

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**

NAYRA TAVEIRA RODRIGUES

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DO  
TATU-CANASTRA (*Priodontes maximus*) EM UMA ÁREA DO CENTRO-  
OESTE DO BRASIL**

SÃO CARLOS  
2020

NAYRA TAVEIRA RODRIGUES

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DO  
TATU-CANASTRA (*Priodontes maximus*) EM UMA ÁREA DO CENTRO-  
OESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.

Colaborador: Prof. Dr. Arnaud Léonard Jean Desbiez

São Carlos  
2020



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

### Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Nayra Taveira Rodrigues, realizada em 30/03/2020:

---

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior  
UFSCar

---

Profa. Dra. Alexandra Sanches  
UFSCar

---

Prof. Dr. Adriano Garcia Chiarello  
USP

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Alexandra Sanches, Adriano Garcia Chiarello e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

---

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

Dedico este trabalho a todos aqueles que  
de alguma forma contribuem para a  
conservação do meio ambiente.

## AGRADECIMENTOS

Definitivamente, trabalhos acadêmicos não são individuais, são necessárias inúmeras pessoas contribuindo direta ou indiretamente para que eles se concretizem. Esse trabalho não foi diferente, durante todo o tempo que me dediquei a essa tarefa, foram muitas as pessoas que me ajudaram. Gostaria de agradecer a todos, em especial:

Ao professor Dr. Pedro Manoel Galetti Jr. pela oportunidade de pertencer ao Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LabBMC) e confiança depositada em trabalhar com uma espécie tão particular e especial.

A todos os colegas e amigos do LabBMC. Obrigada por proporcionarem esse ambiente tão agradável e acolhedor de se trabalhar, pela disposição, discussões e contribuições. Gostaria de realizar um agradecimento especial aos Pós-Docs. Brunão (Dr. Bruno Saranholi), Karencita (Dra. Karen Rodriguez), Rô (Dra. Rosane Santos) e Carol (Dra. Carolina Machado). Obrigada por me acolherem e aconselharem, por serem professores e orientadores incríveis. Vocês são pessoas inspiradoras, cada um com seu jeito especial me ensinou tanto academicamente como pessoalmente lições que levarei para toda a vida. Não poderia deixar de agradecer ao Alexandre Inforzato e ao Dr. Jorge Ramirez, vocês dois, gênios da bioinformática, salvaram minha vida e meu mestrado.

Obrigada a Lu (Luana Portela), AKA (Mrs. Camila Gonçalves), Marinão (Mrs. Marina Oliveira), Carmela (Mrs. Carmen Elena Barragan) e Shir (Mrs. Shirleny Sandoval), “fridas” amadas. Por todos os papos, por todas as vezes que me abraçaram quando eu chorava, pelas broncas, conselhos, por acreditarem em mim quando eu não acreditei e me empurrarem sempre para cima. Obrigada por todo amor compartilhado, vocês aqueceram meu coração durante esses anos.

Aos pesquisadores colaboradores Dr. Leandro Silveira coordenador do Projeto Tatu-Canastra do Parque Nacional das Emas e Dr. Arnaud L. J. Desbiez coordenador do Projeto Bandeiras e Rodovias e Projeto Tatu Canastra, sem o esforço deles e de todos os envolvidos nos projetos citados esse trabalho não teria sido possível.

Um agradecimento especial ao colaborador Dr. Arnaud L. J. Desbiez por sua paixão, entusiasmo e dedicação em ampliar cada vez mais o conhecimento em relação a espécie Tatu-canastra criando uma linda rede de trabalho. Sua contribuição para a conservação dessa espécie e de tantas outras é inestimável.

A banca examinadora Prof. Dr. Adriano G. Chiarello e Profa. Dra. Alexandra Sanches por terem aceitado o convite em avaliar e contribuir com nosso trabalho. Obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Código de Financiamento 001), pela bolsa concedida que permitiu que eu me dedicasse exclusivamente a pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e ao Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade de cursar o Mestrado.

Obrigada as minhas companheiras de casa, que me acolheram quando me mudei para São Carlos, Thais Navarro e Thais Souza, e as novas companhias Lúcia Vivaldini e Taynara Oliveira, obrigada pelos papos, pelas comidas e por me proporcionarem um lugar cheio de amor para voltar depois de um dia difícil no lab.

Obrigada ao meu namorado, Raphael Guimarães Lopes. Você foi um parceiro incrível durante essa etapa. Sempre me incentivando, me apoiando, me ouvindo e aconselhando. O Yin do meu Yang, que estava sempre pronto para me consolar e acalmar durante meus momentos de desespero. Obrigada pela paciência e por seu amor. Obrigada também a sua família, principalmente dona Margaridinha, Sr. Orlando e minha sogrinha Regina. Estando longe da minha família vocês me acolheram e me ajudaram sempre que precisei. Muito obrigada!

Obrigada aos meus amados pais Fernando Bosi Rodrigues e Beatriz Cristina Taveira e a minha irmã Livia Taveira Rodrigues. Sei que para vocês a distância não foi fácil, assim como não foi para mim. Obrigada por muitas vezes mesmo sem entender o que eu fazia me apoiarem nas minhas escolhas, por compreenderem minha ausência, e por todo esforço realizado. Obrigada por me fazerem saber que eu sempre vou ter um colo para correr caso tudo der errado. Amo vocês de todo coração.

*“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

O tatu-canastra, *Priodontes maximus*, é um mamífero neotropical que pertence a super ordem dos Xenarthra. A espécie está amplamente distribuída por nove países da América do Sul. Embora sua distribuição seja ampla, ele ocorre em populações descontínuas e de baixa densidade na maioria das áreas. *P. maximus* está listado como "vulnerável" na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN devido a um recente declínio populacional causado, provavelmente, por ações antrópicas. Uma questão importante que deve ser considerada ao propor ações para conservação é o conhecimento da diversidade e da estrutura genética de populações naturais. Entretanto, esses dados não estão disponíveis para a espécie focal desse trabalho. Dessa forma, o presente estudo representa o primeiro trabalho genético populacional que visa investigar a distribuição da diversidade genética em *P. maximus*, na região Centro-Oeste brasileira, abrangendo áreas nos biomas Pantanal e Cerrado. Foram utilizados 14 marcadores microssatélites selecionados por sequenciamento de nova geração e amplificados em 41 amostras de tatus-canastra coletadas na área de estudo. Os microssatélites desenvolvidos neste trabalho mostraram-se bastante úteis para as análises genéticas realizadas. Os resultados de agrupamento bayesiano espacial indicaram a presença de dois *clusters* ( $K = 2$ ) dentro da amostragem, separando os indivíduos do Cerrado e Pantanal. Encontramos níveis moderados de heterozigidade esperada nos dois *clusters*, porém, ambos os grupos apresentaram diversidade alélica e número efetivo de alelos baixo, o que pode ser reflexo da recente redução populacional descrita para a espécie. O desenvolvimento desses microssatélites específicos abre a possibilidade para a realização de outros estudos populacionais em *P. maximus*, incluindo as populações encontradas nos remanescentes de Mata Atlântica, onde a espécie está com grande risco de extinção local. Os dados obtidos no presente estudo fornecem informações importantes também para entendimento da ecologia desses animais e poderão ser utilizados em planos de manejo da espécie.

**Palavras-chave:** Cingulata, Xenarthra, microssatélites, genética da conservação.



## ABSTRACT

The giant armadillo, *Priodontes maximus*, is a neotropical mammal that belongs to the Xenarthra superorder. The species is widely distributed in nine countries in South America. Although its distribution is wide, it occurs in low densities in most areas. *P. maximus* is listed as "vulnerable" on the IUCN Red List of Threatened Species due to a recent population decline caused by anthropic actions. Knowledge of the population's genetic structure and diversity is an essential issue that must be considered when proposing conservation actions, however, those data are not available for this specie. Thus, the present study represents the first population genetic work and aims to investigate the distribution of the genetic diversity of *P. maximus*, in the Midwest region of Brazil, covering areas in the Pantanal and Cerrado biomes. We used 14 microsatellite markers selected by new generation sequencing and amplified in 41 samples of giant armadillos collected in the study area. The microsatellites developed in this work proved to be useful for the genetic studies carried out. The results of spatial Bayesian grouping indicated the presence of two clusters ( $K = 2$ ) within the sample, separating individuals from Cerrado and Pantanal. We found moderate levels of heterozygosity expected in the two clusters, however, both groups showed low allelic diversity and effective allele number, which may reflect the recent population reduction described for the species. The development of these specific microsatellites opens the possibility for further population studies on *P. maximus*, including the populations found in the remnants of the Atlantic Forest, where the species is at great risk of local extinction. The data obtained in the present study also provide important information for understanding the ecology of these animals and can be used in species management plans.

**Keywords:** Cingulata, Xenarthra, microsatellites, conservation genetics.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Priodontes maximus*. Foto: Luiz Claudio Marigo. Fonte: sarkive.com.....17
- Figura 2.** Distribuição geográfica de *P. maximus* (IUCN) e área ampliada onde a amostragem foi realizada nos biomas Pantanal e Cerrado. P = Pantanal; C = Cerrado; P-ATR = Animal atropelado no Pantanal; P-FBP = Fazenda Baía das Pedras; C-ATR = Animais atropelados no Cerrado; C-PNE = Parque Nacional das Emas. Fonte: Adaptado de IUNC 2019; Ministério do Meio Ambiente 2008.....22
- Figura 3.** Estimativa do número de *clusters* (K) mais adequado para o conjunto de dados analisados. **A)** Metodologia proposta por Pritchard *et al.* (2000) para definição do K mais provável. **B)** Metodologia proposta por Evanno *et al.* (2005) para definição do K mais provável.....32
- Figura 4.** Gráfico com o número de *clusters* (K=2) mais provável fornecido pelo pacote Geneland. Mapas de probabilidade posterior de atribuição espacial das populações amostrais de *Priodontes maximus* no estado do Mato grosso do Sul e Goiás. **A)** Número de K mais provável indicado pela análise é K=2. **B)** Agrupamento espacial sugere dois *clusters* distintos ao longo da área geográfica estudada. A linha tracejada corresponde a divisa entre os biomas Pantanal e Cerrado. Os pontos pretos representam a localidades dos indivíduos. Valores mais altos de probabilidade de pertencer ao *cluster* são representados pelas cores amarela e branca.....33
- Figura 5.** Autocorrelação espacial (SAA) para *Priodontes maximus*. (n=41). **A)** Autocorrelação espacial (SAA) para todos os indivíduos (n=41). **B)** Autocorrelação espacial (SAA) sem os indivíduos subadultos (n=30). Os gráficos mostram o coeficiente de correlação genética (r) em função da distância geográfica entre as classes de distância espacial definidas. Linhas vermelhas tracejadas representam os limites superior (U) e inferior (L) da hipótese nula de ausência de estrutura espacial com base em 10.000 permutações aleatórias. As barras de erro representam intervalos de confiança de 95% sobre r com base em 1.000 *bootstraps*.....34
- Figura 6.** Gráfico das frequências alélicas dos 14 locos de SSR, estimados para cada *cluster* encontrado nesse estudo. O eixo Y indica as frequências alélicas e o eixo X indica o tamanho do alelo para cada loco.....38

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Microssatélites isolados para *Euphractus sexcinctus* por Paviotti-Fischer (2016). Nomes dos locos, sequências dos *primers forward* e *reverse*, motivo com número de repetições e tamanho do produto de PCR na espécie onde foram descritos.....24

**Tabela 2.** Microssatélites isolados para *Dasypus novemcinctus* por Prodöhl *et al.* (1996). Nomes dos locos, sequências dos *primers forward* e *reverse*, motivo e número de repetições e tamanho do produto de PCR.....25

**Tabela 3.** Características dos 14 locos de microssatélites desenvolvidos e testados para *Prionomys maximus*. Nome dos locos, sequências dos *primers forward* e *reverse*, motivo (*motif*) com número de repetições, temperatura de anelamento ( $T_a$ ) e tamanho do produto de PCR.....31

**Tabela 4.** Parâmetros da diversidade genética para cada *cluster*, baseados em 14 locos de microssatélites.  $N$  = número de indivíduos analisados;  $N_A$  = Número de alelo por loco;  $R_A$  = Riqueza alélica;  $A_E$  = número efetivo de alelos;  $P_A$  = Alelos privados; PIC = conteúdo de informação polimórfica; HWE = p-valor do teste exato de Fischer para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weibnerg ( $\alpha= 0,05$ );  $H_O$  = heterozigosidade observada;  $H_E$  = heterozigosidade esperada;  $F_{IS}$  = coeficiente de endogamia. O nível de significância dos valores de  $F_{IS}$  para o  $p < 0,00357$ ;  $P_S$  = valores de  $F_{IS}$  *smaller*;  $P_L$  = valores de  $F_{IS}$  *larger*.....36

**Tabela 5.** Valores de p para excesso e/ou déficit de heterozigotos gerados pelo teste de Wilconxon. Hde = déficit de heterozigotos; Hex = excesso de heterozigotos; Hed = déficit e excesso de heterozigotos; IAM = modelo de mutação de alelos infinitos; SMM = modelo de mutação gradual; TPM = modelo de mutação em duas fases, com 70% e 95% do modelo de mutação gradual e 20% de variância. Resultados para  $n = 9$  no cerrado e  $n = 32$  no pantanal (dados coletados) e  $n = 32$ ,  $n = 100$  (genótipos simulados). \* valores de p significativos  $p < 0,05$ .....37

**Tabela 6.** Estimativas médias de diversidade genética na super ordem Xenarthra usando microssatélites.  $N$  = número de indivíduos;  $N$  locos = número de locos usados;  $H_O$  = heterozigosidade observada;  $H_E$  = heterozigosidade esperada;  $N_A$  = total de alelos;  $R_A$  = riqueza alélica;  $F_{IS}$  = coeficiente de endogâmia.....43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**Ae** - Alelos efetivos

**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais

**DD** – Data deficient

**DGE** – Departamento de Genética e Evolução

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**g** - gramas

**He** - Heterozigosidade esperada

**Ho** - Heterozigosidade observada

**HWE** - Equilíbrio Hardy-Weinberg

**kb** – kilobase

**km<sup>2</sup>** - Quilômetros quadrados

**LC** – Least concern

**MCMC** - *Markov Chain Monte Carlo*

**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de Magnésio

**mL** - mililitros

**mM** - milimolar

**N** - Número de indivíduos

**Na** - Número de alelos

**Ne** – Tamanho populacional efetivo

**ng** - nanogramas

**NT** – Near threatened

**Pa** - Alelos privados

**pb** – Pares de base

**PCR** - *Polymerase chain reaction*

**PIC** - Conteúdo de informação polimórfica

**P<sub>L</sub>** - p *Larger*

**pmol** - picomol

**P<sub>s</sub>** - p *Smaller*

**Ra** - Riqueza alélica

**s** – Segundos

**SISBIO** - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

**SISGEN** - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético

**UFSCar** – Universidade Federal de São Carlos

**VU** – Vulnerable

**μl** - microlitro

**μM** – micromolar

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Xenarthra.....	14
1.2. <i>Priodontes maximus</i> – O tatu gigante .....	16
1.3. Genética da conservação .....	18
1.4. Ferramentas genéticas .....	21
2. OBJETIVO .....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1. Declarações éticas .....	22
3.2. Obtenção das amostras .....	23
3.3. Extração de DNA .....	24
3.4. Teste de transferabilidade de <i>primers</i> microssatélites.....	24
3.6. Prospecção de microssatélites espécie-específicos e padronização das reações de PCR .....	26
3.5. Análise dos dados .....	28
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Microssatélites.....	31
4.2. Estruturação genética populacional.....	32
4.3. Análise entre distância geográfica e distância genética .....	35
4.4. Diversidade genética .....	36
5. DISCUSSÃO .....	40
5.1. Transferabilidade e prospecção dos locos espécie-específicos .....	40
5.2. Estruturação genética populacional.....	41
5.3. Análise entre distância geográfica e distância genética .....	42
5.4. Diversidade genética .....	43
6. CONCLUSÃO.....	46
7. REFERÊNCIAS .....	47

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Xenarthra

A super ordem Xenarthra é um grupo diverso de mamíferos placentários dividido em duas ordens. A ordem Pilosa que inclui os tamanduás e as preguiças e a ordem Cingulata que inclui os tatus (GAUDIN, 2003; WILSON; REEDER, 2005). Os Xenarthra exibem ampla variedade de nichos ecológicos, com táxons completamente fossoriais como, por exemplo, os tatus do gênero *Chlamyphorus*, terrestres como o tamanduá do gênero *Myrmecophaga* e arborícolas representado pelas preguiças dos gêneros *Bradypus* e *Choloepus*.

O nome do grupo "Xenarthra" deriva da posse de articulações atípicas entre as vértebras (em grego, xenos = estranho e arthros = articulação) característica exclusiva desses animais (GAUDIN, 1999). As espécies atuais de xenartros são remanescentes de uma radiação evolutiva promovida por seu isolamento na América do Sul durante o Terciário e influenciada pelas mudanças ambientais no passado (PATTERSON; PASCUAL 1972; DELSUC; VIZCAÍNO; DOUZERY, 2004). Representa um dos quatro clados basais de mamíferos placentários e o único que evoluiu exclusivamente na América do Sul (DELSUC *et al.* 2002). A maioria das espécies de Xenarthra é encontrada apenas na América do Sul, poucas podem ser encontradas na América Central e do Norte. O tatu-galinha (*Dasyopus novemcinctus*), foi o único que obteve sucesso em expandir seu território em direção a América do Norte e pode ser encontrada no sul dos Estados Unidos (ABBA; SUPERINA, 2010; TAULMAN; ROBBINS, 2014).

