



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

PAULA BRAGA FERREIRA

**MARCADORES MOLECULARES PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DA FAUNA
BRASILEIRA: FERRAMENTAS PARA INIBIÇÃO DA
CAÇA PREDATÓRIA NO BRASIL**

Vitória de Santo Antão

2011

PAULA BRAGA FERREIRA

**MARCADORES MOLECULARES PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DA FAUNA
BRASILEIRA: FERRAMENTAS PARA INIBIÇÃO DA
CAÇA PREDATÓRIA NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração Saúde e Ambiente

Orientador: Prof. Dr. **José Eduardo Garcia**

Co-Orientador: Prof. Dr. **Rodrigo Augusto Torres**

Vitória de Santo Antão

2011

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE – Biblioteca Setorial do CAV

F383m Ferreira, Paula Braga
 Marcadores moleculares para identificação de espécies da fauna brasileira:
 ferramentas para inibição da caça predatória no Brasil / Paula Braga Ferreira.
 Vitória de Santo Antão: O Autor, 2011.
 xiii, 45 folhas: il; fig.

 Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade
 Federal de Pernambuco. CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente.

 Orientador: José Eduardo Garcia
 Co-orientador: Rodrigo Augusto Torres

 Inclui bibliografia e anexos.

 1. Caça predatória. 2. Animais silvestres brasileiros. 3. Citocromo B. 4.
 Bioinformática. I. Título. II. Garcia, José Eduardo. III. Torres, Rodrigo
 Augusto.

CDD (21.ed.) 636

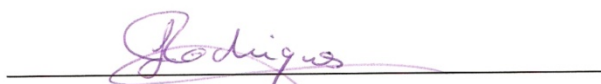
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente – Mestrado Acadêmico

PAULA BRAGA FERREIRA

“MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DA FAUNA
BRASILEIRA: FERRAMENTAS NA MITIGAÇÃO DA CAÇA PREDATÓRIA NO BRASIL”

DISSERTAÇÃO APROVADA em 18 de fevereiro de 2011

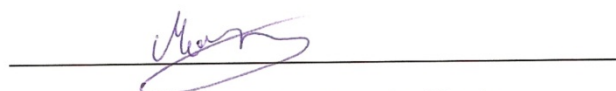
Banca Examinadora



Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues



Prof. Dr. José Eduardo Garcia



Prof. Dr. Martin Alejandro Montes

Dedico aos meus pais que me
permitiram mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu saúde e ânimo para prosseguir na caminhada;

Aos meus pais que investiram tanto tempo e dedicação durante a minha formação pessoal e profissional;

Aos meus familiares que sempre confiaram no meu potencial;

Aos meus amigos de perto e de longe que sempre me transmitiram palavras de encorajamento e amor;

Aos colegas do Centro Acadêmico de Vitória que acompanharam dia após dia a nossa luta. Em especial a Nutricionista Viviane Lansky e a Bióloga Geórgia Fernanda;

A toda a Pós Graduação deste Centro Acadêmico pelo apoio especial, concedido a essa primeira turma de mestres;

A equipe do Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, em especial a aluna Isabel Lima por todo carinho e apoio;

A FACEPE que financiou e concedeu a bolsa de mestrado que permitiu a execução deste projeto;

Aos mestres e doutores que nos instruíram e orientaram para nossa melhor formação;

Em especial ao Professor Dr. José Eduardo Garcia pelo apoio, orientação, carinho e otimismo e ao Professor Dr. Rodrigo Augusto Torres pela oportunidade e confiança.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
1.3 Revisão da Literatura	4
1.4 Material e Métodos	10
1.4.1 Análises <i>In silico</i>	10
1.4.2 Análises <i>In Vitro</i>	12
1.5 Resultados	14
1.5.1 Análises <i>In silico</i>	14
1.5.2 Análises <i>In Vitro</i>	17
1.6 Discussão e Conclusões Gerais	24
1.6.1 Análises <i>In Silico</i> (SNPs)	24
1.6.2 Análises <i>In Vitro</i>	25
1.7 Referências	28
CAPÍTULO 2	33
Single nucleotide polymorphisms from cytochrome b gene as a useful protocol in forensic genetics against the illegal hunting of manatees: <i>Trichechus manatus</i>, <i>Trichechus inunguis</i>, <i>Trichechus senegalensis</i>, and <i>Dugong dugon</i> (Eutheria: Sirenia)	
2.1. Abstract	34
2.2 Introduction	35
2.3 Materials and Methods	36
2.4 Results and Discussion	37

2.5 Conclusions	37
2.6 Literature cited	38
CAPÍTULO 3	39
Identification of paca (<i>Agouti paca</i>) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome b gene: Implication to the detection and monitoring of illegal trade	
3.1 Abstract	39
3.2 Introduction	40
3.3 Materials and Methods	41
3.4 Results	42
3.5 Discussion	43
3.6 Conclusions	43
3.7 Reference	44
ANEXOS	xiv

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Representação do posicionamento das seqüências de animais silvestres com relação às dos animais domésticos.	15
Figura 1.2	Gel de eletroforese mostrando o perfil da PCR-RFLP para as quatro espécies domésticas (L1-L4) e a paca (L5-L6). L1- L4 = Amostras de boi, cabra, porco e carneiro, respectivamente (298 pb); L5= Amostra de paca não digerida com a enzima BsiEI; L6 = Paca parcialmente digerido com BsiEI. (237+61 pb). DNA Ladder 100pb (BioLabs).	21
Figura 1.3	Gel de eletroforese mostrando o perfil da PCR-RFLP para as quatro espécies domésticas (L1-L4) e o tatu-peba (L5). L1- L4 = Amostras de, boi, cabra, porco e carneiro, respectivamente (411 pb); L5 = Tatu-peba digerido com a enzima Avall (304+107 pb). L6 = Amostra de tatu-peba não digerida com a Avall. DNA Ladder100pb (BioLabs).	21
Figura 1.4	Gel de eletroforese mostrando o perfil da PCR-RFLP para as quatro espécies domésticas (L1-L4) e o cateto (L5-L6). L1- L4 = Amostras de boi, porco, carneiro (761pb) e cabra (510+251pb) respectivamente; L5 = Cateto digerido com a enzima BanI (288+473 pb). L6 = Amostra de cateto não digerida com a BanI. DNA Ladder 100pb (BioLabs).	22
Figura 1.5	Gel de eletroforese mostrando o perfil da PCR-RFLP para as quatro espécies domésticas (L1-L4) e a cutia (L5-L6). L1- L4 = Amostras de boi (119+117+98pb), cabra (215+119pb), porco (334pb) e carneiro (217+117pb) respectivamente; L5 = Cutia digerido com a enzima Tfil (287+47pb). L6 = Amostra de cutia não digerida com a Tfil. DNA Ladder 100pb (BioLabs).	22
Figura 1.6	Gel de eletroforese mostrando o perfil da PCR-RFLP para as quatro espécies domésticas (L1-L4) e macaco prego (L5-L6). L1- L4 = Amostras de boi, cabra, porco e carneiro, respectivamente (195pb); L5= Amostra de macaco-prego não digerida com a enzima BanI ; L6 = Macaco-prego digerido com BanI (104 + 91pb). DNA Ladder 100pb (BioLabs).	23
Figura 1.7	Gel de eletroforese mostrando o perfil da PCR-RFLP para as quatro espécies domésticas (L1-L4) e o tatu-galinha (L5-L6). L1- L4 = Amostras de boi, cabra, porco e carneiro, respectivamente (957pb); L5= Amostra de tatu-galinha não digerida com a enzima BsiEI; L6 = Tatu-galinha parcialmente digerido com BsiEI (760 + 197pb). DNA Ladder 100pb (BioLabs).	23
Figure 1 (2.1)	Virtual gel electrophoresis of Cytochrome b RFLP profiles for the four domestic species and for four manatee species under consideration. The Cytochrome b fragment is digested with BanI (394+221bp)(A), EcoRV (338+277bp or 449+166bp)(B) only in the <i>T. inunguis</i> , <i>T. manatus</i> , <i>T. senegalensis</i> and <i>D. dugon</i> . Identification of: (I) <i>Bos</i>	36

indicus Linnaeus, 1758; (II) *Capra hircus* Linnaeus, 1758; (III) *Ovis aries* Linnaeus, 1758; (IV) *Sus scrofa* Linnaeus, 1758; (V) *T. inunguis*; (VI) *T. manatus*; (VII) *T. senegalensis*; (VIII) *D. dugon*.

- Figure 2 (2.2) Virtual gel electrophoresis of Cytochrome b RFLP profiles for the four manatee species under consideration. The Cytochrome b fragment is digested with HpyCH4III (A) which yields a distinct RFLP profile of 357+150+108bp (*T. inunguis*) (I) ; 357+258bp (*T. manatus* and *T. senegalensis*) (II and III) ; 291+258+66 (*D. dugon*) (IV). Digestion with MwoI (B) yields distinct RFLP profiles of 434+181bp (*T. inunguis* and *D. dugon*) (I and II), and 321+181+113bp (*T. manatus* and *T. senegalensis*) (III and IV). 36
- Figure 3.1 Gel electrophoresis of Cytochrome b PCR / RFLP profiles for the four domestic species (L1-L4) and for *Agouti paca* (L5). Using DNA Ladder 100pb (BioLabs). Samples L1- L4 are respectively *Bos indicus*, *Capra hircus*, *Sus scrofa* and *Ovis aries*, respectively (~298 bp); L5= Sample of *Agouti paca* not digested with BsiEI enzyme. L6 = *A. paca* partially digested with BsiEI enzyme (237+61 bp). 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Lista das espécies estudadas com o número de acesso e tamanho das seqüências do gene Cit b.	11
Tabela 1.2	Perfil de esperado de PCR/RFLP para a identificação das 19 espécies analisadas.	15
Tabela 1.3	Seqüência dos pares de <i>primers</i> desenhados utilizados para amplificação por PCR do Cit b das espécies analisadas.	18
Tabela 1.4	Painel de marcadores moleculares obtido após a utilização dos <i>primers</i> e das enzimas selecionadas para a identificação de tatu-peba, cateto, macaco-prego, paca, tatu-galinha e cutia.	19
Tabela 1.5	Posição dos SNPs em relação às enzimas de restrição diagnósticas e a posição nucleotídica onde ocorre o anelamento dos <i>primers</i> correspondentes. SP: Posição dos sítios polimórficos com relação a uma seqüência completa de Cit b de <i>Bos taurus</i> (DQ186290).	20
Table I (2.1)	List of species studied, with <i>GenBank</i> Access Number.	34
Table II (2.2)	Sequence positions of SNPs and diagnostic restriction enzymes; PS: polymorphic site related to the cytochrome b complete sequence of <i>T. manatus</i> (NC_010302). Dark-gray sites are diagnostic SNPs between domestic species and manatee species. Light-gray sites are diagnostic SNPs between manatee species. ¹ indicates one restriction site in position 243 only in <i>Dugong dugon</i> and another restriction site in position 411 in <i>Trichechus manatus</i> , <i>Trichechus inunguis</i> , and <i>Trichechus senegalensis</i> . ² indicates three restriction sites for HpyCH4III, and the position 580 is useful on discriminating <i>T. manatus</i> and <i>T. senegalensis</i> from <i>T. inunguis</i> e <i>D. dugon</i> . N indicates any nucleotide. ³ indicates two restriction sites for MwoI and the position 580 is also useful on discriminating <i>T. manatus</i> and <i>T. senegalensis</i> from <i>T. inunguis</i> e <i>D. dugon</i> .	35

LISTA DE ABREVIATURAS

Cit b	Citocromo b
Pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
IUCN	International Union for Conservation of Nature
CITES	Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna
DNA	Deoxyribonucleic acid
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
mtDNA	DNA mitocondrial
ATP	Trifosfato de adenosina
COI	Citocromo c Oxidase subunidade I
COII	Citocromo c Oxidase subunidade II
SP	Sítio Polimórfico
PE	Pernambuco
MG	Minas Gerais

RESUMO

A caça predatória ilegal é o segundo maior fator de impacto em populações de animais silvestres no Brasil, ficando atrás apenas da perda de habitat por desmatamento. Apesar de ser proibida no Brasil (Leis nº 5.197/1967 e nº 9.605/1998), o poder público ainda não dispõe de recursos eficientes e cientificamente testados que possam ser utilizados em análises forenses visando comprovar o ato da caça, seja ela desportiva ou com finalidade comercial. A análise baseada no DNA tem sido utilizada em várias situações, com a finalidade de detectar fraudes comerciais e outras ilegalidades. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi à identificação e a utilização de perfis de PCR/RFLP espécie-específicos para diagnóstico forense de 15 espécies da fauna brasileira e sua diferenciação de quatro espécies domésticas (bovino, suíno, caprino, ovino), totalizando 19 espécies. Para tanto foram realizadas análises de seqüências de nucleotídeos com os programas Sequencher 4.9, BioEdit 6.0.7, CLEAVER, pDRAW e Gene Runner 3.0.5, tendo sido identificados vários SNPs associados à criação de sítios de enzimas de restrição discriminantes. Com apenas 9 enzimas foram obtidos os perfis de PCR/RFLP discriminantes para as 19 espécies. A validação do protocolo *in vitro* foi realizada com amostras biológicas de 6 espécies silvestres (*Agouti paca*, *Cebus apella*, *Dasyprocta leporina*, *Dasypus novemcinctus*, *Euphractus sexcinctus*, *Tayassu tajacu*) juntamente com 4 espécies domésticas (*Bos taurus*, *Capra hircus*, *Ovis aries* and *Sus scrofa*), e os perfis detectados na análise *in silico* foram confirmados em gel de agarose 2%. O presente estudo reforçou o potencial de polimorfismos do gene Citocromo b como poderosos marcadores para identificação de espécies. Os dados produzidos aqui podem ser úteis como ferramentas em conservação no combate a caça predatória e monitoramento do comércio ilegal de carne de caça e de seus produtos.

Palavras-chave: Citocromo b, animais silvestres brasileiros, caça predatória, bioinformática, PCR/RFLP.

ABSTRACT

Following the habitat loss, illegal poaching is the second most important impact factor on declining of wildlife populations in Brazil. In spite of the prohibition of hunting in Brazil (Law No. 5.197/1967 and No. 9.605/1998), there are no tools available and scientifically proved that can be used in forensic analysis. The analysis based on DNA has been used in various situations, in order to detect commercial fraud and other illegalities. The objective of the present study was the identification and use of PCR/RFLP profiles of species-specific diagnostic of 15 species from Brazilian fauna. For this, we analyzed complete and parcial Cytochrome b nucleotide sequences using the softwares Sequencher 4.9, BioEdit 6.0.7, Cleaver, Gene Runner and pDRAW 3.0.5. Multiple SNPs associated with restriction enzymes sites were identified and most of them were specie-specific. With nine restriction enzymes, PCR/RFLP specie-specific profiles were obtained for all species. To validate the protocol biological samples from four wild species (*Agouti paca*, *Euphractus sexcinctus*, *Dasyprocta leporina*, *Tayassu tajacu*) and four domestic ones (*Bos taurus*, *Capra hircus*, *Ovis aries* and *Sus scrofa*) were analyzed, and the profiles detected in *in silico* were confirmed in 2% agarose gel. This study reinforces the potential of cytochrome b polymorphisms as a source of powerful markers for species identification. The data produced here can be useful as tools in conservation to combat poaching and monitoring of illegal trade in bushmeat and its products.

Keywords: Cytochrome b, Brazilian wildlife, poaching, bioinformatics, PCR/RFLP.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

O Brasil, com um território de 8.514.877 km², é o quinto maior país do mundo em extensão, ocupando quase metade da América do Sul, e é considerado um dos países mais ricos do mundo em diversidade biológica, concorrendo com a Indonésia pelo título de nação biologicamente mais rica do planeta (MITTERMEIER *et al.*, 2005). Estima-se que o país apresente cerca de 1,8 milhões de espécies, o que corresponde a 13,1% da biota mundial (LEWINSOHN; PRADO, 2005). Além disso, o nosso país abriga a maior riqueza de espécies de peixes de água doce, anfíbios e de mamíferos, muitos dos quais são endêmicos (SABINO; PRADO, 2005). Apesar dessa riqueza, grande parte dessa biodiversidade corre o risco de permanecer desconhecida devido às crescentes atividades humanas ameaçadoras. Tal circunstância vem sendo conhecida como “a Crise da Biodiversidade” e, frente ao desenvolvimento globalizado, abordagens conservacionistas integrativas e pró-ativas vem sendo aquelas com maior aceitação (RANDS *et al.*, 2010).

