

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Diversidade Genética e Conservação de
Populações de Ariranha (*Pteronura brasiliensis*,
Zimmerman, 1780) (Carnivora, Mustelidae) no
Brasil.**

ORIENTADO(a): **Débora de Mendonça Garcia**
ORIENTADOR: **Prof. Dr. Fabrício Rodrigues dos Santos**
Local e data da defesa: Sala B2-162, 15-01-2008

BELO HORIZONTE -MG
Fevereiro – 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**Diversidade Genética e Conservação de
Populações de Ariranha (*Pteronura brasiliensis*,
Zimmerman, 1780) (Carnivora, Mustelidae) no
Brasil.**

Débora de Mendonça Garcia

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Genética (Área de Concentração em Genética Evolutiva e de Populações) da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Genética.

‘Dedico este trabalho as ariranhas, afinal elas não foram somente meu objeto de estudo, foram a espécie a qual espero ter colaborado com sua conservação na natureza.’



Agradecimentos

Ao Fabrício pela orientação no mestrado, pelo projeto com as aranhas, pela iniciativa, ajuda e revisões do artigo e pela oportunidade de poder desenvolver meu trabalho no LBEM .

Aos nossos colaboradores Dr. Fernando Rosas do INPA e Dra. Míriam Marmontel do IDSM por terem cedido as amostras e pela ajuda nas várias revisões do artigo.

Ao colega de laboratório e amigo Rodrigo Redondo pela ajuda nas análises, idéias e resgate quando eu ficava meio perdida.

Aos demais amigos do LBEM pelo apoio, amizade, pelo ótimo ambiente de trabalho, “Happy Neys” e pela paciência.

Aos colegas e professores da Pós-Graduação em Genética e a Marina pela disposição e ajuda com as burocracias científicas.

A Dona Nailda pelo cafezinho essencial de todos os dias e a boa “prosa”, e a Dona Lúcia por deixar nosso laboratório sempre limpinho.

A família pelo amor e incentivo e aos amigos pela força, momentos de descontração e boas risadas.

Ao Felipe pelo apoio, carinho e pela presença especial na reta final de mais uma “trilha”.

A banca examinadora pelo tempo disponibilizado, pelas críticas e participação no aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida e a FAPEMIG pelo financiamento de congressos e outros.

A Deus por ter tanta coisa para agradecer.

Índice

| | |
|---|----|
| Introdução Geral..... | 06 |
| Artigo: Conservation Genetics of the giant otter (<i>Pteronura brasiliensis</i> , Zimmerman, 1780) (Carnivora, Mustelidae)..... | 12 |
| Abstract..... | 13 |
| Resumo..... | 14 |
| Introduction..... | 15 |
| Material and Methods..... | 18 |
| Sample Collection..... | 18 |
| DNA extraction and amplification..... | 19 |
| Data analysis | 21 |
| Results..... | 22 |
| DNA extraction from feces..... | 22 |
| CR and Cyt-b..... | 22 |
| COI and CR+Cyt-b+COI..... | 24 |
| Phylogeny of the complete set of mtDNA sequences..... | 24 |
| Discussion..... | 25 |
| Acknowledgments..... | 27 |
| References..... | 28 |
| Tables..... | 33 |
| Figure Legends..... | 36 |
| Figures..... | 37 |
| Discussão Geral..... | 40 |
| Referências Bibliográficas..... | 42 |

INTRODUÇÃO GERAL

Família Mustelidae e a Subfamília Lutrinae

A família Mustelidae é a maior e mais diversa dentro da ordem Carnívora, consistindo de 25 gêneros e 67 espécies (Nowak, 1999) divididas em cinco subfamílias: Mustelinae, Melinae, Taxiidinae, Mellivorinae e Lutrinae (Dragoo & Honeycutt, 1997; Koepfli & Wayne, 2003; Flynn *et al.*, 2005, Fulton & Strobeck, 2006). Os mustelídeos possuem uma grande diversidade eco-morfológica, apresentando desde espécies fossoriais (texugo) até espécies que são semi ou completamente aquáticas (lontras) (Koepfli & Wayne, 2003). Os membros desta família estão distribuídos em todos os continentes, com exceção da Austrália e Antártica. Alguns aspectos morfológicos como corpo alongado, patas curtas e cauda longa são compartilhados pela maioria dos mustelídeos (Nowak, 1999).

As lontras estão classificadas dentro da subfamília Lutrinae (Wozencraft, 1993), são dependentes de ambientes aquáticos e ocupam tanto áreas de água fresca ou ambientes marinhos (Estes, 1989). Wozencraft (2005) agrupou as 13 espécies de lontra em sete gêneros: *Aonyx*, *Enhydra*, *Hidictis*, *Lutrogale*, *Pteronua*, *Lutra* e *Lontra*. Duas espécies de lontras ocorrem no Brasil, a lontra neotropical (*Lontra longicaudis*) e a ariranha ou lontra gigante (*Pteronura brasiliensis*).

A espécie *Pteronura brasiliensis*

A ariranha (*Pteronura brasiliensis*) é o maior carnívoro semi-aquático da América do Sul, sendo que o comprimento total do seu corpo varia de 1,5 a 1,8m em machos e 1,5 a 1,7 em fêmeas e seu peso corpóreo pode chegar à 32 kg em machos adultos (Duplaix, 1980). Na água, o corpo pesado da ariranha é impulsionado pela sua longa cauda achatada e por membranas interdigitais presentes nas patas (Foster-Turley, 1990). As ariranhas possuem uma marcação esbranquiçada irregular no pescoço que permite a identificação individual desde o nascimento, e também a diferenciação de outros mustelídeos (Harris, 1968; Foster-Turley, 1990).

Esta espécie habita muitos tipos de rios, enseadas e lagos de florestas tropicais (Duplaix, 1980), é exclusivamente diurna e sua dieta consiste primariamente de peixes, e em pequena proporção também consomem moluscos, crustáceos, aves, répteis, anfíbios e pequenos mamíferos (Laidler, 1984; Benetton *et al.*, 1990).

A ariranha é um animal endêmico da América do Sul, sua distribuição geográfica original inclui o Suriname, o centro-sul da Venezuela, o sul e leste da

Colômbia, o oeste do Equador, o leste do Peru, o centro-norte e leste da Bolívia, o norte da Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil (exceto a região do semi-árido da Caatinga) (Tomás *et al.*, 2000). Apesar desta espécie ainda posuir uma extensa faixa latitudinal de distribuição, a caça intensiva e indiscriminada no passado (principalmente durante as décadas de 1950 a 1970) para o comércio de sua valiosa pele no mercado internacional e a destruição antrópica de seus habitats (Carter & Rosas, 1997), que perdura até os dias de hoje, levou a espécie à categoria de ameaçada de extinção pela IUCN (2000). A ariranha está também incluída no apêndice I da Convenção Internacional sobre o Comércio das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES) e é considerada vulnerável pelo IBAMA (2004).

Em função da ampla distribuição no continente sul-americano e de algumas características corporais aparentemente distintas entre as populações que ocorrem no norte e no sul de sua distribuição, duas subespécies foram sugeridas se baseando apenas em dados morfológicos: *Pteronura brasiliensis brasiliensis*, com ocorrência na bacia Amazônica, e *Pteronura brasiliensis paranensis*, ocorrendo na bacia dos Rios Paraguai e Paraná (Harris, 1968; Duplaix, 1980).

As populações remanescentes de ariranha que no passado eram ameaçadas principalmente pela caça, agora sofrem uma pressão severa do aumento da colonização e exploração dos recursos naturais, como a construção de usinas hidroelétricas, a mineração, a poluição industrial e a contaminação dos rios (Carter & Rosas, 1997).

Genética da Conservação

Atualmente a diversidade genética é considerada um dos três níveis da biodiversidade que devem ser protegidos (i.e. diversidade genética, diversidade de espécies e diversidade de ecossistemas), por ser essencial para a persistência dos organismos nos ambientes de constante mudança (Lande & Shannon, 1996; Frankham *et al.*, 2002). Em resposta a essa necessidade surgiu a genética da conservação, definida como “a genética e sua aplicação para a preservação de espécies como entidades capazes de evoluir em resposta às mudanças do ambiente, com a finalidade de minimizar seu risco de extinção”. (Frankham *et al.*, 2002).

A genética da conservação é empregada em vários problemas da biologia da conservação, tal como na discriminação de espécies e/ou subespécies ameaçadas de extinção (Daugherty *et al.*, 1990; Walpole *et al.*, 2001), elaboração de estratégias de manejo reprodutivo (Geyer *et al.*, 1993; Miller, 1995), determinação do status de

conservação de uma espécie (O'Brien *et al.*, 1985) etc. Esta área também estuda a variabilidade genética intra e inter-específica buscando uma melhor compreensão da dinâmica de populações das espécies na natureza ou monitoração das populações em cativeiro. Estes estudos podem resultar, por exemplo, na quantificação do grau de estruturação geográfica de populações naturais, medição de graus de diversidade genética e consangüinidade nas populações naturais e de cativeiro, e várias outras análises filogenéticas e filogeográficas (Avice *et al.*, 1995).

Os estudos filogenéticos se preocupam com os problemas envolvendo discriminação de espécies e sua classificação taxonômica, já os estudos filogeográficos, por outro lado, permitem o mapeamento espaço-temporal da diversidade genética, isto é, como se distribui a variabilidade genética no espaço geográfico e como esta se originou no passado evolutivo das espécies. As conseqüências destes estudos consistem muitas vezes na identificação de populações ou grupos de populações prioritárias para a preservação. Em alguns países esta abordagem tem proporcionado a utilização do conceito de ESU ou Unidades Evolucionárias Significativas (Ryder, 1986; Moritz, 1994). Desta forma, nas discussões sobre implementação de unidades de conservação utilizam-se as ESUs, que podem ser consideradas como grupos populacionais representativos da espécie em termos de variabilidade genética (Santos *et al.* 2002).

