

# AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE MARCADORES RAPD EM BANDOS DE QUEIXADA (*Tayassu pecari*) DO PARQUE NACIONAL DAS EMAS

MARIANA PIRES DE CAMPOS TELLES<sup>1</sup>, LUCILEIDE VILELA RESENDE<sup>2</sup>, THANNYA NASCIMENTO SOARES<sup>3</sup>, FLÁVIA MELO RODRIGUES<sup>4</sup>, ANAH TEREZA DE ALMEIDA JÁCOMO<sup>5</sup>E LEANDRO SILVEIRA<sup>6</sup>

1. Bióloga, Professora do Departamento de Zootecnia da UCG – tellesmpc@uol.com.br.
2. Aluna do Curso de Graduação em Zootecnia da UCG – lvresende@bol.com.br
3. Aluna do Curso de Graduação em Biologia da UCG – tnsoares@bol.com.br
4. Bióloga, Professora do Departamento de Biologia Geral do ICBI da UFG – rflamelo@aol.com
5. Bióloga, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da UNB – jacomo@procarnivoros.org.br
6. Biólogo, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da UNB – silveira@procarnivoros.org.br

## RESUMO

A análise da variabilidade genética das espécies nativas passou a ter hoje um papel de destaque na definição das estratégias de conservação e manejo de populações naturais, dentro de um contexto de pecuária alternativa. O objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão de amplificação de diversos *primers* de marcador tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) a fim de fazer uma seleção com base na resolução das bandas no gel e no nível de polimorfismo encontrado para cada *primer*, para bandos de queixada (*Tayassu pecari*) na região do Parque Nacional das Emas, GO. Foram amplificados 40 *primers* utilizando-se reações de PCR a partir do DNA de 18 indivíduos. Os

fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Trinta *primers* foram amplificados com sucesso, fornecendo um total de 203 locos, com uma média de 7 locos por *primer*. Considerando os dois bandos analisados, cerca de 72% dos locos são polimórficos. A análise de variância molecular (AMOVA) realizada para todos os locos mostrou que existe uma tendência de estruturação da variabilidade genética nos bandos, com um  $f_{ST}$  igual a 0,081 ( $P=0,07$ ). Uma análise de coordenadas principais confirma esses resultados, sugerindo que a espécie tende a formar bandos que podem ser unidades reprodutivas.

PALAVRAS-CHAVE: Divergência genética, queixadas, RAPD, *Tayassu pecari*.

## SUMMARY

EVALUATION OF THE PATTERN OF AMPLIFICATION OF RAPD MARKERS IN GROUPS OF WHITE-LIPPED PECCARY (*Tayassu pecari*) OF THE NATIONAL PARK OF EMAS, BRAZIL.

The analysis of genetic diversity within and among natural populations of native species is a central issue to establish conservation and management strategies, in the context of alternative breeding programs. The objective of this research was to evaluate amplification pattern of primers from RAPD markers, for two groups of white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) from Emas National Park. Forty primers were used for the amplification through polymerase chain reaction (PCR), using DNA from 18 individuals. The amplified fragments were analysed by horizontal electroforese in agarose gel. Out of the 40 primers, 30 were

successfully amplified, resulting in 203 loci, with an average of 7 loci per primer. Considering the two groups simultaneously, about 72% of the loci were polymorphic. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed a tendency for structuring the genetic variability exists in the groups with a  $f_{ST}$  equal to 0.081 ( $P = 0.07$ ). A principal coordinate analysis, based on Jaccard coefficients among individuals, also showed the same trend, suggesting that they, at least in part, form reproductive units.

KEY WORDS: Genetic divergency, white-lipped peccary, RAPD, *tayassu pecari*.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos 15 a 20 mil anos o homem domesticou cerca de 50 a 60 espécies de animais que constituem a base da indústria animal no mundo todo e que servem como fonte de alimentos, couros e outros produtos e serviços (CLUTTON-BROCK, 1999). Algumas espécies são cosmopolitas e criadas em quase todas as regiões, enquanto outras têm importância mais regional. A grande maioria das espécies de animais domésticos foi domesticada no chamado Velho Mundo, ou seja, Europa, África e Ásia, e apenas um número muito pequeno de espécies de ocorrência nas regiões onde existiram populações humanas desenvolvidas já foi explorado (LAVORENTI, 1997).