A perda e a fragmentação de habitat constituem as maiores ameaças à biodiversidade do Brasil. Elas estão relacionadas ao desenvolvimento econômico através do crescimento de áreas cultivadas e urbanas, aumento da densidade populacional, poluição atmosférica e aquática, aumento da malha rodoviária, entre outras (COSTA *et al.*, 2005).

Para o grupo dos répteis, a destruição do habitat é a principal ameaça. Mudanças nas condições térmicas perto dos ninhos podem resultar em desvios da razão sexual, o que constitui uma ameaça por si só (RODRIGUES, 2005). Além da degradação ambiental, jacarés e tartarugas são perseguidos por suas carnes, peles e ovos, o que tem causado danos prolongados às suas comunidades (JEROZOLIMSKI; PERES, 2003).

Mamíferos terrestres de grande e médio porte sofrem também com a pressão de caça, ainda que essa atividade seja ilegal no país há mais de 35 anos (COSTA *et al.*, 2005). Na

Amazônia, a caça de subsistência é a principal ameaça aos primatas (PERES, 2000). Além da perda e fragmentação do habitat, a caça ilegal e provavelmente as doenças humanas são as maiores preocupações para a conservação de primatas na Mata Atlântica (MENDES, 1991). Carnívoros como a onça-pintada (*Panthera onca*) e a onça-parda (*Puma concolor*), são perseguidos por atacarem o gado frequentemente na região do pantanal (COSTA *et al.*, 2005). As principais causas de ameaça aos sirênios são a captura intencional e acidental, colisão com embarcações e perda de habitat (LIMA *et al.*, 2007). Ambas as espécies de peixe-boi que ocorrem no Brasil estão em perigo, principalmente devido à caça (IBAMA, 2001).

De forma deliberada ou acidental, os seres humanos têm transportado espécies pelo mundo inteiro, introduzindo-as em áreas onde originalmente não existiam; espécies invasoras podem deslocar ou extinguir espécies nativas através de competição por recursos, predação, disseminação de doenças ou em decorrência de severas modificações no habitat (MACHADO, 2006; SHOCHAT *et al.*, 2010).

Atrás apenas da perda de habitat por desmatamento, especialmente pela expansão da fronteira agrícola, das zonas urbanas e dos grandes empreendimentos de infra-estrutura, a caça predatória ilegal é o segundo maior fator de impacto em populações de animais silvestres no Brasil. Apesar de ser proibida, de acordo com a Lei nº 9.605/98 (Lei de Crimes Ambientais), o poder público ainda não dispõe de recursos eficientes e cientificamente comprovados que possam ser utilizados em análises forenses visando comprovar o ato da caça, seja ela desportiva ou com finalidade comercial. Esses recursos já são amplamente utilizados em países onde a caça também é um problema ambiental sério, como aqueles do continente africano. Tais argumentos justificam o desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para a identificação de espécies da fauna brasileira.

O produto final do presente trabalho foi a elaboração de um protocolo *in silico* de identificação molecular para 15 espécies da fauna brasileira, posteriormente validado em um conjunto de amostras biológicas, com potencial para ser utilizado em qualquer laboratório de análise de DNA seja ele público ou privado; constituindo-se um protocolo passível de ser utilizado por órgãos governamentais (polícia técnica, IBAMA) ou por laboratórios particulares credenciados como prestadores de serviço ao poder público. Apesar de sua utilidade como ferramenta forense, os marcadores poderão ser aplicados por diversos grupos de pesquisa em trabalhos de distribuição e hábitos alimentares de espécies predadoras.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Desenvolver um protocolo de identificação molecular, baseado em seqüências de DNA mitocondrial, para as seguintes espécies da fauna brasileira: Paca (*Agouti paca*), Cutia (*Dasyprocta leporina*), Macaco-prego (*Cebus apella*), Cateto (*Tayassu tajacu*), Queixada (*Tayassu pecari*), Ouriço-caixeiro (*Coendou prehensilis*), Ratão-do-banhado (*Myocastor coypus*), Tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), Tatu-peba (*Euphractus sexcinctus*), Ariranha (*Pteronura brasiliensis*), Peixe-Boi-marinho (*Trichechus manatus*), Tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*), Tartaruga-de-pente (*Eretmochelys imbricata*), Jabuti-piranga (*Geochelone carbonaria*), Jacaré-de-papo-amarelo (*Cayman latirostris*).

1.2.2. Objetivos específicos

1. Organizar um banco de dados com as seqüências do gene Citocromo b disponíveis no GenBank de 15 espécies da fauna brasileira;
2. Identificar SNP's (polimorfismos de um único nucleotídeo) que sejam discriminantes para cada uma das espécies e determinar sítios de enzimas de restrição sobre esses polimorfismos;
3. Desenhar *primers* que amplifiquem um fragmento do gene Citocromo b para cada uma das espécies;
4. Validar o método testando em amostras biológicas

1.3 Revisão da Literatura

- *A caça no Brasil*

A caça é um importante fator de diminuição e extinção de espécies na natureza. (CULLEN Jr. *et al.*, 2000). Segundo MACHADO (2004), as modalidades de caça se dividem em: profissional, de controle, amadorista, de subsistência e científica. A caça de animais selvagens tropicais é historicamente conduzida para o consumo e para o comércio local (EATON *et al.*, 2009). No Brasil, animais como paca (*Agouti paca*) e tatu galinha (*Dasypus novemcinctus*) são intensamente caçados ilegalmente. A qualidade da carne e a forte tradição de caça são fatores que contribuem para o declínio de suas populações ao longo da sua distribuição (FREITAS; SILVA, 2005).

Na caça profissional, que visa à comercialização de peles/couros, as espécies mais atingidas são o jacaré-do-pantanal, onças, pequenos felinos, lontra, ariranha e grandes serpentes (PAIVA, 1999). Até a intervenção da Convenção Internacional sobre o Comércio de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Silvestre (CITES), milhares de animais foram capturados para suprir a demanda do comércio internacional de peles (COSTA *et al.*, 2005). Entre os anos de 1995-1999, os registros da CITES mostraram que o tráfico internacional de animais silvestres incluiu mais de 1,5 milhões de aves vivas, 640.000 de répteis vivos, 1,6 milhões de peles de lagarto, 1,1 milhões de peles de serpentes, além de mais de 150.000 peles de outros representantes da fauna silvestre (ROE *et al.*, 2002).

Com a descoberta das formas adequadas para o armazenamento e o transporte da carne de animais silvestres, os europeus estabeleceram no início do século XVII o comércio de carne de peixe-boi (*Trichechus manatus* e *Trichechus inunguis*) (REDFORD; ROBINSON, 1991). A caça continuou no século XX, e segundo BEST (1982, 1984) entre 1935 e 1954 aproximadamente 10.000 peixes-bois amazônicos foram mortos por ano. Estima-se que o comércio ilegal de vida silvestre tenha movimentado de 10 a 20 bilhões de dólares por ano entre as décadas de 1990 e início do ano 2000 (RENCTAS, 2001).

A caça passou a ser proibida no Brasil desde a publicação do código da fauna em 1967 (Lei nº 5.197/1967), que previa a proibição da caça profissional e admitia a modalidade

amadorista apenas em localidades específicas, onde as peculiaridades regionais a permitam, desde que especificado em lei complementar. O artigo 3º desta lei preceitua “... É proibido o comércio de espécies da fauna silvestre e de produtos e objetos que impliquem a sua caça, perseguição, destruição ou apanha...”

Já a Lei dos Crimes Ambientais de 1998 (nº 9.605, art. 32) descriminaliza a caça desde que o produto seja utilizado para saciar a fome do agente ou sua família, para proteger lavouras ou rebanhos, ou no caso de animais considerados nocivos. Apesar da proibição, a caça desportiva e até mesmo com finalidades comerciais ainda continua sendo amplamente praticada em diversas regiões do país, inclusive, em reservas como Parques Nacionais e Estaduais (CHIARELLO, 1999; CHIARELLO, 2000; CULLEN Jr. *et al.*, 2000). Apesar do consenso de que a caça predatória deve ser considerada como um importante fator de diminuição de número e até extinção de espécies na natureza (CULLEN Jr. *et al.*, 2000), a literatura disponível sobre a caça e seus efeitos no Brasil ainda é incipiente.

- *Espécies ameaçadas*

A primeira compilação das espécies ameaçadas de mamíferos brasileiros já tem mais de 30 anos (COIMBRA-FILHO, 1972). Em 2003, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) divulgou uma lista de espécies ameaçadas que constava de 66 espécies de mamíferos, das quais 24 espécies eram primatas (40% dos táxons) principalmente aqueles endêmicos da mata atlântica (IBAMA, 2003). Algumas espécies não estão ameaçadas no Brasil como um todo, mas são agora extremamente raras ou podem estar até mesmo extintas em áreas de sua distribuição original, como exemplo, a anta (*Tapirus terrestris*) que não está na lista brasileira de espécies ameaçadas, mas se tornou extremamente rara na mata atlântica (COSTA *et al.*, 2005).

Segundo a versão de 2008 da Lista Vermelha da IUCN são reconhecidas 5.488 espécies de mamíferos, dentre as quais, aproximadamente 1.219 espécies (22,2%) estão globalmente ameaçadas (1141 espécies) ou extintas (78 espécies). Dentre as 27 ordens de mamíferos, aquelas com maior porcentagem de espécies ameaçadas são: Sirenia (100%), Perissodactyla (81%), Monotremata (60%), Proboscídea (50%) e Primates (49%) (IUCN, 2008).

No caso das aves, não há registro de extinção, mas de um animal, o mutum de Alagoas, que não é mais encontrado na natureza. A ararinha azul (*Cyanopsitta spixii*) é considerada como possivelmente extinta no Brasil, havendo pouco mais de 100 exemplares em cativeiro. O

Brasil aparece com 80 espécies de mamíferos, 123 de aves, 28 de répteis, 30 de anfíbios e 80 espécies de peixes ameaçadas de extinção segundo a recente lista de 2010 (IUCN, 2010).

- *O DNA como ferramenta forense*

A análise do DNA como uma poderosa ferramenta para a identificação humana passou a ser amplamente utilizada a partir do descobrimento de regiões de DNA repetitivo no genoma humano que são transmitidas segundo as premissas mendelianas. Após esta descoberta, a identificação molecular passou a ser aceita e adquiriu um peso significativo como prova criminal em praticamente todos os tribunais do mundo (JEFFREYS *et al.*, 1985).

Com o advento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), descrita por Kary Mullis em 1987 (MULLIS; FALOONA, 1987), as metodologias utilizadas para a identificação humana se tornaram mais simples, baratas e passíveis de serem aplicadas mesmo quando a quantidade de material (DNA) é extremamente reduzida, como é o caso de pequenas manchas de sangue, saliva, material em estágio avançado de decomposição, etc (JOBLING; GILL, 2004). A ampla utilização da identificação humana por DNA teve como uma de suas conseqüências a apropriação das metodologias no desenvolvimento de protocolos específicos para a identificação animal em diversos tipos de casos forenses (BUDOWLE *et al.*, 2005).

No Brasil, o primeiro caso de utilização do DNA para a identificação humana ocorreu em 1992 quando o próprio Alec Jeffreys foi convidado para auxiliar na identificação dos restos mortais de Josef Mengele, carrasco nazista que viveu no Brasil por décadas até falecer no anonimato (JEFFREYS *et al.*, 1992).

Atualmente, o Brasil já possui uma estrutura laboratorial (ainda que restrita) com peritos especializados em análises forenses do DNA. Essas análises têm ganhado bastante destaque ultimamente na identificação de vítimas de grandes desastres aéreos e de crimes de grande comoção nacional. A utilização dessa estrutura e *expertise* técnica, porém, não vêm sendo aplicada na investigação de crimes contra a fauna pelo simples motivo de não existirem protocolos simples e eficientes de identificação de espécies, por exemplo. Apenas dois artigos descrevem protocolos para a identificação de animais da fauna brasileira: um para a identificação de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) baseado na amplificação alelo-específica de dois genes nucleares e um mitocondrial (HENRIQUE-SILVA *et al.*, 2007) e outro para a

identificação de cervídeos do gênero *Mazama* baseado na análise de um fragmento do gene mitocondrial Citocromo b (GONZÁLEZ *et al.*, 2009).

- *O DNA mitocondrial*

A mitocôndria é uma organela encontrada na maioria dos eucariontes e sua função está relacionada à transformação de uma energia bruta (Glicose) em energia elaborada (ATP), na presença de O₂. No interior destas organelas, é encontrado o DNA mitocondrial que está organizado de forma circular com um tamanho aproximado de 18 Kb. Em vertebrados, o mtDNA possui genes codificadores para duas subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 tRNA, três subunidades da enzima Citocromo c Oxidase (COI, COII e COIII), Citocromo b (Cit b), subunidades 6 e 8 da ATP F₀ sintase (ATP6 e ATP8) e sete subunidades de NADH desidrogenase (ND1-ND6 e ND4L) totalizando 37 genes, além de uma região controladora rica em AT (D-loop) (GUILHAM, 1994. BOORE, 1999).

Características peculiares, como a herança uniparental, normalmente materna, a ausência de recombinação e as altas taxas de evolução (~10 vezes maior), quando comparado ao genoma nuclear, fizeram do DNA mitocondrial (mtDNA) uma ferramenta importante no estudo das relações evolutivas entre indivíduos, espécies e populações (CALCAGNOTTO, 2001). Este elevado número de substituições de nucleotídeos conseqüente das altas taxas de mutações poderia estar sendo causada pelo excesso de resíduos metabólicos, pela baixa fidelidade na replicação das mitocôndrias e pela ausência de um mecanismo de reparo (CALCAGNOTTO, 2001).

Frente a uma grande variedade de regiões gênicas e não gênicas do mtDNA, o desenvolvimento acelerado das técnicas de sequenciamento de nucleotídeos nos últimos anos permitiu uma grande revolução no uso de ferramentas moleculares; atualmente, no campo da genômica, diversos genes e genomas mitocondriais completos de uma grande variedade de organismos já têm suas seqüências depositadas em bancos públicos de dados. Toda essa informação disponibilizada pela ciência genômica só é possível de ser organizada, analisada e interpretada com o apoio da informática, o que constitui uma nova ciência, a bioinformática.

Atualmente a bioinformática é imprescindível para a manipulação dos dados biológicos, e sua associação às ferramentas de biologia molecular favorece o desenvolvimento de marcadores genéticos para estudos de filogenia (LENK *et al.*, 2001), genética de populações (PARSONS *et al.*, 2006), identificação de espécies (BAKER; PALUMBI, 1994), entre outros.

- *PCR/RFLP*

No fim da década de 60, LINN e ARBER (1968) e MESELSON e YUAN (1968) revolucionaram a nascente biologia molecular, com a descoberta das enzimas de restrição, ou endonucleases de restrição, que são capazes de digerir uma determinada sequência específica de DNA em fita dupla, especialmente seqüências palindrômicas. As enzimas de restrição são frequentemente utilizadas na produção de um tipo específico de marcador de DNA, o RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*, baseado no padrão de fragmentos produzidos pela digestão de um determinado DNA com uma endonuclease específica (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). A variabilidade detectada através do RFLP reflete as variações na seqüência de DNA, o que permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes (SOLÉ-CAVA, 2001).

A digestão de produtos de PCR por enzimas de restrição faz com que seja possível a detecção de mutações em locos específicos do DNA. Essa associação de metodologias recebe o nome de PCR/RFLP e vem sendo amplamente utilizada para detectar mutações discriminantes entre espécies ou outros níveis taxonômicos.