Atualmente o conceito de ESUs relativo às populações isoladas e monofiléticas é bastante utilizado na prática conservacionista. Para a caracterização de uma ESU geralmente é feito um estudo filogeográfico e de genética populacional clássica com dados de variações no DNA genômico (Avice *et al.*, 1995; Hewitt, 2001). No entanto, alguns autores criticam esta aplicação das ESUs (Crandall *et al.*, 2000) alegando principalmente que o uso de marcadores moleculares neutros (como o caso do DNA mitocondrial, prática comum nestas metodologias), podem não representar corretamente a diversidade das populações em termos adaptativos, que é a variação necessária para assegurar a persistência da espécie evolutivamente. Apesar das críticas à utilização de marcadores neutros, como DNA mitocondrial e microsatélites, estas metodologias têm conseguido diagnosticar com sucesso as populações divergentes evolutivamente e de certa forma importantes como reservatórios de variabilidade genética das espécies (Hedrick, 2001).

DNA mitocondrial

Os marcadores moleculares têm contribuído para a identificação e o estudo dos processos genéticos que podem estar afetando populações em declínio, e muitas

vezes ajudam também a estabelecer estratégias de manejo quando a informação obtida é utilizada juntamente com dados fisiológicos, demográficos, ecológicos e comportamentais (O'Brien, 1994b; Frankham *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002).

O DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido empregado frequentemente em estudos populacionais, evolutivos e voltados para conservação, sendo também muito útil em investigações sobre relações filogenéticas entre diferentes *taxa* e identificação de subdivisão geográfica entre unidades populacionais (Avise *et al.* 1987, Avise 2000). O mtDNA apresenta algumas características peculiares que o tornam vantajoso como ferramenta para análises genéticas e reconstruções filogenéticas: ocorrência em múltiplas cópias dentro das células, fácil de ser isolado, taxa de evolução de 5 a 10 vezes mais rápida do que genes nucleares, herança materna e ausência ou frequência mínima de recombinação (Avise *et al.*, 1987; Baker *et al.*, 1993). Além disso, seqüências do DNA mitocondrial geram informações independentes que podem ser usadas para corroborar ou confrontar hipóteses filogenéticas obtidas a partir de estudos morfológicos (Avise, 1995).

Várias regiões do DNA mitocondrial, codificadoras ou não, têm sido usadas em estudos populacionais e filogenéticos. A região controle (RC), por ser a região com taxa de evolução mais rápida dentro da molécula, tem sido utilizada principalmente em análises intra-específica (Kvist *et al.*, 2001; Rhymer *et al.*, 2001). Os genes citocromo b (Cytb) e citocromo oxidase I (COI), por outro lado, são regiões codificadoras de evolução mais lenta em relação à região controle e mais utilizadas para estabelecer relações entre espécies, gêneros e famílias (Zink *et al.*, 1998; Bates *et al.*, 1999).

Análises genéticas através de métodos não-invasivos

Um dos fatores que restringem a realização de estudos genéticos é a amostragem, problema especialmente marcante quando se trata de animais raros ou ameaçados, de fauna críptica ou ainda espécies com dificuldades práticas de serem amostradas (Palomares *et al.*, 2002), como é o caso da ariranha.

A descrição de protocolos para extração de DNA a partir de materiais como fezes, pêlo, pele trocada (de répteis), cascas de ovo e outros, permitiram que amostragens não-invasivas superassem muitas destas restrições (Kohn & Wayne, 1997). Contudo, alguns problemas foram logo identificados como a co-purificação de contaminantes (Litvaitis & Litvaitis, 1996), pouca quantidade de DNA (Frantzen *et al.*, 1998), DNA degradado levando à não amplificação através da PCR tradicional, identificação de alelos falsos ou nulos (*allele dropout*) e contaminação esporádica (Gagneux *et al.*, 1997; Kohn & Wayne 1997; Taberlet *et al.*, 1999).

No entanto, diferentes estudos tem sido feitos utilizando-se DNA extraído de fezes e em muitos deles (i.e. Flagstad *et al.*, 1999 com ovelhas domésticas; Parsons, 2001 com golfinhos; Palomares *et al.*, 2002 com o lince; Fernando *et al.*, 2003 com elefantes asiáticos em cativeiro) obteve-se uma alta taxa de confiabilidade na utilização de fezes como fonte de DNA.

Além disso, no caso das ariranhas, a utilização de técnicas não invasivas como a extração de DNA a partir de fezes tornou-se facilitada pela presença de um muco viscoso que não inclui restos alimentares e é relativamente simples de ser separado quando as fezes ainda estão frescas.

Estudos Genéticos com *P. brasiliensis*

Atualmente um número cada vez maior de instituições mantém exemplares de ariranha em cativeiro (Carter & Rosas, 1997; Carter *et al.*, 1999; Sykes-Gatz, 2001). Essa situação tem estimulado uma relativa demanda de troca de animais entre instituições, o que, sem um estudo genético que esclareça a existência ou não de subespécies ou de populações diferenciadas, poderá gerar conseqüências catastróficas para a conservação da ariranha. Uma destas conseqüências poderia ser a depressão exogâmica, ou seja, o aparecimento de problemas genéticos, levando a uma menor viabilidade populacional, decorrente da combinação de alelos entre linhagens genéticas muito diferenciadas por processos seletivos (adaptação local) ou de co-adaptação gênica, o que pode acelerar ainda mais o processo de extinção da espécie (Frankham *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002).

Os estudos genéticos que incluem *P. brasiliensis* publicados até o momento são de filogenia ou filogeografia da família Mustelidae ou da subfamília Lutrinae como um todo (Koepfli & Wayne 1998; Koepfli & Wayne 2003; Marmi *et al.*, 2004). Inexistem, contudo, estudos genéticos que comprovem a validade das subespécies de ariranha ou mesmo de populações geneticamente distintas, ou ainda estudos que estimem os parâmetros genéticos das populações de *P. brasiliensis*, o que poderia ter implicações importantes para a conservação desta espécie.

O presente projeto consiste na realização de um estudo pioneiro da diversidade e estrutura genética da espécie *Pteronura brasiliensis*, através da utilização de seqüências do DNA mitocondrial (Cytb, RC e COI), que irá investigar a proposição, baseada em morfologia, de que há uma divisão em duas subespécies geograficamente separadas, uma ao norte na bacia amazônica e outra mais ao sul, na região do Pantanal Matogrossense. Uma definição clara de subespécies ou populações com status de conservação diferenciado é extremamente importante na

elaboração de programas de manejo e estratégias de conservação, principalmente no caso de espécies ameaçadas de extinção como a ariranha.

O projeto também se propõe a caracterizar a diversidade genética na espécie *P. brasiliensis* a fim de criar subsídios para o início de outros estudos de grande interesse conservacionista. Além disto, face às dificuldades de obtenção de amostras biológicas de indivíduos na natureza, outra proposta importante deste projeto é padronizar protocolos para extração de DNA de fezes e restos de tecidos, ossos, etc.

Conservation genetics of the giant otter (*Pteronura brasiliensis*, Zimmerman 1780) (Carnivora, Mustelidae)

D. M. Garcia¹; M. Marmontel²; F. W. Rosas³ and F. R. Santos¹

¹*Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil;* ²*Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM, Tefé, AM, Brazil;* ³*Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, AM, Brazil.*

Corresponding author: Fabrício R. Santos. Associate Professor
Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627 – C.P. 486, CEP 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brazil, e-mail: fsantos@icb.ufmg.br

Received April 2, 2007, Accepted July 24, 2007 – Distributed December 1, 2007

ABSTRACT

The giant otter (*Pteronura brasiliensis*) is an aquatic mammal belonging to the Mustelidae family, endemic to South America. Its original distribution extended from the Guyanas to north-central Argentina, but it is extinct or on the verge of extinction in most of its historical range. Currently, the species is considered threatened with extinction by the World Conservation Union (IUCN). Based on geographic distribution and morphological characters, two subspecies were suggested: *P. brasiliensis brasiliensis*, occurring in the Amazon and Orinoco river basins and *P. brasiliensis paranensis*, in the Paraná and Paraguai river basins. However, there have been no consensus on assuming this subspecies division and no detailed studies have been carried out to elucidate this question. This study aims to evaluate the genetic diversity and population structure of *Pteronura brasiliensis* along its range in Brazil to check the possibility of existence of two distinct subspecies using also a reciprocal monophyly criterion. We analyzed the control region, Cytochrome b and Cytochrome c Oxidase subunit I genes of the mitochondrial DNA in several giant otter populations from the Amazon and Paraguai river basins. Analyses have indicated some degree of geographic correlation and high levels of inter-population divergence, although the subspecies division is not highly supported. As we observed strong population structure, we cannot rule out the existence of further divisions shaping the species distribution. The results suggest that a more complex population structure occurs in *P. brasiliensis*, and the conservation practice should concentrate on preserving all remaining local populations.

Key words: Giant otter, mitochondrial DNA, conservation genetics, subspecies

RESUMO

Genética da conservação da ariranha (*Pteronura brasiliensis*) (Carnivora, Mustelidae)

A ariranha (*Pteronura brasiliensis*) é um mamífero aquático da família Mustelidae, endêmico da América do Sul. Sua distribuição original se estendia desde as Guianas até o centro-norte da Argentina, mas está extinta ou à beira da extinção na maior parte de sua distribuição histórica. Atualmente a espécie é considerada como ameaçada de extinção pela World Conservation Union (IUCN). Em função de sua distribuição no continente sul-americano, e de algumas características morfológicas, duas subespécies foram sugeridas: *P. brasiliensis brasiliensis*, com ocorrência nas bacias do Amazonas e Orinoco, e *P. brasiliensis paranensis*, ocorrendo nas bacias dos Rios Paraguai e Paraná. Inexiste, contudo, um consenso sobre a validade da divisão em subespécies e nenhum estudo detalhado foi realizado para elucidar esta questão. Este trabalho tem o objetivo de avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional de *P. brasiliensis* no Brasil para verificar a existência de duas subespécies baseando-se também em um critério de monofilia recíproca. Analisamos a região controle e os genes do Citocromo b e da Subunidade I da Citocromo c Oxidase do DNA mitocondrial em populações de ariranha que ocorrem nas bacias dos rios Amazonas e Paraguai. As análises indicaram um grau moderado de correlação geográfica e um alto nível de divergência inter-populacional, embora a divisão em subespécies não seja bem sustentada. Como observamos uma forte estruturação populacional, não podemos descartar a existência de outras subdivisões nesta espécie. Isto indica a presença de uma estrutura populacional mais complexa em *P. brasiliensis*, o que implica que medidas de conservação deveriam concentrar seus esforços preservando todas populações locais remanescentes.

