



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Ricardo Quiterio Sartori

Análise da estrutura genética populacional em *Myrmecophaga*
tridactyla (tamanduá-bandeira), utilizando marcadores
moleculares microssatélites

São José do Rio Preto
2018

Ricardo Quiterio Sartori

Análise da estrutura genética populacional em *Myrmecophaga
tridactyla* (tamanduá-bandeira), utilizando marcadores
moleculares microssatélites

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

Financiadora: CAPES e FAPESP –
Proc. 2016/13023-7

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lilian Castiglioni
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Adriana C.
Morales

São José do Rio Preto
2018

Sartori, Ricardo Quiterio.

Análise da estrutura genética populacional em *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira), utilizando marcadores moleculares microsatélites / Ricardo Quiterio Sartori. -- São José do Rio Preto, 2018

82 f.

Orientador: Lilian Castiglioni

Coorientador: Adriana C. Morales

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética animal. 2. Tamanduá-bandeira. 3. DNA. 4. Microsatélite. 5. Animais – População. 6. Ecologia. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 591.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Ricardo Quiterio Sartori

Análise da estrutura genética populacional em *Myrmecophaga
tridactyla* (tamanduá-bandeira), utilizando marcadores
moleculares microssatélites

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

Financiadora: CAPES e FAPESP –
Proc. 2016/13023-7

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Lilian Castiglioni
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Lilian Madi-Ravazzi
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luis Gustavo da Conceição Galego
UFTM – Uberaba

São José do Rio Preto
05 de março de 2018

*“A onça, o tamanduá, o tucano, não
conhecem as fronteiras geográficas
arbitrariamente desenhadas pelo homem.
A Biodiversidade é uma só”.*

Carlos Minc

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus pais pelo presente da vida. Agradeço muito à minha avó, por tudo, ao meu querido irmão, às minhas irmãs, tias, tios, primos e primas, pelo carinho e incentivo. Agradeço à minha mulher pelo companheirismo, paciência e amor e também a toda sua família pelo apoio e respeito.

Agradeço à Professora Dra. Lilian Castiglioni, pela oportunidade, orientação, dedicação, ensinamentos e paciência. A orientadora que eu tive o prazer de encontrar e que todos gostariam de ter. Agradeço profundamente a oportunidade e a confiança que depositou em mim para a realização deste trabalho. Muito obrigado por tudo.

À Professora Dra. Adriana Coletto Morales, pela co-orientação, por aceitar participar do projeto, pela colaboração e por ceder as amostras de Santa Bárbara para análise, as quais foram essenciais para a realização do trabalho.

À Professora Dra. Cinara Brandão, pela oportunidade, pelos conselhos e pela confiança ao abrir as portas do Laboratório de Imunogenética na FAMERP e ao Professor Dr. Luiz Carlos de Mattos, pelos grandes ensinamentos e por todas as conversas profissionais e pessoais.

Agradeço ao Professor Dr. Diego José Santana pelo conhecimento compartilhado e troca de idéias, à Professora Dra. Lilian Madi-Ravazzi, pela oportunidade de realização do Estágio Docência na disciplina de Evolução e pelas sugestões propostas e também ao Professor Dr. Luis Gustavo Galego pelas importantes contribuições, as quais foram essenciais para a melhoria do presente trabalho.

A todos os Professores que fizeram parte da minha formação, desde o ensino primário até a Pós-graduação, os quais foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a todos do Hospital Veterinário da UNIRP, em especial à equipe do SACCAS, pela parceria e pelas amostras disponibilizadas e a todos do Zoológico Municipal de São José do Rio Preto, em especial ao médico veterinário Bernhard Von Schimonsky, pela disponibilidade, por permitir e realizar a coleta de amostras dos animais.

Agradeço muito a todos os meus amigos e colegas do Laboratório de Imunogenética da FAMERP, sem exceções, pela companhia nos dias e noites desta jornada. Todos auxiliaram de alguma maneira, mas gostaria de agradecer em especial, aos meus amigos Alessandro, Marcos e Warlen, pela amizade e pela força.

Agradeço também à Emília, à Bruna e à Samara, pela amizade, troca de conhecimento e pelas ajudas com os softwares.

Um agradecimento especial aos meus amigos, principalmente aos velhos amigos, que sempre estiveram ao meu lado. A amizade duplica as alegrias e divide as tristezas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto por tudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para realização do projeto, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Todos contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) tem sido uma das principais vítimas da fragmentação de habitat, portanto é fundamental a realização de estudos para a conservação da espécie. Desta maneira, estudos genéticos populacionais permitem avaliar os impactos da fragmentação de habitat nas populações selvagens. O objetivo do trabalho foi analisar a variabilidade genética e a estrutura populacional do tamanduá-bandeira, utilizando marcadores moleculares microsatélites específicos. Foram analisados 34 indivíduos e seis locos. As genotipagens foram realizadas por eletroforese em gel e por eletroforese capilar automatizada. Os resultados indicaram alta diversidade genética, diferenciação moderada entre as populações, estruturação populacional, baixas taxas de migração e o isolamento por distância das populações. As análises bayesianas de estrutura identificaram três agrupamentos e estrutura bem definida em uma das populações. A análise bayesiana de estrutura espacial também mostrou estrutura populacional, três agrupamentos e revelou que os indivíduos ou populações têm baixa probabilidade posterior de pertencer às populações ou áreas mais distantes. Os resultados da AMOVA mostraram que a maior parte da variância está dentro das populações ou subpopulações, revelando a importância e a prioridade na conservação destas. Sugerimos que os resultados encontrados indicam que as populações de tamanduá-bandeira estão evoluindo em um modelo de “Isolamento por Distância em Populações em Desequilíbrio”, que prediz que a falta de migração aumenta as diferenças entre as subpopulações; isolando-as, mas mantendo a variabilidade genética nas subpopulações isoladas, influenciadas pela deriva genética. Assim, as análises genéticas e os modelos estatísticos utilizados permitiram obter informações sobre a variabilidade genética e a estrutura populacional da espécie na região noroeste e sudoeste do estado de São Paulo, indicando a influência da fragmentação de habitat no fluxo gênico, além de demonstrar a necessidade do manejo ou possíveis translocações das populações a fim de evitar extinções locais e a conseqüente perda da diversidade genética destas. Portanto, o presente estudo revelou a importância da conservação das populações do estado de São Paulo para manutenção da diversidade genética da espécie e forneceu dados que podem contribuir para a conservação local do tamanduá-bandeira.

Palavras-chave: DNA microsatélite, estrutura populacional, genética da conservação, *Myrmecophaga tridactyla*, tamanduá-bandeira.

ABSTRACT

The giant anteater (Myrmecophaga tridactyla) has been one of the main victims of habitat fragmentation, so it is fundamental to carry out studies for the conservation of the species. This way, population genetic studies allow analyzing the impacts of habitat fragmentation on wild populations. The aim of this work was to analyze the genetic variability and the population structure of the giant anteater, using specific microsatellite molecular markers. Thirty-four individuals and six loci were analyzed. The DNA fragment analysis and genotyping were performed by gel electrophoresis and by automated capillary electrophoresis. The results indicated high genetic diversity, moderate population differentiation, population structure, low migrations rates and indicate isolation by distance in the populations. Bayesian structure analyzes identified three clusters and well-defined structure in one of the populations. Bayesian spatial structure analysis also showed population structure, three clusters and revealed that individuals or populations have low posterior probability to belong to more distant populations or areas. AMOVA results showed that most of the variance is within populations or subpopulations, revealing the importance and priority in the conservation of these subpopulations. We suggest that the results indicate that the giant anteater populations are evolving in a model of "Isolation by Distance in Non-Equilibrium Populations", which predicts that lack of migration increases the differences between subpopulations; isolating them, but maintaining genetic variability in isolated subpopulation, influenced by genetic drift. Thus, the genetic analyzes and the statistical models used in this work allowed to obtain information about the genetic variability and population structure of the species in the northwest and southwest region of São Paulo state, indicating the influence of habitat fragmentation in the gene flow and demonstrating the need for management or possible population translocations in order to avoid local extinctions and the consequent loss of its genetic diversity. Therefore, the present study revealed the importance of the conservation of São Paulo state populations to the maintenance of genetic diversity of the species and provided data that may contribute to the local conservation of the giant anteater.

Key words: conservation genetics, giant anteater, microsatellite DNA, Myrmecophaga tridactyla, population structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa ilustrando a distribuição atual da espécie (na área amarela) e os locais onde é considerado extinto (áreas vermelhas). Fonte: IUCN (2017).....	15
Figura 2. Área aproximada da Estação Ecológica do Noroeste Paulista e entorno (cidades: São José do Rio Preto e Mirassol) Fonte: MAPS (2017).....	23
Figura 3. Área aproximada da Estação Ecológica de Santa Bárbara. Fonte: MAPS (2017).....	23
Figura 4. Área total de estudo. Quadrados vermelhos indicam os locais de captura/coleta dos indivíduos ao longo do interior do estado de São Paulo. Fonte: MAPS (2017).....	25
Figura 5. Contenção mecânica do animal, com a ajuda do cambão, para posterior contenção química.....	29
Figura 6. Contenção química (sedação leve), para coleta de amostras de sangue.....	29
Figura 7. Após sedação leve, foram coletadas as amostras de sangue, via veia jugular.....	29
Figura 8. Fotodocumentação de um dos fragmentos microssatélites analisado, de 274pb - MtriUSP07 (GARCIA et al., 2005).....	32
Figura 9a-b. Análise no software GeneMapper®.....	35

Figura 10a-b. Gráficos gerados no programa STRUCTURE HARVESTER após a análise no STRUCTURE, a partir da genotipagem manual (a) e da genotipagem automatizada (b).....	42
Figura 11a-b. Tabelas referentes aos valores calculados pelo programa STRUCTURE HARVESTER, a partir da genotipagem manual (a) e automatizada (b).....	43
Figura 12a-b. Resultado após o processamento automático dos dados, no servidor CLUMPAK (KOPELMAN, 2015), pela genotipagem manual (a) e pela genotipagem automatizada (b).....	44
Figura 13. Esquema comparando uma imagem de satélite da área e um dos mapas gerados pelo programa GENELAND.....	46
Figura 14a-b. Resultado da genotipagem manual (a) e automatizada (b). Identificação de três agrupamentos pelo programa computacional GENELAND, em concordância com os dados preliminares do STRUCTURE.....	47
Figura 15a-b. Mapas gerados pelo programa GENELAND, a partir da matriz de genotipagem manual (a) e automatizada (b).....	48
Figura 16a-b-c. Mapas de atribuição individual gerados no GENELAND, a partir da genotipagem manual.....	49
Figura 17a-b-c. Mapas de atribuição individual gerados no GENELAND, a partir da genotipagem automatizada.....	50
Figura 18a-b. Análise da estrutura espacial, apenas das populações das Estações Ecológicas a partir da genotipagem manual (a) e automatizada (b). Diferentes cores indicam agrupamentos distintos.....	51

Figura 19a-b. Mapas de probabilidade posterior referentes à análise das populações das Estações Ecológicas pela genotipagem manual.....52

Figura 20a-b. Mapas de probabilidade posterior referentes à análise das populações das Estações Ecológicas pela genotipagem automatizada. Resultados foram corroborados pela análise capilar.....52

Figura 21a-b. Gráficos gerados pelo programa ARLEQUIN 3.5 (utilizando as funções do R-LEQUIN), a partir da genotipagem manual (a) e automatizada (b), em relação ao número de alelos.....54

Figura 22a-b. Gráficos gerados pelo programa ARLEQUIN 3.5 (utilizando as funções do R-LEQUIN), a partir da genotipagem manual (a) e automatizada (b), em relação aos níveis de heterozigosidade.....55

Figura 23a-b. Gráficos do coeficiente de diferenciação F_{st} gerados pelo programa ARLEQUIN 3.5 (utilizando as funções do R-LEQUIN), a partir de genotipagem manual (a) e automatizada (b).....57

Figura 24a-b. Dendogramas UPGMA gerados a partir da genotipagem manual (a) e automatizada (b), utilizando a distância de Nei.....58

Figura 25. Esquema ilustrativo da estrutura de populações / metapopulações em desequilíbrio. Fonte: Universidade de Idaho [online], 2010. Baseado em: HARRISON, TAYLOR (1997).....66

Figura 26. Simulação do declínio da heterozigosidade em animais de vida longa. Adaptado de HAILER et al. (2006).....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista contendo informações básicas dos 34 tamanduás-bandeira.....	26
Tabela 2. Oligonucleotídeos microssatélites específicos desenvolvidos para a espécie <i>M. tridactyla</i> (GARCIA et al., 2005).....	30
Tabela 3. Estatísticas $F(\theta)$ médias e Testes de significância (genotipagem manual).....	60
Tabela 4. Estatísticas $F(\theta)$ médias e Testes de significância (genotipagem automatizada).....	60
Tabela 5. Análise de Variância Molecular (AMOVA) a partir da genotipagem manual.....	61
Tabela 6. Análise de Variância Molecular (AMOVA) a partir da genotipagem capilar automatizada.....	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Áreas de estudo.....	20
3.2 Obtenção das amostras.....	24
3.2.1 SACCAS - Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”.....	27
3.2.2 Zoológico Municipal de São José do Rio Preto.....	28
3.2.3 Estação Ecológica de Santa Bárbara.....	28
3.3 Extração de DNA.....	30
3.4 Marcadores moleculares.....	30
3.5 Genotipagem manual e condições de amplificação.....	31
3.6 Genotipagem automatizada e condições de amplificação.....	33
3.7 Análises estatísticas.....	36
3.8 Recursos computacionais e modelos estatísticos.....	39
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Eficiência dos marcadores microssatélites.....	41
4.2 Análise de estrutura populacional.....	41
4.3 Diversidade genética e Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	53
4.4 Coeficientes e estatísticas F	56
4.5 Distância genética.....	58
4.6 Número de migrantes.....	59
4.7 Análise de Variância Molecular – AMOVA.....	59
5 DISCUSSÃO.....	62
5.1 Tamanduás-bandeira: diferentes genes, diferentes respostas.....	62
5.2 Hipóteses evolutivas.....	64
5.3 Fatores biológicos e diversidade genética.....	67
5.4 Estratégias de conservação para a espécie.....	70
6 CONCLUSÕES.....	74
7 REFERÊNCIAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

O Brasil abriga a maior diversidade biológica entre os 17 países “megadiversos” do mundo, ou seja, países que concentram a maioria das espécies da Terra e é, portanto, detentor de uma das maiores riquezas naturais do planeta. Proporcionalmente à enorme biodiversidade, são os impactos ambientais causados pelo desenvolvimento econômico, visíveis, principalmente, no Sudeste Brasileiro, onde inúmeras espécies estão sob ameaça de extinção (CUBAS, 2006; BOLZANI, 2016).

Dos impactos ambientais mais drásticos, podemos destacar o processo de desmatamento em áreas florestais e a fragmentação de habitats por interferência antrópica, os quais provocam diversos distúrbios ecológicos e afetam a diversidade biológica de uma região (CONDE; VERA; ROCHA, 2006; SANTOS; PACHECO; PASSAMANI, 2016).

Esses impactos ambientais aumentam a perda da biodiversidade e o declínio geral no tamanho das populações de espécies selvagens, além do declínio na extensão, condição e conectividade de muitos habitats, com a aceleração dos níveis de risco de extinção (BUTCHART et al., 2010; BRASIL, 2016).

A destruição parcial das áreas florestais leva à formação de fragmentos isolados que, por sua vez, funcionam como “ilhas” de mata, cercadas por habitats não florestados. As consequências do processo de fragmentação florestal têm sido intensamente estudadas, principalmente pela biologia da conservação, como forma de tentar prever as características mais adequadas para a formação de reservas florestais e conservação da fauna (FRANKHAM, 1995; PERICO; CEMIN; LIMA, 2005; WILSON et al., 2016).

Neste cenário, uma das principais vítimas da fragmentação de habitat e interferência antrópica é o tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*; Linnaeus, 1758), objeto do presente estudo. Como consequência, é um dos animais mais ameaçados da fauna brasileira, incluído na categoria “Vulnerable” (VU), ou seja, vulnerável tanto em nível global quanto nacional (IUCN, 2017).

O tamanduá-bandeira apresenta distribuição original do sul de Belize e da Guatemala até o norte da Argentina e do Uruguai. Entretanto está provavelmente extinto na Guatemala e em Belize, no Uruguai e em Santa Catarina (figura 1). A espécie está listada também como extinta localmente nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo e criticamente ameaçada no Paraná e Rio Grande do Sul (MIRANDA; BERTASSONI; ABBA, 2014).

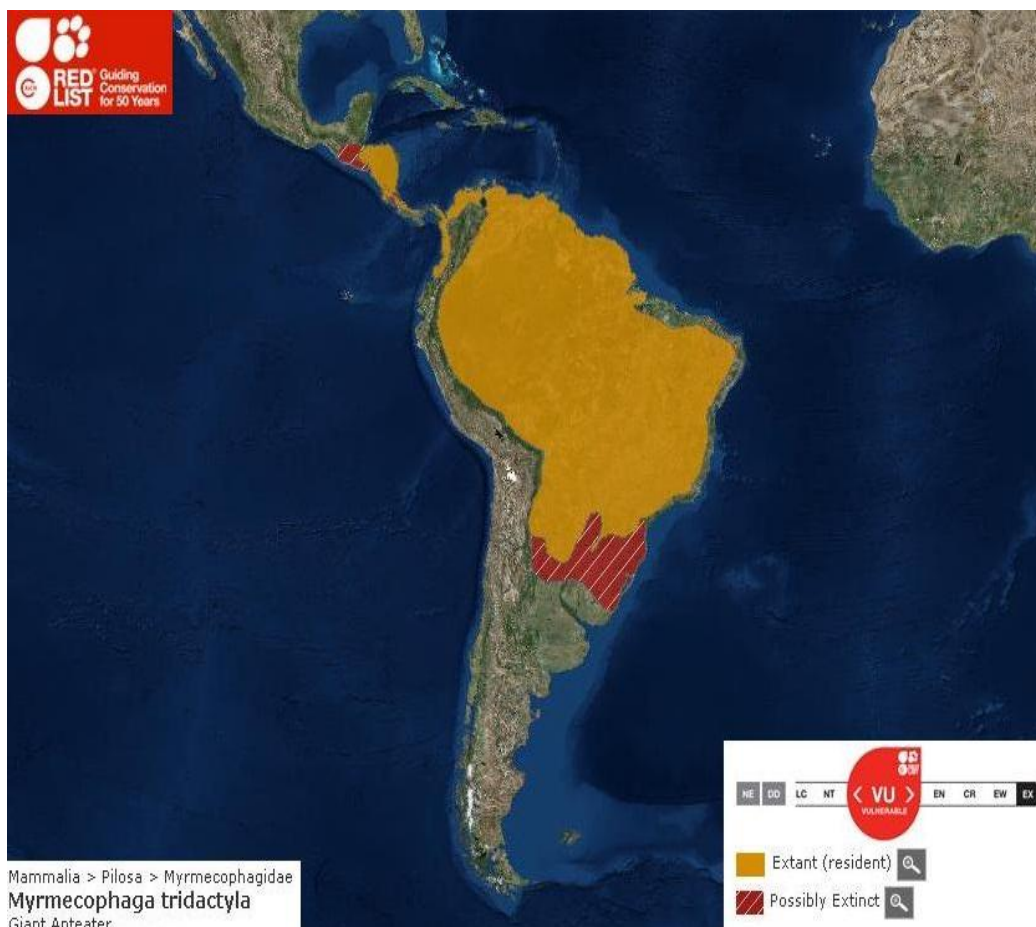


Figura 1. Mapa ilustrando a distribuição atual da espécie (na área amarela) e os locais onde é considerado extinto (áreas vermelhas). Fonte: IUCN (2017).

No Brasil e particularmente no estado de São Paulo, a rápida transformação da paisagem natural em plantações de soja, cana-de-açúcar e a urbanização debilitaram as regiões de savanas em mais de 85% desde a década de 90, fragmentando habitats e exercendo forte pressão seletiva sobre as populações remanescentes de tamanduá-bandeira (GARCIA et al., 2005).

Algumas características biológicas do animal podem ser indicativas de baixas taxas de crescimento populacional. Entre elas, podemos destacar: baixa taxa metabólica, baixa capacidade termorregulatória, pequeno potencial reprodutivo, cuidado parental prolongado, longo período de gestação e hábitos solitários (DINIZ; BRITO, 2013).

A espécie também apresenta características que evidenciam sua alta vulnerabilidade frente aos impactos ambientais. Devido aos seus longos pêlos facilmente inflamáveis e à baixa mobilidade, os tamanduás-bandeira são atingidos com frequência por grandes incêndios florestais, que podem causar a morte desses indivíduos. Em agosto de 1994, um incêndio de grandes proporções queimou 97% do Parque Nacional das Emas, Estado de Goiás, Brasil, inclusive todas as áreas de cerrado aberto. Estudos locais estimaram que em média 332 tamanduás-bandeira morreram pela ação direta do fogo (CHEREM et al., 2007; COLLEVATTI et al., 2007; DURIGAN; SIQUEIRA; FRANCO, 2007).

