**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

**Análise molecular de amostras fecais de uma população de veado-
mateiro (*Mazama americana*) para a obtenção de informações
genéticas e ecológicas**

Márcio Leite de Oliveira

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Ecologia Aplicada

**Piracicaba
2010**

Márcio Leite de Oliveira
Biólogo

**Análise molecular de amostras fecais de uma população de veado-mateiro
(*Mazama americana*) para a obtenção de informações genéticas e ecológicas**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO BARBANTI DUARTE**

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Ecologia Aplicada

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Oliveira, Márcio Leite de

Análise molecular de amostras fecais de uma população de veado-mateiro (*Mazama americana*) para a obtenção de informações genéticas e ecológicas / Márcio leite de Oliveira . - - Piracicaba, 2010.
63 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. DNA 2. Fezes - Amostra 3. Ecologia molecular 4. Genética animal 5. Populações animais
6. Veados I. Título

CDD 639.9797357
O48a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho à cadela Granada, que durante a maior parte do tempo foi a única companhia no trabalho de campo, desempenhando a atividade de faro das amostras brilhantemente até mesmo após ser atacada por uma serpente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me dá sabedoria e inteligência para duvidar de sua existência. Mas também o amor para me sentir parte de sua grandiosidade.

Ao meu avô Carlito, pela ternura, incentivo e exemplo de vontade de viver.

Ao meu pai Carlos Amadeu, por me ensinar a ser honesto e a sempre pensar nos mais carentes, que nada têm e que tudo precisam.

À minha mãe Cristina, por me dar o exemplo do que é doar-se pelos outros, principalmente dando cuidado, atenção e carinho.

Aos meus irmãos Maurício e Juliana, que sempre foram meus grandes companheiros e estiveram presentes ao meu lado quando preciso.

À Fernanda, pelo imenso amor que compartilhamos, por não se cansar com tantas idas e vindas e horas de ônibus, avião ou carro. Também pela paciência para entender que um pesquisador não tem hora para parar de trabalhar nem feriado prolongado.

Aos amigos Mateus, Luís, Iha, Marini e Pedro, pela amizade que, apesar da distância de uns, sempre se mantém viva, e pelos momentos de descontração e apoio.

Aos contribuintes, especialmente aos mais carentes, que financiaram esta pesquisa e minha bolsa.

Ao Prof. José Maurício Barbanti Duarte, pela amizade, orientação na condução deste trabalho e ensinamentos profundos sobre ciência, ética e conservação.

Ao Prof. Luciano Martins Verdade, por aceitar ser meu orientador durante o período de seleção do curso de mestrado.

Ao Alexandre Vogliotti (Geléia), pela amizade e ensinamentos de campo e ecologia de cervídeos.

Ao técnico do Lab. de Genética Molecular João Airton Boer, pela ajuda na rotina do laboratório e pelos momentos de alegria e bom humor.

À Polícia Militar do Estado de São Paulo e ao soldado Ricardo Alexandre Cazarotte, pelo treinamento da cadela Granada para o faro de amostras fecais de cervídeos.

Ao Antônio Vitor, pela amizade e ensinamentos no período em que morei na Fazenda Rio Grande, junto ao fragmento estudado. Juntos, destruimos muitos jiraus e cevas de caçadores.

Aos membros do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos pela amizade, companheirismo e trabalho em equipe. E que equipe!

À Juliana, pela ajuda no laboratório durante os momentos de apuro e correria para cumprir os prazos.

Ao amigo Pedro, também pela ajuda no laboratório, mas por um dizer: “Fica calmo que estamos juntos nessa!”.

Ao amigo Kena, pela ajuda no trabalho de campo, ensinamentos sobre ecologia e história da música, com especialização em Beatles.

Queremos saber
O que vão fazer
Com as novas invenções
Queremos notícia mais séria
Sobre a descoberta da antimatéria
E suas implicações
Na emancipação do homem
Das grandes populações
Homens pobres das cidades
Das estepes, dos sertões

Queremos saber
Quando vamos ter
Raio laser mais barato
Queremos de fato um relato
Retrato mais sério
Do mistério da luz
Luz do disco voador
Pra iluminação do homem
Tão carente e sofredor
Tão perdido na distância
Da morada do Senhor

Queremos saber
Queremos viver
Confiantes no futuro
Por isso se faz necessário
Prever qual o itinerário da ilusão
A ilusão do poder
Pois se foi permitido ao homem
Tantas coisas conhecer
É melhor que todos saibam
O que pode acontecer

Queremos saber
Queremos saber
Todos queremos saber
(Gilberto Gil)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 A metodologia do DNA fecal.....	17
2.1.2 A aplicação da metodologia do DNA fecal na ecologia	20
2.2 Metodologia	21
2.2.1 Área de estudo	21
2.2.2 Treinamento do cão farejador.....	22
2.2.3 Coleta de amostras.....	23
2.2.4 Extração do DNA.....	24
2.2.5 Identificação específica	24
2.2.6 Sexagem	25
2.2.7 Identificação individual.....	26
2.2.8 Análise genética de amostras de <i>M. americana</i> advindas do banco genético do NUPECCE.....	29
2.3 Resultados.....	30
2.3.1 Padronização da metodologia	30
2.3.1.1 Treinamento do cão.....	30
2.3.1.2 Coleta das amostras.....	31
2.3.1.3 Identificação Específica	33
2.3.1.4 Genotipagem Individual das Amostras	36
2.3.1.4.1 Seleção dos iniciadores.....	36
2.3.1.4.2 Amplificação dos locos microsatélites	37
2.3.1.5 Sexagem das amostras	38
2.3.2 Obtenção de informações genéticas e ecológicas	40
2.3.2.1 Obtenção de réplicas.....	40
2.3.2.2 Genotipagem em sequenciador automático	42

2.3.2.3	Análise genética de amostras de <i>M. americana</i> advindas do banco genético do NUPECCE.....	45
2.3.2.4	Análises genéticas e ecológicas baseadas em DNA fecal.....	46
2.4	Discussão	49
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	REFERÊNCIAS	57

RESUMO

Análise molecular de amostras fecais de uma população de veado-mateiro (*Mazama americana*) para a obtenção de informações genéticas e ecológicas

O gênero *Mazama* é composto por cinco espécies no Brasil. São animais de visualização dificultada por causa de comportamentos evasivos, o que torna as capturas e os estudos comportamentais quase impossíveis. Assim, o uso de metodologias não invasivas para estudos ecológicos e genéticos destas espécies se torna necessário. A análise do DNA fecal está dentro das técnicas mais promissoras para esse fim. Este estudo objetivou genotipar amostras fecais, de uma população de veado-mateiro (*Mazama americana*) para a obtenção de informações genéticas e ecológicas. Para tanto, foram coletadas, com auxílio de um cão farejador, georreferenciadas e estocadas em etanol absoluto, 52 amostras fecais de cervídeos. A coleta realizou-se em um fragmento (21°20'S 47°17'W) de 600 ha de floresta estacional semidecidual. Dessas amostras coletadas, 31% (n=16) foram classificadas como “frescas” e 69% (n=36) como “não frescas”. O DNA foi extraído em torno de 30 dias após a coleta, usando o kit comercial QIAamp® DNA Stool Mini Kit, seguindo o protocolo do fabricante. Das 52 amostras, 45 foram identificadas por PCR/RFLP como pertencentes a *M. americana* e as demais apresentaram problemas de amplificação e digestão, permanecendo sem identificação. Amplificaram-se por PCR cinco locos microssatélites, e o sucesso de amplificação, visualizado em gel de agarose, variou com o tamanho dos locos e com a classe das amostras. O sucesso de amplificação foi de 65% das amostras da categoria “fresca” e 35% das amostras da categoria “não fresca”. Encontrou-se uma correlação negativa ($R = -0,82$) entre o tamanho dos fragmentos dos locos de microssatélites e o sucesso de amplificação. Foi possível identificar o sexo do animal em 43,7% das amostras fecais, pela amplificação do gene da amelogenina. Os locos microssatélites amplificados foram analisados em sequenciador automático. Os eletroferogramas gerados pelo sequenciador impossibilitaram a genotipagem da maioria dos locos e amostras, tornando inviável qualquer análise genética e ecológica com confiabilidade. Fica evidente a dificuldade de se trabalhar com a metodologia do DNA fecal para a identificação individual e sexagem de amostras obtidas de Cervídeos florestais em vida livre. Algumas melhorias metodológicas (coleta de amostras fecais frescas, seleção de iniciadores para locos menores e quantificação do DNA extraído por PCR em tempo real) são sugeridas para o aumento nos índices de sucesso na genotipagem em estudos futuros.

Palavras-chave: *Mazama*; DNA Fecal; Ecologia molecular; Microssatélite; Citocromo b; Amelogenina

ABSTRACT

Molecular analysis of faecal samples of a red brocket deer (*Mazama americana*) population for obtaining genetic and ecological information

Mazama genus is composed by five species in Brazil. All of them are difficult to observe due to their evasive behaviors, what makes the captures and behavioral studies almost impossible. Thus, the use of non invasive methodologies is necessary to study the ecology and genetics of these species. The fecal DNA analysis is one of the most promising techniques for this purpose. This study aimed to genotype a *Mazama americana* population faecal samples for obtaining genetics and ecological information. For this, 52 deer faecal samples were collected in a 600ha seasonal semideciduous forest fragment (21°20'S 47°17'W), with the help of a detection dog, stored in ethanol and georeferenced. Of these samples 31% (n=16) was classified as "fresh" and 69% (n=36) as "not fresh". About thirty days after the collection the DNA was extracted using the QIAamp® DNA Stool Mini Kit following the manufacturer's instructions. From the 52 samples collected and extracted, 45 were identified by PCR/RFLP as *M. americana* and the others showed amplification and digestion problems, remaining without identification. Five microsatellite loci were amplified by PCR and the amplification success, visualized in agarose gel, varied with the loco size and age class. The amplifications success occurred in 65% of the "fresh" samples and in 35% of the "non-fresh" samples and a negative correlation ($R = -0.82$) was found between amplification success and loci sizes. It was possible to identify the animal sex in 43% of the samples by the amelogenin gene. The microsatellite loci amplifications were analyzed in an automatic sequencer. The majority of the samples and loci were impossible to genotype because of the quality of the electroferograms, what made impossible any reliable genetic and ecological analysis. It is evident the difficulty to work with the faecal DNA methodology using field collected forest's deer samples for individual and sexual identifications. Some methodological improvements (collect fresh samples, select primers for shorter loci and quantify the extracted DNA by real time PCR) are suggested to increase the genotyping success indexes in future studies

Keywords: *Mazama*; Faecal DNA; Molecular ecology; Microsatellite; Cytochrome b; Amelogenin

1 INTRODUÇÃO

A família Cervidae é constituída por 17 gêneros, largamente distribuídos no globo, com exceção dos extremos polares (EISENBERG; REDFORD, 1999). Na atualidade, o gênero *Mazama*, no Brasil, é representado por cinco espécies: *M. americana*, *M. bororo*, *M. nemorivaga*, *M. gouazoubira* e *M. nana* (DUARTE; MERINO, 1997; ROSSI, 2000) que ocupam todo o território nacional (DUARTE et al., 1998). Os animais do gênero *Mazama* são de pequeno porte, em relação a outros cervídeos, com a porção anterior do corpo minimamente mais baixa que a posterior, apresentando chifres não ramificados e pequenos. Esses animais, de hábitos florestais, alimentam-se basicamente de vegetais (folhas, frutos, brotos, etc.), sendo noturnos, solitários, territorialistas e ocupando pequenas áreas de vida (BARRETTE, 1987). Ainda, como veados de clima tropical, não demonstram interesse pelas cevas e também são pouco atraídos por técnicas baseadas em urina e fezes (VOGLIOTTI, 2003). Essas características ecológicas e comportamentais tornam a captura, necessária para estudos ecológicos detalhados, quase impossível (VOGLIOTTI, 2003), e, quando alcançada, é resultante muitas vezes do mero acaso.

