



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde



Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

KAREN GISELLE RODRÍGUEZ CASTRO

GENÉTICA APLICADA À ECOLOGIA DE ESTRADAS: UM ESTUDO NA ESTRADA MUNICIPAL
GUILHERME SCATENA (São Carlos, SP) E POTENCIAL IMPACTO NA BIODIVERSIDADE LOCAL.

São Carlos

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde



Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GENÉTICA APLICADA À ECOLOGIA DE ESTRADAS: UM ESTUDO NA ESTRADA MUNICIPAL
GUILHERME SCATENA (São Carlos, SP) E POTENCIAL IMPACTO NA BIODIVERSIDADE LOCAL.

Karen Giselle Rodríguez Castro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.

São Carlos

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C355ga

Castro, Karen Giselle Rodriguez.

Genética aplicada à ecologia de estradas: um estudo na estrada municipal Guilherme Scatena (São Carlos, SP) e potencial impacto na biodiversidade local. / Karen Giselle Rodriguez Castro. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
55p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Vertebrados. 2. DNA barcode. 3. COX-1. 4. 16s.
5. Vertebrados atropelados. 6. Identificação molecular. I.
Título.

CDD: 596 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**“Genética Aplicada à Ecologia de Estradas: Um Estudo na
Estrada Municipal Guilherme Scatena (São Carlos, SP) e
Potencial Impacto na Biodiversidade Local”**

Dissertação de Mestrado de
Karen Giselle Rodriguez Castro

Banca Examinadora

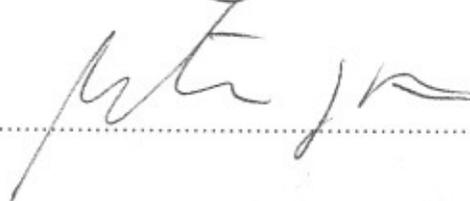
Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior



Prof. Dr. Iran Malavazi



Prof. Dr. Milton Cezar Ribeiro



A mis papas,
por el amor, apoyo y confianza incondicionales.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr. pela orientação, oportunidade, confiança e todo o conhecimento compartilhado durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha família por sempre acreditar nos meus sonhos. A meus pais pela confiança, por ajudar-me a realizar meus sonhos e ser suporte em todos os momentos da minha vida. A meu irmão por ter me acompanhado sempre.

A Eliana, Danielly e Carolina pela paciência, por ser confidentes, em fim por ser mais que amigas. A todas as novas amigas que muitas vezes sem saber fizeram a diferença. A meus amigos estrangeiros, porque compartilhar a mesma situação termina fortalecendo a amizade e a aqueles amigos que mesmo a distância escutaram pacientemente cada história e alegraram cada dia com um sorriso.

A Camila Silveira de Paula, não só pelas coletas, mas também, pelas grandes conversas que formaram nossa amizade e a sua família por todos os momentos agradáveis.

Ao SIDERTEC pelo apoio brindado para começar o desenvolvimento do projeto.

Ao Giordano Ciocheti por toda a ajuda e contribuições durante o desenvolvimento do projeto.

Aos Professores Dr. Manoel Martins Dias Filho, Dr. Mercival Roberto Francisco, Dr. Marco Aurélio Ribeiro Mello e Dr. Milton Cezar Ribeiro por todas as sugestões e colaborações durante a elaboração do trabalho.

A todos os alunos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação, pelo ótimo convívio, conhecimento compartilhado, a diversão, a amizade e o companheirismo.

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante o mestrado.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização, o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

*"Quando tudo nos parece dar errado
acontecem coisas boas
que não teriam acontecido
se tudo tivesse dado certo".*

Renato Russo

Resumo

As estradas geram um grande impacto ecológico à fauna por criar barreiras que separam áreas originalmente contínuas da distribuição das espécies e por ocasionar atropelamentos. Após os atropelamentos, a identificação morfológica dos animais torna-se impossível pela perda de caracteres diagnósticos, sobretudo, nos vertebrados pequenos. A utilização de ferramentas moleculares para a identificação é uma alternativa que tem apresentado resultados bem sucedidos, principalmente quando se pretende conhecer a espécie. Neste contexto, o presente trabalho identificou as amostras de animais mortos por atropelamentos, coletados na estrada Guilherme Scatena, mediante o uso de marcadores de DNA *barcode*, contribuindo assim para o conhecimento da biodiversidade local. Também foi objetivo do mesmo conhecer os locais de maior incidência de atropelamentos e o tipo de coberturas da paisagem desses.

Durante 20 semanas de coleta foram encontrados 123 vertebrados: seis mamíferos (5% do total); 30 aves (24%); 38 anfíbios (30%) e 49 répteis (40%), para uma média de atropelamentos de 0,051 animais/Km. Por meio de características morfológicas e moleculares (genes mitocondriais *cox1* e *16S*) foi possível identificar o status de espécie de 111 amostras do total coletado. As análises realizadas entre classes taxonômicas mostraram diferenças significativas, corroborando que os efeitos das estradas sobre a biodiversidade são táxon-específico. Foram encontrados 19 tipos diferentes de cobertura da paisagem em torno da estrada, sendo mais comuns as construções rurais e as pastagens, evidenciando a forte pressão antrópica sobre os ambientes naturais desta região. Os resultados mostrados neste trabalho pretendem ser uma base importante para o planejamento de ações futuras que prevejam o melhor manejo desta região rica em biodiversidade endêmica do cerrado brasileiro, assim como medidas mitigatórias para diminuir o impacto da estrada.

Abstract

Roads generate a large ecological impact to wildlife by raising barriers among ranges of species originally continuous and for causing road-kills. After road-killing, a morphological identification becomes impossible for the loss of diagnostic features, especially in the case of small vertebrates. Use of molecular tools for identification is an alternative that has shown successful results, especially when looking towards the species level. We identified samples from animals road-killed, collected on Guilherme Scatena road, through the use of DNA barcode markers, contributing to the local biodiversity knowledge. Another objective was to know the places that have a higher incidence of road kill and the type of landscape coverage in them.

During 20 weeks we collected 123 vertebrates: six mammals (5% of total), 30 birds (24%), 38 amphibians (30%) and 49 reptiles (40%), which meant an average of 0.051 animals/Km road-killed. Through morphological characteristics and molecular (mitochondrial genes *cox1* and *16S*) we identified 111 samples until species status. Analyses among taxonomic classes showed significant differences, confirming that the effects of roads on biodiversity are taxon-specific. We found 19 different types of landscape around the road, being the most common farm buildings and pasture, showing the strong anthropic pressure on environments of this region. The results shown in this study are intended to be an important basis for planning future actions that provide the best management of this area rich in endemic biodiversity of the Brazilian *cerrado*, as well as mitigation measures to lessen the impact caused by the road.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Visualização em Gel de agarose 0,8% do DNA total extraído das amostras coletadas mostrando a qualidade da molécula para cada amostra. _____ 23
- Figura 2** Gel de agarose 1% mostrando a amplificação sucedida para alguns indivíduos da região de 670 pb do gene mitocondrial *cox1*. _____ 24
- Figura 3** Arquivos de saída da base de dados da Barcode of Life Data Systems (BOLD) para o indivíduo 031, sucesso na identificação da amostra como representante da espécie *Coryspingus cucullatus* (Statius Müller, 1776). _____ 25
- Figura 4** Arquivos de saída da base de dados do GenBank para o indivíduo 119, sucesso na identificação da amostra como representante da espécie *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925). _____ 27
- Figura 5.** Indivíduos identificados até o status taxonômico de espécie, por classe, baseado nos caracteres diagnósticos utilizados. _____ 30
- Figura 6** Fotografia da estrada municipal Guilherme Scatena feita durante os primeiros meses de coleta. _ 35
- Figura 7** Representação gráfica das porcentagens de atropelamentos por classes para o total de indivíduos coletados. _____ 36
- Figura 8** Localidade de estudo no mapa do Brasil e pontos de coleta na estrada municipal Guilherme Scatena, gerado com o programa de sistema de informação geográfica ArcGIS 9.2-10 sobre uma imagem de satélite obtida pelo QuickBird (Digitalglobe 2007) e no google earth (earth.google.com). _____ 38
- Figura 9.** Análises de K de Ripley para os dados de atropelamento na Estrada Guilherme Scatena. _____ 39
- Figura 10.** Quilômetros com maior influência de atropelamentos na estrada Guilherme Scatena. _____ 39
- Figura 11** Tipos de cobertura da paisagem definidas ao redor dos pontos de coleta na Estrada Municipal Guilherme Scatena, gerado com o programa de sistema de informação geográfica ArcGIS 9.2-10. _____ 41
- Figura 12** Pontos de coleta na Estrada Municipal Guilherme Scatena para anfíbios, gerado com o programa de sistema de informação geográfica ArcGIS 9.2-10. _____ 43
- Figura 13** Pontos de coleta na Estrada Municipal Guilherme Scatena para répteis, gerado com o programa de sistema de informação geográfica ArcGIS 9.2-10. _____ 44

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> Quantidade de identificações taxonômica para cada classe do total de indivíduos coletados _____	27
<i>Tabela 2.</i> Sucesso diferenciado na identificação molecular para cada gene _____	28
<i>Tabela 3</i> Identificação taxonômica, para cada uma das amostras coletadas e classificação em grupos funcionais _____	31
<i>Tabela 4</i> teste de Qui-quadrado para avaliar significância nas diferenças encontradas nos valores de atropelamentos em cada uma das categorias preestabelecidas _____	40
<i>Tabela 5</i> Área em hectares de cada tipo de cobertura da paisagem existente ao redor da Estrada Municipal Guilherme Scatena. _____	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	<i>Ecologia de Estrada e da Paisagem</i>	10
1.2	<i>Caracterização da área de estudo</i>	12
1.3	<i>Caracterização molecular das espécies</i>	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	<i>Objetivo Geral</i>	16
2.2	<i>Objetivos Específicos</i>	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	<i>Obtenção das amostras</i>	17
3.2	<i>Amplificação e sequenciamento dos genes <i>cox1</i> e <i>16S</i></i>	18
3.3	<i>Análises dos dados</i>	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1	<i>Identificação das espécies</i>	22
4.1.1	<i>Gene <i>cox1</i></i>	23
4.1.2	<i>Gene <i>16S</i></i>	25
4.2	<i>Taxas de atropelamentos.</i>	35
4.3.	<i>Distribuição espacial dos indivíduos</i>	38
5	CONCLUSÕES	45
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

Estradas e rodovias levam à interrupção da dispersão de animais e plantas, quebrando a conectividade e promovendo a queda da qualidade dos habitats pela fragmentação. Para manter essa qualidade é necessário reduzir os impactos produzidos pelas construções, porém para mitigar o efeito de barreira produzido pelas obras é fundamental avaliar o impacto causado e conhecer as espécies que estão sendo mais afetadas.

1.1 Ecologia de Estrada e da Paisagem

A fragmentação de habitats, devido à interferência humana em diferentes biomas, tem se tornado uma preocupação inerente à conservação de ecossistemas e sua biodiversidade. O tamanho reduzido apresentado pelas áreas remanescentes após a fragmentação pode mudar a qualidade da paisagem e fazer com que as espécies ali presentes sofram de maneira mais evidente o impacto das intervenções antrópicas (Mac Arthur & Wilson 1963).

A perturbação na mobilidade dos animais entre os fragmentos interfere nas migrações entre as populações e, conseqüentemente, na sua estrutura e viabilidade (Forman & Alexander 1998, Clark *et al.* 2010) por quebra tanto de conectividade estrutural, como por quebra na conectividade funcional; considerando como características estruturais a composição e configuração espacial da paisagem e como características funcionais as relações entre os distintos processos físicos, biológicos e ecológicos (Forman 1995, Margalef 1997).

O isolamento gerado pela fragmentação geralmente promove uma redução na diversidade genética das populações, interferindo na plasticidade adaptativa das espécies frente às possíveis alterações ambientais que se dão ao longo do tempo (Frankham *et al.* 2008). As variações locais e globais geradas pelas intervenções podem influenciar em processos evolutivos e as respostas a estas mudanças requerem alta variação genética

para garantir o sucesso reprodutivo e a manutenção de uma espécie (Sork & Smouse 2006).

Os níveis altos de variação genética são mantidos com um fluxo de indivíduos constante entre as populações. Entretanto, a construção, presença de estradas e falta de corredores ecológicos nos ambientes naturais interrompe este fluxo, fazendo com que os padrões espaciais das espécies sejam definidos pela remoção de habitats e subdivisão de áreas contínuas (Miller *et al.* 1996, Forman & Deblinger 2000). Além do mais, o impacto é maior considerando que as estradas incentivam a construção de moradias (Hawbaker *et al.* 2006) que, por sua vez, incentivam a construção de novas estradas, tornando-se um círculo vicioso. É importante destacar ainda que as respostas das espécies às mudanças levam tempo, o que aumenta o conflito devido à alta velocidade na qual as alterações ocorrem no ambiente pelas construções.

O fluxo de indivíduos entre as populações não é constante para todas as espécies existentes no fragmento, Hawbaker *et al.* (2006) demonstraram que algumas espécies evitam cruzar as estradas, enquanto outras atravessam. No entanto, os indivíduos que se arriscam a cruzar as estradas acabam gerando um sério problema pelos altos índices de atropelamentos ao longo das vias (Forman & Alexander 1998). Estes indivíduos, em geral, são adultos em idade reprodutiva e sua mortalidade contribui para a rápida diminuição dos tamanhos populacionais de cada uma das espécies encontradas nestes fragmentos (Ashley & Robinson 1996).