Palavras-chave: Ariranha, DNA mitocondrial, Genética da conservação, subespécies

INTRODUCTION

The giant otter, *Pteronura brasiliensis* (Zimmermann, 1780), is an aquatic mammal belonging to the Mustelidae family, order Carnivora, endemic to wetlands and river systems in forests of South America (Eisenberg, 1989). Its historical distribution extended from the Guyanas to central-north Argentina (Carter & Rosas, 1997). During the early 1970's, hunters decimated many populations to supply the international market with the species' valuable skin (Rosas, 2004). Today, the giant otter is believed extinct in most of its original range and is classified as endangered with extinction by the World Conservation Union (IUCN, 2000). While in the past, hunting strongly affected giant otter populations, currently the species is threatened by multiple anthropogenic factors derived from expanded colonization of tropical lowland rainforests and wetlands. Destruction of forests, leading to soil erosion, decrease of prey abundance due to over-fishing as well as illegal hunting of otters, are related to human colonization along rivers (Groenendijk *et al.*, 2004).

The giant otter is the largest aquatic carnivore in South America, with a total body length ranging from 1.5 to 1.8 m. (Duplaix, 1980). It is a social species, with group sizes ranging from 2 to 12 individuals. Each individual can be identified since birth by the pale irregular pattern on its chin and throat (Foster-Turley, 1990).

Rengger (1830), later reviewed by Harris (1968), described the subspecies *Pteronura brasiliensis paranensis* based on morphological characters like dentition, throat color and size, inhabiting the Paraná and Paraguai river basins, as opposed to the *P. brasiliensis brasiliensis* occurring in the Amazon and Orinoco river basins. However, no other taxonomic studies have been done to validate the subspecies division, and to this date no population genetic studies have been performed with this species.

According to Ridley (2006), subspecies can be defined as geographic populations, presenting clearly different phenotypes. However, there appears to be no clear phenotype differences documented between the suggested giant otter subspecies. Subspecies are formed by the evolution of at least two populations in relative isolation that accumulate genetic differentiation (Zink, 2004). Knowing the level of population divergence in a particular species is an important issue in conservation biology. Furthermore, population subdivisions such as subspecies are usually taken into account for different conservation management strategies, and are also frequently target of governmental protection, and focus of conservation efforts (Frankham *et al.*, 2002). However, discrimination of subspecies at the phenotypic and genotypic level can be very difficult because of discordant patterns of intra- and inter-population diversity, as well as a complex population structure. Assuming that subspecies should present evolutionary distinctiveness, the use of a reciprocal monophyly criterion is also an important evidence of this taxonomic division, although it may not be the only one (Zink, 2004).

Different molecular markers can be used to access the diversity and genetic structure of natural populations (Avice, 1994). The mitochondrial DNA (mtDNA) has some peculiar characteristics such as maternal inheritance, no recombination, evolution rate about ten times faster than nuclear DNA, extensive intra-specific variation in Vertebrates, multiple copies per cell, and it is easy to isolate and study. Such factors make it an important tool for population and phylogenetic studies (Kocher *et al.*, 1989). The non-coding control region (CR) is known for having the fastest evolution rate in the molecule, thus it is commonly used for intra-specific studies (Kvist *et al.*, 2001; Rhymer *et al.*, 2001). On the other hand, the Cytochrome b (Cyt-b) and Cytochrome c Oxidase subunit I (COI) are coding regions with slower evolution rate and therefore are

frequently used to establish relationships among subspecies, species, genera and families (Zink *et al.*, 1998; Vilaça *et al.*, 2006).

One major difficulty in genetic studies is the geographic sampling, especially when dealing with rare, threatened species that are difficult to capture or collect tissues. For some animals, methods requiring the capture and handling are sometimes not feasible, owing to logistical difficulties or ethical concerns. This problem is particularly acute for endangered carnivore species, which are usually scarce, live in low densities, and have elusive and secretive habits (Palomares *et al.*, 2002). The use of DNA extraction protocols from material such as feces, hair, skin, egg shells among others, allow non-invasive sampling to overcome most of the restrictions (Kohn & Wayne, 1997). However, many problems were soon encountered, like the co-purification of contaminants (Litvaitis & Litvaitis, 1996), small amounts of DNA (Frantzen *et al.*, 1998), degraded DNA leading to non amplification by PCR, identification of false alleles (allele dropout), and sporadic contamination (Gagneux *et al.*, 1997; Kohn & Wayne, 1997; Taberlet *et al.*, 1999). In the case of *P. brasiliensis*, the use of non-invasive techniques was facilitated by the presence of a viscous mucus containing mostly intestine epithelial cells and free of food residues, which can be deposited separately but near the feces or on its surface, making the mucus relatively easy to separate from fresh feces.

Our aim in this project was to carry out a pioneer study of the genetic diversity and population structure of the endangered species *Pteronura brasiliensis*, using mtDNA sequences obtained mainly by non invasive methods. This is the first approach to confront the initial suggestion, based on morphology, that there are two geographically separated subspecies, one in the north (Amazon and Orinoco basins) and another in the south (Paraná and Paraguai river basins). The characterization of the

population structure and likely taxonomic subdivisions in the giant otter is extremely important for the elaboration of management programs and conservation strategies.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection

Thirty giant otter individuals were sampled in different areas, 22 from eight sampling sites located in the Brazilian states of Amazonas (AM) and Roraima (RR), both in the Amazon River basin and 8 individuals from the Brazilian Pantanal (Paraná and Paraguai river basins) (Fig. 1, Table 1). All samples collected (from captive or dead animals, and feces from latrines) were maintained at the Laboratory of Aquatic Mammals at INPA/Manaus (AM), at the Centre of Preservation and Research of Aquatic Mammals (CPPMA) of Manaus Energia S.A. at the Vila de Balbina (AM), at the Institute of Sustainable Development Mamirauá (IDSMM, Pantanal) or at the Center of Research of Pantanal (CPP). Blood samples from live captive animals (n=4) were collected by anesthetizing individuals with Zoletil (Rosas *et al.*, in prep.) Other samples (liver, kidney, heart) were obtained from animals (n=7) that died in captivity between the years of 1992 and 2004, or from feces (mucus) collected from communal latrines of free-ranging giant otters (n=13), or from pelts (n=6) of known origin. The mucus quality and amount obtained from feces depended on sample age. When feces were fresh it was possible to collect only the mucus using a syringe without needle. When feces were old or dry, the surface was scraped off with a spatula, targeting epithelial cells sloughed from the gut lining during gut passage of the fecal bolus. Both the mucus and dried feces were stored in 2.0 ml microcentrifuge tubes containing ethanol 70%. Other tissues were frozen or preserved in ethanol 92%. We have also used two samples of *Lontra longicaudis* as outgroup.

DNA extraction and amplification

Total DNA from tissue and blood was extracted using phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol (Sambrook & Russel, 2001) after digestion with proteinase K. DNA concentration was estimated through visual evaluation of the band resulting from electrophoresis of 5 μ L of DNA solution in 0.8% agarose gels stained with ethidium bromide. Various protocols were tested to extract the DNA from feces/mucus, such as the phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol, DNA Easy Qiagen Kit, QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen), and UltraClean DRY Soil DNA Kit for fecal samples (Gene Works). For extractions using feces/mucus, an average of 100-300 mg starting material was used after discarding the ethanol used for storage. For the majority of the extractions we used the protocol provided by the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). We weighted the fecal material in a 2 ml tube and placed it on ice, then added the ASL buffer, vortexed for 1 min and spun in the centrifuge for 1 min at full speed. The supernatant was transferred into a new 2 ml tube and the pellet was discarded. Next, an InhibitEX tablet (Qiagen) was added to each sample and vortexed immediately for 1 min until the tablet was completely suspended. The suspension was incubated for 1 min at room temperature. Samples were then centrifuged for 3 min at full speed, all the supernatant was transferred into a new 1.5 ml tube and the pellet discarded. The supernatant was incubated for 10 min at 70° C with Proteinase K and AL buffer (Qiagen). Absolute ethanol was added to the lysate and vortexed. Spin filtering was performed until all extract has been filtered. Two washes with buffers AW1 and AW2 (Qiagen) were respectively performed and DNA was finally dissolved in 200 μ l buffer AE (Qiagen).

The CR and Cyt-b partial segments of about 900 bp were amplified using the specific primers XL14733 and H16498 designed by Kocher *et al.* (1989). PCR reaction mixes of 12.5 μ L included 2 μ L of genomic DNA (~ 40 ng), 1 U of *Taq* polymerase (Phoentria[®]), 200 μ M of dNTPs, 1X Tris-KCl buffer with 1.5 mM MgCl₂ (Phoentria[®]) and 0.5 μ M of each primer. The amplification program consisted of 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 57°C, 2 min at 72°C and a final extension step of 10 min at 72°C.