Quando a captura é indispensável, esta constitui-se de um processo especialmente trabalhoso e perigoso, pois é muito comum a ocorrência de acidentes que causam injúria aos animais, como a miopatia de captura (DUARTE, 2008; DUARTE et al., 2010). Assim, poucos animais podem ser obtidos, prejudicando a obtenção razoável de dados.

Uma consequência de toda essa problemática é a falta de trabalhos científicos que embasariam a determinação do status de conservação das espécies e proporião medidas de manejo conservacionista.

Assim, o desenvolvimento de novas metodologias de estimativa populacional, especialmente para espécies pouco conhecidas, deve ocorrer o mais rápido possível, devido às ameaças sofridas por esses animais (WEBER; GONZALEZ, 2003; GONZALEZ et al., 2009). Wilson et al. (1996) ressaltam que, sem dados confiáveis do tamanho das populações, os esforços de manejo conservacionista seriam ineficientes.

Uma alternativa à captura são as metodologias não invasivas, como o armadilhamento fotográfico e a observação de indícios indiretos, como pegadas e fezes. Porém, para estudos mais aprofundados, é necessário reconhecer individualmente os animais, o que não é possível através de fotografias, pegadas e simples observação das fezes.

Restariam, como possível metodologia a ser empregada, os estudos baseados no DNA contido nas fezes (ALBAUGH et al., 1992; SIDRANSKY et al., 1992; KOHN; WAYNE, 1997).

A coleta e a análise das fezes têm sido uma importante fonte de informações sobre os animais selvagens, fornecendo informações desde a genética até a endocrinologia e servindo como base para vários estudos ecológicos (KOHN; WAYNE, 1997).

O presente trabalho objetivou padronizar metodologia para colheita, estocagem, extração, amplificação e genotipagem do DNA fecal para uma população de *Mazama americana*.

Para tanto, escolheu-se um fragmento florestal próximo à sede do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos onde havia a presença confirmada da espécie *Mazama americana*. Dividiu-se a análise dos resultados deste estudo em duas partes. Uma de cunho metodológico, que analisa diferentes aspectos da metodologia empregada até o sucesso de amplificação do DNA constatado em gel de agarose. Outra de cunho genético e ecológico, com base na análise das amplificações e genotipagens em sequenciador automático.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A metodologia do DNA fecal

Atualmente, uma das maiores dificuldades para a realização de estudos populacionais de grandes mamíferos na natureza, especialmente em áreas florestais, é a obtenção de amostras. As expedições de captura são extremamente dispendiosas e nem sempre resultam na obtenção de amostras suficientes (DUARTE et al., 2010). Essa dificuldade mostrou-se especialmente importante em relação aos cervídeos do gênero *Mazama* (VOGLIOTTI, 2003), que necessitam de alternativas eficientes para amostragens amplas e rápidas. Além disso, métodos baseados no censo direto dos animais podem ser imprecisos, por causa da dificuldade de detecção dos indivíduos (KOHN et al., 1999).

A coleta e a análise das fezes são propostas, então, como uma alternativa para a obtenção de informações genéticas, consequentemente servindo como base para vários estudos ecológicos (KOHN; WAYNE, 1997). Esta abordagem amostral não invasiva foi uma estratégia utilizada em animais como *Puma concolor* (MIOTTO et al., 2007), *Meles meles* (FRANTZ et al., 2003) e *Canis rufus* (KNAPP et al., 2009).

Para um estudo populacional detalhado, através do DNA contido nas fezes, é necessário determinar com precisão dados como: espécie a que pertence a amostra de fezes, sexo, identificação individual, local e data de coleta da amostra, etc. Para isso, são utilizados marcadores moleculares específicos, e cada uma dessas informações é obtida.

Palomares et al. (2002) desenvolveram uma metodologia de identificação da espécie *Lynx pardinus* na natureza através da amplificação de um fragmento do gene mitocondrial do citocromo B, utilizando iniciadores espécie-específicos. Esses pesquisadores realizaram, também, um experimento no qual se avaliou a extração de DNA de amostras de fezes coletadas na natureza após diferentes intervalos de tempo, não tendo sido observada uma correlação negativa entre o tempo de defecação e o índice de amplificação do DNA por PCR. Gonzalez et al. (2009) desenvolveram iniciadores capazes de amplificar um fragmento do gene citocromo B de todas as

espécies do gênero *Mazama*. Os autores submeteram esse fragmento à hidrólise com enzimas de restrição BstnI, SspI e AflIII. Essas enzimas promoveram o corte específico do fragmento em fragmentos de tamanhos diferentes, permitindo a identificação das espécies pelos padrões de restrição. Utilizando essa metodologia de PCR, aliada às enzimas de restrição, foi possível estabelecer a provável distribuição geográfica da espécie *M. bororo* através da coleta de fezes nas principais áreas protegidas do sul e sudeste do Brasil (DUARTE et al., 2005).

A determinação do sexo dos indivíduos e consequente estudo da proporção sexual da população pode ser feita baseada na amplificação, por PCR, de uma região do cromossomo Y ou X dos mamíferos (GRIFFITHS; TIWARI, 1993) ou pelo uso do gene codificador da amelogenina, que se encontra presente em ambos os cromossomos sexuais (ENNIS; GALLAGHER, 1994). Para serem utilizados em cervídeos, Wilson e White (1998) adaptaram iniciadores a princípio usados em bovinos e humanos. Esses iniciadores amplificam locos gênicos do cromossomo Y e X, sendo Sry (180 pb) para Y e Fmr-1 (350 pb) para X. Apesar do Fmr-1 funcionar como um controle da reação, ele não identifica possíveis problemas existentes no iniciador ou no fragmento da porção Y. Mesmo com uma não amplificação da região Y, fica incerta a afirmação de um genótipo feminino. Por esse motivo, torna-se mais seguro utilizar como marcador o gene da amelogenina. Com esse marcador, apenas um iniciador amplifica ambas as regiões nos cromossomos X e Y. A região em Y apresenta uma deleção, resultando em dois fragmentos de tamanhos diferentes no indivíduo do sexo masculino, quando analisado o produto de amplificação em gel de agarose. A sexagem pelo gene da amelogenina foi aplicada com sucesso por Yamauchi et al. (2000) em uma espécie de cervídeo, o *Cervus nippon*. A metodologia também é testada por Pajares et al. (2007) para ruminantes silvestres, utilizando o iniciador desenvolvido para bovinos por Ennis e Gallagher (1994). Ele apresenta resultados positivos e, dentre as espécies testadas, estão três pertencentes à família Cervidae: *Capreolus capreolus*, *Dama dama* e *Cervus elaphus*.

Sendo identificados a espécie e o sexo das amostras, restaria, para um estudo mais detalhado, a identificação individual. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996), diferentes experimentos, no início da década de 80, demonstraram que os genomas

eucariotos possuem diferentes classes de sequências repetitivas, umas mais complexas e outras mais simples (HAMADA et al., 1982; TAUTZ; RENZ, 1984). Essas sequências simples repetitivas foram denominadas de *microsatellites* (LITT; LUTY, 1989) e consistem em pequenas sequências com 1 a 4 nucleotídeos, repetidas e justapostas. Essas sequências dos genomas eucariotos são locos genéticos altamente polimórficos, constituindo-se na classe mais polimórfica de marcadores moleculares capazes de uma identificação individual.

Os genótipos nos locos dos microsatélites são identificados por PCR, utilizando-se de um par de iniciadores específicos (de 20 a 30 bases) complementares a sequências únicas que flanqueiam as repetições. Segmentos amplificados a partir desses sítios apresentam fragmentos com tamanhos diferentes explicados pelos diferentes números de repetições. Assim, cada loco microsatélite constitui-se um marcador molecular altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo do mesmo loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Por meio de genotipagem dos locos de microsatélites, foi possível, por exemplo, estimar o tamanho populacional de uma espécie de coioite, cujo comportamento prevê a defecação em locais de fácil acesso (KOHN et al., 1999). Os autores associaram coletas sistemáticas a análises moleculares para a identificação individual e sexagem dos coiotes e concluíram que essa metodologia é bastante factível para estimativas populacionais, para a determinação da razão sexual e até para obter inferências comportamentais e demográficas em carnívoros. Os autores ressaltam, entretanto, que a eficiência da metodologia seja testada a cada grupo que se pretende estudar.

Uma análise crítica das genotipagens de DNA obtido a partir de técnicas não invasivas de amostragem foi realizada por Taberlet et al. (1999), que estabeleceram um protocolo-padrão para o uso de metodologias não invasivas, especialmente as baseadas em DNA fecal. Os autores verificaram a grande incidência de falsos diagnósticos, principalmente no que se refere à perda de alelos (“allelic dropout”), causada pela pouca quantidade e baixa qualidade do DNA específico obtido a partir de extrações de DNA fecal convencionais. O protocolo proposto sugere a amplificação em duplicata ou até triplicata no caso de não concordância dos genótipos obtidos. Inúmeros

trabalhos discorrem extensas análises e protocolos de coleta de amostras, de estocagem, de extração, de quantificação de DNA alvo, de PCR, no sentido de minimizar e lidar com os erros de genotipagens por marcadores do tipo microssatélites aplicados ao DNA fecal (e.g. SOTO-CALDERÓN et al., 2009; RUTLEDGE et al., 2009; TABERLET et al., 1996, 1999; KNAPP et al., 2009; MORIN et al., 2000; PIGGOTT et al., 2003). Uma revisão muito detalhada de todo o processo de trabalho com amostras genéticas não invasivas, especialmente as fezes, foi recentemente publicada por Beja-Pereira et al. (2009), estabelecendo-se como literatura básica para os iniciantes na área. Observam-se diferentes maneiras de lidar com esses problemas de genotipagem. Porém, cada alternativa proposta foi baseada em experimentos, de certa maneira, inerentes às condições enfrentadas por aqueles pesquisadores, e a extrapolação desses métodos não pode ser direta. Observam-se diferentes condições de clima, questões inerentes as espécies estudadas, modelos que apenas funcionam com “N” elevado, e, ainda, questões de inviabilidade orçamentária.