Os atropelamentos de fauna são a causa direta mais evidente de mortalidade de vertebrados silvestres da fragmentação por estradas (Forman & Alexander 1998). As taxas anuais de atropelamentos estimados por Forman (1995) e Van der Zande *et al.* (1980) são preocupantes: 159 mil mamíferos e 653 mil pássaros na Holanda; sete milhões de pássaros na Bulgária; cinco milhões de sapos e répteis na Austrália e um milhão de vertebrados nos Estados Unidos.

No Brasil, os registros de atropelamentos para as espécies de vertebrados além de serem escassos, não apresentam estatísticas sobre taxas de atropelamentos dentro do subfilo nem para suas diversas classes. A situação torna-se mais preocupante ao

considerar os quilômetros de estrada construídos no Brasil quando comparados com os quilômetros de estradas nos países nomeados anteriormente.

Um bioma que apresenta um alto grau de fragmentação pela construção de estradas é o Cerrado. Os fragmentos remanescentes apresentam-se como “ilhas” que muitas vezes, estão circundadas por pastos ou grandes monoculturas, principalmente de grãos (sobretudo soja), cana-de-açúcar ou árvores exóticas fornecedoras de madeira e celulose. Mesmo com a criação de áreas “protegidas” ou Unidades de Conservação, a biodiversidade local destes fragmentos ainda sofre as pressões do entorno advindas da fragmentação e do isolamento dos habitats e da constante interferência das atividades humanas (Pivello 2005).

1.2 Caracterização da área de estudo

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul e um dos mais ameaçados do continente. Nesta região, as savanas dominam a paisagem, e a floresta está apenas próxima aos rios ou isoladas em pequenos fragmentos (Cardoso & Bates 2002).

Nos últimos 35 anos, mais da metade da área do Cerrado, dois milhões de km², tem sido transformada em áreas para pastagem, agricultura e outros usos (Machado *et al.* 2004, Klink & Machado 2005) e as áreas remanescentes permanecem sob a forma de numerosos fragmentos, geralmente com menos de 100 ha cada.

Segundo Myers *et al.* (2000) o Cerrado apresenta grande diversidade e riqueza de espécies, possuindo cerca de 10 mil espécies de plantas, sendo quatro mil delas endêmicas, e 1268 espécies de vertebrados, com 117 endêmicas, que representam 35% do endemismo global. Dentre os vertebrados, estima-se que o Cerrado abrigue cerca de 840 espécies de aves, 160 de mamíferos, 120 espécies de répteis e 150 espécies de anfíbios.

Apesar da grande importância deste ecossistema, a maioria das áreas destinadas à sua conservação restringe-se a pequenos fragmentos, que somam cerca de 33.000 km², área claramente insuficiente quando comparada com os dois milhões de quilômetros originais do Cerrado (Klink & Machado 2005). Esses fragmentos localizam-se em meio à

ocupação urbano-rural, estando sob impacto direto decorrente das atividades agroindustriais, construção de cidades e estradas, entre outras.

Na região que compreende o campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e a Represa 29, existem pequenos fragmentos de cerrado, recortados pela estrada municipal Guilherme Scatena. A paisagem está caracterizada por fragmentos de floresta, cultivos de cana e soja e grandes extensões de pastagem para gado. As áreas de mata ciliar nem sempre são respeitadas dificultando ainda mais o cuidado dos fragmentos e a biodiversidade que eles albergam.

Os pequenos fragmentos localizados em ambos os lados da estrada albergam uma ampla variedade de animais silvestres, que algumas vezes, morrem atropelados ao tentar atravessar a estrada. A identificação morfológica dos animais atropelados torna-se difícil devido a perda de alguns ou todos seus caracteres diagnósticos. Uma solução eficiente e precisa na identificação de espécies é o uso de marcadores genéticos, pois esses podem ser mais objetivos.

1.3 Caracterização molecular das espécies

A identificação baseada em caracteres moleculares vem se mostrando uma alternativa exitosa na identificação precisa de indivíduos, uma vez que as técnicas que utilizam marcadores genéticos excluem a necessidade de diferentes especialistas, anos de prática para a identificação taxonômica confiável das espécies e, além disso, podem ser feitas a partir de pequenos fragmentos de tecido.

O argumento anterior não pretende propor a biologia molecular como ferramenta única na identificação de indivíduos, pelo contrário, o enfoque que se procura é aquele utilizado por vários autores em estudos recentes (DeSalle *et al.* 2005, Hebert & Gregory 2005, Miotto *et al.* 2007), no qual espera-se utilizar marcadores genéticos como apoio nas pesquisas para conseguir dados muito mais confiáveis.

Dentro dessa abordagem, uma metodologia destacada na biologia molecular para identificação de indivíduos de maneira rápida e precisa é a do DNA *barcode*. Esta técnica

consiste na análise de um fragmento específico de DNA que fornece informações de pequenas variações em uma sequência genética conservada, de maneira que é possível identificar com precisão o status taxonômico de um indivíduo baseando-se em marcas internas de cada espécie (Hebert & Gregory 2005). É conhecido como DNA *barcode* porque faz uma analogia aos códigos de barras utilizados para reconhecer os produtos oferecidos nos mercados.

O DNA *barcode* tem se mostrado como uma ferramenta efetiva para o monitoramento de caça furtiva e comércio ilegal de espécies ameaçadas, especialmente quando se trabalha com produtos biológicos semiprocessados ou morfologicamente indistinguíveis (Eaton *et al.* 2010), é igualmente eficiente nas análises de dietas de animais herbívoros (Bradley *et al.* 2007, Kim *et al.* 2011), carnívoros (Symondson 2002, Jarman *et al.* 2004, Pons 2006) e inclusive para identificar as espécies que faziam parte da dieta de animais extintos (Poinar *et al.* 1998, Hofreiter *et al.* 2000).

Para conseguir identificações de indivíduos através de DNA *barcode* o gene utilizado deve apresentar monofilia recíproca num grande número de espécies (Avise 2000, Hickerson *et al.* 2006, Baker *et al.* 2009) e deve apresentar suficientes regiões conservadas de flaqueamento permitindo o desenho de *primers* universais (Ficetola *et al.* 2010).

Os genes utilizados preferencialmente em animais para estas análises são os mitocondriais, devido a sua eficiência para limitar grupos taxonômicos, uma vez que o DNA mitocondrial (mtDNA) sofre pouca influência da recombinação gênica, geralmente apresenta modo de herança materna (Hwang & Kim 1999) e maiores taxas de substituição nucleotídica comparadas com as de genes nucleares (Brown *et al.* 1979, Moore 1995, Mindell *et al.* 1997). Estas vantagens resultam em acúmulo de diferenças entre espécies (Hayasaka *et al.* 1988) revelando sua eficácia para resolver relações dentro e entre as espécies (Folmer *et al.* 1994, Avise & Walker 1999, Hebert *et al.* 2003a, b).

O gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (cox1) foi preferencialmente escolhido para estabelecer códigos de barras genéticos das espécies (Folmer *et al.* 1994). Os 670 pb (pares de bases) da porção inicial deste gene parecem possuir maior variedade

de sinais filogenéticos em relação a outros genes mitocondriais. O gene mostrou sucesso descrevendo novas espécies (Hebert *et al.* 2004b), revelando espécies crípticas (Hebert *et al.* 2004a, Smith *et al.* 2008), relacionando morfotipos juvenis com adultos (Stoeckle 2003) e identificando espécies de diferentes grupos taxonômicos, incluindo grupos de insetos (Folmer *et al.* 1994, Hebert *et al.* 2003a), peixes (Ardura *et al.* 2010), répteis (Naro-Maciel *et al.* 2010), aves (Hebert *et al.* 2004a) e mamíferos (Clare *et al.* 2007).

Em contrapartida, tem sido discutido que não existe um único gene universal para *barcode* que seja conservado para todos os domínios da vida e apresente suficiente divergência para a discriminação de espécies (Stoeckle 2003). Dessa maneira, diferentes marcadores são sugeridos para ministrar informação adicional, levando à individualização das amostras e permitindo estabelecer com maior certeza o *status* taxonômico de todos os indivíduos (Stoeckle 2003). Outro gene que tem sido utilizado com sucesso em *barcode* genético de vertebrados é o 16S descrito por Palumbi *et al.* (1991), o qual é sugerido como *locus* alternativo em vertebrados (Vences *et al.* 2005a, b) e proposto como suporte ao gene *cox1* em identificações moleculares (Smith *et al.* 2008).

Embora alguns estudos argumentassem que o gene 16S apresenta uma taxa de evolução molecular muito baixa, e não mantém suficiente variação para a correta identificação das espécies (Hebert *et al.* 2003a) Ficetola *et al.* (2010) sugerem que, ao menos em vertebrados, o 16S apresenta a mesma capacidade de resolução que o *cox1*. Ficetola e colaboradores (2010) testaram diferentes fragmentos de genes mitocondriais para mostrar sua efetividade como DNA *barcode*, eles encontraram que os *primers* que apresentaram os percentuais mais altos de espécies amplificadas foram o COI-2 o 16Sr e 16Sr2 com valores de 95, 90 e 93%, respectivamente. Igualmente, eles discutiram que DNA *Barcode* com tamanhos entre 500 e 600pb, como os obtidos para os genes *cox1* e o 16S têm alta capacidade de resolução, e são candidatos “ideais”.

Pelas vantagens descritas anteriormente para genes mitocondriais, principalmente por permitir identificar indivíduos com pequenas amostras de tecido, em especial para o caso dos genes *cox1* e 16S, o DNA *barcode* torna-se uma ferramenta muito útil, eficiente e confiável para estudos em diferentes áreas onde o problema para a pesquisa é a correta

identificação das espécies. Além disso, as ferramentas moleculares podem ser aplicadas como uma alternativa para identificação de animais atropelados, principalmente de vertebrados pequenos, os quais após os atropelamentos perdem a maioria ou todos seus caracteres morfológicos diagnósticos.

Determinar o conflito que a estrada está causando na fauna de vertebrados local ajuda na mitigação dos impactos potenciais e, conseqüentemente, na conservação da biodiversidade. Um passo inicial para estimar este impacto é a identificação das espécies que estão sendo atropeladas. A avaliação da distribuição espacial dos atropelamentos pode fornecer informações importantes acerca dos locais de maior impacto e os táxons mais afetados permitindo o desenho de planos de manejo com adoção de medidas que visem à conservação das áreas evitando assim a perda de biodiversidade conhecida e inclusive a desconhecida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto potencial de uma rodovia (estrada municipal Guilherme Scatena) atravessando uma área de vegetação no município de São Carlos (SP, Brasil) sobre os vertebrados da região, utilizando identificação molecular (DNA *barcode*) das espécies atropeladas.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar taxonomicamente as amostras de vertebrados atropelados coletados na estrada Guilherme Scatena pela morfologia e/ou por análises moleculares de fragmentos dos genes mitocondriais citocromo c oxidase I (*cox1*) e 16S.
- Contribuir para a construção da base de dados mundial de DNA *barcode*, através do estabelecimento e depósito de sequências, para novos códigos de barra, das espécies aqui estudadas.
- Estabelecer a relação entre a classe taxonômica e o número de atropelamentos.

- Avaliar a existência da relação entre a frequência de atropelamentos em um local e o tipo de cobertura do mesmo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

As coletas das amostras foram feitas na estrada vicinal Guilherme Scatena, que segue desde a portaria principal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) até a Represa 29 (São Carlos, São Paulo, Brasil). A estrada é simples e possui 12 km de extensão, o limite de velocidade permitido é de 80 km/h. Sua pavimentação foi aprovada pelo Conselho Municipal do Meio Ambiente de São Carlos (Comdema) em 2007, e o projeto incluiu a construção de quatro túneis para a passagem de animais embaixo da pista, sendo dois deles construídos em locais em que a estrada corta corredores ecológicos de mata nativa (Prefeitura de São Carlos 2007).

No decorrer de 20 semanas (10 compreendidas entre 12 de abril e 18 de junho de 2010, 8 semanas entre 13 de outubro e três de dezembro de 2010 e duas últimas, 31 de janeiro a quatro de fevereiro de 2011) foram percorridos diariamente em moto, com uma velocidade máxima de 20 km/h, os 12 Km da estrada (24 Km totais, percurso de ida e volta). O percurso foi feito duas vezes ao dia, uma durante o período da manhã, entre 08h e 10h e outra no período da tarde, entre 16h e 18h.

Foram coletadas amostras de tecido de todos os vertebrados encontrados mortos na estrada por atropelamentos. As amostras foram acondicionadas em microtubos, contendo álcool etílico absoluto e posteriormente armazenadas a -20°C no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação, do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar.

Para um registro uniforme das coletas, as amostras foram individualizadas com números consecutivos e também foram salvas informações adicionais como fotografias, data, hora, local exato da coleta (mediante o uso de GPS, Sistema de Posicionamento

Global), além da determinação taxonômica, com caracteres morfológicos, até onde foi possível.

Os indivíduos encontrados completos e em estado conservado foram levados para o Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva para realizar a identificação morfológica detalhada e depositá-los na coleção biológica da UFSCar. Esta identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Manoel Martins Dias Filho.

3.2 Amplificação e sequenciamento dos genes *cox1* e *16S*

Para cada amostra de tecido coletada foi feita a extração do DNA total mediante o uso de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, seguindo a metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989) com alterações menores.

O DNA obtido nas extrações foi visualizado em gel de agarose a 0,8%, mantendo condições de corrida por 1 hora a 100 volts, para conferir a integridade da molécula. Além disso, cada extração foi quantificada mediante o uso do biofotômetro (*BioPhotometer*, Eppendorf®)

Embora muitos autores sugiram o desenho de *primers* espécie-específicos para evitar a amplificação de cópias de genes mitocondriais nos genes nucleares, que não codificam proteínas (nuclear mitochondrial pseudogenes, *Numts*) e maior confiabilidade nas amplificações, neste estudo foram utilizados *primers* universais descritos previamente na literatura pelo fato de que as amostras obtidas são pertencentes a mais de uma classe taxonômica (anfíbios, répteis, aves e mamíferos).

