E., SAENZ, J. C.; FULLER, T. K. 2002. Movements and activities of white-lipped peccaries in Corcovado National Park, Costa Rica. *Biological Conservation*, 108, 317-324.
- CHAKRABORTY, R.; KIMMEL, M.; STIVERS, D. N.; DAVISON, L. J.; DEKA, R. 1997. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 1041-1046.
- CHIARELLO, A. G. 1999. Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammal communities in south-eastern Brazil. *Biological Conservation*, 89, 71-82.
- COSTA-URRUTIA, P.; ABUD, C.; SECCHI, R.; LESSA, E. P. 2012. Population genetic structure and social kin associations of Franciscana Dolphin, *Pontoporia blainvillei*. *Journal of Heredity*, 103, 92-102.
- CRAWFORD, N. G. 2010. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources*, 10, 556-557.
- CULLEN, J. R. L.; BODMER, R. E.; PADUA, C. V. 2000. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. *Biological Conservation*, 95, 49-56.
- DALLA VECCHIA, A. C.; BIONDO, C.; SANCHES, A.; KEUROGHLIAN, A.; MIYAKI, C. Y.; GALETTI, M.; GALETTI JR, P. M. 2011. Isolation and characterization of microsatellite

- loci for white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and cross-amplification in collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Conservation Genetics Resources*, 3, 151-154.
- DI FIORE, A.; FLEISHER, R. C. 2005. Social behavior, reproductive strategies, and population genetic structure of *Lagothrix poeppigii*. *International Journal of Primatology*, 26, 1137-1173.
- DOBSON, F. S. 1982. Competition for mates and predominant juvenile male dispersal in mammals. *Animal Behaviour*, 30, 1183-1192.
- DOUADI, M. I.; GATTI, S.; LEVRERO, F.; DUHAMEL, G.; BERMEJO, M.; VALLET, D.; MENARD, N.; PETIT, E. J. 2007. Sex-biased dispersal in western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *Molecular Ecology*, 16, 2247-2259.
- DUNCAN, S. I.; RIECHERT, S. E.; FITZPATRICK, B. M.; FORDYCE, J. A. 2010. Relatedness and genetic structure in a socially polymorphic population of the spider *Anelosimus studiosus*. *Molecular Ecology*, 19, 810-818.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, DOI 10.1007/s12686-011-9548-7
- EBENSPERGER, L. A.; HURTADO, M. J.; SOTO-GAMBOA, M.; LACEY, E. A.; CHANG, A. T. 2004. Communal nesting and kinship in degus (*Octodon degus*). *Naturwissenschaften*, 91, 391-395.
- ELLEGREN, H.; MOORE, S.; ROBINSON, N.; BYRNE, K.; WARD, W.; SHELDON, B. C. 1997. Microsatellite evolution - a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 854-860.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.

- FABIANI, A.; GALIMBERTI, F.; SANVITO, S.; HOELZEL, A. R. 2006. Relatedness and site fidelity at the Southern elephant seal, *Mirounga leonina*, breeding colony in the Falkland Islands. *Animal Behaviour*, 72, 617-626.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587.
- FRAGOSO, J. M. V. 1998. Home range and movement patterns of white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) herds in the northern Brazilian Amazon. *Biotropica*, 30, 458-469.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. 2004. *A Primer of Conservation Genetics*. New York: Cambridge University Press.
- FRENTIU, F. D.; CLEGG, S. M.; CHITTOCK, J.; BURKE, T.; BLOWS, M. W.; OWENS, I. P. F. 2008. Pedigree-free animal models: the relatedness matrix reloaded. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 275, 639-647.
- GABOR, T. M.; HELLGREN, E. C.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; SILVY, N. J. 1999. Demography, sociospatial behavior and genetics of feral pigs (*Sus scrofa*) in a semi-arid environment. *Journal of Zoology (London)*, 247, 311-322.
- GALETTI, M.; GIACOMINI, H.; BUENO, R. S.; BERNARDO, C. S. S.; MARQUES, R. M.; BOVENDORP, R. S.; STEFFLER, C. E.; RUBIM, P.; GOBBO, S. K.; DONATTI, C. I.; BEGOTTI, R. A.; MEIRELLES, F.; NOBRE, R. A.; CHIARELLO, A. G.; PERES, C. A. 2009. Priority areas for the conservation of Atlantic forest large mammals. *Biological Conservation*, 142, 1229-1241.
- GARCIA-VALLVE, S.; PALAU, J.; ROMEU, A. 1999. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 1125-1134.
- GOBUSH, K.; KERR, B.; WASSER, S. 2009. Genetic relatedness and disrupted social structure in a poached population of African elephants. *Molecular Ecology*, 18, 722-734.