Por ser um animal de baixa mobilidade e possuir visão fraca, além das mortes ocasionadas pelos incêndios e pela queima da cana-de-açúcar, a espécie é uma das principais vítimas de atropelamentos em rodovias. A mortalidade causada por atropelamentos pode ameaçar profundamente a persistência da população de tamanduá-bandeira em permanecer nas áreas extremamente fragmentadas (DINIZ; BRITO, 2013; DINIZ; BRITO, 2015).

Devido às ameaças e características da espécie, a tendência é que as populações restantes de tamanduá-bandeira progressivamente tornem-se mais isoladas. Sabe-se que as reduções de tamanho e alcance das populações aumentam sua vulnerabilidade à extinção estocástica, levando em vários casos à extinção local (CLOZATO et al., 2017).

Atualmente, é amplamente aceito que a variabilidade e a estrutura genética das populações desempenham um papel importante na persistência e adaptação das populações aos ambientes em mudança. A estruturação de populações e a perda de diversidade genética adaptativa colocam populações selvagens em maior risco de extinção e a Genética da Conservação é uma das ferramentas que podem auxiliar na avaliação destes riscos (FRANKHAM et al., 2002; FRANKHAM, 2005, FRANKHAM, 2015; CLOZATO et al., 2017).

Sabe-se que estes processos de alteração ambiental diminuem a variabilidade genética e aumentam a divergência interpopulacional devido ao aumento da deriva, das taxas de endogamia e da redução do fluxo gênico. A diversidade genética, os níveis de endogamia e as medidas diretas e indiretas de fluxo gênico fornecem as melhores estimativas sobre o quanto a fragmentação atua estruturando a composição genotípica das populações (EWERS; DIDHAM, 2006).

Estes parâmetros genéticos populacionais podem ser utilizados na quantificação do grau de fragmentação e na caracterização da estrutura genética espacial de uma população sendo considerados de extrema importância para caracterização de populações naturais por retratarem o quanto as alterações ambientais influenciam a diminuição da variabilidade genética populacional (FRANKHAM, 2005).

Estudos de variabilidade genética nas populações e indivíduos remanescentes de uma espécie podem ser fundamentais para a compreensão da dinâmica populacional, das taxas de migração, da estrutura genética, das similaridades entre isolados populacionais e dos efeitos da fragmentação de habitat, sendo importantes ferramentas para subsidiar programas de conservação de espécie (COLLEVATTI et al., 2007; BARROS et al., 2011; COSTA et al., 2016).

Portanto, a compreensão de como fatores geográficos e ambientais caracterizam a variação genética e a estrutura da população, evidencia os processos e padrões de fluxo de genes, detecção de descontinuidades genéticas e a correlação destas descontinuidades com características da paisagem. Assim, as características ecológicas do habitat e o perfil genético das populações são ferramentas que permitem a análise da correlação entre a fragmentação do habitat e a viabilidade de populações, para traçar planos de conservação para espécies ameaçadas (MANEL, 2003). Adicionalmente, é necessário considerar as dinâmicas populacionais locais, influenciadas pela ocupação de redes de habitats altamente fragmentadas (CANALE et al., 2012; WEISS; LEESE, 2016).

Em relação aos estudos genéticos, os marcadores moleculares são amplamente empregados para estimar parâmetros genéticos, como o fluxo gênico e o grau de diferenciação dentro e entre as populações. Assim, o foco da Genética da

Conservação é a análise da estruturação genética recente nas populações e para isso requer marcadores que apresentem altas taxas de evolução.

Dentre os marcadores moleculares utilizados para estudos de variabilidade genética em populações, destacam-se os microssatélites (WAN, 2004).

Os marcadores microssatélites têm se mostrado uma ferramenta extremamente vantajosa e são particularmente adequados em estudos de Genética da Conservação. São herdados de maneira mendeliana co-dominante e podem revelar heterozigotos e homozigotos em cada indivíduo. Suas aplicações se estendem por diferentes áreas, como: estudos filogenéticos, forenses, genética de populações, genética da paisagem e manejo. Estão dispersos ao longo do genoma nuclear de organismos eucarióticos e seus polimorfismos são o resultado de variações no número de repetições em *tandem* em uma curta seqüência de DNA (TELLES, 2010; SIGRIST, 2011; WAN, 2004; COSTA et al., 2016).

Muitos estudos conservacionistas utilizam marcadores nucleares e mitocondriais para inferir dados sobre o perfil genético das populações ameaçadas (SARRE; GEORGES, 2009). É amplamente aceito que os microssatélites e o DNA mitocondrial possuem altas taxas de mutação, porém, deve-se atentar ao fato de que as taxas de mutação de DNA mitocondrial e microssatélites podem variar consideravelmente, dependendo da espécie em estudo (WAN, 2004; ALLIO et al., 2017). Todavia, em mamíferos, os genes mitocondriais geralmente evoluem mais lentamente que microssatélites. Portanto, os microssatélites são marcadores moleculares adequados para investigar os impactos recentes em populações de tamanduás-bandeira, devido à alta taxa de mutação (WAN, 2004).

Em suma, em razão da intensa fragmentação de habitat com indiscriminado aumento das fronteiras agrícolas e expansão urbana, é indispensável a realização de estudos genéticos locais sobre o perfil de populações de animais silvestres utilizando-se marcadores moleculares adequados, principalmente em espécies vulneráveis e ameaçadas de extinção. Assim, o presente trabalho objetivou analisar os impactos da fragmentação do habitat na diversidade genética e na estrutura populacional de *M. tridactyla* (tamanduá-bandeira), nas regiões noroeste e sudoeste do estado de São Paulo, utilizando marcadores moleculares microssatélites específicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar a diversidade genética e caracterizar a estrutura genética das populações de *Myrmecophaga tridactyla* nas regiões noroeste e sudoeste do estado de São Paulo, utilizando marcadores moleculares microssatélites específicos.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar agrupamentos populacionais e a probabilidade de ocupação no ambiente, utilizando modelos estatísticos bayesianos de estrutura populacional.
- Obter dados moleculares que permitam entender as dinâmicas das populações e fornecer informações que contribuam para a conservação da espécie.
- Avaliar os impactos da fragmentação de habitat nas populações selvagens de tamanduá-bandeira.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Áreas de estudo

A área de estudo compreendeu a região noroeste do estado de São Paulo, abrangendo a população de animais do entorno da Estação Ecológica do Noroeste Paulista e foram analisados também indivíduos da região sudoeste do estado de São Paulo, pertencentes à população da Estação Ecológica de Santa Bárbara, os quais permitiram expandir a área analisada e comparar as populações de tamanduá-bandeira das áreas das duas Estações Ecológicas.

A região noroeste do estado possui aproximadamente 20.000 km quadrados e faz divisa com os estados de Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Esta região apresenta áreas de ocorrência original da Floresta Estacional Semidecidual, Savana e Contato Savana e Floresta Estacional, mas foi intensamente modificada desde o século XIX, sendo substituída por pastagens, culturas diversas e áreas urbanas, restando atualmente apenas nove por cento de sua área de origem. Recentemente, o cultivo de cana-de-açúcar vem se expandindo rapidamente na região, aumentando ainda mais a taxa de desmatamento. Hoje, esta região é a mais desmatada e fragmentada do estado e prioritária para inventários e manejos de fauna e flora (RODRIGUES et al., 2008; PROVETE, 2011).

A região sudoeste, como ocorre em boa parte do planalto ocidental paulista, também era coberta, antes da colonização, por um mosaico de cerrado e floresta estacional semidecidual. As florestas foram quase integralmente desmatadas, restando geralmente remanescentes em áreas de preservação permanente como matas ciliares ou encostas (IF, 2011).

Por conseguinte, a cobertura vegetal nativa dessas regiões compreendia a formação de florestas e cerrado, porém ao longo dos anos a vegetação do estado de São Paulo foi sendo alterada, em consequência da ação humana.

A ocupação do Cerrado iniciou-se no século XVIII para a exploração mineral e teve novo impulso a partir da década de 1950, para a implantação de projetos de pecuária e de agricultura. O cerrado já ocupou 14% do território paulista e ocupa

hoje cerca de um por cento, sendo que apenas a metade da área remanescente encontra-se protegida em unidades de conservação (DURIGAN et al, 2006). A destruição do Cerrado foi de certa forma, seletiva, pois priorizou as áreas mais adequadas à agricultura. No entanto, com os avanços tecnológicos que possibilitaram a ocupação de terras anteriormente consideradas não aptas para esse uso, a destruição do cerrado acelerou-se e expandiu-se por toda sua área de domínio nas últimas décadas, despertando preocupação e desencadeando esforços destinados à implementação de políticas que promovam sua conservação (SÃO PAULO, 1997; CAVALCANTI; JOLY, 2002; IF, 2011).

Quanto à Mata Atlântica, a mesma perdeu 92,5% de sua cobertura original nos últimos 500 anos e sofreu os impactos gerados pela exploração madeireira, pela conversão para agropecuária e pela instalação de núcleos urbanos. Sendo assim, esta formação vegetal tem, hoje, significativa proporção de espécies ameaçadas de extinção e dentre as formações vegetais que compõem a Mata Atlântica, a Floresta Estacional Semidecidual pode ser considerada a mais ameaçada, restando 280.000 ha ou 7,5% de sua área original (DEAN, 1996).

O Cerrado e a Mata Atlântica estão pouco representados em Unidades de Conservação no país como um todo. Estima-se que apenas 1,2% de área do cerrado estejam protegidos por Unidades de Conservação e 2,7% para a Mata Atlântica. Dados oficiais, referentes exclusivamente a Unidades de Conservação federais, mostram quadro de baixíssima representatividade para ambos os biomas (MYERS et al., 2000).

Além disso, as unidades de conservação existentes não representam igualmente todas as formações vegetais, estando o Cerrado e as zonas de transição com a Mata Atlântica em piores condições em termos de representatividade. A atual situação da vegetação natural remanescente no estado de São Paulo indica que a reversão do quadro de baixa representatividade é difícil, especialmente porque os remanescentes de vegetação nativa são poucos e de pequenas dimensões (SÃO PAULO, 1998; IF, 2011).

Diante do panorama observado, é de extrema importância investigar a situação das populações silvestres remanescentes em Unidades de Conservação no estado de São Paulo. Logo, em relação às áreas que compreendem ambas as

Estações Ecológicas, estas estão inseridas na zona de contato Cerrado/Mata Atlântica e se caracterizam por serem ecótonos, ou seja, regiões de transição entre dois biomas (IF, 2011; IF, 2014). Entretanto, ao longo dos anos, essas áreas sofreram diferentes impactos com a fragmentação de habitat, sendo que a área mais afetada pelos processos antrópicos foi a Estação Ecológica do Noroeste Paulista (IF, 2011; IF, 2014).

A Estação Ecológica do Noroeste Paulista (figura 2), situada entre as coordenadas 22°49' S a 47°23' W, possui uma área de 500 hectares em conjunto com a Floresta Estadual do Noroeste Paulista. Devido ao histórico de degradação do local, não restam fragmentos de floresta madura, especialmente da Estacional e do Cerradão e hoje se encontra altamente fragmentada e em contato com áreas muito urbanizadas (IF, 2014). Vale ressaltar que a urbanização e a especulação imobiliária ameaçam seriamente a área e apesar de a região de estudo ser muito pobre de fragmentos florestais preservados e não haver muitos estudos sobre a fauna que restou, os dados mostram que a região pode abrigar uma rica diversidade, mesmo sendo uma área cercada por pastagens, plantações e bairros urbanos (PEREIRA et al., 2015).

Já a Estação Ecológica de Santa Bárbara (figura 3) conta com 2.712 ha entre as coordenadas geográficas 22°46' a 22°41' S e 49°16' a 49°10' W e a maior parte da área da Estação Ecológica de Santa Bárbara é ocupada por vegetação nativa, com poucas evidências de perturbação antrópica e faz contato, na maior parte de suas divisas, com pastagens e reflorestamentos (IF, 2011).

3.2. Obtenção das amostras

Para a realização do presente estudo, as amostras foram obtidas por meio de coletas e também por uma amostragem de conveniência, na qual as amostras foram obtidas por meio de parceria com a Polícia Ambiental e com o Hospital Veterinário da UNIRP, de acordo com a ocorrência e com o atendimento de animais resgatados, principalmente vítimas de atropelamentos e queimadas. Uma das maiores dificuldades encontradas no presente trabalho foi a obtenção de amostras, devido às características do animal (hábito solitário, difícil captura, vulnerabilidade à extinção), além de todas as questões burocráticas e permissões de coleta envolvidas, principalmente em áreas protegidas.

Ao todo foram analisados 34 indivíduos, listados na tabela 1. Desta maneira, 23 amostras foram obtidas em parceria com o Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”, de São José do Rio Preto / SP, além de cinco amostras coletadas de animais do Zoológico Municipal de São José do Rio Preto e de seis amostras provenientes de coleta realizada na Estação Ecológica de Santa Bárbara (figura 4).

O projeto seguiu todos os procedimentos éticos necessários para a boa prática de pesquisa e bem estar dos animais e obteve autorizações legais dos Comitês de Ética de diferentes Universidades. Este trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética no Uso de Animais – CEUA do Centro Universitário de Rio Preto - UNIRP (04/2014PP); da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP (2014/05302-8) e do SISBIO (nº 43854-3).

Para as capturas na Estação Ecológica de Santa Bárbara (amostras cedidas), foram obtidas 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 (RIBEIRO et al., 2016).

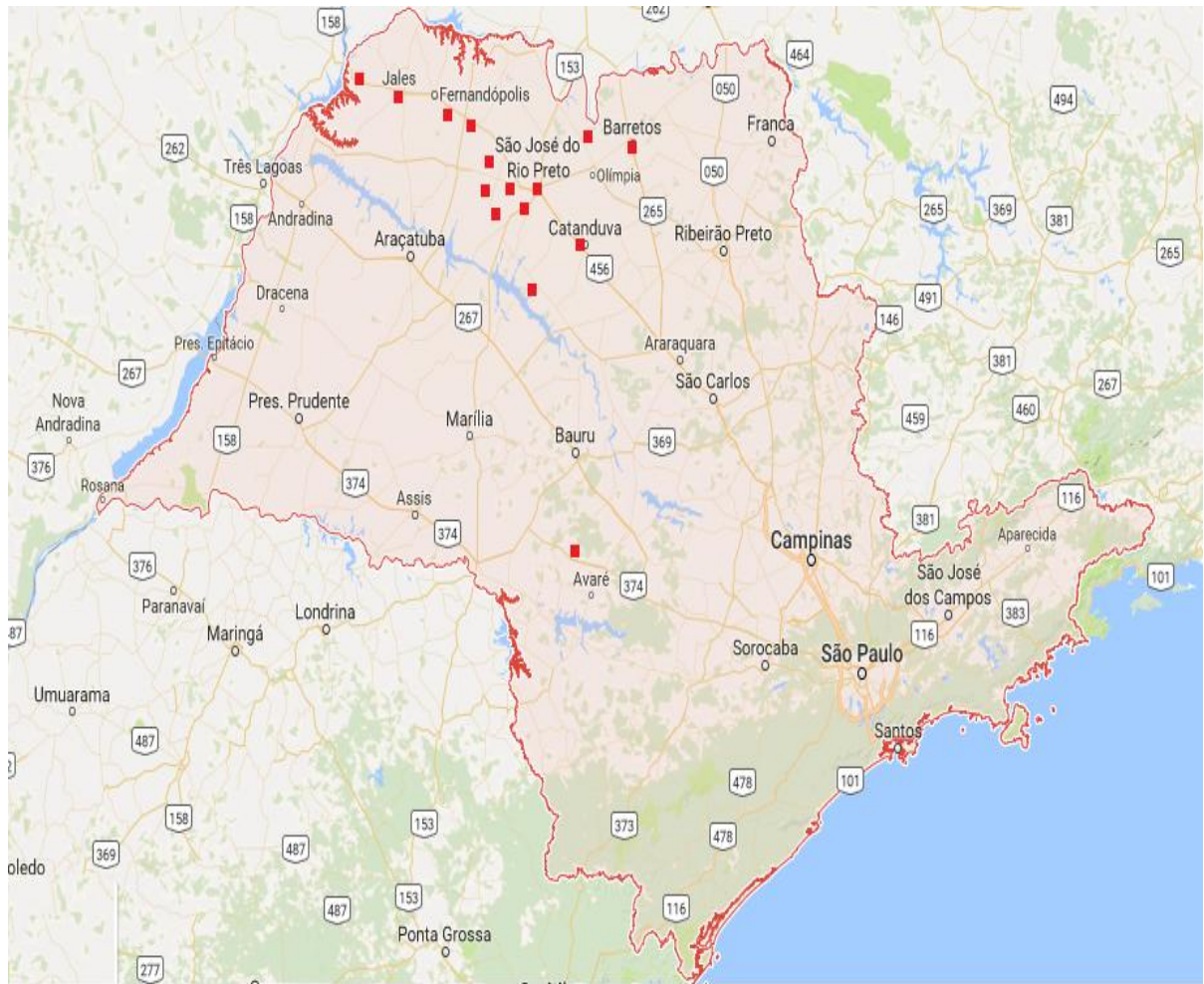


Figura 4. Área total de estudo. Quadrados vermelhos indicam os locais de captura/coleta dos indivíduos de *M. tridactyla* em áreas do interior do estado de São Paulo. Fonte: MAPS (2017).

Tabela 1. Lista contendo informações básicas dos 34 tamanduás-bandeira utilizados no presente estudo.

Identificação dos espécimes	Local de captura	Ocorrência
TAB01	Catanduva	Atropelamento
TAB02	Jales	Atropelamento
TAB06	Tanabi	Atropelamento
TAB07	Santa Fé do Sul	Atropelamento
TAB08	Tanabi	Atropelamento
TAB10	Bady Bassit	Atropelamento
TAB11	Mirassol	Atropelamento
TAB12	Mirassol	Animal hígido
TAB13	São José do Rio Preto	Sem informação
TAB14	São José do Rio Preto	Sem informação
TAB15	Mirassol	Animal hígido
TAB16	São José do Rio Preto	Atropelamento
TAB19	Águas de Santa Bárbara	Coleta/cedida
TAB20	Águas de Santa Bárbara	Coleta/cedida
TAB21	Águas de Santa Bárbara	Coleta/cedida
TAB22	Águas de Santa Bárbara	Coleta/cedida
TAB23	Águas de Santa Bárbara	Coleta/cedida
TAB24	Águas de Santa Bárbara	Coleta/cedida
TAB25	José Bonifácio	Atropelamento
TAB26	Fernandópolis	Atropelamento
TAB27	José Bonifácio	Atropelamento
TAB28	Mirassol	Animal hígido
TAB29	Votuporanga	Atropelamento
TAB30	Barretos	Atropelamento
TAB31	Bady Bassit	Animal queimado
TAB32	Icém	Atropelamento
TAB33	Tanabi	Atropelamento
TAB34	Novo Horizonte	Atacado por cães
TAB36	São José do Rio Preto	Coleta/zoológico
TAB37	Fernandópolis	Coleta/zoológico
TAB38	São José do Rio Preto	Coleta/zoológico
TAB39	Barretos	Coleta/zoológico
TAB40	São José do Rio Preto	Coleta/zoológico
TAB41	Neves Paulista	Atropelamento

3.2.1. SACCAS – Setor de Atendimento Clínico Cirúrgico de Animais Selvagens – Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”

Com o grande número de animais selvagens sendo vítimas de interferências humanas, como atropelamentos e queimadas, e conseqüentemente necessitando de atendimento médico de emergência qualificado, a equipe do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” instituiu, no ano de 2003, o SACCAS (Setor de Atendimento Clínico Cirúrgico de Animais Selvagens). Este setor fornece suporte para a Polícia Militar Ambiental do Estado de São Paulo e para o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), por meio do atendimento de emergência, recuperação e reabilitação de animais selvagens, principalmente de animais atropelados ou ainda, queimados, vítimas de incêndios e queima da cana-de-açúcar, que infelizmente são comuns no interior do Estado de São Paulo.

O Setor de Atendimento Clínico Cirúrgico de Animais Selvagens (SACCAS) atende mais de 90 municípios do Noroeste Paulista, sendo o Centro Universitário de Rio Preto/UNIRP, o mantenedor e incentivador deste projeto. Nos últimos anos, o SACCAS tem atendido cerca de 180 animais por ano, e particularmente para os tamanduás-bandeira esse número tem sido expressivo, tendo em vista que a maioria das amostras utilizadas no presente trabalho foi obtida por meio da parceria com o Hospital Veterinário e o SACCAS, cerca de 20 tamanduás bandeira resgatados e atendidos em aproximadamente três anos de parceria, sendo que 10 destes animais foram encontrados nas cidades que fazem limite com a Estação Ecológica do Noroeste Paulista. A média de tamanduás-bandeira atendidos no Hospital Veterinário pelo SACCAS é de um animal a cada dois meses (0,55 / mês).