- *Identificação de Espécies*

O sequenciamento de genes mitocondriais é a ferramenta molecular mais sensível, disponível até o presente, para a identificação de espécies, sendo que regiões dos genes Cit b, Citocromo Oxidase (COI e COIII), 12S e 16S são os mais comumente utilizados (TOBE; LINACRE, 2008). Uma vez que tais genes apresentam-se altamente conservados em indivíduos da mesma espécie, marcadores moleculares baseados na digestão de fragmentos de PCR por enzimas de restrição (PCR/RFLP) se tornam ferramentas altamente eficientes, rápidas e baratas para a detecção de mutações discriminantes de uma determinada espécie (MALISA *et al.*, 2006; WOLF *et al.*, 2000).

Vários estudos têm sido desenvolvidos utilizando-se COI e Cit b como marcadores importantes na identificação de espécies (EATON *et al.*, 2009; YAN *et al.*, 2005) contribuindo para o conhecimento da diversidade de espécies e monitoramento da caça ilegal de espécies silvestres juntamente com seus produtos (RATNASINGHAM; HEBERT 2007; ROSS *et al.*, 2003; EATON *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2003).

A identificação específica em material biológico obtido em apreensões de caça ilegal vem sendo descrita em diversos países, especialmente aqueles da Europa e África, onde a caça é proibida. MALISA, *et al.* (2006) descrevem um protocolo baseado em amplificação e digestão com enzimas de restrição de um fragmento do gene Cit b para a identificação de nove espécies africanas afetadas pela caça predatória ilegal.

TOBE e LINACRE (2008) desenvolveram uma metodologia de identificação de material de 18 espécies de mamíferos baseada na amplificação específica de fragmentos do gene Cit b. A metodologia proposta se mostrou eficiente para detectar, inclusive, quantidades muito pequenas de DNA em misturas de carne já processada.

Utilizando a comparação de seqüências da região controladora do DNA mitocondrial com seqüências previamente depositadas em bancos de dados, PALUMBI; CIPRIANO (1998) identificaram as espécies contidas em latas de carne de baleia no Japão e na Coréia. Além das espécies permitidas, os autores encontraram carne de golfinho e material de espécies protegidas por leis internacionais em 25% das amostras.

MOORE *et al.* (2003) fizeram uso do PCR/RFLP com a finalidade de identificar ovos de tartarugas marinhas e carne cozida de varias espécies ameaçadas. Foram selecionadas duas enzimas para digestão dos fragmentos do Cit b que se mostraram capazes de identificar as sete espécies de tartarugas marinhas mais apreciadas para consumo e comércio.

TORRES (2006) fez uso da PCR/RFLP do Cit b para confirmar a ocorrência de uma espécie invasora de peixe (*Plagioscion squamosissimus*) no Rio Paraná onde vive a espécie endêmica *Plagioscion ternetzi*, e, discutiu as implicações ecológicas dessa introdução. Foi observado que não existem diferenciação molecular para o nível específico entre a suposta amostra de *P. ternetzi* e aquela de *P. squamosissimus*, sugerindo o uso de perfis de RFLP para detecção de espécies crípticas de peixes invasores.

EATON *et al.* (2009) utilizando o gene COI pode distinguir seguramente entre um conjunto de mamíferos, comumente caçados na África e na America do Sul, e espécies da ordem Crocodilia. Os seus resultados puderam demonstrar o potencial da análise do DNA como uma importante ferramenta para o monitoramento da caça e do comércio ilegal de espécies ameaçadas, mesmo quando se estiver diante de carnes processadas ou produtos silvestres indistinguíveis por morfologia.

1.4 Material e Métodos

1.4.1 Análises *In Silico*

Seqüências completas e parciais dos gene mitocondrial Cit b de quinze espécies da fauna brasileira juntamente com seqüências completas de quatro espécies domésticas (**Tabela 1.1**) foram recuperadas do *GenBank* no formato FASTA, tendo sido criado um banco de dados local.

A similaridade entre os nucleotídeos foram detectadas utilizando-se o pacote computacional Sequencher 4.9 (Gene Codes). Os alinhamentos das seqüências foram feitos utilizando-se o programa Clustal W (BioEdit 6.0.7) (HALL, 1999) e os ajustes mínimos foram feitos por inspeção visual. Foram realizados também alinhamentos locais (BLASTn) onde foram comparadas as seqüências das espécies domésticas com todas as seqüências disponíveis no banco de dados afim de se conhecer suas máximas identidades e minimizar a possibilidade de erro na análise.

Os polimorfismos nos nucleotídeos e os sítios das enzimas de restrição foram identificados através do programa Cleaver (JARMAN, 2006). *Primers* degenerados que amplificasse o fragmento homólogo entre uma das espécies silvestres e as quatro domésticas foram desenhados com o auxílio do programa Gene Runner 3.0.5 (Hastings Software Inc.).

Tabela 1.1. Lista das espécies estudadas com o número de acesso e tamanho das seqüências do gene Cit b.

Nome Científico	Tamanho das seqüências (pb)	Número de Acesso		
<i>Bos taurus</i>	1140		DQ186290	
<i>Ovis aries</i>	1140	D84205	DQ903227	
<i>Capra hircus</i>	1140	D84201	EU350133	
<i>Sus scrofa</i>	1140	AY830174	AB376964	
<i>Agouti paca</i>	395	AY206551	AY206563	AY206572
		AY206552	AY206566	AY206573
		AY206557	AY206567	
<i>Dasyprocta leporina</i>	395	AF437783	AF437797	AF437802
		AF437790	AF437798	AF437803
		AF437793	AF437799	AF437804
		AF437794	AF437800	AF437806
		AF437796	AF437801	AF437807
<i>Tayassu tajacu</i>	1047	AY726771	DQ179062	
		AY726772	DQ179064	DQ179076
		AY726773	DQ179068	DQ179077
		AY726774	DQ179070	DQ179083
		DQ179055	DQ179071	DQ179084
		DQ179056	DQ179072	DQ179085
		DQ179057	DQ179074	U66289
		DQ179059	DQ179075	X56296
<i>Dasypus novemcinctus</i>	1104	NC_00181	AF493823	
		AF493815	AF493824	AF493832
		AF493816	AF493825	AF493833
		AF493817	AF493826	AF493834
		AF493818	AF493827	AF493835
		AF493819	AF493828	AF493836
		AF493820	AF493829	AF493837
		AF493821	AF493830	AF493838
		AF493822	AF493831	AF493839
<i>Geochelone carbonaria</i>	405	AF192928	EF490387	
		AY678334	EF490388	EF490393
		AY678351	EF490390	EF490394
		AY678433	EF490391	EF490395
<i>Euphractus sexcinctus</i>	476	DQ243719	DQ243722	
		DQ243721	DQ243723	DQ243724
<i>Trichechus manatus</i>	610	D83050	AY965885	
		AY965886	AY965884	AY965883
<i>Pteronura brasiliensis</i>	474	EF488536	EF488552	
		EF488551	EF488559	

Tabela 1.1 (Continuação). Lista das espécies estudadas com o número de acesso e tamanho das seqüências do gene Cit b.

Nome Científico	Tamanho das seqüências (pb)	Número de Acesso		
<i>Dermochelys coriacea</i>	503	AF385678 AF385677	L12712 U81363	
<i>Cayman latirostris</i>	718	AY919347 AY919348	EU161673 EU161674	
<i>Tayassu pecari</i>	1047	AY534303	AY726775	U66290
<i>Eretmochelys imbricata</i>	503	AF385673	L12718	
<i>Cebus apella</i>	301	L44586		
<i>Coendou prehensilis</i>	1113	AF411582		
<i>Myocastor coypus</i>	1140	AF422919		

1.4.2 Análises In Vitro

Amostras de tecido de paca (*Agouti paca*), macaco-prego (*Cebus apella*) cutia (*Dasyprocta leporina*), tatu galinha (*Dasytus novemcinctus*), tatu peba (*Euphractus sexcinctus*) e cateto (*Tayassu tajacu*), foram obtidas em zoológicos e criadouros brasileiros, além de bancos de amostras de pesquisadores brasileiros. Foram obtidas amostras do Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Zoológico de Sorocaba/SP), Parque Estadual Dois Irmão/PE, Setor de Animais Silvestres da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal (SP), do Criadouro de Animais Silvestres Instituto Federal de Minas Gerais - campus Bambuí (MG) e do banco de amostras da Profa. Dra. Claudene Barros da Universidade Estadual do Maranhão, campus de Caxias. As amostras dos animais domésticos foram obtidas do Mercado Público de Peixinhos (Olinda-PE) e do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

O DNA das amostras foi extraído por meio do kit de extração de DNA Qiamp Blood and Tissue Kit (Qiagen Inc.), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. O DNA das amostras foi quantificado em gel de agarose 1% corados com Gel Red (Biotium, Hayward, CA, USA).

As amplificações por PCR foram feitas com um volume final de 20µl de reação usando-se pares de *primers* descritos neste trabalho. A reação de PCR conteve Tampão 1X PCR (LGC,

Rio de Janeiro, Brasil), 2.5mM MgCl₂, 2mM de cada dNTP, 20pmol/μl de cada *primer*, 1U Taq DNA Polymerase (LGC), e aproximadamente 50ng de DNA. O padrão de temperatura da amplificação incluiu um passo de desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos a 92 °C por 2 minutos, seguido por uma temperatura de 48 °C (*C. apella*) ou 51 °C (*T. tajacu*), 60 °C (*D. leporina* e *E. sexcinctus*) ou 61 °C (*A. paca*), por 2 minutos, e 72 °C por 1,5 minutos. A conclusão foi feita com um passo de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os amplicons foram digeridos com 2U da enzima de restrição de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Os produtos digeridos foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corados com Gel Red, e as imagens, digitalizadas em fotodocumentador.

1.5 Resultados

1.5.1 Análises *In Silico*

O banco de dados foi constituído por 115 seqüências polimórficas parciais e/ ou completas das espécies silvestres juntamente com 7 seqüências completas (1140pb) provenientes dos animais domésticos. Depois de obtidos os fragmentos homólogos (**Figura 1.1**) foram encontrados SNP's que conferiram sítios de restrição discriminantes. Com os alinhamentos locais foi verificado que as máximas identidades encontradas entre a seqüência *query* (em estudo) e todas as seqüências (não redundantes) depositadas no banco de dados eram quase todas de 100% o que resultou em um *score* elevado e um *e-value* igual a zero, parâmetros estes que reforçam a expectativa do tamanho dos fragmentos de restrição para as amostras posteriormente identificadas.

Para a identificação *in silico* das 19 espécies (incluindo as domésticas) foram selecionadas 9 enzimas de restrição que cortassem preferencialmente em um único ponto das seqüências de todos os indivíduos de uma das espécies silvestres, e que não fossem capazes de digerir as seqüências das espécies domésticas. As enzimas selecionadas a partir da identificação dos sítios polimórficos estão representadas na **Tabela 1.2** onde se observa a expectativa do tamanho dos produtos de restrição, constituindo então, o painel de marcadores moleculares.

Ocorreram casos em que só havia a possibilidade de se utilizar enzimas que digerssem ao menos em um ponto das seqüências das espécies domésticas, como foi o caso da enzima BanI que digeriu tanto as seqüências de cateto e queixada como a de cabra, assim como das enzimas Styl, e Tfil, mas, mesmo assim, ao digerir as seqüências dos animais domésticos foram produzidos fragmentos de restrição de tamanhos diferentes. No caso da enzima BanI, também foi possível diferenciar o cateto e o queixada da cabra, pois os fragmentos de restrição nesta enzima tiveram tamanhos de 598 + 449pb (**Tabela 1.2**). Para os outros três animais domésticos, a enzima não encontrou sítios de restrição, produzindo um único fragmento de 1047pb. O uso da enzima BanI na distinção das demais espécies (Tartaruga-de-couro, Peixe-

boi-marinho e Macaco-prego) com relação às seqüências domésticas, propiciou apenas a digestão das seqüências das espécies silvestres.

Nas seqüências de paca, macaco-prego, cutia, tatu galinha, tatu peba e cateto foram identificados 9 SNPs que estavam relacionados a criação de sítios de restrição para 4 enzimas (AvalI, BanI BsiEI e Tfil), o que permitiu a posterior validação do protocolo.

Através dos alinhamentos também foram identificados 9 mutações presentes entre as seqüências de paca (365pb), 18 entre as seqüências de cutia (395pb), 85 entre as seqüências de tatu-galinha (1.104pb), 8 entre as seqüências tatu-peba (476pb) e 141 entre as seqüências de cateto (1047pb). Como só houve uma seqüência de macaco-prego, esta contagem não foi possível.

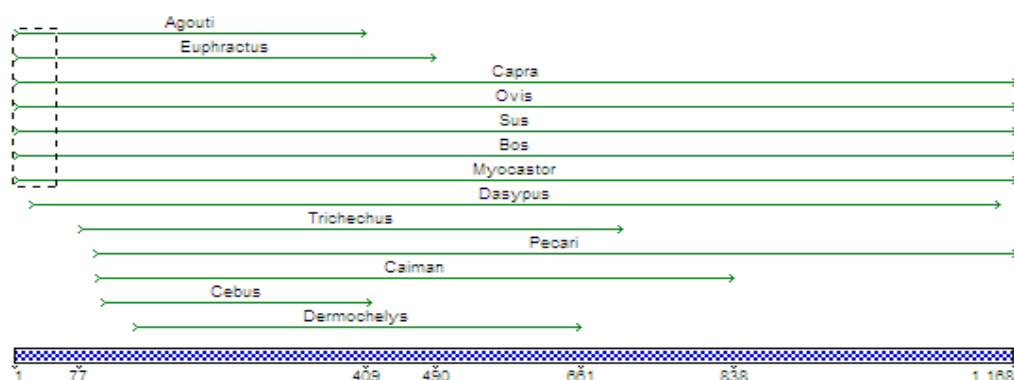


Figura 1.1. Representação do posicionamento das seqüências de animais silvestres com relação às dos animais domésticos.

Tabela 1.2. Perfil de esperado de PCR/RFLP para a identificação das 19 espécies analisadas.

Enzimas / Seqüência de corte	Espécies	Tamanhos dos fragmentos de restrição(pb)
AgeI / ACCGGT	Ariranha	357 + 117
	Boi, porco, carneiro, cabra,	Não digere
AvaI / CYCGRG	Jabuti-piranga	212 + 193
	Macaco-prego	193 + 108
	Boi, porco, carneiro, cabra	Não digere
AvaII / GGWCC	Jacaré-de-papo-amarelo	403 + 314
	Tatu-peba	314 + 162
	Ratão-do-banhado	753 + 387
	Boi, porco, carneiro, cabra	Não digere

Tabela 1.2 (Continuação). Perfil de esperado de PCR/RFLP para a identificação das 19 espécies analisadas.

Enzimas	Espécies	Tamanhos dos fragmentos de restrição(pb)
BamI / GGYRCC	Tartaruga-de-couro	385 + 118
	* Cateto	671 + 376
	* Queixada	671 + 376
	Peixe-boi-marinho	394 + 221
	Macaco prego	146 + 144 + 11
	Boi, porco, carneiro, cabra	Não digere
BsiEI / CGRYCG	Paca	297 + 98
	Tatu-galinha	825 + 279
	Macaco-prego	196 + 105
	Ouriço-caixeiro	703 + 410
	Boi, porco, carneiro, cabra	Não digere
BsrI / ACTGGN	Jabuti-piranga	217 + 188
	Boi, porco, carneiro, cabra	Não digere
SpeI / ACTAGT	Tartaruga-de-pente	225 + 164 + 114
	Boi, porco, carneiro, cabra	Não digere
TfiI / GAWTC	Cutia	302 + 93
	Boi	165 + 117 + 113
	Carneiro	263 + 132
	Cabra	230 + 165
	Porco	Não digere
StyI / CCWWGG	Queixada	654 + 393
	Cateto	* Digere
	Boi e porco	Não digere
	Carneiro	579 + 453 + 15
	Cabra	1032 + 15

*Obs₁: A enzima também corta a sequência de cabra (*Capra hircus*) gerando fragmentos de 598+449pb. Para as demais espécies domésticas ela não digere.