We also amplified a 628 bp segment of the COI gene using the primers HCO2198 and LCO1490 described by Folmer *et al.* (1994). The PCR program cycle for these primers was the same as described above, except that the annealing temperature was changed to 40°C. After amplification, PCR products were checked by running in 0.8% agarose gels and staining with ethidium bromide. Negative controls, where template DNA was omitted, were used in all amplification runs. Only products with a single and well-defined band were used in the sequencing reactions. Before sequencing, PCR products were cleaned by precipitation using 20% polyethyleneglicol (PEG 8000). Sequencing reactions were performed using either of the primers described above, and were conducted in a final volume of 10 μ L containing: 2-4 μ L of purified PCR product, 1-3 μ L of ultrapure water, 1 μ L of one primer (5 μ M) and 4 μ L of sequencing kit (ET DYE Terminator Kit, Amersham Biosciences). The sequencing program consisted of 35 cycles of 95°C for 25 s, 55°C for 15 s, 60°C for 3 min. Then, sequencing products were precipitated with ammonium acetate and ethanol, dried at room temperature, dissolved with formamide-EDTA and run in the automatic sequencer MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences).

To obtain high quality mtDNA sequences the following measures were undertaken: *i*) for each individual, at least two different PCR products were used in the

sequencing reactions until, at least, two high quality and independent sequences could be obtained; *ii*) chromatograms were carefully checked for ambiguities; *iii*) consensus sequences were obtained with forward and reverse sequences; *iv*) CR, Cyt-b and COI sequences produced in the present study were aligned and also compared with others obtained from the GenBank, including sequences of other mustelid species, to check for the presence of any stop or nonsense codons, as well as alignment gaps.

Data analysis

Consensus sequences (GenBank accession numbers: EF488532 -EF488561 and EF491161-EF491181) were obtained and checked through the programs Phred v. 0.20425 (Ewing *et al.*, 1998), Phrap v. 0.990319 (<http://www.phrap.org>) and Consed 12.0 (Gordon *et al.*, 1998). Alignments were done using Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), with manual edition whenever it was necessary. Genetic distances between different haplotypes were estimated using the Kimura 2-parameter (K2p) substitution model (Nei & Kumar, 2000), and used to build a Neighbor Joining (NJ) tree using the program MEGA 3.0 (Kumar *et al.*, 2004). Branch support was checked with 10,000 bootstrap replicates. Genealogical relationships were also investigated by constructing a haplotype network using the Median Joining method through the program Network 4.0 (Bandelt *et al.*, 1999). Haplotype (h) and nucleotide diversity (π) were estimated using the program DnaSP (Rozas & Rozas 1997), and average nucleotide diversity between populations was calculated with the program MEGA 3.0. Other diversity indexes, analysis of molecular variance (AMOVA), population pairwise distances (F_{st} or Φ_{ST}) and an exact test of population differentiation were computed using ARLEQUIN 3.0 (Schneider *et al.*, 2000). The significance of the population pairwise distances was evaluated by 1,023 permutations of the original data and the significance of the exact

test of population differentiation was assessed by 10,000 Markov chain steps. Most of the analyses in Arlequin were performed using two groupings of populations: the suggested subspecies divided in populations of the Amazon and Pantanal, or comparing all local geographic populations defined by eight Amazon sites and a single site in Pantanal (Fig. 1).

RESULTS

DNA extraction from feces

The material derived from feces has a very low amount of cells as DNA source as well as some contaminants, which makes the extraction process very difficult. Different protocols were tested until satisfactory results and high quality sequences were obtained for many individuals. The best results were achieved using the kits QIamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) and UltraClean DRY Soil DNA Kit for fecal samples (Gene Works). Comparing the dry feces with mucus from fresh feces, the later one presented a greater DNA yield and also a higher amplification success (results not shown). The amplified products showed the expected length and good quality when compared to products derived from other tissue extractions.

CR and Cyt-b

High quality sequences of 816 bp long including partial segments of the control region and Cytochrome b were generated and analyzed for 30 individuals. We identified 21 variable sites and 12 haplotypes (Table 2). Nucleotide diversity (π) found for *P. brasiliensis* was 0.006 for the two mtDNA regions combined (CR + Cyt-b). The haplotype diversity index found was $h=0.867\pm 0.038$ and the average number of nucleotide differences was $k=5.25$. We observed a high number of haplotypes in

relation to the sample size (Amazon: n=22 and 10 haplotypes; Pantanal: n=8 and 2 haplotypes), which suggests the existence of a much larger number of non-sampled haplotypes. The phylogeographic analysis made through Network (Fig. 2) revealed a distribution with some geographic correlation. Individuals from Pantanal (n=8) presented two distinct haplotypes (Hap_1 and Hap_10) differentiated from each other by one mutation, and Hap_1 also included one individual from the Amazon. Eight out of twelve haplotypes encountered were represented by a single individual. The most frequent haplotypes were Hap_1 and Hap_4, occurring in 50% of the samples. The individuals from Amazon River basin (n=22) showed 10 haplotypes, including individuals from Roraima (RR), with difference among all haplotypes varying from one to sixteen mutations (Fig. 2). The overall ϕ_{st} value calculated across all local populations divided in two subspecies groups was 0.737 ($P < 0.00001$), indicating a high and statistically significant population structure (Table 2). Although AMOVA analysis using this dataset indicated that most of the variation occurs among groups (Table 2), it is non-significant ($P > 0.05$), a result that is also observed using conventional F_{st} analysis and other datasets (Table 3). However, a large and significant variation is observed among and within populations (Table 2). Indeed, if we consider *P. brasiliensis* as one group of populations, we observe a high and significant ϕ_{st} ($P < 0.0000$) displaying 65% of variation occurring among populations (results not shown). Phylogenetic analyses were made with the two regions of the mtDNA combined (CR + Cyt-b), using sequences of the Neotropical river otter (*Lontra longicaudis*) as outgroup (Fig 3a). One individual from the Amazon (Rio Negro site) shared a haplotype (Hap_1) with seven individuals from Pantanal. Although presenting some geographic clustering, we found no reciprocal monophyly for the proposed subspecies in this tree. However, the Pantanal population appears to be a divergent subgroup of the Amazon diversity.

The pairwise F_{st} and ϕ_{st} 's (Table 3) as well as the exact test for population differentiation (results not shown) were shown to be significant ($P < 0.05$) for all comparisons between Pantanal and Amazonian populations that presented $n > 3$ individuals. However, we also observed a significant ϕ_{st} between two Amazonian populations, Negro river and Balbina lake.

COI and CR+Cyt-b+COI

The sequencing of a 628 bp segment of the COI gene allowed the identification of four haplotypes and four variable sites (Table 2). The value found for haplotype diversity was $h = 0.598 \pm 0.003$, and for nucleotide diversity $\pi = 0.001$. All the individuals from Pantanal presented the same haplotype (H_A) that is shared with some individuals ($n = 4$) from the Amazon. Haplotypes H_A and H_B represented 80% of all samples (data not shown). Considering only the apportionment of diversity produced with COI data (Table 2) we observed a low and non-significant differentiation between Amazon and Pantanal groupings, which was also observed with the CR+Cyt-b+COI (1444 bp) dataset (Table 2). The non-significant among group variation appeared also when excluding from AMOVA all populations with $N < 3$ (results not shown). However, for all datasets (Table 2) the among populations apportionment of variance appeared high and significant.

Phylogeny of the complete set of mtDNA sequences

Phylogenetic trees were also constructed for data including CR+Cyt-b+COI sequences, using *Lontra longicaudis* as outgroup (Fig. 3b). Although in the CR+Cyt-b+COI NJ tree, the Pantanal haplotypes were apparently monophyletic, this can be explained by the absence in this tree of an individual from the Amazon that was not

included for the lack of COI data. This individual shared a CR+Cyt-b haplotype with Pantanal individuals (Fig. 3a). In both analyses (Fig 3) Pantanal haplotypes appears as a subgroup of the Amazon population; however the suggested subspecies do not form reciprocal monophyletic groups that should be seen as separate phylogenetic clades, which is not the case.

Discussion

Reliable use of feces for genetic analyses is particularly important in studies where sampling is difficult due to animal size, behavior, conservation status and ethical issues. The use of noninvasive samples such as feces and mucus for molecular genetic analyses has proven to be an informative DNA source to analyze *P. brasiliensis* populations.

In this study we have characterized the mtDNA diversity of giant otter populations in Brazil. The value found for nucleotide diversity ($\pi = 0.006$) in the species for the two DNA segments combined (CR + Cyt-b) was moderate. Using only control region (342 bp) data we found a diversity value ($\pi = 0.012$) that was similar to other endangered mustelids, like the European polecat ($\pi = 0.009$, Davidson *et al.*, 2001) and the European mink ($\pi = 0.012$, Michaux *et al.*, 2005). The average pairwise nucleotide diversity calculated by MEGA 3.0 between Amazon and Pantanal populations (0.9%) was much lower than values previously used (Avice, 1994) to indicate a possible limit for species (5-7%) and subspecies (2%) differentiation in mammals.

The significant pairwise distances (Table 3) and exact tests of differentiation found between Pantanal and some Amazonian populations is an important data supporting the subspecies division. This is even more compelling when considering that only Amazonian populations with $N < 3$ presented non-significant differentiations with

Pantanal, but a significant differentiation was also observed between at least two Amazonian sites. However, the AMOVA analysis and the sharing of haplotypes (between Negro river in the Amazon basin and Pantanal) as well as the absence of reciprocal monophyly do not corroborate with the existence of two evolutionarily separate subspecies occurring in the Amazon and Pantanal. The observation of high population differentiation data and the great number of observed haplotypes, considering also the relatively small sample size, indicates that expansion of sampling areas is of extreme importance in further studies, not only to characterization of new haplotypes but also to provide more robust data about highly heterogeneous giant otter populations in Brazil and other South American countries.

Thus, *P. brasiliensis* populations seem to be geographically structured, but do not agree well with the suggested subspecies division, at least in our dataset. Although our results must be considered with care due to using only mtDNA, the sampling is representative of a large geographic distribution including both areas of occurrence for the proposed subspecies, and some important results were highly significant among populations, at least concerning the geographic structure of females. Nevertheless, the existence of a complex geographic structure due to differentiation of local populations should be further considered in conservation management.

