

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

ELIANA MICHELLE PAVIOTTI FISCHER

**Diversidade genética de *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758) em
áreas de Cerrado e Pantanal**

SÃO CARLOS, SP
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

TESE DE DOUTORADO

**Diversidade genética de *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758) em
áreas de Cerrado e Pantanal**

Eliana Michelle Paviotti Fischer

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências, com área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior
Co-orientador: Prof. Dr. Arnaud Léonard Jean Desbiez

SÃO CARLOS
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F529d Fischer, Eliana Michelle Paviotti
Diversidade genética de *Euphractus sexcinctus*
(Linnaeus, 1758) em áreas de cerrado e pantanal /
Eliana Michelle Paviotti Fischer. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
73 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. *Euphractus sexcinctus flavimanus*. 2.
Atropelamentos. 3. Genoma mitocondrial. 4.
Microssatélites. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Eliana Michelle Paviotti Fischer, realizada em 07/07/2016:

Prof. Dr. Irineu Bianchini Junior
UFSCar

Profa. Dra. Alexandra Sanches
UFSCar

Profa. Dra. Angela Terumi Fushita
UFSCar

Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte
UNESP

Profa. Dra. Marina Corrêa Côrtes
UNESP

Dedico este trabalho àqueles que amo: à família que Deus me deu, meus pais, irmã e sobrinha, e àquela que escolhi, meu marido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr., por compartilhar comigo seu conhecimento. Obrigada também por fazer de um grande laboratório um ambiente onde todos se sentem acolhidos. Professor, obrigada pela compreensão nos momentos difíceis e pelos conselhos que levarei para a vida toda.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Arnaud Desbiez, pelo entusiasmo, confiança e dedicação.

Aos membros dos Projetos Tatu Canastra Pantanal e Anta Pantanal por todas as amostras de atropelamentos e, em especial, aos pesquisadores Gabriel Massocato e Danilo Kluyber.

À Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas pelo apoio intelectual e pelo suporte de sempre, desde o mestrado.

Ao coordenador do meu Programa de Pós Graduação, Prof. Dr. Irineu Bianchini Jr., por presidir a minha banca.

À pesquisadora do Projeto Tamanduá, Flávia Miranda, pela sugestão da espécie de estudo, e por ter avaliado os primeiros textos deste trabalho. Flávia, obrigada por ter me apresentado esta espécie magnífica!

Ao Prof. Dr. Guilherme Mourão e à MSc. Nina Attias da Embrapa Pantanal pelas amostras dos animais de vida livre.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Profa. MSc. Gloria Victoria Castro Rojas, por ter me presenteado com dois livros maravilhosos, os quais me inspiraram e aumentaram ainda mais o meu amor pelos tatus. Gloria, obrigada pelo carinho!

À minha grande amiga MSc. Karen Rodriguez pelo auxílio nas análises dos atropelamentos. Iniciamos essa longa jornada da pós-graduação juntas, e dentre tantas coisas boas que levo para a minha vida, a nossa amizade certamente é uma delas. Obrigada por todo apoio!

À minha amiga Profa. Dra. Danielly Veloso Blanck por sempre compartilhar seu conhecimento incondicionalmente. Dany, obrigada pela amizade, por ter me auxiliado no

desenho dos *primers*, e principalmente por ter trazido tanta alegria para o laboratório com a chegada do Arthur.

À minha amiga e parceira de trabalho MSc. Karla Cháves-Congrains, pelos bons momentos e pela grande experiência de realizar um trabalho em sintonia como fizemos no artigo sobre o mitogenoma.

À Carmen Helena Barragan Ruiz pela ajuda na construção dos mapas.

À todos os meus colegas e amigos do laboratório, pessoas prestativas, alegres, sábias.

Aos meus pais por todo esforço para tornar a minha vida melhor. Mãe, obrigada pelos mimos, e por me ensinar a lutar incansavelmente pelos meus sonhos. Pai, obrigada por me mostrar todos os dias que a simplicidade é um bem maior.

À minha tia, Maria de Lourdes, por ter me ensinado as primeiras letras e números. Tia, obrigada por ter me ensinado o valor da educação.

Aos meus gatos por toda a diversão e companhia.

Ao meu marido por abdicar da minha companhia diária por tantos anos. Tenho certeza que colheremos juntos os frutos do nosso esforço. Obrigada, meu amor!

À minha irmã pelo amor incondicional. Obrigada pelas noites mal dormidas, por dirigir para mim quando meus braços não aguentavam mais, por cuidar do meu lar quando eu não tinha tempo e, principalmente, por ter me dado o melhor presente de todos: a Isadora.

À minha sobrinha, Isadora, por ter trazido luz à minha vida, no momento em que meus olhos estavam cegos de tanta tristeza. Obrigada por existir, meu amor!

“Os animais do mundo existem para seus próprios propósitos. Não foram feitos para os seres humanos, do mesmo modo que os negros não foram feitos para os brancos, nem as mulheres para os homens.”

Alice Walker

RESUMO

Euphractus sexcinctus é uma espécie de tatu endêmica do continente Sul Americano, que apresenta ampla distribuição geográfica e ocorre em todos os biomas brasileiros. Embora seja generalista, com certa tolerância às alterações ambientais, a espécie é muito ameaçada por pressões antrópicas, principalmente pelos atropelamentos. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo geral disponibilizar informações genéticas para a espécie, aumentando assim a compreensão sobre a distribuição de sua diversidade genética e sua estrutura genética populacional. Para acessar a diversidade genética da espécie, seu genoma completo foi sequenciado por sequenciamento de próxima geração. A partir dos dados do sequenciamento, o genoma mitocondrial completo da espécie foi montado. O mitogenoma foi considerado em nível de subespécie: *Euphractus sexcinctus flavimanus*. Além do mitogenoma, foram desenvolvidos marcadores nucleares do tipo microssatélites, os quais foram utilizados para avaliar a distribuição da diversidade genética da espécie em áreas de Cerrado e Pantanal. Foram utilizados marcadores moleculares para a identificação do sexo dos animais, já que o gênero dos mesmos não foi identificado durante as coletas. A possibilidade de realizar a sexagem molecular em tatus pode ser particularmente útil quando se estuda carcaças. Os dados obtidos para o genoma mitocondrial de *E. s. flavimanus* evidenciaram diferenças, principalmente na região controle (D-loop), em relação ao genoma mitocondrial de *E. sexcinctus* recentemente sequenciado. Quanto aos índices de diversidade genética, foram observados valores altos para a espécie em todas as áreas amostradas, o que é esperado para espécies não ameaçadas. As análises bayesianas e a AMOVA evidenciaram uma população panmítica de *E. sexcinctus* em parte do Mato Grosso do Sul, incluindo áreas de Cerrado e Pantanal. Tal fato não deve desencorajar, entretanto, medidas de conservação para a espécie, já que a análise de correspondência fatorial evidenciou que indivíduos de algumas áreas quase não se sobrepõem. Além disso, os valores de F_{ST} indicaram uma significativa, mas muito baixa, estruturação entre indivíduos do Cerrado e do Pantanal. A sexagem molecular indicou que machos são mais atropelados do que fêmeas em dois grandes trechos da BR262/MS. Foram encontrados diversos *hotspots* de atropelamentos. Esses dados são úteis para tomada de medidas mitigadoras. No entanto, dados mais detalhados sobre a paisagem do entorno tornam-se necessários para o melhor entendimento da distribuição dos atropelamentos nas rodovias amostradas e da ecologia dessa espécie de tatu.

Palavras-chave: *Euphractus sexcinctus flavimanus*; atropelamentos; genoma mitocondrial; microssatélites.

ABSTRACT

Euphractus sexcinctus is a species of armadillo endemic to the South American continent, that has wide distribution and occurs in all Brazilian biomes. Although generalist, with some tolerance to environmental changes, the species is very threatened by anthropogenic pressures, mainly by roadkill. Therefore, this study aimed to provide genetic information for the species, increasing the understanding of the distribution of genetic diversity and its population genetic structure. To access the genetic diversity of the species, its complete genome was sequenced by next generation sequencing. From the sequencing data, the complete mitochondrial genome was assembled. The mitogenoma was considered as subspecies level: *Euphractus sexcinctus flavimanus*. Besides mitogenoma nuclear microsatellites markers were developed. These microsatellites were used to evaluate the distribution of genetic diversity of the species in areas of Cerrado and Pantanal. Molecular markers were used to identify the sex of the animals, since this identification was not performed during collection. The possibility of molecular sexing in armadillos can be useful, especially when studying carcasses. The data for mitochondrial genome of *E. s. flavimanus* showed differences, mainly in the control region (D-loop) in comparison to the mitochondrial genome of *E. sexcinctus* recently sequenced. Regarding the genetic diversity rates, high values were observed for the species in all sampled areas, which is expected to not endangered species. The Bayesian analysis and the molecular variance (AMOVA) analysis exposed a panmitic population of *E. sexcinctus* in part of the Mato Grosso do Sul, including areas of Cerrado and Pantanal. This fact should not discourage, however, conservation measures for the species, as thought he factorial correspondence analysis (FCA) showed that individuals in some areas barely overlap. In addition, the F_{ST} calculations indicated a significant, but very low, structuration between individuals of cerrado and Pantanal. Molecular sexing showed males are more run dwon than females in two large sampled portions of the BR262. Data on roadkill showed several hotspots roadkill. This data is useful for taking mitigating measures. However, more detailed data about the surrounding landscape become necessary to better understand the distribution of roadkill on highways sampled and ecology of this species of armadillo.

Keywords: *Euphractus sexcinctus flavimanus*; roadkill; mitochondrial genome; microsatellites.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** DNA mitocondrial em humanos. Genes codificadores das subunidades do complexo I (ND1, ND6, ND4 e ND4L) em azul; citocromo c oxidase (COI, COII e COIII) em vermelho; citocromo b do complexo III em verde; e subunidades da ATP sintase (ATPase 6 e 8) em amarelo. RNAs ribossomais (rRNA 12S e rRNA 16S) em roxo. Os 22 tRNAs em preto. Região controle (D-loop) em branco. O_H origem de replicação da fita pesada; O_L – origem de replicação da fita leve. Fonte: CHIAL; CRAIG (2008).....19
- Figura 1.2.** Estrutura secundária atípica do tRNA-Cys da espécie de tatu *Dasypus novemcinctus* (a) e estrutura típica de tRNA^{cys} para mamífero, no caso, de uma vaca (b). Fonte: Arnason *et al.* (1997).....20
- Figura 1.3.** *Euphractus sexcinctus*. Foto: Arnaud Desbiez.....24
- Figura 1.4.** Distribuição geográfica da espécie *Euphractus sexcinctus*. Fonte: IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2014. *Euphractus sexcinctus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2015-4.....25
- Figura 3.1.** Mapa do Brasil destacando áreas dos biomas Cerrado e Pantanal e os pontos de coleta das amostras. Em destaque as áreas amostradas, as estradas e os pontos de coleta.....39
- Figura 3.2.** Resultado da análise Bayesiana para a determinação de agrupamentos para 114 indivíduos de *E. sexcinctus*, indicando $K=1$ como valor mais provável.....48
- Figura 3.3.** Probabilidades de atribuição de indivíduos de *E. sexcinctus* para $K=3$. Cada linha na vertical representa um indivíduo, que possui probabilidades diferentes de ser atribuído a cada um dos *clusters*, indicados pelas distintas cores. Os indivíduos estão ordenados de acordo com sua população de origem. População 1: Cerrado 1; População 2: Cerrado 2; População 3: Cerrado 3; População 4: Pantanal.....49
- Figura 3.4.** Gráfico de análise de correspondência fatorial (FCA). Cerrado 1 (pontos em amarelo); Cerrado 2 (pontos em azul); Cerrado 3 (pontos em branco), Pantanal (pontos em cinza).....49
- Figura 4.1.** Rodovias do Mato Grosso do Sul amostradas com os pontos de atropelamentos de *E. sexcinctus*.....55
- Figura 4.2.** Gel de sexagem evidenciando duas bandas para machos e apenas uma banda para fêmea (ausência de amplificação para a amostra dois).....58

Figura 4.3. Gel de sexagem evidenciando a amplificação de diferentes tipos de amostras. Ausência de amplificação para as amostras 19, 22 e 23. Amostras 1 e 2: pelo; amostras 3, 4, 5 e 6: tecido de animais capturados; demais amostras: tecido de animais atropelados.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Características dos pares de <i>primers</i> desenhados a partir dos <i>contigs</i> para a confirmação de sequências do mtDNA.....	32
Tabela 2.2. Caracterização do genoma mitocondrial completo de <i>Euphractus sexcinctus flavimanus</i> . ND1– 6, NADH desidrogenase, subunidades 1-6; COX1–3, citocromo oxidase c, subunidades 1-3; ATP sintase, subunidades 6 e 8; CYTB, citocromo b. Sinais + e - representam a fita H (pesada) e a fita L (leve), respectivamente.....	34
Tabela 3.1. Relação das áreas de atropelamentos amostradas e da distribuição de amostras de espécimes atropelados de <i>E. sexcinctus</i>	37
Tabela 3.2. Relação das áreas amostradas, tipo de material coletado e número de amostras. *Amostra utilizada para o sequenciamento de nova geração.....	38
Tabela 3.3. Locos polimórficos, sequências dos <i>primers</i> , motivo do microssatélite, temperatura de <i>annealing</i> definida após gradiente de temperatura, tamanho esperado do produto de PCR.....	45
Tabela 3.4. Características dos <i>loco</i> microssatélites desenvolvidos para <i>E. sexcinctus</i> . Número de alelos (N_a), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), índice de endocruzamento (F_{IS}), valores de P_L para déficit de heterozigotos, valores de P_S para excesso de heterozigotos. Após correção de Bonferroni $p = 0,00125$	46
Tabela 3.5. Distribuição hierárquica da variação genética de <i>E. sexcinctus</i> para 10 locos microssatélites em três situações distintas de agrupamento. Situação A: os grupos populacionais são correspondentes ao Pantanal/Cerrado 3/Cerrado 1 + Cerrado 2. Situação B: os grupos populacionais são correspondentes ao Pantanal/Cerrado 3 + Cerrado 1 + Cerrado 2. Situação C: os grupos populacionais são correspondentes Pantanal +Cerrado 1 + Cerrado 2 + Cerrado 3.....	47
Tabela 3.6. Índices de fixação estimados para três situações de agrupamento distintas. Valores significativos de p em negrito ($\alpha=0.05$).....	47
Tabela 3.7. Valores de F_{ST} (abaixo à esquerda) e de p (acima à direita) entre os pares de subpopulações de <i>E. sexcinctus</i> . Valores significativos para F_{ST} em negrito ($\alpha = 0.008$ – após correção de Bonferroni).....	48
Tabela 4.1. Dados sobre as estradas amostradas e o número de amostras obtido. *Tráfego apenas na BR163.....	55

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
APRESENTAÇÃO DA TESE	14
CAPÍTULO 1	15
1.1. INTRODUÇÃO	16
A RELAÇÃO ENTRE OS TATUS E OS SERES HUMANOS: IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO.....	16
CONSEQUÊNCIAS GENÉTICAS DAS ALTERAÇÕES AMBIENTAIS	17
DIVERSIDADE GENÉTICA E O GENOMA MITOCONDRIAL	18
OS MICROSSATÉLITES COMO FERRAMENTAS PARA ESTUDOS POPULACIONAIS	21
1.2. A ESPÉCIE DE ESTUDO: <i>Euphractus sexcinctus</i> (Linnaeus, 1758)	22
1.3. BIOMAS DA ÁREA DE ESTUDO: CERRADO E PANTANAL	26
1.4. PREMISSAS	27
1.5. OBJETIVOS	28
1.5.1. OBJETIVO GERAL	28
1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
CAPÍTULO 2	29
2. Caracterização do genoma mitocondrial completo de <i>Euphractus sexcinctus flavimanus</i> (Desmarest, 1804)	30
2.1. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.2. RESULTADOS	33
2.3. DISCUSSÃO	35
CAPÍTULO 3	36
3. Distribuição da diversidade genética e estrutura genética populacional de <i>Euphractus sexcinctus</i> em áreas de Cerrado e Pantanal	37
3.1. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1.1. Obtenção de amostras.....	37