Como procedimento padrão no atendimento dos animais feridos, são realizados exames clínicos e laboratoriais, que atestam o estado de saúde geral dos mesmos. Do restante do sangue colhido para as análises, e que não for utilizado para a realização de exames, uma pequena amostra (entre um e cinco mililitros) foi acondicionada em frasco plástico, contendo etanol a 95% e armazenado a -20° C, para extração do DNA.

3.2.2. Zoológico Municipal de São José do Rio Preto

O Zoológico Municipal de São José do Rio Preto, mantido pela Prefeitura Municipal de São José do Rio Preto, abriga atualmente cinco tamanduás-bandeira, sendo quatro animais que foram encontrados e encaminhados ao Zoológico pela Polícia Ambiental de São José do Rio Preto e Fernandópolis, e um filhote nascido em cativeiro.

Para a realização da coleta, foi feita a contenção mecânica e química dos animais (figuras 5, 6 e 7), de acordo com protocolo realizado pelo médico veterinário responsável e foi utilizado o anestésico dissociativo ZOLETIL 50® (Tiletamina 125 mg e Zolazepam 125 mg). Para o procedimento, foram utilizados 0,5 ml do sedativo para cada 10 kg de peso do animal para a sedação leve. Foram coletados entre cinco e dez mililitros de sangue via veia jugular e os animais foram observados após os procedimentos para garantir que não houvesse danos indiretos causados pela sedação. Parte do material foi enviada para análises sorológicas, a fim de verificar as condições de saúde dos animais.

3.2.3. Estação Ecológica de Santa Bárbara

As amostras da Estação Ecológica de Santa Bárbara são provenientes de coleta na área por campanhas de captura, realizada por grupos de pesquisa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal (FCAV-UNESP) e disponibilizadas pela Profa. Dra. Adriana Coletto e colaboradores (RIBEIRO et al., 2016; BERTASSONI et al., 2017). Segundo Ribeiro et al. (2016), foi realizada a contenção físico-química para captura do animal (ketamina 10 mg.kg⁻¹, midazolam 0,5 mg.kg⁻¹ e xilazina 0,5 mg.kg⁻¹) e 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 de sangue periférico, e uma porção de pelos dorsais contendo bulbo capilar.



Figura 5. Contenção mecânica do animal, com a ajuda do cambão, para posterior contenção química.



Figura 6. Contenção química (sedação leve), para coleta de amostras de sangue.



Figura 7. Após sedação leve, foram coletadas as amostras de sangue, via veia jugular.

3.3. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído utilizando-se o *kit* QIAamp DNA (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA genômico foi quantificado no espectrofotômetro EPOCH (BioTek) para a determinação da concentração e qualidade do DNA.

3.4. Marcadores moleculares

No presente estudo foram utilizados seis pares de oligonucleotídeos microssatélites específicos (Sigma-Aldrich), desenvolvidos para *M. tridactyla* em um estudo pioneiro realizado por Garcia et al. (2005). As seqüências dos oligonucleotídeos e suas especificações encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos microssatélites específicos desenvolvidos para a espécie *M. tridactyla* (GARCIA et al., 2005).

Loco	Motivo	Iniciadores	Ta (°C)	Tamanho (pb)
MtriUSP 04	(gt)09	5'GGGTCAGATATCCTAATGGG3' 5'TGTCTTCTTTACTCAGTGCTCC3'	61	158
MtriUSP 07	(gt)42	5'AGGAGGATAAGATTAGGCAG3' 5'TGTGTCCTGTGAAGTAATGG3'	62	274
MtriUSP 11	(gt)15	5'TGTCTCTGTGTTAGGGTTCTTC3' 5'TCACCTTCATTGGAGCTTC3'	59	174
MtriUSP 13	(gt)14	5'CTGCTCAGGTAACATTCC3' 5'TGGTAAAGAATGAGGTC3'	57	223
MtriUSP 17	(gt)20	5'CCCAGAATGAACTTACTTG3' 5'ACTGGCAACTTGTTGTTG3'	55	191
MtriUSP 20	(gt)14	5'CTTTCCTCATATCTCCCTG3' 5'CTATATGCTTGCCTTTGG3'	55	157

3.5. Genotipagem manual e condições de amplificação

A amplificação dos fragmentos de DNA microssatélites foi realizada por PCR convencional. Após a padronização técnica e amplificação dos fragmentos de DNA por cPCR, os produtos foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose especial de alta resolução a 3% (*MetaPhor*®), utilizando-se o corante *Sybr Safe*® (Invitrogen) e o marcador de peso molecular DNA *ladder* de 100 pares de base (ThermoFischer Scientific).

A agarose de alta resolução é indicada para a separação e genotipagem de fragmentos microssatélites, pois permite separar fragmentos de DNA que diferem em tamanho em 2%, fornecendo duas vezes a capacidade de resolução da agarose comum, semelhante à separação de fragmentos por gel de poliacrilamida (LONZA, 2007). Devido à eficiência na amplificação e separação de fragmentos, a agarose de alta resolução é utilizada para a genotipagem de fragmentos, incluindo os fragmentos microssatélites, em diferentes estudos (KUSUKAWA; WRITE, 1997; ORDOVAS, 1998; ASIF et al., 2008; CHENG et al, 2015).

Além disso, utilizando protocolos de execução rápida, a separação dos fragmentos de DNA pode ser resolvida em apenas uma hora, em um formato de gel horizontal ou vertical de 20 cm de comprimento. Os géis de agarose de alta resolução apresentam vantagens como a maior rapidez na preparação do gel, menor tempo da corrida eletroforética e menor toxicidade, em comparação aos géis de poliacrilamida (LONZA, 2007).

Para a eliminação de artefatos e bandas inespecíficas, foram testadas diferentes condições de reação e para otimizar as amplificações, foi realizada a padronização por gradiente, utilizando como parâmetro a temperatura de *melting* de cada iniciador. Desta forma, foi possível identificar a temperatura de anelamento ideal para cada oligonucleotídeo. Foram necessários ajustes nas concentrações dos reagentes de acordo com cada iniciador e para as amostras com baixa concentração de DNA, foi utilizado o reagente *REPLI-g Mini Kit* (QIAGEN) para replicação do material genômico. Vale ressaltar que houve dificuldades para eliminar bandas inespecíficas e rastros na revelação dos géis, porém as bandas inespecíficas foram eliminadas realizando-se repetições nas PCRs e eletroforeses.

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti, modelo 9700 e em um volume total de 25 μ L, contendo $\sim$ 50 ng/ μ L de DNA (2 μ L), 1 μ L do iniciador *forward*, 1 μ L do iniciador *reverse*, 12,5 μ L de GoTaq® Master Green Promega e 8,5 μ L de água ultra pura.

As condições de amplificação foram adaptadas de Garcia et al. (2005): desnaturação de 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de: 95°C por 50 segundos cada, 50 segundos para anelamento do iniciador (com a temperatura específica para cada iniciador, entre 55 e 62°C), 72°C por 1 minuto, e uma etapa adicional de extensão de 72°C por 10 minutos.

Os padrões de fragmentos que cada iniciador produziu, em cada combinação de fatores, foram inspecionados visualmente, sendo observadas a qualidade e a intensidade dos fragmentos. A amplificação por cPCR, a eletroforese e a genotipagem de cada iniciador foram realizadas independentemente e repetidas para minimizar os erros. Após a padronização dos protocolos moleculares, foi possível a amplificação, separação dos fragmentos e obtenção de imagens de qualidade dos géis. Posteriormente, os resultados das amplificações foram fotodocumentados para a genotipagem manual (figura 8).

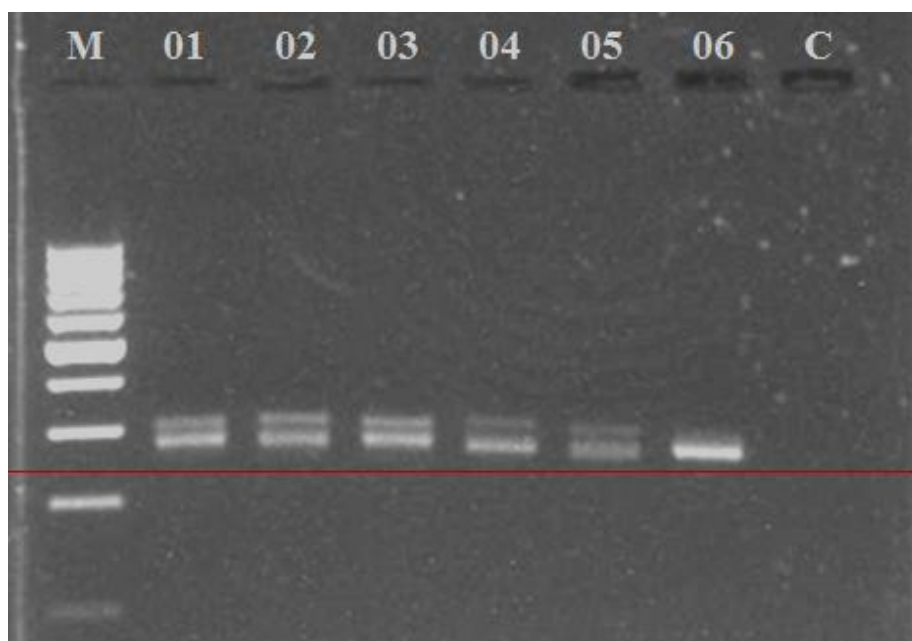


Figura 8. Fotodocumentação de um dos fragmentos microssatélites analisado, de 274pb - MtriUSP07, ilustrando a separação dos fragmentos. Identificação de cinco heterozigotos (01 a 05) e a presença de um homozigoto (06). M: Marcador molecular de 100 pares de base (pb), C: Controle negativo.

3.6. Genotipagem automatizada e condições de amplificação

Além da genotipagem manual em gel, foi realizada a genotipagem automatizada para os mesmos fragmentos microssatélites, a fim de comparar e validar os resultados encontrados com a genotipagem manual.

Esta técnica de genotipagem baseia-se na determinação do tamanho de fragmentos amplificados por PCR, utilizando iniciadores marcados com fluorescência. Após a PCR, os fragmentos são submetidos a uma eletroforese capilar, em seqüenciador automático de DNA e o uso de diferentes fluorescências permite a análise vários fragmentos (locos) ao mesmo tempo (APPLIED, 2012).

Como a leitura do tamanho dos alelos no gel é realizada visualmente, alelos de tamanhos próximos podem ser equivocadamente considerados apenas um alelo, portanto a análise dos fragmentos em seqüenciador automático de DNA é mais precisa em comparação à análise em gel de agarose de alta resolução ou poliacrilamida (GUPTA et al., 2010; GOULART et al., 2011).

A metodologia para a realização da eletroforese capilar consiste inicialmente na realização de uma PCR utilizando-se iniciadores marcados com fluorescência. Para isso, foi utilizado o método da cauda universal M13 marcada com fluoróforo (OETTING et al., 1995; SCHUELKE, 2000). A técnica da cauda fluorescente consiste na marcação dos fragmentos de PCR com fluoróforos presentes em um iniciador universal (“cauda” M13).

Nesta técnica, apenas o iniciador *forward* é sintetizado com a adição de seqüência do iniciador universal (M13), que corresponde à chamada cauda, sintetizada com fluoróforo. Ou seja, cada marcador foi sintetizado de acordo com a técnica da cauda fluorescente, adicionando-se a cauda M13 de 18 pb de seqüência 5'TGTAACGACGGCCAGT-3', na extremidade 5' do iniciador *forward* dos marcadores (GOULART et al., 2011).

A amplificação por PCR é, portanto, realizada com três iniciadores: o *forward* contendo a seqüência complementar a cauda M13, o iniciador *reverse* e o iniciador M13 marcado com fluorescência. A PCR então ocorre em duas etapas (SCHUELKE, 2000). Na primeira, os fragmentos são amplificados de forma usual e, na seqüência,

são incluídos ciclos adicionais de amplificação, com o objetivo de inserir o iniciador M13 marcado com os fluoróforos nos fragmentos amplificados pelos ciclos anteriores (SCHUELKE, 2000).

As amplificações foram realizadas em um volume total de 17,2 μL , contendo ~50ng de DNA (1 μL), 0,2 μL do iniciador *forward*, 0,4 μL do iniciador M13 marcado com fluoróforo, 0,6 μL do iniciador *reverse*, 5 μL de Gotaq® Colorless Master Mix Promega e 10 μL de água ultra pura. A amplificação dos fragmentos para a análise capilar foi realizada por meio de protocolo *Touchdown* (TDPCR), utilizado para aumentar a sensibilidade da amplificação e diminuição de picos inespecíficos “*stutter peaks*” (KORBIE; MATTICK, 2008).

As condições de amplificação nas reações foram: desnaturação a 95°C por 2 minutos, 12 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 40 segundos para anelamento do iniciador (protocolo *Touchdown*, com temperaturas variando de 64 à 53°C, diminuindo um grau por ciclo), 72°C por 30 segundos e mais 25 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 52°C por 40 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 5 minutos.

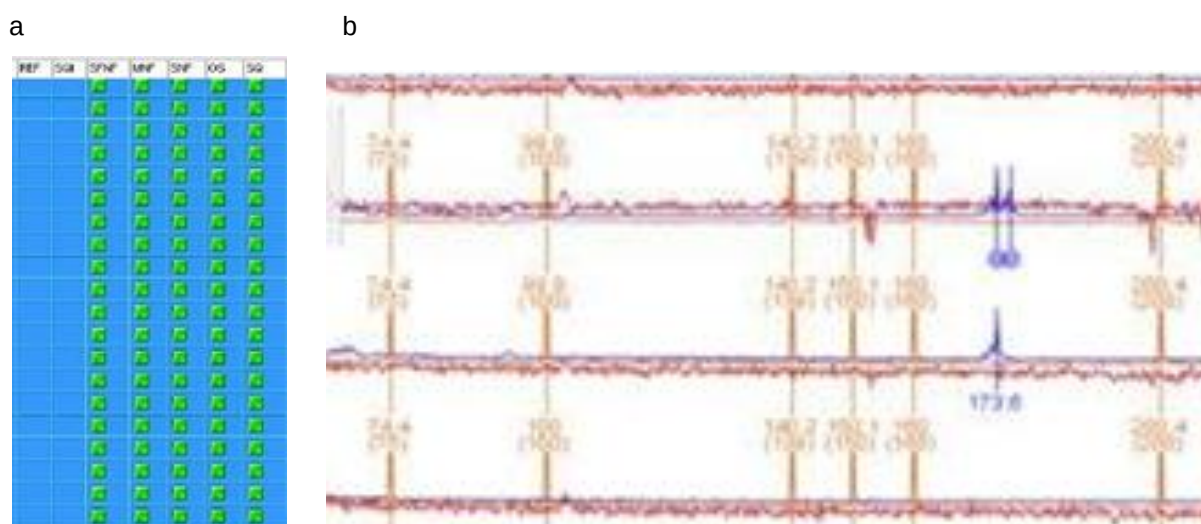
As amostras foram visualizadas em gel de agarose 3% para confirmação das amplificações e após as padronizações, a identificação dos fragmentos foi realizada em seqüenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems), no laboratório Helixxa.

Para a corrida de eletroforese capilar no seqüenciador 3500 Genetic Analyzer, foi utilizado o Dye Set DS 33 - GeneScan 500 Liz, para a combinação de iniciadores marcados com 6-FAM, VIC, NED e PET e como marcador de peso molecular compatível o GeneScan 500 Liz (Applied Biosystems). O marcador de peso molecular GeneScan 500 Liz cria uma curva para cada capilar analisado, gerando uma análise individual e precisa, o que aumenta a precisão da análise em comparação ao padrão de marcador de peso molecular (*ladder*) utilizado em eletroforese em gel. Por isso, a análise de eletroforese capilar automatizada permite a detecção de alelos com apenas uma base de diferença com grande segurança e confiabilidade (DAVID et al., 1993; GOULART et al., 2011).

O iniciador M13 foi sintetizado com a adição dos fluoróforos 6-FAM (azul), VIC (verde) e PET (vermelho), para permitir a leitura por laser do seqüenciador e as reações dos seis marcadores microssatélites foram organizadas em dois grupos, com base nos tamanhos de fragmento esperados.

O primeiro grupo corresponde aos iniciadores MtriUSP04 (158pb), MtriUSP07 (274 pb), MtriUSP11 (174 pb) marcados respectivamente com os fluoróforos 6-FAM, PET e VIC, na cauda M13. No segundo grupo estão os iniciadores MtriUSP 13 (223 pb), MtriUSP 17 (191 pb) e MtriUSP20 (157 pb) marcados respectivamente pela cauda M13 fluorescente, também com os fluoróforos 6-FAM, PET e VIC.

Os resultados e os tamanhos dos picos foram analisados por meio do programa computacional GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems) e durante as análises foram verificados componentes de qualidade para cada uma das amostras e para os genótipos associados às amostras (figura 9a-b). A verificação da qualidade dos picos, a análise dos eletroferogramas e a correta identificação dos alelos na presença de fragmentos não inespecíficos amplificados são extremamente importantes para uma interpretação confiável dos dados microssatélites (ARIF et al., 2010). Os fragmentos apresentaram tamanho maior em relação ao tamanho referente aos marcadores originais, devido à adição da cauda M13 incluída no iniciador, mas também correspondem ao tamanho esperado para este marcador com base na informação referente ao seu desenvolvimento (GARCIA et al., 2005).



3.7 Análises estatísticas

A partir da interpretação dos géis, foram obtidos os genótipos dos indivíduos, os quais foram utilizados para a criação de matrizes binárias, de acordo com a posição dos alelos para as análises computacionais com diferentes recursos. Existe uma extensa base matemática para analisar a variabilidade genética e a estrutura populacional por programas estatísticos que permitem a utilização de diferentes modelos e análises de cenários variados (GREENBAUM, 2014).

Desta maneira, foram realizadas análises para estimar a diversidade genética, distâncias genéticas, diferenciação genética, níveis de fluxo gênico, estrutura populacional, migração, entre outros parâmetros. Foram realizadas análises com e sem informações *a priori*, para entender as dinâmicas populacionais das populações de tamanduá-bandeira a nível local.

A diversidade genética foi caracterizada a partir dos seguintes índices: riqueza alélica ou número médio de alelos por loco e heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada, segundo as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O parâmetro mais utilizado para medir a diversidade dentro das populações é a heterozigosidade esperada, ou a diversidade de genes, definida por Nei (1972) como a probabilidade de que dois alelos escolhidos aleatoriamente da população sejam diferentes. A diversidade alélica é um critério alternativo para medir a diversidade genética, e este parâmetro pode ser o mais relevante em programas de conservação, uma vez que um elevado número de alelos implica uma fonte de variação de loco único para características importantes (SETHURAMAN, 2013).

Os métodos mais popularmente utilizados nas análises para quantificar a diferenciação genética entre populações estão baseados na estatística F de Wright (1965), uma medida padronizada do grau de diferenciação genética entre as populações.

Nas estatísticas F , são utilizados três coeficientes: o coeficiente de endogamia (F_{it}), que é a correlação entre genes dentro de indivíduos da mesma

população, o coeficiente de coancestralidade (F_{st}), que é a correlação entre indivíduos dentro da mesma subpopulação e a correlação entre genes em indivíduos dentro das subpopulações (F_{is}). As estatísticas F também possuem diferentes definições análogas (WHITLOCK, 2011).

A definição mais geral de F é a proporção da redução da heterozigosidade comparada a uma população em equilíbrio de Hardy Weinberg. O valor teórico de F_{st} varia de 0 a 1 e utilizam-se os parâmetros do guia qualitativo proposto por Wright para classificar os níveis de diferenciação populacional em baixo (0 – 0,05), moderado (0,05 – 0,15), alto (0,15 – 0,25) e muito alto (> 0,25) (SETHURAMAN, 2013).

As estatísticas F também são utilizadas para realização de outras análises. Como por exemplo, para quantificar o fluxo gênico pela relação entre F_{st} e o número de migrantes por geração (Nm) (SLATKIN, 1993). Métodos de agrupamento bayesiano foram utilizados para a realização das análises e identificação de agrupamentos populacionais. Desta forma, as análises de diversidade genética de estrutura populacional também foram calculadas a partir de agrupamentos bayesianos com base nos genótipos dos indivíduos.