O interesse popular em proteger espécies animais e de plantas tem se intensificado durante as últimas décadas, tanto por razões ecológicas quanto comerciais.

A preservação do meio ambiente deixou de ser apenas uma bandeira de ecologistas e um conceito politicamente correto para proporcionar ganhos qualitativos e estratégicos às empresas. Investir em linhas de produção que tenham essa preocupação e incorporar processos de gestão ambiental constituem uma tendência e, em alguns casos, significam também a redução nos custos operacionais (DONAIRE, 1995; KINLAW, 1997). Acredita-se que as organizações estejam interessadas na sustentabilidade de seus negócios e preocupadas em conceber produtos, serviços e processos que as aproximem do equilíbrio ambiental. Isso já se verifica nos países desenvolvidos e a influência pode ser sentida no Brasil. A pecuária alternativa, ou silvestre, inserida no contexto de econegócio, deve se tornar regra nos próximos anos (ANDRADE et al., 2000; ROCHA, 2002).

Nesse contexto, a análise da variabilidade genética das espécies nativas passa a ter hoje um papel de destaque na definição das estratégias de conservação e manejo de populações naturais (AVISE & HAMRICK, 1996). O conhecimento da magnitude e distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações é importante, pois está relacionado com o alcance do fluxo gênico, o sistema de acasalamento, as taxas de mortalidade e o sistema

reprodutivo. Por outro lado, a análise da divergência genética entre as populações, aliada aos padrões espaciais de distribuição da divergência genética entre elas, permite a identificação de unidades evolutivas significativas (ESU – em análises filogeográficas com base no DNA mitocondrial) ou de unidades de manejo (UM – em análise com base no DNA nuclear) (EIZIRIK, 1996). Essas informações são importantes na definição de programas para a conservação de populações evolutivamente estáveis bem como para auxiliar no manejo racional e sustentável dessas populações (NEWTON et al., 1999).

Apesar de sua importância econômica e ecológica, sabe-se pouco sobre a ecologia e estrutura genética das populações de queixadas (*Tayassu pecari*). A maior parte do conhecimento sobre este animal é especulativa, deduzida a partir de sua semelhança esperada com porcos selvagens e javalis, sem confirmação na natureza (MAYER & WETZEL, 1987; FRAGOSO, 1997). Ele provavelmente necessita de grandes áreas naturais (não perturbadas), pode ser migratório, sendo suas fontes de alimento provavelmente esparsas e largamente distribuídas (KILTIE, 1981; KILTIE & TEBORGH, 1983). Na natureza, formam bandos que podem variar entre 5 a 200 indivíduos. É possível que em certas estações do ano os bandos grandes se dividam em grupos menores, de acordo com a distribuição e abundância de alimento. Entretanto, acredita-se que seja mais frequente a ocorrência de grupos menores em áreas com maior pressão de caça ou com um grau maior de antropização (KILTIE & TEBORGH, 1983; FRAGOSO, 1997). Dessa forma, a migração desses bandos pode estar relacionada com os ciclos de produção de frutos em grandes regiões e pode ainda necessitar de um certo tamanho mínimo de bando para que haja sucesso na reprodução (SMYTHE, 1986; FRAGOSO, 1997; ALTRICHTER et al., 2001). Portanto, um estudo inicial sobre a genética e dinâmica populacional desses animais torna-se necessário e urgente, já que existe um grande interesse de exploração, para fins comerciais, dessa espécie.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os padrões de amplificação e a variabilidade genética de alguns marcadores RAPD (Random

Amplified Polymorphic DNA), a fim de selecionar os melhores padrões e utilizá-los para estimar a diversidade e a divergência genética dentro e entre bandos de queixadas com ocorrência no Parque Nacional das Emas (PNE) e seu entorno.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção dos dados moleculares

Foram armados chiqueiros, cevados com milho e sal, para a captura dos animais no entorno do Parque Nacional das Emas. Depois de capturados, o sangue de 18 indivíduos, pertencentes aos bandos Bigatinha e Fundão, foi coletado com o auxílio de um *vacouteiner* contendo EDTA. Depois de coletado, o sangue foi acondicionado em um volume igual de um tampão denominado Easy Blood e armazenado em geladeira, que auxilia na conservação do material até chegar ao laboratório para a extração do DNA.