Até recentemente a ordem Cingulata possuía apenas uma família (Dasypodidae; Grey, 1821; GAUDIN; WIBLE, 2006) com nove gêneros e 21 espécies viventes de tatus. Entretanto, uma recente filogenia do grupo realizada por Gibb e colaboradores (2015), utilizando o genoma mitocondrial completo de todos os Xenarthra viventes, propôs a separação dos tatus em duas famílias distintas: Dasypodidae (composta pela subfamília Dasypodinae) e Chlamyphoridae (composta pelas subfamílias Euphractinae, Chlamyphorinae e Tolypeutinae), refletindo melhor a antiga divergência dessas famílias, estimada em 42 milhões de anos.

A subfamília Dasypodinae é composta por todas as espécies do gênero *Dasyopus* (*Dasyopus kappleri*, *Dasyopus septemcinctus*, *Dasyopus hybridus*, *Dasyopus novemcinctus*, *Dasyopus yepesi*, *Dasyopus sabanicola*, *Dasyopus pilosus*). *Dasyopus* é o gênero mais especioso da ordem Cingulata, incluindo aproximadamente 40% das espécies conhecidas de tatus. Suas espécies possuem orelhas grandes e rosto alongado, com quatro a cinco dígitos nas patas e carapaças que possuem de 6 a 11 bandas moveis localizadas entre os escudos escapular e pélvico (WETZEL, 1985a, b; FEIJÓ *et al.*, 2019).

A subfamília Euphractinae é composta por espécies dos gêneros *Chaetophractus* (*Chaetophractus vellerosus*, *Chaetophractus villosus*); *Euphractus* (*Euphractus sexcinctus*); e *Zaedyus* (*Zaedyus pichiy*). Possuem orelha curta, quatro a cinco dígitos e suas carapaças possuem de 6 a 9 bandas moveis localizadas entre os escudos escapular e pélvico (GARDNER, 2007; SUPERINA; PAGNUTTI; ABBA, 2014; ABBA *et al.*, 2015).

A subfamília Chlamyphorinae é composta pelos gêneros *Chlamyphorus* (*Chlamyphorus truncatus*) e *Calyptophractus* (*Calyptophractus retusus*). As duas espécies são subterrâneas e estritamente noturnas compartilhando adaptações morfológicas semelhantes ao estilo de vida, como garras de escavação aumentadas, olhos reduzidos, formato de corpo fusiforme e uma placa vertical e arredondada que cobre a parte dorsal do seu corpo das costas à cabeça. São os menores tatus vivos, com cerca de 100 g (MERITT, 1985; WETZEL, 1985a, b; CUÉLLAR, 2001; SUPERINA, 2006).

A subfamília Tolypeutinae inclui espécies dos gêneros *Tolypeutes* (*Tolypeutes matacus*, *Tolypeutes tricinctus*); *Cabassous* (*Cabassous centralis*, *Cabassous chacoensis*, *Cabassous tatouay*, *Cabassous unicinctus*); e *Priodontes* (*Priodontes maximus*). Possuem patas de quatro a cinco dígitos e orelhas espessas e carnudas. Espécies do gênero *Tolypeutes* em sua maioria possuem três bandas móveis entre o escudo pélvico e escapular em suas carapaças, podendo variar de uma a quatro. Já as espécies dos gêneros *Cabassous* e *Priodontes* possuem de 11 a 14 bandas (GARDNER, 2007; CARTER; SUPERINA; LESLIE, 2016).

As 20 espécies de tatus consideradas como válidas hoje estão classificadas da seguinte forma pela União Internacional para Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature* - IUCN): oito espécies estão classificadas como pouco preocupante (LC – *D. novemcinctus*, *D. septemcinctus*, *D. kappleri*, *C. villosus*, *C. vellerosus*, *C. tatouay*, *E. sexcinctus* e *C. unicinctus*), cinco estão classificadas como quase ameaçada (NT – *D. hybridus*, *D. sabanicola*, *T. matacus*, *Z. pichiy* e *C. chacoensis*), duas espécies classificadas como vulneráveis (VU – *P. maximus* e *T. tricinctus*) e cinco classificadas como dados deficientes (DD – *D. pilosus*, *D. yepesi*, *C. retusus*, *C. truncatus* e *C. centralis*).

As principais ameaças sofridas pelos Cingulata são a caça e a mudança no uso do solo como a agricultura e a pecuária, ameaçando 95% e 70% das espécies respectivamente (IUCN, 2020). Apesar de apenas duas espécies da ordem serem consideradas ameaçadas, quatro espécies das cinco consideradas como “quase ameaçadas” possuem populações em declínio (*D. hybridus*, *D. sabanicola*, *T. matacus*, *Z. pichiy*), apenas quatro possuem populações estáveis (*D. novemcinctus*, *C. villosus*, *C. vellerosus*, *E. sexcinctus*) e 50% das espécies não possuem informações em relação a tendência populacional (IUCN, 2020).

## 1.2. *Priodontes maximus* – O tatu gigante

O tatu-canastra, *P. maximus*, KERR, 1792 (Figura 1), é a maior espécie de tatu existente (NOWAK, 1991; EMMONS; FEER, 1997), tem em média 150 cm de comprimento desde a cabeça até a cauda (SILVEIRA *et al.*, 2009), com adultos pesando em média 30 kg, podendo um macho chegar até 60 kg na natureza (NOWAK, 1991; REDFORD; EISENBERG, 1992; SMITH, 2007; WETZEL *et al.*, 2008). A espécie pode ser encontrada no Brasil, Paraguai, Guianas, Colômbia, Venezuela, Equador, Bolívia, Peru e extremo norte da Argentina (Figura 2; CARTER; SUPERINA; LESLIE, 2016). Embora sua distribuição estenda-se por uma grande área da América do Sul, *P. maximus* ocorre em populações descontínuas e de baixa densidade na maioria das áreas (CABRERA, 1957; MERITT, 2006).

Devido a um declínio populacional estimado por Anacleto e colaboradores (2014) de pelo menos 30% nas últimas três gerações (cerca de 21 anos), *P. maximus* está categorizada como "vulnerável" na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN. Além disso, está incluída no Apêndice I da Convenção sobre Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Selvagens (CITES, 2016) e na lista internacional de espécies ameaçadas de extinção sob a Lei de Espécies Ameaçadas (*Endangered Species Act*) dos Estados Unidos. A nível regional, está listada como ameaçada de extinção na Colômbia, Venezuela, Argentina e no Paraguai, sendo considerada vulnerável na Bolívia, Peru, Equador e Brasil (CARTER; SUPERINA; LESLIE, 2016).

O risco de extinção de *P. maximus* deve-se principalmente à perda e fragmentação do habitat em decorrência do desmatamento, mudanças no uso do solo, agricultura (PARERA, 2002; FONSECA; AGUIAR, 2004), caça para obtenção de carne (MERITT, 1973; LEEUWENBERG, 1997; DE SOUZA-MAZUREK *et al.*, 2000; FONSECA; AGUIAR, 2004; PERES; NASCIMENTO, 2006; CHAGAS *et al.*, 2015) e tráfico ilegal de animais (PORINI, 2001; FONSECA; AGUIAR, 2004). Embora se tenham indícios das possíveis ameaças sofridas pela espécie, esses impactos são difíceis de quantificar (AGUIAR; FONSECA, 2008; TRUJILLO; SUPERINA, 2013; ANACLETO *et al.*, 2014) e têm se tornado uma incógnita.

Alterações nos tamanhos populacionais de *P. maximus* podem ter grande influência na biodiversidade local visto que esses animais têm um papel importante na estruturação de microhabitats e na disponibilidade de recursos alimentares nas paisagens em que ocorrem, devido a construção de suas tocas. Não há relatos publicados de interações comportamentais de *P. maximus* e outras espécies, porém, suas tocas e montes de solo nas entradas criam novos habitats que são usados como refúgios de predadores ou de temperaturas extremas e influenciam a disponibilidade de recursos de pelo menos 26 espécies de vertebrados (LEITE-



PITMAN *et al.*, 2004; DESBIEZ; KLUYBER, 2013; AYA-CUERO; RODRÍGUEZ-BOLAÑOS; SUPERINA, 2017; MASSOCATO; DESBIEZ, 2017).

Além disso, as tocas também podem servir como áreas de coleta de sementes e detritos orgânicos, enquanto os túneis e montes de escavação provavelmente afetam a infiltração de água, a distribuição de nutrientes no solo e, potencialmente, a diversidade de plantas e biota do solo (WHITFORD; KAY, 1999). Devido a esses fatores, ressaltando seu papel ecológico, *P. maximus* foi identificado como um importante “engenheiro de ecossistema” por diferentes pesquisadores (LEITE-PITMAN *et al.*, 2004; DESBIEZ; KLUYBER, 2013; AYA-CUERO; RODRÍGUEZ-BOLAÑOS; SUPERINA, 2017; MASSOCATO; DESBIEZ, 2017).

Além de atuarem como importantes engenheiros de ecossistemas, o tatu-canastra também se torna importante ao pensarmos nele como presa de grandes carnívoros, como onças-pintadas (*Panthera onca*) e onças-pardas (*Puma concolor*) (LEMOS *et al.*, 2017; VOSS; FLECK, 2017). Ao mesmo tempo, possui um papel como predadores especializados em insetos consumindo principalmente cupins e formigas (ANACLETO; MARINHO-FILHO, 2001).

Esta espécie possui áreas de vida muito grandes, de 450 a 1500 hectares (CARTER; ENCARNACAO, 1983; DESBIEZ; KLUYBER, 2013). Silveira e colaboradores (2009) observaram que *P. maximus* desloca-se bastante e, embora as áreas de vida dos indivíduos possam se sobrepor, eles ocorrem em baixas densidades entre 3,36 e 7,65 indivíduos por 100 km<sup>2</sup> (CARTER; ENCARNACAO, 1983; NOSS; PEÑA; RUMIZ, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2009; DESBIEZ; MASSOCATO; KLUYBER, 2019), mesmo em habitat favorável.

Possuem dimorfismo sexual, sendo que os machos são um pouco maiores do que as fêmeas (SILVEIRA *et al.*, 2009). Apesar de solitários, em época reprodutiva foi observado a fêmea e o macho compartilhando uma mesma toca e os eventos reprodutivos não parecem ser sazonais (DESBIEZ; MASSOCATO; KLUYBER, 2019). O período de gestação é estimado de 4-5 meses (MERRETT, 1983; DESBIEZ; MASSOCATO; KLUYBER, 2019) e apenas um filhote nasce a cada três anos aproximadamente (casos de gêmeos são raros; DESBIEZ; MASSOCATO; KLUYBER, 2019). O cuidado parental dessa espécie é longo, o filhote é completamente dependente da mãe até os oito meses de idade (AYA-CUERO; SUPERINA; RODRÍGUEZ-BOLAÑOS, 2015; DESBIEZ; MASSOCATO; KLUYBER, 2019). O desmame parece acontecer apenas entre os 11-12 meses, mas o filhote continua dependendo da toca de sua mãe até os 18 meses (DESBIEZ; MASSOCATO; KLUYBER, 2019). O tempo de geração foi estimado de 6-10 anos (FONSECA; AGUIAR, 2004; ANACLETO *et al.*, 2014). Suas características reprodutivas leva os pesquisadores acreditarem que a espécie possui taxas de

crescimento populacional muito baixas e não se recuperam facilmente dos impactos antropogênicos (DESBIEZ; MASSOCATO; KLUYBER, 2019).

Apesar da ecologia de *P. maximus* ser a mais estudada dentre as espécies de tatu consideradas como vulneráveis pela IUCN (SUPERINA; PAGNUTTI; ABBA, 2014), por se tratarem de indivíduos noturnos, solitários, semifossoriais e com baixas densidades populacionais, pouco se sabe sobre as características populacionais da espécie (CARTER; SUPERINA; LESLIE, 2016). Para Sherwin e colaboradores (2000) a união de estudos ecológicos, comportamentais e demográficos com ferramentas genéticas pode ajudar no melhor entendimento sobre a biologia de espécies ameaçadas.

**Figura 1.** *Priodontes maximus*.



Foto: Luiz Claudio Marigo. Fonte: arkive.org.

### 1.3. Genética da conservação

A biodiversidade ou diversidade biológica descreve a riqueza e a variedade do mundo natural. Inclui todas as informações herdadas contidas em todos os níveis de variação, desde a variação genética contida nos indivíduos, que por sua vez compõem populações de espécies, que formam comunidades que habitam ecossistemas (DÍAZ *et al.*, 2006). A biodiversidade regula muitos processos no nível do ecossistema, incluindo alguns que são essenciais para o fornecimento de bens e serviços à humanidade, os chamados serviços ecossistêmicos

(BALVANERA *et al.*, 2006; CARDINALE *et al.*, 2006; STACHOWICZ; BRUNO; DUFFY, 2007; CARDINALE *et al.*, 2011).

Apesar de sua importância, a biodiversidade está diminuindo rapidamente em todo o mundo (BUTCHART *et al.*, 2010). As ações humanas estão causando uma crise ambiental e estima-se de forma muito conservadora que o número de espécies que se extinguiu no último século é 100 vezes maior do que o histórico, o que leva os cientistas a crerem que estamos entrando na sexta extinção em massa (CEBALLOS *et al.*, 2015).

Existem três formas de biodiversidade reconhecidas pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), a diversidade de ecossistemas, diversidade de espécies e a diversidade genética (MCNEELY *et al.*, 1990; ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Para a manutenção da biodiversidade não devemos nos preocupar apenas com os ecossistemas e as espécies, é necessário também se conservar a diversidade genética existente. A genética da conservação, tem como objetivo o estudo da biodiversidade molecular nas populações naturais das espécies ameaçadas sob impacto antropogênico, permitindo reduzir o impacto nessas populações e auxiliar na sua conservação (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Espécies ameaçadas geralmente possuem populações pequenas e/ou em declínio (IUCN, 2020), o que as torna cada vez mais endogâmicas e a perda de diversidade genética pode ser inevitável (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Depois de perdida, a diversidade genética só é recuperada muito lentamente através de mutações ou da migração, de modo que, mesmo que ações sejam tomadas para aumentar o tamanho populacional de uma espécie, ela pode continuar ameaçada de extinção (AVISE, 1994). As relações entre tamanho populacional, perda de diversidade genética e endogamia em populações fechadas de acasalamento aleatório são descritas pela equação:  $\frac{H_T}{H_0} = \left(1 - \frac{1}{2N_E}\right)^t = 1 - F$ . Onde  $H_T$  é a heterozigosidade esperada pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* na geração  $t$ ,  $H_0$  é a heterozigosidade inicial,  $N_E$  é o tamanho populacional efetivo e  $F$  é o coeficiente de endogamia. Esta equação prevê um decaimento exponencial da diversidade genética com as gerações, o que ocorre a taxas muito maiores em populações pequenas do que em populações grandes. A taxa de redução na diversidade genética e o aumento da endogamia dependem do tamanho populacional efetivo, ou seja, o número de indivíduos participando na produção da próxima geração, que é consideravelmente menor do que o tamanho real da população ou do censo (FRANKHAM, 1995).

Populações naturais, frequentemente não são capazes de manter a *panmixia*, ou seja, a probabilidade de reprodução entre dois indivíduos quaisquer não é sempre a mesma,

dependendo de fatores biológicos e geográficos. Como fatores biológicos podemos citar o reduzido deslocamento dos adultos, que raramente abrangem toda a distribuição da espécie, a seleção de hábitat com fidelidade natal (filopatRIA) e cruzamentos com escolha de parceiro. Já em relação aos fatores geográficos, existem as barreiras naturais como rios e montanhas, mas atualmente também existem as barreiras antrópicas como grandes centros urbanos e as monoculturas (SOLÉ-CAVA, 2001).

Com o passar das gerações, a ausência de *panmixia* vai causando uma diferenciação na distribuição da diversidade genética entre os grupos de indivíduos, levando a divisão da espécie em grupos com características genéticas distintas. Avaliar o nível de diferenciação genética entre subpopulações é um tópico fundamental em genética de populações, ecologia molecular e genética de conservação (SOLÉ-CAVA, 2001). Para estudos de recolonização ou conservação de espécies ameaçadas deve ser levado em conta não a espécie, mas as subpopulações diferenciadas geneticamente (BERG; GUTTMAN; CANTONWINE, 1996), buscando conservar também a diversidade genética entre as diferentes áreas geográficas.

Antes de 1970, os fatores genéticos eram raramente mencionados como causas de extinção (FRANKHAM, 2005). Frankel (1970, 1974) foi o principal responsável por propor que a perda da diversidade genética aumentava o risco de extinção, principalmente por comprometer a resposta evolutiva às mudanças ambientais experimentadas por basicamente todas as espécies, seja devido à mudança climática global, doenças novas ou alteradas, pragas e parasitas, novos predadores, ciclos climáticos etc. (FRANKHAM; KINGSLOVER, 2004).

Hoje já possuímos evidências convincentes de que a endogamia e a perda de diversidade genética contribuem substancialmente para o risco de extinção tanto em populações de cativeiro como em populações naturais (FRANKHAM, 2005). Do ponto de vista do manejo de conservação de espécies ameaçadas é imprescindível levarmos em consideração à genética e à viabilidade populacional. Se os fatores genéticos são ignorados, é possível que haja uma subestimação do risco de extinção em muitos táxons (BROOK *et al.*, 2002); as estratégias de recuperação e/ou populações usadas para reintrodução podem ser inadequadas (WESTEMEIER *et al.*, 1998; SEYMOUR *et al.*, 2001); populações fragmentadas podem não ser corretamente diagnosticadas e o fluxo gênico entre elas pode não ser gerenciado corretamente (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008) e diferentes unidades evolutivas podem ser misturadas o que pode resultar na redução do fitness (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Frankham (2005) enfatiza que investigações sobre risco de extinção ou planos de manejo para espécies ameaçadas que ignoram fatores genéticos não podem mais ser considerados cientificamente confiáveis.

