



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

Câmpus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Genética

Rullian César Ribeiro

**Genética populacional de *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa,
Myrmecophagidae) no estado de São Paulo utilizando o gene mitocondrial
CytB**

Março, 2016

São José do Rio Preto



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

Câmpus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Genética

Rullian César Ribeiro

**Genética populacional de *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa,
Myrmecophagidae) no estado de São Paulo utilizando o gene mitocondrial
CytB**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, como requisito para a obtenção de título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana C. Morales Corrêa e Castro

São José do Rio Preto

Março, 2016

Ribeiro, Rullian César.

Genética populacional de *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa, Myrmecophagidae) no estado de São Paulo utilizando o gene mitocondrial CytB / Rullian César Ribeiro. -- São José do Rio Preto, 2016
50 p. : il., tabs.

Orientador: Adriana C. Morales Corrêa e Castro
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética de populações. 2. Xenarthra. 3. Tamanduá-bandeira – São Paulo (Estado) 4. Diversidade genética. 5. Marcadores genéticos. 6. DNA mitocondrial. I. Castro, Adriana Coletto Morales Corrêa e. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575(038)

Rullian César Ribeiro

Genética populacional de *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa, Myrmecophagidae) no estado de São Paulo utilizando o gene mitocondrial CytB

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Adriana C. Morales Corrêa e Castro

UNESP – Jaboticabal

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Lilian Castiglioni

FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Danísio Prado Munari

UNESP – Jaboticabal

São José do Rio Preto

09 de março de 2016

Ao pequeno Enzo Pires Ribeiro...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a CAPES, ao IBILCE - UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto, e a FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Todas estas instituições possibilitaram a realização deste trabalho, incentivando, gerando auxílio financeiro, e suporte laboratorial para o desenvolvimento desta e de outras pesquisas, que juntas contribuem para que o Brasil cada vez mais cresça e se destaque como um produtor de conhecimento, apesar dos tempos ruins que nossa nação tem passado e está passando na presente data.

Ao Laboratório de Biologia evolutiva (LaBE), o qual faço parte há quase seis prósperos anos. A todos que passaram por lá neste período e em especial a Nara, Amanda (Dou) e Maria Cecília (Me), formando a base de um time que começou com calma e agora colhe frutos de um período de muito trabalho, mas também de muita diversão e amizade. E neste ambiente agradeço muitíssimo a Prof^ª. Dr^ª. Adriana C. Morales Corrêa e Castro, que não só confiou a mim um desafio que contribuiu para que o LaBE ocupasse um novo nicho de pesquisa, mas também por sua atenção, dedicação a seus orientandos, paciência, noites mal dormidas, e boas conversas. Não poderia deixar de dar uma atenção especial a Amanda de Faria Santos (Dou-rada), que ao longo desses sete anos se tornou mais que uma amiga, sendo uma grande companheira que esteve presente em bons e maus momentos de minha vida pessoal e profissional, e nestes últimos suspiros de mestrando, foi de grande importância dando forças e boas risadas, tornando a escrita deste trabalho leve e alegre.

O embrião deste projeto só foi gerado através de uma parceria com o Laboratório de Ecologia de Mamíferos (LEMA), o qual tenho muito apreço e pessoas queridas. Em especial agradeço a Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Bianchi, líder deste time, e a Doutoranda Alessandra Bertassoni (Ale), que de uma pessoa desconhecida tornou-se uma grande amiga e um exemplo de profissional a ser seguido, tanto pela sua competência como pela paixão pela biologia, em especial ao tamanduá-bandeira, e toda sua problemática conservacionista.

Juntamente com a Ale uma das grandes experiências proporcionadas durante esta fase de minha vida foi participar das campanhas de capturas realizadas na Estação Ecológica de Santa Bárbara (EESB). Antes disto, houve o reconhecimento de área no Parque Estadual de Furnas do Bom Jesus, SP, onde deixo um grande abraço pelo acolhimento nos dado pelo Toninho e pelo Carlinhos. Na EESB fica um imenso sentimento de gratidão pela

aprendizagem que me foi proporcionada, e pelas boas risadas madrugadas afora, mesmo naqueles momentos onde o sentimento de angústia e *stress* dominavam. Obrigado, novamente a Ale, Jule, Clarice, Camila Dergan, Gisele, Pedro Teles, Pedro (Parlitão), Vinícius Gasparoto, Alexandre, Seu Moisés e sua acolhedora família, ao Carlos e Marcão.

Por fim, mais uma vez minha caminhada só foi possível graças ao apoio, compreensão e incentivo dado pela minha família. Aos meus pais Rose e Marcos, meus avós Laura e Bida, a minha Tia Egilma e todos que de alguma forma vem acompanhando minha trajetória, gostaria de dizer muito obrigado. Para fechar estas palavras, agradeço ao Enzo, uma pessoinha que neste momento nem nasceu ainda, mas desde a notícia de sua chegada vem fazendo com que meus passos sejam dados rumo a uma caminho que trará muita alegria e conquistas a minha vida. Um beijo do Papai.

**Tira esse sorvete do
chão! Não sabe que isso
vai atrair formigas?**



RESUMO

O tamanduá bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) é uma espécie pertencente a Magma Ordem Xenarthra, a qual possui ampla distribuição ao longo da região Neotropical. Esta espécie é encontrada em todos os biomas brasileiros, no entanto, ela está classificada como vulnerável pela IUCN a nível mundial, nacional e estadual, no estado de São Paulo. Esta classificação é relacionada diretamente com a forte pressão antrópica que acomete o animal e seu habitat, como é o caso do cerrado. Este trabalho teve por objetivo verificar a diversidade genética, utilizando o marcador mitocondrial CytB, de uma amostra da população de tamanduá-bandeira pertencente a região do estado de São Paulo. As amostras de material biológico utilizadas no estudo provém de campanhas de capturas (n = 8) realizadas na Estação Ecológica de Santa Bárbara (EESB), e de parcerias estabelecidas com o Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", FCAV- UNESP, Câmpus de Jaboticabal (n = 11), o Hospital Veterinário "Dr. Halim Atique", Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP, São José do Rio Preto, SP (n = 12), e o Laboratório de Ecologia de Mamíferos (LEMA), FCAV- UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP (n = 1). Após os processos de extração, amplificação e sequenciamento do DNA foram inferidas análises estatísticas pertinente a genética populacional. Dentre as 34 amostras analisadas foram encontradas apenas três haplótipos, dos quais um é exclusivo da EESB. A distância genética encontrada entre as amostras foi praticamente nula, variando entre 0,000 e 0,002, enquanto, o gráfico de distribuição par-a-par apresentou uma curva do tipo unimodal, indicando que a população possivelmente vem de um evento de expansão recente. Os índices de diversidade genética foram muito baixos indicando que os indivíduos analisados são praticamente idênticos pela perspectiva da genética de populações, e o teste de AMOVA mostrou que não há estruturação genética nesta população. Foi possível observar que a baixa diversidade genética associada as características biológicas do animal, juntamente com as ações antrópicas de degradação de habitat, fazem com que a espécie estudada permaneça nas listas de animais ameaçados. Contudo, A EESB serve como um reduto genético para a espécie no estado, sendo sua conservação de extrema importância para a fauna do cerrado e para o entendimento de como as populações das unidades de conservação estão sofrendo com a fragmentação de habitat e outras adversidades causadas pela intervenção humana.

Palavras-Chave: Genética da conservação. Xenarthra. Unidade de conservação. Cerrado.

ABSTRACT

The giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) is a specie that composes the Magma Order Xenarthra, which has a wide distribution along Neotropics. This specie is found in all Brazilian biomes, however, it is listed by the IUCN as vulnerable on global, national and state level (São Paulo). This classification is directly related to the strong anthropic pressure that affects the animal and its habitat, such as cerrado. This study aimed to verify the genetic diversity, using the mitochondrial marker CytB, of a population's sample of giant anteater from some regions of São Paulo. The biological material used in the study came from captures campaigns (n = 8) in Santa Bárbara Ecological Station, SP, (EESB), and from Veterinary Hospital "Governador Laudo Natel" FCAV- UNESP, Jaboticabal (n = 11), from Veterinary Hospital 'Dr. Halim Atique 'Rio Preto University Center, UNIRP, São José do Rio Preto, SP (n = 12), and from Mammalian Ecology Laboratory (LEMA), FCAV- UNESP, Jaboticabal, SP (n = 1). After extraction process, amplification and DNA sequencing were inferred relevant statistical analyzes population genetics. Among the 34 samples analyzed, were found only three haplotypes, one of which is exclusive to EESB. The genetic distance found among the samples was practically nil, ranging from 0.000 to 0.002, while the pairwise distribution showed a unimodal curve, indicating that the population possibly comes from a recent expansion event. The genetic diversity indices were very low, which indicates that the individuals analyzed are practically identical from the perspective of population genetics, and AMOVA test showed that there is not structure in this population. It was observed that the low genetic diversity associated with the biology of the animal, together with anthropogenic habitat degradation, make this specie stays in list of endangered animals. However, EESB serves as a genetic stronghold for the specie in the state, and their conservation is extremely important to the fauna of the cerrado and the understanding of how populations of protected areas are suffering from habitat fragmentation and other adversities caused by human intervention.

Key-words: Conservation genetics. Xenarthra. Conservation unit. Brazilian savanna.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa do estado de São Paulo com destaque (em hachurado) para a área de domínio do mosaico vegetacional compostos pelos fragmentos de cerrado. No canto superior direito é mostrada a localização do estado de São Paulo no Brasil..... 16
- Figura 2. Relação filogenética das famílias que compõe os xenartras, mostrando uma escala temporal do possível surgimento de cada uma destas. Fonte: Delsuc e Dosery, (2009). 19
- Figura 3. Distribuição geográfica do tamanduá-bandeira (em amarelo), com destaque (em vermelho) para as áreas onde a espécie está provavelmente extinta. Fonte: IUCN - International Union for Conservation of Nature (IUCN 2015)..... 21
- Figura 4. Estação Ecológica de Santa Bárbara (contorno preto), Floresta Estadual Águas de Santa Bárbara (contorno verde) e as áreas agrosilvopastoris de entorno. O losango vermelho, representa o Município de Águas de Santa Bárbara. Em tracejado amarelo está a SP280, em laranja a SP261 e em vermelho a estrada da Erva. No canto superior direito é mostrado a localização da reserva no estado de São Paulo. Arte do mapa: Alessandra Bertassoni..... 24
- Figura 5. Mapa do estado de São Paulo (contorno preto) com destaque (em vermelho) para a área de cerrado. Os círculos coloridos representam as cidades de origem das amostras (Tabela 1). 26
- Figura 6. Rede de haplotípica gerada pelo programa TCS1.21, indicando a relação entre os haplótipos encontrados. O algarismo romano representa a identificação específica do haplótipo. Entre parênteses é mostrado sua frequência. 32
- Figura 7. Árvore Neighbor-Joining gerada com o auxílio do programa MEGA6 relacionando as localidades. Foi utilizado uma sequência do gene mitocondrial CytB, da espécie *Dasypus novemcinctus* (GenBank acesso: AF493839.1) para enraizar a análise. 33
- Figura 8. Distribuição par-a-par, mostrando uma curva do tipo unimodal, com o valor de $R_2 = 0,1064$ 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de identificação das amostras conforme tombamento no Laboratório de Biologia Evolutiva (LaBE), FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, localidade de origem e coordenadas geográficas expressa em graus decimais.....	25
Tabela 2. Composição nucleotídica das sequências iniciadoras, direto (F) e reverso (R), utilizadas para a amplificação do gene mitocondrial CytB.....	27
Tabela 3. Agrupamentos realizados apriori baseados na distribuição geográfica das amostras levando em consideração o Rio Tietê como barreira geográfica (Pop I, sul da barreira e Pop II, norte da barreira). A Pop III e IV, foram construídas de acordo com o teste SAMOVA. A população total é constituída por todos os indivíduos amostrados.	30
Tabela 4. Localidade de origem e nº voucher dos indivíduos amostrados relacionado aos haplótipos encontrados. Entre parênteses é indicado a frequência de cada haplótipo.....	31
Tabela 5. Índices de diversidade genética gerados com o auxílio do programa DnaSP v.5, para as populações definidas na tabela 3.	34
Tabela 6. Análise de Variância Molecular (AMOVA) gerada sem agrupamentos pré-definidos.....	35
Tabela 7. Análise de Variância Molecular (AMOVA) com agrupamentos gerados pelo teste SAMOVA	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Objetivos.....	14
1.1.1	Objetivos específicos	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Conservação da mastofauna do cerrado.....	15
2.2	Diversificação e evolução dos xenartras.....	18
2.3	O tamanduá-bandeira.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Área de estudo	23
3.2	Amostras	24
3.3	Extração, amplificação e sequenciamento	27
3.4	Análise estatística	28
3.4.1	Leitura das sequências nucleotídicas	28
3.4.2	Construção de rede de haplótipos.	28
3.4.3	Distância genética	28
3.4.4	Distribuição par-a-par e diversidade genética.....	29
3.4.5	Estruturação genética	29
4	RESULTADOS	31
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS.....	42
	APÊNDICE.....	48

1 INTRODUÇÃO

O tamanduá-bandeira é um mamífero que possui ampla distribuição pelo continente americano, desde o norte da América Central, até o sul da América do Sul. Este é encontrado praticamente em todos os biomas brasileiros. No entanto, ele aparece como animal vulnerável em várias listas de animais ameaçados de extinção, a nível nacional e internacional.