O DNA dos indivíduos foi extraído utilizando o *kit* de purificação de DNA *GFX* fornecido pela Amersham Pharmacia Biotech. Foram utilizados 40 *primers* das séries OPA e OPC fornecidos pela Operon™. Estes *primers* foram amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR) com diferentes protocolos, a fim de escolher o de melhor resultado (HILLIS et al., 1996; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Foram testadas as três condições de amplificação descritas a seguir: Teste 1 – primeira etapa 3' a 96°C, segunda etapa 1' a 92°C, terceira etapa 1' a 35°C, quarta etapa 1' a 72°C, quinta etapa 40 ciclos (2-4), sexta etapa 3' a 72°C e sétima etapa 4°C ∞. Teste 2 – primeira etapa 3' a 94°C, segunda etapa 1' a 94°C, terceira etapa 1' a 35°C, quarta etapa 2' a 72°C, quinta etapa 40 ciclos (2-4), sexta etapa 7' a 72°C, sétima etapa 4°C ∞. Teste 3 – primeira etapa 2' a 94°C, segunda etapa 1,5' a 92°C, terceira etapa 1' a 37°C, quarta etapa 2,5' a 72°C, quinta etapa 40 ciclos (2-4), sexta etapa 5' a 72°C e sétima etapa 4°C ∞. As reações de PCR para um sistema com o volume final de 20ml foram montadas da seguinte forma: 2ml de DNA (~10ng/ml); 1,5ml de *primer* (~10ng/ml); 2,6ml tampão da enzima (10X); 0,78ml de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 2,08ml de d'NTP (2,5mM); 0,2ml da enzima Taq-

Polimerase (5 unidades/ml) e completando o volume com 10,84ml de H<sub>2</sub>O *Milli-Q*. Para cada indivíduo foi feita uma reação de PCR, testando todos os *primers* aqui citados.

Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% com tampão de corrida TBE 0,5X. As bandas foram coradas com brometo de etídio e visualizadas com transiluminador de luz ultravioleta, em seguida os géis foram fotografados para posterior análise, com o auxílio do fotodocumentador Kodak Edas 120.

### Análise estatística dos dados

Depois de codificados os géis, a matriz de dados binários (presença/ausência das bandas nos indivíduos) foi submetida a uma análise estatística descritiva e a uma estimativa da diversidade genética de Nei, que foi feita por *primer*, utilizando o *software* Popgene (Population Genetic Analysis) versão 1.32 (YEH & YANG, 1998). A divergência entre os bandos também foi estimada através da análise de variância molecular (AMOVA), realizada para cada *primer*, utilizando-se o *software* AMOVA versão 1.55 (EXCOFFIER et al., 1992). Em seguida, foram calculadas correlações de Pearson entre as estatísticas descritivas e os estimadores da divergência genética, a fim de testar possíveis preditores desta divergência, com base em algumas características do *primer*.

Os dados também foram utilizados para a construção de uma matriz de distâncias genéticas entre os indivíduos com base no Índice de Jaccard que, em seguida, foi submetida a uma análise de ordenação denominada Coordenadas Principais, a fim de visualizar o padrão de divergência genética entre os indivíduos em um espaço reduzido de duas dimensões (CRUZ & REGAZZI, 1997). Esta análise foi realizada utilizando-se o *software* NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 1.5 (ROHLF, 1989).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 40 *primers* testados, 30 obtiveram amplificação (Figuras 1 e 2). Considerando-se os 30 *primers* nos dois bandos, foi obtido um total de 203