Métodos tradicionais para caracterizar a diferenciação genética entre populações são feitos por meio de agrupamentos dos indivíduos *a priori*, ou seja, os cálculos são feitos levando em consideração apenas a posição geográfica de cada população. Porém, o agrupamento dos indivíduos em populações geográficas pode diminuir o poder das análises para elucidar processos biológicos, podendo levar a estratégias de manejo ou conservação não adequadas (LATCH et al., 2006).

Sendo assim, métodos de agrupamento bayesiano podem determinar a origem de indivíduos desconhecidos e delinear populações, baseado no conceito de que indivíduos da mesma população terão genótipos mais parecidos do que indivíduos de uma população diferente (CORNUET et al., 1999; MANEL et al., 2002). Ou seja, o método de agrupamento bayesiano evita algumas limitações, pois decompõe uma amostra de indivíduos em grupos geneticamente distintos sem caracterização de populações *a priori*. Este método tem sido reconhecido como uma ferramenta poderosa no estudo de populações em amostras de indivíduos de grupos geneticamente distintos (MANK; AVISE, 2004).

A alternativa da utilização desta análise é justificada devido à robustez do método e sua capacidade em diferenciar grupos nos quais os alelos não são extremamente diferentes. Isso a torna adequada para muitos estudos de conservação, sendo a melhor alternativa para estudos locais, com quantidade reduzida de amostras, como em estudos de conservação envolvendo espécies ameaçadas. Além disso, trabalhos já realizados demonstram sua eficiência na aplicação em análises de conjunto de dados genotípicos de organismos “não modelos”, com amostragem menor que as utilizadas em estudos de organismos “modelo” (MANK; AVISE, 2004; LATCH et al., 2006).

Estudos demonstraram que, apesar de baixos números amostrais diminuírem o desempenho dos programas computacionais, o método bayesiano é o mais adequado pela eficiência em inferir corretamente o número de subpopulações (EVANNO et al., 2005).

No presente estudo, as análises de estrutura populacional para identificação dos padrões genéticos das populações e de agrupamentos populacionais ao longo da área foram realizadas por diferentes abordagens estatísticas.

A primeira consiste nas análises realizadas em nível individual, com todos os indivíduos amostrados, desta forma, evitou-se a perda de informações individuais importantes. A outra abordagem refere-se à análise populacional apenas com as duas populações das Estações Ecológicas, bem definidas geograficamente, para evitar extrapolar os dados inseridos nos programas devido à amostragem. Esta abordagem permitiu verificar os resultados gerados, pois possibilita a otimização das análises dos programas computacionais (EVANNO et al., 2005; LATCH et al., 2006).

O objetivo da utilização de diferentes estatísticas e métodos de análise é reconhecer a provável identidade populacional de cada indivíduo, utilizando os organismos individuais como unidade de análise e para que a informação genética individual não seja perdida, fator fundamental no estudo de animais vulneráveis ou ameaçados de extinção (MANK; AVISE, 2004).

3.8 Recursos computacionais e modelos estatísticos

As análises de diversidade genética foram feitas utilizando o programa computacional TFPGA 1.3 (*Tools For Population Genetic Analyses*; MILLER, 1997), para calcular os desvios de equilíbrio de Hardy-Weinberg com testes exatos e Qui quadrado (HALDANE, 1954), distância genética (NEI, 1972), frequências alélicas, heterozigosidade média (observada– H_o e esperada– H_e), porcentagem de locos polimórficos e calcular as estatísticas F de Wright (1965). O programa GENEPOP 4.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995) também foi utilizado, para calcular o número de migrantes por geração, pelo método de alelos privados (BARTON; SLATKIN, 1986).

A caracterização da estrutura populacional e a identificação de grupos populacionais para os indivíduos amostrados foram realizadas utilizando os programas computacionais STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) e GENELAND 4.0.8 do pacote R 3.4.2 (GUILLOT; MORTIER; ESTOUP, 2005), sem dados “*a priori*”. Ou seja, não foram informadas as populações e, além disso, os indivíduos foram analisados separadamente pelos programas, que verificam por uma abordagem bayesiana (MCMC: Cadeia de Markov Monte Carlo), qual agrupamento populacional (*cluster*) é estatisticamente o mais provável para cada indivíduo, com base nos genótipos de cada espécime (POMETTI, 2014).

O programa computacional STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) foi o primeiro passo para examinar a estrutura populacional em uma amostragem baseada em níveis individuais (PORRAS-HURTADO et al., 2013).

Os resultados gerados pelo STRUCTURE 2.3.4 foram inseridos no programa STRUCTURE HARVESTER (EARL, VONHOLDT; 2012), para inferir qual dos valores de k (*clusters*) melhor representa os dados pelo método de Evanno (EVANNO et al., 2005), fornecendo uma maneira rápida de avaliar e visualizar valores de probabilidade em múltiplos valores de k e centenas de interações para facilitar a detecção do número de grupos genéticos que melhor se adequam aos dados. Posteriormente, utilizamos o servidor CLUMPAK: *Cluster Markov Packager Across K* (KOPELMAN et al., 2015), um método que automatiza o pós-processamento de dados, identificando o modelo mais adequado gerado pelo STRUCTURE. Os parâmetros utilizados nas análises do STRUCTURE 2.3.4 foram:

10.000 passos de *burn-in* e 20.000 repetições de MCMC, 25 iterações por corrida e diferentes probabilidades (de um a dez), para a ocorrência de populações.

Para avaliar a estrutura espacial das populações e comparar com os resultados do STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000), foi utilizado outro programa, o GENELAND 4.0.8 (GUILLOT; MORTIER; ESTOUP, 2005). A análise foi realizada com 100.000 iterações, 100 *thinning* e 200 *burn in*, de acordo com o manual do programa. Neste programa, além dos genótipos, foram inseridas as coordenadas geográficas, para gerar informações sobre a área de probabilidade de associação para indivíduos ou populações no espaço, permitindo assim a análise da estrutura espacial e verificação da correlação entre as descontinuidades genéticas e as descontinuidades da paisagem.

Para verificar a estrutura das subpopulações e realizar análises hierárquicas, foi utilizado o programa computacional ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) por meio da Análise de Variância Molecular (AMOVA), a fim de elucidar a distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações. A AMOVA é uma classe de medidas análogas à estatística F , designada estatística θ , que considera níveis hierárquicos de diferenciação populacional: a análise entre grupos (FCT); entre populações dentro de grupos (FST); e dentro das populações (FSC). Para realizar uma análise hierárquica, foi necessário agrupar as populações, atribuindo números diferentes para cada grupo (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992; TURCHETTO-ZOLET et al., 2013).

Além disso, no programa ARLEQUIN 3.5 também foram calculados os níveis de diversidade genética e gerados gráficos utilizando as funções do pacote R (R-lequin), de acordo com o manual do programa (R CORE TEAM, 2013).

Assim, este conjunto de análises estatísticas utilizando diferentes recursos computacionais, permitiu o estudo de organismos individuais como unidades de análise e de populações bem definidas geograficamente, possibilitando a identificação da estrutura e da diversidade genética das populações de tamanduás-bandeira em uma região altamente fragmentada do estado de São Paulo.

4. RESULTADOS

4.1 Eficiência dos marcadores microssatélites

A partir das genotipagem manual e da genotipagem automatizada dos fragmentos microssatélites e das análises estatísticas, foi possível obter dados acerca da variabilidade genética e estrutura populacional atual das populações de *Myrmecophaga tridactyla*, nas regiões noroeste e sudoeste do estado de São Paulo, evidenciando a eficiência dos marcadores microssatélites utilizados.

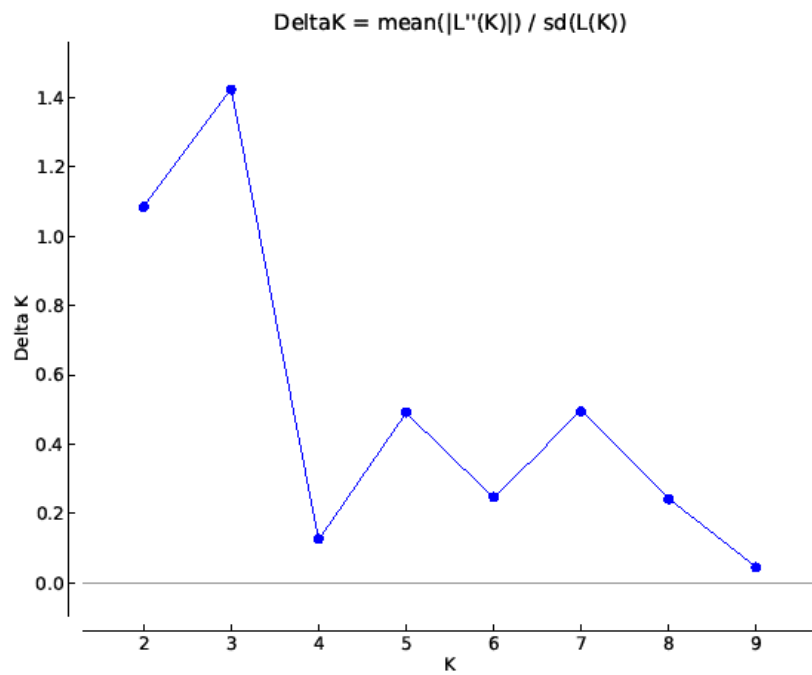
Nossos resultados, gerados a partir de diferentes técnicas de genotipagem, indicaram que as populações de *M. tridactyla* apresentam baixo fluxo de genes e estruturação populacional. Por outro lado, encontramos características que são incomuns em populações pequenas e fragmentadas, uma vez que estas populações apresentaram alta diversidade genética, apesar da intensa fragmentação de habitat e baixa capacidade de dispersão da espécie.

4.2 Análise da estrutura populacional

As análises bayesianas realizadas para a identificação de agrupamentos populacionais no programa STRUCTURE 2.3.4 e o pós-processamento utilizando os recursos computacionais STRUCTURE HARVESTER e CLUMPAK, permitiram a avaliação da estrutura das populações. Os resultados apresentados correspondem às análises populacionais feitas tanto a partir da matriz da genotipagem manual, como da genotipagem capilar automatizada.

Os modelos gerados identificaram três agrupamentos populacionais (figuras 10a-b e 11a-b) e revelaram estrutura populacional bem definida na população da Estação Ecológica de Santa Bárbara em relação aos demais agrupamentos populacionais identificados (figura 12a-b).

a



b

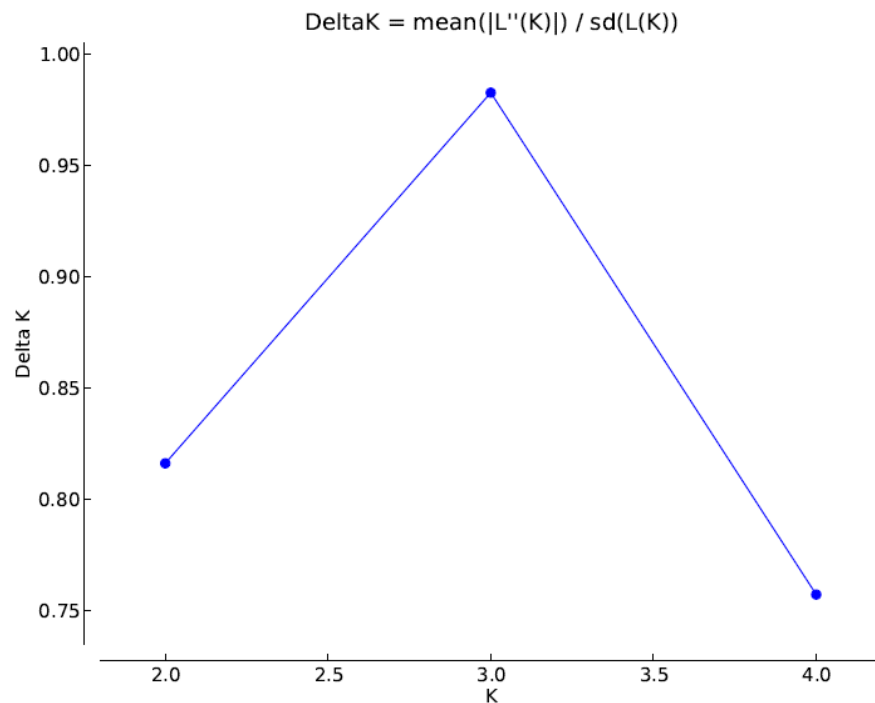


Figura 10a-b. Gráficos gerados no programa STRUCTURE HARVESTER após a análise no STRUCTURE, a partir da genotipagem manual (a) e da genotipagem automatizada (b). Ilustrando a identificação de três agrupamentos populacionais ($K=3$) pelo método de Evanno, por meio da estimativa do maior valor de Delta K (EVANNO et al., 2005).

a

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	25	-789.184000	1.329687	—	—	—
2	25	-761.948000	5.911509	27.236000	6.412000	1.084664
3	25	-741.124000	24.043767	20.824000	34.224000	1.423404
4	25	-754.524000	47.963296	-13.400000	6.072000	0.126597
5	25	-761.852000	42.826687	-7.328000	21.096000	0.492590
6	25	-790.276000	41.787910	-28.424000	10.360000	0.247919
7	25	-808.340000	44.795452	-18.064000	22.168000	0.494872
8	25	-848.572000	91.917973	-40.232000	22.248000	0.242042
9	25	-866.556000	149.501703	-17.984000	6.664000	0.044575
10	25	-877.876000	103.280489	-11.320000	—	—

b

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	25	-659.548000	1.136926	—	—	—
2	25	-725.872000	48.999732	-66.324000	39.984000	0.816004
3	25	-752.212000	50.366807	-26.340000	49.492000	0.982631
4	25	-828.044000	116.532746	-75.832000	88.216000	0.757006
5	25	-815.660000	119.870044	12.384000	—	—

Figura 11a-b. Tabelas referentes aos valores calculados pelo programa STRUCTURE HARVESTER, a partir da genotipagem manual (a) e automatizada (b). Identificação dos três agrupamentos populacionais, de acordo com o maior valor de Delta K (EVANNO et al., 2005).

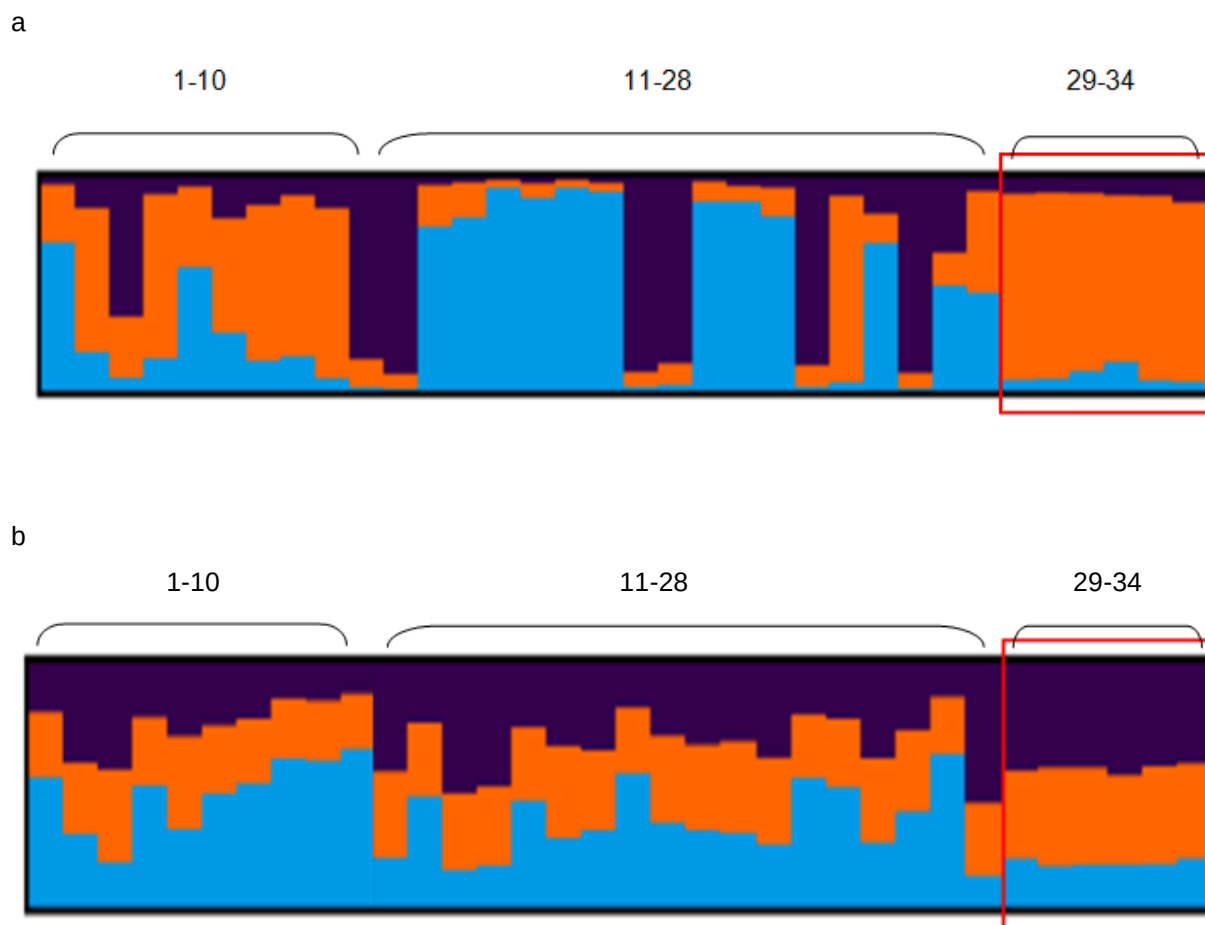


Figura 12a-b. Resultado após o processamento automático dos dados, no servidor CLUMPAK (KOPELMAN, 2015), pela genotipagem manual (a) e pela genotipagem automatizada (b). Barras de 1 a 10: animais do entorno da Estação Ecológica do Noroeste Paulista. 11 a 28: demais animais do Noroeste Paulista. 29 a 34: animais da Estação Ecológica de Santa Bárbara (em vermelho).

O resultado da análise de estrutura espacial pelo programa computacional GENELAND, com todos os indivíduos amostrados, também indicou a presença de três agrupamentos (figuras 14a-b e 15a-b). O modelo gerado corroborou os resultados anteriores obtidos no programa STRUCTURE, tanto com a matriz gerada pela genotipagem manual, quanto pela automatizada.

As imagens dos mapas gerados podem ser analisadas e correlacionadas com imagens de satélite da área, permitindo observar as desconectividades genéticas em relação às características da paisagem (figura 13).

A análise de estrutura espacial permitiu identificar os agrupamentos ao longo do ambiente e também observar a probabilidade dos indivíduos de pertencerem aos agrupamentos ou áreas, de acordo com o genótipo e coordenada geográfica de cada indivíduo. Foi possível verificar as dinâmicas populacionais relacionadas às características geográficas (figuras 16a-b-c e 17a-b-c). Assim, a utilização de diferentes programas de estrutura populacional foi fundamental para esclarecer as dinâmicas e para fornecer dados auxiliares para o estudo dos efeitos da fragmentação de habitat sobre as populações de *M. tridactyla*.