Sua vulnerabilidade está associada a fortes pressões antrópicas exercidas diretamente na espécie, no caso de caça ao animal, também como a pressão exercida no ambiente habitado por esta. Essas pressões podem ser as queimadas, a substituição de vegetação natural por sistema agrosilvopastoris e até atropelamentos devido a construção de rodovias. Todas estas interferências contribuem para que a espécie continue sofrendo riscos de extinção, assim como outros mamíferos que tiveram existência eliminada por ações humanas.

Uma das maneiras de contribuir para a manutenção das espécies são os estudos conservacionistas. Estes trabalhos têm como principal objetivo, utilizar técnicas e teorias pertinentes à várias áreas da biologia, aplicando-as de maneira a responder perguntas que vão de encontro com projetos para a conservação da fauna e flora existentes em nosso planeta.

Dentro da área denominada Biologia da Conservação há a Genética da Conservação que utiliza ferramentas da genética populacional para gerar dados que possam nortear ações de manejo de populações ameaçadas, ou ainda servir como alicerce para políticas de proteção a áreas sob risco de ameaças de degradação, planos de manejo de unidades de conservação, paralização de obras que possam prejudicar a fauna, entre outras aplicabilidades.

Para que dados genéticos possam ser aplicados para fins conservacionistas é necessário escolher o marcador genético adequado a cada tipo de trabalho a ser desenvolvido. Marcadores mitocondriais geralmente são utilizados para inferir eventos evolutivos mais antigos dentro da população. Estes devido a suas características de propagação durante a fecundação, carregam a história matrilinear de determinada linhagem, sofrendo poucas recombinações ao longo do tempo.

Este trabalho se propôs estudar uma amostra populacional de tamanduá-bandeira no estado de São Paulo, do ponto de vista genético populacional, com a utilização do marcador mitocondrial CytB. E Pretende-se contribuir para o conhecimento genético desta espécie, como também embasar ações conservacionistas para a mesma e seus habitats.

1.1 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo investigar a diversidade genética do tamanduá-bandeira no estado de São Paulo, por meio da utilização do marcador mitocondrial CytB, assim como a estruturação das populações analisadas, almejando produzir conhecimento para a conservação desta espécie.

1.1.1 Objetivos específicos

- Obter os parâmetros de diversidade genética para a população em estudo;
- Identificar possível estruturação na população de tamanduás-bandeira no estado de São Paulo;
- Identificar padrões de expansão demográfica da espécie;
- Gerar dados que sirvam de suporte, baseado em análises populacionais para possíveis manejos de indivíduos no estado de São Paulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conservação da mastofauna do cerrado

O termo cerrado é usado comumente pela comunidade científica para designar um complexo que abrange três biomas com fitofisionomias distintas, o campo tropical, a savana e a floresta estacional. Sendo assim, pensar em cerrado apenas como um ambiente savânico suprime sua complexidade (BATALHA, 2011). Para fins práticos, este complexo será tratado durante o decorrer do trabalho com a grafia cerrado apenas, uma vez que há o entendimento que esta área representa um mosaico de formações distintas de vegetação.

O cerrado, possui uma área aproximada de 200 milhões de hectares, fazendo-o menor apenas que a Amazônia (KLINK; MACHADO, 2005), sendo, juntamente com a Mata Atlântica, considerado um dos *hot spots* para a conservação (MYERS et al., 2000). Apenas 7,44% de sua área é protegida por unidades de conservação, sendo dentro desta porcentagem apenas 2,91% protegida integralmente, por parques nacionais (CSR/IBAMA, 2009), como é o caso do Parque Nacional de Brasília-DF e o Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros-GO.

No estado de São Paulo (Figura 1), o cerrado, teve perda de área exacerbada desde a década de 1970. Anteriormente, o que era caracterizado como cerrado, cobria aproximadamente 14% do estado e até o ano de 2005 sua área caiu para 0,81% apenas (SÃO PAULO, 1997; KRONKA et al., 2005). A área original restante encontra-se extremamente fragmentada, devido à forte ação antrópica.

Dentre os fatores que contribuem para a fragmentação das áreas remanescentes de cerrado, temos a substituição das vegetações originais por pastagens para o gado, e os cultivos de monoculturas, como a soja, que é predominante na região central do Brasil (BRAGA; 2003; DURIGAN, 2007; CARVALHO; DE MARCO JUNIOR; FERREIRA, 2009).

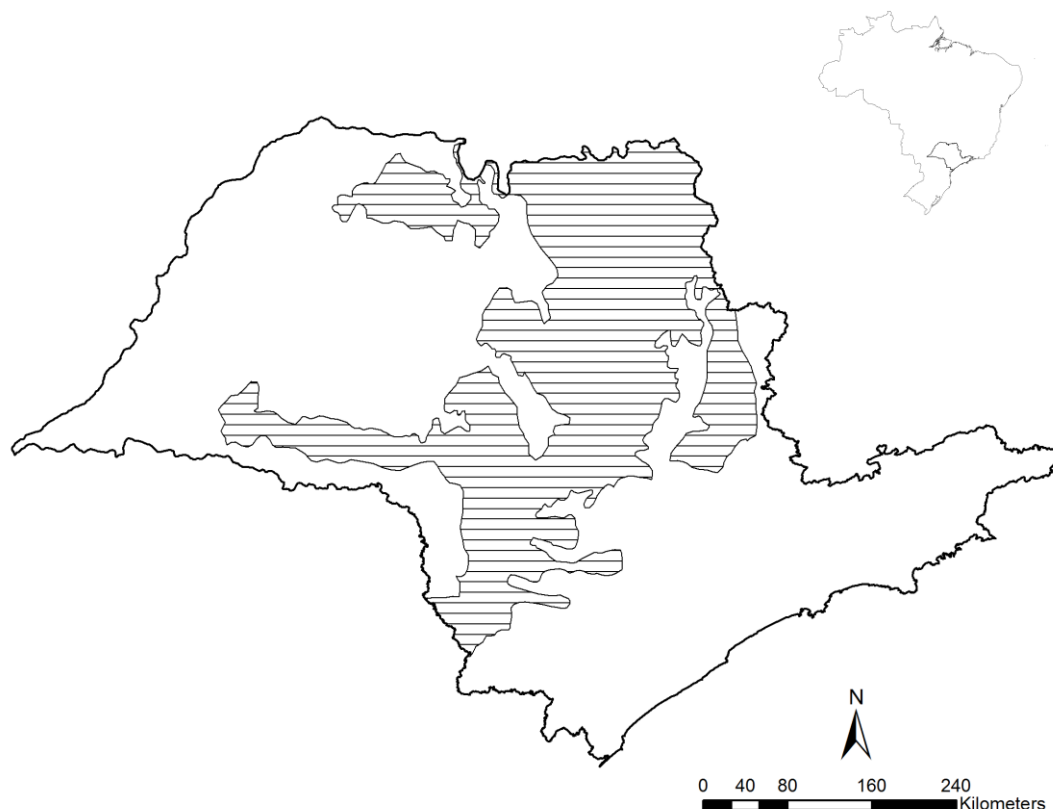


Figura 1. Mapa do estado de São Paulo com destaque (em hachurado) para a área de domínio do mosaico vegetacional compostos pelos fragmentos de cerrado. No canto superior direito é mostrada a localização do estado de São Paulo no Brasil.

A construção de auto estradas faz com que alguns fragmentos de cerrado sejam ainda mais retalhados. Muitos animais atravessam as rodovias e acabam sendo atropelados. Alguns trabalhos abordam o impacto que os atropelamentos causam na fauna que habita as áreas ao redor das estradas brasileiras, GO-060, (CUNHA; ALVES; SOUSA SILVA, 2010), GO-050, GO-206 BR-359 (SILVA NETO et al., 2015), no estado de Goiás, MG-354 (SANTOS; ROSA; BAGER, 2012), BR-050 (CARVALHO; CUSTÓDIO; MARÇAL JÚNIOR, 2015), no estado de Minas Gerais e a RS-135 (HEGEL; CONSALTER; ZANELLA, 2012) no estado do Rio Grande do Sul. É possível observar que os mamíferos que aparecem com mais frequência nos estudos supracitados são o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), o quati (*Nasua nasua*), a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), o tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), o tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), o tatupeba (*Euphractus sexcinctus*), o rato silvestre (*Conepatus semistriatus*) e a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Ainda há aqueles que são impossíveis de identificar a espécie devido ao estado de decomposição em que são encontrados nas rodovias.

As queimadas são parte da dinâmica natural do cerrado, envolvendo processos de desenvolvimento, morte e sucessão de várias espécies vegetais. No entanto, estas acontecem

em um intervalo de tempo grande, que ocorre ao acaso, pois geralmente o início do fogo vem com a queda de raios na vegetação. Além disto, há um histórico de uso de queimadas desde tribos indígenas horticultoras e caçadoras, e conseguinte a chegada dos europeus há aproximadamente 300 anos, como uma ferramenta para a limpeza da vegetação nativa, para a formação de pastagens e áreas agriculturáveis (BRIANI; VIEIRA, 2006).

Quando não controladas, as queimadas, podem ser extremamente prejudiciais a fauna local. Em 1994, 97% área do Parque Nacional das Emas, GO foi devastada devido a um evento de queimada. Foram estimados que 342 tamanduás-bandeira morreram pela ação do fogo, restando apenas 43, em uma área de 131.868 hectares (SILVEIRA et al., 1999). Esse evento fez com que a população de tamanduá-bandeira restante, passasse por um gargalo genético, que elevou as taxas de endogamia da população, diminuindo sua variabilidade genética (COLEVATI, 2007).

A conservação das espécies também é ameaçada pela caça de animais silvestres. Há evidências que relacionam a extinção de mamíferos da megafauna norte americana, principalmente o mamute, com a prática da caça pelos povos que habitavam esta região há aproximadamente 10.000 anos (HUBBE et al., 2003). No Brasil do século XX, esta atividade foi legal e regulamentada entre 1937 e 1967 e nos anos que se seguiram, esta passou não mais a ser permitida como atividade profissional, sendo regulamentada apenas como atividade esportiva. Em 1988, a atividade de caça foi encarada como crime inafiançável, e a partir de 1998 até os tempos atuais, sua realização é permitida, desde que seja com a finalidade de saciar a fome daquele que a realiza, ou de sua família. Contudo, há uma carência de mecanismos de fiscalização e regulamentação desta prática (VERDADE; SEIXAS, 2013).

Outro fator que agrava a mortandade destes animais está relacionado com a percepção que muitos moradores de áreas próximas as unidades de conservação (UC) tem a respeito da fauna. Não são raras as lendas que associam a fauna a personagens vistos como perigosos aos seres humanos. Este é o caso do tamanduá-bandeira, que na mitologia Krahó é associado a uma fera chamada “hunkóputxit” capaz de matar homens e outros animais com suas enormes garras (MELATTI,1992). Por relatos de moradores do entorno de UCs, é possível encontrar histórias de que este animal seria capaz de asfixiar uma pessoa colocando sua língua nas vias respiratórias do indivíduo (BERTASSONI, 2012). A falta de conhecimento a respeito de determinadas espécies, juntamente com práticas históricas de caça ilegal ou de subsistência,

são prejudiciais para a conservação das espécies animais, sejam do cerrado ou de outro biomas (CHIARELO, 2000; METZGER, 2006).

Visto alguns dos entraves existentes para a conservação do cerrado e de suas espécies, mais especificamente os mamíferos, faz-se necessários a realização de projetos, tanto de cunho governamental, quanto não governamental, associados aos conhecimentos científicos que envolvem a biologia da conservação (EIZIRIK, 1996). No cerrado existem vários projetos que visam a conservação de sua mastofauna.

O CENAP (Centro Nacional de Pesquisas para Conservação dos Predadores Naturais) é um centro de pesquisa de manejo e conservação de mamíferos carnívoros do Brasil, ligado ao Ministério do Meio Ambiente pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Neste é possível encontrar alguns projetos em desenvolvimento, específicos para o cerrado, como o “Programa para a Conservação do Lobo-Guará - Lobos da Canastra”, realizado na Serra da Canastra, MG. São desenvolvidos diversos trabalhos de caráter ecológico, genético, de sanidade do animal, e até a ações educativas com os moradores do entorno do parque. Ainda pelo CENAP existe o projeto de monitoramento de áreas protegidas e amostragem da fauna brasileira por veículos não tripulados, e o projeto de conservação do cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) (<http://www.icmbio.gov.br/cenap/o-que-fazemos/projetos-de-pesquisa.html>).

Algumas organizações não governamentais (ONGs) também desenvolvem projetos de conservação com mamíferos do cerrado. Este é o caso do Instituto para a Conservação dos Carnívoros Neotropicais – Pró-Carnívoros (<http://procarnivoros.org.br>), a ONG de Pesquisa e Conservação do Cerrado - PEQUI (<http://www.pequi.org.br/pequi.html>), e o Instituto de Pesquisas Ecológicas - IPÊ (<http://www.ipe.org.br>). No entanto, nota-se que os principais mamíferos alvos do trabalho dessas instituições são em sua maioria, felinos de médio e grande porte, além do lobo-guará. Algumas ONGs não possuem projetos com enfoque estrito na mastofauna do cerrado, mas dão suporte a outros projetos, como é o caso da ONG Projeto Tamanduá (<http://tamandua.org>).