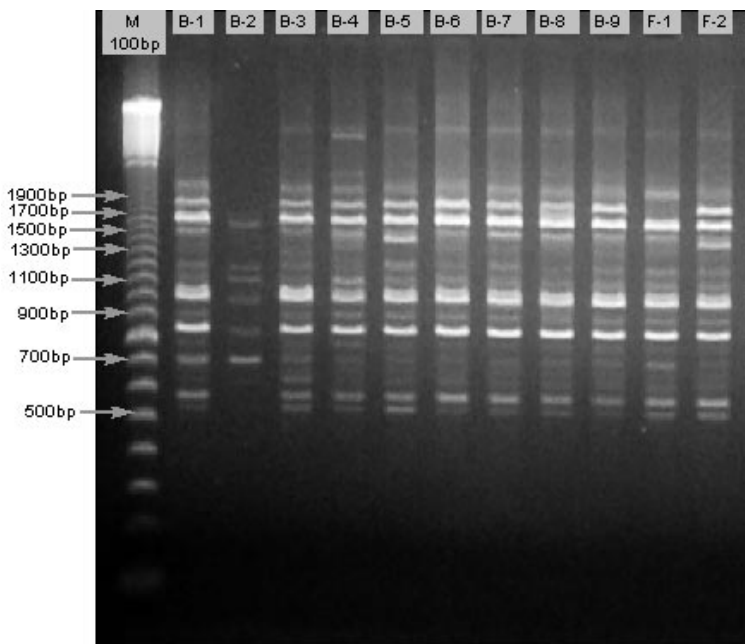
locos, com uma média de 7 locos por *primer*, com variação de 1 a 15. O número de locos polimórfico foi 147, com variação entre 0 e 12 por *primer* (Tabela 1). Quando se consideram os bandos separadamente, encontram-se para o Fundão 104 locos polimórficos, o que corresponde a 51,23% do total. No bando Bigatinha foram encontrados 123 locos polimórficos, que representam 60,59% do total.

A análise de Diversidade de Nei, realizada por *primer*, mostrou que existe uma diversidade total ( $H_i$ ) que variou entre 0 e 0,340, sendo que a proporção de variação genética entre os bandos ( $G_{ST}$ ) variou entre 0 e 0,643. Quando são considerados todos os *primers* simultaneamente, os valores de  $H_i$  e  $G_{ST}$  foram 0,2370 e 0,1278, respectivamente. A análise de variância molecular (AMOVA), quando realizada considerando todos os locos, mostrou que, de fato, existe uma tendência de estruturação da variabilidade genética nos bandos, com um  $f_{ST}$  igual a 0,081, significativo ao nível de 7% de probabilidade. Quando a AMOVA foi realizada por *primer*, o  $f_{ST}$  variou entre 0 e 0,549, sendo que a maior parte dos coeficientes não foi significativa (Tabela 1).

Como a correlação entre os dois estimadores da estrutura genética ( $G_{ST}$  e  $f_{ST}$ ) foi elevada ( $r = 0,719 / P < 0,001$ ), foram analisadas apenas as cor-

relações entre os valores de  $f_{ST}$  ao longo dos *primers* com as características descritivas desses *primers*, incluindo o número de locos, ( $r = 0,109 / P = 0,568$ ), o número de locos polimórficos ( $r = 0,079 / P = 0,678$ ) e a diversidade genética total {HT} ( $r = 0,045 / P = 0,815$ ). Dessas correlações poderiam sugerir preditores em potencial na detecção da divergência genética entre os bandos mas, de fato, apenas os dois estimadores da estrutura genética estão significativamente correlacionados (Figura 3). Assim, uma seleção de *primers*, como a realizada neste trabalho, torna-se necessária na tentativa de otimização da qualidade e quantidade dos dados a serem obtidos. A ausência de correlação entre estas variáveis impossibilitou a utilização de critérios puramente quantitativos para a seleção de *primers* que apresentassem maior poder de detecção da divergência genética.

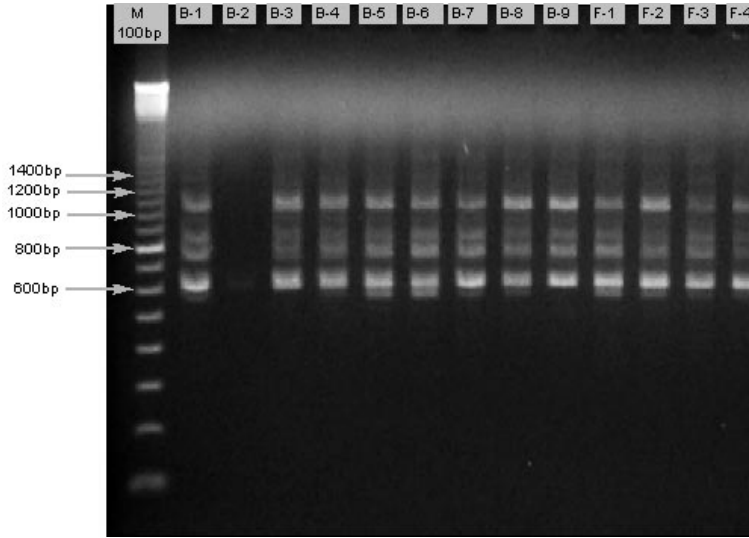
A análise de coordenadas principais mostrou que existe uma tendência de agrupamento dos indivíduos nos seus respectivos bandos, conforme sugerido pela AMOVA, o que seria esperado se esta espécie realmente utilizar uma estratégia de formação de bandos reprodutivos (Figura 4). O significado adaptativo da formação de bandos grandes nesta espécie não é claramente entendido (SMYTHE,