#### 1.4. Ferramentas genéticas

Um marcador útil muito utilizado em estudos de genética da conservação são os microssatélites, Sequências Simples Repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*) ou Sequências Repetidas em Tandem (STR – *Short Tandem Repeats*). Devido às suas características particulares, são os marcadores genéticos mais usados na genética de populações, para realizar estimativas da diversidade genética, estruturação populacional e social, demografia, parentesco e sistema de acasalamento em fina escala (LITT; LUTY, 1989; BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002; SCHLÖTTERER, 2004; AVISE 2004; SELKOE; TOONEN, 2006; ANDREW *et al.*, 2013).

Os microssatélites são compostos por sequências de poucos pares de bases (2 – 6pb) de comprimento, repetidas em tandem e encontrados em alta frequência nos genomas nucleares da maioria dos táxons (SELKOE; TOONEN, 2006). Devido a erros que podem ocorrer durante a replicação do DNA, indivíduos diferentes de uma mesma espécie podem apresentar um número variado de repetições de um mesmo microssatélite, os quais constituem os diferentes alelos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Por isso, sua principal característica é seu nível elevado de diversidade alélica (WEBER; MAY, 1989).

O polimorfismo dos microssatélites está envolvido com suas altas taxas mutacionais. O principal mecanismo de origem desse polimorfismo é o deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação. Considerando esse modelo, microssatélites com maior número de repetições e mais longos são mais mutáveis (KATTI; RANJEKAR; GUPTA, 2001). Entretanto, novos alelos podem surgir por recombinação, através de *crossing-over* desigual ou conversão gênica, por se tratar de sequências repetidas em tandem mais longas (GOLDSTEIN; SCHLÖTTERER, 1999). Esses marcadores são encontrados preferencialmente em regiões não codificantes, podendo ser considerados como marcadores seletivamente neutros, o que é muito importante no estudo de genética de populações naturais. Além disso, são marcadores codominantes, permitindo identificar indivíduos heterozigotos.

A metodologia de utilização dos microssatélites baseia-se na amplificação por PCR das sequências simples repetidas utilizando um par de *primers* de sequências complementares àquelas que as flanqueiam. O desenvolvimento de *primers* específicos para os locos de microssatélites de cada espécie é frequentemente realizado a partir da construção de bibliotecas genômicas através do sequenciamento de nova geração. No entanto, uma alternativa para os estudos com microssatélites quando não há *primers* desenvolvidos para a espécie, é a utilização de *primers* heterólogos, os quais são desenvolvidos para locos de determinada espécie, mas que podem funcionar adequadamente em espécies filogeneticamente próximas, do mesmo gênero

(ISAGI; SUHANDONO, 1997; CIPRIANI *et al.*, 1999) ou mesmo para diferentes gêneros da mesma família (WHITE; POWELL, 1997; ROA *et al.*, 2000; ZUCCHI *et al.*, 2002). 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).

Devido as características comportamentais dos Cingulatas, a dificuldade em obter amostras de DNA de populações selvagens limitou o número de estudos genéticos. Apenas 4 das 20 espécies de tatu possuem estudos realizados na área de genética populacional, sendo elas *D. novencinctus* (PRODÖHL *et al.*, 1996; LOUGHRY *et al.*, 2009; CHINCHILLA *et al.*, 2010; ARTEAGA *et al.*, 2012), *C. vellerosus* (NARDELLI *et al.*, 2016), *T. tricinctus* (MORAES, 2015) e *E. sexcinctus* (PAVIOTTI-FISCHER, 2016). Além do reduzido número de estudos genético-populacionais para esse grupo, apenas a espécie *T. tricinctus* classificada como vulnerável teve sua diversidade e estrutura genéticas investigadas. Os dados genéticos disponíveis atualmente para *P. maximus* se resumem aos estudos descritivos de citogenética (BENIRSCHKE; WURSTER, 1969; BENIRSCHKE; LOW; FERM, 1969; REDI *et al.*, 2005), filogenética e anotação do genoma mitocondrial completo (DELSUC *et al.*, 2002; 2003; GIBB *et al.*, 2015).

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo deste estudo é estimar parâmetros genético-populacionais dos indivíduos de *P. maximus* amostrados nos estados do Mato Grosso do Sul e Goiás.

### **2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos propostos são: (i) verificar a ocorrência de estruturação populacional entre as áreas amostradas; (ii) caracterizar a diversidade genética nuclear dos grupos genéticos amostrados.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Declarações éticas**

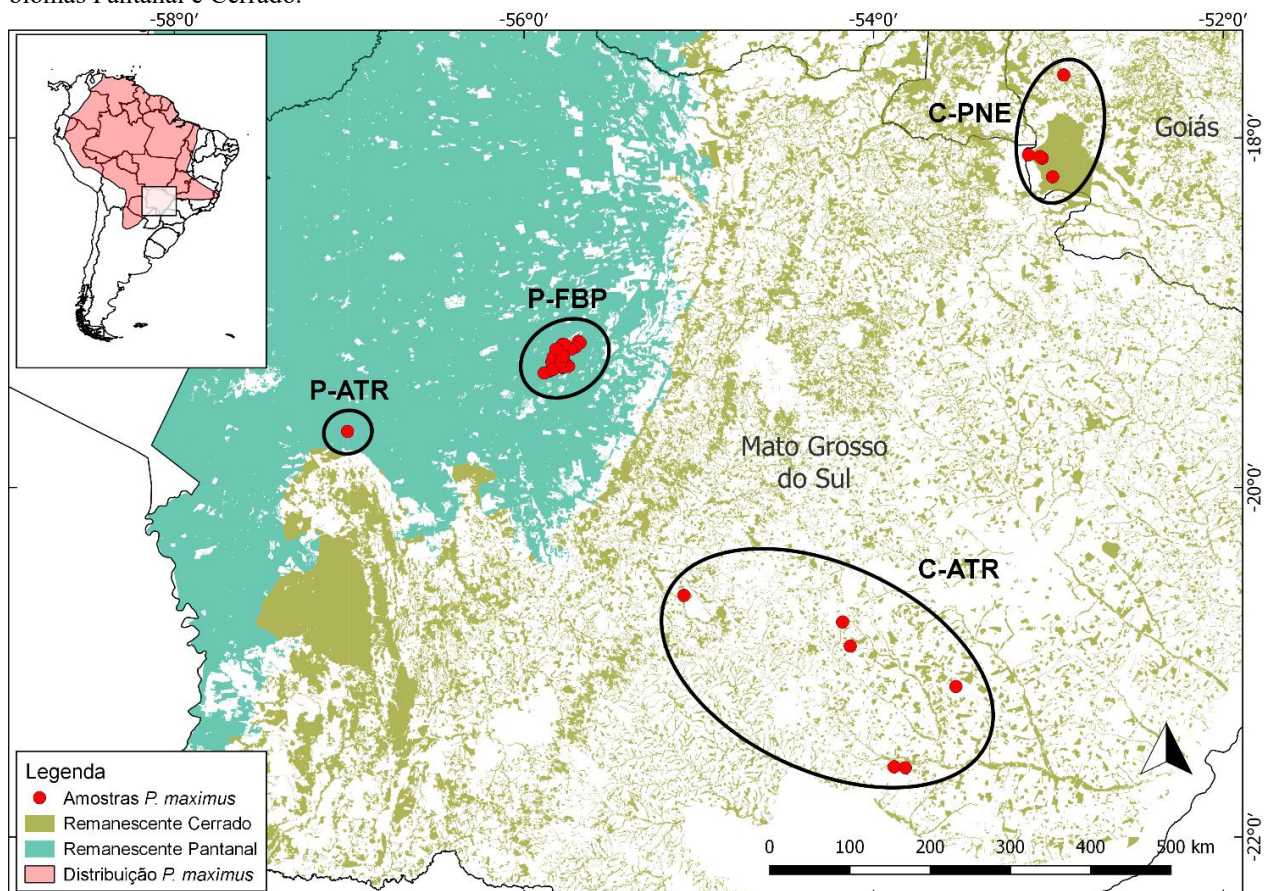
A coleta de amostras foi realizada de acordo com a legislação brasileira, sob o número de licença SISBIO (53798-7) para permissões de coleta de amostras e para autorização de acesso ao material genético SISGEN (A05D558), além da aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR – 3597261118)

### 3.2. Obtenção das amostras

Foram utilizadas 44 amostras de tatu-canastra obtidas por meio de colaborações com o Projeto Tatu-Canastra – Pantanal, Projeto Bandeiras e Rodovias e do Projeto Tatu-Canastra do Parque Nacional das Emas, mantidas no banco de amostras do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (DGE/UFSCar).

As amostras estão assim distribuídas: cinco amostras de sangue coletadas de animais de vida livre do Parque Nacional das Emas (PNE) – GO pelo pesquisador Dr. Leandro Silveira, oito amostras provenientes de atropelamentos em três rodovias localizadas no Mato Grosso do Sul, MS-040, MS-355 e BR-262/MS, em parceria com o projeto Bandeiras e Rodovias e 32 amostras de tecido de orelha de animais monitorados na Fazenda Baía das Pedras (FBP) no interior do pantanal matogrossense pelo Projeto Tatu-Canastra – Pantanal, coordenado pelo Pesquisador Dr. Arnaud Desbiez. A área amostrada está localizada na periferia da área de distribuição da espécie (Figura 2).

**Figura 2.** Distribuição geográfica de *P. maximus* (IUCN) e área ampliada onde a amostragem foi realizada nos biomas Pantanal e Cerrado.



P = Pantanal; C = Cerrado; P-ATR = Animal atropelado no Pantanal; P-FBP = Fazenda Baía das Pedras; C-ATR = Animais atropelados no Cerrado; C-PNE = Parque Nacional das Emas. Fonte: Adaptado de IUNC 2019; Ministério do Meio Ambiente 2008.

Os tecidos correspondentes a cada animal estão armazenados em microtubos de 2mL contendo álcool etílico numa proporção de 3:1 e armazenados em freezer a -20 °C no banco de amostras mencionado acima.

### 3.3. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de tecido foi realizada utilizando o protocolo de Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), posteriormente o DNA foi eluído em água Milli-Q autoclavada. Para aquelas amostras que o tecido apresentava algum grau de decomposição, ou que ficaram expostas ao ambiente e por isso apresentaram DNA degradado, foi realizada a extração através do Kit DNeasy Blood & Tissue da Qiagen segundo as recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA foi corado com Gel Red™ (*Uniscience*) e visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% para a avaliação da sua integridade e quantificado em espectrofotômetro portátil NanoVue® Plus (*GE Healthcare*).

### 3.4. Teste de transferabilidade de *primers* microssatélites

A transferabilidade consiste no uso de *primers* descritos originalmente para uma espécie em outras filogeneticamente próximas. No presente estudo foi testada a transferabilidade de 16 pares de *primers* microssatélites desenvolvidos para a espécie da mesma família, *Euphractus sexcinctus* por Paviotti-Fischer (2016), nesse mesmo laboratório (Tabela 1). Além disso, foram testados seis pares de *primers* microssatélites desenvolvidos para a espécie *Dasypus novemcinctus* por Prodöhl (1996) (Tabela 2).

Todos os *primers* foram inicialmente testados com cinco indivíduos. Para os testes foram escolhidas aquelas amostras com DNA de melhor qualidade e maior quantidade. Além disso, demos preferência para aquelas que estavam amplamente distribuídas na área amostrada para verificar polimorfismo entre as áreas. Para as reações de amplificação foram utilizados solução tampão 1x GoTaq *Buffer* (Promega), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 µM do *primer* com a cauda M13 adicionada, 0,4 µM do *primer* sem a cauda M13, 0,4 µM do *primer* M13, 0,5 unidades de GoTaq® DNA Polimerase (Promega) e 30 ng de DNA em um volume final de 10µl de reação. A PCR foi realizada no equipamento Veriti 96 *Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*).

A amplificação dos microssatélites seguiu o protocolo proposto por Schuelke (2000) para adição da fluorescência através do uso da cauda M13. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 s à 94 °C, 45 s à temperatura de anelamento (Ta), 45 s à 72 °C; 10 ciclos adicionais iniciando a 94 °C por 30 s,



45 s à 53 °C (temperatura de anelamento do *primer* M13), 45 s à 72 °C, finalizando à temperatura de extensão de 72 °C por 20 min.

Para o estabelecimento da melhor temperatura de anelamento de cada par de *primers* foi realizado um gradiente de temperaturas (seis graus acima e abaixo) da temperatura inicialmente obtida a partir da ferramenta Primer3Plus, disponível em [http://primer3plus.com/web\\_3.0.0/primer3web\\_input.htm](http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm) (ROZEN; SKALETSKY, 2000).

A amplificação das reações de PCR foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 2%, corados com Gel Red™ (*Uniscience*), e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Para se estimar o tamanho aproximado dos fragmentos gerados, foi utilizado o marcador de peso molecular 1 kb *Plus* (Invitrogen). Os produtos de PCR foram genotipados em sequenciador automatizado ABI 3730XL (*Applied Biosystems*). As análises do padrão e tamanho dos fragmentos para definição dos genótipos foram realizadas utilizando o *microsatellite plugin* no programa Geneious 6.1.9 (KEARSE *et al.*, 2012).

**Tabela 1.** Microsatélites isolados para *Euphractus sexcinctus* por Paviotti-Fischer (2016). Nome dos locos, seqüências dos *primers forward* e *reverse*, motivo com número de repetições e tamanho do produto de PCR na espécie onde foram descritos.

Locos	Seqüência dos <i>primers</i> (5'-3')		Motivo	Tamanho (pb)
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>		
YArm1	CCCTCTCATCTACCCAATCA	TCAGGGAGTTCAGAAGGAGAT	(CATC) <sub>11</sub>	236
YArm4	CATCCTACAATGCATAGGGC	TTTCTGAGGATGGAGTCTGG	(ATGG) <sub>7</sub>	264
YArm8	CTCTATCCCTTGCCCAATC	GCTAAAGGATAAATGAGTGAATTG	(GTTT) <sub>7</sub>	299
YArm10	TCAAAGCTCAACAATCCCTC	TACATGGCTGTGATCTGCC	(TTTA) <sub>11</sub>	298
YArm12	GTGACATAGCTGGGATGAAA	TGGTTATGACACAAATGGATCT	(AGAT) <sub>8</sub>	278
YArm14	CGGGACCTCGAATGTAGA	CTTCCTCTCTTCTCGTCC	(GTTT) <sub>7</sub>	243
YArm15	AAACTTGTCAGCTTCATGGC	AAGCGGAGATAGGCAGACAT	(TATT) <sub>11</sub>	177
YArm17	AGATGATAGGTAGAGATTAGGCAGA	GCCCTTCTTCTGTATGCTCA	(ACAG) <sub>8</sub>	189
YArm18	TGTTTACAGGATAATAACTCAATGC	GGGCTATTGCTAAGTGTGC	(GATA) <sub>12</sub>	290
YArm19	CCATTTTCATTGCTGGAAGAAT	TTCCTTTCTTCCAAAGGAGTC	(TTTG) <sub>7</sub>	231
2531	TCAGCATATATTTGTTAAGCATCC	GTAAGGGTCTGTGACTGGC	(ATCC) <sub>9</sub>	246
6319	CACAGCAAGTGCAAATAACG	AGCCAAGTGCAGAAAGACTGT	(AAAC) <sub>7</sub>	140
7326	CAAATGGTTGGGTGTCTGTC	AACTTCTTTCTAGGAGTGTGCAA	(AAAT) <sub>10</sub>	293
1688	TTTATGTGCAATTGTTTCACC	AAGGACCTCTGGGACTGGT	(TTGT) <sub>6</sub>	292
2409	AATGATGATTCCCAGGTCC	CATGGGAATTGTTGTGGG	(AAAC) <sub>7</sub>	118
2036	CCCTTCCTAATAATCCATTGC	GCTGGACCATTGTAGTCCTC	(AAAC) <sub>6</sub>	290

**Tabela 2.** Microssatélites isolados para *Dasyopus novemcinctus* por Prodöhl *et al.* (1996). Nome dos locos, seqüências dos *primers forward* e *reverse*, motivo e número de repetições e tamanho do produto de PCR.

Locos	Seqüência dos <i>primers</i> (5'-3')	Motivo	Tamanho (pb)
Dnov1	F: CATAACTTCCACCCCTGATAC R: AGTGATTATCCTCGTTCTTAG	(GACA) <sub>2</sub> (GATA) <sub>14</sub>	233
Dnov2	F: TGCCAATTTGCCATATTATTC R: GGACACAGAGAACAGACAACCTG	(GATA) (GATT) <sub>2</sub> (GATA) <sub>15</sub>	254
Dnov6	F: TGCTGCATTTGTCATATCATTC R: CAGCCTACACTCAAGTATTCGG	(GATA) (GACA) <sub>3</sub> (GATA) <sub>5</sub> (GGTA) (GATA) <sub>10</sub>	189
Dnov7	F: TTTCAAGTCTGCCTCTACTGAG R: TTCAAGTCTGCCTCTACTGAG	(GT) <sub>2</sub> (CA) (GT) <sub>14</sub>	217
Dnov16	F: GAAAGGAGGGGATAAATAAAG R: TTCCAGTTTTTGAATGTTCTAG	(AT) <sub>13</sub> (GT) <sub>2</sub> (AT) (GT) (AG) (AT) <sub>4</sub>	226
Dnov24	F: TTTTAACATTTTTCCACTTTTCC R: AATACATGGCAACGGACTTTAGT	(GATA) <sub>17</sub>	261

### 3.6. Prospecção de microssatélites espécie-específicos e padronização das reações de PCR

Com o objetivo de prospectar novos microssatélites espécie-específicos, foi realizado o sequenciamento em larga escala do genoma de um indivíduo da espécie *P. maximus*. Após a quantificação em espectrofotômetro portátil NanoVue® Plus da GE Healthcare, 15 µL de DNA em concentração de 468 ng/µl foram enviados ao Centro de Genômica Funcional em Piracicaba/SP para a construção de uma biblioteca de DNA usando o kit Nextera DNA Flex da Illumina e o sequenciamento do genoma no equipamento HiSeq2500.