*Obs₂: Produtos de tamanhos variados conforme o polimorfismo encontrado entre os indivíduos.

De toda a lista das enzimas disponibilizadas pelo programa *CLEAVER* apenas a enzima StyI é capaz de distinguir entre as sequências de cateto e de queixada, mas para diferenciá-los das espécies domésticas, o melhor seria o uso enzima BamI que iria digerir apenas uma das sequências dos animais domésticos (cabra) e geraria o mesmo padrão de bandas para o cateto e queixada. A digestão das sequências de cateto com a enzima StyI produziu diversos tamanhos de fragmentos de restrição, tais como: 594 + 339 + 60 + 54pb; 393 + 347 + 307pb;

594 + 393 + 60pb; 393 + 307 + 287+ 60pb; 594 + 453pb; 740+307pb; e, 453 + 307 + 287pb; constituindo-se polimorfismos intra-específicos.

Para as demais espécies, exceto a cutia, foi possível escolher uma enzima que digerisse apenas a sequência da espécie silvestre em questão, o que facilitou a análise. Contudo, mesmo a enzima Tfil digerindo quase todas as sequências dos animais domésticos (exceto porco), os tamanhos de 302 + 93pb só foram observados em cutia. Os fragmentos de restrição tiveram em média tamanhos acima de 100pb podendo ser visualizados no gel de eletroforese a 2%. Muitas enzimas puderam ser usadas pra identificação de mais de uma espécie, como foi o caso da BsiEI que foi útil para identificação da paca (297+98pb), tatu galinha (825+279pb), macaco-prego (196+105pb) e ouriço-caixeiro (703+410pb).

1.5.2 Análises *In Vitro*

Foram obtidas vinte e duas amostras de *A. paca*, uma amostra de *C. apella*, três de *C. latirostris*, quatro de *D. leporina*, seis de *T. tajacu*, trinta de *D. novemcinctus*, nove amostras de *E. sexcinctus* e dezenove de *G. carbonaria*; juntamente com dez amostras dos animais domésticos. O DNA de todas as amostras foi extraído e quantificado com sucesso. Apenas as amostras de *A. paca*, *C. apella*, *T. tajacu*, *D. leporina*, *D. novemcinctus* e *E. sexcinctus* foram passíveis de amplificação com os *primers* degenerados (**Tabela 1.3**).

Em *A. paca*, um fragmento de aproximadamente 298pb foi amplificado contendo o sítio de restrição da enzima BsiEI na posição 294 (com relação a sequência completa de *Bos taurus* DQ186290) único para *A. paca* gerando um perfil único de RFLP (**Tabela 1.4 e Tabela 1.5**)

Em *C. apella*, foi gerado um fragmento de 195pb, o qual apresentou o sítio de restrição da enzima BanI na posição 256 (com relação a sequência completa de *B. taurus* DQ186290), único para a mesma. Com esta mesma enzima foi possível diferenciar *T. tajacu* das espécies domésticas, pois o mesmo apresentava o sítio dessa enzima na posição 469, não encontrado em *B. taurus*, *O. aries* e *S. scrofa*. *C. hircus* apresentou também o sítio dessa enzima, porém na posição 598 o que gerou outro perfil de RFLP (**Tabela 1.4 e Tabela 1.5**).

Já em *D. leporina* foi amplificado um fragmento de 334pb que apresentou o sítio de restrição da enzima Tfil na posição 302 (com relação a sequência completa de *B. taurus* DQ186290). O sítio de restrição desta mesma enzima também estava presente na posição 113 e 230 nas sequências dos animais domésticos (exceto porco) mas produziu fragmentos de restrição de tamanho diferentes, sendo possível discriminá-las (**Tabela 1.4**).

Em *D. novemcinctus* um fragmento de 957pb foi amplificado o qual apresentou o sítio da enzima BsiEI na posição 212 (com relação a sequência completa de *B. taurus* DQ186290) o que gerou um perfil de RFLP único para essa espécie. Por último foi amplificado um fragmento de 411pb para *E. sexcinctus*. Esse fragmento continha o sítio da enzima Avall na posição 314, único para essa espécie (**Tabela 1.5**).

A validação dos marcadores gerou uma matriz onde foram combinadas as posições de ‘anelamento’ dos *primers*, as enzimas de restrição com os seus sítios, os SNPs que permitiram identificar todas as 6 espécies silvestres e os respectivos tamanhos dos amplicons (**Tabela 1.5**).

Como esperado, as amostras biológicas produziram perfis de RFLP idênticos aos esperados pelas análises *in silico*. (**Figuras 1.2 a 1.7**). Seguindo o protocolo de digestão sugerido pelo fabricante, foi observado que esta enzima BsiEI não digeriu por completo o DNA da *A. paca* e de *D. novemcinctus* gerando apenas a banda de maior tamanho,, como pode ser observado nos géis da **Figura 1.2 e Figura 1.7**. As bandas de tamanho inferior a 80pb não foram visualizadas em gel de agarose a 2%.

Tabela 1.3. Sequência dos pares de *primers* desenhados utilizados para amplificação por PCR do Cit b das espécies analisadas.

Sequências dos Primers	Espécie
Primer Forw: 5'- CTYCCHRCYCCMTCHAAAYAT- 3' Primer Rev: 5'- GDAGRABKAYKCCRATRTTTC - 3'	<i>Agouti paca</i>
Primer Forw: 5'- AARWCMCACCCAYTAATMAAA - 3' Primer Rev: 5'- TCCRATRTTTCAGGTTTC - 3'	<i>Dasyprocta leporina</i>
Primer Forw: 5'- AGCAATACAYTAYACRYCHGAC - 3' Primer Rev: 5'- CCRATRTTTCAGTYTYTAG - 3'	<i>Cebus apella</i>
Primer Forw: 5'- CMGCHTTYTCMTCWGTWRC - 3' Primer Rev: 5'- GCTYCGYTGYYTDRAGGTRT - 3'	<i>Tayassu tajacu</i>
Primer Forw: 5'- AYTWYWCAYCHRRCRMMA - 3' Primer Rev: 5'- AKAGKRC DAGKRDBAKKA - 3'	<i>Cayman latirostris</i>
Primer Forw: 5'- ACATYCGHAARWCHCACCC - 3' Primer Rev: 5'- AWGATATTTGTCCTCAKG - 3'	<i>Euphractus sexcinctus</i>
Primer Forw: 5'- GGHTCHYTVYTRGGMATYTG - 3' Primer Rev: 5'- TTGKCCRATRRTDAYRWAKGG - 3'	<i>Dasyus novemcinctus</i>
Primer Forw: 5'- CCMTCMAAYATYTCWKCH - 3' Primer Rev: 5'- GANCCRTARTADARDCKCKG - 3'	<i>Geochelone carbonaria</i>

Bases Degeneradas: N = A+C+G+T; D= A+T+G; B= T+C+G; H= A+T+C; W= A+T; S= C+G; K= T+G; M= A+C; Y= C+T; R= A+G.

Tabela 1.4. Painel de marcadores moleculares obtido após a utilização dos *primers* e das enzimas selecionadas para a identificação de tatu-peba, cateto, macaco-prego, paca, tatu-galinha e cutia.

Enzimas	Espécies	Tamanhos dos fragmentos de restrição(pb)
Avall / GGWCC	Tatu-peba Boi, porco, carneiro, cabra	304 + 107 Não digere
BanI / GGYRCC	* Cateto Macaco-prego Boi, porco, carneiro, cabra	288 + 473 104 + 91 Não digere
BsiEI / CGRYCG	Paca Tatu-galinha Boi, porco, carneiro, cabra	237+ 61 760 + 197 Não digere
TfiI / GAWTC	Cutia Boi Carneiro Cabra Porco	287 + 47 119+117 + 98 217 + 117 215 + 119 Não digere

*Obs₁: A enzima também digere a sequência de cabra (*Capra hircus*) gerando fragmentos de tamanhos 510 + 251pb. Para as demais espécies domésticas ela não digere.

Tabela 1.5. Posição dos SNPs em relação às enzimas de restrição diagnósticas e a posição nucleotídica onde ocorre o anelamento dos *primers* correspondentes. SP: Posição dos Sítios Polimórficos com relação a uma sequência completa de Cit b de *Bos taurus* (DQ186290).

Enzimas	SP	Espécies					Posição de anelamento	Tamanho dos Amplicons
BsiEI CGRYCG	294	<i>Boi</i> A	<i>Carneiro</i> A	<i>Cabra</i> A	<i>Porco</i> A	<i>Paca</i> C	Forw - 61 Rev - 358	298
	212	<i>Boi</i> A	<i>Carneiro</i> A	<i>Cabra</i> A	<i>Porco</i> A	<i>Tatu-galinha</i> C	Forw - 82 Rev - 1038	957
BanI GGYRCC	469/598	<i>Boi</i> A/G	<i>Carneiro</i> A/T	<i>Cabra</i> A/C	<i>Porco</i> A/G	<i>Cateto</i> C/G ou A	Forw - 89 Rev - 849	761
	256	<i>Boi</i> T	<i>Carneiro</i> A	<i>Cabra</i> A	<i>Porco</i> A	<i>Macaco prego</i> C	Forw - 52 Rev - 246	195
Avall GGWCC	314	<i>Boi</i> T	<i>Carneiro</i> A	<i>Cabra</i> A	<i>Porco</i> A	<i>Tatu-peba</i> G	Forw - 08 Rev - 418	411
Tfil GAWTC	113/230/302	<i>Boi</i> G/C/C	<i>Carneiro</i> C/T/C	<i>Cabra</i> C/C/T	<i>Porco</i> C/T/C	<i>Cutia</i> C/A/A	Forw - 16 Rev - 349	334

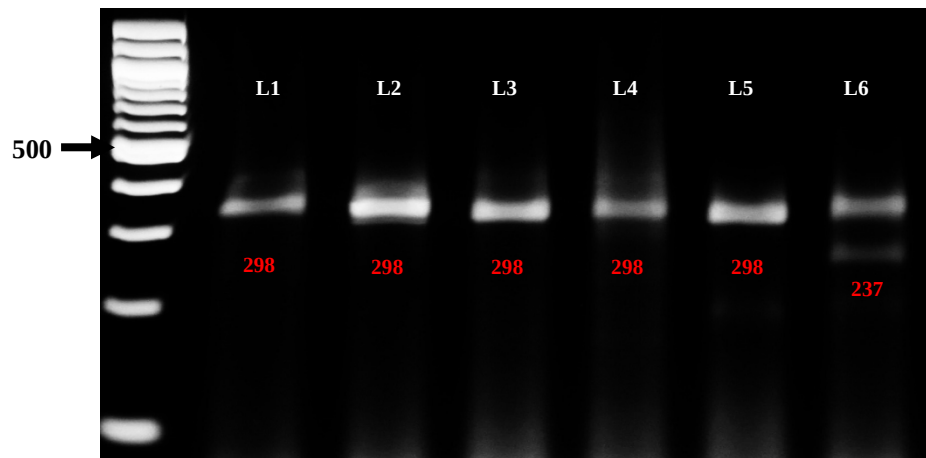


Figura 1.2. Gel de eletroforese mostrando o perfil da PCR-RFLP para as quatro espécies domésticas (L1-L4) e a paca (L5-L6). L1- L4 = Amostras de boi, cabra, porco e carneiro, respectivamente (298 pb); L5= Amostra de paca não digerida com a enzima BsiEI; L6 = Paca parcialmente digerido com BsiEI. (237+61 pb). DNA Ladder 100pb (BioLabs).

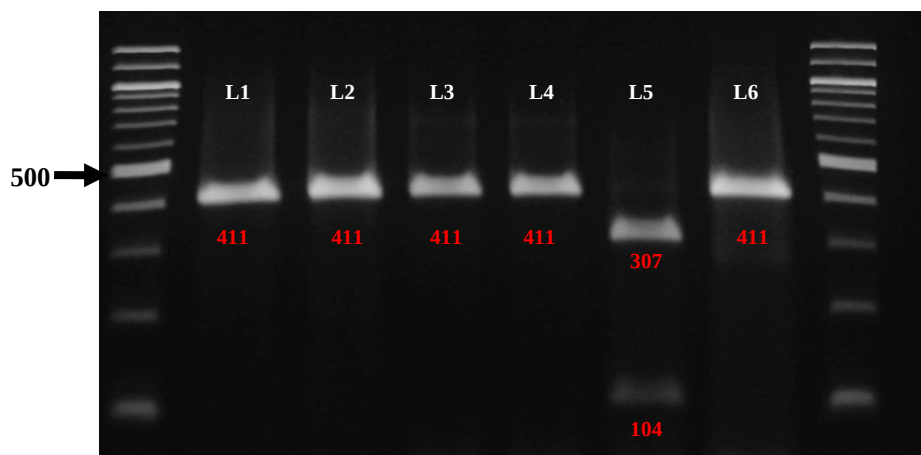


Figura 1.3. Gel de eletroforese mostrando o perfil da PCR-RFLP para as quatro espécies domésticas (L1-L4) e o tatu-peba (L5-L6). L1- L4 = Amostras de boi, cabra, porco e carneiro, respectivamente (411pb); L5 = Tatu-peba digerido com a enzima Avall (304+107pb). L6 = Amostra de tatu-peba não digerida com a Avall. DNA Ladder 100pb (BioLabs).

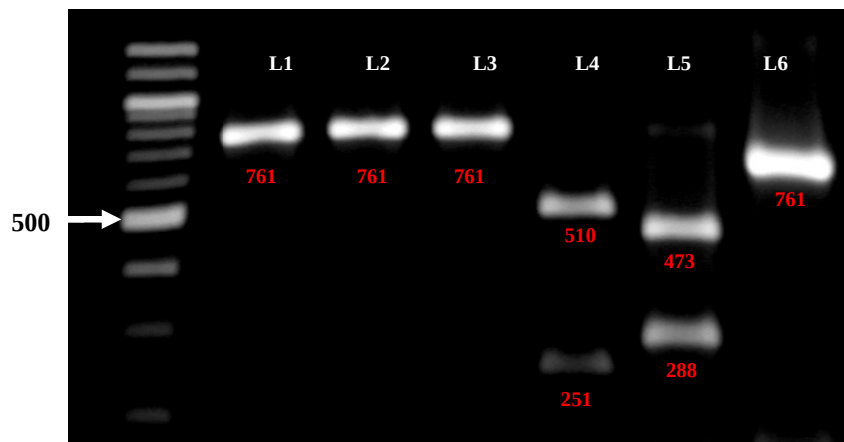


Figura 1.4. Gel de eletroforese mostrando o perfil da PCR-RFLP para as quatro espécies domésticas (L1-L4) e o cateto (L5-L6). L1- L4 = Amostras de boi, porco, carneiro (761pb) e cabra (510+251pb) respectivamente; L5 = Cateto digerido com a enzima BanI (288+473 pb). L6 = Amostra de cateto não digerida com a BanI. DNA Ladder 100pb (BioLabs).

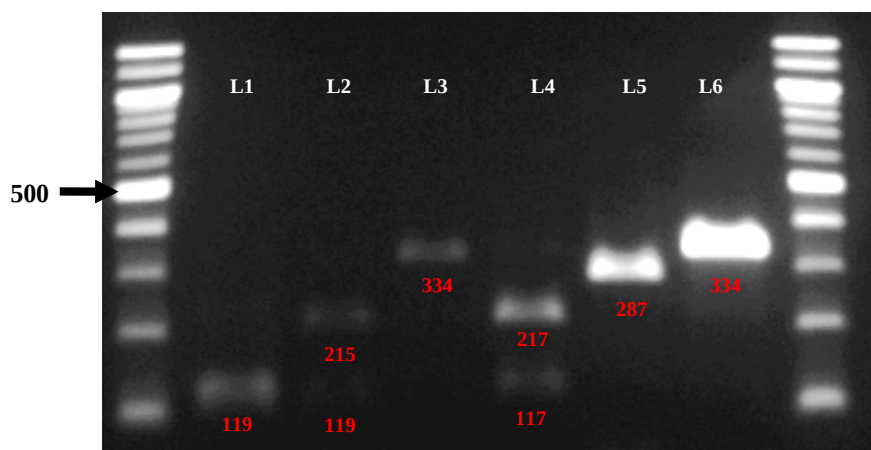


Figura 1.5. Gel de eletroforese mostrando o perfil da PCR-RFLP para as quatro espécies domésticas (L1-L4) e a cutia (L5-L6). L1- L4 = Amostras de boi (119+117+98pb), cabra (215+119pb), porco (334pb) e carneiro (217+117pb) respectivamente; L5 = Cutia digerido com a enzima Tfil (287+47pb). L6 = Amostra de cutia não digerida com a Tfil. DNA Ladder 100pb (BioLabs).