Para a amplificação do fragmento do gene mitocondrial *cox1* foram utilizados o par de *primers* universais LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'), descritos por Folmer *et al.* (1994) inicialmente para invertebrados. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi conduzida em um termociclador *Applied Biosystem* programado para: um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 4 minutos; cinco ciclos inespecíficos de 94°C (1min), 47°C (1 min e 30 seg), 72°C(1 min); 40 ciclos específicos de 94°C (1min), 50°C (1 min e 30 seg), 72°C(1 min); e uma extensão final de 5 min a 72°C.

Seguindo o protocolo descrito por Folmer *et al.* (1994), cada PCR foi feita para um volume final de 25 µl, contendo 50 ng de DNA, onde o mix para a reação continha tampão tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2,0 mM de MgCl₂ (50 mM), 0,3 µM de cada *primer*, 0,25 mM de dNTPs e 0,5 unidade de *Taq* DNA Polimerase Platinum (Invitrogen). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Uniscience) e visualizados em transiluminador de luz UV para conferir a amplificação do fragmento.

Os produtos obtidos na PCR foram purificados mediante a aplicação de polietileno glicol (PEG) seguindo o protocolo proposto por Lis & Schleif (1975), pois este permite a purificação de fragmentos com tamanhos superiores a 240pb de maneira rápida, econômica e eficiente. Posteriormente, eles foram submetidos à reação de sequenciamento direto pelo método Sanger na empresa MACROGEN Inc. Seul, Coréia do Sul (<http://www.macrogen.com>).

As sequências recebidas foram editadas no programa BioEdit (Hall 2004) e comparadas com dados submetidos nas bases de dados do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) através do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.* 1990) e com a do *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) (Ratnasingham & Hebert 2007).

Para a confirmação de que o fragmento amplificado pelos *primers* utilizados realmente pertence ao gene mitocondrial *cox1* e não são oriundas de amplificações de *Numts*, as sequências obtidas foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW (Thompson *et al.* 1994) incluso no programa BioEdit (Hall 2004) comparando-as com sequências das bases de dados.

Para a identificação das amostras com *cox1*, foi procurada nas comparações a espécie com que a sequência consultada compartilhasse um valor de similaridade maior, de modo a estabelecer a espécie mais provável à qual o indivíduo pertence. Para evitar falsas identificações foi conferida a ocorrência no lugar de estudo de cada uma das espécies prováveis, utilizando as listas das espécies reportadas para o Brasil (Souza 1998, Sawaya *et al.* 2008, SBH 2010, Dos Reis *et al.* 2011).

Um fragmento de aproximadamente 550 pb do gene mitocondrial 16S foi amplificado, utilizando-se os *primers* 16SarL (5'-CGCCTGTTTACCAAAAACAT-3') e 16SbrH (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') descritos por Palumbi e colaboradores (1991). Trata-se de *primers* conservados para várias espécies de vertebrados, testados inicialmente para *barcode* em anfíbios.

Para as reações de amplificação foram usados os mesmos volumes de reação que no gene anterior. O ciclo das PCRs utilizado iniciou com uma etapa de desnaturação a 94°C por 5 min, seguido de uma etapa de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 57°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, sendo finalizado com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Uniscience) e visualizados em transluminador de luz UV.

Assim como o gene *cox1*, os amplificados do gene 16S foram purificados segundo o protocolo de Lis & Schleif (1975) e submetidos para sequenciamento pelo método Sanger na empresa MACROGEN Inc. Seul, Coréia do Sul (<http://www.macrogen.com>).

Após a edição das sequências, no programa BioEdit (Hall 2004), e dos alinhamentos, as sequências obtidas foram comparadas somente com aquelas depositadas na base de dados do NCBI devido a não existência de base de dados específica para o gene 16S.

Para estabelecer a espécie mais provável à qual o indivíduo pertencia, novamente foi aceita aquela que apresentava os maiores valores de similaridade, além de considerar os resultados obtidos com antecedência para o gene *cox1*. Para os indivíduos que não se tinha informação prévia para o gene *cox1*, foi analisado o local de ocorrência das prováveis espécies e foi feita a comparação destas com o registro fotográfico das coletas.

3.3 Análises dos dados

Primeiramente foi realizada uma prova de Qui-quadrado (X^2) para verificar se as diferenças entre o número de atropelamentos achados durante a temporada seca e chuvosa eram significativas.

Com o objetivo de estimar a possível associação entre a cobertura da paisagem ao redor das estradas e o local de atropelamento, primeiramente foram feitas análises de Qui-quadrado (X^2) para determinar a existência de diferenças significativas entre os resultados encontrados e os esperados para as categorias pré-estabelecidas. Os indivíduos foram classificados em grupos taxonômicos por classe, obtendo representantes para quatro categorias: anfíbios, répteis, aves e mamíferos. O teste realizado para estas quatro categorias teve como hipótese nula que a frequência de atropelamentos para cada classe é igual, uma vez que a técnica utilizada para a coleta dos indivíduos (atropelamentos) não foi dirigida para uma classe determinada.

Dentro da classe das aves foram feitas duas análises independentes para estimar se as diferenças no número de animais mortos são significativas. Para a primeira delas, foram determinados dois grupos funcionais separando capacidade de deslocamento em duas categorias, alta e baixa. Foram consideradas com baixa capacidade de deslocamento aquelas aves que apresentam uma área de vida menor que 500 m e com alta capacidade as quais tem uma área de vida maior. Na segunda análise para aves, foi realizada a subdivisão em dois grupos baseados no comportamento (aterrissar ou não aterrissar no solo).

Uma última análise de X^2 foi feita dentro da classe dos répteis para testar a hipótese nula de que a frequência dos atropelamentos era igual para cada subordem encontrada (serpentes, lagartos e anfisbena) devido a que cada um deles apresenta um tipo de locomoção diferente levando a diferentes capacidades de deslocamento.

Para determinar possíveis associações entre o tipo de cobertura e o local dos atropelamentos foram feitas análises de padrões espaciais utilizando os pontos com coordenadas UTM (Universal Transverse Mecator) adquiridos no GPS. As coordenadas foram sobrepostas no programa ArcGis 9.2-10 (ESRI 2011) em uma imagem obtida pelo satélite QuickBird (Digitalglobe 2007), cedida pelo Prof. Dr. Marco Aurélio Ribeiro Mello, e imagens conseguidas no *Google Earth* (earth.google.com).

Para determinar quais trechos da rodovia apresentam uma maior mortalidade por atropelamentos foi utilizado o programa *Spatial Evaluation of Road Morality Software*,

Siriema 1.1 (Coelho *et al.* 2011), para o qual foi desenhado o traçado da rodovia Guilherme Scatena com coordenadas obtidas no *Google Earth* sobre o qual os dados dos atropelamentos, transformados em UTM, foram sobrepostos. Antes de calcular os quilômetros com maior incidência, foi feita uma análise estatística K de Ripley, para avaliar a não-aleatoriedade da distribuição espacial de eventos para finalmente calcular os quilômetros com maior número de atropelamentos.

Finalmente, no mapa, foram desenhados polígonos delimitando os diferentes tipos de cobertura da paisagem observados. Foram calculadas as áreas em hectares que cada uma delas ocupa e foi analisado o número de atropelamentos observados em cada tipo de paisagem, incluído análises por classe.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as 20 semanas de coleta foram encontrados mortos por atropelamentos um total de 123 vertebrados na estrada municipal Guilherme Scatena.

Para estabelecer o *status* taxonômico dos indivíduos coletados, inicialmente foi feita a identificação baseada somente no uso de características morfológicas, permitindo a identificação de 28 animais até o nível de espécie, mostrando a dificuldade existente neste tipo de identificação para animais mortos por atropelamentos.

4.1 Identificação das espécies

A extração do DNA total de todas as amostras coletadas foi satisfatória, entretanto algumas amostras apresentaram uma baixa qualidade do DNA extraído (Figura 1), devido à exposição do material biológico às ações do clima e aos repetidos atropelamentos apesar dos curtos intervalos entre as coletas.

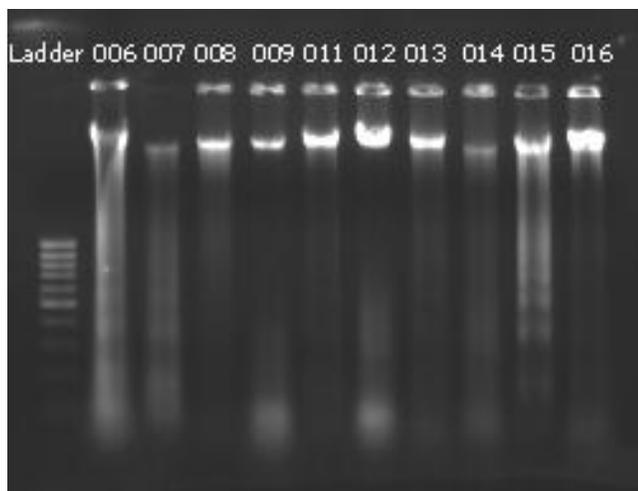


Figura 1 Visualização em Gel de agarose 0,8% do DNA total extraído das amostras coletadas mostrando a qualidade da molécula para cada amostra.

Com o auxílio de caracteres moleculares dos genes mitocondriais *cox 1* e *16S* o número de identificações aumentou consideravelmente devido a que foi possível a identificação da espécie de 96 indivíduos com esses genes. Passando assim, de 28 animais para a identificação até espécie com características genéticas e morfológicas de 111 indivíduos dos 123 coletados.

4.1.1 Gene *cox1*

Mediante o uso dos *primers* universais para *cox1* foram amplificados fragmentos que apresentaram um tamanho médio de 670 pb, entretanto foram utilizadas 650 pb para as análises devido à baixa qualidade na sinal das sequências nas primeiras e últimas bases.

Ao contrário do observado por Ficetola *et al.* (2010), que reportaram que os *primers* universais para *cox1* utilizados neste trabalho, apresentaram uma cobertura baixa e muitas hibridizações aleatórias, em nosso estudo estes funcionaram com sucesso, levando a amplificação satisfatória 96 amostras (Fig. 2). Para evitar falsas identificações com o gene *cox1*, foi utilizada preferencialmente a informação obtida da base de dados da BOLD porque esta apresenta curadoria (Ratnasingham & Hebert 2007).

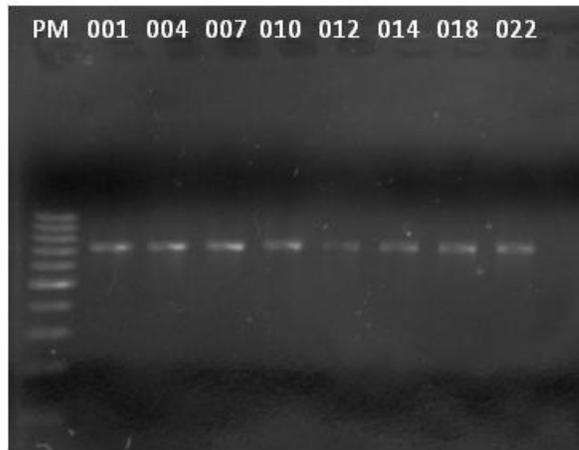


Figura 2 Gel de agarose 1% mostrando a amplificação sucedida para alguns indivíduos da região de 670 pb do gene mitocondrial *cox1*.

Com o intuito de obter maior confiabilidade nos resultados, a identificação taxonômica dos indivíduos foi feita de maneira independente em cada uma das bases de dados (GenBank e BOLD). Foram considerados como pertencentes a uma espécie aqueles indivíduos que apresentaram valores de similaridade acima de 97% e mostraram concordância entre a foto da espécie e o registro fotográfico elaborado durante a coleta. A porcentagem anterior pode ser considerada alta, mas foi utilizada pelo uso de *primers* universais nas amplificações e devido a que a porcentagem de similaridade considerada foi o mesmo para todos os indivíduos sem sopesar a classe à qual a amostra pertencia.

Para cada indivíduo que apresentou valores de similaridade altos foi elaborada uma árvore de identificação taxonômica no site da BOLD pelo método Kimura de dois parâmetros e foram analisados os locais de ocorrência dos indivíduos da espécie à qual ele concordava (Fig. 3), alcançando com o uso do gene *cox1* a identificação até espécie de 67 indivíduos.

