
Otimização de iniciadores de *loci* microssatélites espécie-específicos e heterólogos para estudos de genética populacional em catetos (*Pecari tajacu*) cativos

Paula Teixeira Gomes¹, Carini Picardi Morais de Castro², Maykon Passos Cristiano³

Resumo

O objetivo deste estudo foi otimizar a amplificação de marcadores microssatélites desenvolvidos para as espécies *Tayassu pecari*, *Sus scrofa* e *Pecari tajacu* em catetos (*P. tajacu*). Foram coletadas amostras de sangue de 20 catetos nascidos em cativeiro na Fazenda Engenho D'água (20°15'41" S, 43°36'34" W) e o DNA total de cada animal foi extraído. Dezenove marcadores microssatélites foram otimizados e os *amplicons* analisados em géis de agarose e poliacrilamida quanto ao tamanho do fragmento amplificado. Desses, 14 marcadores amplificaram. Nossos resultados indicaram que os marcadores heterólogos apresentaram maior sucesso de amplificação quando comparados aos específicos. Esses marcadores otimizados são ideais para o estudo da diversidade genética e do grau de parentesco de catetos.

Palavras chave: amplificação, marcadores microssatélites, Tayassuidae, conservação, diversidade genética.

Abstract

The aim of the present study was to optimize the amplification of microsatellite markers developed for *Tayassu pecari*, *Sus scrofa* and *Pecari tajacu* species in the collared peccary (*P. tajacu*). Blood samples of 20 collared peccaries born in captivity were collected at Fazenda Engenho D'água (20°15'41 "S, 43°36'34" W) and the total DNA of each animal was extracted. Nineteen microsatellite markers were optimized and the amplicons analyzed on agarose and polyacrylamide gels for the size of the amplified fragment. From those, 14 markers amplified. Our results indicated that heterologous markers showed greater amplification success when compared to specific markers. These markers are ideal for the study of the genetic diversity and the kinship of the collared peccaries.

Keywords: Amplification, microsatellite markers, Tayassuidae, conservation, genetic diversity.

¹Mestra em Ecologia de Biomas Tropicais – Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP.

²Bacharel em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP.

³Prof. Dr. Adjunto do Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente - Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP.

Introdução

O *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758), fotografia 1, popularmente conhecido como cateto, encontra-se distribuído na América do Sul, América Central e sudoeste da América do Norte (DESBIEZ *et al.*, 2012). Atualmente, essa espécie vem sofrendo com a antropização o que pode levar a diminuição de suas populações. Apesar do *P. tajacu* não se encontrar

ameaçado em todo o território brasileiro, no estado de Minas Gerais ele se encontra na categoria “vulnerável” a extinção (COPAM, 2010). Dentre os fatores que ameaçam as populações dessa espécie, pode-se citar a caça predatória e a fragmentação de *habitat* (KEUROGHLIAN *et al.*, 2004). Assim, medidas conservacionistas devem ser adotadas, com o intuito de minimizar as ameaças que podem levar essa espécie ao declínio populacional.

Fotografia 1 - *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758)



Fonte: Fotografia de Carlos Magno de Faria, 2016

Uma prática que tem sido empregada para algumas espécies com risco de extinção é a criação em cativeiro, visando à reintrodução em locais onde já estejam extintas (NOGUEIRA; NOGUEIRA-FILHO, 2011) Contudo, antes da reintrodução de qualquer espécie na natureza, é importante estudar e avaliar a estrutura genética dessas populações que serão reintroduzidas no seu ambiente natural (WITZENBERGER; HOCHKIRCH, 2011), vi-

sando compreender, dentre outros aspectos, a diversidade genética e o grau de parentesco desses indivíduos. Deste modo, conhecer os níveis de diversidade genética em pequenas populações é fundamental, pois ela é responsável por manter uma população viável ao longo do tempo (RALLS; BALLOU, 1986). A perda da diversidade genética diminui a capacidade de adaptação das espécies às mudanças ambientais e, com isso, ocorre

o aumento do risco de extinção sobre elas (FRANKHAM, 2003). Portanto, é essencial entender as relações de parentesco entre os indivíduos de uma população cativa, já que o acasalamento entre indivíduos geneticamente semelhantes por muitas gerações pode levar ao aumento dos coeficientes de endogamia da população (LAWRENCE *et al.*, 2017). Altos valores dos coeficientes de endogamia promovem a redução da diversidade genética, comprometendo o sucesso reprodutivo e a sobrevivência da população a longo prazo (ARIF; KHAN, 2009). Assim, os estudos genéticos são fundamentais para o manejo e conservação de espécies ameaçadas de extinção (ARIF; KHAN, 2009).