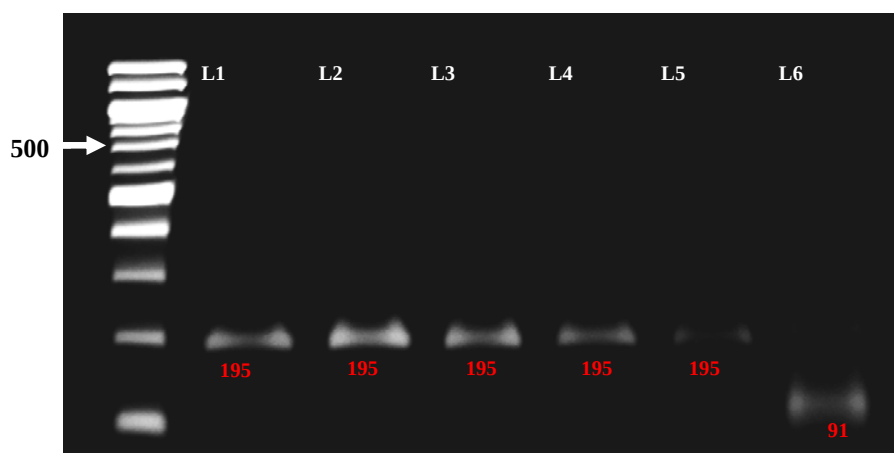


Figura 1.6. Gel de eletroforese mostrando o perfil da PCR-RFLP para as quatro espécies domésticas (L1-L4) e macaco prego (L5-L6). L1- L4 = Amostras de boi, cabra, porco e carneiro, respectivamente (195pb); L5= Amostra de macaco-prego não digerida com a enzima BanI ; L6 = Macaco-prego digerido com BanI (104 + 91pb). DNA Ladder 100pb (BioLabs).

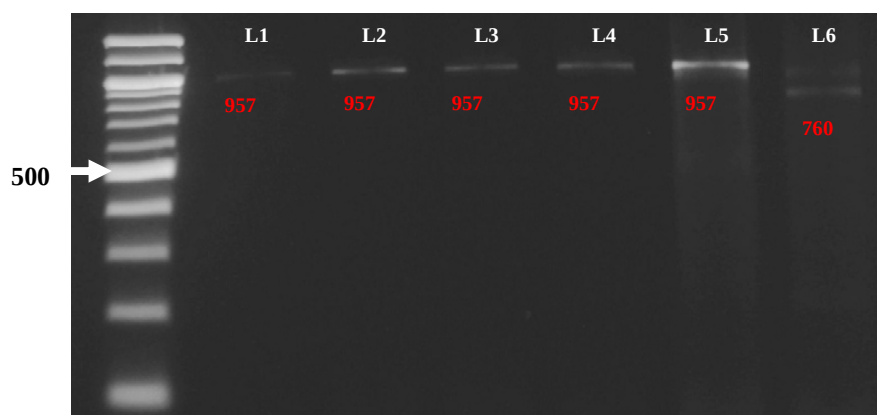


Figura 1.7. Gel de eletroforese mostrando o perfil da PCR-RFLP para as quatro espécies domésticas (L1-L4) e o tatu-galinha (L5-L6). L1- L4 = Amostras de boi, cabra, porco e carneiro, respectivamente (957pb); L5= Amostra de tatu-galinha não digerida com a enzima BsiEI; L6 = Tatu-galinha parcialmente digerido com BsiEI (760 + 197pb). DNA Ladder 100pb (BioLabs).

1.6 Discussão e Conclusões Gerais

1.6.1 Análises *In Silico* (SNPs)

As análises *in silico* desenvolvidas neste estudo resultaram na elaboração de um painel de marcadores moleculares para identificação de dezenove espécies de animais, sendo quinze delas silvestres. Para identificação das amostras biológicas e validação do protocolo foram observados através dos alinhamentos, nove polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) que permitiram a geração de perfis de RFLP virtuais espécie-específicos.

Os SNPs têm sido amplamente identificados em seqüências mitocondriais, sendo aplicados em estudos que envolvam autenticação de recursos pesqueiros (BAKER; PALUMBI, 1994; WOLF *et al.*, 2000), detecção de origem de carne bovina (VERKAAR *et al.*, 2001), identificação e distribuição de espécies simpátricas (GONZÁLEZ *et al.*, 2009), taxonomia molecular (TORRES, 2006), entre outros. Então, a identificação dos SNPs nas seqüências de nucleotídeos das espécies aqui estudadas permitiu a geração de fragmentos de restrição específicos e de tamanhos fáceis de serem identificados no gel, reforçando a aplicabilidade dos polimorfismos nucleotídicos da região do Cit b para autenticação de carne de caça ilegal oriunda de espécies ameaçadas e superexploradas.

A partir dos alinhamentos foi possível o desenho dos *primers* degenerados que amplificaram com sucesso as amostras de espécies silvestres filogeneticamente mais próximas àquelas domésticas, porém quando comparados as seqüências das espécies de répteis (*Geochelone carbonaria* e *Cayman latirostris*) com as dos animais domésticos, não foram encontradas regiões de similaridade extensas o suficiente para a elaboração de um único par de *primer* que amplificasse nas quatro espécies domésticas e na espécie silvestre em análise. A possibilidade de utilizar *primers* degenerados e enzimas de restrição que digiram preferencialmente apenas as seqüências das espécies silvestres estudadas garante agilidade, segurança e economia nas análises forenses, porém as relações evolutivas entre as espécies devem ser consideradas quando se pretende utilizar esse dispositivo metodológico.

1.6.2 Análises *In Vitro*

Os resultados obtidos neste estudo permitiram distinguir seis espécies silvestres (*Agouti paca*, *Cebus apella*, *Dasyprocta leporina*, *Dasypus novemcinctus*, *Euphractus sexcinctus*, *Tayassu tajacu*) dos animais domésticos através de perfis moleculares espécie-específico. Este painel molecular é uma ferramenta de identificação segura que permite distinguir produtos de caça de origem ilegal, na ausência de possibilidade de identificação morfológica.

Como era esperado, a variação intra-específica ($\leq 10\%$) foi bem menor que a variação inter-específica. O maior grau de polimorfismo intra-específico foi observado *in silico* em cateto, porém as amostras biológicas dos mesmos apresentaram o mesmo perfil de RFLP. Também foram observadas regiões dentro das seqüências de Cit b mais conservadas em espécies do mesmo gênero (como em cateto e queixada, por exemplo), o que pode ser explicado pelo pouco tempo de divergência evolutiva entre as espécies (JOHNS; AVISE).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é geralmente escolhido para identificação molecular de espécies, pois podem ser obtidos com facilidade em amostras degradadas ou processadas quando comparados ao DNA nuclear (nDNA) principalmente porque o mtDNA está presente em múltiplas cópias por célula e o nDNA tem apenas uma cópia oriunda de cada parental (DAWNAY *et al.*, 2007). Além disso, o mtDNA apresenta herança única (materna), ausência de recombinação e apresenta uma alta taxa de mutação, aumentando o poder de discriminação entre as espécies (MALISA *et al.*, 2006).

O gene Cit b tem sido escolhido para identificação molecular de muitos vertebrados tais como, tubarões (KUMAR *et al.*, 2007), baleias (MALIK *et al.*, 1997), tartarugas marinhas (MOORE *et al.*, 2003), serpentes (YAU *et al.*, 2002) e felinos (PRADO *et al.*, 2002; VERMA; SINGH, 2003; WAN; FANG, 2003; RONAGHI *et al.*, 1998).

Foram analisados o maior número de amostras possíveis para confirmação dos perfis espécie-específico esperados pela análise *in silico*. Só houve uma amostra de porco que apresentou uma mutação no sítio da enzima Tfil, gerando um perfil próximo ao de cabra na análise de cutia. A análise feita pelo algoritmo BLASTn nos permitiu verificar se todos os polimorfismos encontrados nos sítios de restrição das enzimas selecionadas estavam devidamente representados nas seqüências depositadas no banco de dados, e assim, não ocorrerem resultados inesperados ou falso positivo. Para identificar carne de animais silvestres

no nível de certeza aceito em tribunais, é necessário que a probabilidade de erro na identificação seja extremamente baixa, e para isso é importante avaliar um amplo número de amostras e de diferentes áreas geográficas para garantir se as possíveis variantes de cada espécie estejam representadas (MALISA *et al.*, 2006).

Com relação à aplicabilidade das quatro enzimas de restrição utilizadas na análise de PCR/ RFLP (Avall, BanI, BsiEI, Tfil), apenas a enzima BsiEI não produziu bandas muito claras durante a digestão do DNA de paca e de tatu-galinha, havendo produto de PCR sem ter sido digerido e a geração de um fragmento de baixo peso molecular não detectável no gel de eletroforese. Para a seleção apropriada das enzimas, deve ser considerada a sua capacidade de resolução, correspondida no gel de eletroforese. Em geral, fragmentos menores de 80pb são difíceis de serem identificados em gel de agarose, mesmo que em concentrações mais altas (3% por exemplo) (WOLF *et al.*, 2000).

O objetivo inicial de desenvolver um protocolo de identificação molecular, baseado em seqüências de DNA mitocondrial, para as 15 espécies da fauna brasileira (*Agouti paca*, *Dasyprocta leporina*, *Cebus apella*, *Tayassu tajacu*, *Tayassu pecari*, *Coendou prehensilis*, *Myocastor coypus*, *Dasypus novemcinctus*, *Euphractus sexcinctus*, *Pteronura brasiliensis*, *Trichechus manatus*, *Dermochelys coriacea*, *Eretmochelys imbricata*, *Geochelone carbonaria* e *Cayman latirostris*) esbarrou na dificuldade de obtenção de um par de primers degenerados suficientes para amplificar amostras de répteis (*Geochelone carbonaria* e *Cayman latirostris*) e mamíferos, e na dificuldade de obtenção de amostras biológicas, seja pela raridade das espécies em cativeiro (ariranha, ouriço-caixeiro e ratão-do-banhado, por exemplo), ou pelas dificuldades burocráticas dos mantenedores (peixe-boi e tartarugas marinhas).

As espécies envolvidas nesse estudo representam animais que são amplamente caçados em todo o território nacional, tais como o tatu galinha (*Dasypus novemcinctus*) e a paca (*Agouti paca*) (FREITAS; SILVA, 2005).

Como observado, os resultados das análises *in silico* puderam ser corroborados com os das análises *in vitro* gerando os mesmos perfis de RFLP para cada espécie estudada.

Considerando a fidelidade dos dados encontrados nos bancos públicos e a robustez das ferramentas de bioinformática, espera-se que os polimorfismos encontrados para as demais espécies em questão sejam existentes, constituindo um protocolo passível de utilização.

O presente estudo reforça o potencial de polimorfismos do gene Cit b como poderosos marcadores para identificação de espécies, especialmente aquelas ameaçadas. Os dados

obtidos podem ser úteis como ferramentas em conservação no combate a caça predatória e monitoramento do comércio ilegal de carne de caça e de seus produtos.

1.7 Referências

- ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: HOLOS, 2001. p. 143-152.
- BAKER, C. S.; PALUMBI, S. R. Which Whales Are Hunted? A Molecular Genetic Approach to Monitoring Whaling. **Science**, v. 265, p. 1538-1539, 1994.
- BEST, R. C. A salvação de uma espécie: Novas perspectivas para o peixe-boi da Amazônia. **Revista IBM**, n. 14, p. 1-14. 1982.
- BEST, R. C. *Trichechus inunguis*: Vulgo peixe-boi. **Ciência Hoje**, v. 2, n. 10, p. 66-73, 1984.
- BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 8. 1767–1780, 1999.
- BUDOWLE, B. et al. Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. **International Journal of Legal Medicine**, v. 119, n. 5, p. 295-302, 2005.
- CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: HOLOS, 2001. p. 51-63.
- CHIARELLO, A.G. Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammal communities in southeastern Brazil. **Biological Conservation**, v. 87, p. 71-82, 1999.
- CHIARELLO, A. G. Influência da caça ilegal sobre mamíferos e aves das matas de tabuleiro do norte do estado do Espírito Santo. **Bol. Mus. Biol. Mello Leitão**, v. 11-12, p. 229-247, 2000.
- COIMBRA-FILHO, A. F. Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil. In: Academia Brasileira de Ciências. **Espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1972. p.13-98.
- COSTA, L. P. et al. Conservação de mamíferos no Brasil. **Megadiversidade**, n. 1, p.103-112, 2005.
- CULLEN JR, L.; BODMER, R. E.; VALLADARES-PADUA, C. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forest, Brazil. **Biological Conservation**, v. 95, p. 49-56, 2000.

- DAWNAY, N. et al. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. **Forensic Science International**, v. 173, p. 1–6, 2007. doi:10.1016/j.forsciint.2006.09.013
- EATON, M. J. et al. Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 4, 1389-1404, doi: 10.1007/s10592-009-9967-0. 2009.
- FREITAS, M. A.; SILVA, T. F. S. **Guia ilustrado mamíferos na Bahia: espécies continentais**. Pelotas: USEB, 2005.
- GILLHAM, N. W. **Organelle Genes and Genomes**. Oxford University Press, 1994. 440p.
- GONZÁLEZ, S. et al. Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources**. v. 9, p. 754-758, 2009.
- HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 95–98, 1999.
- HENRIQUE-SILVA, F. et al. Rapid identification of capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) using allele-specific PCR. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 1, p.189-90, 2007.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). **Mamíferos aquáticos do Brasil: plano de ação – versão II**. Brasília: Edições Ibama, 2001.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). **Lista das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção**. Ministério do Meio Ambiente, Ibama, Brasília. 2003. Disponível em: < <http://www.biodiversitas.org.br> >. Acesso em: 15 mai. 2008.
- IUCN (World Conservation Union). **2008 IUCN Red List of threatened species**. IUCN – World Conservation Union, Gland, Suíça. 2008. Disponível em: < http://www.iucnredlist.org/mammals/geographic_patterns >. Acesso em: 20 mai. 2010.
- IUCN (World Conservation Union). **2008 IUCN Red List of threatened species**. IUCN – World Conservation Union, Gland, Suíça. 2010. Disponível em: < http://www.iucnredlist.org/mammals/geographic_patterns >. Acesso em: 20 fev. 2011.
- JARMAN, S.N. Cleaver: software for identifying taxon specific restriction endonuclease recognition sites. **Bioinformatics**. v. 22,, n. 17, p. 2160–2161, doi: 10.1093/bioinformatics/btl330. 2006.
- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73, 1985.
- JEFFREYS, A. J. et al. Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. **Forensic Science International**, v. 56, n. 1, p. 65-76, 1992.

JEROZOLIMSKI, A.; PERES, C. A. Bringing home the biggest bacon: a cross-site analysis of the structure of hunter-kill profiles in Neotropical forests. **Biological Conservation**, v. 111, n. 3, p. 415-425, 2003.

JOBLING, M. A.; GILL, P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 10, p.739-51, 2004.

JOHNS, G. C.; AVISE, J. C. A Comparative Summary of Genetic Distances in the Vertebrates from the Mitochondrial Cytochrome *b* Gene. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 11, p. 1481-1490, 1998.

KUMAR, R. et al. A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45. n. 11, p. 992-997, 2007.