A grande maioria dos trabalhos publicados utilizando a genotipagem individual de amostras fecais para o estudo de populações de animais selvagens teve a coleta de amostras realizada em regiões de clima frio (-20 a 10°C) (e.g. PRUGH et al., 2005; FRANTZ et al., 2003; CREEL et al., 2003) e/ou o animal foi observado a distancia até a defecação, quando as amostras eram coletadas em estado fresco, ou ainda as amostras eram coletadas em ninhos (e.g. NSUBUGA et al., 2004; MORIN et al., 2001). No Brasil, apenas um trabalho publicado foi encontrado com esta metodologia: Miotto et al. (2007). Este estudo conseguiu genotipar apenas 9 de 32 amostras coletadas em campo.

2.1.2 A aplicação da metodologia do DNA fecal na ecologia

Quando uma grande quantidade de amostras fecais é genotipada, o número cumulativo de genótipos individuais pode ser expresso em função do número de fezes coletadas. A assíntota dessa curva pode ser determinada analiticamente e gerar uma estimativa da população local (KOHN et al., 1999). De maneira similar, modelos de marcação e recaptura podem ser úteis para analisar os dados de genotipagem fecal (KONH; KNAUER, 1999). Nessa metodologia, fezes com o mesmo genótipo são

consideradas como recapturas. Ainda segundo Kohn et al. (1999), informações sobre proporção sexual e área de vida são obtidas através de marcadores sexuais específicos e análise da distribuição geográfica dos locais de coleta das amostras fecais. Além disso, a comparação dos genótipos pode derivar em dados de paternidade e parentesco dos indivíduos estudados. Duarte et al. (2005), utilizando-se de DNA fecal, além de determinarem a distribuição geográfica de *M. bororo*, estimaram, também, através do modelo de marcação e recaptura de Schumacher e Eschmeyer (1943), a densidade da espécie no Parque Estadual de Intervales.

A obtenção, em grande quantidade, das amostras é outra dificuldade no caso dos cervídeos do gênero *Mazama*, já que estas são conspícuas e confundem-se com a serrapilheira. Para a localização de amostras fecais de animais selvagens, em geral, são utilizados cães farejadores, que indicam o local da defecação efusivamente (SMITH et al., 2003; WASSER et al., 2004). No Brasil, o Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos é pioneiro nesta metodologia (DUARTE, 2006), usando metodologia, para o treinamento dos animais, muito semelhante ao padrão mundial estabelecido para cães de busca de entorpecentes, explosivos, corpos, etc.

Assim sendo, a metodologia do DNA fecal poderia ajudar a preencher a lacuna de conhecimento, genético e ecológico, a respeito das espécies de cervídeos florestais.

2.2 Metodologia

2.2.1 Área de estudo

A pesquisa foi realizada em um fragmento de floresta estacional semidecidual primária e secundária, de 660 ha, localizado no município de Cajuru, Estado de São Paulo (21° 25' S e 47° 16' O) (Figura 1). Trata-se de um fragmento de formato irregular, localizado às margens do Rio Cubatão (afluente do Rio Pardo), em duas colinas, e circundado por uma matriz agrícola composta principalmente por cana-de-açúcar e pasto. Nas proximidades, encontram-se outros fragmentos, todos com tamanhos menores. Em meados de 2005, a equipe do NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos), através de armadilhamento fotográfico, detectou na área a presença da espécie *M. americana*, detectando assim uma possível nova população do citótipo Paraná, descrito por Duarte, em 1998. Durante visitas prévias à área, foi comum

moradores das fazendas adjacentes ao fragmento relataram, com certa frequência, avistamentos de indivíduos, provavelmente, das espécies *M. americana* e *M. gouazoubira*, parecendo a diferenciação entre as duas espécies algo claro para alguns deles. Além disso, foi frequente a presença de rastros de animais do gênero *Mazama* nas estradas não pavimentadas em meio aos canaviais da região.

Figura 1 - Imagem satelital da área com o fragmento estudado em destaque. (Fonte: Google Earth®)

2.2.2 Treinamento do cão farejador

Devido à extrema necessidade da utilização do cão farejador para a obtenção das amostras fecais, foi necessário o treinamento de um cão, uma vez que o existente no NUPECCE havia falecido. Para tanto, selecionou-se, pelo comportamento extremamente ativo e averse por brinquedo (bola de tênis), um cão fêmea sem raça

definida, de nome Granada. O processo de treinamento foi realizado pelo canil da Polícia Militar do Estado de São Paulo, localizado em Ribeirão Preto - SP. Para este treinamento, foi fornecido ao treinador, semanalmente ou, quando necessário, a cada 2 dias, amostras fecais de animais das cinco espécies brasileiras do gênero *Mazama*, mantidos no criatório do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos. Com o objetivo de fazer com que o odor das fezes se assemelhasse ao máximo ao odor das fezes dos animais de vida livre, a alimentação dos animais de cativeiro, dois dias antes da coleta das amostras, foi alterada substituindo-se a ração por uma dieta composta por folhas e frutas.

Fez parte do treinamento do cão uma habituação à presença de outros animais não canídeos, como medida para evitar que o mesmo interagisse com a fauna nativa durante o trabalho em campo.

Após o treinamento no canil da Polícia Militar, o cão foi levado ao Parque Nacional do Iguaçu (Foz do Iguaçu - PR), onde o mesmo foi testado quanto à habilidade na localização das fezes na natureza. Observada certa ineficiência do animal em reconhecer os odores das fezes naturais, uma adequação foi necessária, utilizando-se de amostras naturais encontradas pelos pesquisadores. Esta adequação seguiu os protocolos da Polícia Militar, padrão internacionalmente utilizado.

2.2.3 Coleta de amostras

A coleta de fezes foi realizada no período entre 29 de outubro de 2008 e 22 de dezembro de 2008, de maneira intensiva até que se alcançou o total de amostras almejado, no menor período de tempo possível. Essa coleta foi feita utilizando-se do cão farejador, percorrendo todo o interior do fragmento, de maneira a realizar uma amostragem completa da área. O local de coleta de cada amostra teve a sua coordenada geográfica anotada e, posteriormente, foi georreferenciado. As amostras foram armazenadas, durante as expedições no interior do fragmento, em tubos de centrífuga com tampa de rosca (50 mL) hermeticamente fechados, para evitar contaminação. Na base de campo, foi adicionado a essas amostras etanol absoluto, com a finalidade de se evitar a degradação do DNA. As amostras foram classificadas, visualmente, em duas categorias: “fresca” (com muco em volta, sem fungos e com a cor

original) e “não fresca” (sem muco, com fungos, escurecidas e quebradiças). Após o trabalho de campo as amostras foram apresentadas a um especialista (Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte) para este identificar, visualmente, se as mesmas eram de cervídeos.

2.2.4 Extração do DNA

A extração do DNA fecal foi realizada utilizando-se do kit de extração QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit, seguindo protocolo do próprio fabricante.

2.2.5 Identificação específica

Um fragmento de 224 pb do gene mitocondrial citocromo b foi amplificado por meio de PCR, com iniciadores capazes de amplificar amostras de todas as espécies do gênero *Mazama*, desenhados por Gonzalez et al. (2009), seguindo as seguintes concentrações dos reagentes: 0,16μM de cada iniciador, 2X de tampão, 1,25mM de dNTP, 10,0mM de MgCl₂, 0,8ng/μL de BSA, 3U de Taq DNA Polimerase, 3,0μL de DNA e água ultrapura qsp 25,0 μL.

As reações de PCR foram realizadas seguindo o seguinte programa de temperaturas:

1. 94°C por 5 minutos;
2. 94°C por 1 minuto e 15 segundos;
3. 55°C por 1 minuto;
4. 72°C por 1 minuto e 15 segundos;
5. Repetir as etapas 2 a 3 por 45 vezes;
6. 72°C por 10 minutos;
7. 4°C em espera.

Após a amplificação, os produtos de PCR de 224 pb foram corados com GelRedTM (Biotium), submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e, sob transiluminador de luz ultravioleta, fotodocumentados e analisados. Foram realizadas até 6 tentativas de amplificar cada amostra; após isso, mantido o insucesso, a amostra era excluída do processo.

Após a confirmação da amplificação, os produtos foram submetidos à hidrólise com as enzimas de restrição SspI e AflIII. Essas enzimas promovem o corte específico do fragmento de 224 pb em fragmentos de tamanhos diferentes, que resultam na identificação das espécies (GONZALEZ et al., 2009). A reação para ambas as enzimas foi composta pelos seguintes reagentes e respectivas concentrações: 8µL de DNA amplificado, 0,2ng/µL de BSA, 2U de enzima, 1X de tampão e água ultrapura qsp 20µL. Após 12 horas de digestão a 37°C, os fragmentos foram corados com GelRed™ (Biotium), analisados por eletroforese em gel de agarose a 3%, e visualizados sob luz ultravioleta. O resultado foi fotodocumentado.

2.2.6 Sexagem

A sexagem das amostras foi realizada por meio da amplificação do locus do gene da amelogenina com o iniciador desenvolvido por Ennis e Gallagher (1994). O protocolo usado na reação de PCR foi o mesmo descrito por Pajares et al. (2007). Somente foi alterada a temperatura de anelamento de 60°C para 61°C, visando à eliminação de bandas inespecíficas. A composição da reação de PCR foi: 0,2µM de cada iniciador, 1X de tampão, 1mM de dNTP, 3,0mM de MgCl₂, 0,6ng/µL de BSA, 1U de Taq DNA Polimerase (Platinum® Invitrogen), 3,0µL de DNA e água ultrapura qsp 12,0µL. As reações foram realizadas seguindo o seguinte programa de temperatura e ciclos:

1. 94°C por 5 minutos;
2. 94°C por 1 minuto e 15 segundos;
3. 61°C por 1 minuto;
4. 72°C por 1 minuto e 15 segundos;
5. Repetir as etapas 2 a 3 por 45 vezes;
6. 72°C por 10 minutos;
7. 4°C em espera.