Os marcadores moleculares microsatélites ou simples sequências repetidas (*Simple sequence repeats* – SSRs) (SELKOE; TOONEN, 2006) são amplamente utilizados em estimativas populacionais, como na quantificação de fluxo gênico entre populações, tempo de divergência, níveis de endogamia, diversidade genética, dentre outros (CHASE; KESSELI; BAWA, 1996; ELLEGREN, 2004). Esses marcadores são sequências ou motivos de repetição em tandem de 1-6 pares de bases (pb) e estão presentes em genomas eucarióticos e procarióticos (ELLEGREN, 2004; ZANE *et al.*, 2002). Os microsatélites são considerados o melhor método para o estudo de populações em cativeiro (WITZENBERGER; HOCHKIRCH, 2011), devido ao grande número de características que eles possuem como, por exemplo, são abundantes no genoma, seletivamente neutros, codominantes e altamente mutáveis (ELLEGREN, 2004). Além do mais, o número de motivos de repetição

pode variar de um indivíduo para o outro, o que torna esses marcadores polimórficos, ou seja, com formas diferentes (ZALAPA *et al.*, 2012).

A taxa de mutação desses marcadores pode variar em detrimento de alguns fatores, como por exemplo, o número de unidades de repetição, o comprimento da sequência e o motivo de repetição (ELLEGREN, 2000; BHARGAVA; FUENTES, 2010). As taxas de mutações podem variar em *locus* e alelos de indivíduos pertencentes a uma mesma espécie e ainda entre espécies diferentes (ELLEGREN, 2000).

Os marcadores microsatélites são envolvidos por sequências de nucleotídeos conhecidas como regiões flangeadoras, que são sequências utilizadas para desenhar os pares de iniciadores (*primers*) que irão amplificar a região contendo os microsatélites (SELKOE; TOONEN, 2006). O fato da região flangeadora dos microsatélites se apresentar extremamente conservada em algumas espécies relacionadas, possibilita a utilização de marcadores microsatélites em espécies próximas àquelas para as quais foram descritas (DALLA VECCHIA *et al.*, 2011).

No entanto, estudos genéticos envolvendo o uso de marcadores microsatélites em *P. tajacu* são ainda escassos, levando em consideração que eles possuem um alto custo e, por existirem poucos iniciadores específicos para a espécie (SILVA *et al.*, 2010). Sendo assim, a transferência de *loci* microsatélites entre espécies proximamente relacionadas tem sido uma estratégia com alta taxa de sucesso para obtenção desses marcadores (BARBARÁ *et al.*, 2007). Neste sentido, o ob-

jetivo deste trabalho foi otimizar as condições de amplificação de marcadores microssatélites desenvolvidos para as espécies *Tayassu pecari*, *Sus scrofa* e *P. tajacu* em catetos cativos.

Material e métodos

Área de estudo e amostragem

As análises genéticas foram realizadas no laboratório de Genética Evolutiva e de Populações da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais. Para tais análises foram coletadas amostras de sangue de 20 catetos (14 fêmeas e 6 machos) nascidos em cativeiro na fazenda Engenho D'Água, localizada no distrito de São Bartolomeu (20°15'41" S,

43°36'34" W), em Ouro Preto, Minas Gerais. A fazenda está inserida na área de Proteção Ambiental das Andorinhas e seu limite faz divisão com a Floresta Estadual Uaimii. Essa instituição é cadastrada no IBAMA sob o nº 002/2003, processo 02015.002962/2003-02 como uma Área de Soltura de Animais Silvestres (ASAS) e possui a licença IBAMA nº 3146.4756/2011-MG, para manejo de fauna silvestre. Os catetos estudados foram divididos em dois grupos com dez indivíduos que se encontravam em dois recintos de 625 m² cada, delimitados por telas de arame de 1,5 m de altura, distanciando-se um do outro por cerca de 10 metros e vegetado com gramíneas e árvores (FOTOGRAFIA 2).