LENK, P. et al. Evolutionary Relationships among the True Vipers (Reptilia: Viperidae) Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 19, p. 94-104, doi:10.1006/mpev.2001.0912, 2001.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 36-42, 2005.

LIMA, R. P.; ALVITE, C. M. C.; VERGARA-PARENTE, J. E. **Protocolo de Reintrodução de Peixes-bois marinhos no Brasil**. Brasília, Edições Ibama, 2007. 62p.

LINN, S.; ARBER, W. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v. 59, p. 1300-1306, 1968.

MACHADO, M. Extinções em massa e a crise atual da biodiversidade: Lições do tempo profundo. **Diálogo Canoas**, n. 9, p. 37-68, 2006.

MACHADO, P. A. L. Direito Ambiental Brasileiro. 12. ed. São Paulo: Malheiros Editores, 2004.

MALIK, S. et al. Pinniped penises in trade: a molecular-genetic investigation. **Conservation Biology**, v. 11, n. 6, p.1365-1374, doi: 10.1046/j.1523-1739.1997.96125.x, 1997.

MALISA, A. L. et al. The potential of mitochondrial DNA markers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for domestic and wild species identification. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 18, p.1588-1593, 2006.

MENDES, S. L. Situação atual dos primatas em reservas florestais do estado do Espírito Santo. In: RYLANDS, A.B.; BERNARDES, A.T (eds.). **A primatologia no Brasil**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1991, v. 3, p. 347-356.

MESELSON, M.; YUAN, R. DNA restriction enzyme from *Escherichia coli*. **Nature**, v. 217, p. 1110, 1968.

MITTERMEIER, R. A. et al. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 14-21, 2005.

MOORE, M. K. et al. Use of restriction fragment length polymorphisms to identify sea turtle eggs and cooked meats to species. **Conservation Genetics**, v. 4, p. 95-103, doi: 10.1023/A:1021881319271, 2003.

MULLIS K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, n. 155, p. 335-350, 1987.

PAIVA, M. P. Agressões à fauna. In: _____. **Conservação da Fauna Brasileira**. Rio de Janeiro: Interciência, 1999, p. 27-35.

PALUMBI, S. R.; CIPRIANO, F. Species identification using genetic tools: the value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. **The Journal of Heredity**, v. 89, n. 5, p. 459-64, 1998.

PARSONS, K. M. et al. Population genetic structure of coastal bottlenose dolphins (*tursiops truncatus*) in the northern bahamas. **Marine Mammal Science**, v. 22, p. 276-298, 2006.

PRADO, M. et al. Comparison of extraction methods for the recovery, amplification and species-specific analysis of DNA from bone and bone meals. **Electrophoresis**, v. 23, n. 7-8, p. 1005-1012, doi: 10.1002/1522-2683(200204)23:7/8<1005::AID-ELPS1005>3.0.CO;2-1, 2002.

PERES, C. A. Effects of subsistence hunting in vertebrate community structure in Amazonian forests. **Conservation Biology**, v. 14, p. 240-253, 2000.

RANDS, M. R. W. et al. (2010). Biodiversity Conservation: Challenges Beyond 2010. **Science**, v. 329, n. 5997, p. 1298-1303, doi: 10.1126/science.1189138, 2010.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. The Barcode of Life Data System. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x, 2007.

REDFORD, K. H.; ROBINSON, J. G. Subsistence and Commercial Uses of Wildlife in Latin America. In: _____. **Neotropical Wildlife Use and Conservation**, Chicago and London: The University of Chicago Press, 1991, p. 6-23.

RENTAS. **Primeiro Relatório Nacional sobre o Tráfico de Animais Silvestres**. Brasília, Rentas, 2001.

RODRIGUES, M. T. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 87-94, 2005.

ROE, D. et al. **Making a killing or making a living? Wildlife trade, trade controls and rural livelihoods**. Biodiversity and Livelihood Issues no. 6. London: IIED and TRAFFIC, 2002. p. 114.

- RONAGHI, M.; UHLEN, M.; NYREN, P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 363-365, doi: 10.1126/science.281.5375.363, 1998.
- ROSS, H.A. et al. DNA Surveillance: Web-Based Molecular Identification of Whales, Dolphins, and Porpoises. **Journal of Heredity**, v. 94, n. 2, p. 111–114, doi: 10.1093/jhered/esg027, 2003.
- SABINO, J.; PRADO, P. I. Vertebrados. In: LEWINSOHN, T.M. **Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira**. 2.ed. Brasília: MMA, 2005. p. 55-144.
- SHOCHAT, E. et al. Invasion, Competition, and Biodiversity Loss in Urban Ecosystems. **BioScience**, v. 60, n. 3, p. 199-208, 2010.
- SOLE-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: HOLOS, 2001. p. 172-187.
- TOBE, S. S.; LINACRE, A. M. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial *cytochrome b* gene. **Electrophoresis**, v. 29, n. 2, p. 340-347, 2008.
- TORRES, R. A. Molecular taxonomy of *Plagioscion* (Perciformes, Sciaenidae) and evidence from mtDNA RFLP markers for an invasive species in the Paraná river, southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, p. 1235-1242, 2006.
- VERKAAR, E. L. C. et al. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. **Meat Science**, v. 60, p. 365-369, 2001.
- VERMA, S.K.; L. SINGH. Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application. **Molecular Ecology Resources**, v. 3. n. 1, p. 28–31, doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00340.x, 2003.
- WAN, Q. H.; S. G. FANG. Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species. **Forensic Science International**, v. 131, n. 1, 75–78, 2003.
- WOLF, C. et al. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Differentiation of Fish Species. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 33, n. 2. p. 144-150, doi:10.1006/fstl.2000.0630, 2000.
- YAN, P. et al. Identification of Chinese alligators (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial *cytochrome b* gene. **Biological Conservation**, v. 121, p. 45–51, doi:10.1016/j.biocon.2004.04.008, 2005.
- YAU, F. C. F. et al. Authentication of snakes used in Chinese medicine by sequence characterized amplified region (SCAR). **Biodiversity and Conservation**, v. 11, n. 9, p. 1653–1662, doi: 10.1023/A:1016836017903, 2002.

CAPÍTULO 2

ZOOLOGIA 21 (1): 133–138, February, 2011
doi: 10.1590/S1984-4670.2011000100015

SHORT COMMUNICATION

Single nucleotide polymorphisms from cytochrome b gene as a useful protocol in forensic genetics against the illegal hunting of manatees: *Trichechus manatus*, *Trichechus inunguis*, *Trichechus senegalensis*, and *Dugong dugon* (Eutheria: Sirenia)

Paula Braga Ferreira¹; Rodrigo A. Torres² & José Eduardo Garcia^{1,3}

¹ Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, Bela Vista, 55608-630 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

² Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental, Departamento de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Nelson Chaves, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

³ Corresponding author. E-mail: jegarcia30@gmail.com

ABSTRACT. The identification of mitochondrial DNA polymorphisms is one of the most efficient methods for species differentiation. Genotyping of molecular markers using PCR/RFLP is a reliable, sensitive and inexpensive method for the detection of species specific mutations. The major causes of decline in Sirenia populations are accidental and intentional catches, collisions with boats and habitat loss. The goal of the present study was to identify *in silico*, nucleotide mutations in the cytochrome b gene that can be used for the future development of forensic tools capable of using small tissue fragments to discriminate manatee meat from domesticated species meat commonly used as food sources (bovine, ovine, caprine and swine). DNA sequence alignments revealed two polymorphic sites distinguishing the manatee species from domestic species. The present study reinforced the power of cytochrome polymorphism as powerful markers for species identification, which may be particularly useful for identifying vulnerable/endangered species. The data provided herein also suggest such mtDNA markers as important conservation tools for combating predatory manatee hunting for illegal meat trade in the Americas.

KEY WORDS. Bushmeat; forensic marker; overhunting; SNPs.

The hunting of tropical wildlife has historically been conducted for subsistence consumption and for local trade. But current trends in wildlife harvest from across the globe suggest that the volume of extraction of wild game, or "bushmeat", has increased considerably, and many species are in sharp decline due to over exploitation (Auerbach *et al.* 2007, Bennett *et al.* 2007, Minna-Gilliam *et al.* 2003, Redford 1992, Eaton *et al.* 2009). Species identification based on DNA analyses using biological material obtained from illegal hunting has been used in forensic genetics in European and African countries where hunting is prohibited. The identification of mitochondrial DNA polymorphisms is one of the most efficient methods of species differentiation.

Molecular markers such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) can be detected using methods such as polymerase chain reaction (PCR)/restriction fragment length polymorphism (RFLP), which are reliable, sensitive and inexpensive. These methods can be used for the detection of species-specific mutations, which enable classification of samples within a molecular

taxonomy perspective (Morris *et al.* 2004, Gonzalez *et al.* 2009). Variation within the cytochrome b gene has been found to be one of the most useful genetic markers for species discrimination (Miyata 1994, Palo & Mitter 2003, Riedel *et al.* 2003, Yan *et al.* 2005, Torres 2006, Passon *et al.* 2000). SNPs can be broadly defined as any single base substitution/indel in the genome of an individual (Pavani *et al.* 2002). The ability to identify wildlife products, whether as processed meat, skins or whole animals, is possible through by the development of DNA sequence databases using a standardized gene fragment (Ratnaingram & Hesser 2007, Ross *et al.* 2003, Eaton *et al.* 2009).

Given that the prospecting of SNPs is still dependent of a prior knowledge of the species genome, Atkins *et al.* (2004) tested a method to determine the feasibility of using previously published comparative anchor tagged sequences (CATS) in order to find SNPs for mammal species with poorly known genomes. The authors demonstrated that, for most mammals, the targeted locus approach might provide an efficient and cost-effective method of discovering SNPs.

SACCHIS et al. (2009) established a SNP genotyping assay for detection of genetic variation in coding regions associated with coat-color alleles, phylogenetically basal mitochondrial mutations, sex markers, and non-coding parts of the fox genome. MALHA et al. (2006) described a protocol based on restriction enzyme digestion of PCR amplicons (PCR/RFLP) from a cytochrome b gene fragment that is useful in the identification of 13 wild African species directly affected by illegal hunting. DNA sequences have been used as complementary tools to construct phylogenies, determine population structure and identify species in different conservation programs directed at marine mammals (BARTZ & PALUMBI 1994, PARSONS et al. 2006, WOLF et al. 2007, GILBERT et al. 2008).

Sirenia is an order of aquatic, strictly herbivorous mammals divided into two families: Trichechidae, with three species – *Trichechus manatus* Linnaeus, 1758, *Trichechus senegalensis* Link, 1795, *Trichechus inunguis* (Natterer, 1883) –; and Dugongidae, with one extant species – *Dugong dugon* (Müller, 1776) – and one extinct species – *Hydroseamalis gigas* (Zimmermann, 1780). The major cause of this extinction was extreme hunting in the 18th century (BISTA et al. 2006). The distribution range of these species is restricted to warm waters in tropical, subtropical and equatorial areas (VASSA et al. 2006).

According to the Red List of the International Union for the Conservation of Nature (IUCN 2010), all manatee species are considered vulnerable (VU). Moreover, *T. manatus*, *T. inunguis* and *D. dugon* are listed in CITES (Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna) Appendix I and *T. senegalensis* are listed in CITES Appendix II (CITES 2010). Appendix I lists species that are the most endangered among CITES-listed animals and plants and Appendix II lists species that are not necessarily now threatened with extinction but that may become so unless trade is closely controlled.

The major causes of decline in Sirenia populations are accidental and intentional catches, collisions with boats and habitat loss (LIMA et al. 2007). Both Brazilian manatees (*T. manatus* and *T. inunguis*) have been exploited by predatory hunting since the 16th century (LIMA et al. 2008). BAR (1982, 1984) estimates that between 1935 and 1954, 10,000 Amazon manatees (*T. inunguis*) were killed yearly.

In the northern Brazilian coast, marine manatees are still essentially captured for meat consumption (LIMA et al. 2008). Due to the large sizes of the specimens, hunters also sell part of the meat in order to make some additional money. The leather of the manatees is used as medicine (poultice) in cuts and swelling, and as tea. The fat is used as medicine, as well as being used to maintain and fry the flesh of the manatee (LIMA et al. 2008).

Currently, bioinformatics is essential for the manipulation of biological data, when combined with molecular biology tools allows the development of *in silico* studies involving genetic resource conservation, remodeling phylogenetic, as-

essment of gene dispersal and search of genomic markers (ROSSI & MARTELLA 2006).

The GenBank, one of the most complete and popular sequence databases, has more than 100 million nucleotide sequences from thousands of species. This enormous quantity of data offers an immense possibility for research and new discoveries. The *in silico* analysis is an obligatory first step to work with SNPs, mainly when the species studied is rare and endangered. Thus, the goal of the present study was to identify, *in silico*, nucleotide mutations in the cytochrome b gene capable to differentiate manatee meat from domestic species meat, commonly used as food sources. For such purposes, complete and partial Cytochrome b sequences from *T. manatus*, *T. inunguis*, *T. senegalensis*, and *D. dugon* were retrieved from GenBank in FASTA format. A local database was created using these manatee sequences and additional sequences from four domestic species, thereby allowing further comparisons (Tab. 1).

Table 1. List of species studied, with GenBank Access Number.

Species	GenBank Access Number
<i>Bos indicus</i>	EF061244
<i>Ovis aries</i>	DQ903227
	D84205
<i>Capra hircus</i>	EU351133
	D84201
<i>Sus scrofa</i>	AB376964
	AY832174
<i>Trichechus manatus</i>	AY965883
	AY965884
	AY965885
	AY965886
	D83050
<i>Trichechus inunguis</i>	AY965887
	AY965888
	AY965889
	AY965890
<i>Trichechus senegalensis</i>	AY965880
	AY965881
	AY965882
<i>Dugong dugon</i>	U07364
	AY075116

Nucleotide similarities between sequences were identified using the Sequencher 4.8 program (Gene Codes). Sequence alignments were performed with Clustal W of the BioEdit 6.0.7 pro-

gram (Hall 1999). Data mining of the alignments and minor adjustments were performed by eye. Nucleotide polymorphisms and restriction enzyme sites were found using the Cleaver software (Jarman 2005). After this procedure, we used the pDRAW 32 software v. 1.1.106 (Acalone 2005) for selection of these enzymes and the generation of virtual gel electrophoresis.

The local database comprised five sequences obtained from *T. manatus*, four sequences from *T. inunguis* (615 bp) and seven complete sequences (1140 bp) from domestic animals. The alignments revealed five polymorphic sites distinguishing the manatee species from domestic species. Such SNPs were related to restriction enzyme digestion sites (Tab. II). Two additional sites were capable of differentiating the manatee species (light-gray sites in Tab. II).

A global analysis of the local database was carried out by adding three Cytochrome b sequences from *T. senegalensis* and two sequences from *D. dugon* (615 bp). The alignments revealed two polymorphic sites distinguishing all manatee species from domestic species. These SNPs were discriminated by restriction enzyme digestion with BstNI and EcoRV (Tab. II). Two additional sites were capable of differentiating part of the manatee species as explained further in the text (light-gray sites in Tab. II). A total of four enzymes were identified as efficient in detecting seven diagnostic SNPs (Tab. II).

Analyzing the virtual gel electrophoresis it was observed that, by using the enzymes BstNI and EcoRV, it is possible to distinguish between domestic species and manatees (Fig. 1). To discriminate *T. inunguis* from *T. manatus*, *T. senegalensis*, and *D. dugon* we used the enzyme HpyCH4III that yielded distinct RFLP profiles (Fig. 2). In addition, the enzyme MwoI also diagnosed the manatee species (Fig. 2). It is important to emphasize that this protocol is unable to differentiate between *T. manatus* and *T. senegalensis* at the cytochrome b gene.

The present study reinforced the potential use of cytochrome b polymorphisms as powerful markers for species identification, especially in vulnerably endangered species, such as manatees. The data provided herein should be useful as conservation tools for combating predatory manatee hunting for illegal meat trade.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge Fundação de Amparo à Pesquisa e Tecnologia do Estado de Pernambuco for grants and P.B.F. fellowship (Process APQ-0402-2.01/8 and IBPG-1483-2.01/08), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for R.A.T. fellowship.