In the near future, nuclear markers such as microsatellites or intron sequences may present limitations to be analyzed in DNA extracted from fecal material, but they may be also added to further characterize the genetic diversity of the giant otter populations. For now, our data indicates that conservation programs of the giant otter should focus on preserving all local populations, which seems not to cluster in major geographic groups but still retain a large heterogeneity.

Acknowledgments

DMG was supported by CAPES (Brazil), FRS, MM and FWR were supported by CNPq (Brazil). This project received grants from CNPq (Proc. 47.6015/2004-9) and Fundação o Boticário de Proteção à Natureza (FBPN), both from Brazil. We are grateful to R. Redondo, UFMG, for technical help and to Stella Maris Lazzarini from CPPMA, Manaus Energia S.A. for providing some samples. We also thank for the comments of two anonymous referees that improved the quality of this manuscript.

REFERENCES

- AVISE, J. C. 1994. Molecular markers, natural history, and evolution. New York: Chapman & Hall.
- BANDELT, H-J., FORSTER, P. & RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol., v.16, p. 37-48.
- CARTER, S. K. & ROSAS, F. C. W. 1997. Biology and Conservation of the Giant Otter, *Pteronura brasiliensis*. Mamm. Rev., v.27 (1), p.1-26.
- DAVIDSON, A., BIRKS J. D. S., BROOKES R. C., MESSENGER J. E. & GRIFFITHS H. I. 2001 Mitochondrial phylogeography and population history of pine martens *Martes martes* compared with polecats *Mustela putorius*. Mol. Ecol., v.10, p.2479–2488.
- DUPLAIX, N. 1980. Observations on the ecology and behaviour of the giant otter *Pteronura brasiliensis* in Suriname. Rev. Ecol. (Terre Vie), v.34, p. 495-620.
- EISENBERG, J. F. 1989. Mammals of the Neotropics. The northern Neotropics: Panama, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois v.1, p.1–449.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDI, M., & GREEN, P. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using Phred I: accuracy assessment. Genome Res., v. 8, p. 175-185.
- FOSTER-TURLEY, P. 1990. Otters in captivity. In Otters: an action plan for their conservation (P. Foster-Turley, S. Macdonald, and C. Mason, eds.). Proceedings of the International Union for the Conservation of Nature, Otter Specialist Group Meeting, Gland, Switzerland. p. 17–19.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J.D. & BRISCOE, D.A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press: Cambridge UK. 617 pp.

- FRANTZEN, M. A. J., SILK J. B., FERGUSON, J. W. H., WAYNE, R. K., & KOHN, M. H. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. Mol. Ecol. v.7, p.1423–1428.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. v.3, p. 294–299.
- GAGNEUX, P., BOESCH, C. & WOODRUFF, D. S. 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. Mol. Ecol. v.6, p. 861–868.
- GORDON, D., ABAJIAN C., & GREEN, P. 1998. "Consed: a graphical tool for sequence finishing." Genome Res. v. 8, p.195-202.
- GROENENDIJK, J., HAJEK, F. & SCHENCK, C. 2004. *Pteronura brasiliensis*. In: IUCN 2004. 2004 IUCN Red List of Threatened Species [<http://www.redlist.org> Downloaded on 27 April 2005]
- HARRIS, C.J. 1968. Otters: a study of the recent Lutrinae. Weidenfeld & Nicolson, London.
- IUCN, 2000. 2000 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Gland, Switzerland, xviii + 61 pp.
- KOCHER, T. D., THOMAS, W. K., MEYER, A., EDWARDS, S.V., PAABO, S., VILLABLANCA, F. X., & WILSON, A. C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v.86, p. 6196-6200.

- KVIST, L., MARTENS, J., AHOLA, A. & ORELL, M. 2001. Phylogeography of a Palaearctic sedentary passerine, the willow tit (*Parus montanus*). J. Evol. Biol., v. 14, p. 930-941.
- KOHN, M. H. & WAYNE R. K., 1997. Facts from feces revisited. Trends. Ecol. Evolut.v.12, p.223–227.
- KUMAR, S., TAMURA, K., & NEI, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform. v. 5, p.150-163.
- LITVAITIS, M. K. & LITVAITIS J.A., 1996. Using mitochondrial DNA to inventory the distribution of remnant populations of New England cottontails. Wildl. Soc. Bull. v.24, p.725–730.
- MICHAUX, J. R., HARDY O. J., JUSTY, F. *et al.*, 2005. Conservation genetics and population history of the threatened European mink *Mustela lutreola*, with an emphasis on the west European population. Mol. Ecol., v.14, p. 2373–2388.
- NEI M. & KUMAR, S. 2000. Molecular clocks and linearized trees. In: Nei M, Kumar S (eds) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, p. 187–206.
- PALOMARES, F., GODOY, J. A ., PIRIZ, A., O'BRIEN, S.J. & W. E. JOHNSON, 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. Mol. Ecol. v. 11, p.2171-2182.
- RENGGER, J. R. 1830. *Naturgeschichte der Säugetiere von Paraguay*. Basel: Schweighausersche. p.128-138.
- RIDLEY, M. 2006. *Evolução*. Porto Alegre: Artmed, 3.ed. p.401-403

- RHYMER, J. M., FAIN, M. G., AUSTIN, J. E., JOHNSON, D. H. & KRAJEWSKI, C. 2001. Mitochondrial phylogeography, subspecific taxonomy, and conservation genetics of sandhill cranes (*Grus Canadensis*; Aves:Gruidae). Conserv. Genet.; v.2, p. 203-218.
- ROSAS, F.C.W. 2004. Ariranha, *Pteronura brasiliensis* (Carnivora:Mustelidae). Pp. 265-269. In: R. Cintra (ed.). História natural, ecologia e conservação de algumas espécies de plantas e animais da Amazônia. EDUA/INPA, Manaus, 333 pp.
- ROSAS, F.C.W., d’AFFONSECA NETO, J.A. & de MATTOS, G.E. in prep. Anesthesiology, hematology and serum chemistry of giant otters, *Pteronura brasiliensis* (Carnivora, Mustelidae). Submitted for publication to the *Veterinary Record*.
- ROZAS, J. & ROZAS, R. 1997. DnaSP, version 2.0: a novel software package for molecular population genetic analysis. Comput. Appl. Biosci., v.13, p.307-311.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3.Ed. CSHL press, New York, U.S.A.
- SCHNEIDER, S., ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. 2000. Arlequin ver 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- TABERLET, P., WAITS, L. P. & LUIKART G, 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. Trends Ecol. Evolut. v.14, p.323–327.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G. 1997. The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic. Acids. Res., v.24, p. 4876-4882.

VILAÇA, S. T., LACERDA, D. R., SARI, E. R. & SANTOS, F. R. 2006. DNA-based identification applied to *Thamnophilidae* (Passeriformes) species: the first barcodes of Neotropical birds. Revs. Bras.Ornit., v. 14, p. 7-13.

ZINK, R. M. 2004. The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. Proc. R. Soc. Lond. B v. 271, p. 561–564.

ZINK, R. M., WELLER, S. J. & BLACKWELL, R. C. 1998. Molecular phylogenetics of the avian genus *Pipilo* and a biogeographic argument for taxonomic uncertainty. Mol. Phylogenet. Evol., v.10, p. 191-201.

Table 1- List of samples analyzed in the present study, their respective source, geographic origin and haplotype (CR+Cyt-b).

| ID | Sample | Geographic region | Haplotype |
|-------|------------|--------------------------------|-----------|
| Pb 01 | dried pelt | Negro river, Amazonas State | Hap_1 |
| Pb 02 | skin | Negro river, Amazonas State | Hap_2 |
| Pb 03 | muscle | Pantanal | Hap_1 |
| Pb 05 | tissue | Roraima State | Hap_3 |
| Pb 06 | tissue | Roraima State | Hap_4 |
| Pb 07 | tissue | Jauaperi river, Roraima State | Hap_5 |
| Pb 08 | blood | Tefé lake, Amazonas State | Hap_6 |
| Pb 09 | blood | Maués river, Amazonas State | Hap_7 |
| Pb 10 | blood | Nhamundá river, Roraima State | Hap_8 |
| Pb 11 | blood | Roraima State | Hap_4 |
| Pb 13 | skin | Negro river, Amazonas State | Hap_9 |
| Pb 16 | skin | Negro river, Amazonas State | Hap_12 |
| Pb 17 | skin | Maués river, Amazonas State | Hap_4 |
| Pb 18 | skin | Uruá river, Amazonas State | Hap_11 |
| Pb 19 | skin | Jauaperi river, Amazonas State | Hap_4 |
| Pb 20 | feces | Pantanal | Hap_10 |
| Pb 23 | feces | Pantanal | Hap_1 |
| Pb 24 | feces | Pantanal | Hap_1 |
| Pb 30 | feces | Pantanal | Hap_1 |
| Pb 36 | feces | Pantanal | Hap_1 |
| Pb 38 | kidney | Pantanal | Hap_1 |
| Pb 40 | feces | Pantanal | Hap_1 |
| Pb 49 | feces | Balbina lake, Amazonas State | Hap_12 |
| Pb 50 | feces | Amazonas State | Hap_12 |
| Pb 52 | feces | Balbina lake, Amazonas State | Hap_5 |
| Pb 53 | footpad | Abonari river, Amazonas State | Hap_5 |
| Pb 54 | footpad | Balbina lake, Amazonas State | Hap_12 |
| Pb 56 | feces | Amazonas State | Hap_4 |
| Pb 57 | feces | Balbina lake, Amazonas State | Hap_4 |
| Pb 58 | feces | Balbina lake, Amazonas State | Hap_4 |

Table 2- Population and sequence data, and AMOVA (ϕ_{ST} with Tamura-Nei) results generated by Arlequin. The nine populations (see Figure 1) were grouped according to the suggested subspecies division. CR+Cyt-b+COI data set was analyzed for only seven Amazonian populations (excluding Maués).