- GOTTDENKER, N.; BODMER, R. 1998. Reproduction and productivity of white-lipped and collared peccaries in the Peruvian Amazon. *Journal of Zoology*, 245, 423-430.
- GOUDET, J. 2002. FSTAT, version 2.9.3.2. University of Lausanne, Lausanne, Switzerland. www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html. Acessado em janeiro de 2012.
- GRANJON, L.; COSSON, J. F. 2008. Social relationships in *Mastomys huberti* as deduced from field and genetic analyses of multiple capture data. *Mammalia*, 72, 161–168.
- GREENWOOD, P. J. 1980. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour*, 28, 1140-1162.
- HAASL, R. J.; PAYSEUR, B. A. 2011. Multi-locus inference of population structure: a comparison between single nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Heredity*, 106, 158-171.
- HAMILTON, W. D. 1964. The genetical evolution of social behavior I/II. *Journal of Theoretical Biology*, 7, 1-52.
- HAMMOND, R. L.; LAWSON-HANDLEY, L. J. L.; WINNEY, B. J.; BRUFORD, M. W. PERRIN, N. 2006. Genetic evidence for female-biased dispersal and gene flow in a polygynous primate. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 273, 479-484.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. 2010. *Princípios de Genética de Populações*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed.
- HEY, J.; MACHADO, C. A. 2003. The study of structured populations - new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews*, 4, 535-543.
- HUGHES, C. 1998. Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: a revolution results. *Ecology*, 79, 2, 383-399.
- HUBISZ, M. J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1322-1332.

- JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801-1806.
- JOST, L. 2008. G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17, 4015-4026.
- KALINOWSKI, S. T.; WAGNER, A. P.; TAPER, M. L. 2006. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6, 576-579.
- KEUROGHLIAN, A.; DESBIEZ, A. L. J. 2010. Biometric and age estimation of live peccaries in the southern Pantanal, Brazil. *Suiform Soundings*, 9, 24-35.
- KEUROGHLIAN, A.; DESBIEZ, A. L. J.; BEISIEGEL, B. M.; MEDICI, E. P.; GATTI, A.; MENDES PONTES, A. R.; CAMPOS, C. B.; TÓFOLI, C. F.; MORAES JR., E. A.; AZEVEDO, F. C.; PINHO, G. M.; CORDEIRO, J. L. P.; SANTOS JR., T. S.; MORAIS, A. A.; MANGINI, P. R.; FLESHER, K.; RODRIGUES, L. F.; ALMEIDA, L. B. 2012. Avaliação do Risco de Extinção do queixada, *Tayassu pecari* (Link, 1795), no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, 3, 84-102.
- KEUROGHLIAN, A.; EATON, D. P.; LONGLAND, W. S. 2004. Area use by white-lipped and collared peccaries (*Tayassu pecari* and *Tayassu tajacu*) in a tropical forest fragment. *Biological Conservation*, 120, 411-425.
- KILTIE, R. A.; TERBORGH, J. 1983. Observations on the behavior of rainforest peccaries in Peru: why white-lipped peccaries form herds. *Zeit Tierpsychology*, 62, 241-255.
- LAWSON-HANDLEY, L. J. L.; PERRIN, N. 2007. Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Molecular Ecology*, 16, 1559-1578.
- LUCA, M.; ANDREW, W.; EMER, R.; PATRICIA, R.; ANDREW, R.; JAMIE, C.; TOM, C. 2009. Population structure of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) in the North

- Atlantic Ocean as revealed by mitochondrial and nuclear genetic markers. *Marine Biology*, 156, 821-834.
- MAHER, C. R. 2009. Genetic relatedness and space use in a behaviorally flexible species of marmot, the woodchuck (*Marmota monax*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63, 857-868.
- MAYER, J. J.; BRANDT, P. N. 1982. Identity, distribution, and natural history of the peccaries, Tayassuidae. In: M. A. Maies; H. H. Genoway (Eds.) *Mammalian Biology in South America*. Pp.433-455. Linesville: Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh.
- MAYER, J.; WETZEL, R. 1987. *Tayassu pecari*. *Mammalian Species*, 293, 1-7.
- NARUM, S. R. 2006. Beyond Bonferroni: Less conservative analyses for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 7, 786-787.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- POMPANON, F.; BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; TABELERT, P. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews*, 6, 847-859.
- PRICE, S. A.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; GITTLEMAN, J. L. 2005. A complete phylogeny of the whales, dolphins and even-toed hoofed mammals (Cetartiodactyla). *Biological Review*, 80, 445-473.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, P.; DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, 8, 285-288.
- RADESPIEL, U.; JURIC, M.; ZIMMERMANN, E. 2008. Sociogenetic structures, dispersal and the risk of inbreeding in a small nocturnal lemur, the golden-brown mouse lemur (*Microcebus ravelobensis*). *Behaviour*, 146, 607-628.

- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- RIDLEY, M. 2006. *Evolução*. 3ª ed. Pp. 222-248. Porto Alegre: Artmed.
- ROHRER, G.A; ALEXANDER, L. J.; HU, Z.; SMITH, T. P.; KEELE, J.W.; BEATTIE, C. W. 1996. A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Research*, 6, 371-391.
- 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, 231-245.
- ROLLINS, L. A.; BROWNING, L. E.; HOLLELEY, C. E.; SAVAGE, J. L.; RUSSELL, A. F.; GRIFFITH, S. C. 2012. Building genetic networks using relatedness information: a novel approach for the estimation of dispersal and characterization of group structure in social animals. *Molecular Ecology*, 21, 1727-1740.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHUG, M. C.; HUTTER, C.M.; WETTERSTRAND, K. A.; GAUDETTE, M.S.; MACKAY, T. F. C.; AQUADRO, C. F. 1998. The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 1751-1760.
- SILK, J. B.; BEEHNER, J. C.; BERGMAN, T. J.; CROCKFORD, C.; ENGH, A. L.; MOSCOVICE, L. R.; WITTIG, R. M.; SEYFARTH, R. M.; CHENEY, D. L. 2009. The benefits of social capital: close social bonds among female baboons enhance offspring survival. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 276, 3099-3104.
- SILK, J. B.; BEEHNER, J. C.; BERGMAN, T. J.; CROCKFORD, C.; ENGH, A. L.; MOSCOVICE, L. R.; WITTIG, R. M.; SEYFARTH, R. M.; CHENEY, D. L. 2010. Strong and consistent social bonds enhance the longevity of female baboons. *Current Biology*, 20, 1359-1361.

- SOLMSEN, N.; JOHANNESSEN, J.; SCHRADIN, C. 2011. Highly asymmetric fine-scale genetic structure between sexes of African striped mice and indication for condition dependent alternative male dispersal tactics. *Molecular Ecology*, 20, 1624-1634.
- SOWLS, L. K. 1984. *The Peccaries*. Tucson: The University of Arizona Press.
- STORZ, J. F. 1999. Genetic consequences of mammalian social structure. *Journal of Mammalogy*, 80, 553-569.
- SUTHERLAND, D. R.; SPENCER, P. B. S.; SINGLETON, G. R.; TAYLOR, A. C. 2005. Kin interactions and changing social structure during a population outbreak of feral house mice. *Molecular Ecology*, 14, 2803-2814.
- TAMURA, K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI, M.; KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- VAN HORN, R. C.; BUCHAN, J. C.; ALTMANN, J.; ALBERTS, S. C. 2007. Divided destinies: group choice by female savannah baboons during social group fission. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61, 1823-1837.
- VAN NOORDWIJK, M. A.; ARORA, N.; WILLEMS, E. P.; DUNKEL, L. P.; AMDA, R. N.; MARDIANAH, N.; ACKERMANN, C.; KRÜTZEN, M.; VAN SCHAIK, C. P. 2012. Female philopatry and its social benefits among Bornean orangutans. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66, 823-834.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- VIDYA, T. N. C.; BALMFORTH, Z. LE ROUX, A.; CHERRY, M. I. 2009. Genetic structure, relatedness and helping behaviour in the yellow mongoose in a farmland and a natural habitat. *Journal of Zoology*, 278, 57-64.

- VONHOF, M. J.; STROBECK, C.; FENTON, M. B. 2008. Genetic variation and population structure in big brown bats (*Eptesicus fuscus*): is female dispersal important? *Journal of Mammalogy*, 89, 1411-1420.
- WAGNER, A. P.; CREEL, S.; KALINOWSKI, S. T. 2006. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity*, 97, 336-345.
- WANG, J. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, 160, 1203-1215.
- WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, 15, 1419-1439.
- WATTS, H. E.; SCRIBNER, K. T.; GARCIA, H. A.; HOLEKAMP, K. E. 2012. Genetic diversity and structure in two spotted hyena populations reflects social organization and male dispersal. *Journal of Zoology*, 285, 281-291.
- WOLFF, J. O. 1993. What is the role of adults in mammalian juvenile dispersal? *Oikos*, 68, 173-177