Fotografia 2 - Recintos dos catetos



Fonte: Fotografia de Carlos Magno de Faria, 2016

Para a coleta de sangue foi estabelecido um jejum alimentar de doze horas e hídrico de seis horas. Após a captura e pesagem, fotografia 3, foi administrado a associação de acepromazina, na dose de 0,2 mg/Kg, por via intramuscular (IM). Após quinze minutos, diazepam (0,5 mg/Kg) e cetamina (0,5 mg/Kg) na mesma seringa, por via intramuscular. Os catetos anestesiados foram mantidos em

decúbito lateral, mantendo as vias respiratórias livres. O sangue foi coletado por meio de punção da veia cefálica com auxílio de seringa de 5 ml estéril, diretamente em tubo vacutainer, processado e acondicionado com anticoagulante (EDTA) e congelado a -20°C . As amostras de sangue coletadas dos indivíduos foram armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA genômico.

Fotografia 3 - Contenção dos catetos para análises clínicas e marcação



Fonte: Fotografia de Carlos Magno de Faria, 2016

Extração, amplificação do DNA e análises dos dados

O DNA total foi extraído utilizando o kit de extração DNeasy Blood & Tissue (Quiagen®, Hilden, Germany), segundo as recomendações do fabricante. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídio (0,3

mg/ml). O DNA total extraído foi quantificado e avaliado quanto à sua pureza, usando o Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Os marcadores moleculares microssatélites publicados na literatura para as famílias Tayassuidae e Suidae, tabela 1, foram testados e amplificados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Tabela 1- Relação de *primers* microssatélites selecionados para padronização em *P. tajacu*, seqüências dos *primers*, tamanho do fragmento amplificado em pares de bases (pb) e as referências dos *primers*

(Continua...)

Locus	Seqüência do primer (5' - 3')	Relação filogenética	pb	Referência
PT0226	F - ACA CAC ATA AAT ACA CAC ACA AG R - CAG AAT AAA AAG CTC CAC GAG AG	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Pecari tajacu</i>	122- 134	BIONDO <i>et al.</i> , 2011
JC011	F - CAC CAA TTT GCT GGG TGA TCC T R - TGT TTC TGC TTC TTC AAC TAA AGA ATG	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Pecari tajacu</i>	97-111	COOPER <i>et al.</i> , 2010
JC033	F - GCT GGT ACA TCC TTT GCA CT R - GCT TCT GTG AGT TTT TTT GGA GAA	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Pecari tajacu</i>	255- 285	COOPER <i>et al.</i> , 2010
JC035	F - TGC TAC CAT ATA AGG ATG TAG R - ATT AGG TAG AGA GAG TGA AGC	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Pecari tajacu</i>	100- 120	COOPER <i>et al.</i> , 2010
JC040	F - CCG CAC AAA GCT TAC AGT CT R - AAT ACA AGC ATC CAA GGT GCC	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Pecari tajacu</i>	313- 333	COOPER <i>et al.</i> , 2010
JC041	F CCT GGC GAC ATA AGC CAA GTA GTG AG R - CGG GGC TGC ACT GTC TAG GGA	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Pecari tajacu</i>	358- 368	COOPER <i>et al.</i> , 2010
TPEC2	F - GGT GTT GGG AAA ATT GGA R - GGA GTT TTA TGG CTT CAT GT	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Tayassu pecari</i>	233- 273	DALLA VECCHIA <i>et al.</i> , 2011
TPEC3	F - AAC TGT CTC CTG TAG GCA C R - TGA ACA GTT TAG AAA CGC TG	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Tayassu pecari</i>	186- 190	DALLA VECCHIA <i>et al.</i> , 2011
TPEC4	F - CAG TGG ACC AGA GAA AAC AT R- GGT AAA TAG CTA AAC TTG CCT	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Tayassu pecari</i>	228- 248	DALLA VECCHIA <i>et al.</i> , 2011
TPEC9	F - TCT TTG GAG AAT CGT CTG TT R - CAC TGG CAA GGG ATT AAT C	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Tayassu pecari</i>	137- 141	DALLA VECCHIA <i>et al.</i> , 2011
TPEC10	F - GAC TAG ATC TCA TGT TAA GTG TTT R - AGG GTA TAG AGT CCA GGA GC	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Tayassu pecari</i>	245- 255	DALLA VECCHIA <i>et al.</i> , 2011
TPEC12	F - CTA GCT GCA TCC CTG TTA CT R - CTA TCT GGA CGA AAC CGT AG	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Tayassu pecari</i>	208- 216	DALLA VECCHIA <i>et al.</i> , 2011