BOLD SYSTEMS v2.5 Taxonomy Browser

Home | Taxonomy Browser | Request an Account | Identify Specimen | FAQs | Documentation

Coryphospingus cucullatus {species} - Chordata; Aves; Passeriformes; Emberizidae; Coryphospingus;

BOLD Stats

Specimen Records:	35
Specimens with Sequences:	27
Specimens with Barcodes:	26
Public Records:	8
Species:	1
Species With Barcodes:	1

Species List - Progress Download Public Sequences

Sample Sources

TOP 20 Matches:

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Specimen Similarity (%)
Chordata	Aves	Passeriformes	Emberizidae	Coryphospingus	cucullatus	99.39
Chordata	Aves	Passeriformes	Emberizidae	Coryphospingus	cucullatus	99.39
Chordata	Aves	Passeriformes	Emberizidae	Coryphospingus	cucullatus	99.39
Chordata	Aves	Passeriformes	Emberizidae	Coryphospingus	cucullatus	99.24
Chordata	Aves	Passeriformes	Emberizidae	Coryphospingus	cucullatus	99.24
Chordata	Aves	Passeriformes	Emberizidae	Coryphospingus	cucullatus	99.24

Collection Sites

Search Request: Type: COI SPECIES DATABASE

Search Result:

Identification Summary:

Taxonomic Level	Taxon Assignment	Probability of Placement (%)
phylum	Chordata	100
class	Aves	100
order	Passeriformes	100
family	Emberizidae	100
genus	Coryphospingus	100
species	Coryphospingus cucullatus	99.4

Distance Summary:

Ampliar (Ctrl+O)

COI_SPECIES_DATABASE_Tree Mon Jul 25 22:19:12 2011 Page 1 of 1

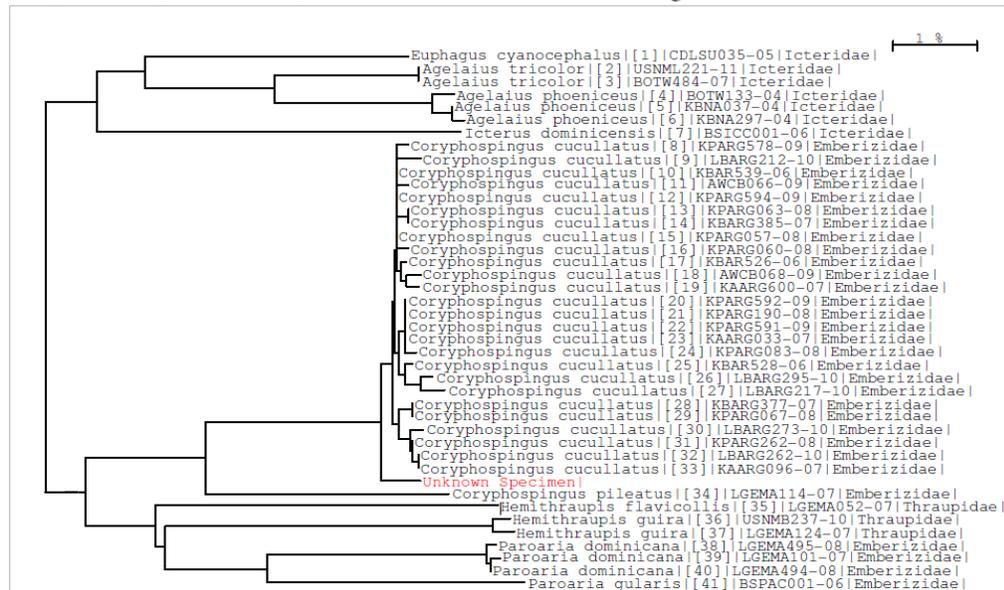


Figura 3 Arquivos de saída da base de dados da *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) para o indivíduo 031, sucesso na identificação da amostra como representante da espécie *Coryspingus cucullatus* (Stadius Müller, 1776).

4.1.2 Gene 16S

O tamanho dos produtos da PCR para o gene mitocondrial 16S apresentou uma média de 550 pb. Da mesma maneira que para o gene *cox1*, 10 bases à extremidade 5' e

10 bases à extremidade 3' foram descartadas para as análises, por apresentarem baixo sinal do sequenciamento.

O gene 16S apresentou maior sucesso na amplificação quando comparado com o gene *cox1*. Dos 123 indivíduos coletados, um total de 103 amostras foi amplificado com o uso de primers universais para este gene. Entretanto, com os fragmentos do gene 16S foi possível identificar até o nível de espécie menos indivíduos que com o gene *cox1*, conseguindo atribuição taxonômica para 62 indivíduos. Esta diferença no número de identificações, levando em conta o sucesso de amplificação para cada um dos genes, pode ser atribuída à falta de uma base de dados específica e a diferença no número de registros existentes para cada um dos genes.

Cabe destacar, que utilizando este gene foi possível a identificação de anfíbios e répteis que não tinham sido identificados utilizando o gene *cox1* ou por meio dos caracteres morfológicos. Vences *et al.* (2005a) demonstraram que as amplificações para anfíbios utilizando *primers* universais do gene 16S são mais confiáveis que aquelas feitas com *cox1*, contudo os dados obtidos para anfíbios no presente trabalho indicam alta confiabilidade para ambos genes. Esse fato pode ser explicado pelo incremento das pesquisas para identificações com *barcode* dos últimos anos e o consequente aumento nas informações depositadas nas bases de dados.

As sequências obtidas foram comparadas com a informação depositada na base de dados do GenBank considerando como pertencentes a uma espécie aqueles indivíduos que apresentaram valores de similaridade maiores ao 97% (Fig. 4) e aqueles que apresentavam concordância entre a foto da espécie e o registro fotográfico elaborado durante a coleta. As identificações feitas com o gene *cox1* foram reafirmadas com este gene para ter maior certeza para cada um dos indivíduos.

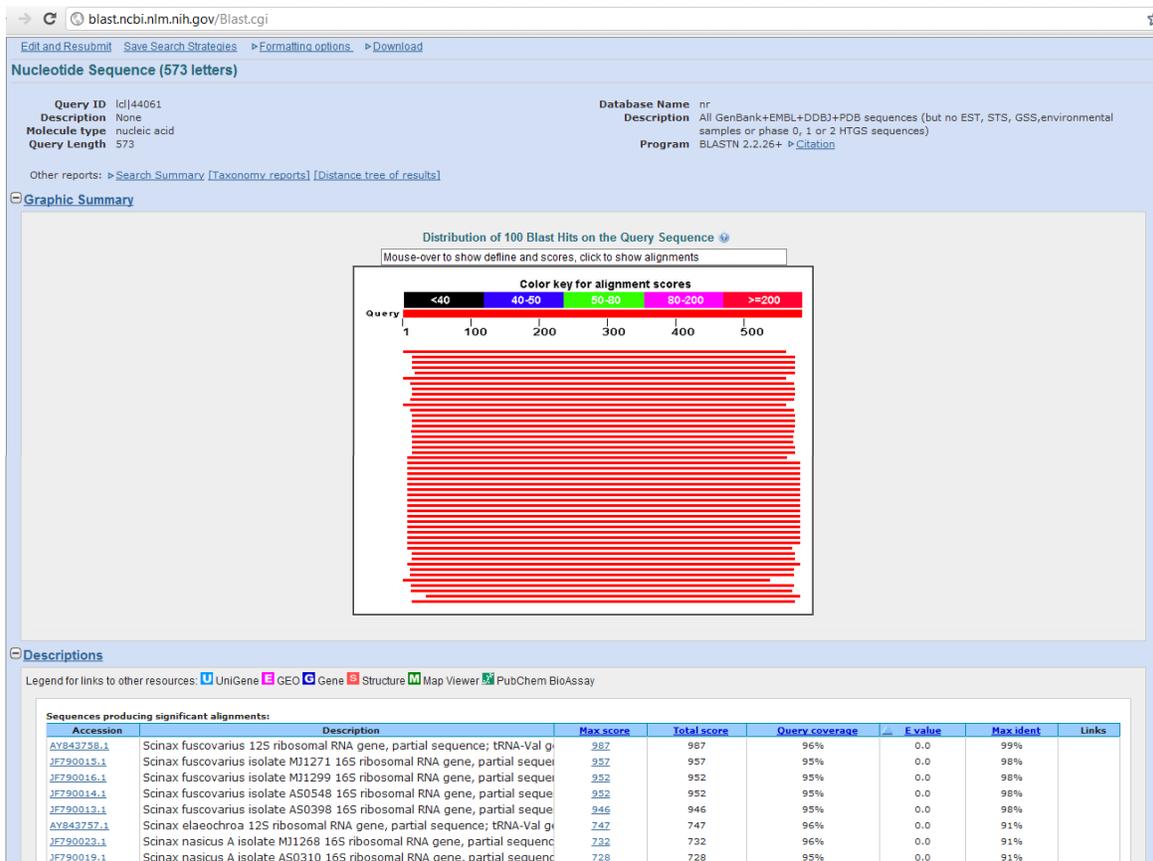


Figura 4 Arquivos de saída da base de dados do GenBank para o indivíduo 119, sucesso na identificação da amostra como representante da espécie *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925).

Totalizando as identificações feitas tanto com métodos morfológicos quanto com métodos moleculares, foram obtidos os valores de êxito apresentados na tabela 1 na identificação taxonômica dos indivíduos coletados.

Tabela 1. Quantidade de identificações taxonômicas para cada classe do total de indivíduos coletados.

	Espécie	Gênero	Família	Ordem	Total
Aves	29	1			30
Répteis	40		9		49
Anfíbios	37	1			38
Mamíferos	5			1	6
Total	111	2	9	1	123

Do total de indivíduos analisados, foi possível identificar até o *status* de espécie 111 amostras e, entre as restantes, duas foram levadas a gênero, nove à categoria de família e um indivíduo foi identificado somente até ordem. As diferenças encontradas no número de identificações para cada característica estão apresentadas na figura 5.

A identificação morfológica das aves e das cobras (répteis) foi muito mais fácil em relação aos outros grupos devido ao fato de apresentarem intacto um maior número de características. As aves geralmente morrem ao bater no para-brisa dos carros e caem no acostamento evitando assim ser atropeladas repetidas vezes. Ao passo que muitas das cobras, em função do formato do corpo, são pisadas pelos pneus em um local específico conservando características diagnósticas de outras partes do corpo.

Esse fato não só ajuda na identificação morfológica, mas também faz com que a amostra tomada para identificação molecular encontre-se em um estado mais conservado, permitindo uma melhor qualidade do DNA extraído e maior eficiência nas ampliações.

Pelo número de identificações para cada um dos genes é fácil deduzir que o sucesso para estabelecer espécie correta é diferenciado. O número de identificações para aves e para mamíferos com o gene *cox1* é maior ao comparar com as obtidas com o *16S*, entretanto, para o caso dos répteis acontece o contrário (Tabela 2). Esse fato é devido tanto ao sucesso nas ampliações, quanto ao número de registros nas bases de dados.

Tabela 2. Sucesso diferenciado na identificação molecular para cada gene.

	cox1	16S
Aves	++	+
Mamíferos	++	-
Répteis	-	++
Anfíbios	+	++

++ Muito sucesso, + sucesso, - dificuldade nas identificações.

No caso dos anfíbios, o número de identificações é aproximadamente a mesma para cada gene, porém a maioria dos indivíduos identificados com o gene *cox1* pertencem

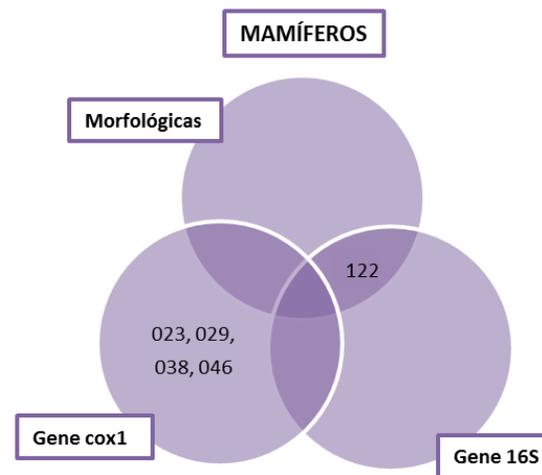
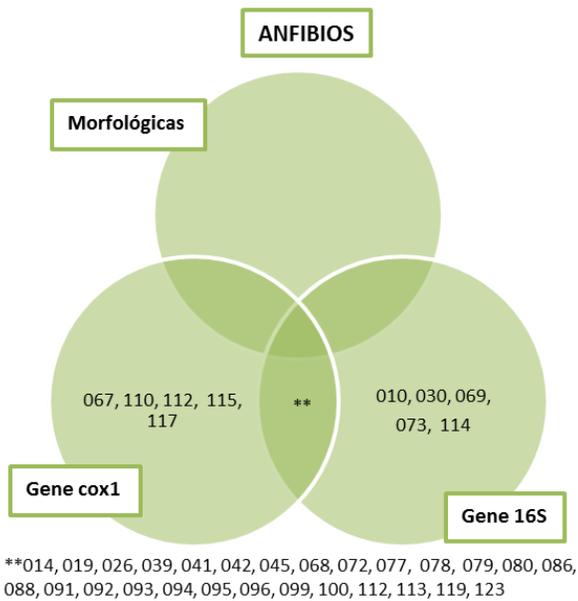
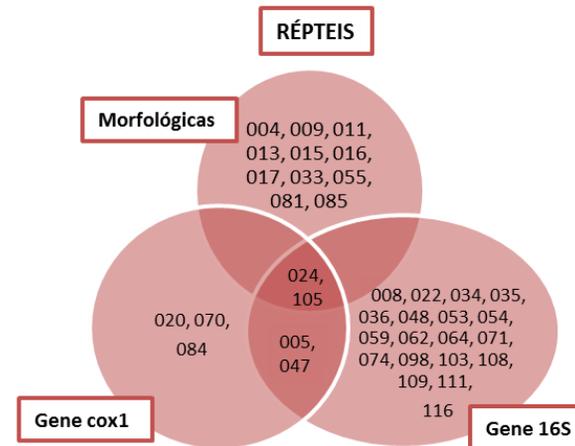
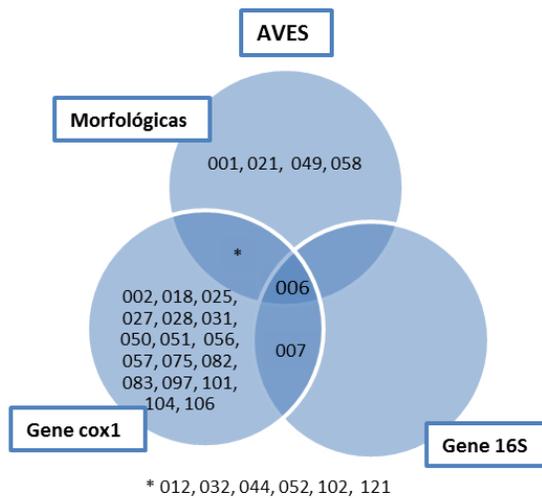
à mesma espécie (Fig. 5, Tabela 4), o que pode significar uma melhor resolução para gene 16S para esta classe.