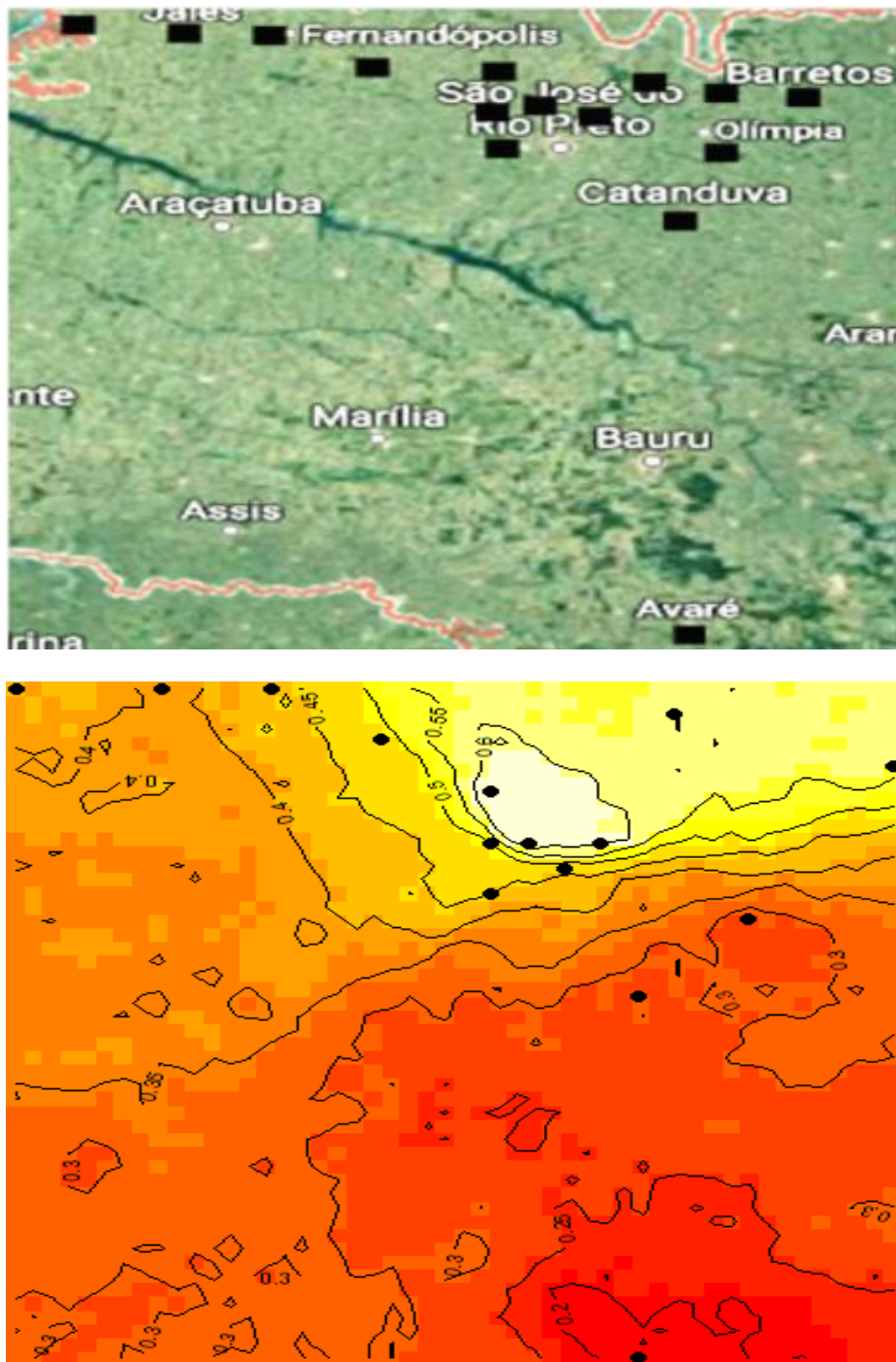
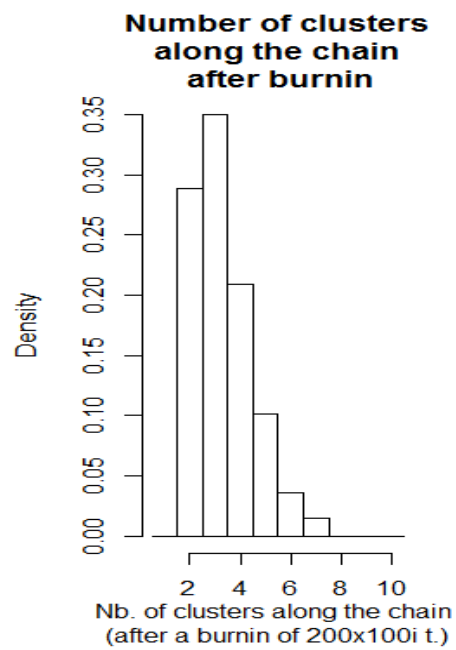


Figura 13. Esquema comparando uma imagem de satélite da área e um dos mapas gerados pelo programa GENELAND. O programa computacional relaciona o genótipo dos indivíduos e sua localização geográfica, permitindo assim uma análise espacial para identificar se há agrupamentos populacionais ao longo do ambiente e se existem desconectividades genéticas em relação às características da paisagem. Pontos pretos indicam os locais dos animais ou populações amostradas e diferentes cores indicam as probabilidades dos indivíduos pertencerem à determinada área ou agrupamento, ou seja, regiões de alta (amarelo claro) a baixa (vermelho) probabilidade posterior de pertencimento à área. As linhas de contorno representam a mudança espacial na probabilidade de atribuição da população.

a



b

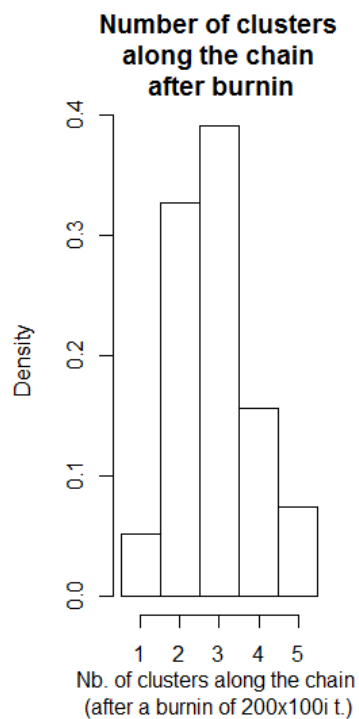
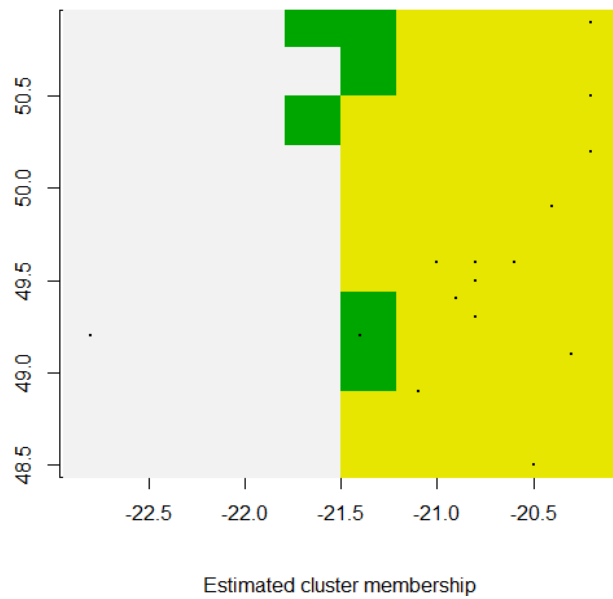


Figura 14a-b. Resultado da genotipagem manual (a) e automatizada (b). Identificação de três agrupamentos pelo programa computacional GENELAND, em concordância com os dados preliminares do STRUCTURE. A maior barra demonstra o número de agrupamentos populacionais identificados ($k=3$).

a



b

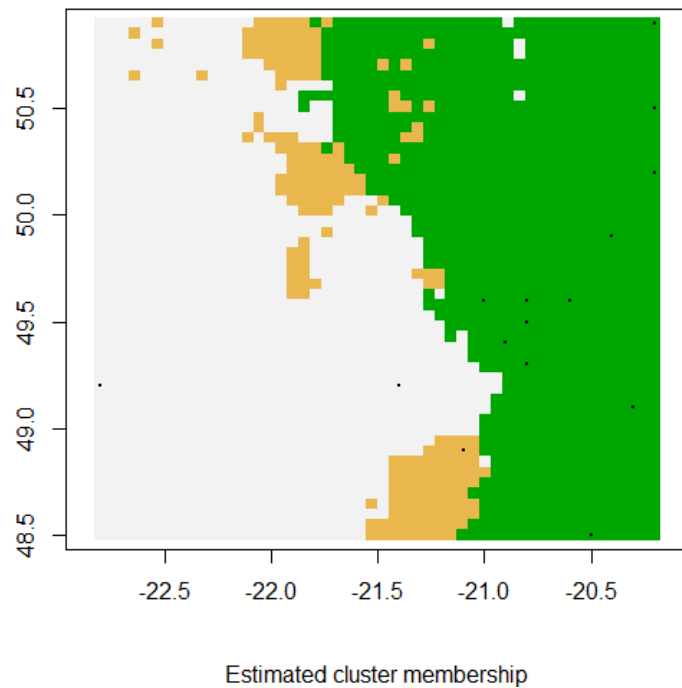
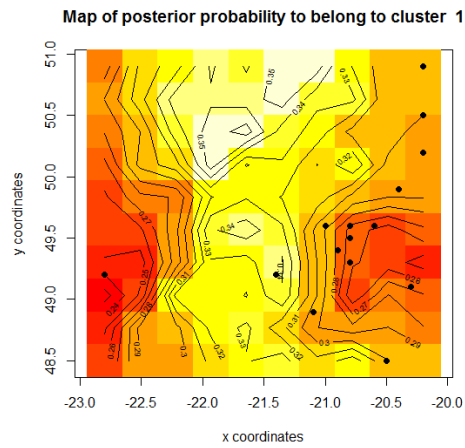
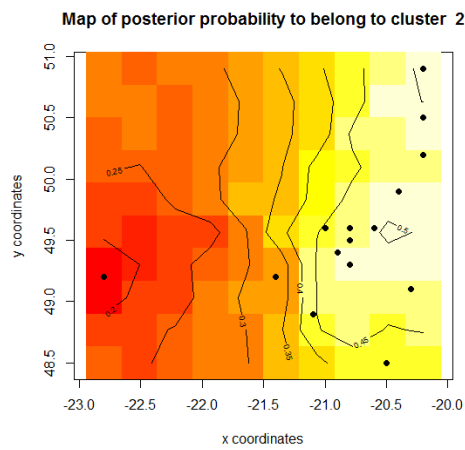


Figura 15a-b. Mapas gerados pelo programa GENELAND, a partir da matriz de genotipagem manual (a) e automatizada (b). Pontos pretos correspondem à localização geográfica dos indivíduos e populações amostradas. Cada cor no mapa indica um agrupamento distinto, estimado com base nos genótipos dos indivíduos.

a



b



c

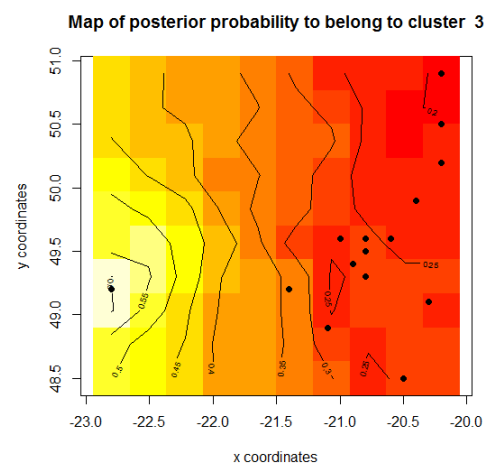
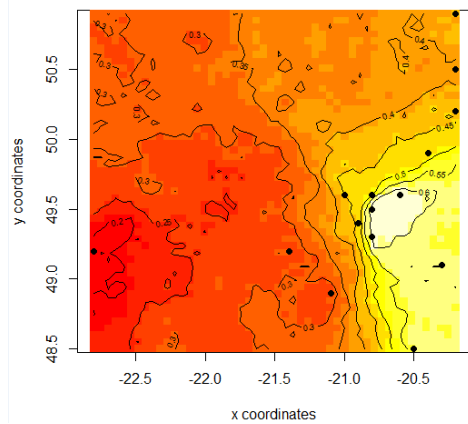


Figura 16a-b-c. Mapas de atribuição individual gerados no GENELAND, a partir da genotipagem manual. Probabilidade posterior de pertencimento aos grupos um, dois e três. Pontos pretos indicam as coordenadas dos locais amostrados. Cores indicam as regiões de alta (amarelo claro) a baixa (vermelho) probabilidade posterior de pertencimento à área ou ao agrupamento e as linhas de contorno representam a mudança espacial na probabilidade de atribuição da população.

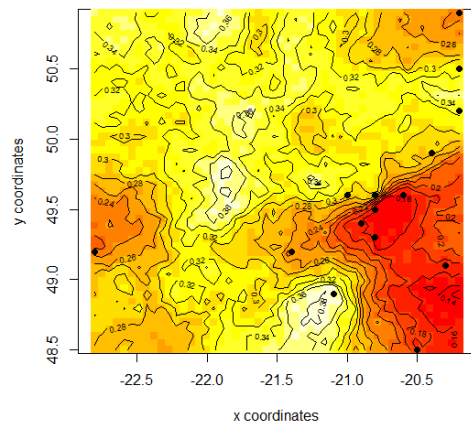
a

Map of posterior probability to belong to cluster 1



b

Map of posterior probability to belong to cluster 2



c

Map of posterior probability to belong to cluster 3

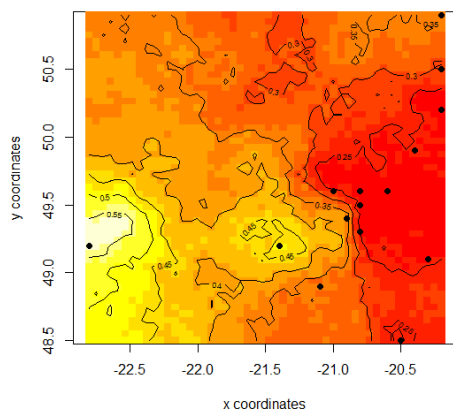


Figura 17a-b-c. Mapas de atribuição individual gerados no GENELAND, a partir da genotipagem automatizada. Probabilidade posterior de pertencimento aos grupos um, dois e três. Pontos pretos indicam as coordenadas dos locais amostrados. Cores indicam as regiões de alta (amarelo claro) a baixa (vermelho) probabilidade posterior de pertencimento à área ou ao agrupamento e as linhas de contorno representam a mudança espacial na probabilidade de atribuição da população.

Adicionalmente, foi realizada a análise apenas com as populações das Estações Ecológicas, ou seja, populações bem definidas geograficamente. A análise das populações da área da Estação Ecológica de Santa Bárbara e da área da Estação Ecológica do Noroeste Paulista e seu entorno, que estão distantes cerca de 300 km, permitiu a comparação das respectivas populações remanescentes de tamanduá-bandeira. Esta análise populacional foi essencial para garantir que os dados não fossem extrapolados, uma vez que a amostragem total foi realizada com diversos indivíduos provenientes de diferentes populações. Esta análise evidenciou o isolamento entre as duas populações e a desconectividade genética entre as populações mais distantes de tamanduá-bandeira nesta região do Estado de São Paulo (figuras 18a-b, 19a-b e 20a-b).

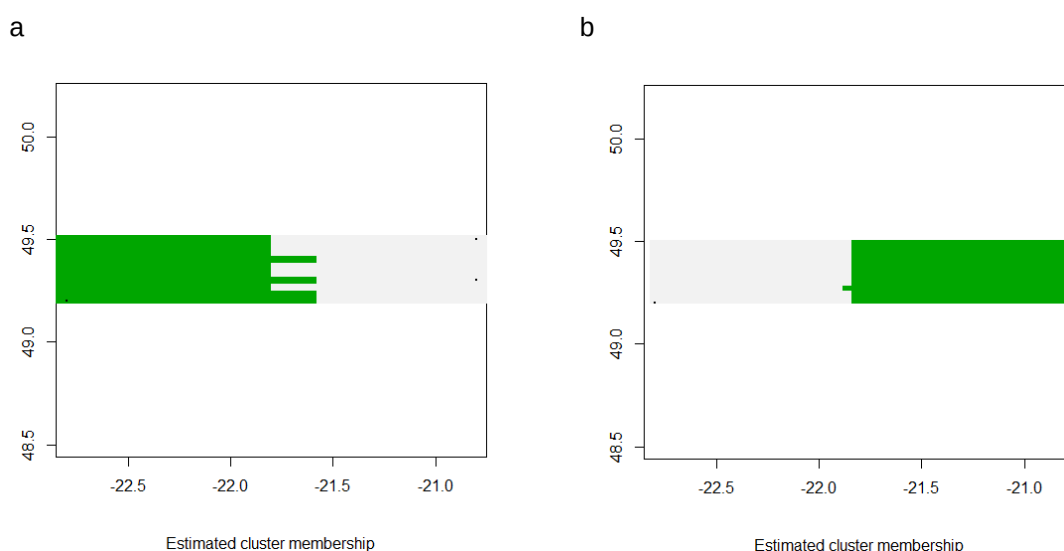
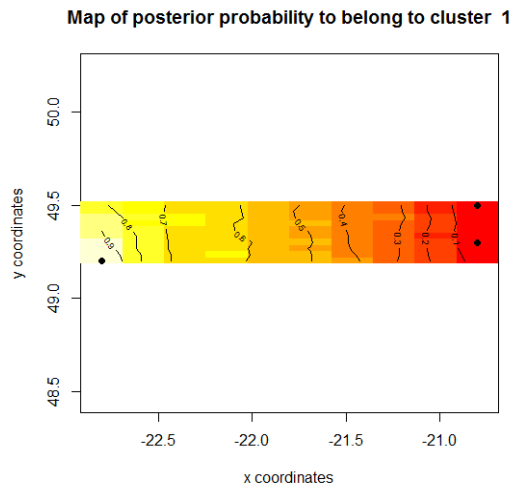


Figura 18a-b. Análise da estrutura espacial, apenas das populações das Estações Ecológicas a partir da genotipagem manual (a) e automatizada (b). Diferentes cores indicam agrupamentos distintos.

a



b

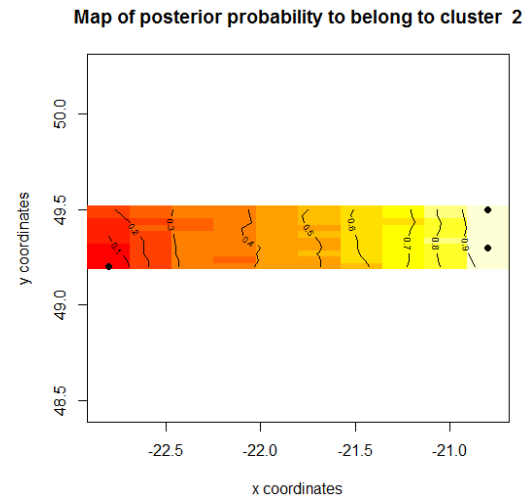
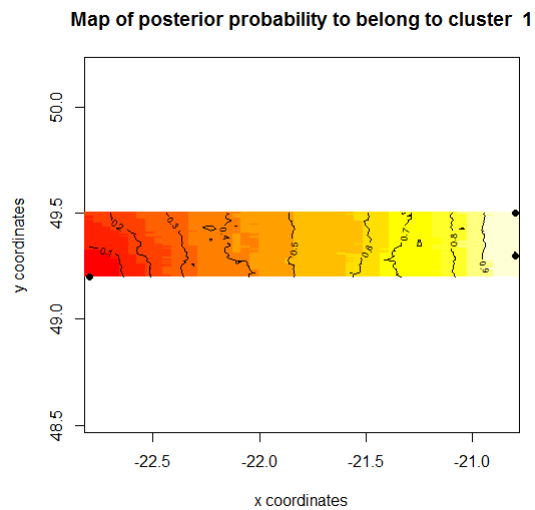


Figura 19a-b. Mapas de probabilidade posterior referentes à análise das populações das Estações Ecológicas pela genotipagem manual.

a



b

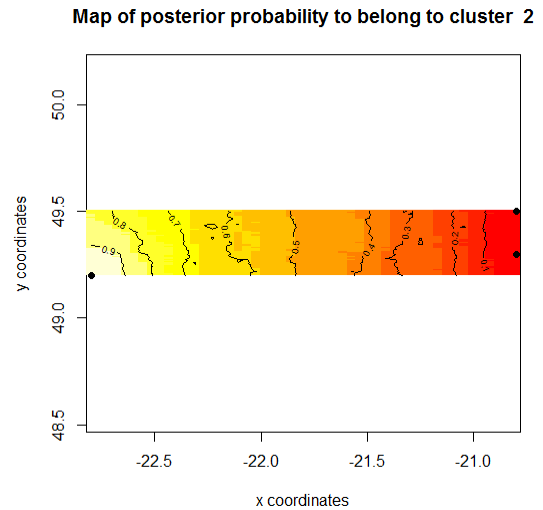


Figura 20a-b. Mapas de probabilidade posterior referentes à análise das populações das Estações Ecológicas pela genotipagem automatizada. Resultados foram corroborados pela análise capilar.

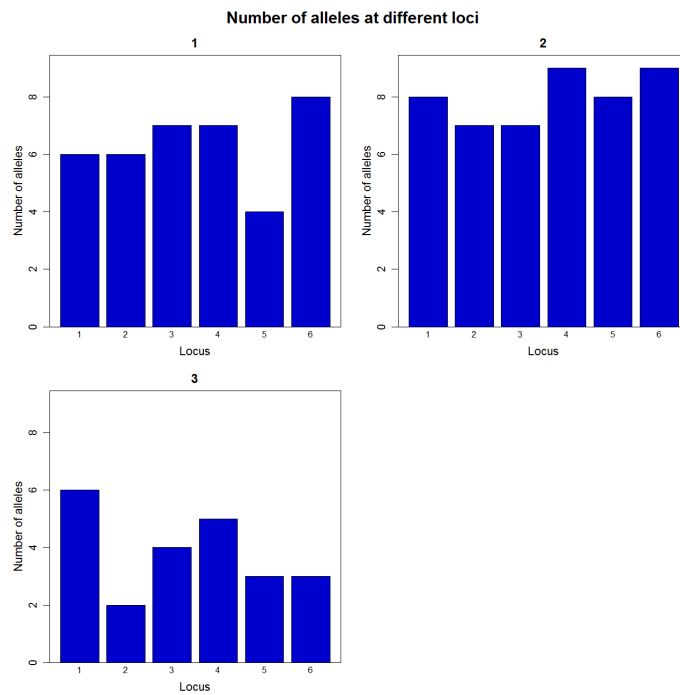
4.3 Diversidade genética e Equilíbrio de Hardy- Weinberg

Para calcular os índices de diversidade genética, as análises foram realizadas de acordo com a localidade geográfica das populações, com a finalidade de identificar separadamente a riqueza genética das populações das Estações Ecológicas e das demais populações remanescentes ao longo do Noroeste Paulista. Assim, foi possível comparar os índices de diversidade genética das populações de tamanduá-bandeira das Estações Ecológicas, permitindo avaliar e inferir sobre o papel das áreas protegidas em relação à espécie, além de mensurar a diversidade genética das populações presentes ao longo da região Noroeste do estado de São Paulo.