Tabela 1- Relação de *primers* microssatélites selecionados para padronização em *P. tajacu*, seqüências dos *primers*, tamanho do fragmento amplificado em pares de bases (pb) e as referências dos *primers*

(Conclusão)				
Locus	Seqüência do primer (5' - 3')	Relação filogenética	pb	Referência
TPEC13	F - GCA TAG TTG TTT AGT TCT ACT CC R - CTA ATA CCT ATC TTG CTG GGA	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Tayassu pecari</i>	186- 190	DALLA VECCHIA <i>et al.</i> , 2011
TPEC14	F - TTT TCC AAC TGG ACT GAT TC R - TGA TAA ACC GTA TGG GAA AG	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Tayassu pecari</i>	249- 257	DALLA VECCHIA <i>et al.</i> , 2011
TPEC18	F - CTG GGA AGG TAT CTC AGC A R - ACC AGG TGG ATA CCA AGT TA	Família: Tayassuidae Espécie: <i>Tayassu pecari</i>	257- 289	DALLA VECCHIA <i>et al.</i> , 2011
SW444	F - ATA GTT TCG GTT GGC CCA G R - CTT AAG CCT CAA GCT AAC AGG C	Família: Suidae Espécie: <i>Sus scrofa</i>	103- 115	ROHRER <i>et al.</i> , 1994
SW857	F - TGA GAG GTC AGT TAC AGA AGA CC R - GAT CCT CCT CCA AAT CCC AT	Família: Suidae Espécie: <i>Sus scrofa</i>	128- 156	ROHRER <i>et al.</i> , 1994
IGF1	F - GCT TGG ATG GAC CAT GTT G R - CAC TTG AGG GGC AAA TGA TT	Família: Suidae Espécie: <i>Sus scrofa</i>	223- 237	ROHRER <i>et al.</i> , 1994
ACTG2	F - CAT CTT CCT CTT CCC TTC CC R - TGT GGA CTC AAG GCT GTA AGC	Família: Suidae Espécie: <i>Sus scrofa</i>	120- 162	ROHRER <i>et al.</i> , 1996

Nota: F: forward
R: reverse

Durante o período de otimização, os pares de iniciadores foram submetidos a ajustes no número de ciclos e na temperatura de pareamento, para atingir as condições exatas de amplificação. As PCRs foram realizadas em reações com volume final de 20,0 µL contendo 4 µL de 1x PCR tampão (Promega), 0,4 µL de dNTPs (0,25 mM de cada), 1,8 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,0 µL de cada iniciador (10mM), 0,5 µL de Taq DNA Polimerase (5 U/µL -Promega) e 0,5 µL de DNA (20 ng/µL). As reações de amplificação incluíram uma desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C, seguida de 32-35 ciclos de amplificação, 95°C por 1 minuto, 50-65°C por 1 minuto para pareamento dos

iniciadores, e 72°C por 1 minuto para extensão, e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