3.1.2. Extração de DNA	39
3.1.3. Desenvolvimento dos marcadores microssatélites e padronização das reações de PCR.....	40
3.1.4. Análise dos dados: diversidade genética.....	41
3.1.5. Análise dos dados: estrutura populacional	42
3.2. RESULTADOS.....	43
3.2.1. Caracterização dos microssatélites e diversidade genética	43
3.2.2. Estrutura genética populacional	47
3.3. DISCUSSÃO	50
CAPÍTULO 4.....	53
4. Distribuição dos atropelamentos de <i>Euphractus sexcinctus</i> em rodovias do Mato Grosso do Sul: uma avaliação da mortalidade de machos e fêmeas.....	54
4.1. MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1.1. Obtenção de amostras.....	54
4.1.2. Extração de DNA e amplificação dos genes <i>SRY</i> e <i>Zinc Finger</i>	55
4.1.3. Análise dos dados.....	57
4.2. RESULTADOS	57
4.3. DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	72
Anexo 1. Alinhamento das sequências de D-loop de <i>Euphractus sexcinctus flavimanus</i> (KX151979) e de <i>Euphractus sexcinctus</i> (NC_028571.1).....	72
Anexo 2. Protocolo de extração de DNA utilizando o método salino de Aljanabi e Martinez (1997), com modificações.	73

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese foi dividida em quatro capítulos. Estes foram divididos da seguinte forma:

- **Capítulo 1:** Introdução. No primeiro capítulo foi realizada uma introdução geral sobre a problemática abordada na tese, sua espécie de estudo, premissas e objetivos.
- **Capítulo 2:** Caracterização do genoma mitocondrial completo de *Euphractus sexcinctus flavimanus* (Desmarest, 1804). Este capítulo aborda a montagem e caracterização do mitogenoma de *E. s. flavimanus* a partir de dados de sequenciamento de nova geração.
- **Capítulo 3:** Distribuição da diversidade genética e estrutura genética populacional de *Euphractus sexcinctus* em áreas de Cerrado e Pantanal. O terceiro capítulo faz uma análise da distribuição da diversidade genética de *E. sexcinctus* utilizando marcadores microssatélites.
- **Capítulo 4:** Distribuição dos atropelamentos de *Euphractus sexcinctus* em rodovias do Mato Grosso do Sul: uma avaliação da mortalidade de machos e fêmeas. O último capítulo faz um levantamento do número de fêmeas e machos atropelados, e identifica os principais *hotspots* de atropelamentos nas rodovias amostradas.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO

A RELAÇÃO ENTRE OS TATUS E OS SERES HUMANOS: IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO

Na América do Sul, a relação entre tatus e seres humanos tem sido observada desde as civilizações pré-hispânicas. Tal relação não se limita ao uso desses animais como fonte de alimento, mas também como fonte de inspiração para o desenvolvimento de artefatos, e como símbolos em suas crenças. Os Maias, por exemplo, os utilizavam na alimentação, e também se inspiravam nesses animais para a elaboração de formas e texturas de cerâmicas e de outros objetos. Os Astecas, criavam instrumentos musicais usando suas carapaças e, para eles, os tatus tinham um grande significado místico (TRUJILLO; SUPERINA, 2013).

Atualmente, os tatus ainda são utilizados como fonte alimentar, para fins medicinais, e também para fins místicos-religiosos, principalmente por comunidades indígenas e rurais (SANTOS *et al.*, 2009; TELES; RODRIGUES; TELES, 2013).

Embora os aspectos culturais devam ser considerados, do ponto de vista da conservação, a relação entre a fauna e os seres humanos pode representar uma ameaça para as espécies. A caça, por exemplo, tem sido intensificada pelo avanço das populações humanas sobre as áreas naturais (AZEVEDO *et al.*, 2015; TROMBULAK e FRISSELL, 2000), e para os tatus, constitui uma ameaça importante, já que esses animais estão entre os mais caçados do Brasil (DANTAS-AGUIAR *et al.*, 2011; BONAUDO *et al.* 2005; AZEVEDO *et al.*, 2015).

Os atropelamentos também representam uma ameaça importante para os tatus. Características como o deslocamento lento e a visão pobre, podem propiciar os impactos com veículos (HELLS; BUCHWALD, 2001; (FORMAN; ALEXANDER, 1998); FORMAN *et al.*, 2003). Além disso, espécies com alimentação generalista como o tatu-peba, podem se tornar ainda mais susceptíveis aos atropelamentos, já que espécies onívoras muitas vezes são atraídas para as estradas pelo lixo e pela carniça encontrados próximos à elas (BENNETT, 1991).

Mesmo diante de todas as ameaças descritas, das 11 espécies de tatus existentes no Brasil (NOWAK, 1999), apenas duas estão listadas na categoria *Vulnerável* pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*): *Tolypeutes tricinctus* e *Priodontes maximus*. As espécies *T. matacus* e *Dasypus hybridus* estão na categoria *Quase Ameaçada*, e as demais na categoria *Pouco Preocupante*, incluindo a espécie de estudo *E. sexcinctus*. A classificação das espécies como *Pouco Preocupante*, no entanto, não deve desencorajar estudos sobre elas, uma vez que essas espécies também sofrem crescentes pressões antrópicas, as quais precisam ser avaliadas.

CONSEQUÊNCIAS GENÉTICAS DAS ALTERAÇÕES AMBIENTAIS

A biodiversidade deve ser preservada em todos os seus níveis, inclusive a nível da diversidade de genes (MCNEELY *et al.*, 1990), pois é a diversidade genética que promove a capacidade de adaptação das espécies diante de alterações ambientais (FRANKHAM, 2002).

Manter a diversidade genética das populações naturais, no entanto, representa um grande desafio diante da atual degradação e fragmentação de habitats. Estes processos promovem a redução populacional de muitas espécies e populações reduzidas tornam-se mais susceptíveis aos efeitos deletérios da deriva genética. A deriva genética é a principal causa de perda de diversidade genética e é caracterizada pela variação aleatória das frequências alélicas ao longo das gerações, o que pode provocar a eliminação ou fixação casual de um alelo, independentemente de seu coeficiente seletivo (ALLENDORF; LUIKART, 2007).

A redução do tamanho populacional também pode promover a depressão endogâmica. Em populações pequenas a probabilidade de indivíduos aparentados se acasalarem aumenta, o que pode promover a alteração das frequências genotípicas da população. Neste caso, ocorre o aumento número de indivíduos homozigotos em detrimento dos heterozigotos, inclusive o de homozigotos para alelos deletérios. Essa alteração genotípica pode levar a diminuição dos valores fenotípicos médios dos caracteres ligados à capacidade reprodutiva ou à eficiência fisiológica (FALCONER; MACKAY, 1996).

Para amenizar os efeitos da deriva genética e do endocruzamento é preciso, portanto, que ocorra o fluxo gênico entre as populações, evitando assim a estruturação populacional (SEOANE *et al.*, 2000).

DIVERSIDADE GENÉTICA E O GENOMA MITOCONDRIAL

Há tempos os marcadores mitocondriais têm sido utilizados em estudos populacionais, filogeográficos e filogenéticos (AVISE *et al.*, 1987; AVISE, 1994; SPRINGER *et al.*, 1997; HUCHON *et al.*, 1999; DELSUC *et al.*, 2003;). Atualmente, o sequenciamento de nova geração tem propiciado a utilização de genomas mitocondriais completos em estudos de filogenia (MORIN *et al.* 2010; GIBB *et al.*, 2015). A disponibilização destes mitogenomas, por sua vez, possibilita o desenvolvimento de inúmeros marcadores moleculares, os quais poderão ser utilizados em diferentes estudos.

A ampla utilização do DNA mitocondrial (mtDNA) se deve a inúmeras características, dentre as quais o tamanho reduzido, a organização gênica conservada, a herança exclusivamente materna, a ausência de recombinação, a ocorrência de inúmeras cópias em uma única célula, e as taxas de mutação maiores do que as do genoma nuclear (AVISE, 1994; CUROLE; KOCHER, 1999).

O DNA mitocondrial (mtDNA) das células animais é uma molécula de fita dupla, circular (com raras exceções), com 15 a 20 Kb. É um genoma compacto, já que não apresenta íntrons, e a presença de nucleotídeos entre os genes é pequena ou ausente (ANDERSON *et al.*, 1981). A sobreposição entre genes reforça essa característica, e pode ser observada entre os genes *atp8* e o *atp6* e entre o *nad4* o *nad4L* (CLAYTON, 1991; WOLSTENHOLME, 1992) (Figura 1.1).

O mtDNA animal possui 37 genes: 13 genes codificadores de proteínas, 22 para RNA transportadores (tRNA) e dois para as subunidades ribossômicas (rRNA). Há ainda uma região não codificadora, a região controle (D-loop), relacionada com a sua origem de replicação e transcrição (Figura 1.1).

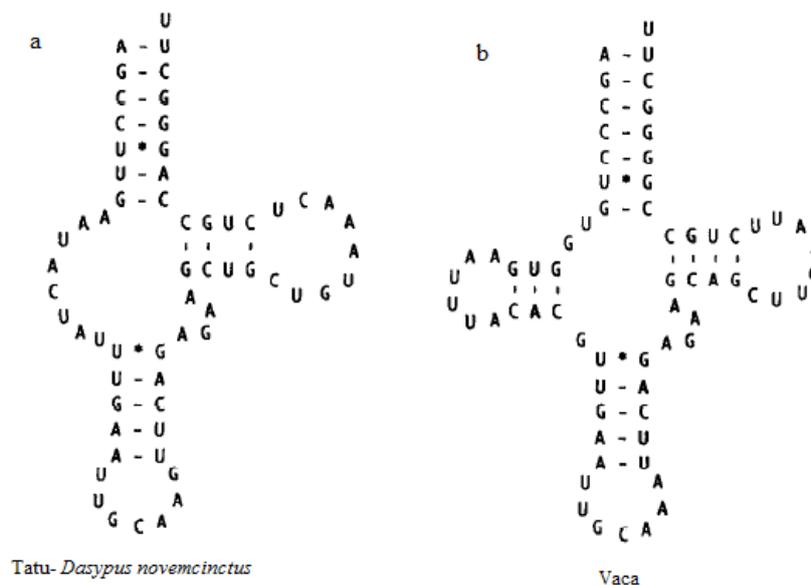
Os genes mitocondriais codificadores de proteínas codificam apenas parte dos produtos necessários para o funcionamento das mitocôndrias, e estão relacionados com a respiração celular (ALBERTS *et al.*, 2004). Esses genes apresentam códons de iniciação e de terminação que podem diferir daqueles observados para o genoma nuclear. Em alguns casos, os códons de terminação podem ser incompletos, e são gerados

organismos podem apresentar estruturas atípicas para determinados tRNAs, como acontece com a espécie de tatu, conhecida como tatu-galinha, *Dasypus novemcinctus* (ARNASON *et al.*, 1997) (Figura 1.2).

Há duas origens de replicação no mtDNA. Na fita H a origem de replicação encontra-se dentro do D-loop (O_H), enquanto a origem de replicação da fita L encontra-se entre tRNAs (O_L), geralmente entre o tRNA-Asn e o tRNA-Cys (CLAYTON, 1991; ARNASON *et al.*, 1997).

Os rRNA codificados pelo genoma mitocondrial codificam para a subunidade maior dos ribossomos, o 16S, e para a subunidade menor dos ribossomos, o 12S (WOLSTENHOLME, 1992). Esses genes apresentam estrutura conservada, sendo muito utilizados em estudos filogenéticos (PRAMUK *et al.*, 2001; DELSUC *et al.*, 2003).

Figura 1.2. Estrutura secundária atípica do tRNA-Cys da espécie de tatu *Dasypus novemcinctus* (a) e estrutura típica de tRNA^{cys} para mamífero, no caso, de uma vaca (b).



Fonte: Arnason *et al.* (1997).

A região controle é a principal região não codificante do genoma mitocondrial, e é responsável pela maior parte da variação de tamanho desse genoma dentro da espécie (ANDERSON *et al.*, 1981). Embora não seja codificadora, a região controle exerce função importante nesse genoma, já que está relacionada com a regulação da transcrição e da replicação do mtDNA (CLAYTON, 1991).

OS MICROSSATÉLITES COMO FERRAMENTAS PARA ESTUDOS POPULACIONAIS

Os microssatélites, também chamados de Sequências Simples Repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*) (LITT; LUTY, 1989), são marcadores moleculares amplamente utilizados para avaliar a diversidade genética e a estrutura genética populacional das espécies em estudos de conservação (BALLOUX; MOULIN, 2002; SELKOE; TOONEN, 2006).

Esses marcadores são constituídos por sequências repetidas em *tandem*, que variam de um a seis pares de bases, segundo Chambers e MacAvoy (2000) e de dois a seis pares de bases segundo Li *et al.* (2002). São marcadores codominantes, com elevado conteúdo de polimorfismo, que revelam variação de comprimento entre os alelos (PARKER *et al.*, 1998; SUNNUCKS, 2000). Esse polimorfismo alto está envolvido com suas taxas mutacionais altas e permite avaliar a distribuição da diversidade genética e a estrutura populacional em diferentes escalas.

A metodologia de utilização dos microssatélites baseia-se na amplificação por PCR (*Reação em Cadeia da Polimerase*) das sequências simples repetidas utilizando um par de *primers* de sequências complementares àquelas que as flanqueiam. O desenvolvimento e isolamento dos locos microssatélites para a construção dos *primers*, no entanto, podem representar uma limitação ao uso desses marcadores (ZANE *et al.*, 2002), o que vem melhorando com o desenvolvimento de novas tecnologias, como o sequenciamento de nova geração.

Uma alternativa para os estudos com microssatélites quando não há *primers* desenvolvidos para a espécie, é utilização de *primers* heterólogos, os quais são desenvolvidos para locos de determinada espécie, mas que podem funcionar adequadamente em espécies filogeneticamente próximas. Em alguns casos, entretanto, o uso de *primers* heterólogos pode levar a uma redução no número de locos polimórficos e a presença de alelos nulos (DAKIN; AVISE, 2004).

Por fim, os microssatélites são considerados bons marcadores moleculares por apresentarem taxas mutacionais altas e conseqüente polimorfismo alto por serem, em sua maioria, marcadores neutros e de fácil análise.

1.2. A ESPÉCIE DE ESTUDO: *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758)

A espécie *E. sexcinctus* é popularmente conhecida como tatu-peba ou tatu-peludo, e assim como os demais tatus, pertence a Superordem Xenartha, Ordem Cingulata, família Dasypodidae (Figura 1.3). Única espécie representante do gênero, apresenta cinco subespécies: *E. s. boliviae* (Thomas, 1907), *E. s. flavimanus* (Desmarest, 1804), *E. s. setosus* (Wied-Neuwied, 1826), *E. s. sexcinctus* (Linnaeus, 1758) e *E. s. tucumanus* (Thomas, 1907) (CABRERA, 1958; WETZEL, 1982; YEPES *apud* REDFORD; WETZEL, 1985). Destas, três ocorrem no Brasil: *E. s. flavimanus*, a partir do Mato Grosso até o leste do Paraguai, nordeste da Argentina e Uruguai; *E. s. setosus*, no extremo sudeste; e *E. s. sexcinctus* no Suriname e no norte do Brasil (REDFORD; WETZEL, 1985; GARDNER, 2007).

Endêmico da América do Sul, o tatu-peba apresenta ampla distribuição geográfica (Figura 1.2), ocorrendo em todos os biomas brasileiros (REDFORD; WETZEL, 1985; WETZEL, 1985; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2001; SILVA JÚNIOR; NUNES, 2001; BONATO, 2002). Habita áreas de vegetação aberta e bordas de florestas; podem ocorrer em áreas alteradas (EISENBERG; REDFORD, 1999). No Cerrado paulista, *E. sexcinctus* foi encontrado com mais frequência na fitofisionomia Campo Sujo, mas não foi observado uso preferencial do habitat para a espécie (BONATO *et al.*, 2008). No entanto, em uma região da Nhecolândia, no Pantanal do Mato Grosso do Sul, foi observado a utilização preferencial de fitofisionomias mais fechadas pelos tatus-peba (Medri, 2008). Nesse estudo, esses animais utilizaram com menos frequência as fitofisionomias de campo úmido e campo cerrado.

