Helena Tadiello de Moraes

Estudo da diversidade genética em Cingulata através de
marcadores mitocondriais e microssatélites: o caso de uma
população de *Tolypeutes tricinctus* (Linnaeus, 1758) do Cerrado.

Genetic diversity of Cingulata assessed by mitochondrial and microsatellite markers: the case of
a *Tolypeutes tricinctus* (Linnaeus, 1758) population from Cerrado.

São Paulo

2015

Helena Tadiello de Moraes

Estudo da diversidade genética em Cingulata através de
marcadores mitocondriais e microssatélites: o caso de uma
população de *Tolypeutes tricinctus* (Linnaeus, 1758) do Cerrado.

Genetic diversity of Cingulata assessed by mitochondrial and microsatellite markers: the case of
a *Tolypeutes tricinctus* (Linnaeus, 1758) population from Cerrado.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área de
Biologia (Genética).

Orientadores: Dra. Nadia Moraes-
Barros e Prof. Dr. João Stenghel
Morgante

São Paulo

2015

Moraes, Helena Tadiello

Estudo da diversidade genética em Cingulata através de marcadores mitocondriais e microssatélites: o caso de uma população de *Tolypeutes tricinctus* (Linnaeus, 1758) do Cerrado.

74 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Tolypeutes tricinctus* 2. Marcadores microssatélites 3. Marcadores mitocondriais 4. Genética de Populações 5. Conservação I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientadora: Dra. Nadia Moraes-Barros

Ao Profº João Stenghel Morgante

Agradecimentos

Aos meus orientadores Prof. João Stenghel Morgante e Dra. Nadia Moraes-Barros pelo apoio sempre, pela paciência, preocupação, cuidados, carinhos e amizade.

A Capes pela concessão da bolsa nos primeiros meses de mestrado.

A Fapesp pela concessão das bolsas de mestrado e de estágio no exterior (BEPE).

Aos colaboradores Adriana Bocchiglieri, Flávia Miranda, Frédéric Delsuc e a todos os pesquisadores envolvidos nas doações de amostras.

Às grandes amigas Sofia Silva e Camila Clozato pelas sessões de terapia, ideias, paciência, ajuda e acima de tudo pela amizade.

Aos amigos eternos do Labec por fazer os dias e a convivência sempre alegres: Maria Helena Maia, Rodrigo Francisco, Juliana Machado, Gabriela Cardoso, Vanessa Simão, Larissa Tormena, Gisele Dantas.

A mais especial e essencial amiga, irmã, companheira, parceira de todas as horas Anna Carolina Milo. Sem você eu não teria chegado aonde cheguei e não seria metade do que sou.

Ao irmão que encontrei pela vida Artur Cortez (Kitu) pelas broncas, puxões de orelha, por me ouvir e por ter o poder de sempre me fazer sentir melhor.

Ao Fe, meu amor! Por ser companheiro, paciente, compreensivo e por tanto ter me ajudado, principalmente nos últimos dias que antecederam a entrega. Sem você eu teria pirado (muito mais)!

Às pessoas do CTM que com tanto carinho me acolheram, me ensinaram e estavam sempre dispostos a ajudar. Em especial Patrícia Ribeiro, Susana Lopes, Felipa Martins, Sofia Mourão e Maria Magalhães pela dedicação, paciência e divertimento. Ao Prof. Nuno Ferrand pela supervisão das atividades no Cibio.

Aos amigos de longa data Fernanda Gentil, Raissa Hadad e Julio Grings. Vocês são pra sempre!

Por último e mais importante, a minha família que mesmo “bagunçada” me ama e sempre me apoiou e suportou. Principalmente à minha irmã Heloisa por ter me dado nestes anos de mestrado o melhor presente da vida: Júlia, sobrinha e afilhada amada!!!