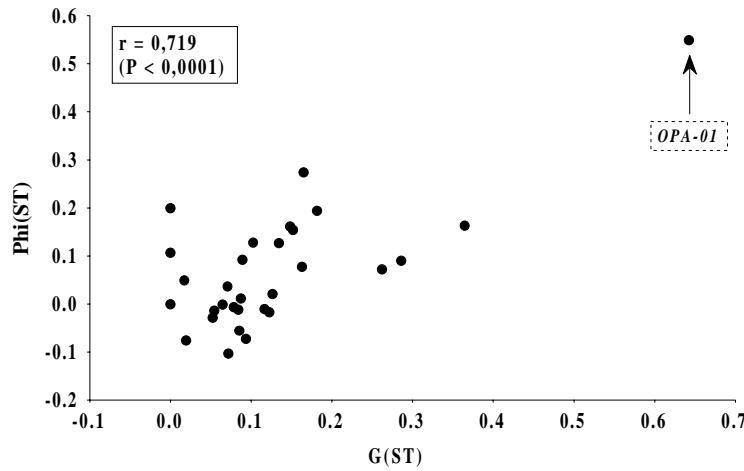
**FIGURA 1.** Exemplo de um bom padrão de amplificação dos fragmentos RAPD obtidos pelo *primer* OPC-4 com o DNA dos bandos (Bigatinha e Fundão) de queixada. As colunas M 100bp indicam o marcador de peso molecular (100 base pair ladder, Pharmacia).

**TABELA 1.** Relação do número de locos, número de locos polimórficos, proporção da variação genética entre bandos ( $G_{st}$ ), diversidade total ( $H_t$ ) e  $f_{st}$  com seu nível de significância (P), para 30 *primers* de RAPD em dois bandos de queixadas (*Tayassu pecari*) do Parque Nacional das Emas.

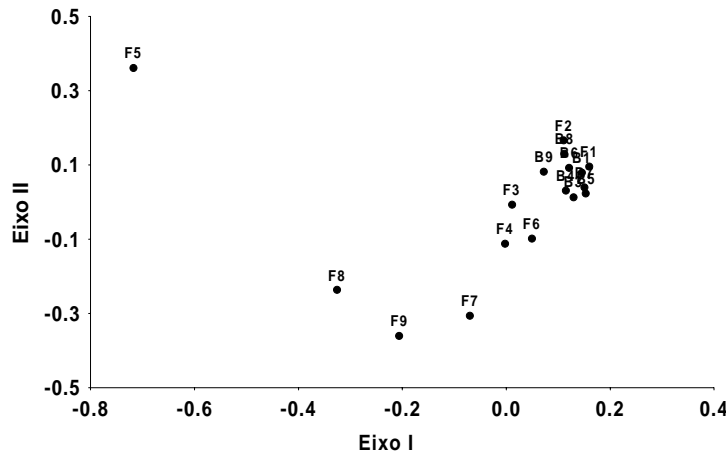
<i>Primers</i>	N.º de locos	N.º de locos polimórficos	$G_{st}$	$H_t$	$f_{st}$	(P)
OPA - 01	3	2	0,6428	0,3169	0,549	(0,0002)
OPA - 02	8	4	0,0935	0,1675	-0,073	(0,6753)
OPA - 05	4	2	0,0720	0,1943	-0,103	(0,7305)
OPA - 08	9	8	0,0195	0,3106	-0,076	(0,9248)
OPA - 09	5	3	0,0172	0,1632	0,049	(0,2370)
OPA - 10	4	3	0,0707	0,2637	0,036	(0,2408)
OPA - 11	11	10	0,0895	0,2472	0,092	(0,0702)
OPA - 13	8	2	0,0845	0,0822	-0,012	(0,6515)
OPA - 14	4	3	0,1164	0,3052	-0,011	(0,4815)
OPA - 15	6	5	0,1229	0,3333	-0,017	(0,5613)
OPA - 16	3	0	0,0000	0,0000	0,199	(0,1278)
OPA - 18	15	12	0,1347	0,2674	0,127	(0,0266)
OPA - 20	9	8	0,1483	0,3221	0,161	(0,0362)
OPC - 01	8	5	0,0541	0,2365	-0,014	(0,5141)
OPC - 02	3	2	0,0858	0,2529	-0,055	(0,2098)
OPC - 04	10	9	0,0784	0,3359	-0,007	(0,3311)
OPC - 05	5	3	0,1524	0,2101	0,154	(0,0492)
OPC - 06	9	7	0,0527	0,3253	-0,029	(0,6133)
OPC - 08	10	9	0,1266	0,2202	0,021	(0,2797)
OPC - 09	5	4	0,0653	0,3399	-0,001	(0,4675)
OPC - 10	4	1	0,3647	0,0979	0,163	(0,0002)
OPC - 11	6	3	0,1653	0,2091	0,274	(0,0002)
OPC - 12	9	8	0,1631	0,2741	0,077	(0,1748)
OPC - 13	2	0	0,0000	0,0000	0,107	(0,2288)
OPC - 14	8	8	0,1820	0,2440	0,194	(0,0252)
OPC - 16	12	9	0,1026	0,1280	0,128	(0,0646)
OPC - 17	1	0	0,0000	0,0000	0,000	(1,0000)
OPC - 18	8	5	0,0875	0,2054	0,011	(0,3733)
OPC - 19	5	4	0,2862	0,2717	0,090	(0,1148)
OPC - 20	9	8	0,2622	0,2635	0,072	(0,1114)
Geral	203	147	0,1278	0,2370	0,081	(0,0078)