| | CR+Cyt-b | COI | CR+Cyt-b+COI |
|------------------------------|----------|-------|--------------|
| N (population size) | 30 | 24 | 18 |
| Number of loci (nucleotides) | 816 | 628 | 1444 |
| Number of polymorphic sites | 21 | 4 | 24 |
| Number of haplotypes | 12 | 4 | 11 |
| Overall Φ_{ST} | 0.737 | 0.799 | 0.836 |
| AMOVA - % among groups | 48.11* | 6.60* | 29.18* |
| AMOVA - % among populations | 25.63 | 73.38 | 54.44 |
| AMOVA - % within populations | 26.26 | 20.03 | 16.38 |

* Non-significant variance component ($P>0.05$)

Table 3- Pairwise F_{st} (below diagonal) and ϕ_{st} (above diagonal) values calculated based on Cyt-b + CR data sets

| | | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Pantanal | x | 0.580* | 0.972 | 0.949 | 0.972 | 0.901* | 0.958 | 0.860* | 0.964 |
| Negro river - AM | 0.306* | x | 0.484 | 0.655 | -0.077 | 0.236* | -0.650 | 0.085 | -0.560 |
| Uruá river - AM | 0.750 | 0.000 | x | 1.000 | 1.000 | 0.872 | 0.100 | 0.777 | 0.487 |
| Nhamundá river - AM | 0.750 | 0.000 | 1.000 | x | 1.000 | 0.800 | 1.000 | 0.640 | 0.100 |
| Abonari river -AM | 0.750 | 0.000 | 1.000 | 1.000 | x | 0.167 | 1.000 | 0.729 | 0.100 |
| Balbina lake - AM | 0.529* | -0.024 | 0.286 | 0.286 | 0.167 | x | 0.655 | -0.019 | 0.544 |
| Maués river - AM | 0.750 | 0.000 | 0.100 | 0.100 | 0.100 | 0.285 | x | 0.315 | 0.100 |
| Jauperi river - AM | 0.034* | 0.300 | 0.300 | 0.300 | 0.125 | 0.009 | 0.300 | x | 0.685 |
| Tefé lake - AM | 0.750 | 0.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.286 | 1.000 | 0.300 | x |

* Significant pairwise distances ($P < 0.05$)

Figure legends

Figure 1 – Sample localities for giant otter subpopulations in Brazil, on the Amazon River basin (white dots) and Pantanal (black dot). In the Amazon, sampling sites are marked with numbers: 1- Negro river, 2 – Tefé lake, 3- Abonari river, 4- Uruá river, 5- Jauaperi river, 6- Nhamundá river, 7- Balbina lake, 8- Maués river.

Figure 2 – Phylogeographic network built by the median joining algorithm with the segment containing Cyt-b and CR sequences. Black sectors correspond to Pantanal population and white to Amazon populations.

Figure 3 – Neighbor joining trees with the different sets of mtDNA sequences. a) CR + Cyt-b; and b) CR + Cyt-b + COI *. Black sectors correspond to Pantanal population and white to Amazon populations. Bootstrap values higher than 50% are shown on the branches.

* Haplotype CR+Cyt-b_Hap_3 represented by one individual was not included on this tree because COI data could not be generated