Constatando-se um resultado positivo para “macho”, este foi acatado. No caso de o resultado positivo ser “fêmea”, o mesmo foi repetido mais duas vezes com temperaturas mais baixas e/ou mais ciclos para averiguar uma eventual amplificação da

banda masculina. Quando da não amplificação de nenhuma banda, a temperatura também foi diminuída, e o número de ciclos aumentado para otimização da reação. Com este resultado, fez-se o mesmo procedimento para a confirmação do diagnóstico “fêmea”. De posse desses dados mais os da genotipagem individual, foi estabelecida a proporção sexual dos genótipos distintos encontrados.

2.2.7 Identificação individual

Foram selecionados 4 iniciadores para locos microssatélites entre um rol de 14, escolhidos e padronizados por Mantellatto e Duarte (2007) e 1 (BM757) sugerido por Gonzalez^{*} (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização dos iniciadores utilizados para as genotipagens individuais

Iniciador	Seqüências (5' → 3')	Espécie para que foi descrito	Fluorescência
RT01	TGCCTTCTTTTCATCCAACAA CATCTTCCCATCCTCTTTAC	<i>Rangifer tarandus</i>	FAM
RT09	TGAAGTTTAATTTCCACTCT CAGTCACTTTTCATCCCACAT	<i>Rangifer tarandus</i>	FAM
RT30	CACTTGGCTTTTGGACTTA CTGGTGTATGTATGCACACT	<i>Rangifer tarandus</i>	HEX
NVHRT16	ATTCTAAGCCCAAATAATCTT TCTAAGGGGTCTGTGTCTT	<i>Rangifer tarandus</i>	HEX
BM757	TGGAAACAATGTAAACCTGGG TTGAGCCACCAAGGAACC	<i>Bos taurus</i>	FAM

As amostras fecais foram genotipadas com a utilização desses 5 iniciadores selecionados, e a genotipagem foi feita em um sequenciador automático *ABI Prism* 3100. As reações de PCR foram realizadas utilizando: 5,0µL de DNA extraído; 8,0pM do iniciador “forward”; 8,0pM do iniciador “reverse” específico; 1X do tampão; 2,0mM de MgCl₂; 1,0ng/µL de BSA; 1,0mM dNTPs; 2,0 unidades de Taq polimerase (Platinum[®] Invitrogen) e água ultrapura qsp 15,0µL.

As reações de PCR foram realizadas seguindo o seguinte programa de temperaturas:

^{*} GONZALEZ, S. (Unidad de Genética de la Conservación, Departamento de Genética, IIBCE-Facultad de Ciencias/UdelaR, Montevideo, Uruguay,) Comunicação pessoal, 2009.

1. 94°C por 5 minutos;
2. 94°C por 1 minuto e 15 segundos;
3. 45-58°C por 1 minuto;
4. 72°C por 1 minuto e 15 segundos;
5. Repetir as etapas 2 a 3 por 47 vezes;
6. 72°C por 10 minutos;
7. 4°C em espera.

As temperaturas de anelamento (Tabela 2) foram diminuídas, à medida que as reações de PCR não obtinham sucesso, até o limite de 10°C abaixo da temperatura ótima estabelecida para as reações que utilizam DNA advindo de sangue. Foram realizadas até 5 tentativas de amplificar cada amostra com cada par de iniciadores; após isso, mantido o insucesso, a amostra era excluída do processo para aquele loco.

Tabela 2 - Temperaturas de anelamento dos iniciadores

Iniciador	Temperaturas de anelamento
RT01	45-55°C
RT09	45-55°C
RT30	45-55°C
NVHRT16	47-57°C
BM757	48-58°C

Amostras que obtiveram sucesso de amplificação passaram pelo processo de obtenção de duplicatas para a confirmação de possíveis homozigotos e detecção de possíveis erros por perda de alelos.

Com o produto de PCR obtido, deu-se procedimento à leitura em sequenciador automático ABI *Prism* 3100. Para tanto, os produtos de PCR de cada amostra foram agrupados (RT09 com NVHRT, RT01 com RT30) em um microtubo de 0,2mL, adicionando 1,5µL de cada loco ou 3,0 µL do locus BM757, o qual não foi agrupado com nenhum outro loco. Paralelamente, foi preparada uma placa, própria do sequenciador, onde cada poço continha 0,4µL de ROX e 8,6 de formamida. Em cada

poço da placa, foi adicionado, então, 1,5µL da mistura dos locos e, a seguir, a placa colocada no equipamento.

A análise dos eletroferogramas e a determinação do tamanho dos fragmentos foram feitas por meio dos pacotes computacionais Genescan® e Genotyper® v.2.0 (*Applied Biosystems Inc.*). Para reanalisar os eletroferogramas, posteriormente, foi utilizado o software GeneMarker® v.1.91 (*SoftGenetics LLC*).

Um genótipo consenso foi determinado seguindo os seguintes critérios:

- a) Uma vez detectado um heterozigoto, o mesmo foi considerado em definitivo, não sendo necessário o resultado da réplica;
- b) Detectado um homozigoto, o mesmo só foi considerado se em conformidade com a réplica;
- c) Resultados divergentes entre réplicas foram descartados.

Na tentativa de aumentar a probabilidade de identificar diferentes combinações genóticas dentre as amostras coletadas foi amplificado um fragmento do gene mitocondrial da região controladora (D-loop), nas amostras em que se obteve ao menos a amplificação de um loco microssatélite. Para tanto, foi seguido o mesmo protocolo utilizado para a amplificação do fragmento do gene do citocromo b, apenas alterando a temperatura de anelamento para 57°C. Após a amplificação, as amostras foram purificadas com duas enzimas: Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) e Exonuclease I (EXO), seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, as amostras foram enviadas para serem sequenciadas em sequenciador automático ABI 3100, e o resultado foi analisado no software MEGA 5. Os haplótipos resultantes foram utilizados como um loco a mais na formação dos genótipos.

Os resultados das genotipagens foram utilizados para a determinação de parâmetros genéticos da população como diversidade alélica e heterozigosidade observada e esperada. Para isso, foi testado se a população se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Foram identificados, também, o número de genótipos diferentes obtidos a fim de determinar uma população mínima na área e sua proporção sexual.

2.2.8 Análise genética de amostras de *M. americana* advindas do banco genético do NUPECCE.

Para que fosse possível a comparação dos parâmetros genéticos da população estudada com uma população diferente, foi extraído DNA de dez amostras (Tabela 3) de pelo coletadas de animais de cativeiro. O protocolo para a extração seguiu o seguinte protocolo:

1. Cortar de 20 bulbos pilosos;
2. Adicionar em um microtubo os bulbos e 500µL de TE-Tween;
3. Incubar a 65°C por 2 horas;
4. Adicionar 5µL de Proteinase K e incubar a 55°C por 6 horas;
5. Incubar a 37°C por 12 horas;
6. Adicionar 500µL de PCL (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico) e agitar vigorosamente;
7. Centrifugar por 10 min e transferir o sobrenadante para um novo tubo;
8. Adicionar 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3M e completar o volume do tubo com etanol absoluto gelado, misturar por inversão;
9. Incubar por 12 horas a -20°C;
10. Centrifugar a 4°C e 12.000 rpm por 30 min;
11. Descartar o sobrenadante e deixar secar o “pellet”;
12. Ressuspender o “pellet” em 100 µL de TE 10:1 e estocar.

Tabela 3 - Origem das amostras utilizadas para a análise genética dos animais da espécie *M. americana*.

Amostra	Local
104	Paraguai
179	Paraguai
192	Curitiba - PR
205	Foz do Iguaçu - PR
245	São Miguel - PR
268	Foz do Iguaçu - PR
270	Foz do Iguaçu - PR
271	Foz do Iguaçu - PR
JR	Foz do Iguaçu - PR
GAB	Cascavel - PR
BIT	Palmas - TO

De posse das amostras extraídas, foram amplificados os mesmos locos, seguindo o mesmo protocolo do item 3.7, também lendo os produtos de amplificação em sequenciador automático e analisando os genótipos para a determinação de parâmetros genéticos da população como diversidade alélica e heterozigosidade observada e esperada. Para isso, foi testado se a população se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

2.3 Resultados

2.3.1 Padronização da metodologia

2.3.1.1 Treinamento do cão

O treinamento do cão foi bem-sucedido, e o animal desempenhou eficientemente a sua função. Foi possível trabalhar durante um tempo médio de 6 horas no campo, variando com o tipo de ambiente, até o momento em que o cansaço físico do cão prejudicava o andamento do trabalho. Notou-se que, durante um período de tempo breve (30min) após o início das atividades, o comportamento do cão era de tamanha ansiedade e avidez que o mesmo acabava indicando amostras fecais de diferentes espécies não pertencentes à família Cervidae. O mesmo acontecia no final do período de trabalho, quando o animal estava cansado de realizar as buscas e indicava qualquer amostra fecal no intuito de encerrar as atividades.

O cão, em momento algum, interagiu com a fauna nativa, não comprometendo a segurança desta. Isso satisfaz às exigências internas de qualidade do NUPECCE e dos órgãos ambientais.

Notou-se que o cão, diferentemente do padrão dentre estes cães de faro e do cão anteriormente utilizado pelo NUPECCE, não farejava o ar para localizar as amostras, e sim vasculhava o solo. Isso prejudicaria sua capacidade de busca, uma vez que o campo de ação se reduziria bastante. Tal adversidade foi compensada pelo fato de o animal ter aprendido, por si só, que quando um carreiro é encontrado, o mesmo, se seguido, muito provavelmente o levará a encontrar as amostras.

2.3.1.2 Coleta das amostras

Após 39 dias de incursões ao campo, totalizando 159 horas de busca efetiva, foram coletadas 59 amostras fecais por toda a área de estudo, com exceção dos locais inacessíveis ao cão, devido à presença de muitos espinhos e rochas pontiagudas no solo. O cão encontrou 88% das amostras contra 12% dos técnicos de campo (Tabela 4). As amostras tinham idade variando entre a categoria “fresca” e “não fresca”. O sucesso na obtenção das amostras foi ao redor de 3 horas por amostra. Porém, quando se computam apenas as amostras frescas, esse sucesso vai para aproximadamente 10 horas de buscas para cada amostra. Na Figura 2, encontram-se os trajetos percorridos no fragmento estudado e, na Figura 3, os pontos onde as amostras foram encontradas.

Figura 2 - Imagem satelital com os trajetos percorridos no interior do fragmento estudado (Fonte: Google Earth®)

Figura 3 - Imagem satelital com os pontos de coleta das amostras fecais representados por pontos brancos no interior do fragmento (Fonte: Google Earth®)

Das 52 amostras localizadas pelo cão, seis não eram de Cervídeos e das sete amostras localizadas pelos técnicos, uma não era de Cervídeo. A idade das amostras encontradas também diferiu entre ambos, com o cão sendo mais eficiente na localização de amostras frescas (Tabela - 4).