Os dados sobre a área de vida da espécie podem ser subestimados, mas apontam maiores valores de área de vida para os machos (ENCARNAÇÃO, 1987; MEDRI, 2008). Utilizando métodos semelhantes, estudos sobre a área de vida da espécie forneceram valores discrepantes. Os valores médios da área de vida dos tatus-peba na Serra da Canastra-MG foi de 268,06 ha para machos adultos e de 62,76 ha para fêmeas adultas (ENCARNAÇÃO, 1987). No Pantanal da Nhecolândia-MS os valores encontrados foram 29,22 ha para machos adultos e 7,15 ha para fêmeas adultas (MEDRI, 2008).

Adultos de *E. sexcinctus* podem medir mais de 40 cm e pesar mais de 6 kg (REDFORD; WETZEL, 1985). Em um estudo realizado no Pantanal da Nhecolândia

utilizando espécimes vivos, não foram encontradas diferenças significativas nem no tamanho, nem no peso entre machos e fêmeas (MEDRI, 2008). A carapaça pardo-amarelada, esparsamente coberta por pelos esbranquiçados, apresenta de 6 a 8 cintas móveis (REDFORD; WETZEL, 1985).

Sobre a atividade da espécie, enquanto Redford e Wetzel (1985) relatam que, ao contrário da maioria dos tatus, a espécie apresenta atividade predominantemente diurna, Bonato *et al.* (2008) encontraram atividade predominante noturna em uma área de Cerrado do estado de São Paulo. Embora o período de atividade tenha sido preferencialmente noturna nesse estudo, os autores também observaram atividade da espécie durante o dia. Esses autores não observaram mudanças do padrão de atividades da espécie em diferentes estações do ano.

São animais carnívoros-onívoros, alimentando-se preferencialmente de pequenos invertebrados e vertebrados, material vegetal e carniça, (REDFORD, 1985). Bons cavadores, suas tocas são utilizadas como refúgio e abrigo para os filhotes (REDFORD; WETZEL, 1985).

Tem hábito solitário, exceto na época reprodutiva, da mãe com filhote (s), e às vezes durante a alimentação em torno de carcaças (NOWAK, 1999). A reprodução ocorre ao longo do ano todo (BONATO *et al.*, 2008). O período de gestação registrado em espécimes de cativeiro foi de 60 a 64 dias e os nascimentos ocorrem ao longo do ano (REDFORD; WETZEL, 1985). A prole tem de um a três filhotes por gestação, e estes não são gerados por poliembrionia, como observado em tatus do gênero *Dasypus* (PRODOHL *et al.*, 1996.). Assim, podem ser gerados filhotes do mesmo sexo ou de sexos diferentes. Os filhotes atingem a maturidade com cerca de nove meses (GUCWINSKA, 1971).

Figura 1.3. *Euphractus sexcinctus*.



Foto: Arnaud Desbiez.

Figura 1.4. Distribuição geográfica da espécie *Euphractus sexcinctus*.



Fonte: IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2014. *Euphractus sexcinctus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2015-4

1.3.BIOMAS DA ÁREA DE ESTUDO: CERRADO E PANTANAL

O Mato Grosso do Sul é ocupado por três biomas: Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica. Mais da metade do estado é ocupado pelo Cerrado, 61%, enquanto 25% é ocupado pelo Pantanal e apenas 14% pela Mata Atlântica (SILVA *et al.*, 2010).

No Mato Grosso do Sul, o Cerrado apresenta um dos menores índices de cobertura de vegetação natural remanescente: apenas 32%. Segundo a FAGRO (*Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Agronegócio*) (2007), 68% da área de Cerrado é antropizada, sendo a pastagem cultivada e a cultura agrícola os principais usos da terra no estado (SANO *et al.*, 2008). No Cerrado desse estado predominam as Formações Savânicas (17%), as quais são caracterizadas pela presença de árvores e arbustos espalhados em um estrato de gramíneas, sem a formação de um dossel contínuo (RIBEIRO; WALTER, 1998).

O Pantanal está distribuído entre os estados do Mato Grosso (40,3%) e Mato Grosso do Sul (59,7%) (IBGE, 2004). Este bioma constitui uma das maiores planícies sujeitas a inundações periódicas do mundo, e é declarado Reserva da Biosfera e Patrimônio Mundial Natural pela UNESCO (*Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura*).

O Pantanal é constituído por um mosaico de ambientes, apresentando influência dos biomas que o margeiam: do Cerrado ao norte e à leste, da Amazônia ao norte e do Pampa à sudeste. Apresenta diferentes feições fitoecológicas, sendo as principais: Savana Arborizada, Savana Florestada, Savana Gramíneo-lenhosa, Pastagem e Floresta Estacional Semidecidual Aluvial (MMA, 2010).

A área conservada desse bioma ainda é alta em relação à de Cerrado. Até o ano de 2009 a vegetação remanescente representava 83,07% de sua área total. Em 2002 esse percentual era de 86% (MMA, 2007). No Mato Grosso do Sul o percentual de vegetação remanescente em 2009 foi de 86,9% (MMA, 2011). No entanto, embora o Pantanal ainda não tenha perdido tantas áreas naturais quanto o Cerrado, a expansão desordenada das atividades agropecuárias nesse bioma tem contribuído para a degradação de seus ambientes naturais (SANTOS, 2006), tendo como base da economia regional a criação extensiva de gado para corte (IBGE, 1998).

1.4. PREMISSAS

Este trabalho tem como premissas:

- I. O genoma mitocondrial da subespécie *E. s. flavimanus* é semelhante em composição gênica e estrutura aos mitogenomas de outras espécies de mamíferos, principalmente aos de outras espécies de tatus, mas apresenta particularidades importantes.
- II. Populações de tatus da espécie *E. sexcinctus* encontradas em diferentes biomas, neste caso, Pantanal e Cerrado, encontram-se geneticamente diferenciadas, já que evoluíram em ambientes com pressões seletivas distintas.
- III. Populações de tatus da espécie *E. sexcinctus* encontradas em áreas mais degradadas tendem a ser menores e apresentam diversidade genética inferior em relação às populações encontradas em áreas mais conservadas. Tal perda resulta dos efeitos da deriva genética e do endocruzamento que são potencializados em populações reduzidas.
- IV. Machos da espécie *E. sexcinctus* são mais atropelados, pois as fêmeas de mamíferos tendem a ser mais filopátricas, e também porque os machos dessa espécie apresentam maior área de vida, tendo assim maiores chances de apresentar estradas sobrepostas aos seus habitats.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. OBJETIVO GERAL

Disponibilizar informações genéticas para a espécie *Euphractus sexcinctus* e avaliar a distribuição da sua diversidade genética e estrutura genética populacional em áreas de Cerrado e Pantanal.

1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Disponibilizar e caracterizar o mitogenoma completo de *E. s. flavimanus*.
- Inferir sobre a distribuição da diversidade genética de *E. sexcinctus* em áreas de Cerrado e Pantanal utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites.
- Avaliar a distribuição dos atropelamentos de *E. sexcinctus* ao longo de diferentes rodovias, identificando possíveis aglomerações de atropelamentos.
- Avaliar a distribuição de machos e fêmeas atropelados ao longo de diferentes rodovias.

CAPÍTULO 2

**Caracterização do genoma mitocondrial completo de *Euphractus
sexcinctus flavimanus* (Desmarest, 1804)**

1. Caracterização do genoma mitocondrial completo de *Euphractus sexcinctus flavimanus* (Desmarest, 1804)

Neste capítulo será abordado o primeiro objetivo específico deste trabalho: disponibilizar e caracterizar o genoma mitocondrial completo de *E. s. flavimanus*.

2.1. MATERIAL E MÉTODOS

Para o sequenciamento completo do genoma mitocondrial de *Euphractus sexcinctus flavimanus* foi utilizada uma amostra de tecido de orelha de um indivíduo atropelado (fêmea) no ano de 2013 em uma região do Pantanal do Mato Grosso do Sul (21K 0628077E 7869838S). A amostra foi cedida pelo Projeto Tatu Canastra Pantanal. O tecido foi armazenado em microtubo contendo álcool etílico absoluto e enviado para análise ao Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação, UFSCar, onde foi conservado em freezer a -20°C.

Foi realizada a extração do DNA genômico total pelo método Salino modificado de Aljanabi e Martinez (1997) (Anexo 1). O DNA foi eluído em água Mili-Q autoclavada, quantificado por fluorometria no Qubit® (Invitrogen), com o uso do Qubit® dsDNA HS Assay Kit, e os níveis de contaminantes foram verificados pelo espectrofotômetro Nanodrop. A integridade do DNA foi avaliada mediante visualização em gel de agarose 0,8% corado com GelRed.

Uma alíquota de DNA com 50 ng em 20µL (2,5ng/µL) foi enviada ao Laboratório de Biotecnologia Animal, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, ESALQ-USP, para o Sequenciamento de Próxima Geração (*Next Generation Sequencing*- NGS). Uma única biblioteca genômica foi preparada de acordo com o protocolo padrão do *kit* Illumina Nextera DNA Library (Illumina, San Diego, USA). O sequenciamento foi realizado a partir de ambas as extremidades (*paired-end*), utilizando a tecnologia Illumina-Hi-Seq 2000 (Illumina, California). O NGS gerou fragmentos com 100pb (pares de base), os chamados *reads*.

Para a montagem do genoma mitocondrial, inicialmente, foram eliminados os adaptadores Illumina utilizando o programa Cutadapt (MARTIN, 2011). Bases de baixa qualidade dos extremos dos *reads* foram eliminadas utilizando o programa Trimmomatic (BOLGER *et al.*, 2014) utilizando parâmetros padrões, e *reads* com menos de 50

nucleotídeos foram descartados após a triagem. Foram realizadas quatro montagens *de novo* diferentes. Uma foi realizada utilizando o Velvet (ZERBINO; BIRNEY, 2008), com tamanho de k-mer de 49, e três utilizando o SOAPdenovo2 (LUO *et al.*, 2012), com tamanhos de k-mer de 43, 53 e 63. O alinhamento foi realizado com o BLAST para comparar os contigs montados às sequências do genoma mitocondrial de *Dasypus novemcinctus* (NC_001821.1), as quais foram utilizadas como referência. Os contigs selecionados foram remontados usando o CAP3 (HUANG; MADAN, 1999) e anotados automaticamente pelo programa MITOS WebServer (BERNT *et al.*, 2013). Os contigs anotados foram editados manualmente no software Bioedit (HALL, 2013) usando os genomas mitocondriais de *D. novemcinctus* e *E. sexcinctus* (NC_028571.1) como referência. Para confirmar algumas sequências, *primers* foram desenhados a partir dos contigs obtidos e sequências do genoma foram obtidas a partir do sequenciamento de Sanger (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Características dos pares de *primers* desenhados a partir dos *contigs* para a confirmação de sequências do mtDNA.

Gene 1	Gene 2	T _m (°C)	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	Tamanho do fragmento (pb)
<i>Leu</i>	<i>ND1</i>	54	GTTAAGATGGCAGAGACAGGT	GTTTCTGCTAGTGTNGAGATAAATC	595
<i>Met</i>	<i>Asn</i>	55	GCCCATACCCCGAAAATGTAG	GTAACTAAAATTCGTGGGGTTGG	1215
<i>COX2</i>	<i>Lys</i>	56	GGATTCCAAGACGCCACATC	GGCATGTCATTGAGGAGAGATTTG	742
<i>ND3</i>	<i>ND4</i>	54	GTAGCCATCACATTCNTACTATTTGAC	GCTAATCATATNAGTTTGGCTGTTC	1105
<i>ND3</i>	<i>Arg</i>	58	CATCTGCGCCCTNACACAAAATG	GTTCGTGAAGATTNTGNTGGTGG	443
<i>D-loop</i>	<i>12S</i>	52	ATTTACTTACCCCATGCATATC	CTGATACTTGCATGTGTAATTTTG	434

Gene 1: sequência foi utilizada para o desenho do primer *forward*; Gene 2: sequência foi utilizada para o desenho do primer *reverse*.

2.2. RESULTADOS

O genoma mitocondrial da subespécie *E. s. flavimanus* possui 16805 pb, onde estão disponibilizados os 13 genes codificadores de proteínas, os 22 tRNA, os dois rRNA e uma região não codificadora, o D-loop. A maioria dos genes codifica na fita H, a qual tem como composição geral de bases: T: 26.2%, C: 27.0%, A: 34.0% e G: 12.8%.

A maioria dos genes codificadores de proteínas apresentaram ATG como códon de iniciação, e TAA, TAG e/ou AGA como códon de terminação. No entanto, o gene COX3, ND3, and ND4 apresentaram códon de terminação incompleto, constituído apenas por T (Tabela 2.2). Apenas o gene ND6 e oito tRNAs codificam na fita L. A origem de replicação também encontra-se na fita L e forma um loop característico dos eutérios (ANDERSON et al. 1982). O gene tRNA-Cys gene evidenciou a ausência da haste-DHU, mas outras características do gene são conservadas.

A região controle do genoma mitocondrial de *E. s. flavimanus* possui 1344 pb, apresenta uma região rica em T na porção inicial do gene, e repetições de sequências com aproximadamente de 80 pb em sua porção final. Não foram observados microssatélites na região controle.

Tabela 2.2. Caracterização do genoma mitocondrial completo de *Euphractus sexcinctus flavimanus*.

Gene	Fita	Início	Fim	Tamanho	Códon de iniciação	Códon de parada	Anticódon
tRNA-Phe	+	1	67	67			GAA
12S	+	68	1040	973			
tRNA-Val	+	1041	1107	67			TAC
16S	+	1108	2694	1587			
tRNA-Leu	+	2695	2769	75			TAA
ND1	+	2773	3729	957	ATG	TAG	
tRNA-Ile	+	3728	3796	69			GAT
tRNA-Gln	-	3866	3794	73			TTG
tRNA-Met	+	3867	3935	69			CAT
ND2	+	3936	4979	1044	ATA	TAG	
tRNA-Trp	+	4978	5046	69			TCA
tRNA-Ala	-	5118	5050	69			TGC
tRNA-Asn	-	5192	5120	73			GTT
tRNA-Cys	-	5285	5224	62			GCA
tRNA-Tyr	-	5353	5287	67			GTA
COX1	+	5355	6896	1542	ATG	TAA	
tRNA-Ser	-	6966	6898	69			TGA
tRNA-Asp	+	6972	7040	69			GTC
COX2	+	7042	7725	684	ATG	TAA	
tRNA-Lys	+	7729	7799	71			TTT
ATP8	+	7801	8004	204	ATG	TAA	
ATP6	+	7962	8642	681	ATG	TAA	
COX3	+	8642	9425	784	ATG	T	
tRNA-Gly	+	9426	9495	70			TCC
ND3	+	9496	9841	346	ATA	T	
tRNA-Arg	+	9843	9911	69			TCG
ND4L	+	9912	10208	297	ATG	TAA	
ND4	+	10202	11579	1378	ATG	T	
tRNA-His	+	11580	11648	69			GTG
tRNA-Ser	+	11649	11710	62			ACT
tRNA-Leu	+	11710	11779	70			TAG
ND5	+	11780	13585	1806	ATA	TAA	
ND6	-	14109	13582	528	ATA	TAA	
tRNA-Glu	-	14178	14110	69			TTC
CYTB	+	14181	15320	1140	ATG	AGA	
tRNA-Thr	+	15323	15390	68			TGT
tRNA-Pro	-	15461	15392	70			TGG
D-loop		15462	16805	1344			

ND1– 6, NADH desidrogenase, subunidades 1-6; COX1–3, citocromo oxidase c, subunidades 1-3; ATP sintase, subunidades 6 e 8; CYTB, citocromo b. Sinais + e - representam a fita H (pesada) e a fita L (leve), respectivamente.