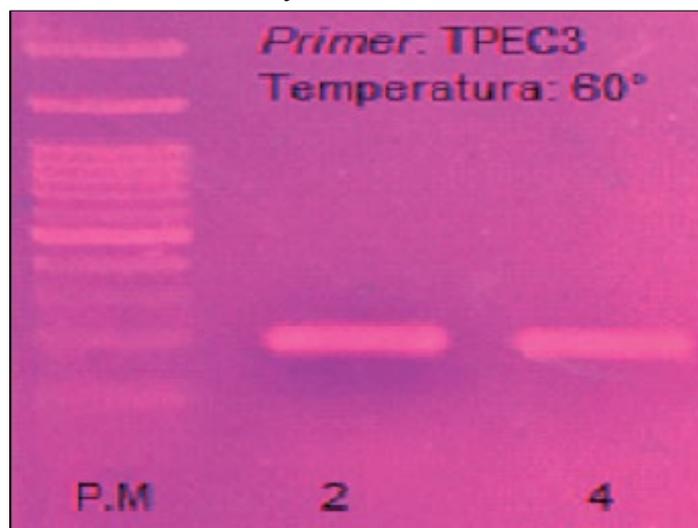
Os produtos da amplificação (*amplicons*) foram analisados quanto à amplificação e a adequabilidade do protocolo utilizado em gel de agarose 1,5 % e em gel de poliacrilamida 8% corados com nitrato de prata (SAMBROOK, 2011). O marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) foi utilizado para identificar os fragmentos microssatélites de interesse, e o resultado foi analisado com base na literatura (BIONDO *et al.*, 2011, COOPER *et al.*, 2010, DALLA VECCHIA *et al.*, 2011, ROHRER *et al.*, 1994 e ROHRER *et al.*, 1996).

Resultados e discussão

Dezenove marcadores moleculares microssatélites foram testados separadamente em diferentes números de ciclos e temperaturas de pareamento, com o intuito de eliminar as bandas inespecíficas geradas durante a amplificação. Os produtos obtidos na amplificação foram analisados em géis de agarose

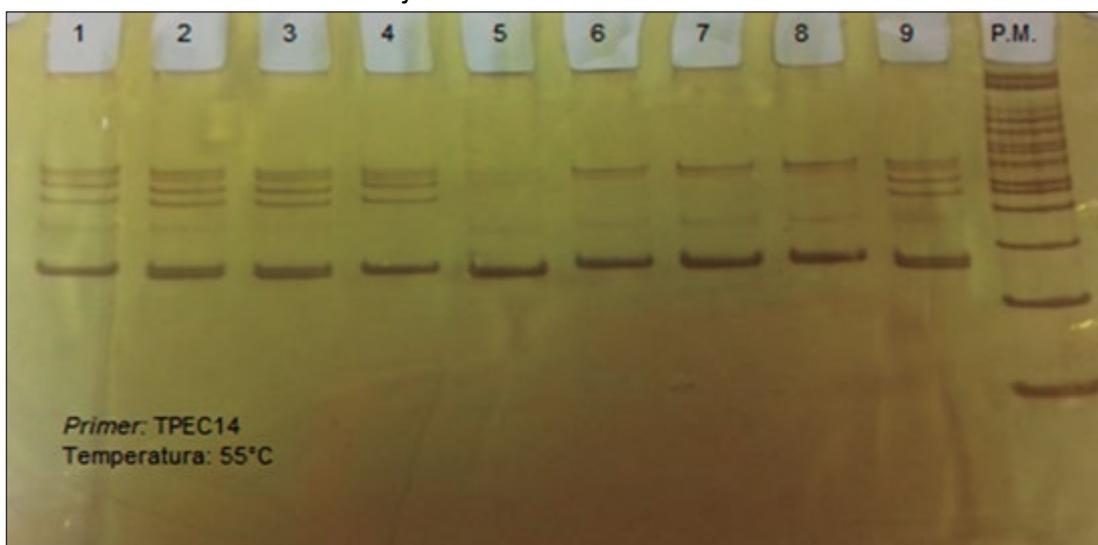
1,5%, figura 1, e em géis de poliacrilamida 8% (FIGURA 2). A partir das análises realizadas nos géis foi possível inferir que 14 marcadores foram amplificados, pois os *amplicons* correspondiam ao tamanho do fragmento descrito na literatura. Cinco marcadores microssatélites não apresentaram amplificação (JC011, JC035, JC041, SW444 e ACTG2), portanto foram retirados desse estudo.