Ao serem comparadas as sequências obtidas com as depositadas nas bases de dados, foram encontradas identificações falsas de espécies próximas que não ocorrem no Brasil ou no cerrado da região de São Carlos, denotando falências nas bases de dados. Também foi observado que elas apresentam amplas informações para algumas regiões do mundo mostrando sub-representação, por exemplo, da fauna neotropical, e representação diferencial dentro das classes taxonômicas.

A falta de informação nas bases de dados, mais que uma crítica, é uma chamada para esforços sejam realizados de maneira a enriquecer as bases de dados com sequências de espécies raras e locais pouco estudados.

Os indivíduos dos quais se tinha certeza na identificação até espécie, apresentavam sequências com sinais fortes nos eletroferogramas e não apresentavam códons de parada ao fazer a tradução a proteínas foram depositaram-se da base de dados do NCBI sob os números de acesso: JQ627200 – JQ627300 para o gene 16S e JQ627301 – JQ627384 para o gene *cox1* (Tabela 1 ANEXO). É importante destacar o grande aporte realizado no desenvolvimento deste trabalho, devido ao depósito de sequências para algumas espécies das quais não se tinha informação nas bases de dados, o que impossibilitava a identificação com caracteres moleculares (Fig. 5).

O depósito das sequências do gene *cox1* na base de dados da BOLD não foi possível, já que é necessário ter um indivíduo *voucher* (Indivíduo depositado numa coleção de história natural identificado por taxonomistas experientes em cada espécie) e pela condição na qual se encontram os animais atropelados, isso não foi possível.



Alguns dos indivíduos não aparecem (ex. 003, 037) porque não foram identificados até espécie.

Figura 5. Indivíduos identificados até o *status* taxonômico de espécie, por classe, baseado nos caracteres diagnósticos utilizados.

Tabela 3. Identificação taxonômica, para cada uma das amostras coletadas e classificação em grupos funcionais.

Classificação taxonômica	Nome comum	No. Amostra
Chordata		
AMPHIBIA		
<u>Anura</u>		
Bufonidae		
<i>Bufo</i>		
<i>Bufo schneider</i> Lutz, 1925	Sapo-cururu	069, 123
Hylidae		
<i>Aplastodiscus</i>		
<i>Aplastodiscus cochranae</i> (Mertens, 1952)	Perereca	030
<i>Hypsiboas</i>		
<i>Hypsiboas albopunctatus</i> (Spix, 1824)	Perereca-cabra	010, 114
<i>Hypsiboas faber</i> (Wied-Neuwied, 1821)	Sapo-martelo	118
<i>Scinax</i>		
<i>Scinax fuscovarius</i> (Lutz, 1925).	Perereca das casas	014, 019, 026, 039, 041, 042, 045, 072, 077, 078, 086, 088, 092, 093, 094, 095, 100, 112, 115, 119
Lepodactylidae		
<i>Leptodactylus</i>	Rã	120
<i>Leptodactylus fuscus</i> (Schneider, 1799).	Rã-assobiadora	067, 068, 079, 080, 096, 110
<i>Physalaemus</i>		
<i>Physalaemus nattereri</i> Steindachner, 1863.	Rã-quatro olhos	073, 113
<i>Physalaemus centralis</i> Bokermann, 1962	Rã	117
<i>Physalaemus cuvieri</i> Fitzinger, 1826	Rã-cachorro	091, 099
REPTILIA		
<u>Squamata</u>		
Amphisbaenia		
Amphisbaenidae		
<i>Amphisbaena</i>		
<i>Amphisbaena darwini</i> Dumeril & Bibron, 1839	Cobra-cega	059, 062, 084, 098, 103, 109, 111
<i>Amphisbaena mertensii</i> Strauch, 1881	Cobra-cega	034, 035
Lacertilia		
Scincidae		
Mabuya		
<i>Mabuya dorsivittata</i> Cope, 1862	Lagartixa, papa-vento	054

Teiidae		
<i>Ameiva</i>		
<i>Ameiva ameiva</i> (Linnaeus, 1758)	Bico-doce	008, 022, 048, 053, 064, 071, 108, 116
<i>Tupinambis</i>		
<i>Tupinambis merianae</i> (Linnaeus, 1758)	Teiú	060, 065, 085
Serpentes	Cobras	003, 037, 040, 107
Boidae		
<i>Boa</i>		
<i>Boa constrictor</i> Stull, 1932	Jibóia	061
Colubridae		
<i>Philodryas</i>		
<i>Philodryas patagoniensis</i> Girard, 1858	Parelheira	070
<i>Sibynomorphus</i>		
<i>Sibynomorphus mikanii</i> (Schlegel, 1837).	Jararaquinha dormideira	036, 074
Dipsadidae		
<i>Oxyrhopus</i>		
<i>Oxyrhopus guibei</i> (Hoge & Romano 1977).	Falsa coral	004, 009, 011, 013, 015, 017, 033, 055, 081
Elapidae		
<i>Micrurus</i>		
<i>Micrurus altirostris</i> (Cope, 1860)	Coral	016
<i>Bothrops</i>		
<i>Bothrops neuwiedi</i> Wagler, 1824	Urutu	005
Viperidae		
<i>Crotalus</i>		
<i>Crotalus durissus</i> (Laurenti 1768).	Cascavel	020, 024, 047, 105

AVES

<u>Apodiformes</u>		
Trochilidae		
<i>Phaethornis</i>		
<i>Phaethornis pretrei</i> (Lesson & Delattre, 1839).	Beija-flor rabo branco	101 ^{a,1}
<u>Caprimulgiformes</u>		
Caprimulgidae		
Caprimulgus		
<i>Caprimulgus parvulus</i> (Gould, 1837).	Bacurau pequeno	083, 106 ^{a,2}
<u>Cariamiformes</u>		
Cariamidae		

<i>Cariama</i>		
<i>Cariama cristata</i> (Linnaeus, 1766).	Seriema	049, 058 ^{b,2}
Columbiformes		
Columbidae		
<i>Columbina</i>		
<i>Columbina tapacolti</i> (Temminck, 1811).	Rolinha-caldo-de-feijão	044, 050 ^{a,1}
Cuculiformes		
Cuculidae		
<i>Guira</i>		
<i>Guira guira</i> (Gmelin, 1788).	Anu branco	032 ^{a,1}
Falconiformes		
Falconidae		
<i>Falco</i>		
<i>Falco spaverius</i> Linnaeus, 1758.	Quiriquiri	006 ^{a,1}
Galliformes		
Phasianidae		
<i>Gallus</i>		
<i>Gallus gallus</i> (Linnaeus 1758)	Galo	007 ^{b,2}
Passeriformes		
Emberizidae		
<i>Coryphospingus</i>		
<i>Coryphospingus cucullatus</i> (Müller, 1776)	Tico-tico rei	012, 025, 031, 052, 102 ^{a,1}
<i>Volantina</i>		
<i>Volantina jacarina</i> (Linnaeus, 1766)	Tziu	028, 056, 082 ^{a,1}
<i>Zonotrichia</i>		
<i>Zonotrichia capensis</i> (Müller, 1776)	Tico-tico	097, 104 ^{a,1}
Furnariidae		
<i>Furnarius</i>		
<i>Furnarius rufus</i> (Gmelin, 1788)	João de barro	075 ^{a,1}
<i>Synallaxis</i>		
<i>Synallaxis frontalis</i> Pelzelin, 1859.	Petrim	002 ^{a,1}
<i>Synallaxis albenscens</i> Temminck, 1823.	Uí-pi	057 ^{a,1}
Parulidae		
<i>Basileuterus</i>		
<i>Basileuterus culicivorus</i> (Deppe, 1830).	Pula-pula	027 ^{a,1}
Thraupidae		

<i>Sporophila</i>			
<i>Sporophila caerulescens</i> (Vieillot, 1823).	Coleirinho		121 ^{a,1}
Turdidae			
<i>Turdus</i>	Tordo		063 ^{a,1}
<i>Turdus amaurochalinus</i> Cabanis, 1850.	Sabiá-poca		018 ^{a,1}
<u>Psittaciformes</u>			
Psittacidae			
<i>Aratinga</i>			
<i>Aratinga leucophthalma</i> (Statius Müller, 1776).	Periquitão-maracanã		021 ^{a,1}
<u>Tinamiformes</u>			
Tinamidae			
<i>Crypturellus</i>			
<i>Crypturellus parvirostris</i> (Wagler, 1827).	Inhambu-chororó		001 ^{b,2}
<i>Nothura</i>			
<i>Nothura maculosa</i> (Temminck, 1815).	Codorna amarela		051 ^{b,2}
<hr/>			
MAMALIA			
<u>Carnivora</u>			066
<u>Rodentia</u>			
Cricetidae			
<i>Oligoryzomys</i>			
<i>Oligoryzomys flavescens</i> (Waterhouse, 1837)	Camundongo do mato		023, 029, 038
Muridae			
<i>Mus</i>			
<i>Mus musculus</i> Linnaeus, 1758.	Camundongo		046
<u>Cingulata</u>			
Dasypodidae			
<i>Cabassous</i>			
<i>Cabassous unicinctus</i> (Linnaeus, 1758).	Tatu		122

^a Alta capacidade de deslocamento, ^b Baixa capacidade de deslocamento

¹ Comportamento de não aterrissar no solo, ² Comportamento de aterrissar no solo

4.2 Taxas de atropelamentos.

A estrada municipal Guilherme Scatena (Fig. 6) é o único acesso à empresa EMBRAPA, à Represa 29 e sua vizinhança. Apesar de ser uma estrada municipal simples de mão dupla, ela apresenta um fluxo grande de carros porque os locais aos que ela conduz são de intensa visitação. Durante a semana, o fluxo de caminhões que transportam pedras, cana e outros alimentos é constante e as velocidades atingidas, algumas vezes, ultrapassam os 100 Km/h. Embora o fluxo de caminhões e de veículos pesados diminua durante o final de semana enquanto a quantidade de carros particulares que transitam aumenta consideravelmente devido à utilização da Lagoa 29 como lugar de lazer.



Figura 6 Fotografia da estrada municipal Guilherme Scatena feita durante os primeiros meses de coleta.

Dos 123 vertebrados mortos por atropelamentos durante a coleta: 38 indivíduos da classe dos anfíbios, 49 dos répteis, 30 pertencentes às aves e seis aos mamíferos (Fig. 7). O impacto gerado nos fragmentos de cerrado é grande considerando a quantidade de animais que foram achados mortos durante as 20 semanas de coleta, apesar dos quatro túneis para passagem de fauna que a estrada apresenta.

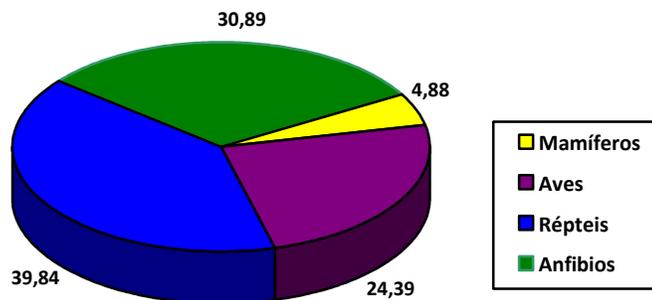


Figura 7 Representação gráfica das porcentagens de atropelamentos por classes para o total de indivíduos coletados.

Considerando o total de quilômetros percorridos durante as coletas, a média de atropelamentos foi de 0,051 animais/Km, valor próximo ao reportado para vertebrados em outras estradas do país, na região do estado de São Paulo; 0,048 animais/km (Prada 2004), 0,045 animais/km para vertebrados de grande porte (Silveira 1999) e 0,06 animais/km (Jácomo *et al.* 1996). Esses números mostram uma problemática geral que precisa de conscientização, tomada de decisões e de ações para mitigar este impacto.

Nas análises entre os atropelamentos da temporada seca: 55 indivíduos (abril a junho de 2010) e chuvosa: 68 indivíduos (outubro de 2010 a janeiro de 2011) não foram encontradas diferenças significativas ($p=0,1746$), provavelmente por três motivos: as espécies analisadas não apresentam mudanças marcantes nos tamanhos populacionais com a mudança de estação, não existe uma variação radical da paisagem durante as duas temporadas e porque os resultados podem apresentar um viés causado pela experiência ganha a partir das repetidas coletas.

Na literatura têm sido reportados valores maiores para a temporada seca (Turci & Bernarde 2009), bem como há registros para valores superiores na temporada chuvosa (Rodrigues *et al.* 2002, Prada 2004). A falta de um padrão nos dados reportados em outras pesquisas apoia o dito anteriormente e demonstra que a dinâmica temporal relacionada aos atropelamentos de pequenos vertebrados é particular para cada espécie e depende da sua história natural (Clevenger *et al.* 2003).

Embora as coletas tenham sido realizadas em curtos intervalos de tempo, não pode ser descartada a hipótese de que alguns dos indivíduos atropelados tenham sido pegos por outras pessoas, porque alguns animais são utilizados como alimento. Apesar da maioria dos atropelamentos ser acidental, principalmente devido ao excesso de velocidade, alguns podem ser propositais com animais como tatus, que servem de alimento (Rodrigues *et al.* 2002), e como as serpentes pelo perigo hipotético que elas proporcionam à comunidade (Turci & Bernarde 2009).

Mesmo que tenha sido reportado que anfíbios e répteis possuam movimentação menor quando comparados a aves e mamíferos, de modo que acabam por ser expostos com menor frequência às rodovias (Prada 2004), neste estudo foram encontrados maiores valores na mortalidade por atropelamentos de anfíbios e répteis (Fig. 7). Em animais de grande porte, pode ser explicado pela hipótese de atropelamentos propositais. Entretanto, para os animais pequenos seria mais adequado argumentar que a dificuldade para distingui-los na estrada os torna alvos comuns.