**FIGURA 2.** Exemplo de um padrão pouco satisfatório de amplificação dos fragmentos RAPD obtidos pelo *primer* OPA-14 com o DNA dos bandos (Bigatinha e Fundão) de queixada. As colunas M 100bp indicam o marcador de peso molecular (*100 base pair ladder, Pharmacia*).



**FIGURA 3.** Relação entre os estimadores da divergência genética ( $G_{ST}$  e  $\Phi_{ST}$ ), por *primer*, para dois bandos de queixada (Bigatinha e Fundão) do Parque Nacional das Emas.



**FIGURA 4.** Análise de coordenadas principais obtidas a partir das distâncias genéticas (Jaccard), mostrando o padrão de divergência entre os indivíduos pertencentes a dois bandos de queixada Bigatinha (B1 a B9) e Fundão (F1-F9).

1986; FRAGOSO, 1997; ALTRICHTER et al., 2001). Esse arranjo em bandos pode ter significado apenas ecológico, por exemplo, como uma estratégia de defesa contra predadores ou na tentativa de melhorar o forrageamento, não significando necessariamente a existência de acasalamentos preferenciais dentro dos bandos. No entanto, embora o número de bandos analisados neste trabalho seja pequeno, as análises genéticas sugerem a existência de uma tendência de estruturação da variabilidade genética dentro e entre bandos, mostrada pelos elevados valores de  $f_{ST}$  encontrados para os *primers* OPA-01, OPC-10 e OPC-11. Essa tendência pode indicar que esses bandos realmente se comportam como unidades reprodutivas, e esta informação é crucial para o planejamento de forma racional da captura desses animais na natureza, direcionando as coletas no sentido de preservar ao máximo a variabilidade genética natural da espécie.

### CONCLUSÃO

A avaliação de um número grande de marcadores possibilitou a escolha de pelo menos 11 *primers* que poderão otimizar as futuras análises de divergência genética entre bandos de queixadas. Com base em uma análise conjunta considerando-se todos os critérios foi possível a escolha dos *primers* OPA-01, OPC-10 e OPC-11, pelo critério de poder de detecção da divergência genética; os *primers* OPA-18, OPC-16, OPC-04 e OPC-08 pelo maior número de locos e locos polimórficos; os *primers* OPA-08, OPA-11, OPC-06 e OPC-18 por apresentarem uma alta diversidade total e uma boa resolução das bandas no gel, quando comparados com outros que apresentam o mesmo número de locos. Embora o número de locos e a diversidade genética total não tenham apresentado correlação com o grau de divergência entre os bandos analisados neste estudo, essas características destes *primers* aumentam a possibilidade de detecção de diferenças em relação a outros bandos não analisados.