Figura 1 – Gel de agarose 1,5% com a amplificação do *loci* microssatélite TPEC3 em dois indivíduos de *Pecari tajacu*



Nota: P.M.: Marcador de peso molecular DNA 100pb

Figura 2 - Gel de poliacrilamida 8% com a amplificação do *loci* microssatélite TPEC 14 em indivíduos de *Pecari tajacu*



Nota: P.M.: Marcador de peso molecular DNA 100pb

Dos 19 marcadores selecionados na literatura, seis eram espécie-específicos (PT0226, JC011, JC033, JC035, JC040 e JC041) e 13 heterólogos (TPEC2, TPEC3, TPEC4, TPEC9, TPEC10, TPEC12, TPEC13, TPEC14, TPEC18, SW444, SW857, IGF1 e ACTG2). Os *loci* microssatélites de 14 regiões foram

amplificados com sucesso, três eram espécies-específicos (PT0226, JC033 e JC040) e onze eram heterólogos (TPEC2, TPEC3, TPEC4, TPEC9, TPEC10, TPEC12, TPEC13, TPEC14, TPEC18, SW857 e IGF1) pertencendo ao gênero *Tayassu* (família Tayassuidae) e ao gênero *Sus* (família Suidae) (TABELA 2).

Tabela- 2 - Relação dos marcadores microssatélites amplificados em *Pecari tajacu*

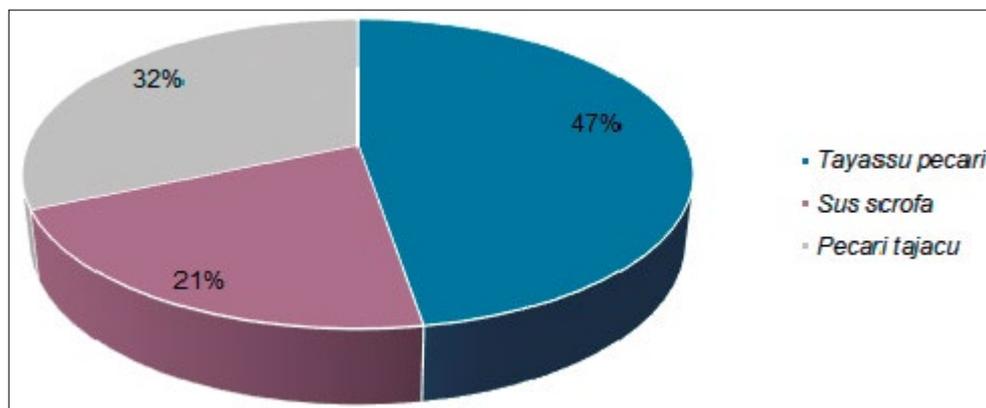
Locus	Espécie	T (°C)	Nº de ciclos	Tipo
PT0226	<i>Pecari tajacu</i>	55	32	Espécie-específico
JC033	<i>Pecari tajacu</i>	60	32	Espécie-específico
JC040	<i>Pecari tajacu</i>	60	32	Espécie-específico
TPEC2	<i>Tayassu pecari</i>	62	32	Heterólogo
TPEC3	<i>Tayassu pecari</i>	60	32	Heterólogo
TPEC4	<i>Tayassu pecari</i>	60	32	Heterólogo
TPEC9	<i>Tayassu pecari</i>	50	32	Heterólogo
TPEC10	<i>Tayassu pecari</i>	64	32	Heterólogo
TPEC12	<i>Tayassu pecari</i>	60	32	Heterólogo
TPEC13	<i>Tayassu pecari</i>	60	32	Heterólogo
TPEC14	<i>Tayassu pecari</i>	55	32	Heterólogo
TPEC18	<i>Tayassu pecari</i>	60	32	Heterólogo
SW857	<i>Sus scrofa</i>	60	32	Heterólogo
IGF1	<i>Sus scrofa</i>	57	32	Heterólogo

OBS.: Espécie para o qual o marcador foi desenvolvido, temperatura de pareamento, número de ciclos de amplificação e tipo do marcador.

Os marcadores empregados nesse estudo foram, em sua maioria, heterólogos, ou seja, foram desenvolvidos para espécies proximamente relacionadas a espécie *P. tajacu*. Sendo, 47,0% do total desenvolvidos para a espécie *T. pecari*, família Tayassuidae, e 21,0% do total desenvolvidos para a espécie *S. scrofa*, família Suidae. Foram

ainda utilizados marcadores específicos da espécie em estudo, representando 32,0% do total (GRÁFICO 1). Porém, nem todos os *loci* selecionados e testados amplificaram a região de interesse, sendo que o número de marcadores amplificados correspondeu à 73,68% do total.