As análises de bioinformática, incluindo a busca pelos microssatélites e o desenho de *primers*, foram realizadas em nosso laboratório pelo bioinformata Alexandre Romero Inforzato, que realizou as seguintes etapas: controle de qualidade dos dados sequenciados, realizado no programa FastQC (qualidade dos reads); “limpeza” dos dados, remoção de adaptadores e leituras de baixa qualidade, no programa Trimmomatic; montagem “de novo” dos dados genômicos, utilizando o programa SPAdes; avaliação da qualidade da montagem, nos programas QUAST (N50 e L50) e BBmap (cobertura); busca dos microssatélites no genoma no programa MISA; desenho dos *primers* nos microssatélites tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, com mais de 6 repetições do *motif* e há pelo menos 20 pares de base de distância do microssatélite, utilizando o programa Primer3Plus.

Após o desenho dos *primers*, uma tabela Excel foi gerada onde foi realizada a triagem para selecionar os 30 melhores locos para os testes *in vitro*. Os critérios estabelecidos foram: ser tetranucleotídeo, devido a maior facilidade na interpretação dos genótipos, os *primers* deveriam estar a pelo menos 50 bases de distância da região do microssatélite, a seqüência dos

*primers* não poderia se repetir em microssatélites distintos, a fim de evitar bandas inespecíficas, os microssatélites deveriam ser simples, por serem mais instáveis que os complexos, e conseqüentemente poderem apresentar um maior número de alelos (CHUNG *et al.*, 1993; PÉPIN *et al.*, 1995), apresentar mais de oito repetições, o que também aumenta a chance de serem mais mutáveis e conseqüentemente mais polimórficos (KATTI; RANJEKAR; GUPTA, 2001) e não estarem em regiões codificantes.

De acordo com os critérios estabelecidos, foram sintetizados 30 pares de *primers*, com adição da cauda M13 na extremidade 5' de um dos *primers* (*forward* ou *reverse*), segundo o protocolo de Schuelke (2000), que permite a obtenção de fragmentos marcados com fluorescência.

Os *primers* foram testados inicialmente com 11 indivíduos. As amostras escolhidas apresentaram DNA de melhor qualidade e maior quantidade, também levamos em consideração a sua localidade, dando preferência para aquelas que estavam amplamente distribuídas na área amostrada. Além disso, utilizamos três amostras que a partir dos dados de campo tínhamos conhecimento de se tratar de uma família (pai, mãe e filho). Para as reações de amplificação foram utilizados solução tampão 1x GoTaq Buffer (Promega), 0,5-4,0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 µM do *primer* com a cauda M13 adicionada, 0,4 µM do *primer* sem a cauda M13, 0,4 µM do *primer* M13, 0,5 unidades de GoTaq® DNA Polimerase e 30 ng de DNA em um volume final de 10 µl de reação. A PCR foi realizada no equipamento Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 s à 94 °C, 45 s à temperatura de anelamento (Ta) (Tabela 3), 45 s à 72 °C; 10 ciclos adicionais iniciando a 94 °C por 30 s, 45 s à 53 °C (temperatura de anelamento do *primer* M13), 45 s à 72 °C, finalizando à temperatura de extensão de 72 °C por 20 min.

Para o estabelecimento da melhor temperatura de anelamento de cada par de *primer*, utilizamos a ferramenta Primer3Plus, disponível em [http://primer3plus.com/web\\_3.0.0/primer3web\\_input.htm](http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm) (ROZEN; SKALETSKY, 2000).

A amplificação das reações de PCR foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 2%, corados com Gel Red™, e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. Para se estimar o tamanho aproximado dos fragmentos gerados, foi utilizado o marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen). Após a verificação da amplificação e a padronização das reações, os produtos de PCR foram genotipados em sequenciador automatizado ABI 3730XL (Applied Biosystems). As análises do padrão e tamanho dos fragmentos para definição dos

genótipos foram realizadas utilizando o *microsatellite plugin* no programa Geneious 6.1.9 (KEARSE *et al.*, 2012).

Após a padronização das reações, todas as amostras de *P. maximus* passaram pela etapa de amplificação por reação de PCR para os locos que apresentaram resultados positivos de amplificação e se apresentaram polimórficos nos indivíduos testados.

### 3.5. Análise dos dados

#### 3.5.1. Análises de estrutura populacional

A avaliação de existência de diferenciação genética populacional dentro da amostragem foi realizada usando duas abordagens que permitem avaliar a estrutura genética sem definir populações *a priori*. Uma abordagem, implementada no programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) que utiliza o método bayesiano auxiliado pelo algoritmo MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) e não inclui a origem geográfica dos indivíduos em sua análise. Esse método estima o número de grupos genéticos tendo como pressupostos o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) e a ausência de desequilíbrio de ligação dentro das populações. A análise foi realizada sem fornecermos a informação *a priori* da localização dos indivíduos. Foram testados valores de K (número de grupos genéticos) variando de 1 - 5 (número de grupos amostrais mais um: P-FBP, C-PNE, C-ATR, P-ATR). Tais valores de K foram replicados em 100 corridas independentes. As análises foram realizadas por meio de 200.000 MCMC, após um período inicial (*burnin-in*) de 100.000 interações. Utilizamos o modelo de “*Admixture Model*”, ideal para quando se tem populações com fluxo gênico. Os demais parâmetros foram configurados de acordo com o *default* do programa.

Para obtenção do K ótimo nós utilizamos o logaritmo de probabilidade dos dados LnP (D/K) (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) e as estimativas de DeltaK (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005), determinados a partir da ferramenta online Structure Harvester (EARL; VONHOLDT, 2012). O gráfico de atribuição dos indivíduos foi visualizado no programa (*Cluster Markov Packager Across K*) que gera um gráfico consenso baseado em uma matriz de similaridade das execuções replicadas dos valores de K (KOPELMAN *et al.*, 2015).

Segundo alguns trabalhos, o *software* STRUCTURE pode falhar em algumas situações para detectar o real número de *cluster* devido as suas premissas dos modelos populacionais, por isso, o uso de diferentes abordagens é altamente recomendável (JOMBART, 2008; JOMBART; DEVILLARD; BALLOUX, 2010). Assim, na segunda abordagem para avaliar a estrutura populacional usamos o pacote Geneland 3.1.4 (GUILLOT; MORTIER; ESTOUP, 2005)

disponível para o *software* R, que utiliza o método bayesiano para executar agrupamentos incluindo informações sobre a origem geográfica dos indivíduos.

A abordagem espacial assume que existe algum grau de dependência espacial entre os indivíduos e que a probabilidade de dois indivíduos pertencerem à mesma população diminui com a distância geográfica entre eles, de acordo com o modelo isolamento por distância (IBD) de Wright (GUILLOT; MORTIER; ESTOUP, 2005). O programa foi executado assumindo frequências alélicas não correlacionadas (*uncorrelated model*). Esse modelo assume que esperamos que as frequências alélicas em diferentes populações sejam razoavelmente diferentes umas das outras. Apesar do modelo de frequências alélicas correlacionada ser mais poderoso na detecção de diferenciações sutis, ele parece ser mais propenso a instabilidades de algoritmos, superestimando valores de K em casos por exemplo onde ocorre isolamento por distância (GUILLOT, 2008). Primeiro, executamos 20 corridas espaciais com valores de k variando de 1 - 5, usando 1.000.000 de iterações MCMC e 1.000 iterações *thining*. Em seguida, o modelo espacial final foi executado com valores de K entre 1 e o número máximo de *clusters* obtido nas execuções iniciais, usando 2.000.000 interações MCMC e 1.000 iterações *thining* em 10 execuções independentes.

Após a detecção de possíveis *clusters*, o índice de fixação de Wright ( $F_{ST}$ ) par-a-par foi calculado no programa Arlequin v.3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). O índice de diferenciação D ( $D_{est}$ ) proposto por Jost (2008), que se baseia no número de alelos efetivos, foi calculado com o auxílio do pacote DEMetics (JUETERBOCK *et al.*, 2012), implementado no programa R (R CORE TEAM, 2017) a fim de verificar se eles corroboram com uma possível estruturação. O uso do  $D_{est}$  se deve ao seu menor viés para marcadores altamente polimórficos como os microssatélites (JOST, 2008). Também verificamos a presença de alelos exclusivos em cada *cluster* no *software* GenAlEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

### 3.5.2. Análise entre distância geográfica e distância genética

Foi realizada uma análise de autocorrelação espacial (SAA) no GenAlEx, versão 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012), para avaliar a distância genética entre os pares de indivíduos em várias classes de distância. Uma autocorrelação significativa positiva indica que indivíduos em uma determinada classe de distância são geneticamente mais semelhantes do que o esperado pelo acaso, enquanto, valores negativos significativos indicam que os indivíduos se localizam buscando maximizar a distância genética (MANEL *et al.*, 2003). O teste de significância estatística,  $p < 0,05$ , dos coeficientes de autocorrelação espacial ( $r$ ), foi obtido através de 9999 permutações e 9999 *bootstraps* conforme implementado no *software*. As classes de distâncias

foram variáveis e divididas em: 2 km, 4 km, 6 km, 8 km, 10 km, 15 km, 25 km, 250 km, 350 km e 450 km.

### 3.5.3. Análises de diversidade genética

Os índices de diversidade genética foram estimados para os grupos genéticos encontrados nas análises de estruturação. A presença de alelos nulos foi verificada no *software* MICRO-CHECKER (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). Os testes para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação entre os pares de locos foram realizados através do programa GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995), com 10.000 repetições, tendo os valores de  $p$  corrigidos seguindo o procedimento de Bonferroni (RICE, 1989). O número de alelos ( $N_A$ ), número de alelos efetivos ( $A_E$ ), os valores de heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) e observada ( $H_O$ ) foram calculados no programa GenAlex 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). No programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001) foram calculados o índice de endocruzamento ( $F_{IS}$ ), bem como os valores de  $p$  para o excesso e para o déficit de heterozigotos e valores de riqueza alélica ( $R_A$ ). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada um dos locos foi avaliado no programa CERVUS (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). O tamanho efetivo populacional ( $N_E$ ) foi estimado com base no desequilíbrio de ligação (WAPLES, 2006) usando o NeEstimator v2.1 (DO *et al.*, 2014).

Para detectar qualquer evidência genética de declínio populacional, foi utilizado o programa BOTTLENECK (CORNUET; LUIKART 1996; PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999). Este método compara a heterozigosidade esperada calculada a partir das frequências alélicas observadas ( $H_E$ ) com a heterozigosidade esperada com base nas frequências alélicas esperadas no equilíbrio entre mutação e deriva ( $H_{eq}$ ). Os valores foram obtidos através de simulações sob três modelos de mutação, o modelo de alelos infinitos (IAM), mutação gradual (SMM) e mutação em duas fases (TPM), com 70% e 95% de SMM, 20% de variação e 1.000 iterações, conforme recomendado por Piry, Luikart e Cornuet (1999). Foi aplicado o teste de Wilcoxon para determinar a significância ( $p < 0,05$ ), apropriado para análises com menos de 20 locos (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999). Para avaliar se o tamanho da amostra do cerrado ( $n = 9$ ) e do pantanal ( $n = 32$ ) estavam mascarando os resultados, foi utilizado o programa HYBRIDLAB 1.0 (NIELSEN; BACH; KOTLICKI, 2006) para simular uma população com 32 e 100 indivíduos para o *cluster* do cerrado e de 100 indivíduos para o *cluster* do pantanal através das frequências alélicas das populações base e posteriormente executamos o BOTTLENECK com os mesmos parâmetros descritos acima.

## 4. RESULTADOS

Apesar de ter sido realizada a extração com Kit, que visa purificar o DNA de inibidores da PCR, três amostras foram retiradas das análises finais devido a dificuldades de amplificação dos locos, provavelmente em decorrência do alto grau de decomposição e DNA degradado. Dessas, duas amostras foram provenientes de atropelamentos e uma amostra de tecido proveniente de carcaça coletada na Fazenda Baía das Pedras. Portanto, foram utilizadas 41 amostras para as etapas subsequentes.

### 4.1. Microssatélites

#### 4.1.1. Microssatélites heterólogos

Dos 22 pares de *primers* heterólogos testados, dez não tiveram sucesso de amplificação em todas as condições de temperatura e cloreto de magnésio testadas nos protocolos de PCR (YArm4, YArm8, YArm10, YArm19, 2531, 6319, Dnov 6, Dnov 7, Dnov 16, Dnov24). Entre os 12 *primers* que foram bem-sucedidos nos testes de amplificação, quatro amplificaram regiões maiores (aproximadamente 650 pb) do que o esperado para o dado loco (YArm1, YArm14, YArm15, Dnov 1) e não foram enviados para genotipagem. Através do sequenciamento foi possível confirmar que a região amplificada do loco YArm1 não possuía um *motif* de microssatélite, nos demais locos não foi possível à amplificação da região de interesse sem bandas inespecíficas, ou identificar um indivíduo homocigoto para obter um sequenciamento de qualidade. Apenas um microssatélite mostrou-se polimórfico (YArm17) para os indivíduos testados, um se apresentou monomórfico (YArm18) e em seis deles não foi possível definir qual o tamanho e o padrão de pico (YArm12, 7326, 1688, 2409, 2036, Dnov 2), devido a ocorrência de múltiplos picos sobrepostos ou a presença de picos em diferentes regiões dentro do tamanho esperado.

#### 4.1.2. Microssatélites específicos

O sequenciamento de nova geração resultou em um grande número de locos microssatélites para a espécie *P. maximus*. Considerando apenas microssatélites formados por mais de três pares de bases, foram encontrados 23.389 dentre os quais: 5.372 trinucleotídeos, 15.244 tetranucleotídeos, 1.821 pentanucleotídeos, e 952 hexanucleotídeos.

Após a triagem dos locos, seguindo os critérios estabelecidos nesse trabalho (apresentados em seção acima), foram sintetizados 30 pares de *primers* que flanqueiam motivos de SSR tetranucleotídeos simples. Os *primers* sintetizados apresentaram porcentagem média de

GC igual a 47,39%, amplificando produtos de tamanho médio de aproximadamente 236 pb, em temperatura média de 61 °C.

Dos 30 *primers* testados, 15 não tiveram sucesso de amplificação em todas as condições de temperatura e cloreto de magnésio testadas. Dos 15 *primers* que foram bem-sucedidos nos testes de amplificação, um se mostrou monomórfico para os indivíduos das áreas utilizadas nesse estudo. Portanto, 14 locos de SSR polimórficos foram utilizados para a caracterização da estrutura e da diversidade genética do grupo amostrado de indivíduos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Características dos 14 locos de microssatélites desenvolvidos e testados para *Priodontes maximus*. Nome dos locos, sequências dos *primers forward* e *reverse*, motivo com número de repetições, temperatura de anelamento (Ta) e tamanho do produto de PCR.