2.3. DISCUSSÃO

A composição, estrutura e ordem dos genes mitocondriais de *E. s. flavimanus* são similares aos de outros mitogenomas de mamíferos. A origem de replicação da fita L (OL) é semelhante à de outros eutérios, incluindo outras espécies de tatus, mas difere da do gênero *Dasypus*, que apresenta uma estrutura instável e atípica (GIBB *et al.* 2015; ARNASON *et al.*, 1997).

O gene *tRNA-Cys* de *E. sexcinctus* foi completamente sequenciado pela primeira vez e foi observada para a espécie, uma estrutura atípica para esse gene, com a ausência da haste-DHU. Tal estrutura também foi observada para *D. novemcinctus* (ARNASON *et al.*, 1997).

O tamanho total do genoma mitocondrial completo de *E. s. flavimanus* apresentou 203 pb a mais do que o descrito para *E. sexcinctus* (GIBB *et al.*, 2015). Essa discrepância se deu, principalmente, devido à diferença de tamanho da região controle. Mesmo sendo maior, o mitogenoma de *E. s. flavimanus* não apresentou a região de microssatélites (CGCATA)₈ relatada para *E. sexcinctus* (GIBB *et al.*, 2015). Essa diferença de tamanho se deve à um segmento exclusivo em *E. s. flavimanus* de aproximadamente 340 pb na porção inicial do D-loop, que resultou em um D-loop 200pb maior. O alinhamento das sequências do D-loop de *E. s. flavimanus* e de *E. sexcinctus* pode ser visualizado no Anexo 1. Tais diferenças sugerem que há inserções e deleções na região controle entre espécies tatus. Além disso, a inserção de 2 pb e 1 pb nos genes 12S e 16S, respectivamente, contribuem com o maior tamanho observado no mitogenoma de *E. s. flavimanus*. Diante dessas diferenças, sugere-se o espécime sequenciado por Gibb *et al.* (2015) não corresponde a subespécie *E. s. flavimanus*.

CAPÍTULO 3

**Distribuição da diversidade genética e estrutura genética populacional
de *Euphractus sexcinctus* em áreas de cerrado e pantanal**

3. Distribuição da diversidade genética e estrutura genética populacional de *Euphractus sexcinctus* em áreas de Cerrado e Pantanal

Neste capítulo será abordado o segundo objetivo específico deste trabalho: inferir sobre a distribuição da diversidade genética de *E. sexcinctus* em áreas de Cerrado e Pantanal utilizando marcadores do tipo microssatélites.

3.1. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Obtenção de amostras

Para os estudos de diversidade genética e estrutura genética populacional foram utilizadas 94 amostras de indivíduos atropelados em rodovias que cortam áreas de Cerrado altamente antropizado do Mato Grosso do Sul e 20 amostras de indivíduos de vida livre de uma área de Pantanal, também do Mato Grosso do Sul. As amostras de atropelamentos foram coletadas pelos projetos Tatu Canastra Pantanal e Anta Pantanal e as de vida livre por pesquisadores da Embrapa Pantanal.

As coletas dos animais atropelados foram realizadas por um período de 12 meses (abril de 2013 a março de 2014), em três rodovias: BR-163/MS, BR-262/MS e BR-267/MS. Foram realizadas três rotas para as coletas, as quais constituíram três transectos. Todas as rotas tiveram a capital Campo Grande como origem. As áreas amostrais foram definidas de acordo com cada trecho (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Relação das áreas de atropelamentos amostradas e da distribuição de amostras de espécimes atropelados de *E. sexcinctus*.

Rodovia	Rota	Área amostral	Comprimento da estrada (Km)	Nº de amostras
BR-163 e BR-267	Campo Grande - Nova Alvorada	Cerrado 1	275	30
BR-262	Campo Grande – Três Lagoas	Cerrado 2	305	31
BR-262	Campo Grande – Ponte do Rio Paraguai	Cerrado 3	340	33

As amostras dos espécimes de vida livre foram coletadas na Fazenda Nhumirim (18°59'S; 56°39'O), estação experimental da Embrapa Pantanal. Essa estação tem uma

área aproximada de 43 km² e está localizada no Pantanal da Nhecolândia, MS (Figura 3.1). Dentre essas amostras, 14 foram de tecido de orelha e sete de pelo (Tabela 3.2).

O Pantanal da Nhecolândia é uma sub-região do Pantanal, que apresenta um mosaico de ambientes, constituídos por áreas extensas de campo, vazantes, lagoas permanentes ou temporárias (conhecidas regionalmente como “baías” e “salinas”) contornadas por vegetação de campo, cerrado e cerradão (ABDON, 1998).

Para o sequenciamento de nova geração foi utilizada a amostra de tecido de orelha de apenas um indivíduo atropelado (fêmea), coletada no ano de 2013 em uma região do Pantanal do Mato Grosso do Sul (21K 0628077E 7869838S).

Todas as amostras de tecido foram conservadas em microtubos contendo álcool etílico absoluto, e foram armazenadas em freezer (-20°C). Os pelos foram obtidos com o bulbo, e estocados em envelopes individuais identificados, e armazenados à temperatura ambiente.

Mais detalhes sobre a amostragem podem ser visualizados na Tabela 3.2 e Figura 3.1.

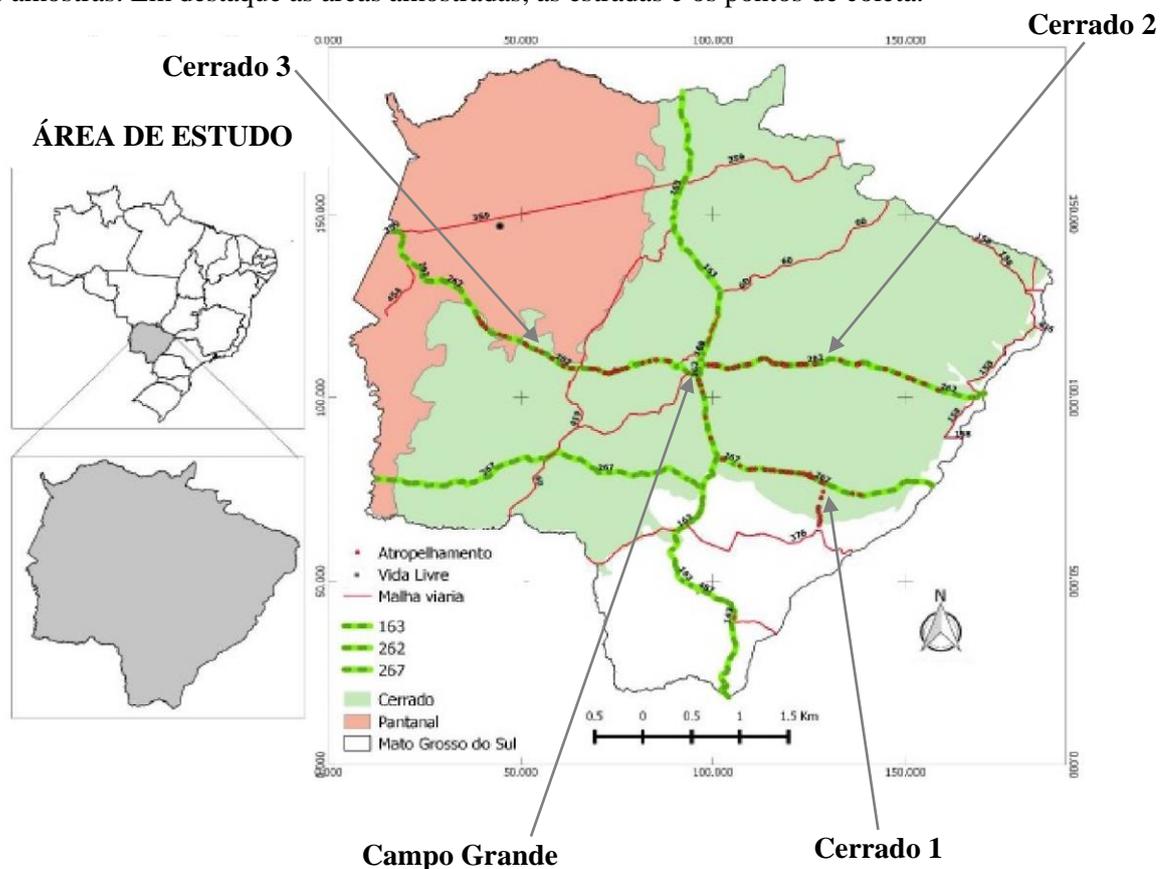
Tabela 3.2. Relação das áreas amostradas, tipo de material coletado e número de amostras coletadas.

Área amostral	Tipo de coleta	Tipo de amostra	Nº de amostras
Cerrado 1	Amostras de Atropelamento	Tecido	30
Cerrado 2	Amostras de Atropelamento	Tecido	31
Cerrado 3	Amostras de Atropelamento	Tecido	33
Pantanal	Captura	Tecido e pelo	20
Pantanal*	Amostras de Atropelamento	Tecido	1

*Amostra utilizada para o sequenciamento de nova geração.

Para todas as amostras foram obtidas as coordenadas geográficas com o uso de GPS. O programa *Track Maker* foi utilizado para transferir os dados do receptor GPS. O mapa da área com os pontos de coleta foi construído utilizando o programa QGis versão 2.08 (Figura 3.1).

Figura 3.1. Mapa do Brasil destacando áreas dos biomas Cerrado e Pantanal e os pontos de coleta das amostras. Em destaque as áreas amostradas, as estradas e os pontos de coleta.



3.1.2. Extração de DNA

A extração do DNA total das amostras de tecido foi realizada utilizando o método de extração com tampão salino modificado de Aljanabi e Martinez (1997) (Anexo 1). As amostras de pelo foram extraídas seguindo o protocolo de Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989), com pequenas modificações.

O DNA extraído foi eluído em água Milli-Q autoclavada, corado com Gel Red™ e visualizado em gel de agarose 0,8% para a avaliação da sua integridade.

O DNA enviado para o sequenciamento de próxima geração foi quantificado por fluorometria no Qubit® (Invitrogen), utilizando o Qubit® dsDNA HS Assay Kit, e os níveis de contaminantes foram verificados pelo espectrofotômetro Nanodrop. As demais amostras de DNA foram quantificadas em biofotômetro.

O DNA enviado para o sequenciamento de próxima geração foi diluído a 2,5ng/μL, enquanto o DNA de trabalho foi diluído em água Milli-Q a uma concentração de aproximadamente 10ng/μl.

3.1.3. Desenvolvimento dos marcadores microssatélites e padronização das reações de PCR

Marcadores microssatélites foram desenvolvidos para a espécie *E. sexcinctus* por sequenciamento de nova geração utilizando a tecnologia Illumina-Hi-Seq 2000. O sequenciamento foi realizado pelo Laboratório de Biotecnologia Animal, ESALQ-USP.

Após o desenho dos *primers*, foi realizada uma triagem dos locos. Alguns critérios foram estabelecidos: os *primers* deveriam estar a pelo menos 20 bases de distância da região de microssatélite, os microssatélites deveriam ser puros, preferencialmente tetranucleotídeos, deveriam apresentar mais de oito repetições e não estarem em regiões codificadoras. De acordo com os critérios estabelecidos, foram sintetizados 20 pares de *primers*, todos com a adição de uma cauda M13 na extremidade 5' de um dos *primers* (*forward* ou *reverse*), segundo o protocolo de Schuelke (2000). O protocolo de Schuelke (2000) permite a obtenção de fragmentos marcados com fluorescência. Neste estudo, foram utilizados os fluoróforos: FAM, PET, NED e VIC.

Todos os *primers* foram inicialmente testados com apenas cinco indivíduos (amostras de tecido). Para as reações de amplificação utilizou-se solução tampão 1x *Taq Buffer*, 1,25 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,06 μM de *primer forward*, 0,25 μM de *primer reverse*, 0,25 μM do *primer* M13, 0,75 U *Taq* Polimerase (Invitrogen-Platinum) e, 30ng de DNA em um volume final de 15μl de reação.

O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 3 ciclos de 30s a 94°C, 45s a temperatura de *annealing* mais 3°C (*touch-down*—diminuição de 1°C a cada ciclo), 45 s a 72°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a temperatura de *annealing* (Tabela 3.3), 45 s a 72°C; 10 ciclos adicionais iniciando a 94°C por 30 s, 45 s a 53°C (temperatura de *annealing* do *primer* M13 marcado), 45 s à 72°C, finalizando à temperatura de extensão de 72°C por 20 min.

Para o estabelecimento da melhor temperatura de *annealing* de cada par de *primers*, foi realizado um gradiente de temperatura, no qual a temperatura definida inicialmente

para o *primer* (de acordo com o programa *Primer 3*) foi utilizada como referência, com um incremento e redução de 4°C desta, com variação de 1°C por teste.

Os fragmentos gerados nas reações de PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1%, corados com Gel Red™, e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Para se estimar o tamanho aproximado dos fragmentos gerados, foi utilizado o marcador de peso molecular 1kb *Plus* (Invitrogen).

Após a verificação da amplificação e a padronização das reações, o polimorfismo dos locos foi verificado com a amplificação de dez indivíduos. Os produtos de PCR foram enviados para genotipagem na empresa MacroGen Inc. (Seul, Coreia). As análises do padrão e tamanho dos fragmentos foram realizadas utilizando o *microsatellite plugin* no programa Geneious 7.1.7 (KEARSE *et al.*, 2012).

Os locos monomórficos e os que apresentaram tamanho diferente do esperado foram descartados e os locos polimórficos foram selecionados e utilizados para a amplificação em todos os indivíduos.

3.1.4. Análise dos dados: diversidade genética

A caracterização dos locos microssatélites foi realizada para cada população amostral. Em princípio foi verificada a ocorrência de alelos nulos utilizando o *software Micro-Checker*, versão 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). A ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos foi verificada utilizando-se o teste exato para desequilíbrio genotípico implementado pelo programa GENEPOP 4.2 (ROUSSET, 2008). O número de alelos (N_a) e os valores da heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) foram estimados utilizando o programa GENALEX 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). A riqueza alélica (RA: estimativa do número de alelos por loco padronizado para amostras de tamanho desigual entre locais) foi calculada utilizando o programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001). Este programa também foi utilizado para calcular o coeficiente de endogamia (F_{IS}) e os valores de P para déficit (PL) e para excesso de heterozigotos (PS). (WEIR; COCKERHAM, 1984). O conteúdo de informação polimórfica PIC (*Polymorphism Information Content*) (BOTSTEIN *et al.*, 1980) para cada loco foi calculado através do programa CERVUS 3.0.3 (MARSHALL, 1998; KALINOWSKI *et al.*, 2007) e a classificação dos resultados se deu segundo Botstein *et al.* (1980), pelo qual marcadores com PIC superior a 0,50 são considerados muito

informativos, com valor entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos, e com valor inferior a 0,25, pouco informativos. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram avaliados utilizando o programa GENEPOP utilizando o algoritmo Cadeia de Markov e Montecarlo (MCMC). Foi realizada a correção de Bonferroni para os testes múltiplos (RICE, 1989).

O programa BOTTLENECK 1.2.02 (CORNUET; LUIKART, 1996; PIRY *et al.*, 1999) foi utilizado para testar reduções recentes do tamanho efetivo populacional. As análises foram realizadas utilizando o teste de Wilcoxon, o qual é adequado para análises com menos de 20 locos. Foi calculada a heterozigosidade esperada sob o equilíbrio de mutação-deriva (H_{eq}) para cada loco considerando o modelo de mutação *two-phase* (TPM), com 70% de mutação de passo simples e 30% de mutação de múltiplos passos (LUIKART; CORNUET, 1998).

3.1.5. Análise dos dados: estrutura populacional

Para avaliar a estruturação populacional nas áreas amostradas foram utilizadas diferentes metodologias: análise de variância molecular, cálculo do índice de fixação de Wright (F_{ST}), análise de atribuição bayesiana e análise de correspondência multidimensional fatorial.

A partição da variação genética entre e dentro dos grupos foi verificada pela análise da variância molecular (AMOVA) implementada no software ARLEQUIN (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Para essa análise as populações amostrais foram agrupadas em três situações diferentes:

Situação A: Pantanal/ Cerrado 1 + Cerrado 2/ Cerrado 3 (três grupos).