Fig. 1

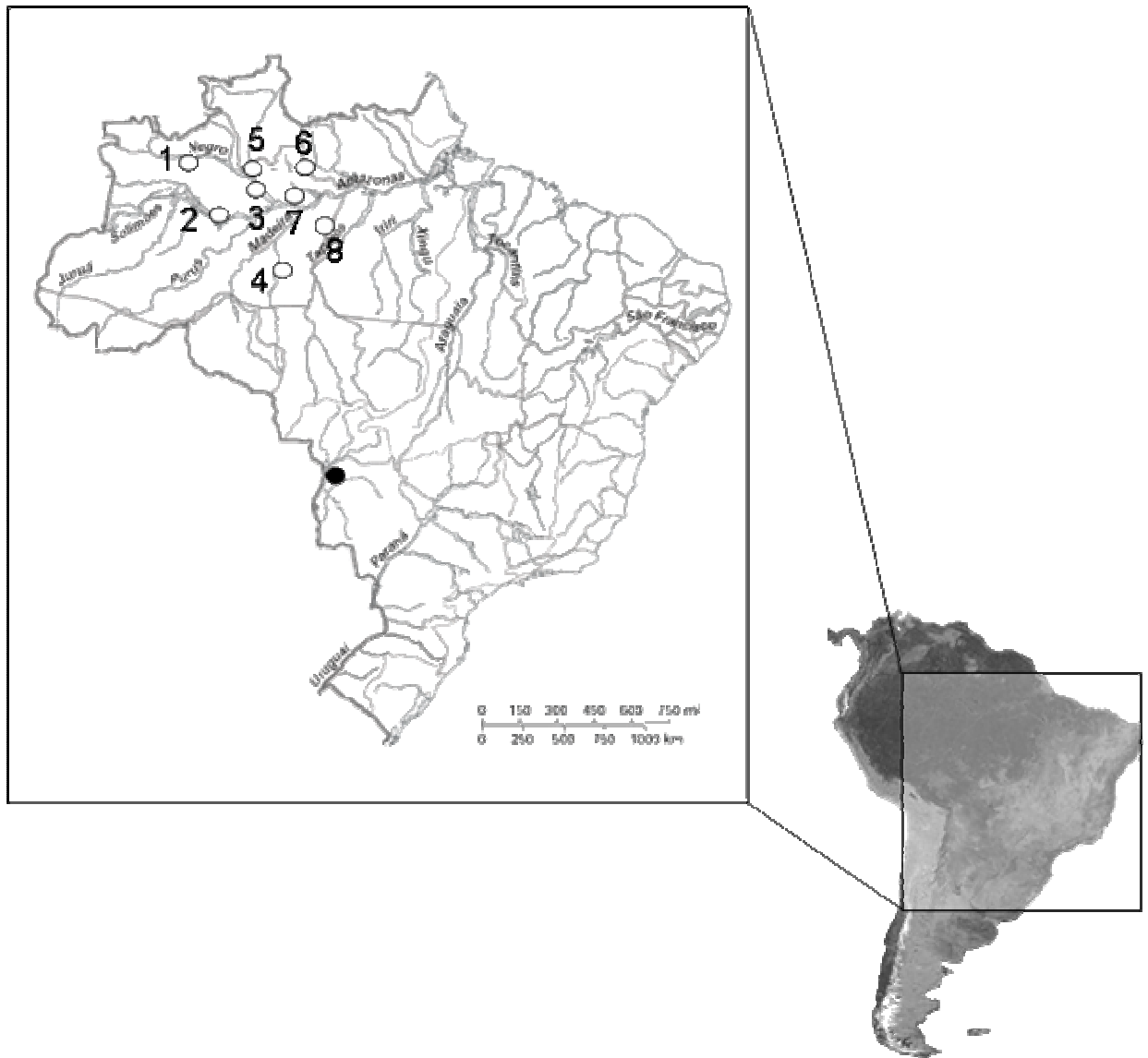


Fig. 2

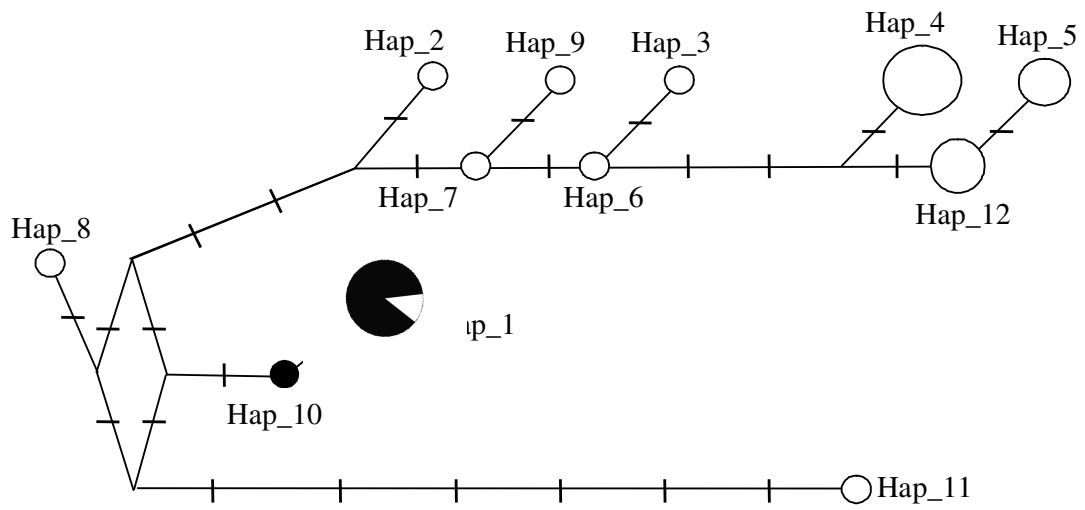
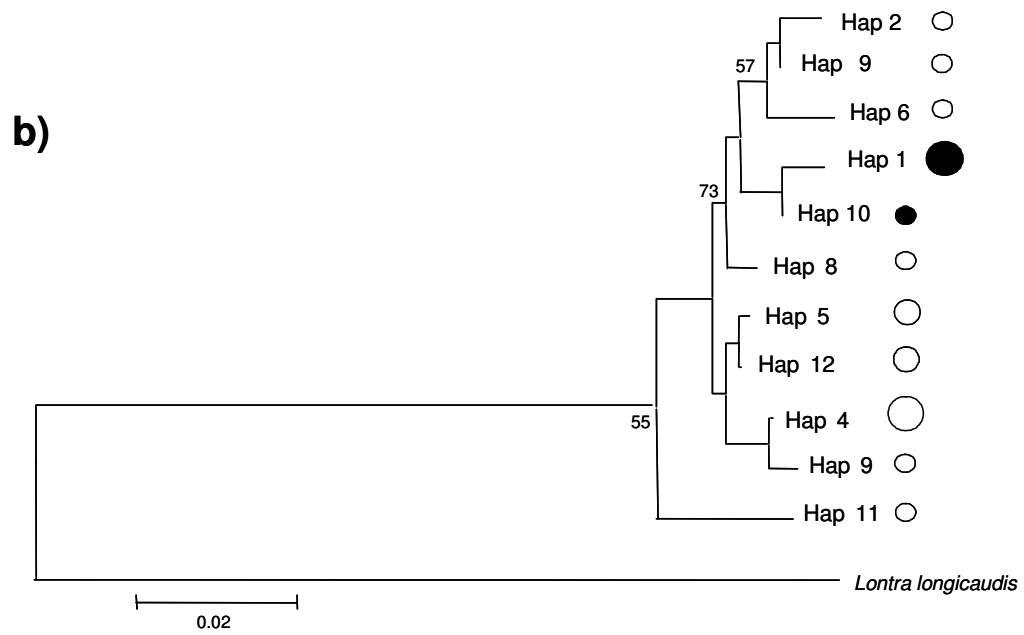
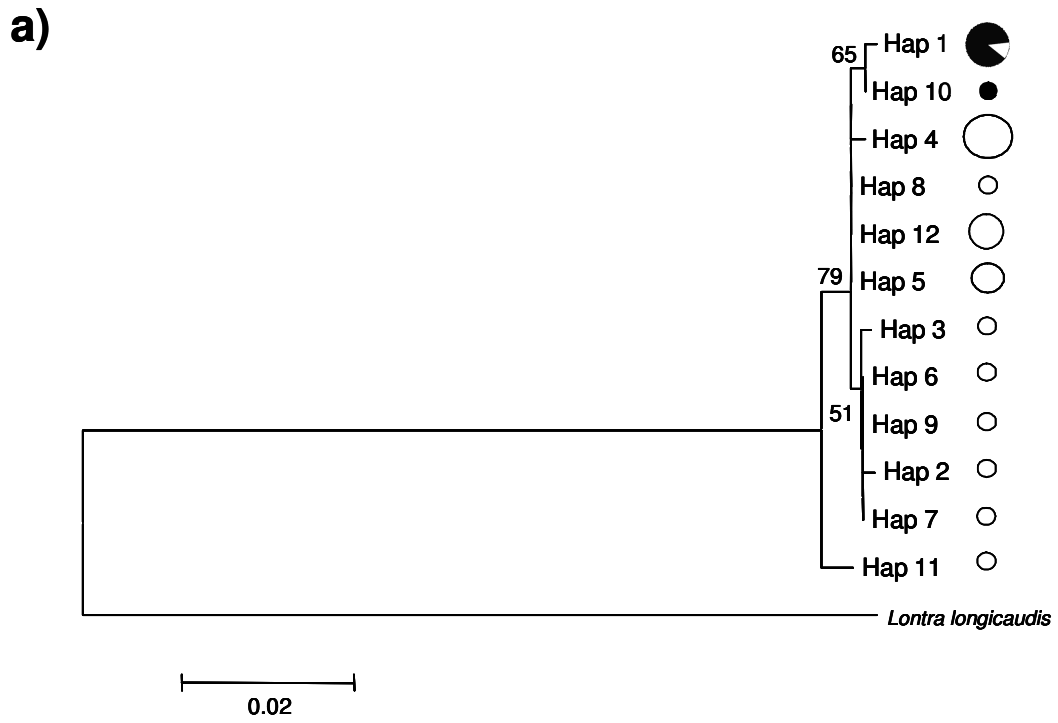


Fig. 3



DISCUSSÃO GERAL

Métodos não-invasivos em estudos com *P. brasiliensis*

Os resultados obtidos a partir da extração de DNA de fezes se mostraram eficientes para o estudo genético de *P. brasiliensis*. O kit de extração de fezes que se mostrou mais eficiente foi o QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen), com algumas modificações no protocolo, como o aumento de *starting material* até 500mg e a diluição do DNA em menor volume (100-150ul) de tampão AE. As amplificações por PCR tiveram uma qualidade superior quando o material utilizado era fresco e quando o muco não se encontrava misturado com as fezes. Os produtos da amplificação apresentaram bandas fortes no gel de agarose 0,8%, apenas um pouco mais fracas comparadas as bandas de DNA de tecido e sangue.

A otimização de protocolos para extração de DNA por métodos não-invasivos é de extrema importância para estudos genéticos de espécies ameaçadas e mais especificamente espécies com dificuldades práticas de amostragem devido à baixa densidade populacional, comportamento e dificuldade de captura, como é o caso da ariranha e outros carnívoros de grande porte.

Nossos resultados demonstraram a viabilidade de estudos genéticos a partir de fezes de ariranha. A presença do muco viscoso livre de restos alimentares facilitou o processamento das amostras e a obtenção de DNA de boa qualidade, entretanto, também obtivemos DNA de qualidade um pouco inferior, mas capaz de gerar sequências, a partir de fezes que foram coletadas secas, sem a presença do muco.

Estruturação genética populacional de *P. brasiliensis*

Neste estudo caracterizamos geneticamente pela primeira vez, através do DNA mitocondrial, populações naturais de *P. brasiliensis* da bacia Amazônica e dos rios Paraguai e Paraná no Pantanal. Estudos morfológicos feitos anteriormente com essas populações (Harris, 1968; Duplaix, 1980) sugeriram a existência de duas subespécies distintas: *Pteronura brasiliensis brasiliensis*, com ocorrência na bacia Amazônica, e *Pteronura brasiliensis paranensis*, ocorrendo no Pantanal.

Entretanto, até o momento, os únicos estudos genéticos feito incluindo esta espécie foram análises filogenéticas da família Mustelidae como um todo, ou da subfamília Lutrinae (Koepfli & Wayne 1998; Koepfli & Wayne 2003; Marmi *et al.*, 2004). Contudo, nenhum estudo havia sido feito com populações de ariranha considerando

os aspectos genéticos e populacionais e tampouco estudos que corroborem geneticamente com a divisão em duas subespécies.

Nossos resultados mostraram um valor moderado de diversidade nucleotídica para as populações de ariranha (0,6%) utilizando segmentos combinados da região controle e do citocromo b do mtDNA. Analisando somente a região controle para efeito de comparação, o valor obtido (1,2%) foi similar aos resultados obtidos em estudos com outros mustelídeos ameaçados de extinção (Davidson et al., 2001; Michaux et al. 2005). A diversidade nucleotídica média par-a-par (0,9%) entre as populações da Amazônia e do Pantanal foi bem menor que valores utilizados por Avise (1994), para indicar um possível limite para subespécies (2%) em mamíferos.

A análise de NJ, feita no programa MEGA, com todos os haplótipos de *P. brasiliensis* produzidos neste estudo, demonstrou correlação geográfica entre os haplótipos e monofilia de *P. brasiliensis*, além disso, pode-se observar que dois indivíduos da bacia amazônica se agruparam dentro de um haplótipo de indivíduos do Pantanal (Fig. 2), utilizando as regiões RC e Cytb do mtDNA combinadas.

As árvores neighbor-joining assim como a *network* evidenciaram estruturação geográfica dos haplótipos e valores significativos de distancia par-a-par foram encontrados entre algumas população da Amazônia e do Pantanal, suportando a divisão de subespécies. Entretanto, o compartilhamento de haplótipos, as análises de AMOVA e a ausência de monofilia recíproca não corroboram com a existência de duas subespécies evolutivamente separadas ocorrendo nestas duas regiões.

O alto valor de divergência entre as sequências e o grande número de haplótipos observados, considerando o tamanho amostral relativamente pequeno, indica que uma maior amostragem em toda distribuição de *P. brasiliensis* deve ser feita em estudos posteriores, não somente para caracterizar novos haplótipos, como também para melhor compreensão das relações e dos padrões filogeográficos das populações de ariranhas no Brasil e outras regiões da América do Sul.

Nossos resultados permitiram observar que as populações de ariranhas analisadas possuem uma estruturação genética complexa, mas não corroboram com a existência de duas subespécies evolutivamente distintas. Embora nossos dados tenham sido produzidos somente com mtDNA, são representativos de uma grande área de distribuição geográfica e demonstram uma diferenciação significativa entre populações locais.

Programas de conservação e manejo das ariranhas devem levar em consideração a alta heterogeneidade presente entre as populações e concentrar os esforços preservando todas as populações locais, que apesar de não se agruparem em unidades evolutivamente distintas ainda retém uma alta diversidade genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVISE J. C., ARNOLD J., BALL R. M., BERMINGHAM E., LAMB T., NEIGEL J. E., REEB C. A., SAUNDERS N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annu Rev Ecol Syst. v.18 p.489–522.
- AVISE J. C., HAIG S. M., RYDER O. A., LYNCH M., GEYER C. J. 1995. Descriptive genetic studies: applications in population management and conservation biology. In: Ballou, J.D. e Fose, T.J. (Ed.) Population management for survival and recovery. Columbia University Press, New York. pp. 183-244.
- AVISE, J. C. 2000. Phylogeography- The history and formation of the species. HARVARD University Press, Cambridge, Massachusetts.
- BAKER, C. S., PERY, A., BANNISTER J. L., WEINRICH, M. T., ABERNETHY R. B., CALAMBOKIDIS, K., LIEN, J., LAMBERTSEN R. H., URNA-RAMIREZ, J., VASQUEZ, O., CLAPHAM P.J., ALLING, A., O'BRIEN S. J., PALUMBI S. R. 1993. Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. PNAS. v.90 p. 8239-8243.
- BATES, J. M., HACKETT, S. J., GOERCK, J. 1999. High levels of mitochondrial DNA differentiation in tow lineages of antbirds (*Drymophila* and *hypocnemis*). *Auk*, v.116, p. 1093-1106.
- BENETTON, M. L. F. M., ROSAS, F. C.W. & COLARES, E. P. 1990. Aspectos do hábito alimentar da ariranha (*Pteronura brasiliensis*) na Amazônia brasileira. In: Programa y Resumenes, 4ª Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, Valdivia, Chile, p.12-15.
- CARTER, S. K. & ROSAS, F. C. W. 1997. Biology and Conservation of the Giant Otter, *Pteronura brasiliensis*. Mamm. Rev., v.27 (1), p.1-26.
- CARTER, S. K., ROSAS, F. C. W., COOPER, A. B. & CORDEIRO-DUARTE, A. C. O. 1999. Consumption rate, food preferences and transit time of captive giant otter, *Pteronura brasiliensis*: Implications for the study of wild populations. *Aquatic Mammals*. v. 25(2) p.79-90.
- CRANDALL, K. A., BININDA-EMONDS, O. R. P., MACE, G. M., WAYNE, R. K. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. Trends Ecol. Evol. v.15 p. 290-295.