Tabela 4 - Total de amostras encontradas pelo cão e pelos técnicos com respectivas idades e identificação taxonômica

	Amostras totais	Amostras de cervídeos	Amostras frescas	Amostras não frescas	% de amostras frescas
Cão	52	46	16	30	35%
Técnicos	7	6	0	6	0%
Total	59	52	16	36	31%

2.3.1.3 Identificação Específica

De posse do DNA extraído das amostras fecais, iniciou-se o procedimento para a identificação da espécie. Foram realizadas reações de PCR para a amplificação do gene mitocondrial do citocromo b (Figura 4) e obteve-se sucesso em 94% das amostras (49 amostras) (Tabela 5). Esse sucesso foi diferente para as amostras das categorias “fresca” e “não fresca”, com uma leve superioridade da categoria “fresca” sobre a “não fresca”.

Tabela 5 - Sucesso de amplificação do gene do citocromo b nas diferentes categorias de idade das amostras

Categoria	Sucesso de amplificação (%)
Fresca	100%
Não-fresca	92%
Total	94%

Figura 4 - Gel de agarose 2% com produtos de PCR de 224 pb corados com GelRed™ (Biotium), fotografado sob transiluminador de luz ultravioleta

Como foi computado o número de reações de PCR realizadas até o sucesso da reação, foi possível chegar a um número médio de 2,54 reações até a obtenção do sucesso, sendo este número de 1,19 reação para as amostras frescas e de 3,14 reações para as amostras não frescas (Tabela 6).

Tabela 6 - Número médio de reações de PCR até o sucesso da mesma nas diferentes categorias de amostras. D.P. – Desvio-padrão C.V. Coeficiente de Variação

Categoria	Tentativas	D.P.	C.V.
Fresca	1.19	0.75	0.63
Não fresca	3.14	1.99	0.63
Total	2.54	1.92	0.76

Após a amplificação do fragmento do gene do citocromo b e a submissão destas amostras à digestão com as enzimas de restrição SspI e AflIII (Figura 5), foi possível identificar que 45 amostras pertenciam à espécie *Mazama americana*, não sendo

possível identificar 4 amostras que apresentaram padrão de corte não esperado para a enzima SspI (Figura 6).

Figura 5 - Gel de agarose a 3% com o resultado das digestões corado com GelRed™ (Biotium) e fotografado sob transiluminador de luz ultravioleta (Controles positivos: Mn – *Mazama nana*; Ma – *Mazama americana*; Mg *Mazama gouazoubira*. Controle negativo: B)

Figura 6 - Gel de agarose a 3% com o resultado das digestões da enzima Sspl corado com GelRed™ (Biotium) e fotografado sob transiluminador de luz ultravioleta. Em destaque, o resultado duvidoso de algumas amostras. Controles positivos: Mn – *Mazama nana*; Ma – *Mazama americana*; Mg *Mazama gouazoubira*. Controle negativo: B

Tal insucesso persistiu em uma segunda tentativa, obrigando a retirada das amostras da análise para a identificação individual.

2.3.1.4 Genotipagem Individual das Amostras

2.3.1.4.1 Seleção dos iniciadores

Na seleção dos iniciadores, dois deles foram descartados por apresentarem os maiores tamanhos de fragmento amplificado, com exceção do CA71, que já se encontrava adquirido e, por isso, foi testado. Então, 13 iniciadores foram submetidos a um teste de amplificação em 15 amostras fecais, e os resultados visualizados em gel de agarose a 2%. Os que obtiveram maior sucesso foram submetidos a um teste de polimorfismo com amostras de DNA extraído de pelo de animais da espécie *M. americana* mantidos em cativeiro. O resultado foi visualizado em gel de poliacrilamida a 10%. Levando em consideração o nível de polimorfismo por eles apresentado, foram selecionados 5 iniciadores: RT01, RT09, RT30, NVHRT16 e BM757 (Tabela 7). O mau desempenho, ocorrido no teste com amostras fecais, obtido pelo iniciador CA71, que amplifica uma região de, em média, 305 pares de bases, ressalta a dificuldade de

amplificação de fragmentos longos em amostras que possuem pouco material genético e/ou o mesmo encontra-se degradado.

Tabela 7 – Caracterização e resultado da seleção dos iniciadores.

Iniciador	Tamanho aproximado do fragmento (pb)	% de amplificação em fezes	Número de Alelos	Resultado
CA71	305	0%	-	Reprovado
Mber39B	215	13%	-	Reprovado
Mber43B	205	33%	-	Reprovado
Mber710B	185	20%	-	Reprovado
Mber99B	275	-	-	Reprovado
NVHRT16	170	53%	5	Aprovado
RT01	230	53%	5	Aprovado
RT05	155	26%	-	Reprovado
RT06	100	66%	1	Reprovado
RT07	195	26%	-	Reprovado
RT09	110	60%	5	Aprovado
RT13	295	-	-	Reprovado
RT30	190	40%	4	Aprovado
T156	150	73%	1	Reprovado
BM757	180	47%	5	Aprovado

2.3.1.4.2 Amplificação dos locos microssatélites

Na Tabela 8 estão expostos os resultados de amplificação com cada loco após as cinco tentativas de amplificação, bem como a correlação entre o comprimento dos locos e o sucesso obtido em cada um.

Tabela 8 - Sucesso de amplificação de cada loco obtido para as amostras das categorias “fresca” e “não fresca”, o total delas e a correlação desses sucessos com o comprimento dos locos

		RT09 110pb	NVHRT 16 170pb	BM757 180pb	RT30 190pb	RT01 230pb	Correlação tamanho do fragmento X sucesso de amplificação	Sucesso geral
Sucesso de amplificação (%)	Total	51,1%	48,9%	51,1%	40,0%	35,6%	R= -0,82 P= 0,08	45,3%
	Frescas	81,3%	68,8%	75,0%	50,0%	50,0%	R= -0,87 P= 0,05	65,0%
	Não frescas	34,5%	37,9%	37,9%	34,5%	27,6%	R= -0,53 P= 0,36	35,5

Com o número de reações de PCR executadas, foi possível calcular a média de tentativas até se obter a amplificação das amostras em cada loco para as diferentes categorias de idade das mesmas (Tabela 9).

Tabela 9 - Número médio de tentativas até o sucesso da amplificação de cada loco em amostras das categorias “fresca” e “não fresca”. Entre parênteses, o coeficiente de variação

Loco	Amostras	
	Frescas	Não frescas
RT09	2.1 (0.5)	2.8 (0.3)
NVHRT16	1.6 (0.4)	1.5 (0.4)
BM757	2.4 (0.6)	2.0 (0.8)
RT30	3.0 (0.6)	1.8 (0.5)
RT01	2.3 (0.5)	2.0 (0.5)

2.3.1.5 Sexagem das amostras

Foram sexadas apenas as amostras que obtiveram sucesso de amplificação em, ao menos, um loco microssatélite. A adaptação para a espécie estudada dos iniciadores do gene da amelogenina obteve o sucesso de amplificação em 43,7% das amostras (Tabela 10). Esse sucesso sobe para 64,2% dentre as amostras da categoria “fresca” e cai para 27,7% dentre as amostras da categoria “não fresca”. Foi possível identificar 11 amostras do sexo masculino e 3 do sexo feminino. Na Figura 7, é possível observar a localização das amostras sexadas.

Tabela 10 - Resultado da sexagem das amostras com o gene da amelogenina. F: Fêmea; M: Macho; células vazias representam resultado negativo

Amostras	Sequência de reações			Sexo
	PCR 1	PCR 2	PCR 3	
CAJ009				
CAJ012	F			
CAJ014	F			
CAJ016	M			M
CAJ018	F	F	F	F
CAJ019				
CAJ020	F	F		F
CAJ021	M	M	M	M
CAJ023	M			M
CAJ024	F			
CAJ026	F	M		M
CAJ027	M	M		M
CAJ028	M			M
CAJ032	F			
CAJ034	M			M
CAJ038	F	M		M
CAJ039				
CAJ040	F	F	M	M
CAJ041	M			M
CAJ042				
CAJ043	F	F		F
CAJ045				
CAJ046				
CAJ048				
CAJ050				
CAJ051				
CAJ053	M			M
CAJ055				
CAJ062				
CAJ063				
CAJ065				
CAJ066

Figura 7 - Imagem satelital do fragmento estudado com a localização das amostras sexadas. Azul: Sexo masculino; Rosa: Sexo feminino (Fonte: Google Earth®)

2.3.2 Obtenção de informações genéticas e ecológicas

2.3.2.1 Obtenção de réplicas

Para maior confiança dos dados na etapa de genotipagem em sequenciador, é necessária a obtenção de réplicas ou tréplicas (TABERLET et al., 1996). Para isso, foi repetido o procedimento de amplificação dos locos microsatélites apenas para as amostras que obtiveram resultado positivo na primeira etapa de amplificação. Destas, apenas em dois locos foi possível repetir o resultado positivo em todas as amostras, nos demais, os sucessos foram de 83 e 57% das amostras (Tabela 11).

Tabela 11 - Porcentagem de sucesso na obtenção de réplica nos cinco locos analisados

RT09 110pb	NVHRT16 170pb	BM757 180pb	RT30 190pb	RT01 230pb
83%	59%	57%	100%	100%

Tal insucesso dificultou em muito as genotipagens, fazendo com que diferentes locos fossem amplificados em diferentes amostras (Tabela 12).

Tabela 12 - Sucesso de amplificação (x) e obtenção de réplica (xx) nas diferentes amostras e locos

Amostra	Loco				
	RT09 FAM	NVHRT16 REX	BM757 FAM	RT30 REX	RT01 FAM
9	x				
12	xx		x	xx	
14		x		xx	
16	xx			xx	
18				xx	xx
19		xx		xx	
20				xx	
21	xx		xx	xx	
23	xx	xx	x	xx	xx
24	x	x	xx	xx	xx
26	xx	xx	xx	xx	xx
27	xx	xx	xx	xx	xx
28	xx	xx	xx	xx	xx
32	xx	x	x		
34	xx	xx	xx		xx
38		xx			
39		x			
40	xx	xx	x	xx	xx
41		xx	xx	xx	
42	xx	x			
43	xx	xx	xx	xx	xx
45		xx	xx		xx
46	xx		x		xx
48	xx		xx		
50	xx		xx		xx
51	xx	x	x	xx	xx
53	xx	x	x	xx	
55		x	x		
62	x	x	x	xx	xx
63	xx	xx	xx		xx
65	x		x		
66	xx	xx	xx		xx

2.3.2.2 Genotipagem em sequenciador automático

As amostras que obtiveram sucesso na obtenção das réplicas foram encaminhadas para a leitura e genotipagem em sequenciador automático (Tabela 13).