Situação B: Pantanal/Cerrado 1 + Cerrado 2 + Cerrado 3 (dois grupos).

Situação C: Pantanal +Cerrado 1 + Cerrado 2 + Cerrado 3 (um grupo).

Os índices de fixação que indicam a diferenciação genética entre grupos (F_{CT}), entre populações dentro de um mesmo grupo (F_{SC}) e entre populações independente do grupo que pertença (F_{ST}) foram calculados para as três situações.

O programa ARLEQUIN foi utilizado para calcular os valores par-a-par de F_{ST} (WEIR; COCKERHAM, 1984; EXCOFFIER *et al.*, 2005).

O programa STRUCTURE 2.3 (PRITCHARD *et al.* 2000) foi utilizado para detectar a estrutura genética populacional, e inferir o número provável de agrupamentos genéticos (K) existentes na amostragem. Este programa utiliza o método bayesiano de agrupamento, juntamente com o algoritmo Cadeia de Markov e Montecarlo (MCMC), e tem o equilíbrio de Hardy-Weinberg e a ausência de desequilíbrio de ligação dentro das populações como premissa para a inferência do número de populações. Foi utilizado o modelo *admixture*, que é adequado para populações que apresentam ou já apresentaram fluxo gênico. Foram realizadas seis corridas independentes para $K=1-4$ com 1.000.000 repetições da MCMC após um período de *burn-in* de 300.000 para cada corrida. O número provável de agrupamentos K , utilizando o logaritmo de probabilidade dos dados $\ln(P(X|K))$ (PRITCHARD *et al.*, 2000) foram obtidos utilizando o programa Structure Harvester (EARL, 2012).

O programa GENETIX 4.0.5 (BELKHIR *et al.*, 2004) foi utilizado para a realização da análise de correspondência multidimensional fatorial (FCA), a qual propicia a visualização dos indivíduos no espaço pela projeção dos resultados de similaridade de seus alelos.

3.2. RESULTADOS

3.2.1 Caracterização dos microssatélites e diversidade genética

O sequenciamento de nova geração resultou em um grande número de locos microssatélites para a espécie *E. sexcinctus*. Considerando apenas os microssatélites com mais de cinco repetições, foram encontrados 2921 locos: 2419 dinucleotídeos, 251 trinucleotídeos, 203 tetranucleotídeos, 44 pentanucleotídeos, e apenas quatro hexanucleotídeos.

Neste estudo foram testados 20 locos tetranucleotídeos, dos quais quatro não apresentaram amplificação, um não correspondia ao tamanho esperado para o loco, um apresentou bandas inespecíficas, quatro eram monomórficos, e 10 eram polimórficos (detalhes dos locos polimórficos podem ser visualizados na Tabela 3.3).

O valor de PIC calculado para cada um dos 10 locos polimórficos indicou que estes são muito informativos ($PIC > 0,5$) (Botstein *et al.*, 1980).

Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os pares de locos analisados. Não foi detectado desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg para nenhum loco após a correção de Bonferroni ($\alpha = 0.005$). Também não foi detectada a presença de alelos nulos. Não houve valores significativos para F_{IS} (Tabela 3.4).

O número médio de alelos foi semelhante em todas as populações amostrais e variou de variou de 4,3 (Cerrado 3) a 6,2 (Cerrado 2) (Tabela 3.4). Embora todas as populações tenham apresentado alelos exclusivos, a frequência desses alelos em geral foi baixa. A área do Pantanal foi a que apresentou a maior frequência de alelos exclusivos, com valores de 5,9% para Yarm12 e 11% para Yarm15.

Foram observados valores de diversidade genética (R_A , H_E e N_E) muito semelhantes em todas as áreas. Os valores médios de R_A variaram de 5,585 (Cerrado 1) a 6,113 (Cerrado 2); os valores médios de H_E variaram de 0,684 (Cerrado 1) a 0,728 (Cerrado 2); e os de N_E variaram de 3,738 (Pantanal) a 4,208 (Cerrado 2) (Tabela 3.4).

Não foram encontradas evidências de gargalo populacional em nenhuma das áreas.

Tabela 3.3. Locos polimórficos, sequências dos *primers*, motivo do microssatélite, temperatura de *annealing* definida após gradiente de temperatura, tamanho esperado do produto de PCR.

Loco	<i>Primer Forward 5'-3'</i>	<i>Primer Reverse 5'-3'</i>	Motivo	Tm (°C)	Tamanho (pb)
YArm1	CCCTCTCATCTACCCAATCA	TCAGGGAGTTCAGAAGGAGAT	ATCC	54	236
YArm4	CATCCTACAATGCATAGGGC	TTTCTGAGGATGGAGTCTGG	ATCC	56	264
YArm8	CTCTATCCCTTGCCCAATC	GCTAAAGGATAAATGAGTGAATTG	AAAC	54	299
YArm10	TCAAAGCTCAACAATCCCTC	TACATGGCTGTGATCTGCC	AAAT	58	298
YArm12	GTGACATAGCTGGGATGAAA	TGGTTATGACACAAATGGATCT	AGAT	56	278
YArm14	CGGGACCTCGAATGTAGA	CTTCCTCCTCTTCTTCGTCC	AAAC	56	243
YArm15	AAACTTGTCAGCTTCATGGC	AAGCGGAGATAGGCAGACAT	AAAT	60	177
YArm17	AGATGATAGGTAGAGATTAGGCAGA	GCCCTTCTTCTGTATGCTCA	ACAG	56	189
YArm18	TGTTTACAGGATAATAACTCAATGC	GGGCTATTGCTAAGTGTGC	AGAT	56	290
YArm19	CCATTTCAATTGCTGGAAGAAT	TTCTTTCTTCCAAAGGAGTC	AAAC	56	231

Tabela 3.4. Características dos locos microssatélites desenvolvidos para *Euphractus sexcinctus*.

Cerrado 1										Cerrado 2									
Loco	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>RA</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>P_L</i>	<i>P_S</i>	Loco	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>RA</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>P_L</i>	<i>P_S</i>
Yarm1	28,000	6,000	4,752	5,843	0,929	0,790	-0,158	0,985	0,048	Yarm1	29,000	6,000	4,596	5,826	0,897	0,782	-0,129	0,949	0,129
Yarm4	30,000	4,000	2,490	3,562	0,767	0,598	-0,266	0,981	0,051	Yarm4	29,000	3,000	2,526	3,000	0,621	0,604	-0,010	0,631	0,563
Yarm8	27,000	6,000	2,514	5,081	0,852	0,602	-0,399	0,999	0,003	Yarm8	25,000	8,000	4,310	7,541	0,880	0,768	-0,126	0,950	0,151
Yarm10	29,000	9,000	5,780	8,509	0,655	0,827	0,224	0,005	0,998	Yarm10	30,000	11,000	6,691	9,813	0,867	0,851	-0,002	0,608	0,633
Yarm12	23,000	4,000	1,869	5,258	0,652	0,465	-0,230	0,996	0,025	Yarm12	28,000	5,000	2,550	5,482	0,893	0,608	-0,309	1,000	0,004
Yarm14	29,000	6,000	2,691	3,478	0,862	0,628	-0,384	1,000	0,031	Yarm14	31,000	6,000	3,090	4,455	0,935	0,676	-0,455	1,000	0,003
Yarm15	27,000	9,000	7,364	5,147	1,000	0,864	-0,357	1,000	0,003	Yarm15	29,000	9,000	7,313	5,563	0,931	0,863	-0,369	1,000	0,001
Yarm17	28,000	4,000	3,057	8,686	0,750	0,673	-0,139	1,000	0,025	Yarm17	28,000	5,000	3,881	8,849	0,857	0,742	-0,061	0,893	0,296
Yarm18	28,000	6,000	4,752	6,436	0,929	0,790	-0,153	0,975	0,084	Yarm18	29,000	6,000	4,596	5,992	0,897	0,782	-0,476	1,000	0,001
Yarm19	30,000	4,000	2,490	3,850	0,767	0,598	-0,097	0,819	0,329	Yarm19	29,000	3,000	2,526	4,607	0,621	0,604	-0,137	0,955	0,150
Média	27,900	5,800	3,776	5,585	0,816	0,684	-0,174	1,000	0,001	Média	28,700	6,200	4,208	6,113	0,840	0,728	-0,196	1,000	0,001

Cerrado 3										Pantanal									
Loco	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>RA</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>P_L</i>	<i>P_S</i>	Loco	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>RA</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>P_L</i>	<i>P_S</i>
Yarm1	32,000	6,000	4,561	5,894	0,813	0,781	-0,025	0,695	0,479	Yarm1	20,000	6,000	4,444	5,848	0,850	0,775	-0,071	0,836	0,374
Yarm4	30,000	3,000	2,140	2,969	0,700	0,533	-0,299	0,986	0,043	Yarm4	20,000	4,000	2,010	3,700	0,600	0,503	-0,169	0,855	0,283
Yarm8	28,000	6,000	3,920	5,918	0,929	0,745	-0,229	0,994	0,021	Yarm8	19,000	6,000	3,181	5,886	0,947	0,686	-0,358	1,000	0,004
Yarm10	33,000	1,000	5,018	8,535	0,879	0,801	-0,082	0,906	0,200	Yarm10	17,000	9,000	5,780	9,000	0,824	0,827	0,034	0,466	0,781
Yarm12	32,000	5,000	2,510	6,207	0,844	0,602	-0,088	0,886	0,288	Yarm12	17,000	4,000	2,688	6,000	0,941	0,628	0,164	0,155	0,940
Yarm14	33,000	5,000	3,180	4,415	1,000	0,685	-0,389	1,000	0,001	Yarm14	18,000	5,000	3,071	4,000	1,000	0,674	-0,476	1,000	0,004
Yarm15	28,000	1,000	6,588	4,783	0,893	0,848	-0,447	1,000	0,001	Yarm15	19,000	8,000	4,813	5,000	1,000	0,792	-0,461	1,000	0,001
Yarm17	30,000	7,000	4,286	9,036	0,900	0,767	-0,034	0,794	0,438	Yarm17	20,000	6,000	4,938	7,772	0,950	0,798	-0,237	1,000	0,014
Yarm18	32,000	6,000	4,561	5,600	0,813	0,781	-0,275	1,000	0,010	Yarm18	20,000	6,000	4,444	6,700	0,850	0,775	-0,348	1,000	0,003
Yarm19	30,000	3,000	2,140	6,198	0,700	0,533	-0,157	0,973	0,086	Yarm19	20,000	4,000	2,010	5,996	0,600	0,503	-0,166	0,989	0,086
Média	30,800	4,300	3,890	5,956	0,847	0,708	-0,189	1,000	0,001	Média	19,000	5,800	3,738	5,990	0,856	0,696	-0,197	1,000	0,001

Número de amostras (*N*), Número de alelos (*Na*), Número efetivo de alelos (*Ne*), riqueza alélica (*RA*), heterozigidade observada (*Ho*), heterozigidade esperada (*He*), índice de endocruzamento (*F_{IS}*), valores de *P_L* para déficit de heterozigotos, valores de *P_S* para excesso de heterozigotos. Após correção de Bonferroni $p=0,00125$.

3.2.2. Estrutura genética populacional

A AMOVA indicou que a maior parte da variação genética encontra-se entre os grupos, tanto na Situação A, onde foram definidos três grupos distintos: Pantanal/Cerrado 3 (que apresenta áreas de transição entre Cerrado e Pantanal) / Cerrado 1 + Cerrado 3, quanto na Situação B, onde foram definidos dois grupos: Pantanal / Cerrado 1 + Cerrado 2 + Cerrado 3. Na situação C, onde todas as áreas foram consideradas em um mesmo grupo, foi verificado que aproximadamente 99,43% da variação encontra-se dentro das populações. Diante disso, os resultados da AMOVA indicam que há uma única população na área de estudo (Tabela 3.5).

Tabela 3.5. Distribuição hierárquica da variação genética de *E. sexcinctus* para 10 locos microssatélites em três situações distintas de agrupamento.

Fonte da variação	Situação A	Situação B	Situação C
	Porcentagem da variação	Porcentagem da variação	Porcentagem da variação
Entre grupos	1,0261	0,8681	-
Entre populações dentro de grupos	-0,2299	0,2144	-
Dentro de populações	99,2039	98,9175	99,4269

Situação A: os grupos populacionais são correspondentes ao Pantanal/Cerrado 3/Cerrado 1 + Cerrado 2. Situação B: os grupos populacionais são correspondentes ao Pantanal/Cerrado 3 + Cerrado 1 + Cerrado 2. Situação C: os grupos populacionais são correspondentes Pantanal +Cerrado 1 + Cerrado 2 + Cerrado 3.

Nenhuma das situações apresentou índice de fixação F_{CT} , que representa a diferenciação entre grupos, significativo. O F_{SC} , que representa a diferenciação entre populações dentro de um mesmo grupo, indicou diferenciação significativa na situação B, ou seja, quando foram consideradas as áreas de Pantanal em um grupo e todas as áreas de Cerrado em outro. Já o F_{ST} , que representa a diferenciação entre populações de quaisquer grupos, indicou valores significativos nas três situações. No entanto, estes valores foram muito baixos (Tabela 3.6).

Tabela 3.6. Índices de fixação estimados para três situações de agrupamento distintas

Índice	Situação A		Situação B		Situação C	
	Valor do índice	p-value	Valor do índice	p-value	Valor do índice	p-value
F_{SC}	0.00168	0.05963	0.00120	0.04399	NC	NC
F_{CT}	0.00234	0.25318	0.00597	0.06549	NC	NC
F_{ST}	0.00402	0.00098	0.00717	0.00293	0.00351	0.00000

Valores significativos de p em negrito ($\alpha = 0.05$).

Os valores de F_{ST} variaram de 0,000 (Pantanal-Cerrado 1; Cerrado 1-Cerrado 2; Cerrado 2-Cerrado 3) à 0,00782 (Pantanal-Cerrado 2). Os valores de significância (p) apontam que apenas o agrupamento Pantanal/Cerrado 2 apresenta uma diferenciação genética significativa, no entanto, o valor de F_{ST} é baixo (Tabela 3.7).

Tabela 3.7. Valores de F_{ST} (abaixo à esquerda) e de p (acima à direita) entre os pares de subpopulações de *E. sexcinctus*.

	Pantanal	Cerrado 1	Cerrado 2	Cerrado 3
Pantanal	-	0.13867	0.00586	0.04590
Cerrado 1	0.0000	-	0.11523	0.10547
Cerrado 2	0.00782	0.0000	-	0.26465
Cerrado 3	0.00168	0.00044	0.0000	-

Valores significativos para F_{ST} em negrito ($\alpha = 0.008$ – após correção de Bonferroni).

Para as análises de estrutura populacional, foram considerados ainda os resultados obtidos pelo programa STRUCTURE. A análise bayesiana implementada neste programa apontou que há uma única população para as áreas amostradas (Figura 3.3). O maior valor médio de $\text{LnP}(D)$ e a menor variância fornecidos por este programa representa o número provável de populações (PRITCHARD *et al.*, 2000) (Figura 3.2). Como foi encontrada uma única população, não foi aplicada a correção de Evanno *et al.* (2005).

Figura 3.2. Resultado da análise Bayesiana para a determinação de agrupamentos para 114 indivíduos de *E. sexcinctus*, indicando $K=1$ como valor mais provável.