Todos os locos foram polimórficos e os resultados dos testes exatos e Qui-quadrado, indicaram desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg em três dos seis locos com a genotipagem manual e dois dos seis locos com a genotipagem automatizada. Em relação à diversidade genética, ao considerar a variabilidade alélica, foram encontrados, no total, 49 alelos a partir da genotipagem manual e 52 alelos pela genotipagem automatizada e ao verificar os níveis de heterozigosidade, os valores médios para todas as populações foram altos: respectivamente $H_o = 0,4825$ / $H_e = 0,7847$ (genotipagem manual) e $H_o = 0,6857$ / $H_e = 0,7202$ (genotipagem automatizada).

Os níveis de heterozigosidade (H_e) e o número de alelos por população e em cada loco estão representados na forma de gráficos, demonstrando a alta variabilidade genética encontrada nas populações (figuras 21a-b e 22a-b).

a



b

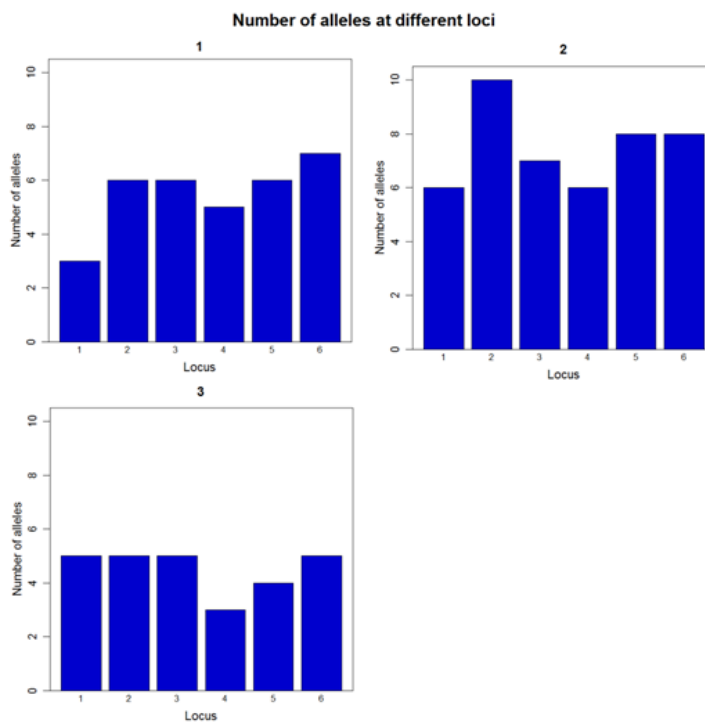
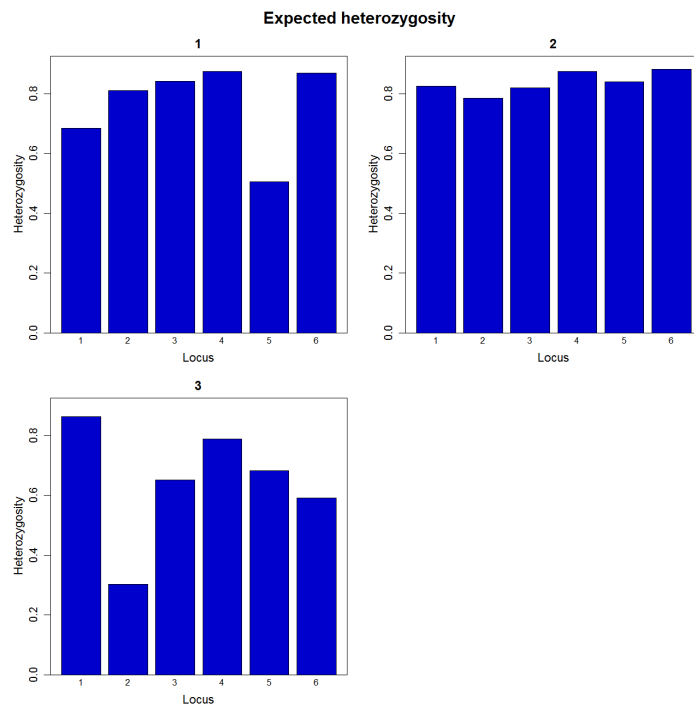


Figura 21a-b. Gráficos gerados pelo programa ARLEQUIN 3.5 (utilizando as funções do R-LEQUIN), a partir da genotipagem manual (a) e automatizada (b), em relação ao número de alelos. Cada barra representa um loco e cada quadrado representa uma população. 1: população do entorno da Estação Ecológica do Noroeste Paulista. 2: população correspondente aos demais indivíduos amostrados ao longo do noroeste paulista. 3: população da Estação Ecológica de Santa Bárbara.

a



b

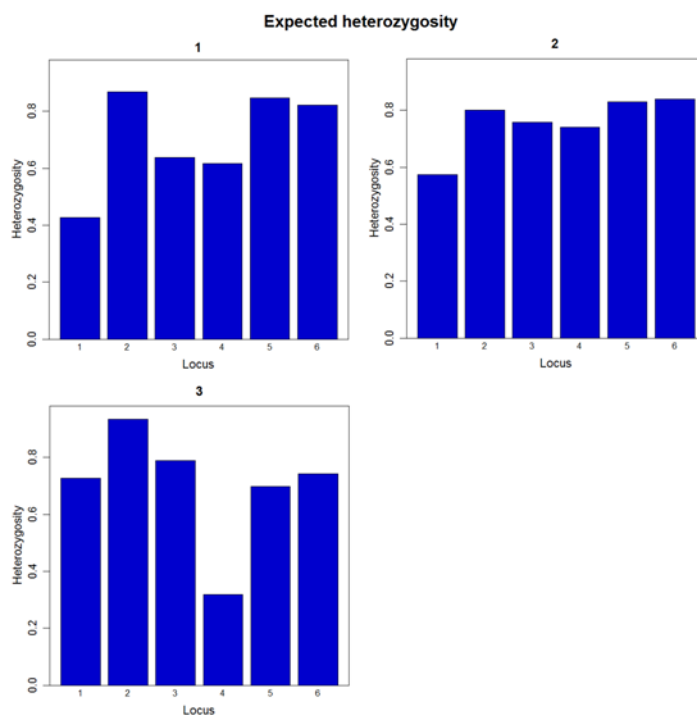


Figura 22a-b. Gráficos gerados pelo programa ARLEQUIN 3.5 (utilizando as funções do R-LEQUIN), a partir da genotipagem manual (a) e automatizada (b), em relação aos níveis de heterozigosidade. Cada barra representa um loco e cada quadrado representa uma população. 1: população do entorno da Estação Ecológica do Noroeste Paulista. 2: população correspondente aos demais indivíduos amostrados ao longo do noroeste paulista. 3: população da Estação Ecológica de Santa Bárbara.

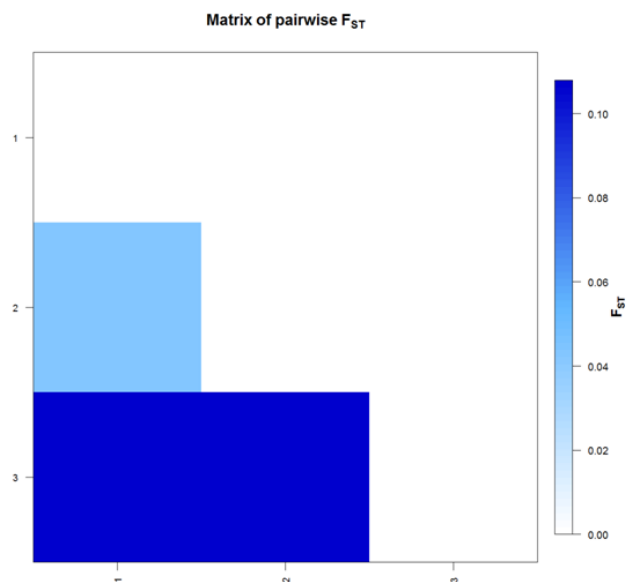
4.4 Coeficientes e estatísticas *F*

As estatísticas *F* indicaram diferenciação moderada entre as populações pela genotipagem manual ($F_{st} = 0,0665$) e também pela análise por genotipagem automatizada ($F_{st} = 0,0798$). Porém, apesar dos valores equivalentes encontrados para o índice *F_{st}*, os índices *Fit* e *Fis* variaram consideravelmente nas análises realizadas a partir das diferentes técnicas de genotipagem.

A genotipagem manual revelou a deficiência de heterozigotos ($F_{is} = 0,3805$) e a presença de endogamia ($F_{it} = 0,4216$), entretanto a genotipagem automática resultou em valores bem mais baixos ($F_{is} = 0,0532$ e $F_{it} = 0,1288$). Sugerimos que essas diferenças ocorreram devido à maior especificidade e precisão da técnica de genotipagem automatizada e sua capacidade de identificação de alelos muito próximos. Como consequência, um maior número de indivíduos heterozigotos foi obtido, o que levou à diminuição dos índices de endogamia e de deficiência de heterozigotos.

Valores de *F_{st}* por pares de população também foram calculados e estão representados em forma de gráfico (figuras 23a-b). A menor diferenciação genética ocorreu entre os agrupamentos populacionais geograficamente mais próximos e a maior diferenciação genética ocorreu entre os grupos geograficamente mais distantes.

a



b

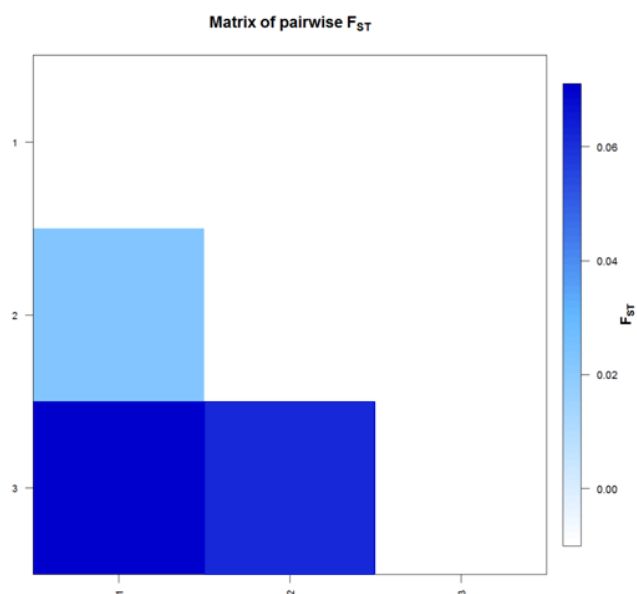
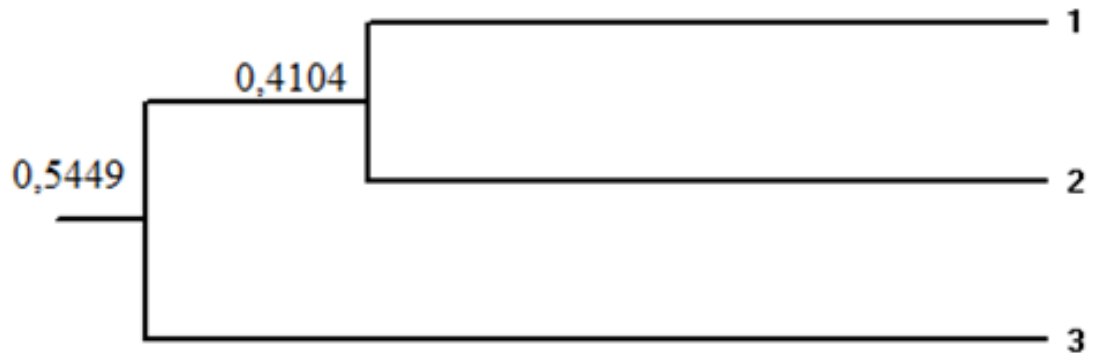


Figura 23a-b. Gráficos do coeficiente de diferenciação F_{ST} gerados pelo programa ARLEQUIN 3.5 (utilizando as funções do R-LEQUIN), a partir de genotipagem manual (a) e automatizada (b), ilustrando a diferenciação genética e indicando menor diferenciação genética entre os grupos geograficamente mais próximos. 1: população do entorno da Estação Ecológica do Noroeste Paulista. 2: população correspondente aos demais indivíduos amostrados ao longo do noroeste paulista. 3: população da Estação Ecológica de Santa Bárbara. Valores de F_{ST} por par de populações são indicados pelas cores representadas na barra ao lado.

4.5 Distância genética

Os valores de distância genética revelaram que a distância genética mais alta foi observada nas populações geograficamente mais distantes, evidenciando a separação genética das populações das áreas referentes às Estações Ecológicas (figura 24a-b).

a



b

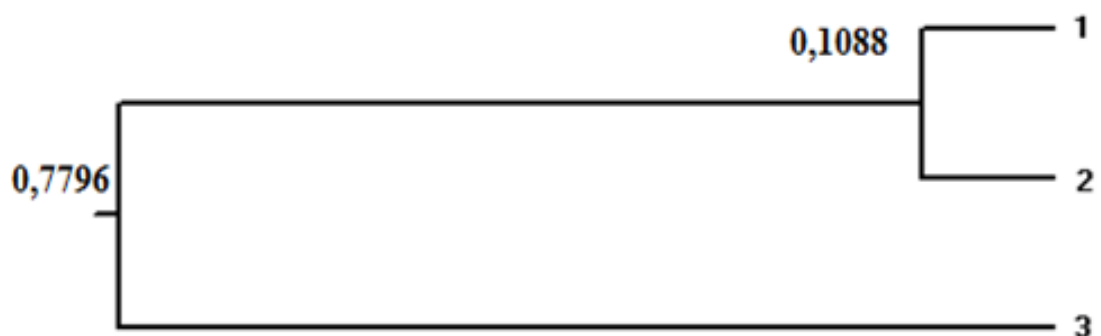


Figura 24a-b. Dendogramas UPGMA gerados a partir da genotipagem manual (a) e automatizada (b), utilizando a distância de Nei. 1: população do entorno da Estação Ecológica do Noroeste Paulista. 2: demais indivíduos coletados no Noroeste Paulista. 3: população da Estação Ecológica de Santa Bárbara.

4.6 Número de migrantes

A relação entre F_{st} e o número de migrantes por geração (Nm) é freqüentemente empregada para quantificar o fluxo gênico e o resultado da estimativa do número de migrantes por geração foi 0,67107 para a genotipagem manual e 0,36095 para a genotipagem automatizada. De acordo com Slatkin (1993), o valor menor que um migrante por geração ($Nm < 1$) não é suficiente para contrapor os efeitos da deriva, o que pode levar à diferenciação de populações ou subpopulações.

4.7 Análise de Variância Molecular - AMOVA

Para a Análise de variância Molecular (AMOVA), que considera níveis hierárquicos de diferenciação populacional, é necessário analisar grupos de populações, atribuindo números diferentes para cada grupo desejado. Ou seja, foi necessário agrupar as populações em dois grupos, para permitir a análise hierárquica no programa. Para separar as populações em dois grupos, utilizamos os dados moleculares gerados nas análises de estrutura espacial, de acordo também com as características geográficas da região.

O primeiro grupo foi composto pelos indivíduos pertencentes ao primeiro *cluster*, definido pelo programa GENELAND e foram divididos geograficamente em duas populações: 1) população da Estação Ecológica do Noroeste Paulista e 2) demais indivíduos amostrados ao longo do Noroeste paulista. O segundo grupo foi composto pelos indivíduos pertencentes aos outros dois *clusters*: 1) população da Estação Ecológica de Santa Bárbara e 2: demais indivíduos pertencentes ao terceiro grupo (*cluster*).

Os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) indicaram que a maior variância está contida dentro das populações ($\theta_{st} = 0,08188$ pela genotipagem manual e $\theta_{st} = 0,12816$ pela genotipagem automatizada). Em relação aos valores da variação entre os grupos e entre as populações do mesmo grupo (θ_{sc} e θ_{ct}), houve

diferenças entre os resultados provenientes das duas técnicas de genotipagem. O resumo desses resultados encontra-se nas tabelas 3 e 4.

Verificou-se, portanto, que a maior parte da variação genética encontra-se dentro das populações (91,8% de acordo com a genotipagem manual e 87,2% com a automatizada). Todos os valores ($p < 0,05$) foram significativos (tabelas 5 e 6).

De maneira geral, os resultados gerados pela análise da matriz de genotipagem manual e da matriz de genotipagem automatizada foram semelhantes em quase todas as análises, demonstrando que apesar da maior especificidade e precisão da genotipagem capilar automatizada, a técnica de genotipagem manual apresentou-se eficiente e ainda representa uma alternativa de baixo custo em relação à técnica automatizada. Todavia, as análises automatizadas corroboraram e validaram os dados obtidos pela genotipagem manual, no presente estudo.

Em resumo, os resultados obtidos indicaram pouca migração, evidência de isolamento por distância, estruturação populacional e alta variabilidade genética nas populações isoladas.

Tabela 3. Estatísticas $F(\theta)$ médias e Testes de significância (genotipagem manual).

Índices de fixação	Testes de significância
θ_{ST} : 0,08188	$p = 0,00978$
θ_{SC} : 0,05048	$p = 0,04301$
θ_{CT} : 0,03306	$p = 0,04301$

Tabela 4. Estatísticas $F(\theta)$ médias e Testes de significância (genotipagem automatizada).

Índices de fixação	Testes de significância
θ_{ST} : 0,12816	$p = 0,00000$
θ_{SC} : 0,03137	$p = 0,03715$
θ_{CT} : 0,09992	$p = 0,01173$

Tabela 5. Análise de Variância Molecular (AMOVA) a partir da genotipagem manual.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Componente de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	6,188	0,08472	3,30616
Entre populações	8,535	0,12509	4,88150
Dentro das pops.	148,187	2,35267	91,81234
Total	165,294	2,56248	

Tabela 6. Análise de Variância Molecular (AMOVA) a partir da genotipagem capilar automatizada.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Componente de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	8,980	0,24782	9,99204
Entre populações	6,361	0,07003	2,82363
Dentro das pops.	126,926	2,16228	87,18433
Total	142,267	2,48012	

5. DISCUSSÃO

5.1 Tamanduás-bandeira: diferentes genes, diferentes respostas

A diversidade e a variabilidade genéticas encontradas no presente estudo foram consideradas altas para as populações de tamanduá-bandeira, em comparação com dados da literatura para esta espécie, indicando que as populações mantiveram alta diversidade genética mesmo em um cenário altamente fragmentado (COLLEVATTI et al., 2007).

Em relação às análises de populações de tamanduá-bandeira, alguns estudos já foram realizados para avaliar as dinâmicas populacionais e a variabilidade genética das populações desta espécie (GARCIA et al., 2005; COLLEVATTI et al., 2007; RIBEIRO et al., 2016; CLOZATO et al., 2017).

Garcia et al. (2005) desenvolveram os marcadores microsatélites específicos para a espécie e também analisaram 15 indivíduos de diferentes regiões, inclusive do estado de São Paulo (sete animais capturados no Parque Nacional de Emas e oito de espécimes mortos, coletados em estradas nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul). A diversidade genética, levando em consideração o número de alelos e a heterozigosidade média, foi semelhante à obtida em nossos resultados.

Collevatti et al. (2007) estudaram populações de tamanduá-bandeira situadas no Parque Nacional das Emas, utilizando os mesmos marcadores microsatélites utilizados por Garcia et al. (2005) e concluíram que as populações exibiram níveis muito baixos de diversidade genética (média de alelos = 3; H_e = 0,482 e H_o = 0,059), além de um elevado grau de endogamia (F_{it} = 0,879).

Outros estudos utilizando diferentes marcadores moleculares nesta espécie foram realizados, com genes mitocondriais e nucleares.