LITERATURE CITED

- ACALONE, 2009. Pdraw 32 v. 1.1.136. Freeware available online at: <http://www.acalone.com> [Accessed: 02. VIII. 2009].
- AREEN, N.; S. SMITH; C. SCHWARTZ & P.A. MORN. 2004. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in mammals: a targeted-gene approach. *Molecular Ecology* 13 (6): 1423-1431. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02159.x.
- ARRECHES, L.; D.W. MACDONALD; P.J. JOHNSON; R. CASTELO & J.E. FA. 2007. Faunal loss from bushmeat hunting: empirical evidence and policy implications in Bioko Island. *Environmental Science and Policy* 10 (7-8): 654-667. doi: 10.1016/j.envsci.2007.04.007.
- BATES, C.S. & S.R. PALMBER. 1994. Which Whales Are Hunted? A Molecular Genetic Approach to Monitoring Whaling. *Science* 265 (5178): 1538-1539.
- BENNETT, E.L.; E. BLINOWE; K. BRIDGES; D. BROOME; R.W. BURE; G. CHANILLAS; G. DARTY; H. DUBRE; J.F. FA; F.J. MINERS; GILLIS; ANDY.

Table II. Sequence positions of SNPs and diagnostic restriction enzymes. (PS) Polymorphic site related to the cytochrome b complete sequence of *T. manatus* (NC_010302). Dark-gray sites are diagnostic SNPs between domestic species and manatee species. Light-gray sites are diagnostic SNPs between manatee species.

Enzymes	PS	<i>B. indicus</i>	<i>O. aries</i>	<i>C. hitus</i>	<i>S. scrofa</i>	<i>T. manatus</i>	<i>T. inunguis</i>	<i>T. senegalensis</i>	<i>D. dugon</i>
BstNI	279	G	A	A	A	C	C	-	-
BstSI	646	A	A	A	A	G	G	-	-
XcmI	380	A	A	A	A	T	T	-	-
BstNI	474	A	A	A	A	C	C	C	C
EcoRV ¹	243	C	A	C	C	C	C	C	T
	411	A	A	A	A	G	G	G	A
HpyCH4III ²	367/432/580	G/N/A	A/N/A	A/N/A	G/N/G	A/N/G	A/N/A	A/N/G	G/N/A
MwoI ³	259/580	G/A	G/A	G/A	G/G	G/G	G/A	G/G	G/A

¹ One restriction site in position 243 only in *D. dugon* and another restriction site in position 411 in *T. manatus*, *T. inunguis*, and *T. senegalensis*. ² Three restriction sites for HpyCH4III, and the position 580 is useful on discriminating *T. manatus* and *T. senegalensis* from *T. inunguis* and *D. dugon*. N indicates any nucleotide. ³ Two restriction sites for MwoI and the position 580 is also useful on discriminating *T. manatus* and *T. senegalensis* from *T. inunguis* e *D. dugon*.



Figure 1. Virtual gel electrophoresis of Cytochrome b RFLP profiles for the four domestic species and for four manatee species under consideration. The Cytochrome b fragment is digested with *BamI* (394+221 bp) (A), *EcoRV* (338+277 bp or 449+166 bp) (B) only in the *T. inunguis*, *T. manatus*, *T. senegalensis* and *D. dugon*. Identification of (I) *Bos indicus* Linnaeus, 1758; (II) *Capra hircus* Linnaeus, 1758; (III) *Ovis aries* Linnaeus, 1758; (IV) *Lus scrofa* Linnaeus, 1758; (V) *T. inunguis*; (VI) *T. manatus*; (VII) *T. senegalensis*; (VIII) *D. dugon*.

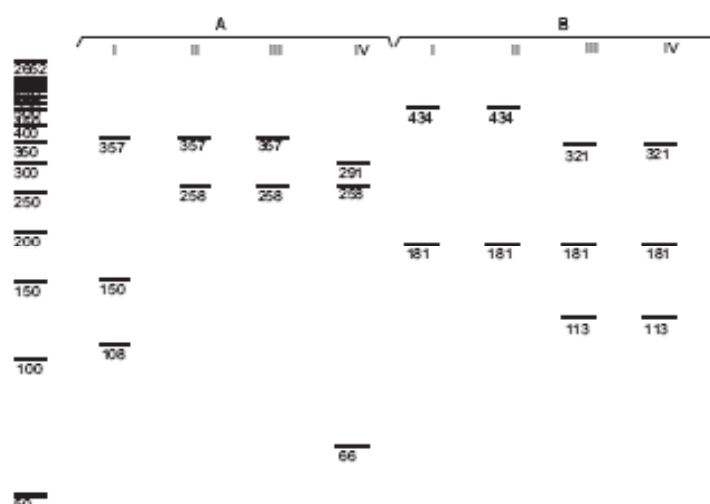


Figure 2. Virtual gel electrophoresis of Cytochrome b RFLP profiles for the four manatee species under consideration. The Cytochrome b fragment is digested with *HpyCH4III* (A) which yields a distinct RFLP profile of 357+156+108 bp (*T. inunguis*) (I); 357+258 bp (*T. manatus* and *T. senegalensis*) (II and III); 291+258+66 (*D. dugon*) (IV). Digestion with *MwoI* (B) yields distinct RFLP profiles of 434+181 bp (*T. inunguis* and *D. dugon*) (I and II), and 321+181+113 bp (*T. manatus* and *T. senegalensis*) (III and IV).

- J.G. ROBINSON; J. MARCIS ROWCLIFFE; E.M. UNDERWOOD & D.S. WILKIN. 2007. Hunting for consensus: reconciling bushmeat harvest, conservation, and development policy in west and central Africa. *Conservation Biology* 21 (3): 884-887. doi: 10.1111/j.1523-1739.2006.00595.x.
- BERTA, A.; J.L. SUMICH & K.M. KOVACH. 2006. *Marine Mammals: Evolutionary Biology*. San Diego, Academic Press, 2nd ed., 547p.
- BEIT, R.C. 1982. A salvação de uma espécie: Novas perspectivas para o peixe-boi da Amazônia. *Revista IBM* 14: 1-9.
- BEIT, R.C. 1984. *Trichechus inunguis*: Vulgo peixe-boi. *Ciência Hoje* 2 (10): 66-73.
- CITES. 2010. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Appendices I, II and III, available online at: <http://www.cites.org>. [Accessed: 04.VII.2010].
- EATON, M.J.; G.L. MEYER; S.O. KOLLODITIS; M.S. ISSUE; A.P. MARTIN & G. AMATO. 2009. Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conservation Genetics* 11 (4): 1389-1404. doi: 10.1007/s10592-009-9967-0.
- GILLET, R.M.; B.N. WHITE & R.M. ROLLAND. 2008. Quantification and genetic profiling of DNA isolated from free-floating feces of the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*). *Marine Mammal Science* 24 (2): 341-355. doi: 10.1111/j.1748-7692.2008.00192.x.
- GONZÁLEZ, S.; J.E. MALDONADO; J. ORTEGA; A.C. TALARICO; L. BIDEGARAY-BATISTA; J.E. GARCIA & M.B. DUARTE. 2009. Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia: Cervidae). *Molecular Ecology Resources* 9: 754-758. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02390.x.
- HALL, T.A. 1998. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- IUCN. 2010. Red List of Threatened Species. World Conservation Union, available online at: <http://www.iucnredlist.org>. [Accessed: 04.VII.2010].
- JARMAN, S.N. 2006. Cleaver: software for identifying taxon specific restriction endonuclease recognition sites. *Bioinformatics* 22 (17): 2160-2161. doi: 10.1093/bioinformatics/btl330.
- LIMA, R.P.; C.M.C. ALVITE & J.E. VERGARA-PARENTE. 2007. Protocolo de Reintrodução de Peixes-bois marinhos no Brasil. Brasília, Itama, 62p.
- LUNA, E.O.; J.P. ARAÚJO; R.F. LIMA; M.M. PEISANHA; R.J. SOARES & J.Z.O. PARANHANTE. 2001. Captura e utilização do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) no litoral Norte do Brasil. *Biomas* 21 (1): 115-123.
- MALHA, A.L.; P. GWAKHA; S. BALHAZARY; S.K. WASHIR & B.M. MUTAYORA. 2006. The potential of mitochondrial DNA markers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for domestic and wild species identification. *African Journal of Biotechnology* 5 (18): 1588-1593.
- MEYER, A. 1954. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 278-280.
- MEYER-GILLAND E.J.; E.L. BENNETT & THE SCB 2002 ANNUAL MEETING WILD MAMMALS GROUP. 2003. Wild meat: the bigger picture. *Trends in Ecology & Evolution* 18 (7): 351-357. doi:10.1016/S0169-5347(03)00123-X.
- MORIN, P.A.; C. LUIKART; R. K. WATSON & THE SNP WORKSHOP GROUP. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 19 (4): 208-216. doi:10.1016/j.tree.2004.01.009.
- PALO, J.U. & J. MEJILA. 2003. A simple RFLP method for identification of two rapid frogs. *Conservation Genetics* 4: 801-803.
- PARSON, W.; E. PEGORARO; H. NIEDERSTÄTTER; M. FÖGER & M. STINCHBISSE. 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 114: 23-28.
- PARSON, K.M.; J.W. DURRAN; D.E. CLARIDGE; D.L. HERRING; K.C. BALCOMB & L.R. NORRIS. 2006. Population genetic structure of coastal bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the northern Bahamas. *Marine Mammal Science* 22 (2): 276-298. doi: 10.1111/j.1748-7692.2006.00019.x.
- PRIMMER, C.R., T. BORG, J. LINDELL & G.-E. SAETHE. 2002. Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Molecular Ecology* 11 (3): 605-612. doi: 10.1046/j.0962-1083.2001.01452.x.
- RATNAINGRAM, S. & E.D.N. HEART. 2007. The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes* 7 (3): 355-364. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
- REDFORD, K.H. 1992. The empty forest. *Bioscience* 42 (6): 412-422.
- RIDDELL, A.E.; K.L. PIERRE; L.S. MILLS; K.S. McELVEY & L.F. RUGGIERO. 2003. Identification of mustelids using mitochondrial DNA and non-invasive sampling. *Conservation Genetics* 4: 241-243.
- ROSI, H.A.; G.M. LINTO; M.L. DALLEROUT; M. GOODE; G. EWING; E. McCLAREN; A.G. RODRIGO; S. LAYRY & C. S. BAKER. 2003. DNA Surveillance: Web-Based Molecular Identification of Whales, Dolphins, and Porpoises. *Journal of Heredity* 94 (2): 111-114. doi: 10.1093/jhered/egs027.
- ROSH, F.H.J. & M.B. MARTILLA. 2006. DNA test to sex the lesser rhea (*Rhea pennata pennata*). *British Poultry Science* 47: 375-377.
- SACKS, B.N.; D.I. VÄGE & M.J. STATHAK. 2009. A medium-throughput SNP assay for detecting genetic variation in coding and non-coding portions of the red fox genome. *Conservation Genetics Resources* 1 (1): 459-463. doi: 10.1007/s12686-009-9106-8.
- TORRES, R.A. 2006. Molecular taxonomy of *Plagiodont* Heckel

- (Perciformes, Sciaenidae) and evidence from mtDNA RFLP markers for an invasive species in the Paraná river, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23 (4): 1235-1242.
- VIANNA, J.A.; R.K. BONDI; S. CABALLERO; J.F. GERALDO; R.F. LIMA; A. CLAIR; M. MARMONTEL; B. MORALES-VELA; M.J. DE SOUZA; L. PASS; M.A. RODRIGUEZ-LOPEZ; A.A. MIGNUCCI-GUARNONI; J.A. POWELL & F.R. SANTOS. 2006. Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichachid sisanians: implications for manatee conservation. *Molecular Ecology* 15 (2): 433-447. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02771.x
- WOLF, J.B.; D. TAUTZ & E. TRILLMICH. 2007. Galapagos and Californian sea lions are separate species: Genetic analysis of the genus *Zalophus* and its implications for conservation management. *Frontiers in Zoology* 4: 20. doi: 10.1186/1742-9994-4-20.
- YAN, F.; X.-B. WU; Y. SHI; C.M. GU; R.F. WANG & C.L. WANG. 2005. Identification of Chinese alligators (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome b gene. *Biological Conservation* 121: 45-51. doi:10.1016/j.bioccon.2004.04.008.

Submitted: 05.V.2010; Accepted: 30.XII.2010.
Editorial responsibility: Lorenzo R.S. Zanetta

CAPÍTULO 3

ARTIGO A SER SUBMETIDO NA REVISTA CONSERVATION GENETICS RESOURCES (ISSN: 1877-7260)

Identification of paca (*Agouti paca*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome b gene: Implication to the detection and monitoring of illegal trade

Silva-Neto, A.A.¹; Ferreira, P.B.¹; Torres, R.A.²; Texeira, R.H.T.F.³; Duarte, J.M.B.⁴; Barbosa, A.C.⁵; Vargas, R.C.⁵; Garcia, J.E.¹

1. Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão / PE. CEP: 55608-680, Brazil
 2. Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental, Departamento de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, Recife / PE. CEP: 50670-901. Brazil
 3. Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros – Sorocaba / SP
 4. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal
 5. Instituto Federal Minas Gerais – Bambuí / MG
- e-mail: jegarcia30@gmail.com

ABSTRACT. Belonging to the family Agoutidae, paca (*Agouti paca*) is the second largest rodent in the Brazilian fauna. The meat quality and the strong tradition of hunting are contributing factors to the decline in their populations throughout its distribution. Hunting, capturing and trading of Agouti paca are strictly banned, however, raising and trading of the domestic individual are permitted. In spite of the prohibition of hunting, there are no tools available to identify paca meat in forensic tests. Here we describe a simple, fast and efficient way to differentiate biological material of paca from those from domestic species commonly used as food sources based on nucleotide mutations in the cytochrome b gene. We designed a pair of degenerate primers capable on amplifying a standard fragment size of approximately 298bp for all studied species. The amplification product contains a BsiEI digestion site only in Paca, that show a specific profile with 237 + 61 bp. The identification of samples paca was possible in 100% of the analyzed material, demonstrating that the methodology proposed here is reliable, fast, and can be used not only in forensic analysis.

KEY WORDS: Agouti paca; Cytochrome b; forensic markers; bushmeat

INTRODUCTION

Poaching is an important factor in the decline and extinction of species in nature (Cullen Jr. et al. 2000). The hunting of tropical wildlife has historically been conducted for subsistence consumption and for local commerce. Nowadays, wild game is still a significant factor on the declining of natural population due to the trade at regional and international scales (Eaton et al. 2009). There are many traditional uses for wildlife such as religion, pets and the meat due to its exotic taste or as the single protein source for poor and isolated population. Over exploitation of wild population can be the major cause of local extinction and depends on its extension, it should cause global extinction (Alacs et al. 2009).

Despite the existence of legislation and treaties governing the wildlife trading, such as the Convention on the International Trade of Endangered Species (CITES), a common problem in wildlife enforcement is the lack of a reliable method for identification of samples from suspected illegal products, such as skins and processed meat, once traditional identification methods, like morphological analyses are not always viable. To improve the ability to detect, monitor and control the wildlife and wildlife products traffic and consumption, accurate and efficient methods of species identification based in DNA analysis should be required (Eaton et al. 2009).

The exploring of globally available database of DNA sequences from standardized gene region, such as Cytochrome c oxidase subunit I and Cytochrome b, has been proposed as an important tool for species identification contributing to assess genetic diversity and monitoring the legal and illegal trade in wildlife species and their products (Eaton et al. 2009; Ratnasingham and Hebert 2007; Yan et al. 2005; Moore et al. 2003; Ross et al. 2003). Molecular markers such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) can be detected using the polymerase chain reaction (PCR) followed by digestion with specific restriction enzymes (PCR/RFLP). The application of this methodology at the cytochrome b mitochondrial gene has been extensively used for species identification and processed meat products (e.g. sausages) (Meyer et al. 1995), once it is an accurate, reliable, sensitive and low cost method (Meyer 1994; Palo and Merilä 2003; Riddle et al. 2003; Yan et al. 2005; Wolf et al. 2000). Malisa et al. (2006) described a protocol based PCR/RFLP from a cytochrome b gene fragment that was useful on the identification of 10 wild African species directly affected by illegal hunting. Belonging to the family Agoutidae,

paca(*Agouti paca*) is the second largest rodent in the Brazilian fauna. It occurs from Mexico to Argentina in various habitats such as forests, grasslands and cultivated areas (Nowak 1999).