2.2 Diversificação e evolução dos xenartras

A magna ordem Xenarthra, formada pelos tamanduás, preguiça e tatus (MCKENNA; BELL, 1997) foi denominada *a priori* por Linnaeus (1758) como grupo “*Bruta*”, devido a

morfologia peculiar que seus representantes apresentam em relação a outros mamíferos, (NAPLES, 1999). A monofilia do grupo é suportada morfologicamente pela existência de uma articulação adicional entre as vertebrae da coluna vertebral, denominada xenartria. Dados moleculares corroboram a monofilia do grupo pela deleção de três aminoácidos da cadeia protéica α -cristalina A (DELSUC; DOSERY, 2009).

No grupo temos a família Dasypodidae (Cingulata) como táxon mais basal, tendo se separado da ordem Pilosa (preguiças e tamanduás), entre o período Cretáceo e o Paleógeno (70,5 Ma, Figura 2, ponto 1). Os tamanduás pertencem a subordem Vermilingua e estes, por sua vez, divergiram das preguiças, subordem Folívora há aproximadamente 60 Ma no meio do Paleoceno (Figura 2, ponto 2). Dentro de Vermilingua há duas famílias (Figura 2, ponto 3), a Myrmecophagidae, a qual é composta pelo tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), e os tamanduás, *Tamandua tetradactyla* e *Tamandua mexicana* e a família Cyclopedidae, sendo representada por uma única espécie, o tamanduáí (*Cyclopes didactylus*). Estas duas famílias teriam se separado no meio do Eoceno (~ 40 Ma) (DELSUC; DOSERY, 2009).

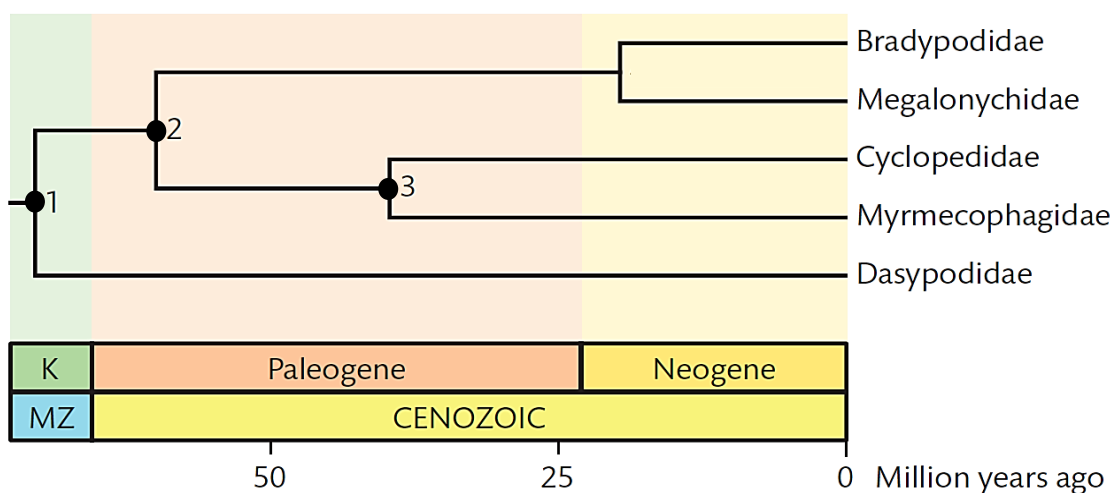


Figura 2. Relação filogenética das famílias que compõe os xenartras, mostrando uma escala temporal do possível surgimento de cada uma destas. Fonte: adaptado de Delsuc e Dosery, (2009).

Dados moleculares baseados no gene mitocondrial 16S rRNA, evidenciam a linhagem que deu origem a *Cyclopes didactylus* como a primeira a se diversificar (~31,8 Ma) na família Myrmecophagidae, seguido do grupo formado pelos gêneros *Myrmecophaga* e *Tamandua*, com diversificação datada em aproximadamente 12,9 Ma (BARROS; SAMPAIO; SCHEIDER, 2003)

O grupo dos xenartras é um modelo adequado para os estudos dos padrões evolutivos da biodiversidade na região neotropical, pois pertencem aos clados mais basais dos mamíferos eutérios, sendo o único grupo a evoluir exclusivamente nessa região (SUPERINA; LOUGHRY, 2015). Os primeiros registros fósseis do grupo datam do Paleoceno há 58 milhões de anos, mas foi no período Terciário que a maior diversificação de espécies teria ocorrido. Este fato está relacionado ao isolamento da América do Sul do continente africano no Cretáceo superior (85-65 Ma). Até o momento do grande intercâmbio faunístico da América (GABI – Great American Biotic Interchange), os xenartras foram os mamíferos placentários mais bem sucedidos no continente sul-americano, ocupando diversos nichos ecológicos e possuindo formas gigantes, como a preguiça gigante e o gliptodonte (SIMPSOM, 1980; DELSUC et al., 2004).

O surgimento do Istmo do Panamá possibilitou que a placa continental sul americana se conectasse com a porção norte do continente e com isso, foi possível que o GABI. Este evento possibilitou que muitas famílias de xenartras, atualmente extintas, ocupassem a região norte, onde hoje seria os Estados Unidos. No entanto, apenas oito espécies viventes do grupo são encontradas fora da América do Sul. São estas, o tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), o tamanduá (*Tamandua mexicana*), e o tamanduáí (*Cyclopes didactylus*), a preguiça-comum (*Bradypus variegatus*), a preguiça-real (*Choloepus hoffmanni*), e a preguiça-anã (*Bradypus pigmaeus*), o tatu-de-rabo-mole (*Cabassous centralis*), e o tatu-galinha (*Dasypus novencintus*), sendo este último o único representante da magna ordem a ser encontrado na América do Norte nos dias atuais, mais especificamente no sul dos Estados Unidos (MORAES-BARROS; ARTEGA, 2015).

Outros eventos geológicos influenciaram na evolução do grupo, como o soerguimento das Cordilheiras dos Andes que promoveu alterações no clima atmosférico e serviu como barreira de isolamento geográfico. Este evento teve influência direta na diversificação de tamanduás e tatus no Eoceno, na radiação da linhagem que deu origem as preguiças modernas e a subfamília Tolipeutinae no começo do Mioceno, e a diversificação no gênero *Dasypus* no Mioceno superior (7 Ma), quando houve aumento significativo na altura dos Andes (DELSUC et al., 2004; MORAES-BARROS; ARTEGA, 2015). Ainda, segundo Moraes-Barros e Artega (2015), a separação entre Floresta Amazônica e Mata Atlântica, juntamente com a distribuição longitudinal da Mata Atlântica são outros eventos geológicos, ocorridos na América do Sul que possuem forte influência na evolução dos xenartras.

2.3 O tamanduá-bandeira

O tamanduá-bandeira, *Myrmecophaga tridactyla* (LINNAEUS, 1758) possui algumas adaptações, como o alongamento do rostro e sua língua protuberante, que lhe confere vantagens na obtenção e aproveitamento do alimento, uma vez que ele se alimenta quase exclusivamente de formigas e cupins (NAPPLES, 1999). Ainda esta espécie pode ser caracterizada por uma boca tubular ínfima, ausência de dentes, orelhas e olhos reduzidos, corpo recoberto por pelos longos e grossos, patas dianteiras que apresentam três grandes garras e cauda longa com pelos cumpridos.

Sua distribuição geográfica ocorre desde Honduras na América Central, até a região do Gran Chaco na Bolívia, Paraguai e Argentina, na América do Sul (Figura 3). Porém, há algumas localidades no Brasil onde o animal está provavelmente extinto, como nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e região Sul. Em outros países como Belize, Guatemala, El Salvador, Costa Rica e Uruguai, a situação é semelhante (MIRANDA; BERTASSONI; ABBA, 2014).

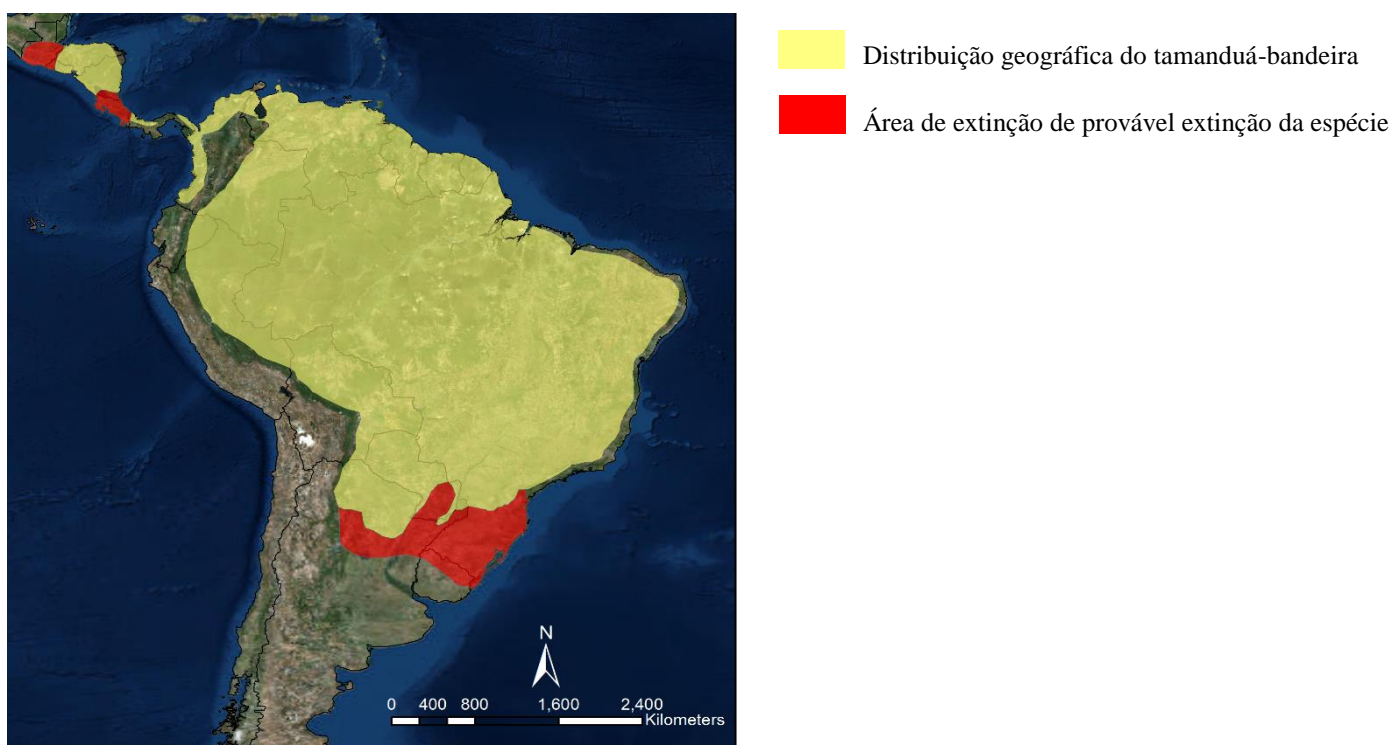


Figura 3. Distribuição geográfica do tamanduá-bandeira (em amarelo), com destaque (em vermelho) para as áreas onde a espécie está provavelmente extinta. Fonte: IUCN - International Union for Conservation of Nature (IUCN 2015)

O tamanduá-bandeira está listado na IUCN - *International Union for Conservation of Nature* (IUCN 2015) a nível mundial, no Livro Vermelho da Fauna (MEDRI; MOURÃO, 2008) a nível nacional, e na Lista de Vertebrados Ameaçados de Extinção (BRESSAN et al, 2009) a nível estadual, em todas estas como vulnerável. A perda de habitat devido às queimadas (SILVEIRA et al., 1969; KLINK; MACHADO, 2005) e à substituição de áreas naturais por áreas agrosilvopastoris (BRAGA, 2003) são ações que contribuem para que a espécie ainda permaneça nas listas de animais ameaçados de extinção. Além desses fatores, ainda devem ser considerados os atropelamentos em rodovias (CASELLA et al., 2006, BRAGA, 2003) e a caça ilegal (LEEUWENBERG 1997; VERDADE; SEIXAS, 2013).

Há poucos dados sobre as populações cativas de tamanduá-bandeira, porém a literatura mostra que a manutenção deste em cativeiro é difícil. Baixas taxas de reprodução e de sobrevivência dos recém nascidos são reportadas, sendo encontrados animais natimortos, em que as principais causas dessas mortes estão ligadas a quadros de insuficiência respiratória, traumatismos, colapso cardiovasculares, choque hipovolêmico, inanição e septicemia (LEIVA; MARQUES, 2010).