O número de registros de vertebrados nesse estudo pode estar subestimado já que os animais atropelados podem ser carregados por aves de rapina antes das coletas (Rodrigues *et al.* 2002, Prada 2004). Além disso, animais lesados podem se afastar da rodovia e morrerem em outros lugares (Vieira 1996, Rodrigues *et al.* 2002).

O número de animais encontrados mortos na estrada Gilherme Scatena cria uma grande preocupação, principalmente por atravessar uma área com remanescentes de cerrado. A maioria dos atropelamentos é devido ao excesso de velocidade atingido, portanto, uma possível solução inicial para reduzir este impacto é a construção de lombadas ou a colocação de radares para a diminuição da velocidade e respeito nos limites estabelecidos.

Cabe destacar que alguns dos caminhões que transitam nessa estrada transportam alimentos, como cana e soja, e devido vazamentos nas cargas os animais podem ser atraídos à via, aumentando assim o número de atropelamentos. Medidas preventivas podem ser tomadas para impedir a caída de alimentos na estrada, evitando não só mortes dos animais, mas também perdas econômicas para os produtores e empresários.

A quantidade de animais encontrados atropelados mostra o grande impacto que as estradas causam aos ecossistemas. Medidas simples de mitigação como a construção de lombadas, instalação de radares e uma mudança na atitude dos condutores para respeitar os limites de velocidade, podem diminuir o número de atropelamentos. Por isso é importante elaborar políticas públicas que levem ao planejamento de vias considerando os locais que estas atravessam e construção de túneis para passagem de fauna, assim como a manutenção e monitoramento dos túneis existentes.

4.3. Distribuição espacial dos indivíduos

Os pontos exatos dos atropelamentos identificados durante o andamento do estudo foram plotados no mapa da região, mediante o sistema de informação geográfica no programa ArcGIS 9.2-10 (ESRI 2011) mostrando uma distribuição dos atropelamentos ao longo do percurso da estrada Guilherme Scatena (Fig. 8).



Figura 8 Localidade de estudo no mapa do Brasil e pontos de coleta na estrada municipal Guilherme Scatena, gerado com o programa de sistema de informação geográfica ArcGIS 9.2-10 sobre uma imagem de satélite obtida pelo QuickBird (Digitalglobe 2007) e no google earth (earth.google.com).

As análises estatísticas K de Ripley, para determinar o quilômetro com maior incidência de atropelamentos, mostraram distribuições significativas para raios entre 10 e 11 km, as linhas pretas são os limites de confiança superior e inferior (Fig. 9).

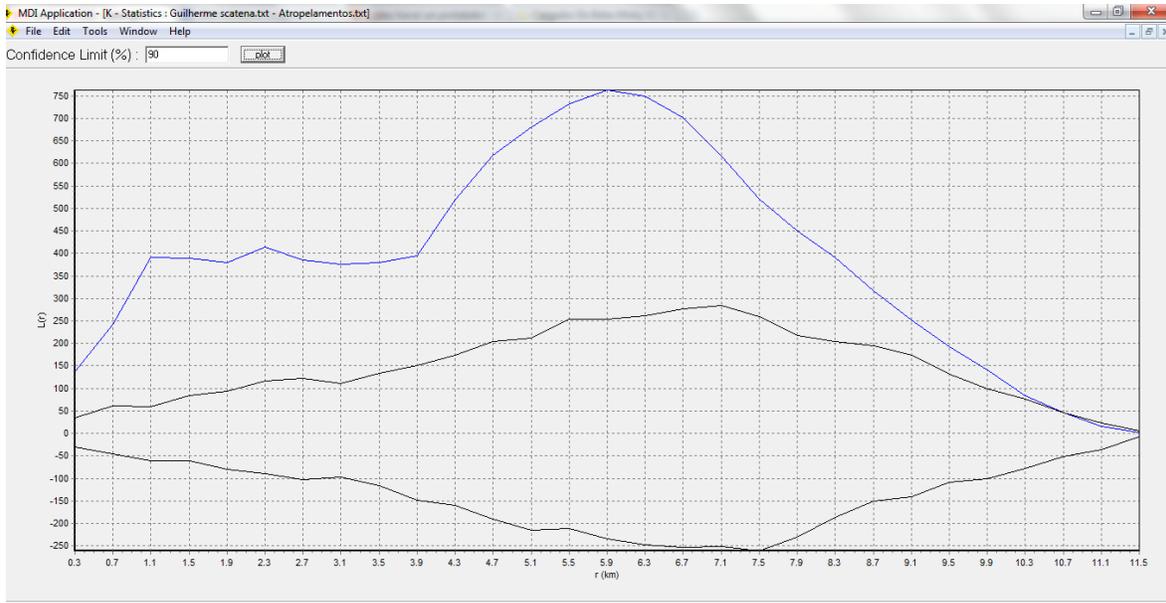


Figura 9. Análises de K de Ripley para os dados de atropelamento na Estrada Guilherme Scatena.

Os valores obtidos nesta análise foram utilizados como parâmetros para determinar os quilômetros com valores maiores no número de atropelamentos. Após as análises foi determinado com maior incidência de atropelamentos entre os quilômetros 6,5 e 7 provavelmente, pela presença de corpos de água nas proximidades (Fig. 10).

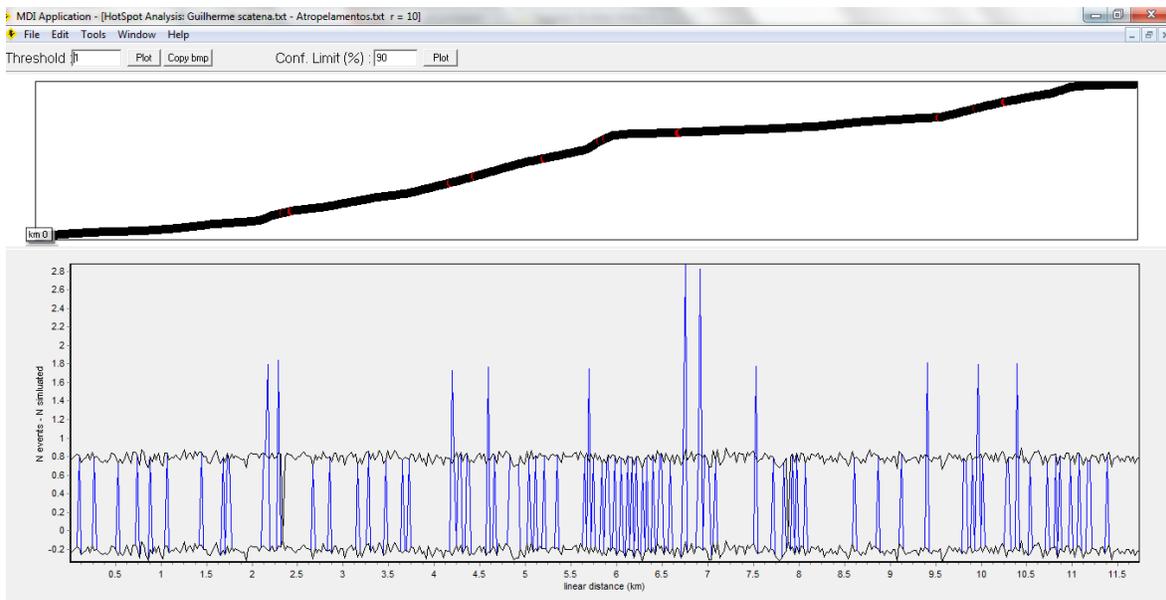


Figura 10. Quilômetros com maior influência de atropelamentos na estrada Guilherme Scatena.

Os picos azuis que ultrapassam as linhas pretas (Fig. 10) mostram os quilômetros com maior incidência de atropelamentos permitindo estabelecer medidas mitigatórias para o impacto causado pela estrada, como construir lombadas ou instalar radares nestes quilômetros.

A divisão do total das amostras em grupos para as análises de χ^2 permitiram determinar diferenças significativas entre todas as categorias propostas (classe, grupo funcional, comportamento e subordem), o que permitiu rejeitar as hipóteses nulas que pressupõem frequências iguais nos atropelamentos em cada categoria e continuar com as análises para estabelecer a possível associação entre a cobertura da paisagem e os locais dos atropelamentos (Tabela 4).

Os resultados encontrados mostraram diferenças significativas para todas as análises, corroborando que os efeitos das estradas sobre a biodiversidade são táxon-específico e, em muitos casos, características ecológicas das espécies podem ser determinantes para a magnitude dos efeitos registrados.

Tabela 4. Teste de Qui-quadrado para avaliar significância entre as diferenças encontradas e esperadas nos valores de atropelamentos em cada uma das categorias preestabelecidas.

	Obs.	Freq. Esp	χ^2	P
CLASSE			32.295	<0.001
Mamíferos	6	0.250		
Aves	30	0.250		
Répteis	49	0.250		
Anfíbios	37	0.250		
AVES-GRUPO FUNCIONAL (CAPACIDADE DE DESLOCAMENTO)			13.333	<0.001
Alta	25	0.500		
Baixa	5	0.500		
AVES-COMPORTAMENTO			13.333	<0.001
Não aterrissa no solo	25	0.500		
Aterrissa no solo	5	0.500		
RÉPTEIS-SUBORDEM			7.143	0.026
Cobras	23	0.333		
Lacertílias	18	0.333		
Amphisbaenia	8	0.333		

No mapa foram desenhados polígonos para definir 19 tipos de cobertura da paisagem em torno da estrada: água, arbóreo (cerrado sensu stricto e cerradão), arbustivo (cerrado campo sujo), campo antrópico (pastos abandonados), cultivo de cana, cerca viva, construção rural (chácaras e fazendas), cultura (cultivos diferentes de cana e eucalipto), estrada, eucalipto (plantações manejadas, com corte cada 5-7 anos), eucalipto antigo (plantações antigas de eucalipto sem manejo), eucalipto sub (plantações de eucalipto e sub-bosque), florestal (floresta semidecídua), mata ciliar, mata urbana (bosques com muita intervenção antrópica), pastagem, solo exposto, urbano e várzea (gramíneas ao redor de corpos de água geralmente encharcadas) (Fig. 11).

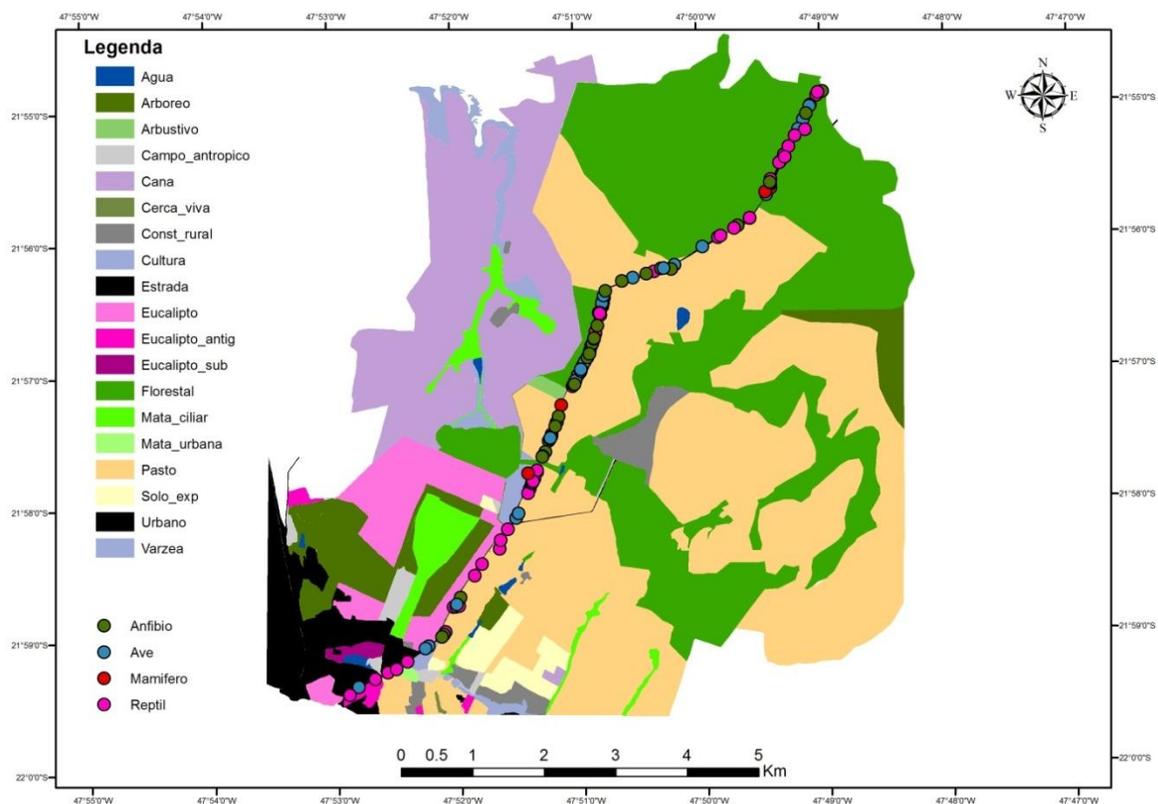


Figura 11 Tipos de cobertura da paisagem definidas ao redor dos pontos de coleta na Estrada Municipal Guilherme Scatena, gerado com o programa de sistema de informação geográfica ArcGIS 9.2-10.