Gráfico 1 - Proporção de marcadores microssatélites selecionados para otimização



Fonte: Paula Teixeira Gomes, 2018

Os marcadores utilizados foram selecionados de acordo com algumas características, sendo elas a filogenia das espécies e o número de alelos por *locus*. O número de alelos encontrados por autores que realizaram estudos genéticos em catetos (*P. tajacu*) utilizando os iniciadores selecionados para esse estudo, variou entre dois e 16 alelos por *locus* (BIONDO *et al.*, 2014; COOPER *et al.*, 2010; COOPER *et al.*, 2011; DALLA VECCHIA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2010). Uma possível explicação para esses valores seria que a maioria dos marcadores são heterólogos, sendo desenvolvidos para espécies *T. pecari* e *S. scrofa*, e marcadores moleculares microssatélites tendem a ser mais polimórficos para a espécie no qual eles foram desenvolvidos devido ao seu alto grau de especificidade (ELLEGREN *et al.*, 1997). No entanto, nesse estudo os marcadores heterólogos apresentaram maior sucesso de amplificação quando comparados aos específicos. Todos os marcadores de *T. pecari* testados em *P. tajacu* obtiveram 100% de sucesso na amplificação, sendo similar ao encontrado por Dalla Vecchia *et al.* (2011) ao testar o potencial de amplificação heteróloga desses marcadores na espécie em estudo. Barbará *et al.* (2007) ao analisar a transferibilidade de marcadores de microssatélites concluiu que, em mamíferos pode haver uma probabilidade de sucesso na transferência de microssatélites entre gêneros pertencentes a uma mesma família. Porém, na transferência entre famílias a chance de sucesso é menor (BARBARÁ *et al.*, 2007). Os marcadores transferidos da família Suidae para a Tayassuidae apresentaram menor potencial de amplificação nesse trabalho, confirmando

os estudos de Barbará *et al.* (2007).

Ao longo desse trabalho foram padronizados iniciadores de *loci* microssatélites específicos e heterólogos que serão empregados em estudos de genética populacional de catetos.

Considerações finais

No presente trabalho otimizamos as condições de amplificação de marcadores microssatélites desenvolvidos para as espécies *P. tajacu*, *T. pecari* e *S. scrofa* em catetos cativos. Os resultados obtidos indicaram que os marcadores heterólogos apresentaram maior sucesso de amplificação quando comparados aos específicos, sugerindo que eles podem ser empregados em estudos de genética populacional na espécie *P. tajacu*. Assim, posteriormente, utilizaremos os marcadores otimizados para o estudo da diversidade genética e do parentesco dos catetos mantidos em cativeiro. Deste modo, os resultados gerados irão nos orientar quanto a possibilidade de reintrodução desses indivíduos em seu *habitat* natural, bem como, poderemos sugerir medidas para o manejo e a conservação dessa espécie.

Referências

- ARIF, I. A.; KHAN, H. A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 32, n.1, p. 9–17, 2009.
- BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microssatellite markers: Potential and limitations. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 18, p. 3759-3767, 2007.
- BHARGAVA, A.; FUENTES, F. F. Mutational dynamics