As diretrizes mundiais e nacionais para a conservação das espécies indicam estudos de densidade populacional, população mínima viável e a análise genética das populações como essenciais para que planos de manejos sejam traçados adequadamente (MEDRI; MOURÃO, 2008; SUPERINA et al., 2010). Consequentemente, as ações decorrentes de projetos conservacionistas, podem ter um embasamento científico adequado que ampare e direcione suas iniciativas, visando sempre o melhor para a proteção e conservação da espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O mosaico de vegetação da Estação Ecológica de Santa Bárbara (-22°48'59",-49°14'12") (EESB), a Floresta Estadual Águas de Santa Bárbara (FEASB), e o entorno destas, localizadas no município de Águas de Santa Bárbara, SP constituíram a área do estudo (Figura 4), onde foram realizadas as campanhas de captura do tamanduá-bandeira, para a coleta de material biológico, e busca de restos de animais mortos dentro da EESB.

A EESB é uma unidade de conservação (UC) que apresenta 27 km² em mosaico de cerrado *lato sensu*, matas ciliares, áreas com Floresta Estacional e porções com talhões de *Pinus*. A unidade é dividida em quatro áreas pelas rodovias SP-280 (Castelo Branco), e duas estradas não pavimentadas, a SP-261, e a estrada da Erva, sendo ao sul sua divisa com a área urbana (MELO; DURIGAN, 2011).

O relevo é de baixa declividade e altitude (600-680m). O clima é Cwa - clima quente e úmido com inverno seco - e as temperaturas médias nos meses mais quentes são de 24°C e nos mais frios de 17°C (MELO; DURIGAN, 2011). O entorno é representado pela Floresta Estadual Águas de Santa Bárbara (FEASB, 17 km²) de plantios de *Pinus spp.* e *Eucalyptus spp.*, e por cultivos e pastagens de fazendas vizinhas. A UC é um dos últimos remanescentes de vegetação savânica, e de campo cerrado do estado de São Paulo, sendo considerada de alta relevância para a conservação da fauna e flora do cerrado (MELO; DURIGAN, 2011).

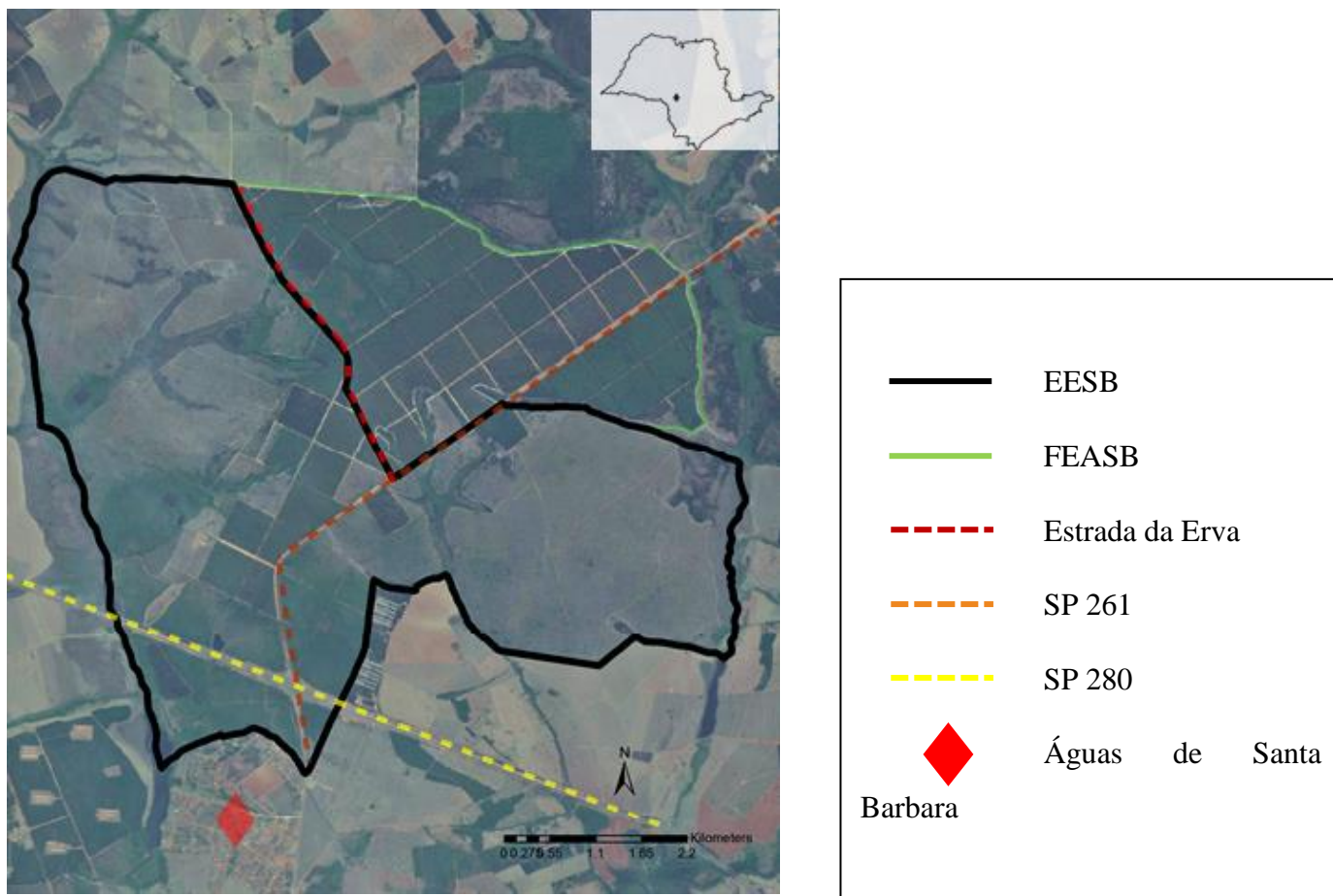


Figura 4. Estação Ecológica de Santa Bárbara (contorno preto), Floresta Estadual Águas de Santa Bárbara (contorno verde) e as áreas agrosilvopastoris de entorno. O losango vermelho, representa o Município de Águas de Santa Bárbara. Em tracejado amarelo está a SP280, em laranja a SP261 e em vermelho a estrada da Erva. No canto superior direito é mostrada a localização da reserva no estado de São Paulo. Arte do mapa: Alessandra Bertassoni.
















3.2 Amostras

O total de 34 amostras representativas de 15 localidades do estado de São Paulo foi utilizado para o trabalho (Tabela 1; Figura 5). O material biológico provém da campanha de captura realizada na EESB. Para estas capturas foram necessárias a Licença de coleta (COTEC 429/2014 D23/2013 PGH, SISBIO 38326-5), e a autorização pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (nº 003414/13) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV). Foram capturados oito animais e duas carcaças encontradas em estágio avançado de decomposição.

Ao todo três campanhas de busca e captura foram realizadas na EESB, por meio de busca ativa dos animais, com o auxílio de um carro. O esforço de captura foi investido naqueles indivíduos que foram encontrados nas estradas dentro da UC, que apresentavam

condições propícias para serem capturados, visando a segurança da equipe e o bem estar físico do animal. Ao todo a primeira campanha de captura foi realizada entre 16/10 e 19/11/2014, totalizando 292 horas de busca em 5762 quilômetros rodados. A segunda, foi realizada entre 09/01 e 10/02/2015 somando 191 horas em 2564 quilômetros de busca, e a terceira campanha, realizada entre 26/05 e 02/07/2015, percorreu 4279 quilômetros em 296 horas de trabalho de busca.

Tabela 1. Número de identificação das amostras conforme tombamento no Laboratório de Biologia Evolutiva (LaBE), FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, localidade de origem e coordenadas geográficas expressa em graus decimais.

Número de identificação	Localidade e símbolos representativos	Latitude	Longitude
5	Batatais 	-20.893344	-47.592595
11	Brodowski 	-20.986691	-47.652623
17, 27	Catanduva 	-21.131855	-48.977473
1, 2, 3, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26	EESB 	-23.068887	-49.236667
9	Ilha solteira 	-20.432311	-51.348717
14	Ituverava 	-20.335938	-47.810245
28	Jales 	-20.268686	-47.810245
6	Jurupema 	-21.366746	-48.570248
31	Nipoã 	-20.904570	-47.810245
29, 32, 33, 34, 36, 37, 38 e 35	Noroeste ¹ , SP 	-20.811761	-49.376227
30	Nova Granada 	-20.534069	-47.810245
12, 13 e 16	Ribeirão Preto 	-21.170511	-47.810245
18	Rod. Washinton Luiz 	-21.518892	-48.536058
15	Sertãozinho 	-21.149460	-47.992365
10	Taquaral 	-21.073244	-48.414482
N= 34	15 localidades		

¹ 1. As amostras denominadas Noroeste, SP, não possuem identificação da localidade de onde vieram, desta forma, foi assumida a coordenada referente a cidade de São José do Rio Preto, SP onde o material se encontrava armazenado.

Para a realização da captura foi feita a contenção físico-química do animal (quetamina 10 mg.kg^{-1} , midazolam $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ e xilazina $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), sendo que a quantidade de anestésico injetado foi baseada no peso aparente no momento da captura (MIRANDA et al., 2006). Após a completa sedação foram coletados entre um e dez mililitros (ml) de sangue periférico, e uma porção de pelos dorsais contendo bulbo capilar. Os animais foram pesados, sexados e acompanhados, no que diz respeito a seus parâmetros vitais durante o tempo de procedimento, a fim de proporcionar a redução do stress pertinente a captura e seu retorno para a vida livre sem danos causados pela intervenção da pesquisa. Todos os procedimentos foram acompanhados por médicos veterinários.

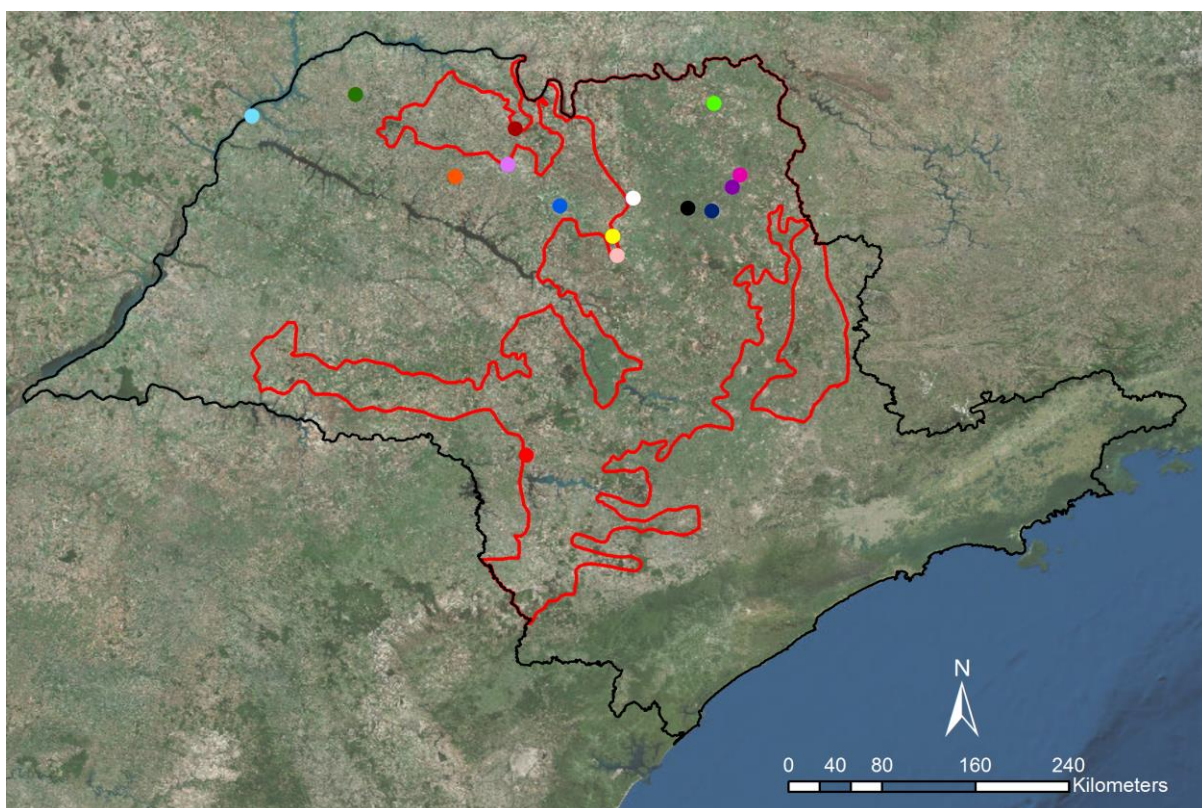


Figura 5. Mapa do estado de São Paulo (contorno preto) com destaque (em vermelho) para a área de cerrado. Os símbolos coloridos representam as cidades de origem das amostras (Tabela 1).

O restante do material foi obtido por meio de parcerias realizadas com hospitais veterinários. Onze amostras foram cedidas (sangue e tecido) pelo Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" (HVGLD), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal, FCAV-UNESP. Outras 12 amostras de DNA extraído pelo Laboratório de Imunogenética - Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de

Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), vindas do Setor de Atendimento Clínico Cirúrgico de Animais Selvagens (SACCAS) - Hospital Veterinário "Dr. Halim Atique", Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP. Uma amostra de pelo foi cedida pelo Laboratório de Ecologia de Mamíferos (LEMA) – Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária FCAV-UNESP. Estas amostras são de animais trazidos com vida aos hospitais veterinários, ou para necropsia, que geralmente são encontrados nas rodovias da região que permeiam às Instituições.