O tipo de cobertura mais comum ao redor da estrada municipal Guilherme Scatena é a construção rural, seguida pelas pastagens para gado evidenciando a forte intervenção antrópica existente na região (Tabela 5). É importante destacar que apesar desta forte intervenção existem fragmentos de áreas naturais como resultado dos esforços para conservação da área (florestal, mata ciliar, água). Igualmente, existem tipos de cobertura que apresentam uma pequena área, mas proporcionam refúgio a muitos animais (Eucalipto com sub-bosque, mata urbana, cerca viva) (Fig. 11).

Os diferentes tipos de cobertura ao redor da estrada são amplamente utilizados como provedores de recursos para as espécies, isso pode explicar porque são encontrados animais atropelados ao longo do percurso.

Tabela 5. Área em hectares de cada tipo de cobertura da paisagem existente ao redor da estrada municipal Guilherme Scatena.

Tipo de cobertura	Área (ha)
Construção rural	38.349
Pasto	36.605
Várzea	35.238
Urbano	29.947
Mata ciliar	28.003
Arbóreo	26.100
Campo antrópico	25.875
Florestal	21.999
Água	17.582
Solo exposto	15.660
Cana	13.849
Eucalipto antigo	12.406
Estrada	12.259
Eucalipto	9.700
Arbustivo	9.550
Cerca viva	6.141
Mata urbana	4.742
Cultura	2.320
Eucalipto sub-bosque	1.358

Embora fossem encontrados indivíduos ao longo dos 12 km, ao analisar por classes taxonômicas encontramos uma maior quantidade de atropelamentos para os anfíbios na

parte intermediária do percurso (Fig. 12), isto pode ser explicado pela presença de várzea e corpos de água nas proximidades da estrada e à necessidade deste recurso para o ciclo de vida desses animais. Também, porque a necessidade de mobilização para colonizar ambientes novos torna-se maior para os animais em áreas remanescentes de habitats nativos menores (Moilanen & Hanski 2001).

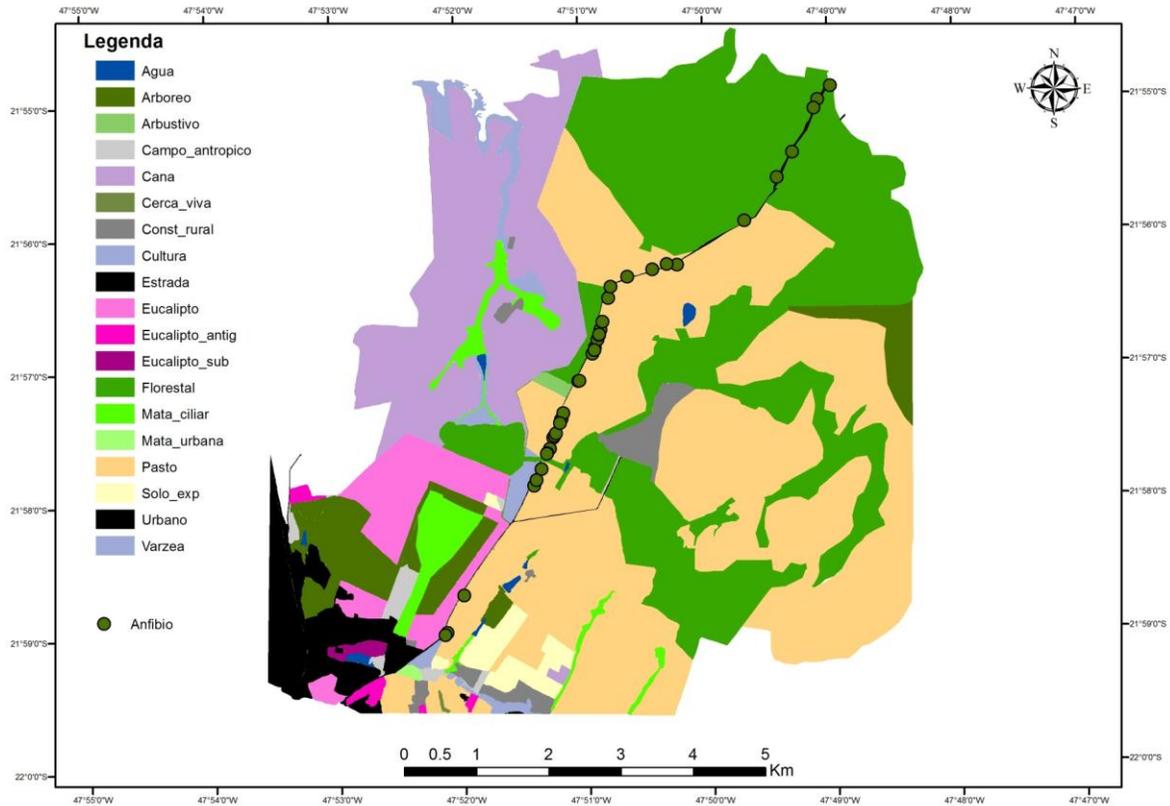


Figura 12 Pontos de coleta na Estrada Municipal Guilherme Scatena para anfíbios, gerado com o programa de sistema de informação geográfica ArcGIS 9.2-10.

Nas áreas que apresentam maior presença humana, perto das áreas urbanas foram encontrados valores de atropelamento altos para répteis (Fig. 13), possivelmente pela adaptabilidade às transformações que estas classes apresentam. No entanto, os valores baixos reportados para anfíbios nestes locais podem ser devido à alta sensibilidade da classe a ambientes degradados (Fig. 12).

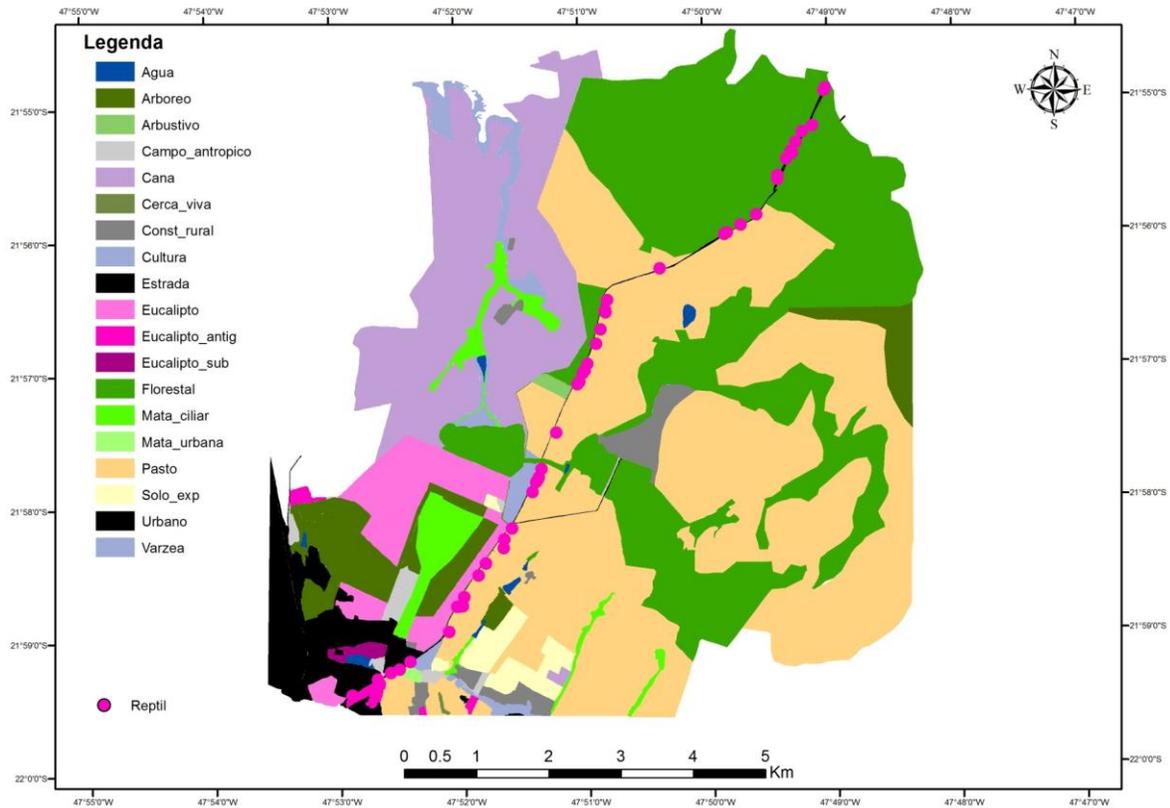


Figura 13 Pontos de coleta na Estrada Municipal Guilherme Scatena para répteis, gerado com o programa de sistema de informação geográfica ArcGIS 9.2-10.

Na área do mapa onde existe um fragmento de floresta semidecídua mais conservada (Florestal), foram encontrados valores altos de atropelamentos para todas as classes taxonômicas (Fig. 11). Essa particularidade ocorreu devido a que este fragmento encontra-se mais conservado e afastado da área urbana conservando uma maior riqueza e abundância.

Na procura por recursos, cada espécie escolhe o local onde atravessa e a quantidade de vezes que isto se torna necessário, fazendo diferenciais as probabilidades de morrer atropelados. Os resultados dos atropelamentos permitem evidenciar como cada espécie se adapta de maneira distinta dependendo de suas necessidades, deslocando-se ou não em diferentes tipos de coberturas da paisagem.

5 CONCLUSÕES

Na atribuição taxonômica até o nível de espécie é importante o uso tanto de caracteres morfológicos quanto de caracteres moleculares para a identificação das espécies.

O uso de dois ou mais genes para *barcode* genético permite um maior número de identificações e maior confiabilidade dos resultados obtidos.

Pela falta de informação atual nas bases de dados é importante utilizar preferencialmente alguns genes dependendo da classe taxonômica da qual se pretende fazer a identificação taxonômica.

A conservação dos diferentes tipos de coberturas leva à conservação de diferentes espécies, entretanto torna-se essencial a conservação de ambientes mais susceptíveis para assim manter populações das espécies que apresentam maior sensibilidade a mudanças ambientais.

Para conservação de fauna dos remanescentes de cerrado da região é necessário estabelecer medidas de mitigação para diminuir o impacto causado principalmente pelo número de atropelamentos.

Valores diferentes no sucesso de ampliações e de atribuições taxonômicas corretas para cada gene mostram uso preferencial dos fragmentos do gene *cox1* na identificação de aves e mamíferos e do gene *16s* para répteis.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ARDURA, A. et al. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation*, v. 143, p. 1438–1443, 2010.
- ASHLEY, E.P.; ROBINSON, J. T. Road mortality of amphibians, reptiles and other wildlife on the Long Point causeway, Lake Erie, Ontario. *Canadian Field-Naturalist*. v. 110, n. 3, p. 403-412, 1996.
- AVISE J. C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, MA Harvard University Press, 2000. 447 p.
- AVISE, J.C.; WALKER, D. Species realities and numbers in sexual vertebrates: Perspectives from an asexually transmitted genome. *PNAS. US*. v. 96, p. 992-995, 1999.
- BAKER, A.J.; TAVARES, E. S.; ELBOURNE, R. F. Countering criticisms of single mitochondrial DNA gene barcoding in birds. *Ecology Resources*. v. 9, n. 1, p. 257–268, 2009.
- BRADLEY, B.J. et al. Plant DNA sequences from feces: potential means for assessing diets of wild primates. *American Journal of Primatology*. v. 69, p. 699–705, 2007.
- BROWN, W.M.; GEORGE, M.Jr.; WILSON, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *PNAS. USA*. v. 76, p. 1967–1971, 1979.
- CARDOSO, J.M; BATES, J.M. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot. *BioScience*. v. 52, p. 225-233, 2002.
- CLARE, E.L. et al. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*. v. 7, p. 184–190, 2007.
- CLARK, R.W. et al. Roads, Interrupted Dispersal, and Genetic Diversity in Timber Rattlesnakes. *Conservation Biology*. v. 24, n. 4, p. 1059–1069, 2010.
- CLEVENGER, A.P.; CHRUSZCZ, B.; GUNSON, K.E. Spatial patterns and factors influencing small vertebrate fauna road-kill aggregations. *Biological Conservation*. v. 109, p. 15-26, 2003.

COELHO, A.V.P. et al. *Spatial Evaluation of Road Morality Software Siriema* Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, Brazil. 2011. Version 1.1.

DESALLE, R.; EGAN, M.G.; SIDDALL, M. The Unholy Trinity: Taxonomy, Species Delimitation and DNA Barcoding *Philosophical Transactions: Biological Sciences*. v. 360, n. 1462, p. 1905-1916. 2005.

DIGITALGLOBE. Disponível em: <<http://www.digitalglobe.com/about/imaging.shtml>>. Acesso em: 2007.

DOS REIS, N.R. et al. Mamíferos do Brasil. 2ª edição. Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2011. 439 p.

EATON, M.J. et al. Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conservation Genetics*. v. 11, p. 1389–1404, 2010.

ESRI. ArcGIS 9.2-10. Disponível em: <<http://www.esri.com/software/arcgis/index.html>>. Acesso em: Out 2011.

FICETOLA, G.F. et al. An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *Genomics*. v. 11, p. 434, 2010.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. v. 3, p. 294–299, 1994.

FORESTER, D.C. et al. Post-Breeding Dispersal and Summer Home Range of Female American Toads (*Bufo americanus*). *Northeastern Naturalist*. v. 13, n. 1, p. 59-72, 2006.

FORMAN, R.T.T. Land mosaics: the ecology of landscapes and the regions. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 1995. 632 p.

FORMAN, R.T.T.; ALEXANDER, L.E. Roads and their major ecological effects. *Annual review of Ecology and Systematics*. v. 29, p. 207-232, 1998.

FORMAN, R.T.T.; DEBLINGER, R.D. The Ecological Road-Effect Zone of a Massachusetts (U.S.A.) Suburban Highway. *Conservation Biology*. v. 14, n. 1, p. 36-46, 2000.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. Fundamentos de genética da conservação. En: *A primer or conservation genetics*. 1 ed., 2008. 280 p.