Tabela 13 - Resultado obtido após a leitura das amostras de produto de PCR em sequenciador automático. As duas colunas de cada loco referem-se às réplicas

Amostras	RT09		NVHRT16		Loco BM757		RT30		RT01	
CAJ012	113	erro					erro	erro		
CAJ014							erro	erro		
CAJ016	107	erro					erro	erro		
CAJ018							197	177/197	erro	217/219
CAJ019			erro	erro	192	192/194	erro	erro		
CAJ020							erro	189/191		
CAJ021	erro	117/119			erro	erro	erro	erro		
CAJ023	109/113	erro	169	erro			179/197	179	221/225	erro
CAJ024					erro	192	erro	erro	erro	erro
CAJ026	113	113	169	169			177	177/191		
CAJ027	111/113	111/113	169/177	erro			erro	191	231	erro
CAJ028	111/113	111/113	erro	169/177	erro	192/194	179	179/193	231/233	231/233
CAJ032	erro	erro								
CAJ034	erro	113	erro	177	erro	182/194			231	erro
CAJ038			erro	189						
CAJ040	113/117	113					erro	erro	erro	213
CAJ041					erro	erro	189/193	erro		
CAJ042	erro	113								
CAJ043	113	113			erro	190/194	177	erro	213	erro
CAJ045					178	178			erro	erro
CAJ046	111	111							erro	221/231
CAJ048	erro	109			erro	190				
CAJ050	erro	107							201	201
CAJ051					erro	181			erro	213
CAJ053	erro	109			erro	erro				
CAJ055										
CAJ062							erro	erro	219	erro
CAJ063	109/115	erro	erro	erro	erro	192			erro	erro
CAJ066	109/113	erro	193	erro	180				erro	erro

A presença de erros foi muito frequente, resultante de eletroferogramas com picos duvidosos ou completamente falhos. A Figura 8 ilustra resultados positivos na agarose e respectivo eletroferograma. Porém, muitas bandas em gel de agarose que

foram consideradas aptas a serem analisadas em sequenciador, neste, não apresentaram resultado ou o mesmo foi duvidoso (Figura 9).

Figura 8 - Bandas do loco BM757 em gel de agarose a 2%, corado com GelRed™ (Biotium) e fotografado sob transiluminador de luz ultravioleta, e respectivo eletroferograma

Figura 9 - Bandas do loco NVHRT16 em gel de agarose a 2%, corado com GelRed™ (Biotium) e fotografado sob transiluminador de luz ultravioleta, e respectivo eletroferograma com resultado negativo ou duvidoso

Obtidos os resultados no sequenciador (Tabela 13), foram construídos os genótipos consenso. Para tanto, uma vez obtido um resultado heterozigoto, o mesmo foi aceito, mesmo que houvesse falha em sua réplica. Quando obtido um genótipo homozigoto, o mesmo somente foi aceito se confirmado na respectiva réplica (Tabela 14).

Tabela 14 - Genótipos consenso para cada loco microssatélite e haplótipos referentes à região mitocondrial controladora (D-loop), ambos obtidos após reações de PCR e leitura em sequenciador

Amostra	RT09	NVHRT16	BM757	RT01	RT30	Haplótipo D-loop
CAJ018				217/219	177/197	
CAJ019			192/194			
CAJ020					189/191	
CAJ021	117/119					
CAJ023	109/113			221/235	179/197	
CAJ026	113	169			177/191	
CAJ027	111/113	169/177				
CAJ028	111/113		192/194	231/233	179/193	
CAJ034			182/194			C
CAJ040	113/117					B
CAJ041					189/193	
CAJ043	113		190/194			
CAJ045			178			
CAJ046	111			221/231		A
CAJ050				201		A
CAJ063	109/115					
CAJ066	109/113					

Foi amplificado com sucesso o fragmento mitocondrial da região controladora (D-loop) em 8 das 17 amostras genotipadas com os locos microssatélites. Essas oito amostras foram, então, sequenciadas. Dentre as 8 sequências, duas eram, provavelmente, resultantes de produtos de amplificação inespecíficos, pois não se alinhavam às demais, e duas tiveram muitas falhas na leituras das bases nitrogenadas, sendo muito inseguro compará-las às 4 demais. Dentre as quatro sequências remanescentes, duas eram pertencentes ao mesmo haplótipo, e as outras duas, cada uma constituía um haplótipo, resultando em três haplótipos diferentes (A, B e C). Esse resultado foi incorporado à Tabela 14.

2.3.2.3 Análise genética de amostras de *M. americana* advindas do banco genético do NUPECCE

As amostras de produto amplificado dos 5 locos foram encaminhadas para a leitura e genotipagem em sequenciador automático (Tabela 15).

Tabela 15 - Genótipos para cada loco e amostra

Amostra	RT09	NVHRT16	BM757	RT01	RT30
104	109	167/177	170/182	erro	177/191
179	111/113	177	182	223/231	187
192	111	167	182	221/229	197
205	109/111	177	182/194	237/239	erro
245	109/113	167/173	182/198	229/231	187/191
268	113	167	168/182	227/231	191
270	109	167	182	erro	erro
271	113/115	167	182	223/225	187/191
GAB	109/113	167	170	231/235	187/191
BIT	109/111	169/181	172/186	223	191/201

Foi testado se a “população” se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg bem como as frequências alélicas, heterozigosidade observada e esperada e o resultado encontra-se na Tabela 16.

Tabela 16 - Alelos, frequência, heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P) para cada loco. N é o número de indivíduos usados para o cálculo.

Loco	N	Alelos	Frequência	H_o	H_e	P
RT09	10	109	0,400	0,60	0,68	0,8934
		111	0,250			
		113	0,300			
		115	0,050			
NVHRT16	10	167	0,600	0,30	0,57	0,0210
		169	0,050			
		173	0,050			
		177	0,250			
		181	0,005			
BM757	10	168	0,050	0,50	0,61	0,3513
		170	0,150			
		172	0,050			
		182	0,600			
		186	0,050			
		194	0,050			
		198	0,050			
RT30	8	177	0,063	0,50	0,69	0,8476
		187	0,313			
		191	0,438			
		197	0,125			
		201	0,063			
RT01	8	221	0,063	0,70	0,84	0,3147
		223	0,250			
		225	0,063			
		227	0,063			
		229	0,125			
		231	0,250			
		235	0,063			
		237	0,063			
		239	0,063			

2.3.2.4 Análises genéticas e ecológicas baseadas em DNA fecal

A escassez de dados em muitos locos impossibilita qualquer análise genética mais elaborada, ou mesmo a aplicação destas na ecologia. Para simples exercício metodológico, foi testado se a população se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg bem como as frequências alélicas, heterozigosidade observada e esperada (Tabela 17). Como “ N ”, tamanho da população, foi utilizado o número de diferentes genótipos para cada loco.

Tabela 17 - Número de genótipos diferentes (N), alelos, frequência, heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P)

Loco	N	Alelos	Frequência	Ho	He	P
RT09	9	109	0,167	0,67	0,77	0,3652
		111	0,167			
		113	0,444			
		115	0,056			
		117	0,111			
		119	0,056			
NVRT16	2	169	0,750	0,50	0,50	-
		177	0,250			
BM757	5	178	0,200	0,80	0,82	0,3379
		182	0,100			
		190	0,100			
		192	0,200			
		194	0,400			
RT30	6	177	0,167	1,00	0,91	1,0000
		179	0,167			
		189	0,167			
		191	0,167			
		193	0,167			
		197	0,167			
RT01	5	201	0,200	0,80	0,93	0,3624
		217	0,100			
		219	0,100			
		221	0,200			
		231	0,200			
		233	0,100			
		235	0,100			

Os valores de P confirmam que a população se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mas esse valor não é confiável, uma vez que não foi obtido um tamanho amostral realístico.

A aplicação dos dados da Tabela 14 e da Tabela 10 para a obtenção de dados ecológicos (abundância populacional e proporção sexual) é um tanto quanto arriscada, dada a fragilidade dos dados. Não é possível alimentar nenhum modelo de estimativa populacional baseado em captura-marcação-recaptura, pois esses modelos exigem que haja ao menos uma recaptura, o que, com as genotipagens, é impossível afirmar com segurança. Porém, se agruparmos os dados das genotipagens com os da sexagem e haplótipos, observa-se que as amostras CAJ027 e CAJ028 poderiam ser o mesmo indivíduo, uma vez que a chance de o genótipo ocorrer na população ($0,167 \times 0,444$) mais a probabilidade de ele ser do sexo masculino (0,5) é 0,037, ou seja, esse

genótipo, e com esse sexo, apenas ocorreria duas vezes em uma população se esta fosse maior que 54 indivíduos. Alimentando o software Ecological Methodology 2nd Ed. com os dados obtidos e partindo do pressuposto de que cada coleta de amostra é uma seção de captura, chega-se ao resultado, pelo estimador de Schanbel (1938) de 30 indivíduos (6,6 a 287,7; 90%), implicando uma densidade na área de 5ind/km². A Figura 10 indica a localização dos oito possíveis genótipos diferentes com o respectivo sexo.

Figura 10 - Imagem satelital com a localização dos oito diferentes genótipos e o respectivo sexo: Azul: Sexo masculino; Rosa: Sexo feminino; Branco: Sexo não identificado (Fonte: Google Earth®)

Com os dados da sexagem, levando em conta também a genotipagem individual, não podem ser feitas inferências quanto à proporção sexual da população, mas apenas relatar a possível ocorrência de uma fêmea e cinco machos.

É necessário, do ponto de vista da conservação, registrar que foram localizados no fragmento estudado nove pontos de caça, onde se encontravam cevas e jiraus (Figura 11). Os mesmos foram destruídos.

Figura 11 - Imagem satelital do fragmento estudado com a localização dos pontos de caça (símbolos vermelhos). No local do símbolo maior, encontravam-se 6 pontos em um raio de 50 metros (Fonte: Google Earth®)

2.4 Discussão

A utilização do cão para a localização das amostras foi bem-sucedida. O erro taxonômico cometido pelo cão na identificação das amostras pode ser explicado, muito possivelmente, pelo seu comportamento, já relatado anteriormente, de excesso de avidez ou cansaço físico. Já o erro dos técnicos é resultado da similaridade, para olhos leigos, das fezes de cervídeos com as de roedores e lagomorfos. O número total de amostras encontradas pelo cão e pelos técnicos, e a evidente diferença na porcentagem de amostras frescas vêm ressaltar o papel fundamental do cão na etapa de coleta das amostras em campo, sendo praticamente impossível a condução de um estudo amplo sem o auxílio do mesmo.