3.3 Extração, amplificação e sequenciamento

Para a extração do DNA genômico foram utilizados dois métodos. Para algumas amostras foi utilizado o protocolo padrão para extração de tecido/sangue por digestão com Proteinase K (20 mg/ml), seguido de purificação com fenol:clorofórmio e precipitação com álcool isoamílico adaptado de Sambrook et al. (1989). Detalhes podem ser encontrados no endereço eletrônico <http://www.icb.ufmg.br/lbem/protocolos>. Para o restante das amostras a extração foi feita com o *kit NucleoSpin® Tissue* (MACHEREY-NAGEL®) seguindo as instruções do fabricante.

Foi utilizado como marcador molecular o primeiro terço do gene mitocondrial Citocromo B (CytB) que possui aproximadamente 572 pares de bases (pb). Esta sequência gênica foi amplificada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLINS; FALOONA, 1987) utilizando as sequências iniciadoras, direta (F) e a reversa (R), específicas para xenartras (Tabela 2).

As condições de amplificação para o gene foram: desnaturação a 94°C por 3' seguido de 35 ciclos de 94°C por 30", 50°C por 30" e 72°C por 3', e um passo final de extensão a 72°C por 10' (CLOZATO, 2009).

Tabela 2. Composição nucleotídica das sequências iniciadoras, direto (F) e reverso (R), utilizadas para a amplificação do gene mitocondrial CytB.

Gene	Sequência (5' → 3')	Referência
CytB (F)	CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GGA ACA T	LARA-RUIZ
CytB (R)	TGG TTT ACA AGA CCA GTG TAA TTA A	et al., 2008

Para purificação do DNA, o produto da PCR foi tratado com o conjunto enzimático Ilustra™, ExoProStar™ 1-Step (GE®), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida as amostras foram sequenciadas por meio do conjunto de reagentes *Big Dye* (Perkin-Elmer ®) no sequenciador automático ABI 3730 XL DNA *Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)).

3.4 Análise estatística

3.4.1 Leitura das sequências nucleotídicas

A partir dos cromatogramas gerados pelo sequenciamento automático, as sequências nucleotídicas foram lidas através do *software* Chromas Lite v. 2.01 (Technelysium Ltd., 2005). O programa BioEdit v. 7.2.0 (GARCIA et al., 1999) foi utilizado para inspecionar a leitura dos eletroferogramas gerados, editar e corrigir possíveis artefatos de técnica.

3.4.2 Construção de rede de haplótipos.

A rede haplotípica foi construída baseando-se no método estatístico, não paramétrico, da parcimônia. Para tal, foi utilizando o programa TCS1.21, onde as sequências de DNA são analisadas par-a-par, e quando estas apresentam diferenças mutacionais acima de 95% a ligação entre elas é rompida, indicando o número máximo de mutação entre estas, por meio de critério da parcimônia (CLEMENT et al., 2000).

O índice de confiabilidade utilizado foi de 95%, com a exclusão dos “gaps” como quinto estado. Todos os indivíduos sequenciados foram utilizados para compor a matriz de dados utilizada na análise. Nesta, foi possível verificar quais indivíduos compartilham os haplótipos informado pela rede.

3.4.3 Distância genética

Para as estimativas de distância genética foi utilizado o programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013). O programa utiliza um algoritmo que faz uma comparação par-a-par entre as sequências, ou seja, as sequências nucleotídicas são comparadas duas-a-duas entre si, gerando desta forma, um valor numérico para a distância genética entre elas. Todas as sequências são

comparadas, sendo possível obter um valor médio de distância genética geral e/ou entre agrupamentos pré-definidos pelo pesquisador. O modelo de substituição nucleotídica adotado para as análises foi o Kimura 2P, que pressupõe que as taxas de transversão e transição são diferentes, porém a frequência de bases se mantém a mesma (SCHNEIDER, 2007).

3.4.4 Distribuição par-a-par e diversidade genética

No programa DnaSP 4.0 (LIBRADO; ROZAS, 2009) foi realizada a análise de distribuição par-a-par. Esta evidencia a história demográfica da população em estudo por representações gráficas. Em uma população em equilíbrio demográfico a um longo e contínuo tempo, é esperado que seja apresentado um padrão multimodal de distribuição, enquanto numa população que passou por uma recente expansão apresenta uma curva de distribuição unimodal. Eventos de gargalo populacional geralmente apresentam resultados próximos a zero, ou padrões bimodais. Este último padrão, também pode ser atribuído a populações que tiveram, em um primeiro momento, contato e após seu isolamento por um longo período de tempo, voltaram a ter contato (SLATKIN; HUDSON, 1991; ROGERS; HARPENDING, 1992; FRANKHAM et al., 2004).

Ainda com o mesmo *software*, foram calculados os índices de diversidade genética. A diversidade nucleotídica (π), indica a probabilidade de dois nucleotídeos se retirados ao acaso de uma determinada sequência serem diferentes entre si. A probabilidade de duas sequências tiradas ao acaso de uma população, serem iguais, é dada pela diversidade haplotípica (H_d). O número de sítios segregantes (s) indica a quantidade de sítios polimórficos existentes na população.

Também foi calculado o número médio de diferenças nucleotídicas (k) entre os indivíduos e o número de sítios migrantes (N_m) e os índices de fluxo gênico, sendo a diferenciação de frequência gênica entre populações (D_{st}), e a proporção interpopulacional da variabilidade genética (G_{st}), dado por, $G_{st} = D_{st} / H_t$, onde H_t é o índice de heterozigosidade da população total. No entanto, devido ao número reduzido da amostra, segundo Nei (1982) se faz mais adequando o uso de δ_{st} e λ_{st} respectivamente no lugar de D_{st} e G_{st} .

3.4.5 Estruturação genética

A análise de variância molecular (AMOVA) para elucidar a distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações amostradas de acordo com sua localidade de origem foi realizada no programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Para a definição dos grupos presentes na AMOVA foi utilizado o programa SAMOVA 2.0 (DUPALUP et al., 2002), que relaciona as populações geograficamente homogêneas com a máxima diferenciação que pode ocorrer entre elas.

Para a realização dos testes de estruturação da população as amostras foram divididas da seguinte forma: a primeira população (Pop I, n=10) foi constituída por todos os animais da EESB, e fica localizada no centro sul do estado, abaixo do rio Tietê. A segunda população (Pop II, n=24) foi composta pelas amostras localizadas acima do rio Tietê, a noroeste do estado, que foram cedidas pelos hospitais veterinários. A terceira população (Pop III, n = 5) foi sugerida pelo algoritmo SAMOVA, por conseguinte é composta apenas pelos indivíduos da localidade de Ribeirão Preto e Catanduva. A quarta população (Pop IV, n = 19) foi composta pelos indivíduos restantes, exceto os pertencente a Pop I. Desta forma a Pop IV é composta por amostras de Batatais, Rod. Washinton Luiz, Jurupema, Ilha Solteira, Taquaral, Brodowski, Sertãozinho, Ituverava, Jales, Nova Granada, Nipoã, e Noroeste, SP. A Pop Total é constituída por todos os indivíduos analisados. A Tabela 3 identifica cada indivíduo pertencente aos agrupamentos realizados.

Tabela 3. Agrupamentos realizados *a priori* baseados na distribuição geográfica das amostras levando em consideração o Rio Tietê como barreira geográfica (Pop I, sul da barreira e Pop II, norte da barreira). A Pop III e IV, foram construídas de acordo com o teste SAMOVA. A população total é constituída por todos os indivíduos amostrados.

Populações	Número de identificação do indivíduos	Número de indivíduos
Pop I	1, 2, 3, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26	10
Pop II	5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38	24
Pop III	12, 13, 16, 17, 27	5
Pop IV	5, 6, 9, 10, 11, 14, 15, 18, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38	19
Pop Total	1, 2, 3, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38	34

4 RESULTADOS

Após a reação de amplificação e verificação manual da sequências e alinhamento, os fragmentos de DNA mitocondrial apresentaram ao todo 572 pares de bases, perfazendo um total de três haplótipos distribuídos entre os 34 indivíduos (Tabela 4), em que o haplótipo de maior frequência foi encontrado em 28 indivíduos. É possível notar que a Pop I, composta pelos animais da reserva ecológica, possui os três haplótipos identificados na população, sendo o haplótipo III exclusivo da EESB. No apêndice I, é possível encontrar as sequências nucleotídicas que representam cada haplótipo encontrado, com destaque para seus sítios polimórficos.

Tabela 4. Localidade de origem e nº *voucher* dos indivíduos amostrados relacionado aos haplótipos encontrados. Entre parênteses é indicado a frequência de cada haplótipo.

Haplótipos CytB (nº <i>voucher</i>)			Localidade
I (28)	II (5)	III (1)	
19, 20, 21, 22, 23, 24, 26	1, 2	3	EESB
5			Batatais
	18		Rod. Washinton Luiz
6			Jurupema
17	27		Catanduva
9			Ilha Solteira
10			Taquaral
11			Brodowski
15			Sertãozinho
13, 16	12		Ribeirão Preto
14			Ituverava
28			Jales
30			Nova Granada
31			Nipoã
29, 32, 33, 34, 36, 37, 38 e 35			Noroeste, SP

A rede de haplótipos evidencia a relação entre os haplótipos encontrados para o gene CytB (Figura 6). Não houve nenhum passo mutacional entre eles, indicando que são haplótipos com uma relação próxima entre si.

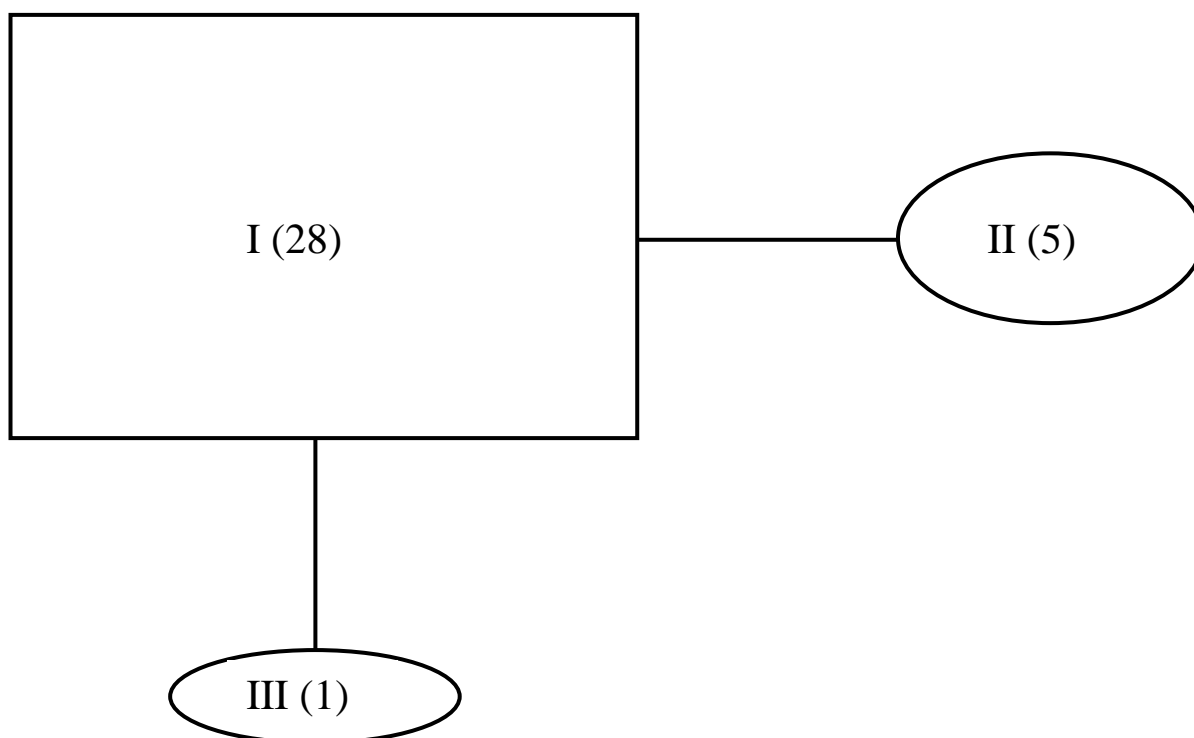


Figura 6. Rede de haplotípica gerada pelo programa TCS1.21, indicando a relação entre os haplótipos encontrados. O algarismo romano representa a identificação específica do haplótipo. Entre parênteses é mostrado sua frequência.

A análise de distância genética realizada entre todos os indivíduos amostrados revelou um valor médio de 0,001. A maior distância genética entre as amostras foi de 0,004, ocorridas entre os indivíduos 3 e 1, 3 e 2, 9 e 3, 15 e 3 e entre 23 e 3. Nota-se que o indivíduo 3 foi aquele que apresentou um haplótipo exclusivo, não compartilhado com quaisquer outro que tenha sido amostrado. A distância dentro de cada grupo foi de 0,001 para a Pop I e III, e de 0,000 para a Pop II e IV. A média entre todas as populações foi de 0,001.