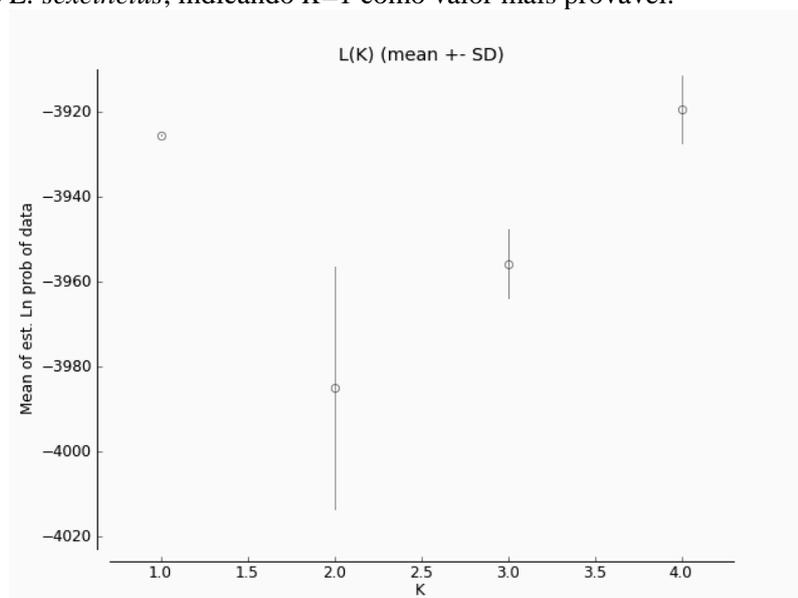
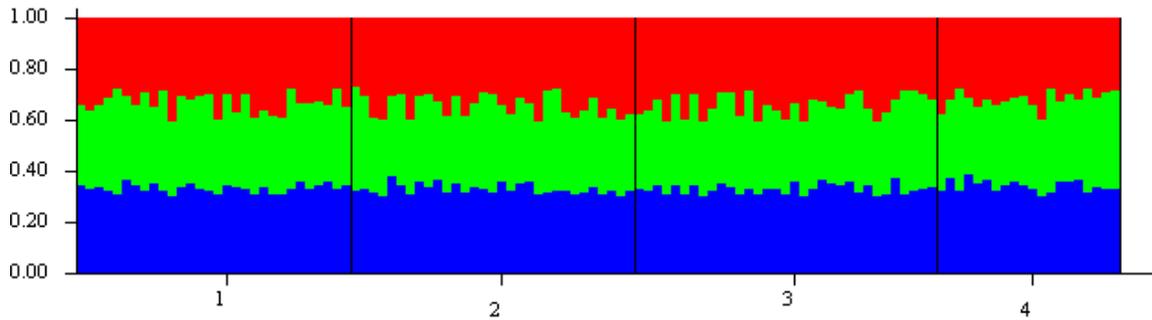


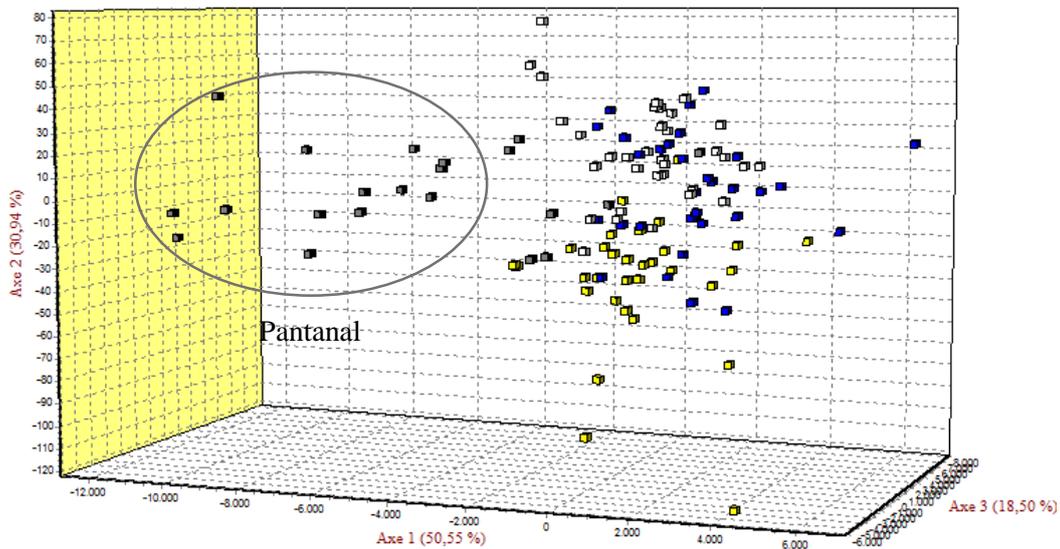
Figura 3.3. Probabilidades de atribuição de indivíduos de *E. sexcictus* para $K=3$.



Cada linha na vertical representa um indivíduo, que possui probabilidades diferentes de ser atribuído a cada um dos *clusters*, indicados pelas distintas cores. Os indivíduos estão ordenados de acordo com sua população de origem. População 1: Cerrado 1; População 2: Cerrado 2; População 3: Cerrado 3; População 4: Pantanal.

A análise de correspondência fatorial, realizada com os indivíduos agrupados de acordo com sua origem geográfica, evidenciou a sobreposição de indivíduos para todas as populações. No entanto, essa análise revelou que indivíduos de Cerrado 3 apresentam maior similaridade com Cerrado 2 e os de Cerrado 1 com Cerrado 2. A população do Pantanal foi a que apresentou o maior número de indivíduos fora da faixa de sobreposição (Figura 3.4).

Figura 3.4. Gráfico de análise de correspondência fatorial (FCA).



Cerrado 1 (pontos em amarelo); Cerrado 2 (pontos em azul); Cerrado 3 (pontos em branco), Pantanal (pontos em cinza).

3.3 DISCUSSÃO

Neste estudo, a maior parte das amostras foram obtidas a partir de atropelamentos. Optou-se por esse tipo de amostragem pela abundância de indivíduos da espécie *E. sexcinctus* encontrados atropelados na área de estudo. Além disso, um estudo realizado por Loughry e McDonough (1996) avaliaram a eficácia da amostragem dos atropelamentos para verificar a demografia e estrutura populacional de tatus da espécie *Dasybus novemcinctus*. Esses autores encontraram que os animais atropelados representavam a demografia de tatus adultos do entorno da área de atropelamento. Dessa forma, considerou-se que a avaliação da distribuição da diversidade genética e a estrutura genética populacional de *E. sexcinctus*, uma espécie com altas taxas de mortalidade em estradas, pode ser realizada a partir da amostragem de atropelamentos.

Os valores de diversidade genética encontrados para todas populações amostrais foram muito semelhantes. Tal fato, associado a existência de uma população panmítica encontrada pelas análises de estruturação populacional, sugere que a amostragem utilizando indivíduos atropelados foi satisfatória.

O número de alelos obtidos para *E. sexcinctus* foram maiores do que os encontrados por Prodohl *et al.* (1996) para uma população de *D. novemcinctus* dos Estados Unidos, onde considerando sete microssatélites, o número de alelos variou entre três e sete. No presente estudo, com 10 microssatélites, este número variou entre quatro e 11 alelos. No entanto, o número de alelos por loco aqui relatado foi inferior ao encontrado para *D. novemcinctus* no México (ARTEAGA *et al.*, 2012). Nesse estudo, o número de alelos variou entre nove e 20, considerando apenas seis locos microssatélites. Embora *E. sexcinctus* tenha apresentado um menor número de alelos, os valores de heterozigidade foram maiores para essa espécie. O excesso de heterozigotos observado para *E. sexcinctus* nas áreas Pantanal, Cerrado 2 e Cerrado 3 pode indicar expansão populacional nessas áreas.

Os valores de diversidade genética aqui obtidos foram discrepantes daqueles obtidos para *Tolypeutes tricinctus*, o tatu-bola (MORAES, 2015). Os valores obtidos para essa espécie de tatu ameaçada foram muito inferiores aos obtidos para *E. sexcinctus*. Para *T. tricinctus*, Moraes (2015) desenvolveu e testou um grande número de marcadores do tipo microssatélites, no entanto, foram encontrados apenas dois locos polimórficos em 23

locos testados. Dessa forma, foi obtido apenas 9% de polimorfismo para os locos testados, enquanto aqui foram encontrados aproximadamente 77% dos locos polimórficos. Esses resultados podem ser explicados pelo tamanho populacional reduzido observado para espécies ameaçadas, como o tatu-bola, em contraste com populações maiores, observadas para populações não ameaçadas como *E. sexcinctus* (FRANKHAM, 2002). Na área do Pantanal aqui amostrada, por exemplo, sabe-se que *E. sexcinctus* é abundante (ALHO *et al.*, 1987).

Muitas das características da espécie que justificam a sua alta diversidade genética, também podem justificar a ausência de estruturação populacional nas áreas amostradas. A ocorrência em diferentes tipos de vegetação, os hábitos alimentares generalistas e a certa tolerância a ambientes antropizados, possibilitam que esses animais se desloquem amplamente pela paisagem promovendo, assim, o fluxo gênico e a consequente homogeneização das populações de *E. sexcinctus*. No entanto, embora se trate de uma população panmítica, como foi apontado pela AMOVA e pelo STRUCTURE, os resultados obtidos pelas análises de F_{ST} e de correspondência fatorial não podem ser ignorados, pois podem fornecer dados importantes sobre o comportamento populacional da espécie.

O índice de fixação F_{ST} apontou uma estruturação significativa, porém muito baixa, entre Pantanal e Cerrado 2 ($F_{ST} = 0.00782$). Valores de F_{ST} significativos, porém, muito baixos, também foram obtidos quando as áreas amostrais foram divididas em dois grupos: Pantanal em um grupo e áreas de Cerrado de em outro grupo ($F_{ST} = 0.00351$ a 0.00717). Segundo Frankham (2002), valores de F_{ST} acima de 0,15 são considerados indicativos de diferenciação moderada entre populações, enquanto valores próximos a 0,07 podem indicar um baixo grau de diferenciação. Baixos valores de diferenciação genética também foram obtidos para *D. novemcinctus* no México (ARTEAGA *et al.*, 2012).

A análise de correspondência fatorial evidenciou maior similaridade entre os indivíduos do Cerrado do que entre os indivíduos de Cerrado e Pantanal. Foi observado que poucos indivíduos de Cerrado 1 e Cerrado 3 se sobrepõem, e que estes últimos são mais similares aos indivíduos de Cerrado 2. A maior similaridade entre as áreas de Cerrado 1 e Cerrado 2 pode estar sendo favorecida pela ausência de grandes aglomerações humanas entre elas. A menor similaridade encontrada entre Cerrado 1 e Cerrado 3 pode estar ocorrendo devido à presença da capital Campo Grande. Essa análise pode parecer

incoerente quando se observa que Campo Grande localiza-se entre Cerrado 2 e Cerrado 3, ocorrendo mesmo assim muita sobreposição entre seus indivíduos. Tal fato pode estar ocorrendo porque Campo Grande estende-se mais ao sul da MS-BR262, podendo representar uma barreira entre Cerrado 1 e Cerrado 3, mas não entre Cerrado 2 e Cerrado 3.

CAPÍTULO 4

Distribuição dos atropelamentos de *Euphractus sexcinctus* em rodovias do Mato Grosso do Sul: uma avaliação da mortalidade de machos e fêmeas

4. Distribuição dos atropelamentos de *Euphractus sexcinctus* em rodovias do Mato Grosso do Sul: uma avaliação da mortandade de machos e fêmeas

Neste capítulo serão abordados os dois últimos objetivos específicos do presente trabalho: (i) avaliar a distribuição dos atropelamentos de *E. sexcinctus* ao longo de diferentes rodovias, identificando possíveis aglomerações de atropelamentos; e (ii) avaliar a distribuição de machos e fêmeas atropelados ao longo de diferentes rodovias.

4.1. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Obtenção de amostras

Foram obtidas 98 amostras de tecido (97 de orelha e apenas uma amostra de perna) de indivíduos da espécie *Euphractus sexcinctus* mortos por atropelamento em três estradas do Mato Grosso do Sul. Todas as estradas eram pavimentadas e de pista dupla. Para a amostragem foram definidas três rotas, todas tendo Campo Grande como origem (Tabela 4.1). As rotas constituíram, assim, três transectos. As coletas foram realizadas quinzenalmente durante um ano, entre março de 2013 e abril de 2014. Cada coleta consistia de três dias, sendo percorrido um transecto por dia em automóvel com velocidade média entre 40 e 50km/h. No total, foram percorridos mais de 23000 km. Para cada animal observado foi anotada a coordenada geográfica com o uso de GPS. As amostras foram coletadas pelos projetos Tatu Canastra Pantanal e Anta Pantanal.

Os tecidos coletados foram armazenados em microtubos contendo álcool etílico absoluto, e enviados ao laboratório, onde foram armazenados em freezer a -20°C.

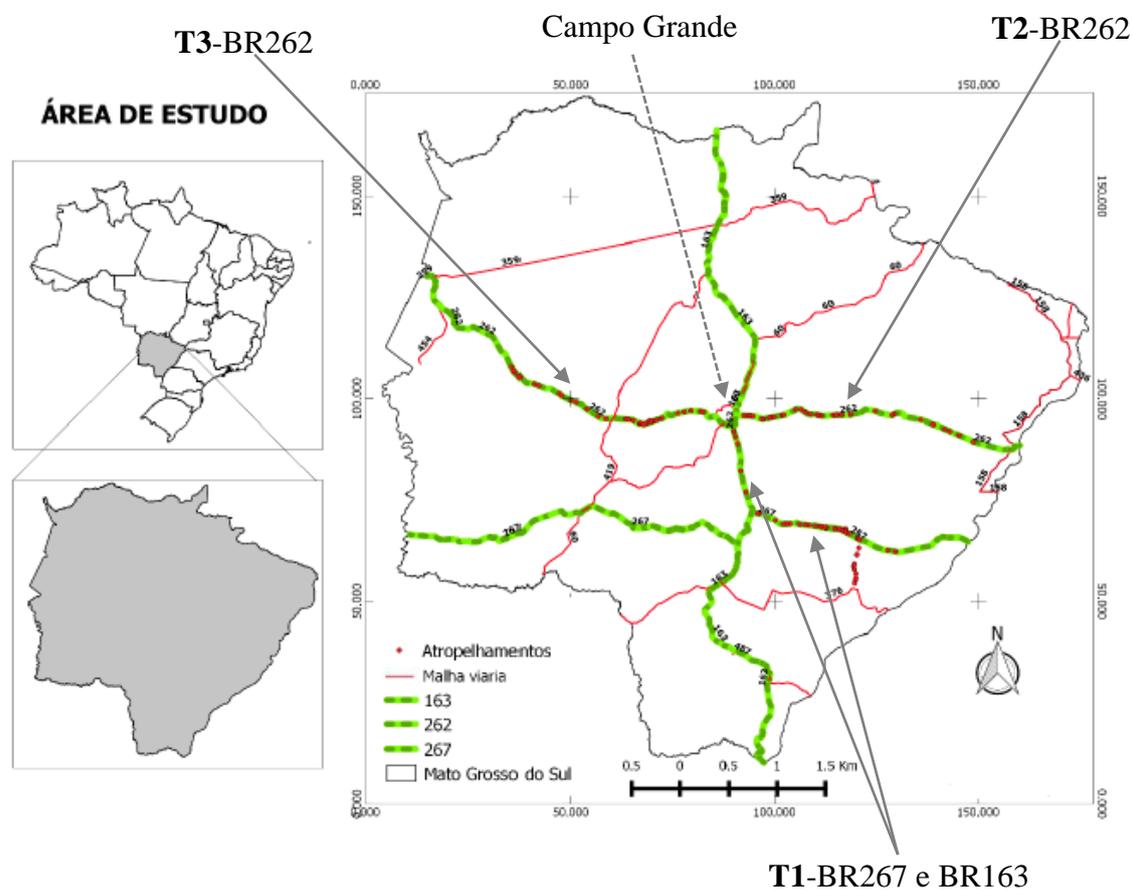
Os dados sobre o tráfego foram obtidos no Relatório do Departamento Nacional de Infraestrutura de Transportes, DNIT (2011) (Tabela 4.1).

Como as estradas estudadas cortam áreas muito antropizadas de Cerrado, suas áreas de entorno foram classificadas apenas de acordo com a presença (Mata e Campo arborizado) ou ausência de árvores (Campo), eucaliptais e residência.

Tabela 4.1. Dados sobre as estradas amostradas e o número de amostras obtidas.