Locos	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')		Motivo	Ta (°C)	Tamanho (pb)
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>			
Pmax02	CAAGCTCATGATCTGCACATGT	AGGATCCCAAGGTAACCTGA	(TCTA) <sub>14</sub>	62,0	258
Pmax04	TCTAAGTTGTACATTGGTGTCTGT	TCTCCTCCCTCAGCATGACA	(TATC) <sub>13</sub>	64,0	214
Pmax05	ACAGTAGGAACATCTTCACGAA	GCCCTACCAAAGCCATAATAGC	(TATC) <sub>12</sub>	60,0	245
Pmax09	TCCCTGGGAGATACTCAAGGA	TCCACTTCCCTGTAGCTTGC	(TCTA) <sub>12</sub>	62,0	240
Pmax11	ATCTCTGTTTCTCTCAGAAGCT	TACAACCTGTGACTGCTGCA	(TAGA) <sub>11</sub>	64,0	223
Pmax16	ACAATTTAGGACAGAAAAGGACAGA	CCCAAATACCCAGATCCTCCA	(TAGA) <sub>10</sub>	62,0	237
Pmax17	TCACAGAAATAGAGGGTTCACAGA	AGTCAATCTTGCTTGTCTTCCA	(TAGA) <sub>10</sub>	60,0	209
Pmax18	ACATCATCTCTCCCTGACA	TTGTCAGCCCACCTACTTG	(GATA) <sub>10</sub>	62,0	210
Pmax19	TCTGTGTTCTACCAGTCAAGCT	TGGTAACTCAATCCAGCAGTTCA	(CTAT) <sub>10</sub>	62,0	221
Pmax21	AGTGCTCAAGGAACATGATGT	TCGACAGCACTGGTGATACA	(TAGA) <sub>9</sub>	60,0	278
Pmax22	ACTTCACCAGCATTACCAA	TGCTCAGCACCATGAAACAA	(GATA) <sub>9</sub>	62,0	256
Pmax25	AGTGTTCAAGCAGCATGATGT	ACCCTTTATCCAGCTACCCAG	(GATA) <sub>9</sub>	60,0	209
Pmax28	ACTCTTTCTGCACACACTCT	GGCAGATAAGTAGCTGAGGCC	(ATAG) <sub>8</sub>	64,0	264
Pmax30	GGCAAATTCATGGCAAGACTCT	AGAGAAAATGCAGAAAGATCACACT	(TATC) <sub>8</sub>	60,0	248

## 4.2. Estruturação genética populacional

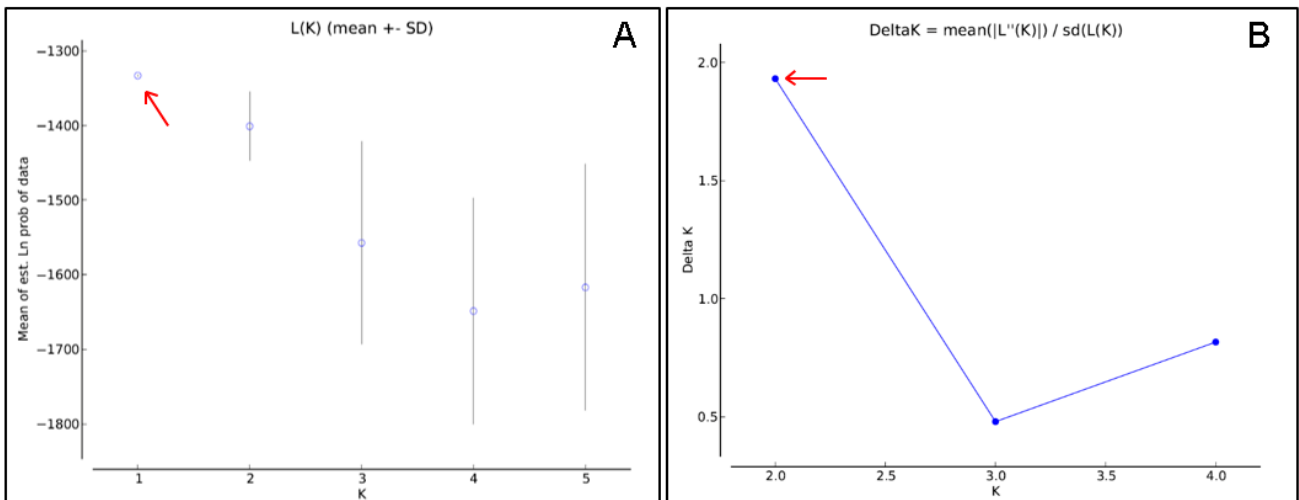
As análises de agrupamento conduzidas no programa STRUCTURE, sem informação *a priori* da origem dos indivíduos, baseado no modelo desenvolvido por Pritchard *et al.* (2000) indica o provável valor de  $K = 1$ , maior valor de Ln, com menor variância. Já o resultado segundo o método desenvolvido por Evanno *et al.* (2005), indica que o provável valor de grupos genéticos é  $K = 2$ , a partir do valor de Delta  $K = 1,93$ , porém, esse método não permite calcular o valor de Delta para  $K = 1$  (Figura 3). Apesar do método de Evanno *et al.* (2005) ter dado valor ótimo de  $K = 2$ , ao analisarmos o gráfico de atribuição dos indivíduos gerado no programa Clumpak, não conseguimos visualizar uma clara separação entre os indivíduos amostrados.



A análise bayesiana de estruturação espacial realizada no Geneland (GUILLOT; MORTIER; ESTOUP, 2005) identificou a presença de dois *clusters*, que correspondem ao bioma ao qual o grupo está inserido, separando os grupos entre Pantanal (P-FBP + P-ATR) e Cerrado (C-PNE + C-ATR). Tais *clusters* apresentaram probabilidades posteriores em torno de 90% (Figura 4).

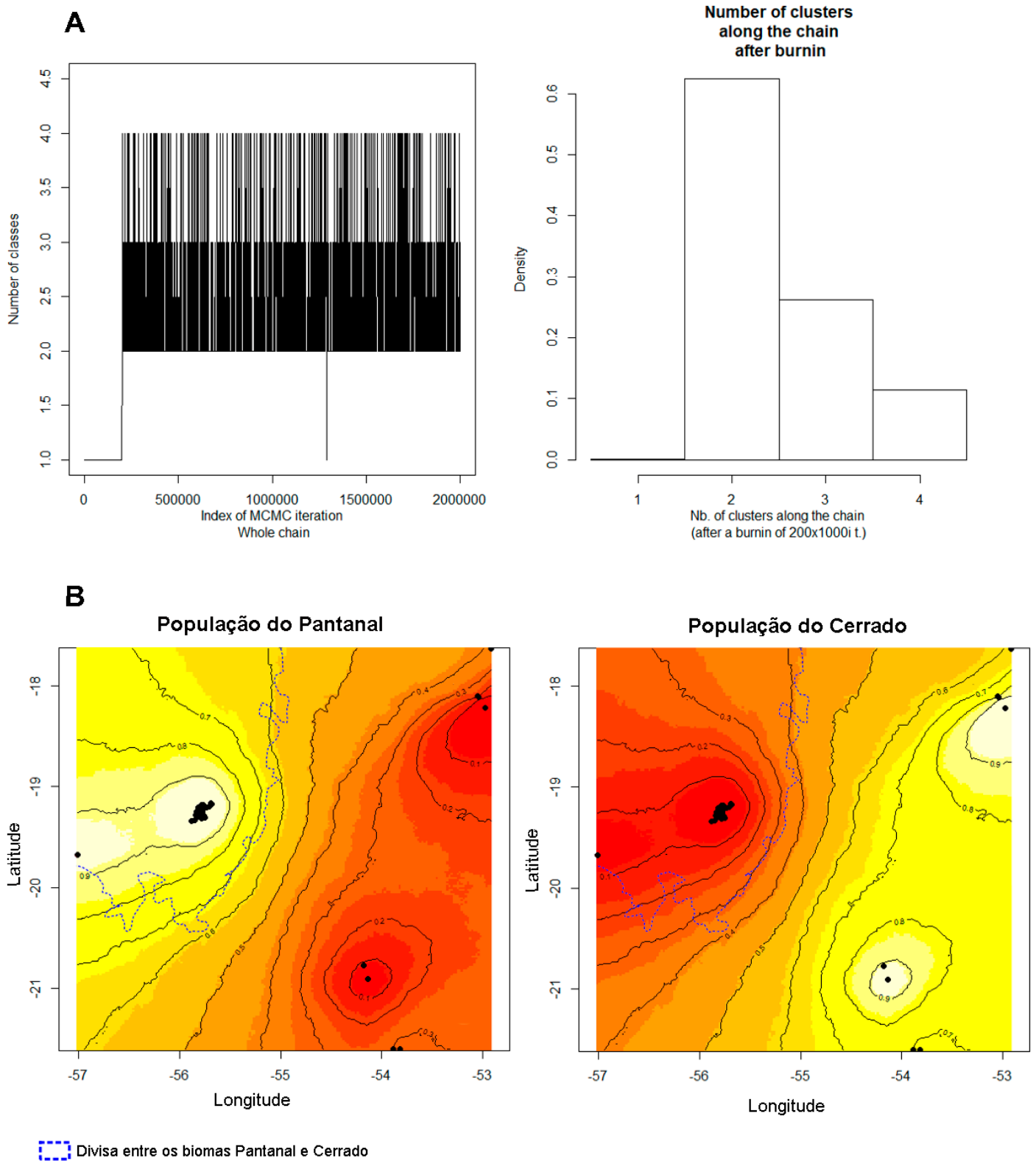
Ao calcularmos o índice de fixação de Wright ( $F_{ST}$ ) par-a-par para os dois *clusters* (Pantanal e Cerrado) encontrados pelo Geneland ( $F_{ST} = 0,01157$ ,  $p = 0,11712$ ) o valor não foi significativo. No entanto, quando olhamos para o índice de diferenciação  $D_{est}$  (JOST, 2008), encontramos uma diferença significativa no número de alelos efetivos entre os dois grupos ( $D_{est} = 0,02390$ ,  $p = 0,037$ ), indicando diferenças genéticas entre os dois *clusters*.

**Figura 3.** Estimativa do número de *clusters* (K) mais adequado para o conjunto de dados analisados



**A)** Metodologia proposta por Pritchard *et al.* (2000) para definição do K mais provável. **B)** Metodologia proposta por Evanno *et al.* (2005) para definição do K mais provável. A seta vermelha indica o valor de K mais provável em cada método.

**Figura 4.** Gráfico com o número de *clusters* (K=2) mais provável fornecido pelo pacote Geneland. Mapas de probabilidade posterior de atribuição espacial das populações amostrais de *Prionotus maximus* no estado do Mato grosso do Sul e Goiás.



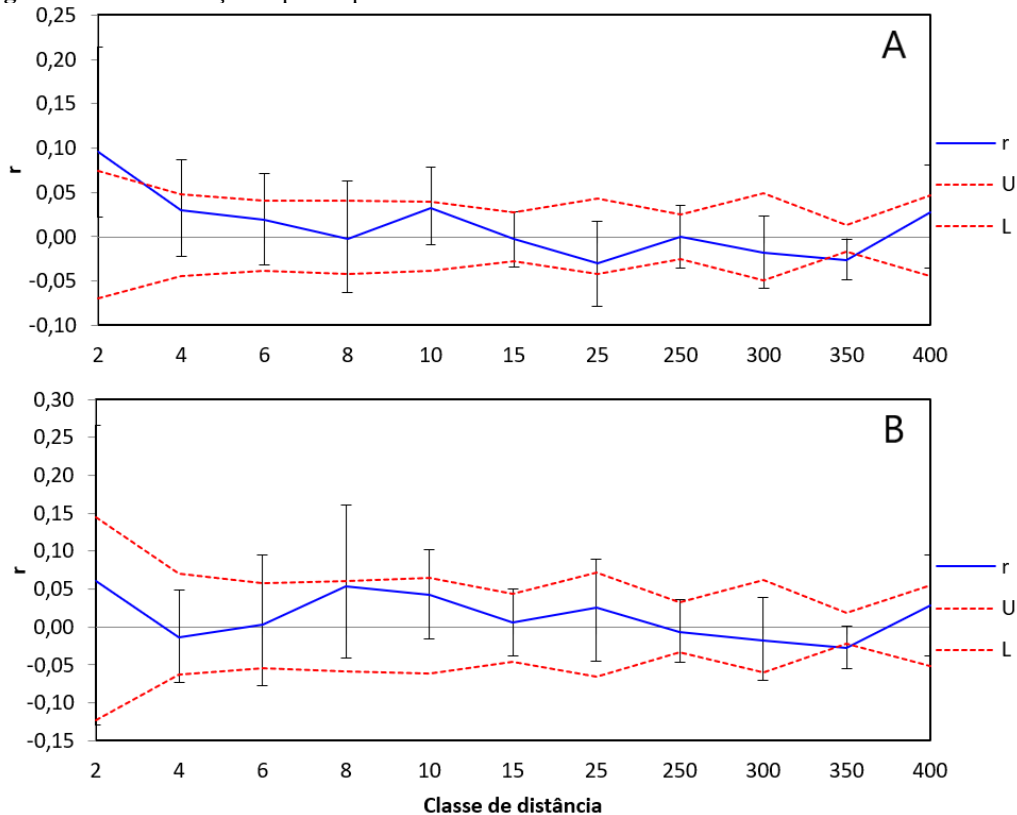
**A)** Número de K mais provável indicado pela análise é K=2. **B)** Agrupamento espacial sugere dois *clusters* distintos ao longo da área geográfica estudada. A linha tracejada corresponde a divisa entre os biomas Pantanal e Cerrado. Os pontos pretos representam a localidades dos indivíduos. Valores mais altos de probabilidade de pertencer ao *cluster* são representados pelas cores amarela e branca.

### 4.3. Análise entre distância geográfica e distância genética

A análise de autocorrelação espacial (SAA) mostrou correlação positiva significativa ( $r = 0,096$  com  $p=0,007$ ) entre os indivíduos na primeira classe, sugerindo que até 2 km os indivíduos são geneticamente mais semelhantes. Nas classes de distância geográfica subsequentes não houve correlação, pois os valores se comportaram igual aos esperados pelo acaso, mostrando que as distâncias geográficas a partir dos 4 km não explicam a distribuição dos indivíduos. No entanto, na décima classe de distância, onde os indivíduos se encontram entre 300 - 350 km, existe uma correlação negativa significativa ( $r = -0,027$  com  $p=0,002$ ), sugerindo que os indivíduos são geneticamente mais distintos (Figura 5 A).

A fim de verificar se a correlação encontrada até 2 km estava sendo causada pelos indivíduos subadultos amostrados dentro da fazenda Baía das Pedras, realizamos a análise de autocorrelação espacial sem esses indivíduos. O gráfico gerado não mostrou correlação entre as distâncias genéticas e geográficas na classe até 2 km como encontrado anteriormente, os valores se comportaram igual ao esperado pelo acaso, mostrando que as distâncias geográficas não explicam a distribuição dos indivíduos (Figura 5 B).

**Figura 5.** Autocorrelação espacial para *Prionotus maximus*.



**A)** Autocorrelação espacial (SAA) para todos os indivíduos ( $n=41$ ). **B)** Autocorrelação espacial (SAA) sem os indivíduos subadultos ( $n=30$ ). Os gráficos mostram o coeficiente de correlação genética ( $r$ ) em função da distância geográfica entre as classes de distância espacial definidas. Linhas vermelhas tracejadas representam os limites superior (U) e inferior (L) da hipótese nula de ausência de estrutura espacial com base em 10.000 permutações aleatórias. As barras de erro representam intervalos de confiança de 95% sobre  $r$  com base em 1.000 *bootstraps*.

#### 4.4. Diversidade genética

De acordo com os *clusters* encontrados pela análise bayesiana com modelo espacial conduzida no pacote Geneland (GUILLOT; MORTIER; ESTOUP, 2005), verificamos os parâmetros de diversidade genética para cada grupo (Cerrado e Pantanal). Não foram encontradas evidências de alelos nulos. Nenhum loco está em desequilíbrio de ligação após a correção de Bonferroni ( $p = 0,0035$ ) ou fora dos valores esperados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,0035$ ).

Apesar da diferença entre o número de indivíduos nove e 32 para os *clusters* Cerrado e Pantanal respectivamente, os índices de diversidade entre os dois foram muito semelhantes, com maior discrepância entre o número de alelos privados. A população do Cerrado apresentou ao todo 51 alelos, sendo quatro alelos privados (Pmax04, Pmax09, Pmax25, Pmax30) com frequências de 5% a 7%. Já a população do Pantanal apresentou 58 alelos, sendo 11 deles privado (Pmax04, Pmax05, Pmax11, Pmax16, Pmax18, Pmax19, Pmax28) com frequências de 1% a 28%.

O número de alelo por loco variou entre dois (Pmax18) e cinco (Pmax04), na população do Cerrado e entre três (Pmax02, Pmax09, Pmax17, Pmax21, Pmax25, Pmax30) e seis (Pmax04, Pmax16, Pmax19) na população do Pantanal. No grupo do Pantanal, oito alelos apresentaram frequências inferiores a 5% sendo considerados alelos raros, dos quais três eram privados. Já o grupo do Cerrado apresentou cinco alelos com frequências inferiores a 5%, dos quais três eram privados. A figura 6 mostra um gráfico das frequências alélicas dentro dos *clusters*.

Os valores de heterozigosidade observada e esperada média não divergiram significativamente entre os *clusters* Cerrado ( $H_o = 0,654$ ,  $H_e = 0,646$ ) e Pantanal ( $H_o = 0,646$ ,  $H_e = 0,627$ ). No grupo do Cerrado, os locos Pmax18 ( $H_o = 0,222$   $H_e = 0,523$ ) e Pmax22 ( $H_o = 1,00$   $H_e = 0,686$ ) foram os que apresentaram valores mais discrepante entre heterozigosidade observada e esperada, apesar disso não apresentaram valores de  $F_{IS}$  significativos. Os valores médios de riqueza alélica ( $R_{ACerrado} = 3,438$ ,  $R_{APantanal} = 3,436$ ) e número de alelos efetivos ( $A_{ECerrado} = 2,691$ ,  $A_{EPantanal} = 2,789$ ) também foram muito próximos entre os dois *clusters*. Os valores de PIC médio para os dois *clusters* detectados mostram que o conjunto de locos utilizado foi altamente informativo, uma vez que valores médios de PIC maiores que 0,5 são considerados altamente informativos de acordo com Botstein e colaboradores (1980). Os resultados de todos os locos para cada *cluster* são mostrados na tabela 4.

O tamanho populacional efetivo ( $N_E$ ) variou para a população do Pantanal de 31,2 ( $P_{crit} = 0,05$ , IC 95% = 20,4 – 54,4) a 35,0 ( $P_{crit} = 0,01$ , IC 95% = 22,8 – 62,2) para os diferentes

valores críticos. Para a população do Cerrado a estimativa foi de 5,6 (IC 95% = 2,5-15,3) para os diferentes valores críticos.

**Tabela 4.** Parâmetros da diversidade genética para cada *cluster*, baseados em 14 locos de microssatélites. N = número de indivíduos analisados;  $N_A$  = Número de alelo por loco;  $R_A$  = Riqueza alélica;  $A_E$  = número efetivo de alelos;  $P_A$  = Alelos privados; PIC = conteúdo de informação polimórfica; HWE = p-valor do teste exato de Fischer para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weiberg ( $\alpha= 0,05$ );  $H_O$  = heterozigosidade observada;  $H_E$  = heterozigosidade esperada;  $F_{IS}$  = coeficiente de endogamia. O nível de significância dos valores de  $F_{IS}$  para o  $p < 0,00357$ ;  $P_s$  = valores de  $F_{IS}$  *smaller*;  $P_L$  = valores de  $F_{IS}$  *larger*.