A Figura 7 mostra uma árvore de *Neighbor-Joining* construída a partir das distâncias genéticas entre as localidades amostradas. Foi utilizado uma sequência do gene CytB de

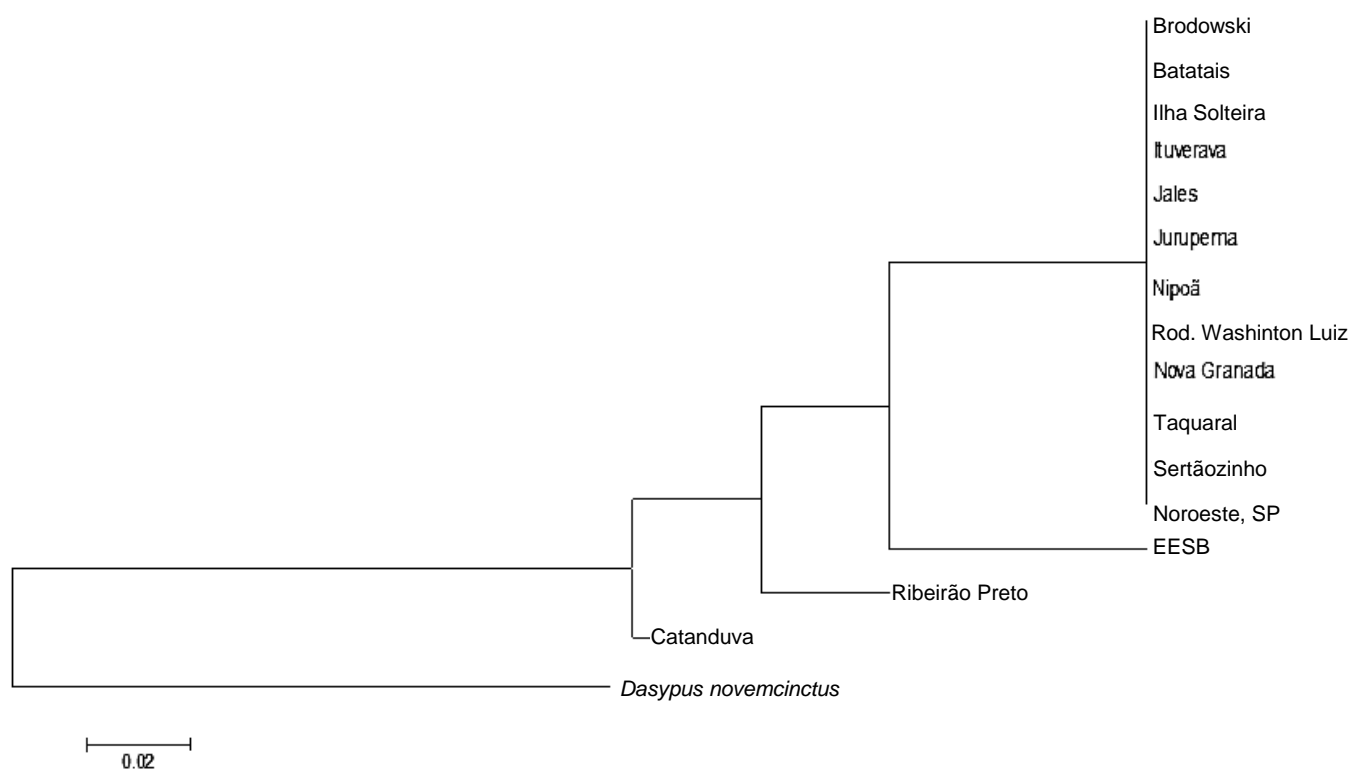


Figura 7. Dendograma *Neighbor-Joining* gerada com o auxílio do programa MEGA6 relacionando as localidades. Foi utilizado uma sequência do gene mitocondrial CytB, da espécie *Dasyurus novemcinctus* (*GenBank* acesso: AF493839.1) para polarizar a análise.

Dasyurus novemcinctus retirada do *GenBank* (nº de acesso:AF493839.1) com a finalidade de enraizar a análise.

A Figura 8 mostra um gráfico de distribuição par-a-par gerado para a população total amostrada no estado de São Paulo. A curva gerada foi do tipo unimodal, sendo o valor de R_2 foi igual a 0,1064.

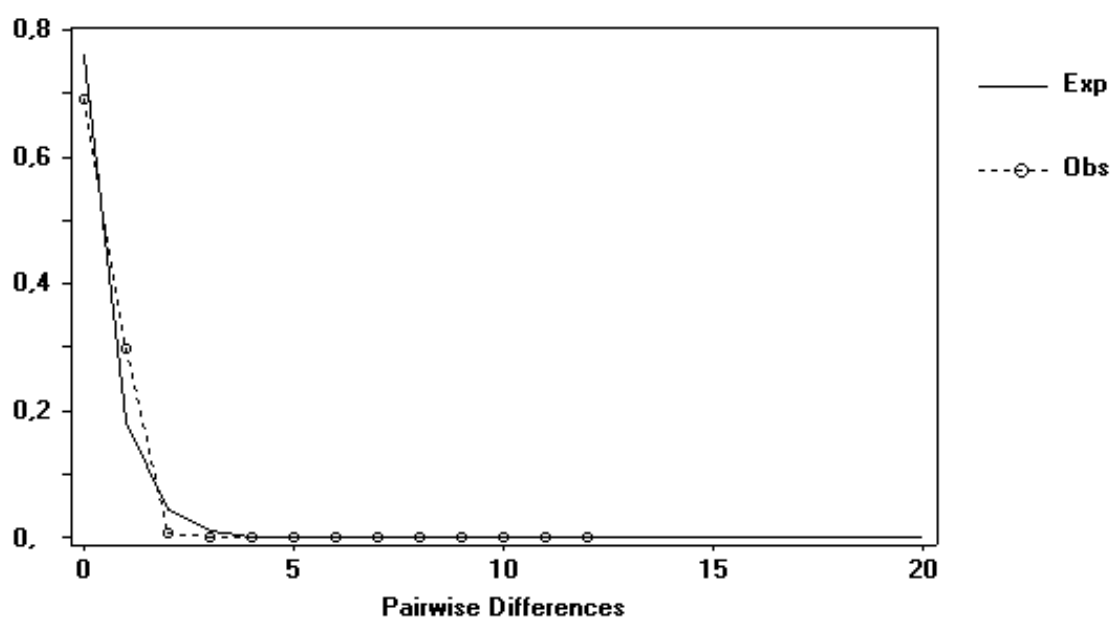


Figura 8. Distribuição par-a-par, mostrando uma curva do tipo unimodal, com o valor de $R_2 = 0,1064$.

Os parâmetros de diversidade genética para a população total e para os agrupamentos sugeridos são apresentados na Tabela 5. A Pop III é detentora dos maiores índices de diversidade haplotípica (Hd) $0,6000 \pm 0,175$, diversidade nucleotídica (π) $0,00105 \pm 0,00031$ e número médio de diferenças nucleotídicas (k) $0,6000$.

Tabela 5. Índices de diversidade genética gerados com o auxílio do programa DnaSP v.5, para as populações definidas na tabela 3.

	n	Nh	S	Hd	π	k
Pop I	10	3	2	$0,511 \pm 0,164$	$0,00097 \pm 0,00036$	$0,55556$
Pop II	24	2	1	$0,228 \pm 0,102$	$0,00040 \pm 0,00018$	$0,22826$
Pop III	5	2	1	$0,600 \pm 0,175$	$0,00105 \pm 0,00031$	$0,6000$
Pop IV	19	2	1	$0,105 \pm 0,092$	$0,00018 \pm 0,00016$	$0,105$
Pop Total	34	3	2	$0,308 \pm 0,092$	$0,00055 \pm 0,00017$	$0,31729$

Número amostral (n), número de haplótipos (Nh), número de substituições (S), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), número médio de diferenças nucleotídicas (k).

A análise de variância molecular, gerada sem agrupamentos *a priori* (Tabela 6), mostra que a população estudada não apresenta estruturação ($p = 0,27468 \pm 0,01545$). Por conseguinte, foi obtido para Pop I e Pop II os valores de frequência gênica entre populações e

a proporção interpopulacional da variabilidade genética, $\delta_{st} = 0,00001$ e $\lambda_{st} = 0,02107$ respectivamente, enquanto o número de sítios migrantes (N_m) foi de 23,23.

Tabela 6. Análise de Variância Molecular (AMOVA) gerada sem agrupamentos pré-definidos.

Fonte da variação	G.L.	S.Q.	C.V.	V%	ϕ_{ST}
Entre populações	1	0,277	0,00422 Va	1,9	
Dentro das populações	32	6,958	0,21745 Vb	98,1	0.01902
Total	33	7,235	0,22166		

Graus de liberdade (G.L), soma dos quadrados (S.Q.), componente de variação da amostra (C.V.), variação entre populações (Va) e dentro das populações (Vb), porcentagem de variação (V%) e índice de fixação (ϕ_{ST}).

Na Tabela 7, os agrupamentos gerados pelo teste SAMOVA mostram valores de $p = 1,0000 \pm 0,0000$ indicando que não há estrutura populacional. Os índices de frequência gênica entre populações e a proporção interpopulacional da variabilidade genética para as populações Pop I, Pop III e Pop IV foram respectivamente de $\delta_{st} = 0,00006$, e de $\lambda_{st} = 0,11230$ com $N_m = 3,95$.

Tabela 7. Análise de Variância Molecular (AMOVA) com agrupamentos gerados pelo teste SAMOVA

Fonte da variação	G.L.	S.Q.	C.V.	V%	ϕ_{ST}
Entre populações	2	1.000	0.00000 Va	0.00	
Entre pop. dentro do grupo	12	6.000	0.00000 Vb	0.00	0,0000
Dentro das populações	19	9.500	0.50000 Vc	100.00	
Total	33	16.500	0.500000		

Graus de liberdade (G.L.), soma dos quadrados (S.Q.), componente de variação da amostra (C.V.), variação entre populações (Va), variação entre as populações dentro do grupo (Vb), variação dentro das populações (Vc), porcentagem de variação (V%) e índice de fixação (ϕ_{ST}).

5 DISCUSSÃO

Todos os resultados indicaram que a população estudada possui pouco polimorfismo para a região CytB. São apenas três haplótipos para todas as amostras analisadas, sendo o haplótipo I, o mais frequente, estando em 28 dos 34 indivíduos que compuseram esta amostra. É possível notar que a Pop I, composta pelos animais da EESB, contém todos os haplótipos diagnosticados, sendo que o haplótipo III é exclusivo deste local e também o menos frequente. Os haplótipos I e II foram encontrados em ambos os lados do rio Tietê, mesmo este se constituindo em uma barreira geográfica para estes animais.

No lado norte do rio Tietê (Figura 5), as cidades de Ituverava e Ilha Solteira, apresentam entre si a maior distância geográfica em linha reta, com aproximadamente 454 quilômetros, e mesmo assim compartilham o haplótipo I. Clozato (2009) em seu estudo também obteve poucos haplótipos para o gene CytB no estado de São Paulo. Foram somente dois haplótipos para seis amostras de animais neste estado, sendo que o haplótipo mais frequente apareceu em quatro das amostras analisadas. Nesta pesquisa, a população total amostrada era composta por 77 indivíduos distribuídos em diferentes biomas, com um total de 12 haplótipos para o gene CytB.

A distância genética de 0,001 encontrada entre as todas as localidades estudadas é extremamente baixa ou inexistente, como pode ser visto no grau de divergência dentro da Pop II e IV que é igual a 0.000. Isto indica que os indivíduos são idênticos do ponto de vista genético para o gene estudado. Não havendo diferença genética significativa entre as populações.

Os dados de fluxo gênico corroboram com a não diferenciação genética da população uma vez que, foi obtido um $Nm=23,23$ entre a Pop I e Pop II. Este índice é extremamente elevado visto que basta que ele seja igual a 1 para demonstrar que populações de localidades diferentes estão acasalando e por conseguinte trocando material genético. Com isto há um aumento na probabilidade dessas serem similares do ponto de vista genético (SLATKIN, 1989).

Isso poderia indicar que estamos lidando com uma população com níveis elevados de endogamia, como foi visto por Colevati (2007) no Parque Nacional de EMAS (PARNA EMAS), GO. Dez anos após um forte efeito de gargalo, as subpopulações determinadas no trabalho (SPI e SPII), as quais compõe a população amostrada no PARNA EMAS,

apresentaram alto índice de endogamia 0.833 ($p = 0,01$) e 0.999 ($p = 0,01$), respectivamente SPI e SPII. A autora utilizou marcadores genéticos do tipo microssatélites para obtenção destes parâmetros, pois estes conseguem inferir uma história ecológica recente da população (GOLDSTEIN; SCHLOTTERER, 1999), diferentemente dos marcadores mitocondriais que acabam por abranger a origem de dispersão da população, pois carregam a história matrilinear das linhagens.

A distribuição par-a-par mostrou que a população do estado de São Paulo, vem de um evento recente de expansão (Figura 4). Esta recente ocupação demográfica pode estar ligada a diminuição da área de cerrado entre 32.000 e 20.000 anos atrás (MAYLE et al., 2000), o que corroboraria a possível diversificação inicial do tamanduá-bandeira no cerrado (CLOZATO, 2009). Do mesmo modo que o tamanduá-bandeira, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), apresenta uma curva de distribuição par-a-par unimodal, tendo suas expansões demográficas ligadas aos eventos ocorridos no cerrado e as mudanças climáticas do pleistoceno (GONZÁLEZ et al., 2015). A mesma situação é vista para o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (SALGADO-LABOURIAU et al. 1997; MARQUEZ et al. 2006).