A análise também mostrou que os diversos *primers* têm comportamentos diferentes com relação ao poder de detecção da divergência genética entre os bandos. Como o objetivo do trabalho foi

avaliar o padrão de amplificação dos marcadores, o número de indivíduos testados foi bem reduzido, tornando necessária a análise de uma amostra maior para que seja possível tirar conclusões mais satisfatórias sobre a estruturação da variabilidade entre e dentro dos bandos de queixada. Entretanto, verificou-se uma tendência de que os indivíduos sejam mais similares geneticamente dentro dos bandos quando comparados com indivíduos de um outro bando. Essa informação, portanto, passa a ser importante em programas visando à conservação ou ao manejo racional desta espécie.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. José Alexandre F. Diniz Filho, do Departamento de Biologia da UFG, pelo auxílio durante o planejamento e análise dos dados, e à Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás e da Jaguar *Conservation Fund*, pelo auxílio financeiro.

### REFERÊNCIAS

- ALTRICHTER, M.; DREWS, C.; CARRILLO, E.; SÁENZI J. Sex ratio and breeding of white-lipped peccaries *Tayassu pecari* (Artiodactyla: Tayassuidae) in a Costa Rica rain Forest. **Revista de Biologia Tropical**, v. 49, n. 1. 2001.
- ANDRADE, R. O. B.; TACHIZAWA, T.; CARVALHO, A. B. **Gestão ambiental**. São Paulo: Makron Books, 2000.
- AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. **Conservation genetics: case histories from nature**. New York: Chapman & Hall, 1996.
- CLUTTON-BROCK, J. **A natural history of domesticated mammals**. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 390 p.
- DONAIRE, D. **Gestão ambiental na empresa**. São Paulo: Atlas, 1995.

- EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Genetics and Molecular Biology**, v. 19, n. 4, p. 23-29, 1996.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa - Cenargen, 1998.
- FRAGOSO, J. M. Queixadas e palmeiras na Ilha de Maracá. In: VALLADARES-PADUA, C.; BODMER, R. **Manejo e conservação de vida silvestre no Brasil**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 1997. p. 270- 283.
- HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996.
- KILTIE, R. A. Stomach contents of rainforest peccaries (*Tayassu tacaju* and *T. pecari*). **Biotropica**, v. 13, p. 234-236, 1981.
- KILTIE, R. A.; TEBORGH, J. Observation on the behavior of rain Forest peccaries in Peru: why do White-lipped peccaries from herds? **Z. Tierpsychol**, v. 62, p. 241-255, 1983.
- KINLAW, D. C. **Empresa competitiva e ecológica: desempenho sustentado na era ambiental**. Tradução de Lenke Peres Alves de Araújo. São Paulo: Makron Books, 1997.
- LAVORENTI, A. Situação atual da pesquisa com animais silvestres no Brasil: perspectivas e necessidades futuras. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., Brasília. **Anais...** Brasília, SBZ, 1997.
- MAYER, J. J.; WETZEL, R. M. *Tayassu pecari*. **Mammalian Species**, v. 293, p.1-7, 1987.
- NEWTON, A. C.; ALLNUTT, T. R.; GILLIES, A. C. M.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, p. 140-145, 1999.
- ROCHA, D. C. C. Criação e manejo de animais silvestres em cativeiro e zoológicos. In: **ANAIS DO 1º FÓRUM AMBIENTAL DE MARINGÁ**. Disponível em: <[http://www.maringa.pr.gov.br/forum-ambiental/anais/palestras/fauna\\_deciocesar.htm](http://www.maringa.pr.gov.br/forum-ambiental/anais/palestras/fauna_deciocesar.htm).> Acesso em: 17 jul. 2002.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. New York: Exeter publishers, 1989.
- SMYTHE, N. Competition and resource portioning in the guild of neotropical terrest frivorous mammals. **Annual Review of Ecology And Systems**, v. 17, p.169-188, 1986.
- YEH F. C.; YANG, R. C. **Popgene 1.32: Population Genetic Analysis**. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1998. Distribuído pelo autor.