- DAUGHERTY, C. H., CREE, A., HAY, J.M., THOMPSON, M. B. 1990. Neglected taxonomy and continuing extinctions of tuatara (*Sphenodon*). Nat. v.347 p.177–179.
- DAVIDSON, A., BIRKS J. D. S., BROOKES R. C., MESSENGER J. E. & GRIFFITHS H. I. 2001 Mitochondrial phylogeography and population history of pine martens *Martes martes* compared with polecats *Mustela putorius*. Mol. Ecol., v.10, p.2479–2488.
- DRAGOO, J., HONEYCUTT, R. 1997. Systematics of mustelid-like carnivores. J. Mammal. v.78, p. 426-443.
- DUPLAIX, N. 1980. Observations on the ecology and behaviour of the giant otter *Pteronura brasiliensis* in Suriname. Rev. Ecol. (Terre Vie), v.34, p. 495-620.
- ESTES, J. A. 1989. Adaptations for aquatic living by carnivores. In *Carnivore behavior, ecology, and evolution*. Gittleman, J. L. (Ed.). Ithaca, NY: Cornell University Press. p.242-282.
- FERNANDO, P., VIDYA, T. N. C., PAYNE, J., STUEWE, M., DAVISON, G. 2003. DNA Analysis Indicates That Asian Elephants Are Native to Borneo and Are Therefore a High Priority for Conservation. PLoS Biol. v.1(1) p. e6.
- FLAGSTAD, O., ROED, K., STACY J. E., JAKOBSEN K. S. 1999. Reliable noninvasive genotyping based on excremental PCR of nuclear DNA purified with a magnetic bead protocol. Mol. Ecol. v. 8 p. 879-883.
- FLYNN, J., FINARELLI J., ZEHR S., HSU J., NEDBAL M. 2005. Molecular phylogeny of the Carnivora (Mammalia): Assessing the impact of increased sampling on resolving enigmatic relationships. Syst. Biol. v.54, p. 317-337.
- FOSTER-TURLEY, P. 1990. Otters in captivity. In *Otters: an action plan for their conservation* (P. Foster-Turley, S. Macdonald, and C. Mason, eds.). Proceedings of the International Union for the Conservation of Nature, Otter Specialist Group Meeting, Gland, Switzerland. p. 17–19.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J.D. & BRISCOE, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press: Cambridge UK. 617 pp.
- FRANTZEN, M. A. J., SILK J. B., FERGUSON, J. W. H., WAYNE, R. K., & KOHN, M. H. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. Mol. Ecol. v.7, p.1423–1428.
- FULTON, T. L., STROBECK, C. 2006. Molecular phylogeny of the Arctoidea (Carnivora): effect of missing data on supertree and supermatrix analyses of multiple gene data sets. Mol. Phylogenet. Evol. v.41(1) p.165-81.

- GAGNEUX, P., BOESCH, C. & WOODRUFF, D. S. 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. Mol. Ecol. v.6, p. 861–868.
- GEYER, C.J., RYDER, O.A., CHEMNICK, L.G., THOMPSON, E.A. 1993. Analysis of relatedness in the California condors from DNA fingerprints. Mol. Biol. Evol. v. 10 p. 571-589.
- HARRIS, C.J. 1968. Otters: a study of the recent Lutrinae. Weidenfeld & Nicolson, London.
- HEDRICK, P. W. 2001. Conservation genetics: where are we now? Trends Ecol. Evol. v. 16 p. 629-636.
- HEWITT, G.M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. Mol. Ecol. v.10 p. 537-549.
- IBAMA, 2004. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Plano de ação: Pesquisa e Conservação de mamíferos carnívoros do Brasil. Centro Nacional de Pesquisa e Conservação dos predadores Naturais-CENAP, São Paulo.
- IUCN, 2000. 2000 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Gland, Switzerland, xviii + 61 pp.
- KOEPFLI, K., WAYNE, R. 1998. Phylogenetic relationships of otters (Carnivora:Mustelidae) based on mitochondrial cytochrome b sequences. J. Zool. v. 246, p. 401-416.
- KOEPFLI, K., WAYNE, R. 2003. Type I Sts markers are more informative than cytochrome b in phylogenetic reconstruction of the Mustelidae (Mammalia: Carnivora). Syst. Biol., v. 52, p. 571-593.
- KVIST, L., MARTENS, J., AHOLA, A. & ORELL, M. 2001. Phylogeography of a Palaearctic sedentary passerine, the willow tit (*Parus montanus*). J. Evol. Biol., v. 14, p. 930-941.
- KOHN, M. H. & WAYNE R. K., 1997. Facts from feces revisited. Trends. Ecol. Evolut.v.12, p.223–227.
- LANDE, R. & SHANNON, S. 1996. The role of genetic variation in apaption and population persistence in a changing environment. Evol. v. 50 p. 434-437.
- LAIDLER, P.E. The behavioral ecology of the giant otter in Guyana. PhD Thesis, University of Cambridge, 1984.

- LITVAITIS, M. K. & LITVAITIS J.A., 1996. Using mitochondrial DNA to inventory the distribution of remnant populations of New England cottontails. Wildl. Soc. Bull. v.24, p.725–730.
- MARMI, J., LOPEZ-GIRALDEZ J., DOMINGO-ROURA, X. 2004. Phylogeny, evolutionary history and taxonomy of the Mustelidae based on sequences of the cytochrome b gene and a complex repetitive flanking region. Zool. Scripta. v. 33 p. 481-499.
- MICHAUX, J. R., HARDY O. J., JUSTY, F., FOURNIER, P., KRANZ, A., CABRIA, M., DAVISON, A., ROSOUX, R. & LIBOIS, R. 2005. Conservation genetics and population history of the threatened European mink *Mustela lutreola*, with an emphasis on the west European population. Mol. Ecol., v.14, p. 2373–2388.
- MILLER, P.S. 1995. Selective breeding programs for rare alleles: examples from the Przewalski's horse and California condor pedigrees. Conserv. Biol. v.9 p.1262-1273.
- MORITZ, C. 1994. Defining “evolutionary significant units” for conservation. Trends in Ecol. Evol. v. 9 p.373-375.
- NOWAK, R. M. 1999. Walker's Mammals of the World, volume 2. London: Johns Hopkins University Press.
- O'BRIEN, S. J., ROELKE, M.F., MARKER, L., NEWMAN, A., WINKLER, C.A., MELTZER, D., COLLY, L., EVERMANN, J.F., BUSH, M., WILDT, D.E. 1985. Genetic Basis for species vulnerability in the cheetah. Sci. v.227 p. 1428-1434.
- O'BRIEN, S. J. 1994b. The Cheetah's Conservation Controversy. Conserv. Biol. v. 8 p. 1153-1 155.
- PALOMARES, F., GODOY, J. A ., PIRIZ, A., O'BRIEN, S.J. & W. E. JOHNSON, 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. Mol. Ecol. v. 11, p.2171-2182.
- PARSONS, K. M., DALLAS, J. F., CLARIDGE, D. E., DURBAN J. W., BALCOMB K. C. lii, Thompson P. M., Noble L. R. 1999. Amplifying dolphin mitochondrial DNA from faecal plumes. Mol. Ecol. v. 8 (10) p. 1766–1768.
- RHYMER, J. M., FAIN, M. G., AUSTIN, J. E., JOHNSON, D. H. & KRAJEWSKI, C. 2001. Mitochondrial phylogeography, subspecific taxonomy, and conservation genetics of sandhill cranes (*Grus Canadensis*; Aves:Gruidae).Conserv. Genet.; v.2, p. 203-218.
- RYDER, O.A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. Trends Ecol. Evol. v. 1 p. 9-10.

- SANTOS F. R., GUIMARÃES P. E. M. & REDONDO R. A. F. 2002. Bancos de DNA: coleções estratégicas para estudos da biodiversidade. *Lundiana* v.3 p. 93-98.
- SYKES-GATZ, S. 2001. Husbandry and management of the giant otter (*Pteronura brasiliensis*). Münster: Schöling. ISBN 3-930962-03-9, 30 pp.
- TABERLET, P., WAITS, L. P. & LUIKART G, 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evolut.* v.14, p.323–327.
- TOMAS, W. M., LIMA BORGES, P.A., ROCHA, H. J. F., SÁ FILHO, R., KUTCHENSKI, F.Jr. & UDRY, T.V. 2000. Potencial dos rios Aquidauana e Miranda, no Pantanal de Mato Grosso do Sul, para a conservação da ariranha (*Pteronura brasiliensis*). In: Anais do III Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa-Pantanal, Corumbá, Brasil. pp. 1-12.
- WALPOLE, M.J.; MORGAN-DAVIES, M.; MILLEDGE, M.; BETT, P.; LEADER-WILLIAMS, N. 2001. Population dynamics and future conservation of a free-ranging black rhinoceros (*Diceros bicornis*) population in Kenya. *Biol. Conserv.* v.99 p. 237-243.
- WOZENCRAFT, W. C. 2005. Order Carnivora. In: *Mammal Species of the World* (D. E. Wilson, D. M. Reeder, eds.) Baltimore and London: Johns Hopkins University Press. p. 532-628.
- ZINK, R. M., WELLER, S. J. & BLACKWELL, R. C. 1998. Molecular phylogenetics of the avian genus *Pipilo* and a biogeographic argument for taxonomic uncertainty. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v.10, p. 191-201.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)