Em um estudo filogeográfico, utilizando sequência de DNA mitocondrial e nuclear, Clozato et al. (2017) verificaram alta diversidade genética na população do Parque Nacional das Emas. Por outro lado, a análise de microsatélites, realizada por Collevatti et al. (2007) para a mesma população indicou baixa diversidade genética e altos índices de endogamia. Vale ressaltar que, apesar da diferença de

tempo de dez anos entre os dois estudos (COLLEVATTI et al., 2007; CLOZATO et al., 2017), algumas das mesmas amostras foram utilizadas nos dois trabalhos.

Essas incongruências poderiam ser explicadas pelas características de cada marcador, uma vez que os microssatélites geralmente possuem taxas de mutação mais rápidas que marcadores mitocondriais em mamíferos e detectam mais claramente eventos recentes, como o gargalo sofrido pela população do Parque Nacional das Emas, no incêndio ocorrido em 1994 (COLLEVATTI et al., 2007; CLOZATO et al., 2017).

Ainda segundo Clozato et al. (2017), apesar da diversidade haplotípica encontrada, valores negativos significativos de D de Tajima indicaram um possível cenário de estrangulamentos repetidos ao longo do tempo, seguido de expansões durante a recuperação da população.

Outro exemplo relacionado às diferenças encontradas em estudos na espécie de tamanduá-bandeira, é o trabalho realizado por Ribeiro et al. (2016) em populações do estado de São Paulo, com o gene mitocondrial *CytB*, onde verificaram que populações desta espécie, no estado de São Paulo, mostraram uniformidade genética, fluxo gênico e baixa diversidade haplotípica, como também não foi observada estrutura populacional. Estes resultados diferem dos dados encontrados com os microssatélites no presente trabalho e uma possível explicação é que o fluxo gênico alto encontrado para o *CytB* pode sugerir que, historicamente, as populações de tamanduá-bandeira foram interconectadas e a dispersão feminina foi um mecanismo provável que ajudou a conectar as populações e fixar genes de origem matrilinear nestas populações (FRANKHAM et al., 2002).

O DNA mitocondrial e os microssatélites possuem altas taxas de mutação, porém as taxas de mutação de DNA mitocondrial e dos microssatélites podem variar consideravelmente, dependendo da espécie e assim deve-se levar em consideração que em mamíferos, genes mitocondriais geralmente evoluem mais lentamente que microssatélites. Ou seja, os marcadores mitocondriais podem mostrar uma história mais antiga da população, já os microssatélites nos permitem avaliar impactos recentes, devido sua rápida taxa de mutação em mamíferos, como no caso dos tamanduás-bandeira (WAN, 2004, ALLIO et al., 2017).

5.2 Hipóteses evolutivas

Os resultados do presente estudo indicaram a presença de alta variabilidade genética nas populações, diferenciação populacional moderada, baixas taxas de migração, evidência de isolamento por distância e maior variância gênica dentro das populações ou subpopulações.

Algumas hipóteses indicam que fatores históricos possam ter levado a esse padrão nas populações, devido às misturas aleatórias de populações separadas ao longo do processo de fragmentação de habitat (RIDLEY, 2006).

A deriva genética parece ser o fator mais razoável para explicar os nossos resultados, uma vez que a baixa taxa de migração leva a diferenças regionais na frequência gênica das subpopulações, pois em uma metapopulação com populações isoladas, diferentes alelos são fixados, aumentando a variância entre as subpopulações, devido à deriva genética (RIDLEY, 2006). Outros fatores, como a seleção natural, também podem estar contribuindo para este cenário e sugerimos que nossos resultados e os padrões populacionais encontrados poderiam ser explicados pelo modelo de isolamento por distância de populações em desequilíbrio (SLATKIN, 1993).

A subdivisão espacial, as extinções locais e recolonizações, podem levar a vários efeitos na distribuição da variação genética nas populações de diversas espécies e o modelo de isolamento por distância em populações em desequilíbrio geralmente ocorre em ambientes antropizados, onde os fragmentos vazios raramente são recolonizados (figura 25). Ou seja, as populações locais estão isoladas em pequenos fragmentos e as extinções excedem as recolonizações, gerando forte impacto na sobrevivência das gerações das populações remanescentes (HARRISON, TAYLOR, 1997).

O modelo de isolamento por distância em populações em desequilíbrio é de uma expansão de alcance gradual, onde uma subpopulação dá origem à outra subpopulação vizinha e assim por diante, como em um modelo de *stepping stones* (alpondras). Esse processo se repete em todas as gerações, porém, com a fragmentação de habitat e conseqüente falta de migração, as diferenças entre as subpopulações aumentam ao longo do tempo (SLATKIN, 1993). Desta forma, este

modelo de isolamento por distância de populações em desequilíbrio afeta as frequências de alelos em relação ao espaço pela deriva genética. Assim, as proporções de diferentes genótipos nas populações locais levam ao aumento da variabilidade genética na população total, fragmentada em diferentes subpopulações isoladas (GARNIER-GÉRÉ, CHICKI, 2013).

Este modelo proposto difere do modelo de isolamento por distância de populações em equilíbrio, onde há variedade de subpopulações com troca de migrantes entre as subpopulações adjacentes. Ou seja, no isolamento por distância de populações em equilíbrio, cada subpopulação será quase a mesma, com pouca variabilidade genética, devido a fatores como o efeito fundador e à migração, homogeneizando geneticamente as populações (SLATKIN, 1993).

De acordo com o modelo de ilhas introduzido por Sewall Wright (1943), para descrever o acúmulo das diferenças genéticas locais com restrita dispersão geográfica, parte-se do pressuposto da neutralidade, onde há migração e as populações são infinitas. Dessa maneira, espera-se que o fluxo de genes seja maior quando as populações estão mais próximas e, como consequência, as populações próximas deveriam ser mais semelhantes nos locos neutros. No entanto, os níveis de fluxo de genes não dependem apenas da distância entre as populações, mas também da natureza da paisagem circundante entre as populações (TEMPLETON et al., 2001).

Em conclusão, no modelo de Isolamento por Distância de populações em desequilíbrio, há um padrão de isolamento por distância, mas com uma grande variação em curtas distâncias, o que pode explicar o padrão encontrado nas populações de tamanduás-bandeira das regiões noroeste e sudoeste do estado de São Paulo.

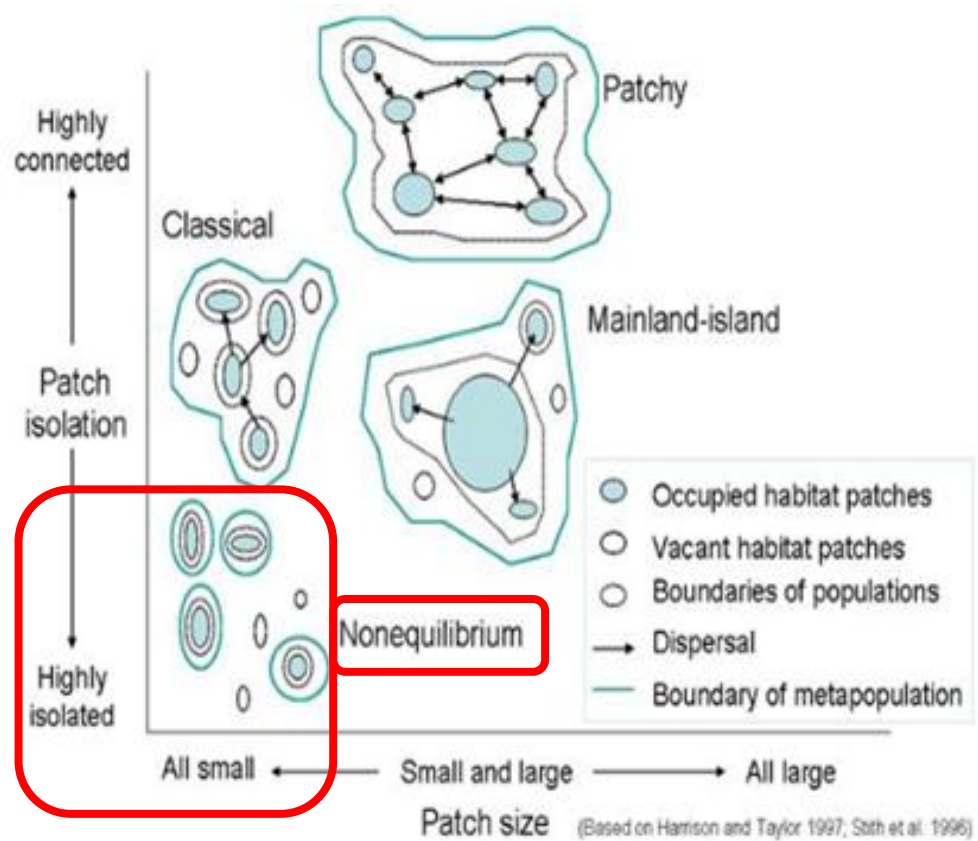


Figura 25. Esquema ilustrativo da estrutura de populações/metapopulações em desequilíbrio (em vermelho), demonstrando o isolamento por distância de populações em desequilíbrio. Fonte: Universidade de Idaho [online], 2010. Baseado em: HARRISON, TAYLOR (1997).

5.3 Fatores biológicos e diversidade genética

As análises do perfil das populações de animais silvestres devem levar em consideração além das características genéticas, a história demográfica de cada população, as características ambientais e também as questões biológicas da espécie (LACY, 1997).

Fatores biológicos podem levar a uma alta variabilidade genética em algumas espécies com populações pequenas, isoladas e ameaçadas de extinção (DINERSTEIN; MCCRACKEN, 1990). Assim, um fator que parece contribuir para a manutenção de variabilidade genética em populações ameaçadas é o longo tempo de vida e o período geracional de algumas espécies, pois animais de vida longa podem demorar mais para apresentar uma resposta genética clara frente aos impactos ambientais (HAILER et al., 2006).

Estudos envolvendo mamíferos e aves de vida longa ameaçados de extinção identificaram alta variabilidade genética em diversas populações, inclusive em populações extremamente pequenas e isoladas (DINERSTEIN; MCCRACKEN, 1990; SWART et al., 1994; TAYLOR et al., 1994; HAILER et al., 2006; TORRES-FLOREZ et al., 2014; ZÁVALA-PÁRAMO et al., 2017).

Um exemplo clássico é o caso dos rinocerontes indianos, que possuem longevidade estimada em cerca de 30 a 45 anos e que após um grande gargalo populacional sofrido pela espécie, a população quase extinta ainda carregava uma alta diversidade genética (DINERSTEIN; MCCRACKEN, 1990). Ao longo dos anos, foi verificado que esta não era uma população ou espécie excepcional a apresentar este padrão populacional. Alguns exemplos de outras populações pequenas de espécies ameaçadas e de alta longevidade que apresentaram este padrão já foram descritos na literatura, porém vale ressaltar que estes exemplos podem ser casos pontuais ou exceções. Algumas espécies que se enquadram no mesmo caso são: rinoceronte preto, com idade estimada em 30 anos (SWART et al., 1994); águias de cauda branca; 17 anos (HAILER et al., 2006); anta de Baird; 20 a 25 anos (ZÁVALA-PÁRAMO et al., 2017); o raro marsupial vombate *Lasiorhinus krefftii*; 25 anos (TAYLOR et al., 1994); baleias azuis, 80 a 110 anos (TORRES-FLOREZ et al., 2014).

Hailer et al. (2006) ao analisarem populações de águias de cauda branca na Noruega, simularam um gargalo populacional de cerca de 20 a 30 anos, que é equivalente a cerca de duas gerações de águias de cauda branca. Desta maneira, calcularam o declínio da heterozigosidade e da diversidade genética ao longo dos anos em espécies de vida longa. Para isso, realizaram simulações estatísticas partindo de um número pequeno de indivíduos e compararam o declínio da diversidade genética entre uma espécie de vida longa e uma espécie de vida curta (figura 26). Nas simulações, os resultados mostraram que apenas cerca de quatro por cento (4%) da heterozigosidade original deve ser perdida em uma população de vida longa durante esse período. Em contraste, para um organismo com um período de geração de um ano, a perda correspondente de diversidade genética seria de 16%, consideravelmente maior (HAILER et al., 2006).

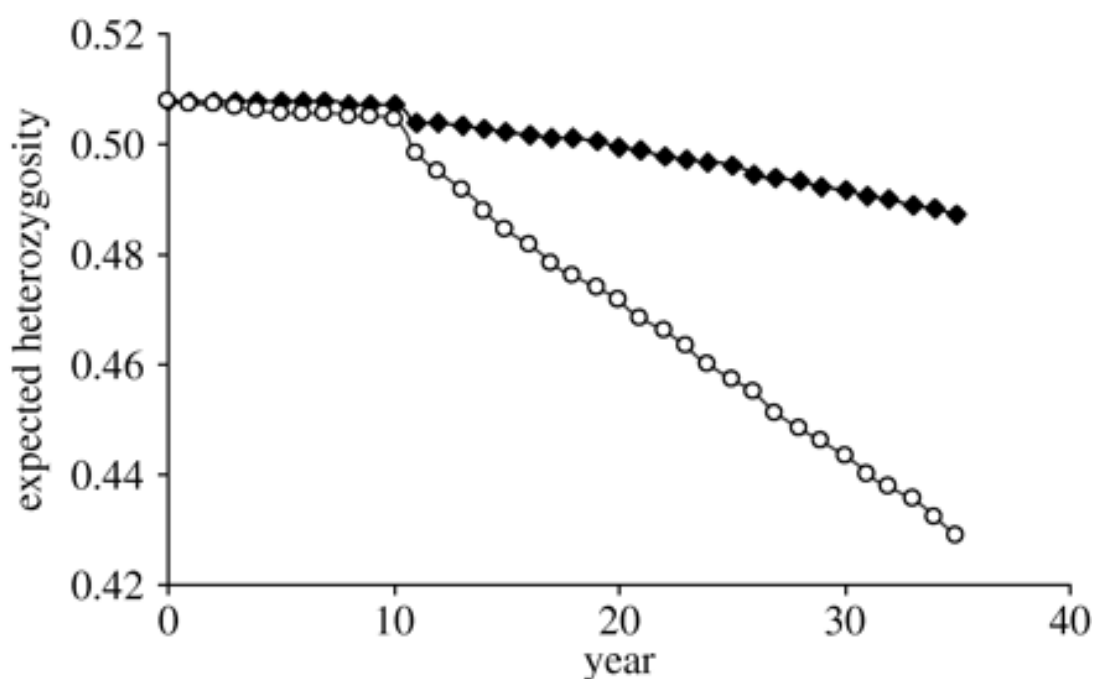


Figura 26. Simulação do declínio da heterozigosidade em animais de vida longa. Losangos pretos indicam o declínio da curva de heterozigosidade em espécies de vida longa, utilizando como modelo a espécie de águia de cauda branca ao longo dos anos. Círculos brancos indicam o declínio da heterozigosidade em espécies de vida curta. Adaptado de HAILER et al. (2006).

Argumentamos ainda que o longo tempo de vida dos tamanduás-bandeira; entre 20 e 30 anos (NOWAK, 1999), em conjunto com a história demográfica e evolutiva das populações analisadas, possam ter atuado amortecendo a perda da diversidade genética nestas populações (HAILER et al., 2006).

Espécies com maior longevidade podem apresentar virtualmente a manutenção de alelos ancestrais e menor queda da variabilidade genética após gargalos populacionais, quando comparadas com as de espécies de vida curta. Além disso, fatores evolutivos como a deriva genética e a seleção natural podem estar atuando, fixando diferentes alelos em diferentes subpopulações, refletindo na diversidade genética encontrada nestas populações para os locos microssatélites.

Vale ressaltar que apesar da manutenção da alta variabilidade genética em espécies ameaçadas de extinção, fatores como a fragmentação, a destruição de habitat e a instabilidade demográfica, podem levar as populações naturais à extinção antes de uma resposta genética clara frente aos impactos ambientais, principalmente em espécies de vida longa (LACY, 1997).

Portanto, nossos resultados indicam que algumas populações de espécies vulneráveis e ameaçadas de extinção são capazes de manter altos níveis de diversidade genética, mesmo em áreas intensamente fragmentadas e que diferentes populações da mesma espécie podem responder de maneiras distintas aos impactos ambientais.

5.4 Estratégias de conservação para a espécie

Nosso estudo encontrou níveis consideravelmente maiores de diversidade genética nas populações presentes em fragmentos florestais no noroeste e sudoeste paulista em comparação aos estudos de populações maiores e de áreas protegidas, como no caso do Parque Nacional das Emas, para os marcadores microssatélites (COLLEVATTI et al., 2007).

Os dados obtidos com as análises de diversidade genética e com a análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) indicam que estratégias de conservação, utilizando várias subpopulações pequenas, podem preservar uma maior proporção da diversidade genética total do que se a conservação se concentrar em uma população de grandes áreas, no que tange ao manejo ou translocações de populações, uma vez que as subpopulações de tamanduá-bandeira estudadas no fragmentado estado de São Paulo apresentaram maior variabilidade genética do que a população do Parque Nacional das Emas, para os marcadores microssatélites (COLLEVATTI et al., 2007; HAILER et al, 2006).

Para programas de conservação visando espécies ameaçadas e de vida longa como o tamanduá-bandeira, nossos resultados destacaram a importância de se levar em conta a retenção de alta diversidade genética local, em populações remanescentes isoladas, o que melhora as perspectivas em relação a programas de conservação para a espécie. Além disso, os resultados indicam a prioridade da criação de programas de conservação para estas populações e a importância destas populações em planos de manejo para resgate genético

Estudos com uma abordagem multidisciplinar, incluindo análises ecológicas, imunológicas e ambientais são necessárias para compreender o grau de risco de uma população e para a criação de planos de manejo efetivos, além do monitoramento das populações e análises genéticas futuras, que são essenciais para verificar a situação da espécie e garantir a sobrevivência de populações em longo prazo (FREI et al., 2016).

Estudo ecológico utilizando monitoramento de tamanduás-bandeira via GPS, na Estação Ecológica de Santa Bárbara, realizado por Bertassoni et al. (2017), indicou que os tamanduás-bandeira, possivelmente, são incapazes de persistir em

habitats compostos só por ambientes alterados e que a baixa taxa de persistência populacional na área de estudo em longo prazo chama atenção especial. Ou seja, tanto o estudo ecológico quanto o presente estudo genético, indicam a necessidade de se estabelecer medidas mitigadoras dos impactos antrópicos sobre a espécie, para evitar as extinções locais e conseqüentemente conservar a alta diversidade genética encontrada nestas populações.

Levando em consideração os aspectos locais, propomos algumas medidas e políticas que possam auxiliar na redução da mortalidade e diminuir o risco de extinção local dessas populações. Destacamos que é necessário elaborar e colocar em prática possíveis programas de reintrodução ou translocação, devido à intensa expansão urbana da região Noroeste Paulista.

Assim, propomos:

1) O monitoramento ecológico (telemetria, armadilhas de câmera, estudos de campo) e genético (análises multilocos) de outras populações, para obter mais dados acerca das populações de tamanduá-bandeira, além da investigação em relação à necessidade e riscos da translocação das populações remanescentes em áreas urbanas, visando evitar extinções locais.

2) Realização de estudos de Ecologia de Estradas a fim de identificar locais para a construção de passagens de fauna e implantação de medidas rodoviárias como sinalização e diminuição de velocidade nos locais com maiores índices de atropelamento de animais silvestres.

3) Monitoramento de focos de queimada por satélite, em esforço conjunto de órgãos públicos (Prefeitura, Bombeiros, Polícia Ambiental) e políticas públicas de Educação Ambiental, divulgação e projetos visando à conscientização da população.

4) Maior fiscalização no controle da emissão de Licenças Ambientais, que não permitam a especulação imobiliária próximo à áreas protegidas.

5) Estabelecimento de leis e fiscalização efetiva em relação à queima da cana de açúcar e incentivos fiscais para automatização da colheita. Essas medidas poderiam auxiliar na dispersão dos indivíduos, uma vez que as plantações de cana de açúcar e o mosaico de mata remanescente serviriam como fragmentos dispersos na paisagem e aumentariam a conectividade das áreas, uma vez que o tamanduá-

bandeira pode estar utilizando as plantações de cana-de-açúcar como refúgio nestas áreas fragmentadas.

6) Utilização do potencial de Zoológicos, como o Zoológico Municipal de São José do Rio Preto para a reprodução em cativeiro, análise de viabilidade de animais cativos e programas de reintrodução para a espécie. No momento, foi possível apenas inferir a variabilidade genética de três filhotes: dois animais de vida livre resgatados e um filhote cativo, nascido no Zoológico de Rio Preto. Entretanto, devido ao baixo número de amostras, não foi possível nenhuma conclusão, mas pudemos verificar, em uma análise simples que o animal nascido em cativeiro apresentou o mesmo padrão de polimorfismos que identificamos nos dois filhotes de vida livre, dado que todos apresentaram 50% de locos heterozigotos em diferentes locos. Este fato pode ser um indício otimista inicial das chances de sucesso da reprodução em cativeiro para futuras introduções em ambientes protegidos, uma vez que o animal cativo apresentou características genéticas semelhantes a dos animais silvestres, para estes marcadores microssatélites.