A idade das amostras (de acordo com as categorias previamente estabelecidas) influenciou fortemente no sucesso da amplificação do citocromo b. Mesmo tendo sido o sucesso de amplificação das amostras não frescas inferior ao das amostras frescas (Tabela 5), ele foi considerado satisfatório. Porém, quando observado o número médio

de tentativas até o sucesso da amplificação do citocromo b (Tabela 6), nota-se que as amostras frescas são mais fáceis de obter sucesso, resultando em economia de material e de tempo.

A respeito do insucesso nas reações de PCR, sugere-se que isso tenha ocorrido devido à degradação do DNA na natureza antes de as amostras serem coletadas. Embora o trabalho realizado por Palomares et al. (2002), também com identificação específica através do material genético mitocondrial, não relatar diferenças significativas no sucesso de amplificação de amostras de diferentes idades, os resultados relativos ao número de tentativas até o sucesso da amplificação indicam ser necessário incluir a questão da idade das amostras coletadas no delineamento dos próximos estudos que visem à identificação específica dos animais através do DNA fecal. A intensa discussão na literatura (e.g. WASSER et al., 1997; FRANTZEN et al., 1998; ROEDER et al., 2004; SOTO-CALDERÓN et al., 2009; BEJA-PEREIRA et al., 2009) quanto aos métodos mais adequados de preservação do DNA fecal, após a coleta em campo, mostra que a degradação natural do DNA contido nas fezes, ao longo do tempo após a defecação, tem alta influência no sucesso do processo de PCR.

O insucesso na identificação específica de duas amostras por RFLP pode ter ocorrido por dois motivos. Um seria a contaminação das mesmas com material genético de duas espécies (*M. americana* e *M. gouazoubira*). Outro seria a ocorrência de mutações no sítio de corte da enzima, ocasionando tamanhos de fragmentos diferentes do esperado. A hipótese de mutação parece ser muito pouco provável, pois a probabilidade de a enzima clivar o fragmento do gene do citocromo b em duas regiões e gerar fragmentos idênticos aos das espécies *M. americana* e *M. gouazoubira* é muito remota. O sequenciamento do produto amplificado do gene do citocromo b não confirmaria uma possível contaminação, mas indicaria uma possível mutação no sítio de restrição da enzima.

Quanto à amplificação dos locos microssatélites, observa-se que as amostras frescas têm maior sucesso de amplificação que as amostras não frescas (Tabela 8). Porém, para a obtenção deste sucesso, foram necessárias mais tentativas do que nas amostras não frescas, com exceção do loco RT09, onde o inverso ocorreu. Nsubuga et al. (2004), em primatas, quantificando o DNA nuclear por PCR quantitativo em tempo

real, não encontraram diferenças significativas entre amostras frescas (defecação observada) e não frescas (até 12 horas de idade). Qualquer comparação com o presente trabalho é inadequada, pois não se dispõe de possibilidade de coleta imediata (ninhos ou através da observação da defecação) e datação tão precisa para os cervídeos do gênero *Mazama*. Possivelmente, as amostras consideradas dentro da categoria “fresca”, neste trabalho, poderiam possuir mais do que 12 horas de idade.

A forte correlação negativa ($R = -0,82$) entre o sucesso de amplificação nos diferentes locos com o respectivo comprimento dos mesmos mostra a necessidade de utilização de iniciadores que amplifiquem regiões pequenas, neste caso, inferiores a 180 pares de base. Esta correlação apresentou-se ainda mais forte ($R = -0,87$) quando se compara ao comprimento dos fragmentos o sucesso apenas das amostras da categoria “fresca”. Quando o cálculo da correlação utilizou o sucesso de amplificação apenas das amostras da categoria “não fresca”, este resultou em uma correlação mais baixa ($R = -0,53$). O comportamento diferenciado entre os locos de diferentes tamanhos já era esperado (BEJA-PEREIRA et al., 2009). Porém, as diferenças entre as categorias de idade indicam que o resultado da amplificação das amostras “não-frescas” era mais incerto que o das amostras “frescas”, o que também foi observado quando da identificação específica, onde ambas as categorias tiveram bons sucessos de amplificação, mas as amostras da categoria “não fresca” tiveram de ser repetidas mais vezes até o seu sucesso.

Observa-se, também, que as amostras de fezes pertencentes à categoria “fresca” tiveram desempenho quanto à amplificação de cada loco microsatélite, muito superior ao das amostras da categoria “não fresca”, evidenciando que as amostras frescas, como ocorrido também no caso da identificação específica, são mais adequadas para esse tipo de estudo, compensando o investimento de mais tempo de busca apenas coletando este tipo de amostras.

Quanto à sexagem das amostras pela amplificação do gene da amelogenina, nota-se que o pequeno sucesso (43,7%) também é devido à idade das amostras, deixando clara a influência da degradação do DNA no sucesso das técnicas de genética molecular. Ainda, foi muito frequente a presença de bandas inespecíficas quando os resultados eram visualizados em gel de agarose. Isso dificultou a sexagem,

pois quando se tinha amostras-controle do sexo feminino (duas bandas no gel) e diminuía-se a temperatura de anelamento na reação PCR, com o intuito de eliminar as bandas inespecíficas, também uma das bandas do gene da amelogenina desaparecia, levando a um falso diagnóstico de que a amostra era do sexo masculino.

Quanto à obtenção das réplicas dos locos microssatélites, o insucesso foi inesperado e mostra certa instabilidade no comportamento das amostras durante o processo de PCR. Este fato dificultou em muito as genotipagens, fazendo com que diferentes locos fossem amplificados em diferentes amostras (Tabela 12).

Os dados gerados pela genotipagem individual das amostras fecais impossibilitaram análises genéticas robustas. Ainda assim, como simples exercício metodológico, compararam-se as médias das heterozigosidades observadas e esperadas com os indivíduos *M. americana* do banco genético do NUPECCE e com outros trabalhos com espécies de cervídeos (Tabela 18). Um deles (TEMATE et al., 2000) estudou uma pequena população de *Cervus nippon* que, apesar de seu tamanho, não apresentou uma diversidade pequena quando comparada a outras populações e espécies de cervídeos. Outro (KUEHN et al., 2003) estudou várias populações fragmentadas de *Cervus elaphus* no sul da Alemanha, encontrando razoável diversidade em muitas delas.

Tabela 18 - Comparação deste estudo com outros estudos com diferentes espécies de cervídeos. N: Número de indivíduos utilizados na análise; Ho: Heterozigosidade observada; He: Heterozigosidade esperada

	N	Ho	He
Tamate et al., 2000	109	0,523	0,516
Kuehn et al., 2003	26	0,586	0,666
Banco genético NUPECCE	8-10	0,520	0,680
Amostras de DNA fecal	2-9	0,754	0,786

A proximidade entre os valores obtidos para a heterozigosidade observada e esperada, e a comparação com os outros trabalhos e amostras do banco genético do NUPECCE sugerem que a população estudada, aparentemente, não está apresentando perda de heterozigosidade, sugerindo a inexistência de longo isolamento e número populacional diminuto. Isso não estaria em consonância com o esperado, uma vez que a população viveria em um fragmento de aproximadamente 600 ha.

A estimativa da abundância populacional pelo modelo de Schanbel (1938) apresenta um limite de confiança de 90% muito amplo (6,6 a 287,7), indicando a fragilidade da estimativa. Se for comparada a densidade de indivíduos na área (5ind/km²) com as densidades médias do gênero *Mazama* (1-1,5ind/km²) (VOGLIOTTI, 2003; DUARTE et al., 2005), observa-se um adensamento populacional. Porém, como já mencionado anteriormente, os dados obtidos são frágeis e podem não representar a real densidade da área. Mesmo aceitando-se esta alta densidade, a população total da área estaria por volta de 30 animais, o que seria considerado como uma população pequena e com alta probabilidade de perda de heterozigosidade em longo prazo. Os resultados genéticos não demonstram essa perda e isso pode ser devido ao curto espaço de tempo de isolamento da população ou, ainda, pela existência de fluxo genético com outras populações próximas, desconhecidas da equipe do NUPECCE. De qualquer forma, estes estudos devem ter continuidade para que se possam obter resultados mais confiáveis, gerando hipóteses mais consistentes para explicar a história evolutiva dessa população e subsídios para tomada de decisões de manejo conservacionista.

Por fim, é importante destacar a intensa atividade de caça registrada na área. Tal atividade, mesmo não objetivando a caça específica de cervídeos, já que, como ceva, era utilizado milho (geralmente utilizado para catetos, pacas e cutias e que não atrai os cervídeos), o eventual abate destes animais pode seriamente impactar a população. Assim, para a conservação dessa população em curto prazo, são necessárias, no local, medidas urgentes de fiscalização.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A coleta de amostras fecais, utilizando-se do cão farejador, demonstrou-se eficiente. Entretanto, tornar-se-á necessário um maior investimento de tempo, nesta etapa, para permitir a coleta de um maior número de amostras frescas, uma vez que a idade das amostras mostrou-se determinante na obtenção das amplificações.

A identificação específica mostrou-se satisfatória para identificação das amostras fecais de cervídeos encontradas no campo. Assim, estudos de distribuição geográfica de espécies e levantamentos faunísticos seriam viáveis com as técnicas já existentes, sem necessidade de maiores ajustes.

Fica evidente a dificuldade de se trabalhar com a metodologia do DNA fecal para a identificação individual e a sexagem, sendo necessárias melhorias metodológicas como: a) Coleta somente de amostras fecais frescas; b) Seleção ou confecção de iniciadores de locos microssatélites menores que 180 pares de bases; c) Diminuição do fragmento amplificado do gene da amelogenina; d) Quantificação do DNA extraído por PCR em tempo real e conseqüente pré-seleção das amostras.

A população de veado-mateiro estudada demonstrou estar em alta densidade e com um perfil genético dentro do esperado para populações equilibradas, apesar dos resultados terem mostrado grande fragilidade para que isto pudesse ser afirmado com segurança. Assim, novos estudos, utilizando as adequações propostas acima, deverão ser conduzidos para aumentar a confiabilidade dos resultados.

REFERÊNCIAS

ALBAUGH, G.P.; IYENGAR, V.; LOHANI A.; MALAYERI, M.; BALA. S.; MAIR, P.P. Isolation of exfoliated epithelial cells, a novel, non invasive approach to the study of cellular markers. **International Journal of Cancer**, Heidelberg, v. 52, p. 347-350, 1992.