	Loco	N	$N_A$	$R_A$	$A_E$	$P_A$	PIC	HWE	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$	$P_s$	$P_L$
Cluster do Cerrado (N=9)	Pmax02	9	3	2,971	2,219	0	0,489	1,000	0,667	0,582	-0,157	0,407	0,871
	Pmax04	9	5	4,617	4,050	1	0,712	0,448	0,778	0,797	0,026	0,714	0,607
	Pmax05	9	3	2,999	2,945	0	0,586	0,278	0,778	0,699	-0,120	0,500	0,782
	Pmax09	9	4	3,569	2,656	1	0,557	0,397	0,778	0,660	-0,191	0,364	0,885
	Pmax11	8	4	3,700	2,844	0	0,582	1,000	0,750	0,692	-0,091	0,517	0,800
	Pmax16	7	4	3,989	3,630	0	0,674	0,348	0,714	0,780	0,091	0,828	0,471
	Pmax17	9	3	2,902	2,455	0	0,505	0,080	0,444	0,627	0,304	0,928	0,200
	Pmax18	9	2	2,000	1,976	0	0,372	0,172	0,222	0,523	0,590	1,000	0,103
	Pmax19	7	4	3,846	2,513	0	0,553	0,785	0,857	0,648	-0,358	0,139	1,000
	Pmax21	9	3	2,975	2,571	0	0,535	0,359	0,444	0,647	0,326	0,950	0,182
	Pmax22	9	4	3,657	2,842	0	0,592	0,073	1,000	0,686	-0,500	0,014	1,000
	Pmax25	9	4	3,666	3,306	1	0,637	0,826	0,778	0,739	-0,057	0,592	0,717
	Pmax28	9	4	3,235	1,604	0	0,354	1,000	0,444	0,399	-0,123	0,667	1,000
	Pmax30	6	4	4,000	2,057	1	0,476	0,528	0,500	0,561	0,118	0,910	0,467
	Média	-	3,64	3,438	2,691	-	0,545	-	0,654	0,646	-0,014	0,410	0,596
Total	-	51	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	
Cluster do Pantanal (N=32)	Pmax02	32	3	2,875	2,283	0	0,490	0,778	0,531	0,571	0,071	0,789	0,353
	Pmax04	32	6	4,919	4,511	2	0,745	0,118	0,813	0,791	-0,028	0,507	0,707
	Pmax05	32	4	3,328	2,488	1	0,541	0,669	0,531	0,608	0,127	0,889	0,210
	Pmax09	32	3	2,722	2,319	0	0,473	1,000	0,563	0,578	0,027	0,610	0,571
	Pmax11	32	5	3,489	2,756	1	0,568	0,986	0,719	0,647	-0,112	0,267	0,853
	Pmax16	32	6	5,046	4,452	2	0,741	0,650	0,813	0,788	-0,032	0,435	0,710
	Pmax17	32	3	2,530	2,190	0	0,438	0,605	0,625	0,552	-0,134	0,253	0,857
	Pmax18	32	4	3,149	2,616	2	0,546	0,199	0,688	0,627	-0,097	0,260	0,860
	Pmax19	32	6	4,721	3,112	2	0,647	0,600	0,844	0,689	-0,228	0,010	0,996
	Pmax21	32	3	2,972	2,779	0	0,564	0,260	0,594	0,650	0,088	0,792	0,339
	Pmax22	32	4	2,850	1,633	0	0,357	0,151	0,375	0,394	0,049	0,750	0,446
	Pmax25	32	3	2,972	2,550	0	0,540	0,366	0,750	0,618	-0,219	0,053	0,982
	Pmax28	32	5	3,586	2,999	1	0,606	0,357	0,594	0,677	0,125	0,885	0,225
	Pmax30	31	3	2,951	2,350	0	0,511	0,261	0,613	0,584	-0,051	0,425	0,750
	Média	31,93	4,14	3,436	2,789	-	0,555	-	0,646	0,627	-0,032	0,142	0,864
Total	-	58	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	

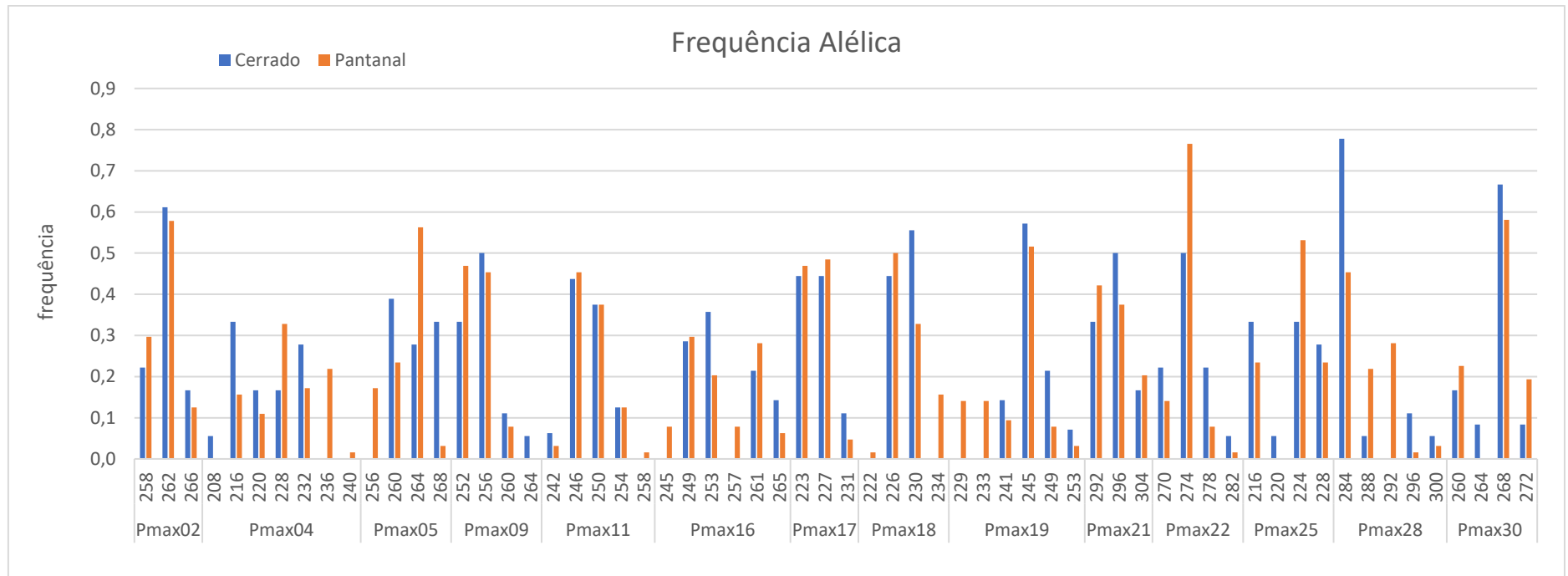
Ao aplicar o teste de significância de Wilcoxon, encontramos sinal de redução populacional no Cerrado ( $p < 0,05$ ) para  $n = 9$  indivíduos apenas no modelo de mutação de

alelos infinitos (IAM). No entanto, ao usar  $n = 32$  com genótipos simulados, foi encontrado um sinal de gargalo recente para os modelos IAM e TPM com 70% e 95% de SMM. Já para a simulação de genótipos  $n = 100$ , encontramos sinal de gargalo para os três modelos de mutação, IAM, TPM com 70% e 95% de SMM e SMM (Tabela 5). No caso do Pantanal, encontramos sinal de redução populacional ( $p < 0,05$ ) para  $n = 32$  indivíduos (dados coletados) nos modelos de mutação IAM e TPM com 70% e 95% de SMM. Para os genótipos simulados  $n = 100$ , encontramos sinal de redução populacional ( $p < 0,05$ ) nos modelos de mutação IAM e TPM com 70% de SMM (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores de p para excesso e/ou déficit de heterozigotos gerados pelo teste de Wilcoxon. Hde = déficit de heterozigotos; Hex = excesso de heterozigotos; Hed = déficit e excesso de heterozigotos; IAM = modelo de mutação de alelos infinitos; SMM = modelo de mutação gradual; TPM = modelo de mutação em duas fases, com 70% e 95% do modelo de mutação gradual e 20% de variância. Resultados para  $n = 9$  no cerrado e  $n = 32$  no pantanal (dados coletados) e  $n = 32$ ,  $n = 100$  (genótipos simulados). \* valores de p significativos  $p < 0,05$ .

		9			32			100					
		IAM	TPM		SMM	IAM	TPM		SMM	IAM	TPM		SMM
			70%	95%			70%	95%			70%	95%	
Cerrado	Hde	0.98773	0.94055	0.9137	0.90314	0.99997	0.99985	0.9917	0.97101	1	0.99997	0.99969	0.99786
	Hex	0.01477*	0.06763	0.09686	0.10828	0.00006*	0.00021*	0.01013*	0.03381*	0.00003*	0.00006*	0.00043*	0.00269*
	Hed	0.02954*	0.13525	0.19373	0.21655	0.00012*	0.00043*	0.02026*	0.06763	0.00006*	0.00012*	0.00085*	0.00537*
Pantanal	Hde	-	-	-	-	0.99997	0.99869	0.97906	0.95471	0.99997	0.99979	0.97528	0.948
	Hex	-	-	-	-	0.00006*	0.00168*	0.02472*	0.052	0.00006*	0.00031*	0.02899*	0.05945
	Hed	-	-	-	-	0.00012*	0.00336*	0.04944*	0.104	0.00012*	0.00061*	0.05798	0.1189

**Figura 6.** Gráfico das frequências alélicas dos 14 locos de SSR, estimados para cada *cluster* encontrado nesse estudo. O eixo Y indica as frequências alélicas e o eixo X indica o alelo para cada loco.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Transferabilidade e prospecção dos locos espécie-específicos

Embora outros estudos realizados com mamíferos tenham obtido sucesso na utilização de *primers* microssatélites heterólogos entre espécies de diferentes gêneros (SCHLOTTERÖER; AMOS; TAUTZ, 1991; DALLA VECCHIA *et al.*, 2011; RODRÍGUEZ-CASTRO, 2017; SARANHOLI, 2018), o tempo de divergência da família Dasypodidae e Chlamyphoridae de 44,9 milhões de anos e de 37,2 milhões de anos para subfamílias Tolypeutinae e Euphractinae pode ter reduzido o nosso sucesso na transferabilidade dos *primers* microssatélites entre as espécies testadas. Até o presente momento, o único trabalho descrevendo a transferência de microssatélites entre Xenarthra foi realizado por Moraes (2015) entre as espécies *T. tricinctus* e *T. matacus*. Apesar de se tratar de espécies do mesmo gênero, dos 23 pares de *primers* testados, apenas cinco tiveram sucesso na amplificação, sendo que apenas um marcador apresentou um alelo diferente do encontrado em *T. tricinctus* (MORAES, 2015).

Pode-se esperar que testes para a transferabilidade de marcadores polimórficos entre espécies, produzam resultados positivos na maioria dos grupos de animais dentro e entre gêneros e até mesmo entre famílias diferentes em alguns casos. Barbará e colaboradores (2007) realizaram uma revisão afim de sumarizar os potenciais e as limitações da transferência interespecífica de marcadores microssatélites nucleares e encontraram que as taxas de sucesso na transferabilidade são > 40% em mamíferos, > 25% em peixes, e > 10% em aves. Porém, de modo geral, a taxa de amplificação bem-sucedida diminui à medida que a divergência genética entre as espécies aumenta (BARBARÁ, *et al.*, 2007). Isso se deve ao fato de que quanto maior for o tempo de divergência entre a espécie fonte e a espécie alvo, maior a probabilidade de ocorrerem mutações no local onde os *primer* dos locos microssatélites foram desenhados, o que diminuirá consideravelmente o sucesso da amplificação (HENDRIX *et al.*, 2010).

Outro fator discutido no contexto da baixa taxa de sucesso de amplificação cruzada de locos microssatélites é o tamanho do genoma. O tamanho do genoma pode não apenas afetar a amplificação de marcadores microssatélites no táxon fonte (GARNER, 2002), mas também o sucesso da transferência de marcadores entre as espécies. Barbará e colaboradores (2007) encontraram que o sucesso da amplificação diminui com o aumento do tamanho do genoma nas espécies-alvo em relação à espécie fonte. De fato, o sucesso da transferabilidade de *primers* microssatélites varia consideravelmente entre os diferentes táxons e entre as diferentes espécies de um táxon (BARBARÁ, *et al.*, 2007), de forma que o baixo sucesso na transferabilidade de



*primers* microssatélites entre as espécies testadas nesse trabalho e dentro da super ordem Xenarthra precisa ser melhor compreendido.

Considerando a dificuldade na transferência de *primers*, o uso de novas técnicas de sequenciamento como o sequenciamento completo do genoma (sequenciamento de nova geração; NGS) pode ser útil para prospecção de microssatélites específicos. Essa técnica possui a vantagem sobre as técnicas antigas por ser capaz de selecionar um número maior de marcadores microssatélites, além de ser um método mais rápido e com excelente relação custo-benefício (MALAUSA *et al.*, 2011). Silva (2013) conseguiu selecionar 52 marcadores microssatélites para *Bradypus variegatus* com a técnica de NGS em contraste com a obtenção de somente oito locos utilizando o método tradicional.

Em nosso estudo, a técnica de NGS resultou em um grande número de locos microssatélites para a espécie *P. maximus*. Considerando apenas microssatélites com mais de seis repetições do *motif*, foi possível encontrar 9688 microssatélites tetranucleotídeos, em contraste com o encontrado por Paviotti-Fischer (2016) para a espécie *E. sexcinctus*, que considerando microssatélites com mais de cinco repetições, encontrou apenas 203 tetranucleotídeos. Para avaliar a qualidade dos locos microssatélites aqui desenvolvidos, realizamos o cálculo do conteúdo de informação polimórfica para cada loco. De acordo com a escala proposta por Botstein e colaboradores (1980), os locos podem ser altamente ( $PIC > 0,5$ ), moderados (0,25 - 0,5) ou pouco informativos ( $<0,25$ ). Os locos desenvolvidos nesse estudo, mostrando PIC superior a 0,25 (Tabela 4), podendo ser considerados de moderados a altamente informativos, mostraram-se muito úteis para as análises de genética populacional realizadas.

## 5.2. Estruturação genética populacional

A análise bayesiana espacial, realizada no Geneland, indicou valor ótimo de  $K=2$  alocando em um mesmo *cluster* os indivíduos amostrados no bioma Cerrado e separando-os dos alocados no bioma Pantanal, apesar da distância geográfica entre os dois sítios do Cerrado (C-ATR e C-PNE) serem maiores do que entre os pares de sítios entre biomas (C-ATR x P-FBP e C-PNE x P-FBP). O valor de  $K=2$  inferido pelo Geneland separando os grupos entre Cerrado e Pantanal parece plausível dada a natureza diversa dos biomas e dos diferentes níveis de degradação que apresentam na região. Resultados semelhantes de diferenciação genética significativa entre Cerrado e Pantanal também foram encontrados por Paviotti-Fischer (2016) para a espécie *Euphractus sexcinctus*, encontrando maior similaridade entre indivíduos alocados em diferentes áreas do bioma Cerrado quando comparados aos alocados no bioma Pantanal, apesar das distâncias geográficas entre os pontos.

A diferenciação entre os *clusters* Pantanal e Cerrado é suportada pelo valor de  $D_{est}$ , que apesar de baixo apresentou valor de  $p$  significativo. Embora o índice de fixação de Wright ( $F_{ST}$ ) seja frequentemente utilizado como índice de diferenciação entre populações, trabalhos realizados por Jost (2008) e Meirmans e Hedrick, (2010) demonstraram que, quando trabalhamos com locos altamente polimórficos como os microssatélites, cálculos de  $F_{ST}$  podem subestimar o real grau de diferenciação das subpopulações. Populações altamente diferenciadas podem ter valores de  $F_{ST}$  próximos a 0 indicando baixa diferenciação devido a sua dependência dos valores de heterozigosidade (JOST, 2008). Por isso, este último autor propõe que para esses marcadores o mais adequado é utilizar o cálculo de  $D_{est}$ , que leva em conta o número efetivo de alelos, como índice de diferenciação. A presença de alelos privados nas duas populações e com frequências elevadas, como no caso da população do Pantanal, pode ser mais um indicativo da redução do fluxo gênico entre esses dois *clusters*.

A divergência nos valores ótimos de  $K$  encontrados pelo *software* STRUCTURE e Geneland pode ser devido às premissas dos modelos populacionais do STRUCTURE que, em alguns casos, pode falhar em detectar o real número de *clusters* (JOMBART, 2008; JOMBART; DEVILLARD; BALLOUX, 2010). Jombart e colaboradores (2010), a partir de análises realizadas com dados simulados, demonstraram que a precisão dos resultados obtidos com o *software* STRUCTURE depende criticamente do modelo genético da população simulada.

Nossos resultados representam, assim, as primeiras evidências de estruturação populacional para a espécie entre os biomas estudados, e por isso, são importantes para medidas de conservação da espécie.

### **5.3. Análise entre distância geográfica e distância genética**

Os resultados obtidos pelo SAA não apresentaram um padrão de isolamento por distância. A correlação negativa observada na décima classe de distância provavelmente foi causada devido à estrutura genética encontrada entre os biomas, uma vez que a maioria das comparações par a par entre os pontos no pantanal (P-FBP, P-ATR) e os pontos do cerrado (C-ATR e C-PNE) se encontram entre 300 km a 350 km de distância.