Enquanto esforços políticos são aguardados e programas de translocações e manejo não são definidos, devem-se realizar estudos para obter o maior número de dados possível sobre a situação das populações selvagens de tamanduá-bandeira.

Assim, as análises genéticas e modelos estatísticos robustos utilizados no presente trabalho, permitiram alcançar informações sobre a variabilidade genética, a estrutura populacional e como a fragmentação de habitat está influenciando o fluxo de genes na espécie.

O estudo permitiu a compreensão das dinâmicas populacionais da espécie frente à fragmentação do habitat e forneceu dados que podem contribuir para a conservação da espécie, pois a alta variabilidade genética encontrada nas populações do noroeste e sudoeste do estado de São Paulo, com os marcadores microssatélites, corrobora a importância da conservação destas populações para a manutenção da riqueza genética da espécie, além de demonstrar a eficiência do uso de marcadores moleculares microssatélites em estudos de Genética da Conservação.

Portanto, o presente trabalho identificou populações importantes para a conservação da diversidade genética da espécie, revelou a prioridade na criação de planos de manejo locais para a espécie no estado de São Paulo e indicou a viabilidade da utilização destes indivíduos ou populações em programas de reprodução em cativeiro e em possíveis translocações ou reintroduções em áreas protegidas. Medidas necessárias para evitar extinções em uma área extremamente urbanizada e para manter a variabilidade genética encontrada, contribuindo para a conservação da espécie.

6. CONCLUSÕES

- A fragmentação de habitat influencia as dinâmicas populacionais de *M. tridactyla*, subdividindo as populações em três grupos na região estudada.

-A estrutura genética populacional das populações de *M. tridactyla* na Estação Ecológica de Santa Bárbara encontra-se bem definida em relação às populações do Noroeste Paulista.

- As populações apresentaram baixo fluxo gênico e efeitos do isolamento por distância, apesar da manutenção da diversidade genética.

- Devido à alta diversidade genética encontrada nas populações, podemos inferir que a região noroeste paulista e a Estação Ecológica de Santa Bárbara servem como reduto genético para *M. tridactyla*.

- As subpopulações isoladas em pequenos fragmentos, apresentam uma maior variância genética, revelando a importância da conservação destas subpopulações e a prioridade na criação de planos de manejo.

7. REFERÊNCIAS

ALLIO, R.; DONEGA, S.; GALTIER, N.; NABHOLZ, B. Large Variation in the Ratio of Mitochondrial to Nuclear Mutation Rate across Animals: Implications for Genetic Diversity and the Use of Mitochondrial DNA as a Molecular Marker, **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 11, p. 2762–2772, 2017.

APPLIED User guide. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis, 4474504, Rev. A, Life Technologies Corporation, 2012.

ARIF, I. A.; KHAN, H. A.; SHOBRAK, M.; AL HOMAIDAN, A. A.; AL SADOON, M.; AL FARHAN, A. H.; BAHKALI, A. H. Interpretation of electrophoretograms of seven microsatellite loci to determine the genetic diversity of the Arabian Oryx. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 259-265, 2010.

BARROS, E. A.; RIBEIRO, M. N.; ALMEIDA, M. J. O.; ARAUJO, A. M. Population Structure and Genetic Variability of the Marota goat breed, **Archivos de Zootecnia**, v. 60, n. 231, 2011.

BARTON, N. H.; SLATKIN, M. A Quasi-Equilibrium Theory of the Distribution of Rare Alleles in a Subdivided Population. **Heredity**, v. 56, p. 409-415, 1986.

BERTASSONI, A. Ecologia espacial e populacional de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) em Estação Ecológica de domínio Cerrado, São Paulo, Brasil, 2017, 127 folhas. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista.

BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura** [online] vol.68, n.1, p. 04-05, 2016.

BRASIL, 5º relatório nacional para a Convenção Sobre Diversidade Biológica / Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas; Coordenador Carlos Alberto de Mattos Scaramuzza, 2016.

BUTCHART, S. H. M.; WALPOLE, M.; COLLEN, B., et al. Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines, **Science**, v. 328, p. 1164, 2010.

CANALE, G. R.; PERES, C. A.; GUIDORIZZI, C. E.; GATTO, C. A. F.; KIERULFF, M. C. M. Pervasive Defaunation of Forest Remnants in a Tropical Biodiversity Hotspot. **Plos One**, v. 7, n.8, 2012.

CAVALCANTI, R.B.; JOLY, C.A. Biodiversity and conservation priorities in the cerrado region. Pp. 351-367 in Oliveira, P.S. & Marquis, R.J. (eds.). The cerrados of Brazil ecology and natural history of a neotropical savanna. Columbia University Press, New York, 2002.

CHENG, A., MASSAWE, F. ISMAIL I, MOHAMAD OSMAN4, HASHIM H. High resolution agarose-based system for single-tube genotyping of *fgf* and *Waxy* genes in rice: MAGE to displace PAGE? **Plant Omics Journal**, v. 8, n.4, p.348-352, 2015.

CHEREM, J. J.; KAMMERS, M.; GHIZONI JR, I. R.; MARTINS, A. Mamíferos de médio e grande porte atropelados em rodovias do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil, **Biotemas**, v.20, p. 81-96, 2007.

CLOZATO, C. L.; MIRANDA, F. R.; LARA-RUIZ, P.; COLLEVATTI, R. G.; SANTOS, F. R. Population structure and genetic diversity of the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*: Myrmecophagidae, Pilosa) in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.40: 1, 2017.

COLLEVATTI, R. G.; LEITE, K. C. E.; MIRANDA, G. H. B.; RODRIGUES, F. H. G. Evidence of high inbreeding in a population of the endangered giant anteater, *Myrmecophaga tridactyla* (Myrmecophagidae), from Emas National Park, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 112-120, 2007.

CONDE, C. F.; VERA Y.; ROCHA, C. F. D. Habitat disturbance and small mammal richness and diversity in an Atlantic rainforest area in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 983-990, 2006.

CORNUET, J. M.; PIRY, S.; LUIKART, G.; ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M. New Methods Employing Multilocus Genotypes to Select or Exclude Populations as Origins of Individuals, **Genetics**, v. 153, n. 4, p. 1989-2000, 1999.

COSTA, M. S.; ARAUJO, A. M.; CAMPELO, J. E. G.; MACHADO, T. M. M.; PIRES, L. C.; EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S. Survey and morphological characterization of Brazilian local goat breed Gurgueia in its origin. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, n. 2, p. 127-138, 2016.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R., CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária. São Paulo, Roca, p. 1354, 2006.

DAVID, L. S.; SCOTT, L. S.; STEPHEN, C. R. An alternate universal forward primer for improved automated DNA sequencing of M13. **BioTechniques**, v. 15, n. 4, p. 580-582, 1993.

DEAN, W. Aferroefogo: a história e a devastação da mata atlântica brasileira. Trad. Cid Knipel Moreira. São Paulo: Companhia das Letras, 1996.

DINERSTEIN, E.; MCCracken, G. F. Endangered Greater One-horned Rhinoceros Carry High Levels of Genetic Variation, **Conservation Biology**, v. 4, n. 4, p. 417-422, 1990.

DINIZ, M. F.; BRITO, D. Threats to giant anteater, *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae), viability in a protected Cerrado remnant encroached by urban expansion in central Brazil. **Zoologia**, v. 30, p. 151–156, 2013.

DINIZ, M. F.; BRITO, D. Protected areas effectiveness in maintaining viable giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) populations in an agricultural frontier. **Revista Natureza e Conservação**, v. 13, n 2, p. 145-151, 2015.

DURIGAN, G.; SIQUEIRA, M. F.; FRANCO, G. A. D. C.; RATTER, J. M. Seleção de fragmentos prioritários para a conservação do cerrado no Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, v. 18, n. 1, p. 23-37, 2006

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, Brazil, v.64, n.4, p.355-363, 2007.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, p.359-361, 2012.

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

EWERS, R. M.; DIDHAM, R. K. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biological Reviews**, Oxford, v. 81, p. 117-142, 2006.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial-DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FRANKHAM, R. Conservation genetics. **Annual Review of Genetics**, v. 29, p. 305-327, 1995.

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

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, v. 126, p. 131-140, 2005

FRANKHAM, R. Genetic rescue of small inbred populations: meta-analysis reveals large and consistent benefits of gene flow, **Molecular Ecology**, v. 24, n. 11, p. 2610-2618, 2015.

FREI, M.; CSENCSICS, D.; BRODBECK, S.; SCHWEIZER, E.; BUHLER, C.; GUGERLI, F.; BOLLIGER, J. Combining landscape genetics, radio-tracking and long-term monitoring to derive management implications for Natterjack toads (*Epidalea calamita*) in agricultural landscapes, **Journal for Nature Conservation**, v. 32, p. 22–34, 2016.

GARCIA, J. E.; VILAS BOAS, L. A.; LEMOS, M. V. F.; MACEDO LEMOS, E. G.; CONTEL, E. P. B. Identification of microsatellite DNA markers for the giant anteater *Myrmecophaga tridactyla*. **Journal of Heredity**, v. 96, p. 600-602, 2005.

GARNIER-GÉRÉ, P.; CHIKHI, L. Population Subdivision, Hardy–Weinberg Equilibrium and the Wahlund Effect, **Essential for Life Sciences**, 2013.

GOOGLE MAPS. Imagens de satélite, 2017. Disponível em: <www.googlemaps.com> Acesso em: 20 de outubro de 2017.

GOULART, I.C.G.R.; MEROTTO JUNIOR, A.; NUNES, A.L.; BERED, F. Optimization of the Use of Micro-satellite Molecular Markers in Weed Science Studies, **Revista Planta Daninha**, v. 29, p. 1175-1181, 2011.

GREENBAUM, G.; TEMPLETON, A. R.; ZARMI, Y.; BAR-DAVID, S. Allelic Richness following Population Founding Events—A Stochastic Modeling Framework Incorporating Gene Flow and Genetic Drift, **Plos One**, v. 10, n. 3, 2014.

GUILLOT, G.; MORTIER, F.; ESTOUP, A. GENELAND: A computer package for landscape genetics. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 712-715, 2005.

GUPTA, V., et al. Gel versus capillary electrophoresis genotyping for categorizing treatment outcomes in two antimalarial trials in Uganda. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 19, 2010.

HAILER, F.; HELANDER, B.; FOLKESTAD A. O.; GANUSEVICH, S. A.; GARSTAD, S.; HAUFF, P.; KOREN, C.; NYGÅRD, T.; VOLKE, V.; VILÀ, C.; ELLEGREN, H. Bottlenecked but long-lived: high genetic diversity retained in white-tailed eagles upon recovery from population decline, **Biology Letters**, v. 22, n. 2, p. 316-319, 2006.

HALDANE, J. B. S. An exact test for randomness of mating, **Journal of Genetics**, v. 52, n. 1, p. 631-635, 1954.

HARRISON, S.; TAYLOR, A. D. Empirical evidence for metapopulation dynamics, in *Metapopulation Dynamics: Ecology, Genetics and Evolution* (Hanski, I. and Gilpin, M.E., eds), Academic Press, 1997.

IF – INSTITUTO FLORESTAL. Plano de Manejo da Estação Ecológica de Santa Bárbara, Governo do Estado de São Paulo, São Paulo, 2011.

IF – INSTITUTO FLORESTAL. Proposta de criação da floresta estadual do Noroeste Paulista, Governo do Estado de São Paulo, São Paulo, 2014.

IUCN. Red List of Threatened Species. Version 2017-2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 15 de agosto de 2017.

KOPELMAN, N. M.; MAYZEL, J.; JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A; MAYROSE, I. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K, **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 5, p. 1179-1191, 2015.

KORBIE, D. J.; MATTICK, J. S. TouchDown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification, **Nature Protocols**, n. 3, p. 1452-1456, 2008.

KUSUKAWA, N.; WHITE, H. W. Agarose-Based System for Separation of Short Tandem Repeat Loci, **BioTechniques**, v. 22, p. 976-980, 1997.

LACY, R. C. Importance of Genetic Variation to the Viability of Mammalian Populations, **Journal of Mammalogy**, v. 78, n. 2, p. 320-335, 1997.

LATCH, E. K.; DHARMARAJAN, G.; GLAUBITZ, J. C.; RODHESJR, O. E. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation, **Conservation Genetics**, v. 7, n. 2, p. 295–302, 2006.

LONZA, R. Manual product instructions, MetaPhor Agarose, Lonza Rockland Inc., 2007.

MANEL, S.; BERTHIER, M. P.; LUIKART, G. Detecting Wildlife Poaching: Identifying the Origin of Individuals with Bayesian Assignment Tests and Multilocus Genotypes, **Conservation Biology**, v. 16, n. 3, p. 650-659, 2002.

MANEL, S.; SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics, **Trends in Ecology and Evolution**, v.18 n.4, 2003.

MANK, J.; AVISE, J. Individual organisms as units of analysis: Bayesian-clustering alternatives in population genetics, **Genetical research**, v. 84, n. 43, 2004.

MILLER, M. P. Tools for population genetic analyses –TFPGA –1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. **Computer software distributed by author**, 1997.

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

MIRANDA, F.; BERTASSONI, A.; ABBA, A.M. *Myrmecophaga tridactyla*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2014.

ASIF, M.; RAHMAN, M.; JAVED I.; MIRZA, J. I.; ZAFAR Y. High resolution metaphor agarose gel electrophoresis for genotyping with microsatellite markers, **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 45, n.1, p. 75-79, 2008.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.

NEI, M. Genetic Distance between populations, **The American Naturalist**, v. 106, n. 949, p. 283-292, 1972.

NOWAK, R. M. Walker's Mammals of the World. v. 1. 6. ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 1999.

OETTING, W. S. et al. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers, **Genomics**, v. 30, n. 3, p. 450-458, 1995.

ORDOVAS, J. M. Separation of small-size DNA fragments using agarose gel electrophoresis, **Methods in Molecular Biology**, v. 110, p. 35-42, 1998.

PEREIRA, J. H. Análise de impactos ambientais gerados pela implantação de loteamentos fechados de alto padrão, 2015, 131 folhas. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.

PERICO, E.; CEMIN, G.; LIMA, D. F. B. Efeitos da fragmentação de habitats sobre comunidades animais: utilização de sistemas de informação geográfica e de métricas de paisagem para seleção de áreas adequadas a testes. In: XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia, Brasil. Anais, INPE, p. 2339-2346, 2005.

POMETTI, C. L.; BESSEGA, C. F.; SAIDMAN, B. O.; VILARDI, J. C. Analysis of genetic population structure in *Acacia caven* (Leguminosae, Mimosoideae), comparing one exploratory and two Bayesian-model-based methods, **Genetics and Molecular Biology**, vol. 37, n.1, 2014.

PORRAS-HURTADO, L.; RUIZ, Y.; SANTOS, C.; PHILLIPS, C.; CARRACEDO, Á.; LAREU, M. V. An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n.98, 2013.

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

PROVETE, D. B.; GAREY, M. V.; SILVA, F. R.; ROSSA-FERES, D. C. Anuranfauna from northwestern region of the State of São Paulo: species list and taxonomic key for adults. **Biota Neotropica**, v. 11, n.2, 2011.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

RIBEIRO, R. C. Genética populacional de *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa, Myrmecophagidae) no estado de São Paulo utilizando o gene mitocondrial CytB, 2016, 50 folhas. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.

RIDLEY, M. Evolução, Rivo Fischer 3. ed., Porto Alegre, Artmed, 2006.

RODRIGUES, R. R.; JOLY, C. A.; BRITO, M. C. W.; PAESE, A.; METZGER, J. P.; CASATTI, L.; NALON, M.A.; MENEZES, N.; IVANAUSKAS, N. M.; BOLZANI, V.;

BONONI, V. L. R. Diretrizes para conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo. Governo do Estado de São Paulo, São Paulo, 2008.

SANTOS, K. K.; PACHECO, G. S. M.; PASSAMANI, M. Medium-sized and large mammals from Quedas do Rio Bonito Ecological Park, Minas Gerais, **Journal Check List**, v. 12, n. 5, 2016.

SÃO PAULO (Estado). (Secretaria do Meio Ambiente). Cerrado: bases para conservação e uso sustentável das áreas de Cerrado do estado de São Paulo. Série PROBIO/SP. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1997.

SÃO PAULO (Estado). (Secretaria do Meio Ambiente). Áreas de domínio do cerrado no Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria Estadual do Meio Ambiente, p. 84, 1998.

SARRE, S.D.; GEORGES, A. Genetics in conservation and wildlife management: A revolution since Caughley. **Wildlife Research**, v. 36, p. 70-80, 2009.

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

SETHURAMAN, A. On inferring and interpreting genetic population structure - applications to conservation, and the estimation of pairwise genetic relatedness. Graduate Theses and Dissertations (Bioinformatics and Computational Biology, PhD). Iowa State University, p. 177, 2013.

SIGRIST, M.S.; Pinheiro J.B.; Filho J.A.; Zucchi M.I. Genetic diversity of turmeric germplasm (*Curcuma longa*; Zingiberaceae) identified by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 419-428, 2011.

SLATKIN, M. Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations, **Evolution**, v. 47, n. 1, p. 264-279, 1993.

SWART, M. K. J.; FERGUSON, J. W. H.; TOIT, R.; FLAMAND J. R. B. Substantial Genetic Variation in Southern African Black Rhinoceros (*Diceros bicomis*), **Journal of Heredity**, v. 85, n. 4, p. 261–266, 1994.

TAYLOR, A. C.; SHERWIN, W. B. ; WAYNE, R. K. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorhinus krefftii*, **Molecular Ecology**, v. 3, n. 4, p. 277-290, 1994.

TELLES, M.P.C.; RESENDE, L.V.; BRONDANI, R. P. V; COLLEVATTI, R. G.; COSTA, M. C.; SILVA JÚNIOR, N. J. Isolation and characterization of microsatellite markers in the armored catfish *Hypostomus gymnorhynchus* (Loricariidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p.1770-1774, 2010.

TEMPLETON, A. R.; ROBERTSON, R. J.; BRISSON, J.; STRASBURG, J. Disrupting evolutionary processes: The effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, v. 98, n. 10, p. 5426-5432, 2001.

TORRES-FLOREZ, J. P.; HUCKE-GAETE, R.; ROSENBAUM, H.; FIGUEROA, C. C. High genetic diversity in a small population: the case of Chilean blue whales, **Ecology and Evolution**, v. 4, n. 8, p. 1398-1412, 2014.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; SEGATTO, A. L. A.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, A. C.; FREITAS, L. B. Guia Prático para estudos Filogeográficos. Ribeirão Preto, SBG, 105 p., 2013.

WAN, Q. H.; WU, H.; FUJIHARA, T.; FANG, S. G. Which genetic marker for which conservation genetics issue?, **Electrophoresis**, v. 25, p. 2165–2176, 2004.

WEISS, M.; LEESE, F. Widely distributed and regionally isolated! Drivers of genetic structure in *Gammarus fossarum* in a human-impacted landscape, **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, n. 153, 2016.

WHITLOCK, M. C. $G'ST$ and D do not replace FST , **Molecular Ecology**, v. 20, n. 6, p. 1083-1091, 2011.

WILSON, M. C.; CHEN, X.; CORLETT, R. T.; DIDHAM, R. K.; DING, P.; HOLT, R. D.; HOLYOAK, M.; HU, G.; HUGHES, A. C.; JIANG, L.; LAURANCE, W. F.; LIU, J.; PIMM, S. T.; ROBINSON, S. K.; RUSSO, S. E. Habitat fragmentation and biodiversity conservation: key findings and future challenges, **Landscape Ecology**, v. 31, p. 219. 2016.

WRIGHT, S. Isolation by distance, **Genetics**, v. 28, n. 2, p. 114-138, 1943.

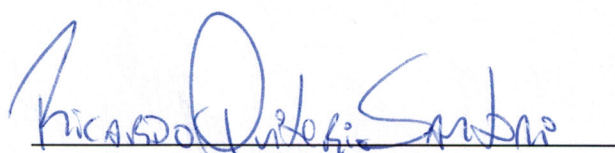
WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F -statistics with special regard to system of mating, **Evolution**, v. 19, p. 395-420, 1965.

ZAVALA-PÁRAMO, A. S.; OYAMA, K.; MENDOZA, E.; ZAVALA-PÁRAMO, M. G.; JOHN POLLINGER, J.; THOMAS B. SMITH, T. B. Genetic variability in captive individuals of the endangered species *Tapirus bairdii* in Mexico, **Mexican Journal of Biodiversity**, v. 88, n. 2, p. 480–484, 2017.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 13 / 03 / 2018.



Assinatura do autor