BARRETTE, C. The comparative behaviour and ecology of chevrotains, musk deer and morphologically conservative deer. In: WEMMER, C.M. (Ed.). **Biology and management of the Cervidae**. Washington; London: Smithsonian Institution Press, 1987. pt. 1: Review papers and theoretical issues, p. 200-213.

BEJA-PEREIRA, A.; OLIVEIRA, R.; ALVES, P.C.; SCHWARTZ, M.K. ; LUIKART, G. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. **Molecular Ecology Resources**, Vancouver, v. 9, n. 5, p. 1279-1301, 2009.

CREEL, S.; SPONG, G.; SANDS, J.L.; ROTELLA, J.; ZEIGLE, J.; JOE, L.; MURPHY, K.M.; SMITH, D. Population size estimation in yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 12 n. 7, p. 2003–2009, 2003.

DUARTE, J.M.B. **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. 45 p. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

_____. **Ecologia e distribuição de *Mazama bororo* (Mammalia; Cervidae): relatório final PROBIO/MMA**. Jaboticabal, 2006. 89 p.

_____. A technique for the capture of free-ranging marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Yulee, v. 39, n. 4, p. 596-599, 2008.

DUARTE, J.M.B.; MERINO, M. Taxonomia e evolução. In: DUARTE, J.M.B. **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama**. Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 1-21.

DUARTE, J.M.B.; UHART, M.M.; GALVEZ, C.E.S. Capture and physical restraint. In: DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical cervidology**. Jaboticabal: FUNEP, 2010. p. 218-227.

DUARTE, J.M.B.; GARCIA, J.E.; FERRAUDO, A.S.; RAMOS, P.R.R.; JORGE, W. Reestruturação taxonômica do gênero *Mazama* no Brasil através de características genéticas e morfológicas. In: DUARTE, J.M.B. **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. 45 p. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 1998.

DUARTE, J.M.B.; VOGLIOTTI, A.; GARCIA, J.E.; TALARICO, A.C.; RODRIGUES, F.P.; OLIVEIRA, E.J.F.; GONZÁLES, S.; MALDONADO, J.E. Distribution and abundance of the small red brocket deer (*Mazama bororo* DUARTE, 1996): is it an endangered species? In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR CONSERVATION BIOLOGY, 2005, Brasília. **Book of abstracts...** Brasília: UnB, 2005. p. 62.

EISENBERG, J.F.; REDFORD, K.H. **Mammals of the neotropics: the central neotropics**. Chicago: The University of Chicago Press, 1999. v. 3, 609 p.

ENNIS, S.; GALLAGHER, T.F. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. **Animal Genetics**, Sydney, v. 25, p. 425-427, 1994.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1996. 220 p.

FRANTZ, A.C.; POPE, L.C.; CARPENTER, P.J.; ROPER, T.J.; WILSON, G.J.; DELAHAY, R.J.; BURKE, T. Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 12, p. 1649-1661, 2003.

FRANTZEN, M.A.J.; SILK, J.B.; FERGUSON, J.W.; WAYNE, R.K.; KOHN, M.H. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 7, p. 1.423-1.428, 1998.

GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J.E.; ORTEGA, J.; TALARICO, A.C.; BIDEGARAY-BATISTA, L.; GARCIA, J.E.; DUARTE, J.M.B. Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources**, Vancouver, v. 9, p. 754-758, 2009.

GRIFFTHS, R.; TIWARI, B. Primers for the differential amplification of the sex-determining region Y gene in a range of mammal species. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 2, p. 405- 406, 1993.

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 79 p. 6.465-6.469, 1982.

KNAPP, S.M.; CRAIG, B.A.; WAITS, L.P. Incorporating genotyping error into non-invasive DNA based mark-recapture population estimates. **The Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 73, p. 598-604, 2009.

KOHN, M.H.; KNAUER, F. Phylogeography of brown bears in Europe and excremental PCR – the new tool in the genetic analyses of animals in the wild. **Ursus**, Missoula, v. 10 p. 315-321, 1998.

KOHN, M.H.; WAYNE, R.K. Facts from feces revisited. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 12 p. 223-227, 1997.

KOHN, M.H.; YORK, E.C.; KAMRADT, D.A.; HAUGHT, G.; SAUVAJOT, R.M.; WAYNE, R.K. Estimating population size by genotyping faeces. **Proceedings of the Royal Society of London. B. Biological Science**, London, v. 266, p. 657, 1999.

KUEHN, R.; SCHROEDER, W.; PIRCHNER, F.; ROTTMANN, O. Genetic diversity, gene flow and drift in Bavarian red deer populations (*Cervus elaphus*). **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 4, p. 157–166, 2003.

LITT, M.; LUTY, J.A.A. Hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v. 44, p. 397–401, 1989.

MANTELLATTO, A.M.B.; CARNELOSSI, E.A.G.; DUARTE, J.M.B. Transferability of microsatellite loci from exotic Cervidae to Brazilian brocket deer (*Mazama* spp, Mammalia: Cervidae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 277–282, 2010.

MIOTTO, R.A.; RODRIGUES, F.P.; CIOCHETI, G.; GALETTI, P.M. Determination of the minimum population size of pumas (*Puma concolor*) through fecal DNA analysis in two protected Cerrado areas in the Brazilian Southeast. **Biotropica**, Zurich, v. 39, p. 647–654, 2007.

MORIN, P.A.; CHAMBERS, K.E.; BOESCH, C.; VIGILANT, L. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 10, p. 1835–1844, 2001.

NSUBUGA, A.M.; ROBBINS, M.M.; ROEDER, A.D.; MORIN, P.A.; BOESCH, C.; VIGILANT, L. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 13, p. 2089–2094, 2004.

PAJARES, G.; ÁLVAREZ, I.; FERNÁNDEZ, I.; PÉREZ-PARDAL, L.; GOYACHE, F.; ROYO, L.J. A sexing protocol for wild ruminants based on PCR amplification of amelogenin genes AMELX and AMELY. **Archiv Tierzucht**, Dummerstorf, v. 50, p. 442–446, 2007.

PALOMARES, F.; GODOY, J.A.; PIRIZ, A.; O'BRIEN, S.J. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian Lynx. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 11, p. 2171–2182, 2002.

PRUGH, L.R.; RITLAND, C.E.; ARTHUR, S.M.; KREBS, C.J. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. **Molecular Ecology**, Vancouver, v.14, p. 1585–1596, 2005.

ROEDER, A.D.; ARCHER, F.I.; POINAR, H.N.; MORIN, P.A. A novel method for collection and preservation of faeces for genetic studies. **Molecular Ecology Notes**, Vancouver, v. 4, p. 761-764, 2004.

ROSSI, R.V. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. 2000. 147 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

RUTLEDGE, L.Y.; HOLLOWAY, J.J.; PATTERSON, B.R.; WHITE, B.N. An improved field method to obtain DNA for individual identification from wolf scat. **The Journal Of Wildlife Management**, Bethesda, v. 73, n. 8, p. 1430–1435, 2009.

SCHNABEL, Z.E. The estimation of the total fish population of a lake. **The American Mathematical Monthly**, Washington, v. 45, p. 348-352, 1938.

SCHUMACHER, F.X.; ESCHMEYER, R.W. The estimation of fish population in lakes and ponds. **Journal of The Tennessee Academic Science**, Memphis v. 18, p. 228-249, 1943.

SIDRANSKY, D.; TOKINO, T.; HAMILTON, S.R.; KINZLER, K.W.; LEVIN, B.; FROST, P.; VOGELSTEIN, B. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. **Science**, Washington, v. 256, p. 102-105, 1992.

SMITH, D.A.; RALLS, K.; HURT, A.; ADAMS, B.; PARKER, M.; DAVENPORT, B.; SMITH, M.C.; MALDONADO, J.E. Detection and accuracy rates of dogs trained to find scats of San Joaquin kit foxes (*Vulpes macrotis mutica*). **Animal Conservation**, London, v. 6, p. 339–346, 2003.

SOTO-CALDERÓN, I.D.; NTIE, S.; MICKALA, P.; MAISELS, F.; WICKINGS, E.J.; ANTHONY, N.M. Effects of storage type and time on DNA amplification success in tropical ungulate faeces. **Molecular Ecology Resources**, Vancouver, v. 9, p. 471-479, 2009.

TABERLET, P.; WALTZ, L.P.; LUIKART, G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 14 p. 323-327, 1999.

TABERLET, P.; GRIFFIN, S.; GOOSSENS, B.; QUESTIAU, S.; MANCEAU, V.; ESCARAVAGE, N.; WAITS, L.P.; BOUVET, J. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, n. 16 p. 3189–3194, 1996.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12 p. 4127-4138, 1984.

TEMATE, H.B.; OKADA, A.; MINAMI, M.; OHNISHI, N.; HIGUCHI, H.; TAKATSUKI, S. Genetic variations revealed by microsatellite markers in a small population of the sika deer (*Cervus nippon*) on Kinkazan Island, Northern Japan. **Zoological Science**, Tokyo, v. 17, p. 47–53, 2000.

VOGLIOTTI, A. **História natural de *Mazama bororo* (Artiodactyla; Cervidae) através da etnozootologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria**. 2003. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

WASSER, S.K.; HOUSTON, C.S.; KOEHLER, G.M.; CADD, G.G.; FAIN, S.R. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 6, p. 1091-1097, 1997.

WASSER, S.K.; DAVENPORT, B.; RAMAGE, E.R.; HUNT, K.E.; PARKER, M.; CLARKE, C.; STENHOUSE, G. Scat detection dogs in wildlife research and management: application to grizzly and black bears in the Yellowhead Ecosystem, Alberta, Canada. **Canadian Journal of Zoology**, Toronto, v. 82, p. 475–492, 2004.

WEBER, M.; GONZALEZ, S. Latin American deer diversity and conservation: a review of status and distribution. **Ecoscience**, Québec, v. 10 p. 443-454, 2003.

WILSON, D.E.; NICHOLS, J.D.; RUDRAN, R.; SOUTHWELL, C. Introduction. In: WILSON, D.E.; COLE, F.R.; NICHOLS, J.D.; RUDRAN, R.; FOSTER, M.S. **Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for mammals**. Washington; London: Smithsonian Institution Press, 1996. p. 1-7.

WILSON, P.J.; WHITE, B.N. Sex identification of elk (*Cervus elaphus Canadensis*), moose (*Alces alces*) and white tailed deer (*Odocoileus virginianus*) using the polymerase chain reaction. **Journal of Forensic Sciences**, Colorado Springs, v. 46, p. 477– 482, 1998.

YAMAUCHI, K.; HAMASAKI, S.; MIYAZAKI, K.; KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Sex determination based on fecal DNA analysis of the Amelogenin gene in Sika Deer (*Cervus nippon*). **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 62, p. 669-671, 2000.