Além disso, a correlação positiva encontrada entre os indivíduos que estavam a até 2 km de distância, está sendo causada devido a existência de indivíduos subadultos amostrados na região da Fazenda Baía das Pedras, corroborado pela realização da análise de autocorrelação espacial sem esses indivíduos (Figura 5B). Os resultados mostraram que sem os subadultos, a correlação entre as distâncias genéticas e a primeira classe de distância não existe, e os valores se comportaram igual ao esperado pelo acaso. Este resultado corrobora os dados ecológicos

que mostram que os indivíduos dessa espécie estabelecem áreas de vida próximas ou sobrepostas de seus parentais, dispersando para novas áreas a partir dos 9 anos, quando atingem maturidade sexual (DESBIEZ, 2020; dados não publicados).

#### 5.4. Diversidade genética

A diversidade genética tem consequências ecológicas importantes nas populações naturais, incluindo a manutenção do potencial evolutivo e a capacidade individual para responder a ameaças como mudanças ambientais e doenças (HUGHES *et al.*, 2008; ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Embora a amostragem fosse maior no Pantanal, podemos concluir que a diversidade genética nos dois *clusters* é muito semelhante, uma vez que utilizamos valores de riqueza alélica, uma medida que permite a comparação entre dois grupos com valores amostrais distintos. A riqueza alélica observada para *P. maximus* foi mais baixa do que a encontrada para outras espécies não ameaçadas como *Chaetophractus vellerosus* e *Dasypus novencinctus* que apresentaram alta riqueza alélica igual a 15 (NARDELLI *et al.*, 2016) e 12,6 (ARTEAGA *et al.*, 2012) respectivamente, em contraste com a média entre os *clusters* de 3,46 observada nesse estudo (Tabela 6).

O número de alelos efetivos também foi baixo em ambas as populações, indicando que o número de alelos que de fato contribuem para a diversidade genética é menor que o número de alelos totais encontrados. Esses resultados foram mais baixos do que os valores encontrados por Paviotti-Fischer (2016) para a espécie *E. sexcinctus* na mesma região ( $A_{\text{Ecerrado}} = 4,06$ ;  $A_{\text{Epantanal}} = 3,86$ ). O número médio de alelos, como uma medida de diversidade genética, é uma das medidas mais sensíveis para inferir sobre redução do tamanho de uma população (LEBERG, 1992; SPENCER; NEIGEL; LEBERG, 2000). Espécies ameaçadas que sofreram redução no seu tamanho populacional já perderam grande parte de seus alelos, por isso em sua maioria, apresentam menor riqueza alélica do que espécies relacionadas não ameaçadas (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Níveis moderados de heterozigosidade foram observados nos dois *clusters*. Embora todos os componentes da diversidade genética sejam afetados por uma redução no tamanho populacional, já é reconhecido que gargalos tem um efeito imediato maior na diversidade alélica do que na heterozigosidade (NEI; MARUYAMA; CHAKRABORTY, 1975). Grandes perdas de heterozigosidade são mais prováveis se o gargalo durar por várias gerações ou se a recuperação da população após o gargalo for lenta (LEBERG, 1992).

Valores menores de heterozigosidade foram encontrados em *Tolypeutes tricinctus* (Tabela 6). Em seu estudo, Moraes (2015) desenvolveu *primers* específicos para *T. tricinctus* e

obteve sucesso na amplificação de 23 marcadores microssatélites, no entanto, ela encontrou apenas dois locos polimórficos. Dessa forma, foi obtido apenas 9% de polimorfismo para os locos testados, enquanto aqui foram encontrados aproximadamente 93% dos locos polimórficos. Esses resultados podem ser explicados pelo tamanho populacional reduzido observado para *T. tricinatus*, uma espécie endêmica do Brasil que habita os biomas Caatinga e áreas adjacentes de Cerrado. Em contraste, *P. maximus* possui uma distribuição mais ampla e consequentemente populações maiores.

**Tabela 6.** Estimativas médias de diversidade genética na super ordem Xenarthra usando microssatélites. N = número de indivíduos; N locos = número de locos usados; H<sub>O</sub> = heterozigosidade observada; H<sub>E</sub> = heterozigosidade esperada; N<sub>A</sub> = total de alelos; R<sub>A</sub> = riqueza alélica; F<sub>IS</sub> = coeficiente de endogâmia.

Espécie	N	N locos	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	N <sub>A</sub>	R <sub>A</sub>	F <sub>IS</sub>	Referência
<i>Chaetophractus vellerosus</i>	69	6	0,58	0,77	90	15	0,216	Nardelli <i>et al.</i> (2016)
<i>Dasybus novencinctus</i>	310	7	0,50	0,55	30	4,29	-	Prodöhl <i>et al.</i> (1996)
<i>Dasybus novencinctus</i>	139	4	0,64	0,63	27	6,75	-0,021	Loughry <i>et al.</i> (2009)
<i>Dasybus novencinctus</i>	116	5	0,62	0,82	63	12,6	0,126	Arteaga <i>et al.</i> (2012)
<i>Euphractus sexcinctus</i>	115	10	0,85	0,71	-	5,91	-0,189	Paviotti-Fischer (2016)
<i>Priodontes maximus</i>	41	14	0,64	0,63	62	3,43	-0,010	Esse estudo
<i>Tamandua tetradactyla</i>	50	9	0,31	0,49	91	10,11	-	Clozato <i>et al.</i> (2014)
<i>Tamandua tetradactyla</i>	65	8	0,38	0,49	-	-	-	Clozato <i>et al.</i> (2015)
<i>Tolypeutes tricinctus</i>	39	2	0,30	0,25	5	3,5	-	Moraes (2015)
<i>Bradypus variegatus</i>	32	18	0,72	0,72	117	6,5	-	Moss <i>et al.</i> (2012)
<i>Choloepus hoffmanni</i>	23	16	0,56	0,59	78	4,88	-	Moss <i>et al.</i> (2011)
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	15	6	0,61	0,63	26	4,33	-	García <i>et al.</i> (2005)
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	27	5	0,059	0,482	16	3,2	0,879	Collevatti <i>et al.</i> (2007)

O modelo de mutação TPM tem sido considerado a melhor alternativa para análises de gargalos populacionais utilizando marcadores microssatélites, devido a resultados inconsistentes dos outros dois modelos IAM e SMM (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999; DI RIENZO *et al.*, 1994; LUIKART *et al.*, 1998). Levando em consideração o modelo TPM, é possível observar um sinal genético de redução para os dados coletados apenas da população do pantanal. No entanto, para alcançar um poder estatístico razoavelmente alto (0,80) no programa BOTTLENECK, é recomendado o uso de pelo menos 10 locos polimórficos (microssatélites ou aloenzimas) e amostrar pelo menos 30 indivíduos (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999). Considerando essa recomendação, concluímos que a ausência de redução populacional nos modelos TPM e SMM para os dados coletados no Cerrado (n = 9) não possuem poder estatístico. Por sua vez, ao analisarmos os resultados para os dados simulados tanto para o Cerrado (n=32 e n=100), como para o Pantanal (n=100) o sinal de redução populacional torna-se significativo para ambos os *clusters*.

Uma vez que *software* BOTTLENECK é capaz de identificar gargalos recentes nas gerações  $2N_e-4N_e$  passadas, nossos resultados estão em concordância com o descrito na literatura por Anacleto e colaboradores (2014), que estimaram uma redução populacional de pelo menos 30% nas últimas três gerações de *P. maximus*.

O  $F_{IS}$  total para cada uma das áreas (Tabela 4) não mostrou a existência de excesso ou déficit de heterozigotos, e conseqüentemente, nenhum indício de endogamia ou exogamia genética na população. Os efeitos de uma redução populacional podem não ser observados até várias gerações após a ocorrência de um gargalo, de forma que a ausência de desvios nos valores esperados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg pode ser devido ao tempo que essa redução teve início (PRICE; HADFIELD, 2014).

O tamanho efetivo da população ( $N_e$ ) é um dos parâmetros mais importantes na genética de populações e na biologia da conservação. Flutuações nos tamanhos populacionais ao longo de gerações, causa um grande efeito em  $N_e$ , por isso, pequenos valores de  $N_e$  podem indicar que houve declínio populacional na espécie (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). O reduzido tamanho efetivo encontrado de em média 33 indivíduos no Pantanal, pode ser mais uma evidência corroborando a recente redução populacional descrita. No entanto, características da história de vida da espécie como, abundância de adultos, duração do tempo de geração, idade da maturação sexual e a variação no número de descendentes gerado por indivíduo podem afetar o tamanho efetivo da população (WAPLES, 2016). Uma vez que a reprodução de *P. maximus* parece não ser sazonal, com um intervalo gestacional estimado de aproximadamente 3 anos, gerando apenas um descendente e a idade estimada de maturação sexual é de aproximadamente 7-9 anos (DESBIEZ *et al.* 2020; dados não publicados), esses fatores podem estar causando uma redução de  $N_e$ . No cerrado, o resultado obtido é devido ao baixo número amostral para essa população. Estudos futuros ampliando a amostragem são necessários para realizar o cálculo do tamanho efetivo populacional no cerrado.

Outro fator que pode estar influenciando os níveis de diversidade genética encontrados nas populações estudadas é a localização delas em relação a distribuição total da espécie, uma vez que nossa amostragem foi realizada na periferia da distribuição da espécie. O modelo de “centro abundante” (*Abundant centre model*) sugere que populações geograficamente periféricas devem exibir menor diversidade genética e maior diferenciação genética do que as populações centrais (SAGARIN; GAINES, 2002). Isso se deve, pois, dois parâmetros genéticos importantes, tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) e taxa de fluxo gênico ( $m$ ), devem ser mais altos no centro da faixa de distribuição da espécie do que nas margens (ECKERT; SAMIS; LOUGHEED, 2008). Do ponto de vista da conservação, populações periféricas podem

apresentar *pools* gênicos distintos, podendo divergir adaptativamente das populações mais centrais e, portanto, desempenhar um papel na manutenção e geração de diversidade biológica (MAYR, 1970; CHANNELL; LOMOLINO, 2000; LENORMAND, 2002).

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo representa o primeiro trabalho genético populacional para *P. maximus* e investigou a estrutura e a variação genética em populações que habitam dois diferentes biomas (Pantanal e Cerrado) na região Centro-Oeste do Brasil, periferia da área de distribuição da espécie. Contribuindo para aumentar o conhecimento sobre essa espécie considerada ameaçada de extinção.

Os microssatélites desenvolvidos mostraram-se satisfatórios para estudos genéticos populacionais e podem auxiliar em futuros estudos para o melhor entendimento de questões ecológicas de *P. maximus*. Por exemplo, análises de padrões de fluxo gênico entre duas linhagens divergentes de *D. novemcinctus* no México levaram a *insights* adicionais sobre o conservadorismo de nicho e seus impactos na dispersão de espécies (ARTEAGA *et al.* 2012). Nossos resultados mostram que os locos microssatélites desenvolvidos foram úteis para estudar essas populações em particular e podem ser úteis no estudo de outras populações de *P. maximus*, como a população descrita por Srbek-Araujo e colaboradores (2009) localizada nos remanescentes de Mata Atlântica no sudeste do Brasil onde a espécie está se encaminhando para a extinção.

A estrutura genética aqui encontrada entre os biomas Pantanal e Cerrado ajudarão futuros planos de manejo para a espécie. Além disso, os dados de diversidade genética encontrados são um indício de que a população já está sofrendo efeitos da recente redução populacional descrita para a espécie.

Dado o status atual de conservação do tatu-canastra, é crucial avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional em toda a distribuição da espécie para planejar ações eficazes de conservação que garantam a sua persistência.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABBA, A. M. *et al.* Systematics of hairy armadillos and the taxonomic status of the Andean hairy armadillo (*Chaetophractus nationi*). **Journal of Mammalogy**, v. 96, n. 4, p. 673-689, 2015.
- ABBA, A. M.; SUPERINA, M. The 2009/2010 Armadillo Red List Assessment. **Edentata: The Newsletter of the IUCN/SSA Anteater, Sloth and Armadillo Specialist Group**, Arlington, v. 2, n.11, p. 135-184, 2010.
- AGUIAR, J.; DA FONSECA, G. Conservation status of the Xenarthra. In: VIZCAÍNO, S. F.; LOUGHRY, W. J. (Ed.) **The biology of Xenarthra**. University Press of Florida, Gainesville, p. 215-231, 2008.
- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G.; AITKEN, S.N. **Conservation and the genetics of populations**. 2nd ed. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2013.
- ANACLETO, T. C. S.; MARINHO-FILHO, J. Hábito alimentar do tatu-canastra (*Xenarthra*, Dasypodidae) em uma área de cerrado do Brasil central. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 18, p. 681-688, 2001.
- ANACLETO, T.C.S. *et al.* ***Priodontes maximus***. The IUCN Red List of Threatened Species, 2014: Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T18144A47442343.en>>. Acesso em: 24 ago. 2018.
- ANDREW, R.L. *et al.* A road map for molecular ecology. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 2605-2626, 2013.
- ARTEAGA, M.C. *et al.* Genetic structure and diversity of the nine-banded armadillo in Mexico. **J Mammal**, v. 93, p. 547-559, 2012.
- AVISE, J.C. **Molecular Markers Natural History, and Evolution**. 2.ed. New York: Chapman & Hall, p. 541, 2004.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman & Hall.; London, 1994.
- AYA-CUERO, C.; RODRÍGUEZ-BOLAÑOS, A.; SUPERINA, M. Population density, activity patterns, and ecological importance of giant armadillos (*Priodontes maximus*) in Colombia. **Journal of Mammalogy**, v. 98, p. 770-778, 2017.
- AYA-CUERO, C.; SUPERINA, M.; RODRÍGUEZ-BOLAÑOS, A. Primeros registros de crías de ocarro (*Priodontes maximus* Kerr, 1792) en Colombia. **Edentata**, v. 16, p. 57-64. 2015.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 155-165, 2002.
- BALVANERA, P. *et al.* Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. **Ecology letters**, v. 9, n. 10, p. 1146-1156, 2006.
- BARBARÁ, T. *et al.* Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 18, p. 3759-3767, 2007.
- BENIRSCHKE, K.; LOW, R. J.; FERM, V. H. Cytogenetic studies of some armadillos. In: BENIRSCHKE, K. (Ed.) **Comparative mammalian cytogenetics**, Springer-Verlag, New York, p. 330-345, 1969.

- BENIRSCHKE, K.; WURSTER, D. H. The chromosomes of the giant armadillo, *Priodontes giganteus* Geoffroy. **Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia**, v. 49, p. 125–130, 1969.
- BERG, D.J.; GUTTMAN, S.I.; CANTONWINE, E.G. Geographic variation in unionid genetic structure: Do management units exist? **J. Shellfish Res.**, v. 15, p. 484, 1996.
- BOTSTEIN, D. *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.
- BROOK, B.W. *et al.* Contribution of inbreeding to extinction risk in threatened species. **Conservation Ecology**, v. 6, n. 1, 2002.
- BUTCHART, S. H. *et al.* Global biodiversity: indicators of recent declines. **Science**, v. 328, n. 5982, p. 1164-1168, 2010.
- CABRERA, A. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”**, v. 4, p. 1–732, 1957.
- CARDINALE, B. J. *et al.* Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. **Nature**, v. 443, n. 7114, p. 989-992, 2006.
- CARDINALE, B.J. *et al.* The functional role of producer diversity in ecosystems. **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 572-592, 2011.
- CARTER, T. S.; ENCARNAÇÃO, C. D. Characteristics and use of burrows by four species of armadillos in Brazil. **J. Mammal**, v. 64, n. 1, p. 103–108, 1983.
- CARTER, T. S.; SUPERINA, M.; LESLIE, D. M. *Priodontes maximus* (Cingulata: Chlamyphoridae). **Mammalian Species**, v. 48, n. 932, p. 21–34, 2016.
- CEBALLOS, G. *et al.* Accelerated modern human–induced species losses: Entering the sixth mass extinction. **Science advances**, v. 1, n. 5, p. e1400253, 2015.
- CHAGAS, A. T. de A. *et al.* Illegal hunting and fishing in Brazil: a study based on data provided by environmental military police. **Natureza & conservação**, v.13, p. 183-189, 2015.
- CHANNELL, R.; LOMOLINO, M. V. Dynamic biogeography and conservation of endangered species. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 84-86, 2000.
- CHINCHILLA, L. *et al.* Microsatellite markers for the study of leprosy in nine-banded armadillos. **Mol Ecol Resour**, v. 10, p. 1098-1105, 2010.
- CHUNG, M. *et al.* Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. **Nat. Genet**, v. 5, p. 254-258, 1993.
- CIPRIANI, G. *et al.* AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, n. 1-2, p. 65-72, 1999.
- CITES. **Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora**. 2016. Disponível em: <<http://www.cites.org>>. Acesso em: 19 jan. 2020.
- CLOZATO, C. L. *et al.* Historical and non-invasive samples: a study case of genotyping errors in newly isolated microsatellites for the lesser anteater (*Tamandua tetradactyla* L., Pilosa). **Molecular ecology resources**, v. 14, n. 3, p. 531-540, 2014.