Rodovia	Rota	Transecto	Tráfego (veículos/dia)	Comprimento da estrada (Km)	Nº de amostras
BR-163 e BR-267	Campo Grande - Nova Alvorada	T1	2794*	275	32
Tes	Campo Grande – Três Lagoas	T2	2193	305	33
BR-262	Campo Grande – Ponte do Rio Paraguai	T3	1521	340	33

*Tráfego apenas na BR163

Figura 4.1. Rodovias do Mato Grosso do Sul amostradas com os pontos de atropelamentos de *E. sexcinctus*.

4.1.2 Extração de DNA e amplificação dos genes *SRY* e *Zinc Finger*

As extrações de DNA das amostras foram realizadas utilizando o método Salino modificado de Aljanabi e Martinez (1997) (Anexo 1). O DNA genômico total obtido foi quantificado em biofotômetro e sua integridade foi avaliada mediante eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com Gel Red™. O DNA foi diluído em água Milli-Q

autoclavada, e parte dele foi utilizado na preparação de alíquotas de uso com concentração de aproximadamente 10ng/μl.

Para a sexagem molecular foram utilizados dois pares de *primers* simultaneamente, ambos descritos por Fain e LeMay (1995). Um par foi utilizado para a amplificação do gene *SRY* (*Forward*: 5'-CCCATGAACGCATTCATTGTGTGG-3' e *Reverse*: 5'-ATTTTAGCCTTCCGACGAGGTGATA-3'), ou seja, para a identificação de machos e um para a amplificação do gene *Zinc Finger, ZFY/X*, (*Forward*: 5'-ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT-3' e *Reverse*: 5'-GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT-3'), o qual foi utilizado como controle das reações, uma vez que deve apresentar amplificação tanto para machos quanto para fêmeas. Os *primers* para o *SRY* amplificam fragmentos com 224 pb, enquanto os *primers ZFY/X* amplificam fragmentos com 445 pb em fêmeas e 447 pb em machos. A diferença de tamanho entre os fragmentos é importante para a amplificação simultânea desses genes e posterior identificação dos sexos em gel de eletroforese.

Para a avaliação da eficiência desses *primers* na sexagem de tatus, ambos foram amplificados em dez indivíduos de sexos conhecidos, cinco machos e cinco fêmeas. Os animais utilizados como controle foram capturados, ou seja, tais amostras eram oriundas de espécimes vivos. As amostras controle consistiam de pelo e tecido. Duas amostras de pelo e três de tecido para cada sexo. As extrações das amostras de pelo foram realizadas utilizando o método Fenol-Clorofórmio de SAMBROOK *et al.* (1989) com pequenas modificações.

Para as reações de PCR foram utilizados solução tampão 1x *Taq Buffer*, 1 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 μM de cada *primer*, 0,5 U *Taq* Polimerase (Invitrogen-Platinum) e 40ng de DNA em um volume final de 12μl de reação.

O programa para a amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 3 min; 35 ciclos de 94°C por 45 s, 60°C por 45 s, e 72°C por 1 min; finalizando à temperatura de extensão de 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% corado com Gel Red™, e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Para se estimar o tamanho aproximado dos fragmentos observados, foi utilizado o marcador de peso molecular 1kb *Plus* (Invitrogen).

4.1.3. Análise dos dados

Inicialmente foi realizado o teste do Qui-quadrado (X^2) para verificar se havia diferenças significativas na frequência de atropelamentos de machos e fêmeas. O teste teve como hipótese nula que os atropelados para cada sexo é igual. Este teste foi realizado considerando os atropelamentos em cada transecto separadamente.

Para avaliar a não-aleatoriedade dos atropelamentos ao longo das rodovias, e identificar possíveis agrupamentos significativos, foi realizada a estatística K de Ripley utilizando o software Siriema (COELHO, 2011). Optou-se pela estatística K de Ripley-2D porque esta mantém a bidimensionalidade do traçado, fornecendo distâncias mais reais entre os pontos de atropelamento (COELHO *et al.*, 2008). Na estatística K de Ripley-2D, o traçado da rodovia, a paisagem local e presença de outros atropelamentos são considerados, enquanto que na estatística K de Ripley linearizada tais fatores não são considerados, o que pode superestimar a distância entre os atropelamentos.

Uma primeira análise foi realizada considerando todos os animais atropelados, independente do sexo. Outras duas análises foram realizadas considerando apenas machos e apenas fêmeas.

Após a identificação dos agrupamentos significativos, foi realizada uma análise dos principais trechos de atropelamentos, os chamados *hotspots*. Essa análise também foi realizada no programa Siriema 1.1 (COELHO *et al.*, 2011), e foi considerado o espaço bidimensional utilizando o método Análise de *HotSpots – 2D*. Essas análises também foram realizadas considerando separadamente as três rotas pré-estabelecidas. As análises de *hotspots* também foram realizadas de três formas: uma considerando todas as amostras, uma considerando apenas machos e uma considerando apenas fêmeas.

4.2. RESULTADOS

Este é o primeiro trabalho a utilizar sexagem molecular em tatus. Embora a identificação do sexo em *E. sexcinctus* possa ser facilmente determinada pela identificação da genitália (MEDRI, 2008), neste estudo a metodologia foi necessária porque a identificação do sexo dos indivíduos não foi realizada durante as coletas. Desta forma, uma informação de grande importância para a compreensão de aspectos ecológicos da espécie pôde ser acessada por dados moleculares.

A sexagem molecular em tatus da espécie *E. sexcinctus* foi realizada com sucesso para todos os tipos de amostras testadas: tecidos e pelos de animais capturados e tecidos de carcaças. Os produtos de PCR de todas as amostras sexadas, quando visualizados em gel de agarose, apresentaram bandas de tamanhos aproximados esperados para ambos os genes utilizados. Foram obtidas duas bandas para machos e apenas uma banda para fêmeas. Imagens de géis de sexagem podem ser visualizadas nas Figuras 4.2 e 4.3.

Figura 4.2. Gel de sexagem evidenciando duas bandas para machos e apenas uma banda para fêmea (ausência de amplificação para a amostra dois) e controle negativo em cinco. A primeira coluna corresponde ao *ladder*.

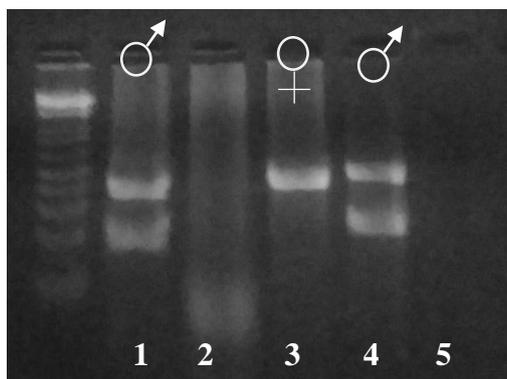
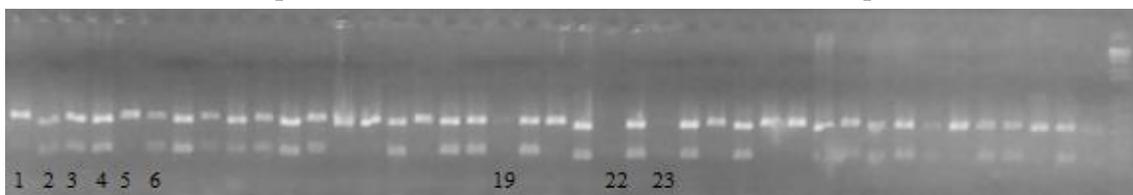


Figura 4.3. Gel de sexagem evidenciando a amplificação de diferentes tipos de amostras. Ausência de amplificação para as amostras 19, 22 e 23. Amostras 1 e 2: pelo; amostras 3, 4, 5 e 6: tecido de animais capturados; demais amostras: tecido de animais atropelados.



Foram sexados 98 indivíduos, dos quais 62 eram machos e 36 eram fêmeas. Em T1 foram encontradas 17 fêmeas e 15 machos; em T2 10 fêmeas e 23 machos; e em T3 10 fêmeas e 23 machos.

O teste do Qui-quadrado apontou diferença significativa entre o número de machos e fêmeas atropelados considerando todas as áreas em conjunto ($X^2=6,8979$; $p=0,0086$). Houve diferença significativa entre o número de machos e fêmeas em dois dos trechos pré-estabelecidos: T2 e T3 ($X^2=5,1212$; $p=0,0236$). Apenas o T1 não apresentou diferença significativa entre o número de machos e fêmeas atropelados ($X^2=0,125$; $p=0,7237$).

A não-aleatoriedade dos atropelamentos foi confirmada pela estatística K de Ripley-2D, e agrupamentos significativos de atropelamentos foram identificados em todas estradas. A análise de *HotSpots – 2D* evidenciou três *hotspots* no T1, quatro no T2 e três no T3. Observou-se maior ocorrência de machos atropelados nos *hotspots* em T2 e T3, enquanto no T1 houve maior ocorrência de atropelamentos de fêmeas.

Considerando todas rotas, observou-se as seguintes constituições de cobertura vegetal do entorno dos atropelamento: mata/mata, mata/campo, mata/eucalipto, campo arborizado/campo, campo/eucalipto, eucalipto/eucalipto e campo/campo). Dessas áreas, apenas Mata/Mata, Campo/Mata e Campo/Campo foram encontradas no entorno dos *hotspots*.

4.3. DISCUSSÃO

O grande número de indivíduos atropelados encontrado em todas as áreas amostradas corrobora com estudos sobre atropelamentos de fauna do Brasil. Embora não haja trabalhos específico sobre os impactos dos atropelamentos sobre *E. sexcinctus*, estudos sobre atropelamento de fauna comumente relatam a ocorrência da espécie, inclusive dentre as mais representativas (FREITAS 2009; WEISS; VIANNA, 2012). Este fato pode ser resultante da ampla distribuição geográfica da espécie, sua tolerância às alterações antrópicas, e de características biológicas da espécie como visão pobre e deslocamento lento (REDFORD; WETZEL, 1985; FORMAN *et al.* 2003; GRILO *et al.* 2011).

Nossos resultados indicam um maior impacto sobre os machos na maioria das áreas amostradas. Estes resultados podem ser justificados pela diferença do tamanho da área de vida e dispersão diferencial entre os sexos de *E. sexcinctus*. Segundo Encarnação (1987) e Medri (2008), os machos apresentam área de vida maior do que as fêmeas. Uma área de vida maior aumenta as chances de uma rodovia se sobrepor sobre a área de vida de um indivíduo, aumentando, conseqüentemente, sua chance de ser atropelado. Artega *et al.* (2012) propõem ainda maior filopatria para as fêmeas da espécie de tatu *Dasypus novemcinctus*.

Nossos resultados diferem, no entanto, daqueles encontrados por Loughry e McDonough (1999) em uma rodovia dos Estados Unidos, onde o número de machos e

fêmeas atropelados foi similar para a espécie *D. novemcinctus*. Tal diferença pode ser justificada pelo fato de machos e fêmeas de *D. novemcinctus* apresentarem áreas de vida semelhantes, diferente do que é relatado para *E. sexcinctus*.

Observou-se ainda que o número de machos e fêmeas em T2 e T3 foram iguais, com um número elevado de machos atropelados. É interessante notar que ambos os transectos situam-se na mesma rodovia, a BR262. No entanto, em T1 (BR267/BR163) a diferença entre o número de machos e fêmeas não foi significativa. Esses resultados sugerem que as áreas amostradas podem exercer pressões diferentes sobre *E. sexcinctus*. Assim, estudos mais aprofundados da paisagem tornam-se extremamente necessários para a melhor compreensão do impacto dos atropelamentos sobre o tatu-peba.

CONCLUSÕES

- ❖ O presente estudo forneceu uma grande quantidade de dados genéticos para a espécie *E. sexcinctus*. Estes dados, além de responderem aos questionamentos aqui levantados, também poderão ser utilizados em trabalhos futuros sobre essa espécie e mesmo sobre outras espécies de tatus.
- ❖ As diferenças observadas no genoma mitocondrial de um indivíduo do Pantanal do Mato Grosso do Sul em relação ao mitogenoma de *E. sexcinctus* de origem desconhecida, evidenciou a importância deste dado para o melhor entendimento da diversidade genética intra-específica.
- ❖ A alta diversidade genética encontrada em todas as áreas amostradas condiz com o esperado para espécies não ameaçadas.
- ❖ A ocorrência de uma população panmítica de *E. sexcinctus* em uma região do Mato Grosso do Sul não deve desencorajar medidas de conservação para a espécie, pois, embora não tenha sido encontrada estruturação populacional, a análise de correspondência fatorial evidenciou que indivíduos de algumas áreas quase não se sobrepõem.
- ❖ Os dados sobre atropelamentos aqui disponibilizados evidenciaram diversos *hotspots* de atropelamentos. Tal identificação é útil para tomada de medidas mitigadoras. No entanto, dados sobre a paisagem do entorno tornam-se necessários para o melhor entendimento da distribuição dos atropelamentos nas rodovias amostradas e da ecologia dessa espécie de tatu.
- ❖ O grande número de machos atropelados parece estar relacionado com a maior área de vida relatada para esse sexo. Além disso, as fêmeas de mamíferos tendem a ser mais filopátricas. Neste caso, os machos são primordiais para a manutenção da diversidade genética da espécie e estudos futuros devem reavaliar se a diversidade da mesma foi mantida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS B., *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463p.

ALHO, C. J. R., *et al.* Mamíferos da Fazenda Nhumirim, sub-região de Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul. I – Levantamento preliminar de espécies. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 4, n. 2, p. 151-164, 1987.

ALJANABI SM, MARTINEZ I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4692-4693, 1997.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the Genetics of Populations**. Blackwell Publishing Ltda, 2007. 642 p.

ANDERSON, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, p. 457–465, 1981.

ARNASON, U.; GULLBERG, A; JANKE, A. Phylogenetic analyses of mitochondrial DNA suggest a sister group relationship between Xenarthra (Edentata) and Ferungulates. **Molecular biology and evolution**, v. 14, p. 762–768, 1997.

ARTEAGA, Maria Clara *et al.* Genetic structure and diversity of the nine-banded armadillo in Mexico. **Journal of Mammalogy**, [s.l.], v. 93, n. 2, p.547-559, 2012.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994, 511 p.

AVISE, J. C., *et al.* Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual review of ecology and systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.

AZEVEDO, A. T. C. de. *et al.* Illegal hunting and fishing in Brazil: A study based on data provided by environmental military police. **Natureza e Conservação**, v. 13, n. 2, p. 183–189, 2015.

BALLOUX F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 155–165, 2002.

BELKHIR, K. *et al.* GENETIX 4.05, software under Windows™ for the genetics of populations. **University of Montpellier, Montpellier, France**, 2004.

BENNETT A. F. Roads, roadsides and wildlife conservation: a review. In: **Saunders DA, Hobbs RJ (eds) Nature conservation 2: the role of corridors**. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton. 1991.

BERNT M., et al. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, p. 313-319, 2013.

BOBROWICZ, A.; LIGHTOWLERS, R.; CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z. Polyadenylation and degradation of mRNA in mammalian mitochondria: a missing link?. **Biochemical Society Transactions**, v. 36 (Pt 3), p. 517-9, 2008.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics** v. 30 n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BONATO, V. 2002. **Ecologia e História Natural de Tatus do Cerrado de Itirapina, São Paulo (Xenarthra: Dasypodidae)**. 80 pp. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

BONATO, V. et al. Ecology of the armadillos *Cabassous unicinctus* and *Euphractus sexcinctus* (Cingulata: Dasypodidae) in a Brazilian Cerrado. **Journal of Mammalogy**, v. 89, n. 1, p. 168-174, 2008.

BONAUDO, T. et al., The effects of deforestation on wildlife along the transamazon highway. **European Journal of Wildlife Research**, v. 51, p. 199–206, 2005.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

CHAMBERS, G. K. & MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 126, p. 455-476, 2000.

CHIAL, H.; CRAIG, J. mtDNA and mitochondrial diseases. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 217, 2008.

CLAYTON, D. A. Replication and transcription of vertebrate. **Annual Reviews Cell Biology**, v. 7, p. 453–478, 1991.

COELHO A.V.P. et al. Spatial Evaluation of Road Mortality Software: Versão 1.1. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). 2011.