The meat quality and the strong tradition of hunting are contributing factors to the decline in their populations throughout its distribution (Freitas and Silva 2005).

At this paper we show the development of a molecular tool for simple, fast and efficient identification of nucleotide mutations in the Cytochrome b gene, capable of differentiating biological material from paca from those of domestic species commonly used as food sources in the neotropics.

MATERIALS AND METHODS

In silico analyses

Partial Cytochrome b sequences from *Agouti paca* and complete sequences from four domestic species (*Bos indicus*, *Capra hircus*, *Sus scrofa* and *Ovis aries*) were retrieved from GenBank in FASTA format. A local database was created using those sequences and additional sequences from domestic species, thereby allowing further comparisons.

Nucleotide similarities were identified using Sequencher 4.8 (Gene Codes). Sequence alignments were performed using Clustal W (BioEdit 6.0.7) (Hall 1999) and minor adjustments were performed by eye. Nucleotide polymorphisms and restriction enzyme sites were found using the Cleaver (Jarman 2006). Degenerate primers capable of amplifying a homolog fragment in all species were designed using Gene Runner 3.0.5 (Hastings Software Inc.).

PCR and RFLP analyses

DNA was isolated from 22 muscle samples following the manufacturer protocol of the Qiaamp Blood and Tissue Kit (Qiagen Inc.). Tissue samples were collected from the Wild Animals Facilities from Animal Science Department UNESP / Jaboticabal (SP - Brazil) (n:10) and from the Minas Gerais Federal Institute campus Bambuí (MG – Brazil) (n:11). Samples from domestic animals were obtained at the public market (Olinda-Brazil / PE) and from University Federal Rural of Pernambuco (Brazil / PE). DNA samples were quantified in 1% agarose gel stained with Gel Red (Biotium, Hayward, CA, USA). PCR amplification was carried out in a final volume of 20 µl reaction using a pair of degenerate primers (Forw 5'CTYCCHRCYCCMTCHAAAT3' and Rev 5'GDAGRABKAYKCCRATRTTTC3'). PCR reaction

contained 1X buffer (LGC, Rio de Janeiro, Brazil), 2.5 mM MgCl₂, 2 mM of each dNTP, 20 pM/μl of each primer, 1 U Taq DNA Polymerase (LGC), and 50ng of DNA. The thermal profile included an initial denaturation step of 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of 92 °C for 2 min, 61 °C for 2 min, and 72 °C for 1.5 min. A final extension step of 72 °C for 10 min concluded the profile.

Amplicons were digested with 2U of BsiEI, according to the manufacturer's protocol. Digestion products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gel stained with Gel Red.

RESULTS

Twenty four partial sequences of *A. paca* were obtained from GenBank but only eight were polymorphic (AY206551, AY206552, AY206557, AY206563, AY206566, AY206567, AY206572, AY206573). All of the sequences had 395bp in average. Complete sequences (~1,200bp) of each domestic species (EF061244, DQ903227, D84205, EU350133, AB376964) were retrieved and aligned. Complete sequences were trimmed aiming to align with fragments of 395bp from *A. paca*.

The set of primers designed provided satisfactory results in the PCR reaction generating a standard fragment size of approximately 298bp for *A. paca* and all of the domestic species. The fragment contains the BsiEI digestion site in position 294 only for *A. paca* related to a substitution of adenine (domestic sequences) by cytosine (*paca* sequences) in restriction site. After digestion, a clear band of 237bp could be saw in 2% agarose gel in all samples from *A. paca* (Fig. 3.1). The lower band was not able to see in the gel. The digestion with this enzyme was not complete.

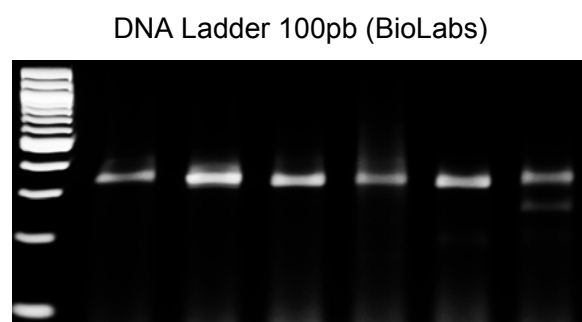


Figure 3.1. Gel electrophoresis of Cytochrome b PCR / RFLP profiles for the four domestic species (L1-L4) and for *Agouti paca* (L5). Using DNA Ladder 100pb (BioLabs). Samples L1- L4 are respectively *Bos indicus*, *Capra hircus*, *Sus scrofa* and *Ovis aries*, respectively (~298 bp); L5= Sample of *Agouti paca* not digested with BsiEI enzyme. L6 = *A. paca* partially digested with BsiEI enzyme (237+61bp).

DISCUSSION

At the present paper we described a simple and reliable protocol for identification of biological material from *A. paca* and its differentiation from samples of four domestic animals commonly used as food source in the neotropics (*Bos indicus*, *Sus scrofa*, *Ovis aries* e *Capra hircus*) Nowadays, the illegal hunting of *Agouti paca* for meat consumption in Brazil is lesser only than those impetrated against the armadillo (*Dasypus novemcinctus*) (Freitas and Silva 2005), and this should be an important factor on the reducing local and global populations of this species, considered the second largest rodent in South America.

Mitochondrial DNA (mtDNA) is usually choose for molecular species identification protocols due to the easiness of use in degraded or processed samples, when compared with nuclear DNA (nDNA), mainly because mtDNA are present in multiple copies per cell and nDNA have only one, compared to one copy of nDNA from each parent (Dawnay et al. 2007). In addition, mtDNA have maternal inheritance, lack recombination and high mutation rate, increasing the likelihood of discrimination between species (Malisa et al. 2006). Cytochrome b gene has been chosen for molecular identification of many vertebrate species impacted by illegal trade like sharks (Kumar et al. 2007), seals (Malik et al 1997), marine turtles (Moore et al. 2003), snakes (Yau et al. 2002) and felids (Prado et al. 2002; Verma and Singh 2003; Wan and Fang 2003; Ronaghi et.al 1998).

To discriminate meat products of the species examined at a level of certainty that will hold up in a court of law, one has to be certain that the probability of misassignment is extremely low, and then it is important to study the largest possible number of samples to assure that all possible variants of each species have been accounted for (Malisa et al. 2006).

CONCLUSIONS

The present study reinforced the potential use of Cytochrome b polymorphisms as powerful marker for species identification, especially in endangered species. The data provided herein should be useful as conservation tools for combating predatory *Agouti paca* hunting for illegal meat trade. With minimal efforts and simple PCR/RFLP protocols, cytochrome b sequences can be obtained of bushmeat and wildlife products. We supply a molecular tool to improve the bushmeat monitoring and investigation of origin of wildlife products.

REFERENCES

- Alacs EA, Georges A, Fitzsimmons NN, Robertson J (2009) DNA detective: a review of molecular approaches to wild live forensics. *Forensic Sci med pathol*. doi: 10.1007/s12024-009-9131-7.
- Cullen JR.L, Bodmer RE, Valladares-Padua C (2000) Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forest, Brazil. *Biol Conserv* 95: 49-56. doi:10.1016/S0006-3207(00)00011-2
- Dawnay N, Rob O, Ross M, Gary RC, Roger ST (2007) Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci Int* 173: 1–6. doi:10.1016/j.forsciint.2006.09.013
- Eaton MJ, Meyers GL, Kolokotronis SO, Leslie MS, Martin AP, Amato G (2009) Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conserv Genet*. doi: 10.1007/s10592-009-9967-0
- Freitas MA, Silva TFS (2005) Guia ilustrado mamíferos na Bahia: espécies continentais. USEB, Pelotas
- Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98
- Jarman SN (2006) Cleaver: software for identifying taxon specific restriction endonuclease recognition sites. *Bioinformatics* 22: 2160–2161. doi:10.1093/bioinformatics/btl330
- Kumar R, Singh PJ, Nagpure NS, Kushwaha B, Srivastava SK, Lakra WS (2007) A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales. *Indian J Exp Biol* 45: 992–997.
- Malik S, Wilson PJ, Smith RJ, Lavigne DM, White BN (1997) A pinniped penises in trade: A molecular-genetics investigation. *Conservation Biology* doi: 10.1046/j.1523-1739.1997.96125.x
- Malisa AL, Gwakisa P, Balthazarky S, Wasser SK, Mutayoba BM (2006) The potential of mitochondrial DNA markers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for domestic and wild species identification. *Afr J Biotechnol* 5: 1588–1593
- Meyer A (1994) Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends Ecol Evol* 9: 278-280
- Meyer R, Höfelein C, Lüthy J, Candrian U (1995) Polymerase chain reactionrestriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J Assoc off Anal Chem* 78: 1542-1551
- Moore MK, Bemiss JA, Rice SM, Quattro JM, Woodley CM (2003) Use of restriction fragment length polymorphisms to identify sea turtle eggs and cooked meats to species. *Conserv Genet* 4: 95-103. doi: 10.1023/A:1021881319271

- Nowak RM (1999) Walker's mammals of the world. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Palo JU, Merilä J (2003) A simple RFLP method for identification of two ranid frogs. *Conserv Genet* 4: 801–803. doi: 10.1023/B:COGE.00000006117.43571.6e
- Prado M, Franco C, Fente C, Cepeda A, Va'zquez B, BarrosVela'zquez (2002) Comparison of extraction methods for the recovery amplification and species-specific analysis of DNA from bone and bone meals. *Electrophoresis* 23: 1005–12 doi: 10.1002/1522-2683
- Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) The Barcode of Life Data System. *Mol Ecol Notes* 7: 355–364. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x
- Riddle AE, Pilgrim KL, Mills LS, McKelvey KS, Ruggiero LF (2003) Identification of mustelids using mitochondrial DNA and non-invasive sampling. *Conserv Genet* 4: 241–243. doi: 10.1023/A:1023338622905
- Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 281:363 doi: 10.1126
- Ross HA, Lento GM, Dalebout ML, Goode M, Ewing G, McLaren P, Rodrigo AG, Lavery S, Baker CS (2003) DNA Surveillance: Web-Based Molecular Identification of Whales, Dolphins, and Porpoises. *J Hered.* v. 94. n. 2. p. 111–114. doi: 10.1093/jhered/esg027.
- Verma SK, Singh L (2003) Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application. *Mol Ecol Notes* 3: 28–31 doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00340.x
- Wan QH, Fang SG (2003) Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species. *For Sci Int.*;131:75–8.
- Wolf C, Burgener M, Hübner P, Lüthy J (2000) PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Differentiation of Fish Species. *Lebensm Wiss und Technol* 33:144–150. doi:10.1006/fstl.2000.0630
- Yan P, Wu XB, Shi Y, Gu CM, Wang RP, Wang CL (2005) Identification of Chinese alligators (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome b gene. *Biol Conserv* 121: 45–51. doi:10.1016/j.biocon.2004.04.008
- Yau FCF, Wong KL, Shaw PC, But PPH, Wang J (2002) Authentication of snakes used in Chinese medicine by sequence characterized amplified region (SCAR). *Biodiv Conserv* 11: 1653–62. doi: 10.1023/A:1016836017903

ANEXOS

Normas da Revista Conservation Genetics Resources

Instructions for Authors

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

Save your file in doc format. Do not submit docx files.

Word template

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

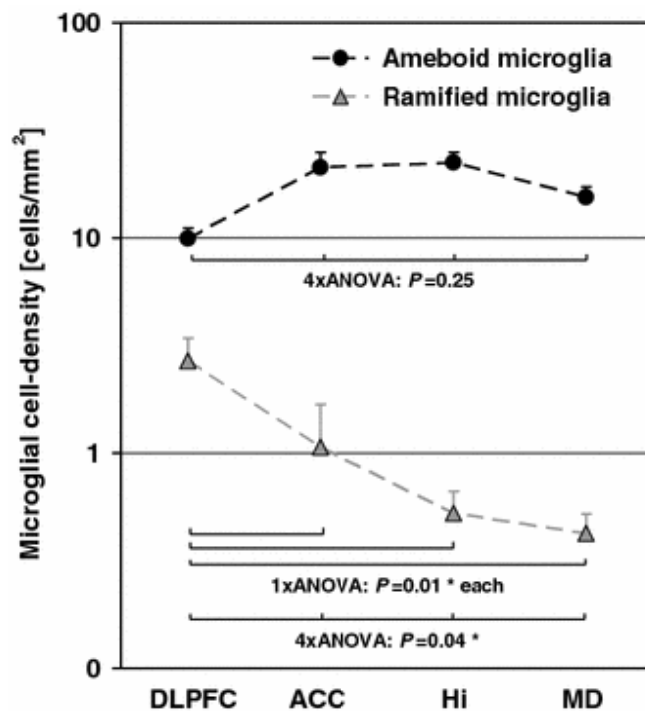
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

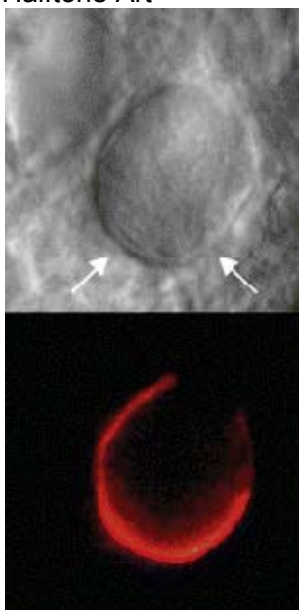
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

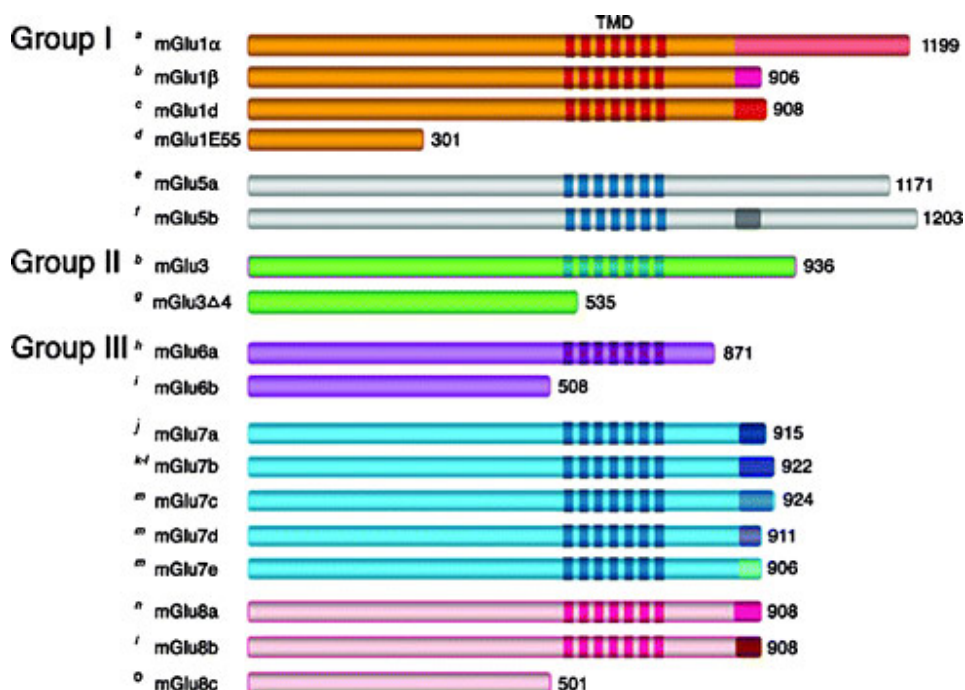


Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