Os índices de diversidade genética obtidos para a população total deste trabalho ($H_d = 0,308 \pm 0,20,092$, $\pi = 0,00055 \pm 0,00017$ e $k = 0,31729$) corroboram com os índices de diversidade apresentados por Clozato (2009) para os indivíduos do estado de São Paulo estudados por ela ($H_d = 0,3333 \pm 0,2152$, $\pi = 0,000601 \pm 0,000791$ e $k = 0,333333$). No entanto, estes índices se apresentam baixos se comparados com a Pop III ($H_d = 0,6000 \pm 0,175$, $\pi = 0,00105 \pm 0,00031$ e $k = 0,6000$). Isto deve-se ao fato que esta população (Ribeirão Preto e Catanduva) foi definida a partir do teste SAMOVA, cuja distância geográfica aproximada entre estas cidades é cerca de 121 quilômetros. No entanto, este grupo pode não ser o mais informativo para as questões populacionais da região amostrada, uma vez que o algoritmo utilizado no teste SAMOVA não necessita de agrupamentos manuais *a priori*, e portanto seu pode não ter sentido biológico visto a proximidade das regiões e baixa diversidade genética.

Este fato está relacionado diretamente com o algoritmo utilizado para os cálculos, uma vez que, as análises de diversidade genética levam em consideração a variabilidade presente nas sequências analisadas e o tamanho amostral. A Pop III é constituída por cinco amostras, sendo três do haplótipo I e duas do haplótipo II, ou seja, proporcionalmente é uma amostra pequena com o mesmo número de haplótipos das outras populações, como a Pop IV e Pop II.

Portanto, os valores de diversidade da Pop III serão numericamente maiores que dos outros agrupamentos. Temos a Pop I, que por sua vez, apresenta os valores de diversidade de $H_d = 0,511 \pm 0,164$, $\pi = 0,00097 \pm 0,00036$ e $k = 0,55556$, como o agrupamento que apresenta maior relevância biológica para o estado, pois além de apresentar elevada diversidade genética, possui um haplótipo exclusivo de seu agrupamento.

Embora, a diversidade genética total para todos os indivíduos analisados por Clozato (2009) ($H_d = 0,4115 \pm 0,0713$), utilizando o gene CytB, sejam parecidos com os dados obtidos neste trabalho para a Pop Total ($H_d = 0,308 \pm 0,20,092$), o número de indivíduos analisados pela autora, no estado de São Paulo, foi muito menor do que os utilizados nesta pesquisa para a mesma região. Os dados presentes neste trabalho asseguram que para este gene em específico, o tamanduá-bandeira mostra uma diversidade haplotípica baixa, isto é, para o estado de São Paulo podemos dizer que as amostras apresentam uniformidade genética.

Ainda pode-se observar que, os índices de diversidade nucleotídica e o número médio de diferenças nucleotídicas obtidos por Clozato (2009) para sua amostra total ($\pi = 0,001238 \pm 0,001055$ e $k = 0,686945 \pm 0,528222$) são elevados em relação aos apresentados na Tabela 5. Parte dessa diferença pode estar relacionada com o tamanho amostral uma vez que esses índices podem variar com o tamanho da amostra. Outro fator contribuinte é a heterogeneidade de biomas e localidades apresentadas pela autora. Estes refletem na maior probabilidade de se encontrar diferentes haplótipos e, portanto, maior variação dentro das sequências analisadas.

Em outros xenartras como as preguiças, vemos que para São Paulo a espécie, *Bradypus variegatus* mostra baixa diversidade ($n = 20$, $H_d = 0.100 \pm 0.009$ e $\pi = 0.0003 \pm 0.005$), sendo menor do que os índices apresentados neste trabalho (Tabela 5). As espécies *Bradypus torquatus* ($n = 19$, $H_d = 0.901 \pm 0.039$ e $\pi = 0.012 \pm 0.007$) e *Bradypus variegatus* ($n = 47$, $H_d = 0.699 \pm 0.039$ e $\pi = 0.010 \pm 0.006$) só mostram valores mais elevados quando amostrados em diferentes localidades, tais como, estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia (MORAES-BARROS et al., 2006). Tais dados poderiam ser indicativos de que xenartras em geral apresentam baixa diversidade genética.

É importante ressaltar que os xenartras possuem em seu grupo grande variedade de comportamentos, pois temos desde espécies estritamente arborícolas, como as preguiças e o tamanduáí, até espécies fossoriais como os tatus. Portanto, as adaptações de cada grupo também podem influenciar diretamente na sua diversidade genética.

Visando compreender se as causas da diversidade genética do tamanduá-bandeira pode ser devido aos efeitos ambientais, independente de sua filogenia, este foi comparado a outro animal do cerrado, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), para estimar se este, também de hábitos terrícolas, poderia apresentar padrões similares de diversidade genética. No entanto, o lobo-guará apresentou alta diversidade haplotípica (0,807) e baixa diversidade nucleotídica (0,03437) em um conjunto amostral de 35 indivíduos, distribuídos nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, para o gene mitocondrial D-Loop (234 pb) (GONZALEZ et al, 2015). Deve-se ressaltar que, o tamanduá-bandeira e o lobo-guará, ocupam nichos ecológicos distintos e, portanto, apesar de ser também um animal de cerrado terrícola, este possui um padrão de locomoção e dispersão que diverge com a espécie analisada neste trabalho.

Junto aos fatores analisados neste trabalho, também há os próprios aspectos reprodutivos do animal, que fazem com que o grupo estudado possua alta similaridade genética. Os tamanduás-bandeira possuem uma gestação de 183 a 190 dias gerando apenas um filhote, que após nascer fica agarrado de seis a nove meses, o que faz com que o intervalo gestacional seja de aproximadamente nove meses. A relação macho: fêmea (1:1; 1:3) varia de um macho para uma fêmea até três machos para uma fêmea, ou seja, a fêmea ao longo de sua vida pode acasalar-se com três diferentes machos (LUNA et al., 2014).

É suposto que provavelmente o tamanduá-bandeira tenha se diversificado no Cerrado e posteriormente irradiado para outras localidades. Esse fato ajuda a elucidar a uniformidade genética presente na população estudada, uma vez que as localidades amostradas no estado de São Paulo pertencem ao cerrado em sua maioria. Há indícios de estruturação na população apenas entre o cerrado e Amazônia, mas não dentro dos biomas (CLOZATO, 2009).

O teste AMOVA utilizado para indicar uma possível estruturação da população, foi realizado a *priori* sem agrupamentos pré-definidos, e em seguida com os agrupamentos sugeridos pelo teste SAMOVA. O valor de p, mostrou que os testes não foram significativos, sendo assim, foi excluído a possibilidade de estruturação da população dentro do Estado de São Paulo. A ausência de estrutura destas populações, não pode deixar de ser entendida também devido a biologia desta espécie, que apresenta baixa taxa reprodutiva e poucos parceiros para acasalamento, o que acarreta na ausência de um incremento na variabilidade genética da população.

O marcador utilizado neste trabalho por ser mais conservado do que outras regiões gênicas da mitocôndria (BROWN, 1986), nos fornece uma visão mais profunda do tempo histórico evolutivo desta espécie, de modo que poderemos entendê-la no tempo não só ecológico, mas também evolutivo. Portanto, estes poderiam ser os haplótipos mais antigos para a espécie, que devido a sua alta frequência possuem maior probabilidade de fixação dentro das populações, acarretando na baixa diferenciação genética da população.

No entanto, a EESB mostrou ser de grande importância para a conservação da espécie em questão, no estado de São Paulo, uma vez que esta é detentora de todos os haplótipos encontrados na amostra, e ainda possui um exclusivo da UC. Desta forma, a conservação da área é primordial para a população vivente tanto em seu interior quanto no restante do estado, possibilitando mais estudos de caráter conservacionista, contribuindo para o entendimento da dinâmica populacional e o quão impactantes ações humanas podem ser para a espécie em estudo, e outras.

É importante ressaltar que para que os dados possam ser mais conclusivos a utilização de diferentes marcadores torna-se fundamental para a acurácia do perfil genético da espécie. Marcadores do microssatélites seriam muito interessantes para que a história ecológica da população do estado fosse inferida. Ainda, a utilização de um número amostral maior, podendo abranger não só o cerrado, mas também a Mata Atlântica se faria de grande valia para o entendimento da dinâmica genética da população.

Por fim, os estudos genéticos populacionais para esta espécie devem ser levados em consideração para a elaboração de planos de manejos, em locais estratégicos para a manutenção da variabilidade genética da espécie, ou mesmo para a recuperação de populações extintas localmente ou em processo de extinção local. Fazendo-se necessário mais trabalhos em diferentes regiões, onde é possível encontrar e caracterizar redutos ecológicos potenciais, de manutenção da diversidade genética da população vivente de tamanduá-bandeira ao longo de sua distribuição.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A população estudada no estado de São Paulo é uniforme do ponto de vista genético;
- Baseando-se no marcador utilizado não foi possível encontrar indícios de nenhuma estruturação populacional dentro do estado de São Paulo;
- A baixa diversidade genética associada ao intervalo reprodutivo do animal, juntamente com as ações antrópicas de degradação de habitat, fazem com que a espécie estudada permaneça nas listas de animais ameaçados;
- A EESB serve como um reduto genético para a espécie no estado de São Paulo devido a presença de todos os haplótipos encontrados para a população estudada;
- Os eventos recentes de expansão demográfica diagnosticados neste trabalho corroboram outros dados encontrado para mamíferos do cerrado;
- A conservação da EESB, é de extrema importância para a fauna do cerrado e para o entendimento de como as populações das unidades de conservação estão sofrendo com a fragmentação de habitat e outras adversidades causadas pela intervenção humana.

REFERÊNCIAS

- BARROS, M. C.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. Phylogenetic analysis of 16S mitochondrial DNA data in sloths and anteaters. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 26, n. 1, p. 5-11, 2003.
- BATALHA, M. A. O cerrado não é um bioma. *Biota Neotropica*, Campinas, v. 11, n. 1, p. 21-24, 2011.
- BERTASSONI, A. Perception and popular reports about giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) by two brazilian traditional communities. *Edentata*, Belo Horizonte, v. 13, p. 10-17, 2012.
- BRAGA, F. G. Tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) espécie criticamente em perigo: uma preocupação no estado do Paraná. *Acta Biologica Paranaense*, Curitiba, v. 33, p. 193-194, 2003.
- BRESSAN, P. M.; KIERULFF, M. C. M.; SUGIEDA, A. M. Fauna ameaçada de extinção no estado de São Paulo: vertebrados. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo; Secretaria do Meio Ambiente, 2009.
- BRIANI, D. C.; VIEIRA, E. M. Efeito do fogo em mamíferos do Brasil. In FREITAS, T. R. O.; VIEIRA, M.; PACHECO, S.; CHRISTOFF, A. Mamíferos do Brasil: genética, sistemática, ecologia e conservação. São Carlos: Suprema, 2006. p. 41-52.
- BROWN, G. G. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology*, London, v. 192, p. 503-511, 1986.
- CARVALHO, C. F.; IANNINI CUSTÓDIO, A. E.; MARÇAL JÚNIOR, O. Wild vertebrates roadkill aggregations on the br-050 highway, state of Minas Gerais, Brazil. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 31, n. 3, p. 951-959, 2015.
- CARVALHO, F. M. V.; DE MARCO JÚNIOR, P; FERREIRA, L, G. The cerrado into-pieces: habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. *Biological Conservation*, Essex, v. 142, p. 1392–1403, 2009.
- CASELLA, J. et al. Uso de sensoriamento remoto e análise espacial na interpretação de atropelamentos de fauna entre Campo Grande e Aquidauana, MS. In: SIMPÓSIO DE GEOTECNOLOGIAS NO PANTANAL, 1º, 2006, Campo Grande. Anais... Campo Grande: Embrapa Informática Agropecuária/INPE, 2006, p.321-326.
- CHIARELLO, A. G. Influência da caça ilegal sob mamíferos e aves da mata de tabuleiro do norte do estado do Espírito Santo. *Boletim do Museu de Biologia Professor Mello Leitão*: 11, Santa Teresa, n. 12, p. 229-247, 2000

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL; K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 9, n. 10, p. 1657-1660, 2000.

CLOZATO, C. L. Diversidade genética do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*: Xenarthra, Mammalia) no Brasil e implicações para sua conservação. 2009, 87 folhas. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Minas Gerais.

COLLEVATTI, R. G. et al. Evidence of high inbreeding in a population of the endangered giant anteater *Myrmecophaga tridactyla* (Myrmecophagidae) from Emas National Park. *Genetic and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 30, p. 112-120, 2007.

Centro de Sensoriamento Remoto/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (CSR/IBAMA). Relatório técnico de monitoramento do desmatamento no bioma cerrado, 2002 a 2008: dados revisados. 2009. TEM QUE ENTRAR PELO NOME POR EXTENSO. ATENTAR PARA ALTERAR NA ORDEM ALFABÉTICA, SE FOR O CASO.

CUNHA, H. F.; MOREIRA, F. G. A.; SOUSA SILVA, S. Roadkill of wild vertebrates along the GO-060 road between Goiânia and Iporá, Goiás State, Brazil. *Acta Scientiarum: biological sciences*, Maringá, v. 32, n. 3, p. 257-263, 2010.