HALL T. *Bioedit sequence alignment editor*, 2004. Version 7.0.0.

HAWBAKER, T.J. et al. Road Development, Housing Growth, and Landscape Fragmentation in Northern Wisconsin: 1937-1999. *Ecological Applications*. v. 16, n. 3, p. 1222-1237, 2006.

HAYASAKA, K.; GOJOBORI, T.; HORAP, S. Molecular Phylogeny and Evolution of Primate Mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*. v. 5, n. 6, p. 626, 1988.

HEBERT, P.D.N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society Biological science*. v. 270, p. 313–321, 2003a.

HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society Biological science*. v. 270, p. S96–S99, 2003b.

HEBERT, P.D.N. et al. Identification of Birds through DNA Barcodes. *Plos biology*. v. 2, n. 10, p. 1658-1663, 2004a.

HEBERT, P.D.N. et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS*. V. 101, n. 41, p. 14812–14817, 2004b.

HEBERT, P.D.N.; GREGORY, T.R. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*. v. 54, n. 5, p. 852–859, 2005.

HICKERSON, M. J.; MEYER, V.; MORITZ, C. DNA Barcoding Will Often Fail to Discover New Animal Species over Broad Parameter Space. *Systematic Biology* 55 (5): 729-739, 2006.

HOFREITER, M. et al. A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation. *Molecular Ecology*. v. 9, p. 1975–1984, 2000.

HWANG, U.; KIM, W. General properties and phylogenetics utilities of nuclear ribosomal DNA and mtDNA commonly used in Molecular Systematics. *The Korean Journal of Parasitology*. v. 37, n. 4, p. 215-228, 1999.

INDERMAUR, L. et al. Behavior-Based Scale Definitions for Determining Individual Space Use: Requirements of Two Amphibians. *The American Naturalist*. v. 173, n. 1, p. 60-71, 2009.

JÁCOMO, A.T.A.; SILVEIRA, L.; CRAWSHAW, P.G. Impacto da rodovia estadual GO-341 sobre a fauna do Parque Nacional das Emas, Goiás. In: 3º Congresso de Ecologia do Brasil, 1996, Brasília. Anais. Brasília: Universidade de Brasília , 1996, p. 174.

JARMAN, S.N.; DEAGLE, B.E.; GALES, N.J. Group-specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. *Molecular Ecology*. v. 13, p. 1313–1322, 2004.

KIM, B. J.; LEE, N.S.; LEE, S.D. Feeding diets of the Korean water deer (*Hydropotes inermis argyropus*) based on a 202 bp rbcL sequence analysis. *Conserv Genet*. v. 12, p. 851–856, 2011.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*. v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005.

LIS, J. T.; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Research*. v. 2, n. 3, p. 383-389, 1975.

MAC ARTHUR, R.H.; WILSON, E.O. An equilibrium theory of insular zoogeography. *Evolution*. v. 17, p. 373-387, 1963.

MACE, G.M.; HARVEY, P.H. Energetic Constraints on Home-Range Size. *The American Naturalist*. v. 121, n. 1, p. 120-132, 1983.

MACHADO, R.B. et al. Estimativas da perda da área do cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. *Conservação Internacional*, Brasília, DF. 2004.

MARGALEF, R. 1997. Our biosphere. Kinne, O. (ed.) Excellence in Ecology Book 10. Ecology Institute, Oldendorf/Luhe, Germany, XIX 194p.

MILLER, J.R. et al. Forest roads and landscape structure in the southern Rocky Mountains. *Landscape Ecology*. v. 11, p. 115-127, 1996.

MINDELL, D.P. et al. Phylogenetic relationships among and within select avian orders based on mitochondrial DNA. In: DP Mindell, editor. Avian molecular evolution and systematics. *New York: Academic Press*, 1997. p. 214-247,

MIOTTO, R.A. et al. Identification of pumas (*Puma concolor* (Linnaeus, 1771)) through faeces: a comparison between morphological and molecular methods. [Brazilian Journal of Biology](#). v. 67(special number), p. 631-637, 2007.

MOILANEN, A.; HANSKI, I. On the use of connectivity measures in spatial ecology. *Oikos*. v. 95, p. 147-151, 2001.

MOORE, W. S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*. v. 49, p. 718–726, 1995.

MYERS, N. et al. Biodiversity Hotspots For conservation priorities. *Nature*. v. 403, p. 853–858, 2000.

NARO-MACIEL, E. et al. DNA barcodes for globally threatened marine turtles: a registry approach to documenting biodiversity *Molecular Ecology Resources*. v. 10, p. 252–263, 2010.

PALUMBI, S.R. et al. The simple fool's guide to PCR. Honolulu. v. 2. University of Hawaii. 45 p. 1991.

PERRY, G.; GARLAND JR.T. Lizard Home Ranges Revisited: Effects of Sex, Body Size, Diet, Habitat, and Phylogeny. *Ecology*. v. 83, n. 7, p. 1870–1885, 2002.

PIVELLO, V.R. Manejo de fragmentos de Cerrado: princípios para a conservação da biodiversidade. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Org.). Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. *Brasília: Ministério do Meio Ambiente*. 2005. v. 24, p. 401–413.

POINAR, H. N. et al. 1998. Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science*. v. 281, p. 402–406.

PONS, J. DNA-based identification of preys from non-destructive, total DNA extractions of predators using arthropod universal primers. *Molecular Ecology Notes*. v. 6, p. 623–626, 2006.

PRADA, C.S. Atropelamento de vertebrados silvestres em uma região fragmentada do nordeste do estado de São Paulo: quantificação do impacto e análises de fatores envolvidos. Dissertação de mestrado (mestrado em Ecologia e Recursos naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

PREFEITURA MUNICIPAL DE SÃO CARLOS. 2007. Inauguração Rodovia Guilherme Scatena. Disponível em: <<http://www.saocarlos.sp.gov.br/index.php/noticias/2007/150457-inauguracao-rodovia-guilherme-scatena.html>>. Acesso em: May 2010.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*. v. 7, p. 355–364, 2007.

RODRIGUES, F.H.G. et al. Impacto de rodovias sobre a fauna da Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF. *In: Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação. Anais.* Fortaleza. 2002. p. 585-593.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd ed. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 1989. 999 p.

SAWAYA, R.J.; MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M. Composition and natural history of Cerrado snake assemblage at Itirapina, São Paulo state, southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, v. 8, n. 2, p. 127-149, 2008.

Sociedade Brasileira de Herpetologia, SBH. Brazilian amphibians – List of species. 2010. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em: Ago 2011.

SILVEIRA, L. 1999. Ecologia e conservação dos mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas. Dissertação de mestrado (mestrado em Biologia). Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SMITH, M.A.; NIKOLAI, A.P. JR; HEBERT, P.D.N. DNA BARCODING CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge *Molecular Ecology Resources*. v. 8, p. 235–246, 2008.

SORK, V. L.; SMOUSE, P.E. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecology*. v. 21, p. 821–836, 2006.

SOUZA, D. Todas as Aves do Brasil - Guia de campo para Identificação. Editora DALL, Feira de Santana. 1998. 258 p.

STOECKLE, M. Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *BioScience*. v. 53, n. 9, p. 2-3 2003.

SYMONDSON, W.O.C. Molecular identification of prey in predator diets. *Mol Ecol*. v. 11, p. 627–641, 2002.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

- TURCI, L.C.B.; BERNARDE, P.S. Vertebrados atropelados na Rodovia Estadual 383 em Rondônia, Brasil. *Biotemas*. v. 22, n. 1, p. 121-127, 2009.
- VAN DER ZANDE, A.N.; TER KEURS, W.J.; VAN DER WEIJDEN, W.J. The impact of roads on the densities of four bird species in an open field habitat - evidence of a long-distance effect. *Biol.Conserv.* v. 18, p. 299-321, 1980.
- VENCES, M. et al. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*. 2:5. 2005a.
- VENCES, M. et al. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical transactions of the Royal Society*. v. 360, p. 1859-2868, 2005b.
- VIEIRA, E.M. Highway mortality of mammals in central Brazil, *Ciência e Cultura*. v. 48, p. 270-272, 1996.
- WOOLBRIGHT, L.L. Patterns of Nocturnal Movement and Calling by the Tropical Frog *Eleutherodactylus coqui*. *Herpetologica*. v. 41, n. 1, p. 1-9, 1985.

ANEXO

Tabela 1. Número de acesso para as sequências depositadas na base de dados do NCBI

Classe	Espécie	16S	cox1
	<i>Aplastodiscus cochranae</i>	030	JQ627200
	<i>Bufo schneider</i>	069	JQ627201
		123	JQ627202
	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	010	JQ627203 JQ627301
		014	JQ627204
		114	JQ627205 JQ627302
	<i>Hypsiboas faber</i>	118	JQ627206 JQ627303
	<i>Leptodactylus fuscus</i>	067	JQ627304
		068	JQ627207
		079	JQ627208
		080	JQ627209 JQ627305
		096	JQ627306
		110	JQ627307
	<i>Physalaemus centralis</i>	117	JQ627210 JQ627308
	<i>Physalaemus cuvieri</i>	091	JQ627211 JQ627309
		099	JQ627212 JQ627310
	<i>Physalaemus nattereri</i>	073	JQ627213 JQ627311
		113	JQ627214 JQ627312
AMPHIBIA	<i>Scinax fuscovarius</i>	014	JQ627313
		019	JQ627215 JQ627314
		026	JQ627216 JQ627315
		039	JQ627217 JQ627316
		041	JQ627218 JQ627317
		042	JQ627219 JQ627318
		045	JQ627220 JQ627319
		072	JQ627221 JQ627320
		077	JQ627222 JQ627321
		078	JQ627223 JQ627322
		086	JQ627224 JQ627323
		088	JQ627225 JQ627324
		092	JQ627226 JQ627325
		093	JQ627227 JQ627326
		094	JQ627228 JQ627327
		095	JQ627229 JQ627328
		100	JQ627230 JQ627329
		112	JQ627231 JQ627330
		115	JQ627232 JQ627331

		119	JQ627233	JQ627332
	<i>Aratinga leucophthalma</i>	021	JQ627234	
	<i>Basileterus culicivorus</i>	027	JQ627235	JQ627333
	<i>Cariama cristata</i>	049	JQ627236	JQ627334
		058	JQ627237	JQ627335
	<i>Coryphospingus cucullatus</i>	012	JQ627238	JQ627336
		025	JQ627239	JQ627337
		031	JQ627240	JQ627338
		052	JQ627241	JQ627339
		102	JQ627242	JQ627340
	<i>Crypturellus parvirostris</i>	001	JQ627243	JQ627341
	<i>Caprimulgus parvulus</i>	083	JQ627244	JQ627342
		106	JQ627245	
	<i>Columbina tapacolti</i>	044	JQ627246	JQ627344
		050	JQ627247	JQ627343
AVES	<i>Furnarius rufus</i>	075	JQ627248	JQ627345
	<i>Falco spaverius</i>	006	JQ627249	JQ627346
	<i>Gallus gallus</i>	007	JQ627250	JQ627347
	<i>Guira guira</i>	032	JQ627251	JQ627348
	<i>Nothura maculosa</i>	051	JQ627252	JQ627349
	<i>Phaethornis pretrei</i>	101	JQ627253	JQ627350
	<i>Synallaxis frontalis</i>	002	JQ627256	JQ627353
	<i>Synallaxis albenscens</i>	057	JQ627254	JQ627351
	<i>Sporophila caerulescens</i>	121	JQ627255	JQ627352
	<i>Turdus amaurochalinus</i>	018	JQ627257	JQ627354
	<i>Volantina jacarina</i>	028	JQ627258	JQ627355
		056		JQ627356
		082	JQ627259	JQ627357
	<i>Zonotrichia capensis</i>	097	JQ627260	JQ627358
		104		JQ627359
	<i>Cabassous unicinctus</i>	122	JQ627261	JQ627360
	<i>Mus musculus</i>	046		JQ627361
MAMALIA	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	023	JQ627262	JQ627362
		029	JQ627263	
		038	JQ627264	
	<i>Ameiva ameiva</i>	008	JQ627265	
		022	JQ627266	
REPTILIA		048	JQ627267	JQ627365
		053	JQ627268	JQ627363
		064	JQ627269	JQ627364

	071	JQ627270	
	108	JQ627271	JQ627366
	116	JQ627272	
<i>Amphisbaena darwini</i>	059	JQ627273	
	062	JQ627274	JQ627367
	084	JQ627275	JQ627368
	098	JQ627276	JQ627369
	103	JQ627277	
	109	JQ627278	JQ627370
	111	JQ627279	
<i>Amphisbaena mertensii</i>	034	JQ627280	
<i>Boa constrictor</i>	061	JQ627281	
<i>Bothrops neuwiedi</i>	005	JQ627282	JQ627371
<i>Crotalus durissus</i>	020		JQ627372
	024	JQ627283	JQ627373
	047	JQ627284	JQ627374
	105	JQ627285	
<i>Micrurus altirostris</i>	016	JQ627286	JQ627375
<i>Mabuya dorsivittata</i>	054	JQ627287	
<i>Oxyrhopus guibei</i>	004	JQ627288	JQ627376
	009	JQ627289	
	011	JQ627290	JQ627377
	013	JQ627291	JQ627378
	015	JQ627292	JQ627379
	017	JQ627293	JQ627380
	033		JQ627381
	055	JQ627294	
	081	JQ627295	JQ627382
<i>Philodryas patagoniensis</i>	070	JQ627296	
<i>Sibynomorphus mikanii</i>	036	JQ627297	JQ627383
	074	JQ627298	
<i>Tupinambis merianae</i>	060	JQ627299	
	065	JQ627300	JQ627384