- of microsatellites. **Molecular Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 250-66, 2010.
- BIONDO, C.; KEUROGHLIAN, A.; GONGORA, J.; MIYAKI, C. Y. Population genetic structure and dispersal in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) from the Brazilian Pantanal. **Journal of Mammalogy**, v.92, p.267-274, 2011.
- BIONDO, C.; IZAR, P.; MIYAKI, C. Y.; BUSSAB, V. S. R. Social structure of collared peccaries (*Pecari tajacu*): Does relatedness matter? **Behavioural Processes**, v.109, n. Part A, p. 70-78, 2014.
- CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal Botany**, v. 83, p. 51-57, 1996.
- COOPER, J. D.; WASER, P. M.; GOPURENKO, D.; HELLGREN, E. C.; GABOR, T.M.; DEWOODY, J. A. Measuring sex-biased dispersal in social mammals: comparisons of nuclear and mitochondrial genes in collared peccaries. **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 6, p. 1413–1424, 2010.
- COOPER, J. D.; WASER, P. M.; HELLGREN, E. C.; GABOR, T. M.; DEWOODY, J. A. Is sexual monomorphism a predictor of polygynandry? Evidence from a social mammal, the collared peccary. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 65, p. 775–785, 2011.
- CONSELHO DE POLÍTICA AMBIENTAL - COPAM. Deliberação Normativa nº 147, de 30 de abril de 2010. Aprova a Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna do Estado de Minas Gerais. **Diário Oficial do Estado de Minas Gerais**- Belo Horizonte, 04 mai. 2010.
- DALLA VECCHIA, A. C.; BIONDO C.; SANCHES A.; KEUROGHLIAN A.; MIYAKI, C. Y.; GALETTI, M.; GALETTI JR, P. M. Isolation and characterization of microsatellite loci for white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and cross-amplification in collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, p.151–154, 2011.
- DESBIEZ A. L. J.; KEUROGHLIAN A.; BEISIEGEL B. M.; MEDICI E. P.; GATTIA.; MENDES PONTES A. R.; CAMPOS C. B.; TÓFOLI C. F.; MORAES JUNIOR, E. A.; AZEVEDO F. C.; PINHO G. M.; CORDEIRO J. L. P.; JÚNIOR, T. S. S.; MORAIS, A. A.; MANGINI, P. R.; FLESHER K.; RODRIGUES, L. F.; ALMEIDA, L. B. Avaliação do Risco de Extinção do Cateto *Pecari tajacu* Linnaeus, no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 3, p.74–83, 2012.
- ELLEGREN, H.; MOORE, S.; ROBINSON, N.; BYRNE, K.; WARD, W.; SHELDON, B. C. Microsatellite evolution - a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. **Molecular Biology and Evolution**, v.14, p. 854-860, 1997.
- ELLEGREN, H. Microsatellite mutations in the germline: Implications for evolutionary inference. **Trends in Genetics**, v. 16, p. 551–558, 2000.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435-445, 2004.
- FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes rendus Biologies**, v.326, p.22–29, 2003.
- KEUROGHLIAN, A.; EATON, D. P.; LONGLAND, W. S. Area use by white-lipped and collared peccaries (*Tayassu pecari* and *Tayassu tajacu*) in a tropical forest fragment. **Biological Conservation**, v. 120, p. 411– 425, 2004.
- LAWRENCE, M.; MASTROMONACO, G.; GOOD-ROWE, K.; SANTYMIRE, R. M.; WADDELL, W.; SCHULTE-HOSTEDDE, A. I. The effects of inbreeding on sperm morphometry of captive-bred endangered mammals. **Canadian Journal of Zoology**, v. 95, n. 8, p. 599-606, 2017.
- NOGUEIRA, S. S. C.; NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. Wildlife farming: an alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests? **Biodiversity and Conservation** v. 20, p.1385–1397, 2011.
- RALLS, K.; BALLOU, J. Captive breeding programs for populations with a small number of founders. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 1, n.1, p. 19-22, 1986.
- ROHRER, G. A.; ALEXANDER, L. J.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P.; BEATTIE, C. W. A microsatellite linkage map of the porcine genome. **Genetics**, v. 136, n. 1, p. 231-245, 1994.
- ROHRER, G. A.; ALEXANDER, L. J.; HU, Z.; SMITH T. P. L.; KEELE, J. W.; BEATTIE, C. W. A comprehensive map of the porcine genome. **Genome Research**, v. 6, n. 5, p. 371–391, 1996.
- SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters** , v. 9, n. 5, p. 615-629, 2006.
- SILVA, R. W.; FREITAS, T. R. O.; SBALQUEIRO, I. J.

Evaluation of genetic variability in the collared peccary *Pecari tajacu* and the white-lipped peccary *Tayassu pecari* by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 62-67, 2010.

ZALAPA, J. E.; CUEVAS, H.; ZHU, H.; STEFFAN, S.; SENALIK, D.; ZELDIN, E.; MCCOWN, B.; HARBUT, R.; SIMON, P. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 2, p. 193-208, 2012.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARMELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: A review. **Mol Ecol**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

WITZENBERGER, K. A.; HOCHKIRCH, A. Ex situ conservation genetics: are view of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. **Biodiversity and Conservation**, v. 20, p.1843–1861, 2011.