COELHO, I. P.; COELHO, A. V. P.; KINDEL, A. Roadkills of vertebrate species on two highways through the Atlantic Forest Biosphere Reserve, southern Brazil. **European Journal of Wildlife Research**, v. 54, p. 689-699, 2008.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 1996.

CUROLE, J. P.; KOCHER, T. D. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 10, p. 394-398, 1999.

DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, n. 5, p. 504-509, 2004.

DANTAS-AGUIAR, P.R., et al. Hunting activities and wild faunause: a profile of Queixo-D'antas community, Campo Formoso, Bahia, Brazil. **Bioremediation Biodiversity and Bioavailability**, v. 5, p. 34-43, 2011.

DELSUC, F.; STANHOPE, M. J.; DOUZERY, E. J. P. Molecular systematics of armadillos (*Xenarthra*, *Dasypodidae*): contribution of maximum likelihood and Bayesian analyses of mitochondrial and nuclear genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 28, n. 2, p.261-75, 2003.

DNIT (Org.). **Monitoramento e Mitigação de Atropelamentos de Fauna**. 2012. Disponível em: <<http://www.dnit.gov.br/download/meio-ambiente/colecao-estrada-verde/monitoramento-e-mitigacao-de-atropelamento-de-fauna.pdf>>. Acesso em: 5 mar. 2016.

DNIT (Org.). **Relatório de volume de tráfego diário (VMD)**. 2011. Disponível em: <<http://www.dnit.gov.br/planejamento-e-pesquisa/planejamento/contagem-de-trafego/dnitvmdm1994a2001.xlsx>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

EARL, D. A. et al. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EISENBERG, J F; REDFORD, K H. **Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil**. Chicago: The University Of Chicago Press, 1999. 609 p.

ENCARNAÇÃO, C. D. da. **Contribuição à ecologia dos tatus (*Xenarthra*, *Dasypodidae*) da Serra da Canastra, Minas Gerais**. 1987. 210 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611- 2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 1, p. 47, 2005.

FAGRO. (Org.). **Mapeamento de cobertura vegetal do bioma Cerrado**: Edital Projeto Probio 02/2004. PROBIO (Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira) do Ministério do Meio Ambiente.. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2007. 93 p.

FAIN, S; LEMAY, J. Gender identification of humans and mammalian wildlife species from PCR amplified sex linked genes. **Proceedings American Academy of Forensic Science**, v. 1, p.34-34, 1995.

FALCONER, D S; MACKAY, T F C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. São Francisco EUA: Benjamim Cummings, 1996. 480 p.

FORMAN, R. T. T.; ALEXANDER, L. E. Roads and Their Major Ecological Effects. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 207–231, 1998.

FORMAN, R T et al. **Road ecology: science and solutions**. Washington: Island Press, 2003. 481 p.

FRANKHAM, R; BALLOU, J D; A BRISCOE, D. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 617 p.

GARESSE R. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations. **Genetics**, v. 118, n. 4, p. 649-663, 1988.

GIBB, G. C. et al. Shotgun Mitogenomics Provides a Reference Phylogenetic Framework and Timescale for Living Xenarthrans. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 3, p.621-642, 2015.

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). 2001.

GRILO, C. et al. Do the size and shape of spatial units jeopardize the road mortality-risk factors estimates? **Natureza & Conservação**. 2016.

GUCWINSKA, H. Development of Six-banded armadillos *Euphractus sexcinctus* at Wrocław Zoo. **International Zoo Yearbook**, v. 11, p. 88-89, 1971.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. 1999. p. 95-98.

HASS, A.; RODRIGUES, F. H. G.; DE OLIVEIRA, T. G. The Yellow Armadillo, *Euphractus sexcinctus*, in the North/Northeastern Brazilian Coast. **Edentata**, v. 5, p. 46-47, 2003.

HELMS, T. & BUCHWALD, E. The effect of road kills on amphibian populations. **Biological Conservation**, v. 99, n. 3, p. 331–340, 2001.

HUANG, X; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome research**, v. 9, p. 868-877, 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 1995-1996: n. 24. Mato Grosso. Rio de Janeiro: IBGE, 1998. 231 p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de biomas e vegetação. 2004. disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 12 mar 2016.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Blackwell Publishing Ltd Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099–1106, 2007.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Blackwell Publishing Ltd Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099–1106, 2007.

KATTI, M. V.; RANJEKAR, P.; GUPTA, V. S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 1161-1167, 2001.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KELLER, K.; EXCOFFIER, L.; LARGIADÈR, C. R. Estimation of effective population size and detection of a recent population decline coinciding with habitat fragmentation in a ground beetle. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 18, n. 1, p. 90- 100, 2005.

KIMMEL, M. et al. Dynamics of repeat polymorphisms under a forward-backward mutation model: within- and betweenpopulation variability at microsatellite loci. **Genetics**, v. 143, p. 549-555, 1996.

KINDLMANN, P.; BUREL, F. Connectivity measures: a review. **Landscape Ecology**, v. 23, p. 879-890, 2008.

LAURENCE, W. F. Rainforest fragmentation and the structure of small mammal communities in tropical Queensland. **Biological Conservation**, v. 69, p. 23-32, 1994.

LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2453-2465, 2002.

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

LOUGHRY, W. J.; McDONOUGH, C. M. 1996. Are road-kills valid indicators of armadillo population structure? **American Midland Naturalist Journal**, v. 135, p. 53-59.

LOUGHRY, W. J. et al. Research on armadillos: A review and prospectus. **Journal of Mammalogy**, v. 96, n. x, p. 635-644, 2015.

LOWE, T. M.; EDDY, S. R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n.9, p. 55-64, 1997.

LUIKART, G.; CORNUET, J. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation biology**, v. 12, n. 1, p. 228-237, 1998.

LUO et al.: SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. **GigaScience**, v. 1, n. 1, p. 18, 2012.

MARSHALL, T. C. et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639-655, 1998.

MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet journal**, v. 17, n. 1, p. 10-12, 2011.

MCNEELY, J. A. *et al.* **Conserving the World's Biological Diversity**. IUCN, World Resources Institute, IUCN, WWF-US and the World Bank, Conservation International, Washington, DC, 1990. 127p.

MEDRI, Í. M. **Ecologia e história natural do tatu-peba, *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758), no Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul**. 2008. 187 p. Tese de doutorado.

Departamento de Ecologia. Universidade de Brasília, Brasília.

MEGLÉCZ, E. et al. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. **Bioinformatics**, v. 26, p. 403-404, 2010.

MILLER, A. D. et al. Microsatellite loci and the complete mitochondrial DNA sequence characterized through next generation sequencing and de novo genome assembly for the critically endangered orange-bellied parrot, *Neophema chrysogaster*. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 35–42, 2013.

MMA - Ministério do Meio (Org.). **Áreas Prioritárias para a Conservação, Uso Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira.**: Atualização Portaria MMA no. 09 de 23 de janeiro de 2007. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2007. 328 p. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/biodiversidade31.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2016.

MMA - Ministério do Meio Ambiente (Org.). **Monitoramento do bioma Pantanal.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011. 30 p. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/_arquivos/relatrio_tcnico_monitoramento_pantanal_2008_2009_72.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2016.

MORIN, P. A. et al. Complete mitochondrial genome phylogeographic analysis of killer whales (*Orcinus orca*) indicates multiple species. *Genome Res*, v. 20, p. 908–916, 2010.

NIELSEN, R.; PALSBO, P. J. Single-locus tests of microsatellite evolution: multi-step mutations and constraints on allele size. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 11, p. 477-484, 1999.

NOWAK, R. M. **Walker's Mammals of the World.** Johns Hopkins University Press. 6. ed., 1999. 836p.

PARKER, P. G. *et al.* What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v. 79, n.2, p. 361-382, 1998.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 502-503, 1999.

PRAMUK, J. B.; HASS, C. A.; HEDGES, S. B. Molecular Phylogeny and Biogeography of West Indians Toads (Anura: Bufonidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 20, n. 2, p. 294–301, 2001.

PRITCHARD, J. K.; MATTHEW, S.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

PRODOHL, P. et al. Molecular documentation of polyembryony and the microspatial dispersion of clonal sibships in the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B. Biological Sciences**, v. 263, p. 1643-1649, 1996.

REDFORD, K. H. 1985. Food habitats of armadillos (Xenarthra: Dasypodidae). In: **The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas**. G. G. Montgomery. Smithsonian Institution Press, Washington and London. 1985. p. 429-437.

REDFORD, K. H.; WETZEL, R. M. **Euphractus sexcinctus**. **Mammalian Species**, v. 252, p. 1-4, 1985.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: **Cerrado: Ambiente e Flora**. SANO, S. M.; Almeida, S. P. (eds.). Planaltina: EMBRAPA CPAC, Cap. 3, p. 87-166, 1998.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225, 1989.

ROUSSET, F. GENEPOP'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 103-106, 2008.

ROZEN S, SKALETSKY HJ. Primer3. Disponível em: http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html. 1998. Acesso em agosto de 2014.

RUTLEDGE LY, GARROWAY CJ, LOVELESS KM, PATTERSON BR. Genetic differentiation of eastern wolves in Algonquin Park despite bridging gene flow between coyotes and grey wolves. **Heredity**, v. 105, n. 6, p. 520-531, 2010.

SAMBROOK, J; FRITSCH, e F; MANIATIS, T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2. ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1886 p.

SANTOS, S. L. D. X. et al. Plantas Utilizadas Como Medicinais Por Uma Comunidade Rural Do Semi-Árido Da Paraíba, Nordeste Do Brasil. **Pos-Graduacao.Uepb.Edu.Br**, v. 93, n. 1, p. 1-157, 2009.

SANO, E. E. et al. Mapeamento semidetalhado (escala de 1:250.000) da cobertura vegetal antrópica do bioma Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 153-156, 2008.

SANTOS, J. R. Avanços das pesquisas e aplicações de sensoriamento remoto no monitoramento da paisagem: contribuições aos estudos do Pantanal. SIMPÓSIO DE GEOTECNOLOGIAS NO PANTANAL, 2006, **Anais...** .Campo Grande, Brasil, Embrapa Informática Agropecuária/INPE, 2006, p.675-683.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234, 2000.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.

SEOANE, C. E.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa*. **Scientia Forestalis**, v. 57, p. 123-139, 2000.

SILVA JÚNIOR, J de S.; NUNES, A. P. The Disjunct Geographical Distribution of the Yellow Armadillo, *Euphractus sexcinctus* (Xenarthra, Dasypodidae). **Edentata**, 4: 16-18, 2001.

SILVA JÚNIOR, J. S.; FERNANDES, M. E. B.; CERQUEIRA, R. New records of the yellow armadillo (*Euphractus sexcinctus*) in the state of Maranhão, Brazil (Xenarthra, Dasypodidae). **Edentata**, v.4, n.1, p.18-23, 2001.

SILVA, Ariadiny Monteiro da et al. Vegetação natural e área antrópica em Mato Grosso do Sul até o ano de 2002. In: SIMPÓSIO DE GEOTECNOLOGIAS NO PANTANAL, 2010, Cáceres. **Anais...** . Cáceres: Embrapa Informática Agropecuária/INPE, 2010. p. 391 - 400.

SIMPÓSIO DE GEOTECNOLOGIAS NO PANTANAL, 1., 2006, Campo Grande. **Avanços das pesquisas e aplicações de sensoriamento remoto no monitoramento da paisagem: contribuições aos estudos do Pantanal**. Campo Grande: Embrapa Informática Agropecuária/INPE, 2006. 683 p.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, London, v.15, p. 199-203, 2000.

TELES, D. A.; RODRIGUES, J. K.; TELES, E. A. Uso Místico – Religioso Da Fauna Comercializada Em Feiras Livres Nos Municípios De Crato E Juazeiro Do Norte, Ceará, Nordeste Do Brasil. **Etnobiología**, v. 11, n. 3, p. 28 – 33, 2013.

TROMBULAK, S. C.; FRISSELL, C. A. Review of ecological effects of roads on terrestrial and aquatic communities. **Conservation Biology**, v. 14, p. 18–30, 2000.

TRUJILLO, F; SUPERINA, M. **Armadillos de los Llanos Orientales. Fundación Omacha, EAD, Corporinoquia, Cormacarena, Bioparque Los Ocarros, Corpometa.** Bogotá: TRUJILLO, F. e M. SUPERINA, 2013. 176 p.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

WADE, P. R. et al. The world's smallest whale population? **Biology Letters**, v. 7, p. 83–85, 2011.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. Clark. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, p. 1358-1370, 1984.

WETZEL R. M. 1985. Taxonomy and distribution of armadillos, Dasypodidae. In: **The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas.** G. G. Montgomery. Smithsonian Institution Press, Washington and London. 1985. p. 23-46.

WOLSTENHOLME, D. R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. **International Review of Cytology**, v. 141, p. 173-216, 1992.

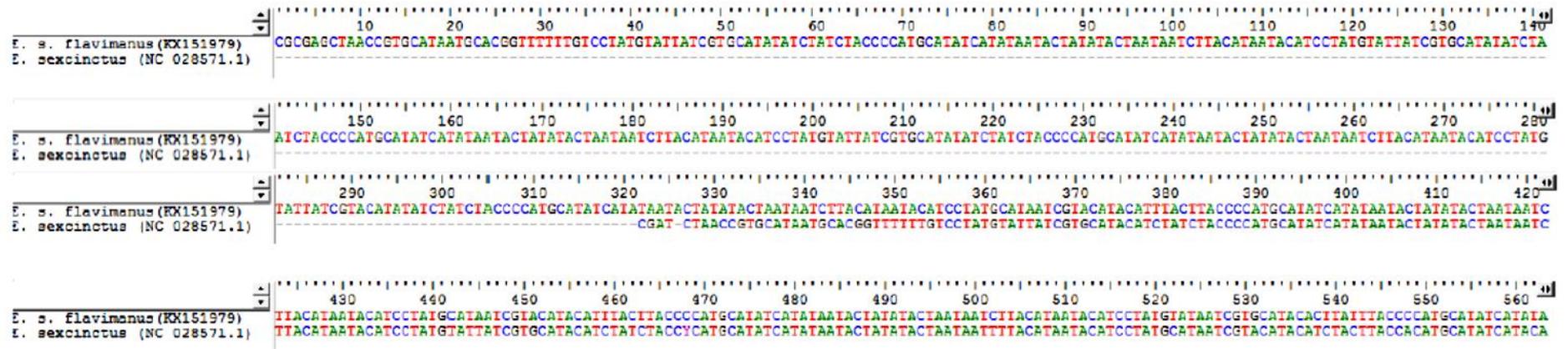
ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, p. 821-829, 2008.

ANEXOS

Anexo 1. Alinhamento das sequências de D-loop de *Euphractus sexcinctus flavimanus* (KX151979) e de *Euphractus sexcinctus* (NC_028571.1).



Anexo 2. Protocolo de extração de DNA utilizando o método salino de Aljanabi e Martinez (1997), com modificações.

1. Homogeneizar o tecido (50 – 100 mg ou 1 cm²) em 400 µl de tampão salino (NaCl 0,4 M; Tris HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA pH 8,0 a 0,2 mM).
2. Adicionar 40 µl de SDS 20% e 8,0 µl de Proteinase K 20 mg/ml e misturar bem.
3. Incubar as amostras a 55 - 65°C por pelo menos 2h ou overnight.
4. Adicionar 300 µl de NaCl 6 M.
5. Vortexar as amostras por 30 segundos a velocidade máxima e centrifugar por 30 min. a 10000 rpm.
6. Transferir o sobrenadante para outro tubo (2,0 ml).
7. Adicionar igual volume de isopropanol e misturar bem.
8. Incubar a -20°C por 1h ou -80°C por 20-30 min.
9. Centrifugar por 20 min. a 10000 rpm.
10. Lavar o pellet com 300 µl de etanol 70% e centrifugar por 5 minutos.
11. Lavar o pellet novamente com 300 µl de etanol 100% e centrifugar por mais 5min.
12. Secar o DNA em estufa e ressuspender em 50 µl de H₂O. Caso haja necessidade, colocar RNase (2,0 µl a uma concentração de 10 ng/µl).