DELSUC, F.; DOUZERY, E. J. P. Armadillos , anteaters , and sloths (*Xenarthra*). The timetree of life, p. 475–478, 2009.

_____; 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*, London, v. 4, n. 11, p. 1-13, 2004

DUPANLOUP, I.; SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 11, n. 12, p. 2571-2581, 2002.

DURIGAN, G.; SIQUEIRA, M. F.; FRANCO, G. A. D. C. Threats to the cerrado remnants of the state of São Paulo, Brazil. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 355-363, 2007.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação, e o conceito de unidades evolutivamente significativas. *Revista Brasileira de Genética = Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, v. 19, n. 4, p.23-24, 1996.

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*, Oxford, v. 10, p. 564-567, 2010.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A.; A primer of conservation genetics. Cambridge University Press, São Paulo, 2004.

GARCÍA, J. et al. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. Nucleic Acids Symposium Series, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press, Oxford, v. 0, n. 0, p. 0-00, 1999.

GONZÁLEZ, S. et al. Population structure of mtDNA variation due to pleistocene fluctuations in the South American maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815): management units for conservation. Journal of Heredity, Cary, v. 106, p. 459-468, 2015.

HEGEL, C. G. Z.; CONSALTER, G. C.; ZANELLA, N. Mamíferos silvestres atropelados na rodovia RS-135, norte do estado do Rio Grande do Sul. Biotemas, Florianópolis, v. 25, n. 2, p. 165-170, 2012.

HUBBE, M. et al. A primeira descoberta da América. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2003. p. 70.

INSTITUTO FLORESTAL. Inventário florestal da vegetação natural do estado de São Paulo. São Paulo: Imprensa Oficial, 2005. p. 1-200.

International Union for Conservation of Nature (IUCN). The red list of threatened species: version 2015-3. Disponível em: <www.iucnredlist.org> Acesso em: 14 nov. 2015.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. Megadiversidade, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

LARA-RUIZ, P.; CHIARELLO, A.; SANTOS, F. R. Extreme population divergence and conservation implications for the rare endangered atlantic forest sloth, *Bradypus torquatus* (Pilosa: Bradypodidae). Biological Conservation, Essex, v. 141, p. 1332-1342, 2008.

LEEUWENBERG, F. Edentata as a food resource: subsistence hunting by xavante indians, Brazil. Edentata, Belo Horizonte, v. 3, n. 1, p. 4-5, 1997.

LEIVA, M.; MARQUES, M. C. Dados reprodutivos da população cativa de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Edentata, Belo Horizonte, v. 11, n. 1. p. 49-52, 2010.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, Oxford, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LUNA, H. S.; HOSSOTANI, C. M. S.; MOREIRA, F. M. A. Esforços para conservação da espécie *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758: tecnologias aplicadas à reprodução. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 38, n. 1, p. 10-14, 2014.

MÁRQUEZ, A. et al. Phylogeography and pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the río de la Plata basin. *Conservation Genetics*, Dordrecht, v. 7, p. 563–575, 2006.

MAYLE, F. E.; BURBRIDGE R.; KILLEEN, T. J. Millennial-scale dynamics of southern amazonian rain forests. *Science*, Washington, v. 290, p. 2291–2294, 2000.

MCKENNA M. C.; BELL, S. K. *Classification of mammals above the species level*. Columbia University Press, New York, p. 631, 1997.

MEDRI, I. M.; MOURÃO, G. *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758. In: MACHADO, A. B. M., DRUMMOND, G. M., PAGLIA, A. P. *Livro Vermelho da Fauna*. Brasília, DF: : MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2008.

MELO, A. C. G.; DURIGAN, G. *Plano de manejo da Estação Ecológica de Santa Barbara*. São Paulo: SEMA, p. 222. 2011.

METZGER, J. P. et al. Características ecológicas e implicações para a conservação da Reserva Florestal do Morro Grande. *Biota Neotropica*, Campinas, v. 6, n. 2, p. 0-00, 2006.

MIRANDA, F.; BERTASSONI, A.; ABBA, A. M. *Myrmecophaga tridactyla*, Giant Anteater. The IUCN red list of threatened species 2014: e.T14224A47441961. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T14224A47441961.en>> Acesso em 28 out. 2015.

_____ et al. *Manual clínico para el manejo del oso hormiguero gigante (Myrmecophaga tridactyla)*. Manual Técnico, 2006.

MORAES-BARROS, N.; ARTEAGA, M. C. Genetic diversity in *Xenarthra* and its relevance to patterns of neotropical biodiversity. *Journal of Mammalogy*, Lawrence, v. 20, n. 10, p. 1-13, 2015.

MORAES-BARROS, N. et al. Comparative phylogeography of the atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (*Bradypodidae*, *Xenarthra*). *Genetica*, v. 126, n.1, p. 189-198, 2006.

MULLINS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chaptalized chain reaction. *Methods of enzymology*, Maryland Heights, v. 155, p. 335-348, 1987.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, London, v. 403, p. 853-858, 2000.

NAPLES, V. L. Morphology, evolution and function of feeding in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). *Journal of Zoology*, London, v. 249, p. 19- 41, 1999.

NEI, M. Evolution of human races at the gene level. In: Petersen, G. M. Human genetics: part A: the unfolding genome. New York: B. Bonne-Tamir, 1982. p. 167-181.

NETO, C. M. S. et al. Fauna atropelada nas estradas do município de Chapadão do Céu (Goiás, Brasil). Revista Percurso - NEMO, Maringá, v. 7, n. 1, p. 97-114, 2015.

PARSONS, T. J. et al. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. Nature Genetics, New York, v. 15, p. 363-367, 1997.

RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality test against population growth. Molecular Biology and Evolution, Chicago, v. 19, p. 2092-2100, 2002.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular Biology and Evolution, Chicago, v. 9, p. 552-569, 1992.

SALGADO-LABOURIAU, M. L. et al. Late quaternary vegetational and climatic changes in cerrado and palm swamp from central Brazil. Palaeogeography, Palaeoclimatology. Palaeoecology, Amsterdam, v. 128, p. 215-226, 1997.

SAMBROOK, E.; FRITSCH, F.; MANIATIS, T. Molecular cloning., New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SANTOS, A. L. P. G.; ROSA, C. A.; BAGER, A. Variação sazonal da fauna selvagem atropelada na rodovia MG 354, Sul de Minas Gerais – Brasil. Biotemas, Florianópolis, v. 25, n. 1, p. 73-79, 2012.

SÃO PAULO. Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo. Cerrado: bases para a conservação e uso sustentável das áreas de cerrado do estado de São Paulo. São Paulo, SEMA. p.1-184. 1997. (Série PROBIO/SP).

SCHNEIDER, H. Métodos de análise filogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2007. p. 200.

SILVEIRA, E. K. P. História natural do tamanduá-bandeira, *Myrmecophaga tridactyla* Lineu, 1758, Myrmecophagidae. Vellozia, Rio de Janeiro, v. 7, p. 34-43, 1969.

SILVEIRA, L. et al. Impact of wildfires on the megafauna of Emas National Park, central Brazil. Oryx, Oxford, v. 33, n. 2, p. 108-114, 1999.

SIMPSON, G. G.; Splendid isolation: the curious history of south american mammals. Yale: University Press, 1980.

SLATKIN, M.; BARTON, N. H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, Lancaster, v. 43, n. 7, p.1349-1368, 1989.

_____; HUDSON R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing population. *Genetics*, Austin, v. 129, p. 555-562, 1991.

SUPERINA, M.; LOUGHRY, W. J. Why do xenarthrans matters? *Journal of Mammalogy*, Lawrence, v. 20, n. 10, p. 1-5, 2015.

_____; MIRANDA, F. R.; ABBA, A. M. The 2010 anteater red list assessment. *Edentata*, Belo Horizonte, v. 11, n. 2, p. 96-114, 2010.

SVARTMAN, M.; STONE, G.; STANYON, R. The ancestral Eutherian karyotype is present in Xenarthra. *PLoS Genetics*, San Francisco, v. 2, n. 7, p. 1006-1011, 2006.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VERDADE, L. M; SEIXAS, C. S. Confidencialidade e sigilo profissional em estudos sobre caça. *Biota Neotropica*, Campinas, v. 13, n. 1, p.21-23, 2013.

APÊNDICE

Sequências nucleotídicas para o gene CytB (572 pb), com destaque para seus sítios polimórficos. Cada bloco de sequências contém 100 pb, com exceção do último com 72 pb.

Na parte superior de cada bloco é mostrado o número de cada sítio gênico

```
[
[
1 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 ]
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#1 CTCCACGAAA CAGGATCCAA TAACCCATTA GGACTATCAT CAGACATAGA TAAATCCCA TTTCACCCAT ACTACACTAT CAAAGACATC CTAGGCCTAT
#2 .....
#3 .....T.....
#5 .....T.....
#6 .....T.....
#9 .....T.....
#10 .....T.....
#11 .....T.....
#12 .....
#13 .....T.....
#14 .....T.....
#15 .....T.....
#16 .....T.....
#17 .....T.....
#18 .....
#19 .....T.....
#20 .....T.....
#21 .....T.....
#22 .....T.....
#23 .....T.....
#24 .....T.....
#26 .....T.....
#27 .....
#28 .....T.....
#29 .....T.....
#30 .....T.....
#31 .....T.....
#32 .....T.....
#33 .....T.....
#34 .....T.....
#35 .....T.....
#36 .....T.....
#37 .....T.....
#38 .....T.....
]
```

```
[
1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111112 ]
0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 ]
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#1 TCATCCTAAT CACCATCTA ATAACCCTAG TATTATTTC ACCAGACCTA CTAGGAGACC CAGACAATTA TACACCAGCA AACCCACTCA GCACCCACC
#2 .....
#3 .....T.....
#5 .....
#6 .....
#9 .....
#10 .....
#11 .....
#12 .....
#13 .....
#14 .....
#15 .....
#16 .....
#17 .....
#18 .....
#19 .....
#20 .....
#21 .....
#22 .....
#23 .....
#24 .....
#26 .....
#27 .....
#28 .....
#29 .....
#30 .....
#31 .....
#32 .....
#33 .....
#34 .....
#35 .....
#36 .....
#37 .....
#38 .....
]
```

```

[ 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222223 ]
[ 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 ]
[ 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#1 ACACATCAAA CCAGAATGAT ATTTCTTATT TGCCCTACGCC ATTCTACGAT CCATCCCCAA CAAACTAGGC GGAGTACTAG CCCTAATCTG TTCAATCCTA
#2 .....
#3 .....
#5 .....
#6 .....
#9 .....
#10 .....
#11 .....
#12 .....
#13 .....
#14 .....
#15 .....
#16 .....
#17 .....
#18 .....
#19 .....
#20 .....
#21 .....
#22 .....
#23 .....
#24 .....
#26 .....
#27 .....
#28 .....
#29 .....
#30 .....
#31 .....
#32 .....
#33 .....
#34 .....
#35 .....
#36 .....
#37 .....
#38 .....

```

```

[ 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333334 ]
[ 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 ]
[ 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#1 GTATTAATAA TTATACCACT CCTACACACA GCCAAACAAC GAAGCATAAT ATTCCGACCA CTAAGTCAAC TACTATTCTG ACTCCTAACA GCCAATCTTC
#2 .....
#3 .....
#5 .....
#6 .....
#9 .....
#10 .....
#11 .....
#12 .....
#13 .....
#14 .....
#15 .....
#16 .....
#17 .....
#18 .....
#19 .....
#20 .....
#21 .....
#22 .....
#23 .....
#24 .....
#26 .....
#27 .....
#28 .....
#29 .....
#30 .....
#31 .....
#32 .....
#33 .....
#34 .....
#35 .....
#36 .....
#37 .....
#38 .....

```

```

[ 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444445 ]
[ 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 ]
[ 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#1 TCATCCTAAC ATGAATTGGC GGCCAACCCG TAGAACACCC CTTCAATTATC ATGGCCAAG TAGCCTCAAT TTCTACTTC TCAATCATT TAATCCTGAT
#2 .....
#3 .....
#5 .....
#6 .....
#9 .....
#10 .....
#11 .....
#12 .....
#13 .....
#14 .....
#15 .....
#16 .....
#17 .....
#18 .....
#19 .....

```

```
#20 .....  
#21 .....  
#22 .....  
#23 .....  
#24 .....  
#26 .....  
#27 .....  
#28 .....  
#29 .....  
#30 .....  
#31 .....  
#32 .....  
#33 .....  
#34 .....  
#35 .....  
#36 .....  
#37 .....  
#38 .....
```

```
[ 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 55]
[ 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 77]
[ 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 12]
#1 ACCACTGGCA GGAATCCTAG AAAACCACCT AATAAACTT TAAGCCCTG TAGTATAAAA CATTACACTG GT
#2 .....
#3 .....
#5 .....
#6 .....
#9 .....
#10 .....
#11 .....
#12 .....
#13 .....
#14 .....
#15 .....
#16 .....
#17 .....
#18 .....
#19 .....
#20 .....
#21 .....
#22 .....
#23 .....
#24 .....
#26 .....
#27 .....
#28 .....
#29 .....
#30 .....
#31 .....
#32 .....
#33 ...ac.....
#34 .....
#35 .....
#36 .....
#37 .....
#38 .....
```