- CLOZATO, C. L. *et al.* Spatial pattern of adaptive and neutral genetic diversity across different biomes in the lesser anteater (*Tamandua tetradactyla*). **Ecology and evolution**, v. 5, n. 21, p. 4932-4948, 2015.
- COLLEVATTI, R. G. *et al.* Evidence of high inbreeding in a population of the endangered giant anteater, *Myrmecophaga tridactyla* (Myrmecophagidae), from Emas National Park, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 112-120, 2007.
- CORNUET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, n. 144, p. 2001-2014, 1996.
- CUÉLLAR, E. The tatujeikurajoyava (*Chlamyphorus retusus*) in the Izozog communities of the Bolivian Gran Chaco. **Edentata**, v. 4, p. 14–16, 2001.
- DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, n. 5, p. 504-509, 2004.
- DALLA VECCHIA, A. C. *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci for white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and cross-amplification in collared peccaries (*Pecari tajacu*). Conservation genetics resources, v. 3, n. 1, p. 151-154, 2011.
- DE SOUZA-MAZUREK, R. R. *et al.* Subsistence hunting among the Waimiri Atoari Indians in central Amazonia, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 9, p. 579–596, 2000.
- DELSUC, F. *et al.* Molecular phylogeny of living xenarthrans and the impact of character and taxon sampling on the placental tree rooting. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, p. 1656–1671, 2002.
- DELSUC, F.; VIZCAÍNO, S. F.; DOUZERY, E. J. P. Influence of tertiary paleoenvironmental changes on the diversification of South American mammals: a relaxed molecular clock study within xenarthrans. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, p. 11–24. 2004.
- DESBIEZ, A. L. J. *et al.* Spatial ecology of the giant armadillo *Priodontes maximus* in Midwestern Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 101, n. 1, p. 151-163, 2019.
- DESBIEZ, A. L. J.; KLUYBER, D. The role of giant armadillos (*Priodontes maximus*) as physical ecosystem engineers. **Biotropica**, v. 45, p. 537–540, 2013.
- DESBIEZ, A. L. J.; MASSOCATO, G. F.; KLUYBER, D. Insights into giant armadillo (*Priodontes maximus* Kerr, 1792) reproduction. **Mammalia**, 2019.
- DI RIENZO, A. *et al.* Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 8, p. 3166-3170, 1994.
- DÍAZ, S. *et al.* Biodiversity loss threatens human well-being. **PLoS Biol**, v. 4, n. 8, p. 1300-1305, 2006.
- DO, C. *et al.* NeEstimator V2: re-implementation of *software* for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, p. 209-214, 2014.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. 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.
- ECKERT, C. G.; SAMIS, K. E.; LOUGHEED, S. C. Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. **Molecular ecology**, v. 17, n. 5, p. 1170-1188, 2008.

- EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. 2nd ed. University of Chicago Press, Chicago, Illinois. 1997.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the *software* structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 14, p. 2622-2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.
- FEIJÓ, A. *et al.* Phylogeny and molecular species delimitation of long-nosed armadillos (*Dasyus: Cingulata*) supports morphology-based taxonomy. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 186, n. 3, p. 813-825, 2019.
- FONSECA, G. A. B. D.; AGUIAR, J. M. The 2004 Edentate Species Assessment Workshop. **Edentata**, v. 6, p. 1-26, 2004.
- FRANKEL, O.H. Genetic conservation: our evolutionary responsibility. **Genetics**, v. 78, p. 53-65, 1974.
- FRANKEL, O.H. Variation, the essence of life. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales** v. 95, p. 158-169, 1970.
- FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological conservation**, v. 126, n. 2, p. 131-140, 2005.
- FRANKHAM, R., Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. **Genetical Research**, v. 66, p. 95-107, 1995.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2008.
- FRANKHAM, R.; KINGSLOVER, J.G., Response to environmental change: Adaptation or extinction. In: FERRIER, R.; DIECKMAN, U.; COUVET, D. (Eds.), **Evolutionary Conservation Biology**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 85-100, 2004.
- GARCÍA, J. E. *et al.* Identification of microsatellite DNA markers for the giant anteater *Myrmecophaga tridactyla*. **Journal of heredity**, v. 96, n. 5, p. 600-602, 2005.
- GARDNER, A.L. Mammals of South America: Marsupials, Xenarthrans, Shrews and Bats. University of Chicago Press, v. 1, 2007.
- GARNER, T.W.J. Genome size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential. **Genome**, v. 45, p. 212-215, 2002.
- GAUDIN, T. J. Phylogeny of the Xenarthra, in FARIÑA, R. A., VIZCAÍNO, S. F., STORCH, G. (eds.). **Morphological Studies in Fossil and Extant Xenarthra (mammalia)**: Frankfurt am Main, Seckenbergiana Biologica, 27-40, 2003.
- GAUDIN, T. J. The morphology of xenarthrous vertebrae (Mammalia: Xenarthra). **Fieldiana Geol**, v. 41, p. 1-38, 1999.
- GAUDIN, T. J.; WIBLE, J.R. The phylogeny of living and extinct armadillos (Mammalia, Xenarthra, Cingulata): a craniodontal analysis. In: CARRANO, M. T.; GAUDIN, T. J.; BLOB, R.W.; WIBLE, J.R. (eds.) **Aminote Paleobiology**. University of Chicago Press, Chicago, IL, p. 153-198, 2006.

- GIBB, G. C. *et al.* Shotgun mitogenomics provides a reference phylogenetic framework and timescale for living xenarthrans. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 621–642, 2015.
- GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites**: evolution and applications. New York: Oxford University Press, p.34-41, 1999.
- GOUDET, J. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)**. 2001.
- GUILLOT, G. Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation. The correlated allele frequencies model revisited. **Bioinformatics**, v. 24, p. 2222-2228, 2008.
- GUILLOT, G.; MORTIER, F.; ESTOUP, A. GENELAND: A computer package for landscape genetics. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 3, p. 712–715, 2005.
- HENDRIX, R. *et al.* Strong correlation between cross-amplification success and genetic distance across all members of ‘True Salamanders’(Amphibia: Salamandridae) revealed by *Salamandra salamandra*-specific microsatellite loci. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 6, p. 1038-1047, 2010.
- HUGHES, A.R. *et al.* Ecological consequences of genetic diversity. **Ecol Lett**, v. 11, n. 6, p. 609-623, 2008.
- ISAGI, Y.; SUHANDONO, S. PCR *primers* amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 9, p. 897-899, 1997.
- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. 2020. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 03 abr. 2020.
- JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 24, n. 11, p. 1403–5, 2008.
- JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC genetics**, v. 11, n. 1, p. 94, 2010.
- JOST, L. GST and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 18, p. 4015–4026, 2008.
- JUETERBOCK, A. *et al.* Package “DEMEtics”. **Mol. Ecol.**, v. 19, p. 3845–3852, 2012.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099–1106, 14 fev. 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.
- KOPELMAN, N. M. *et al.* Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 5, p. 1179–1191, 2015.
- LEBERG, P.L. Effects of population bottlenecks on genetic diversify as measured by allozyme electrophoresis. **Evolution**, v. 46, p. 477–494, 1992.

- LEEUWENBERG, F. Edentata as a food resource: subsistence hunting by Xavante Indians, Brazil. **Edentata**, v. 3, p. 4–5, 1997.
- LEITE-PITMAN, R. *et al.* Habitat use and activity of the giant armadillo (*Priodontes maximus*): preliminary data from southeastern Peru. Presented at the Society for Conservation Biology Meeting, New York, USA. 2004.
- LEMOS, F. G. *et al.* Bridging gaps on population knowledge of giant armadillos: importance of intensify sampling efforts in highly-modified landscapes to accurately estimate species occurrence. **PeerJ Preprints**, v. 5, p. 23, 2017.
- LENORMAND, T. Gene flow and the limits to natural selection. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 4, p. 183-189, 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. *et al.* Is leprosy spreading among nine-banded armadillos in the southeastern United States? **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, p. 144–152, 2009.
- LUIKART, G. *et al.* Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of heredity**, v. 89, n. 3, p. 238-247, 1998.
- MALAUUSA, T. *et al.* High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 638 – 644, 2011.
- MANEL, S. *et al.* Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 4, p. 189-197, 2003.
- MASSOCATO, G. F.; DESBIEZ, A. L. J. Presença e importância do tatu-canastra, *Priodontes maximus* (Kerr, 1792), na maior área protegida do leste do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Edentata**, v. 18, p. 26–33, 2017.
- MAYR, E. **Populations, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution.** Harvard University Press, 1970.
- MCNEELY, J. A. *et al.* **Conserving the world's biological diversity.** International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 1990.
- MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W. Assessing population structure: FST and related measures. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 1, p. 5-18, 2010.
- MERITT Jr., D.A. The fairy armadillo, *Chlamyphorus truncatus* Harlan. In: MONTGOMERY, G.G. (ed.), **The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas.** Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 393– 395, 1985.
- MERITT, D. A. Jr. Observations on the status of the giant armadillo, *Priodontes giganteus*, in Paraguay. **Zoologica: Scientific Contributions of the New York Zoological Society**, v. 58, p. 103, 1973.
- MERITT, D. A. Jr. Research questions on the behavior and ecology of the giant armadillo (*Priodontes maximus*). **Edentata**, v. 7, p. 30–33. 2006.
- MORAES, H. T. de. **Estudo da diversidade genética em Cingulata através de marcadores mitocondriais e microssatélites: o caso de uma população de *Tolypeutes tricinctus* (Linnaeus, 1758) do Cerrado.** (2015). 74 p. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo (SP), 2015.

- MOSS, W. E. *et al.* Development and characterization of 16 microsatellites for Hoffmann's two toed sloth, *Choloepus hoffmanni*. **Conservation genetics resources**, v. 3, n. 4, p. 625-627, 2011.
- MOSS, W. E. *et al.* Isolation and characterization of 18 microsatellite markers for the brown-throated three-toed sloth, *Bradypus variegatus*. **Conservation genetics resources**, v. 4, n. 4, p. 1037-1039, 2012.
- NARDELLI, M. *et al.* Genetic structuring in a relictual population of screaming hairy armadillo (*ChaetophRACTUS vellerosus*) in Argentina revealed by a set of novel microsatellite loci. **Genetica**, v. 14, n. 4, p. 469-76, 2016.
- NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, v. 29, p. 1-10, 1975.
- NIELSEN, A.E.G.; BACH, L.A.; KOTLICKI, P. HYBRIDLAB ver. 1.0: A program for generating simulated hybrids from population samples. **Mol Ecol Notes**, v. 6, p. 971-973, 2006.
- NOSS, A. J.; PEÑA, P.; RUMIZ, D. I. Camera trapping *Priodontes maximus* in the dry forests of Santa Cruz, Bolivia. *Endangered Species UPDATE*, v. 2, p. 43-52, 2004.
- NOWAK, R. M. **Walker's mammals of the world**. 5 ed. John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 1991.
- OLIVEIRA, E. J. *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.
- PARERA, A. **Los mamíferos de la Argentina y la region austral de Sudamérica**. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina. 2002.
- PATTERSON, B.; PASCUAL, R. The fossil mammal fauna of South America. In: KEAST, A.; ERK, F.C.; GLASS, B. eds. **Evolution, mammals and southern continents**. Albany, NY: State University of New York Press, p. 247- 309, 1972.
- PAVIOTTI-FISCHER, E. M. **Diversidade genética de *Euphractus sexcinctus* (linnaeus, 1758) em áreas de Cerrado e Pantanal**. (2016). 86 p. Tese de Doutorado. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos (SP), 2016.
- 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.
- PÉPIN, L. *et al.* Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. **Heredity**, v. 74, p. 53-61, 1995.
- PERES, C.; H. NASCIMENTO. Impact of game hunting by the Kayapo of south-eastern Amazonia: implications for wildlife conservation in tropical forest indigenous reserves. **Biodiversity and Conservation**, v. 15, p. 2627-2633, 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. **J Hered**, v. 90, p. 502-503, 1999.
- PORINI, G. Tatú carreta (*Priodontes maximus*) in Argentina. **Edentata**, v. 4, p. 9-14, 2001.
- PRICE, M. R.; HADFIELD, M. G. Population genetics and the effects of a severe bottleneck in an ex situ population of critically endangered Hawaiian tree snails. **PloS one**, v. 9, n. 12, 2014.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

PRODÖHL, P. A. *et al.* Molecular documentation of polyembryony and the micro-spatial dispersion of clonal sibships in the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*. **Proceedings: Biological Sciences**, p. 1643-1649, 1996.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2018. Disponível em: <<https://www.r-project.org>>.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. population genetics *software* for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REDFORD, K. H.; J. F. EISENBERG. **Mammals of the Neotropics**. The Southern Cone. v. 2. Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay. University of GENEPOP: Chicago Press, Chicago, Illinois. 1992.

REDI, C. A. *et al.* Genome sizes in Afrotheria, Xenarthra, Euarchontoglires and Laurasiatheria. **Journal of Heredity**, v. 96, p. 485–493, 2005.

RICE, W. R. Analyzing Tables of Statistical Tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223–225, 1989.

ROA, A. C. *et al.* Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 11, p. 1647-1655, 2000.

RODRÍGUEZ-CASTRO, K. G. **Distribuição da variação genética nos canídeos *Cerdocyon thous* e *Chrysocyon brachyurus* de paisagens antropizadas da região centro-oeste e sudeste do Brasil**. (2017). 152 p. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos (SP), 2017.

ROZEN, S; SKALETSKY, H.J. Primer3. Disponível em: [http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html). 1998. Acesso 03 ago. de 2019.

SAGARIN, R. D.; GAINES, S. D. The ‘abundant centre’ distribution: to what extent is it a biogeographical rule?. **Ecology letters**, v. 5, n. 1, p. 137-147, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor**, 2001.

SARANHOLI, B. H. **Genética populacional de felinos e as ameaças para *Puma concolor*: estruturação populacional recente e atropelamentos**. (2018). 123 p. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos (SP), 2018.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nature Reviews**, Vienna, v. 5, p.63-69, 2004.

SCHLOTTERÖER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 63-65, 1991.

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

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J.. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecol. Lett**, v. 9, p. 615– 629, 2006.

SEYMOUR, A.M. *et al.* High effective inbreeding coefficients correlate with morphological abnormalities in populations of South Australian koalas (*Phascolarctos cinereus*). In: **Animal Conservation forum**. Cambridge University Press, p. 211-219, 2001.

SHERWIN, W.B. *et al.* Analysis and conservation implication of koala genetics. **Conservation Genetics**, v. 14, p. 639-649, 2000.

SILVA, S. A. M. **Contribuições para a conservação de *Bradypus variegatus* (preguiça comum): processos históricos e demográficos moldando a diversidade nuclear**. (2013). 180 p. Tese de Doutorado. Instituto de Biociência. Universidade de São Paulo. São Paulo (SP), 2013.

SILVEIRA, L. *et al.* Ecology of the giant armadillo (*Priodontes maximus*) in the grassland of Central Brazil. **Edentata**, v. 8, n. 10, p. 25–34, 2009.

SMITH, P. Giant armadillo *Priodontes maximus*. **FAUNA Handbook of the Mammals of Paraguay**, v. 6, p. 1–11, 2007.

SOLE-CAVA, A. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. (Org.) **Biologia molecular e evolução**, 2001. p. 163-171.

SPENCER, C.C.; NEIGEL, J.E.; LEBERG, P.L. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1517–1528, 2000.

SRBEK-ARAÚJO, A.C. *et al.* Records of the giant-armadillo *Priodontes maximus* (Cingulata: Dasypodidae) in the Atlantic Forest: are Minas Gerais and Espírito Santo the last strongholds of the species? **Zoologia**, v. 26, n. 3, p. 461–468, 2009.

STACHOWICZ, J. J.; BRUNO, J. F.; DUFFY, J. Emmett. Understanding the effects of marine biodiversity on communities and ecosystems. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 38, p. 739-766, 2007.

SUPERINA, M. New information on population declines in pink fairy armadillos. **Edentata**, v. 7, p. 48–50, 2006.

SUPERINA, M.; PAGNUTTI, N.; ABBA, A. M. What do we know about armadillos? An analysis of four centuries of knowledge about a group of South American mammals, with emphasis on their conservation. **Mammal Review**, n. 44, p. 69–80, 2014.

TAULMAN, J. F.; ROBBINS, L. W. Range expansion and distributional limits of the nine-banded armadillo in the United States: an update of Taulman & Robbins (1996). **Journal of Biogeography**, v. 41, n. 8, p. 1626-1630, 2014.

TRUJILLO, F.; SUPERINA, M.. **Armadillos de los Llanos Orientales**. ODL, Fundación Omacha, Cormacarena, Corporinoquia, Bogotá, Colombia. p. 176, 2013.

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.

VOSS, R. S.; FLECK, D. W. Mammalian Diversity and Mammal Ethnomammalogy in Amazonian Peru Part 2: Xenarthra, Carnivora, Perissodactyla, Artiodactyla, and Sirenia. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 417, p. 118, 2017.

WAPLES, R. S. Life-history traits and effective population size in species with overlapping generations revisited: the importance of adult mortality. **Heredity**, v. 117, n. 4, p. 241-250, 2016.

- WAPLES, R.S. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene locos. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 7, p. 167-184, 2006.
- WEBER, J.L.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am J Hum Genet**, v. 44, p. 388–396, 1989.
- WESTEMEIER, R.L. *et al.* Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. **Science**, v. 282, n. 5394, p. 1695-1698, 1998.
- WETZEL, R. M. *et al.* Order Cingulata. In: GARDNER, A. L. (Ed.) **Mammals of South America**, v. 1. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats. University of Chicago Press, Chicago, Illinois. p. 128–156, 2008.
- WETZEL, R. M. Taxonomy and distribution of armadillos, Dasypodidae. In: MONTGOMERY, G. G. **The evolution and ecology of armadillos, sloths, and vermilinguas** (Ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C, p. 23–46, 1985a.
- WETZEL, R. M. The identification and distribution of recent Xenarthra (= Edentata). In: MONTGOMERY, G. G. **The evolution and ecology of armadillos, sloths, and vermilinguas** (Ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C, p. 5–21, 1985b.
- WHITE, G.; POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 9, p. 851-860, 1997.
- WHITFORD, W. G.; KAY, R. F. Biopedturbation by mammals in deserts: A review. **J. Arid Environ.** v. 41, p. 203–230, 1999.
- WILSON, D.; REEDER, D. **Mammal Species of the Worl**. Johns Hopkins University Press, v.2, p. 142, 2005.
- ZUCCHI, M. I. *et al.* Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 4, p. 512-513, 2002.