Índice

Resumo.....	08
Abstract.....	10
1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	25
3. Material e métodos.....	26
4. Resultados.....	38
5. Discussão.....	46
6. Conclusões.....	57
7. Referências bibliográficas.....	58
Anexos.....	72

Resumo

Tolypeutes tricinctus, o tatu-bola, é um mamífero neotropical pertencente ao grupo dos Xenarthra. É uma espécie endêmica ao Brasil que só ocorre nos biomas de Caatinga e Cerrado e encontra-se ameaçada de extinção. O único estudo genético que foi realizado sobre a espécie estimou a diversidade no gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI). Apenas um haplótipo foi observado em 30 indivíduos da única população de tatus-bola até então amostrada. Devido a esse resultado e à falta de estudos genéticos e filogenéticos este trabalho foi proposto a fim de investigar melhor a diversidade genética dessa população, distribuída no Cerrado do estado da Bahia na área da Fazenda Jatobá. Para tanto, foram utilizados marcadores microssatélites selecionados por sequenciamento de nova geração e a região controle do DNA mitocondrial (D-loop). Foi feito também um esforço de amostragem a fim de analisar exemplares de *T. tricinctus* provenientes de outras populações e da espécie congênica *Tolypeutes matacus*. Além disso, testou-se o poder do gene COI na diferenciação entre oito espécies da ordem Cingulata através da técnica do DNA *barcoding*. Foram selecionados e testados 60 *loci* microssatélites, sendo 23 amplificados com sucesso entre os indivíduos da Fazenda Jatobá. Destes, apenas dois se mostraram polimórficos com dois e três alelos respectivamente. Nas amostras provenientes de museu ou de outras localidades não foi possível amplificar nenhum dos marcadores. Já na amostra de *T. matacus*, cinco marcadores foram amplificados com sucesso, sendo que em um marcador foi encontrado um alelo diferente do observado na população da Fazenda Jatobá. Esse resultado foi inesperado e impossibilitou a estimativa dos parâmetros populacionais relativos ao efetivo populacional e grau de

endocruzamento. A possibilidade de erros ou limitações da técnica utilizada foi descartada sendo provável que a baixa eficiência na seleção de loci polimórficos seja reflexo da baixa diversidade da população estudada. Baixos índices de diversidade genética foram também observados em segmentos de 386pb do D-loop ($h = 0.4032 \pm 0.0909$ e $\pi = 0.002084 \pm 0.001737$), sendo que em 23 indivíduos da fazenda Jatobá somente dois haplótipos foram observados. Um terceiro haplótipo foi observado em uma amostra proveniente do estado do Ceará que também foi incluída na estimativa dos índices de diversidade para a espécie ($h = 0.4529 \pm 0.0948$ e $\pi = 0.002125 \pm 0.001757$). No estudo com *barcoding*, o gene COI mostrou-se eficiente na diferenciação entre a maioria das espécies. A estimativa da filogenia não mostrou suporte significativo nas relações dentro das subfamílias. Considerando as evidências sobre a baixa diversidade na população de *T. tricinatus* da Fazenda Jatobá e as ameaças à sobrevivência da espécie, é possível que a mesma situação seja observada em outras populações. Sendo assim os resultados aqui apresentados demonstram a necessidade de uma maior amostragem nas demais localidades de distribuição de *T. tricinatus*, para confirmação da atual situação da espécie. A fim de contribuir para conservação da espécie, a preservação das populações remanescentes de tatu-bola, evitando o declínio das mesmas, deve ser prioridade em planos de conservação. A manutenção da variação genética do tatu-bola é de especial interesse, em especial da população da Fazenda Jatobá, a qual se já não for um exemplo de extinção local poderá sofrer os efeitos negativos da depressão por endocruzamento e consequente impacto em sua viabilidade e sobrevivência.

Abstract

Tolypeutes tricinctus, the three-banded armadillo, is a Neotropical mammal that belongs to Xenarthra group. This species is endangered and endemic to Brazil occurring only in Caatinga and Cerrado biomes. The previous genetic study available analyzed the genetic diversity on Cytochrome Oxidase I (COI) gene and found only one haplotype among 30 individuals of a single population, the only one sampled so far. Considering this result and the lack of genetic and phylogenetic studies, the present work was proposed to better understand the genetic diversity of this population, from the Cerrado biome of the Bahia state, the Fazenda Jatobá population. We used microsatellite markers selected by next generation sequencing and the mitochondrial DNA control region (D-loop). A field research and contact with other researchers were made to obtain samples of the *T. matacus* and *T. tricinctus* samples from different localities. In addition, we also tested the power of COI gene to differentiate eight species of Cingulata order and to estimate the phylogeny using the DNA barcoding approach. Sixty microsatellite *loci* were selected and tested and 23 showed positive amplification results among individuals from Jatobá Farm population. Only two were polymorphic with two and three alleles respectively. Museum samples and individuals from other localities did not present positive results after amplification tests. The obtained result was unexpected and prevents any further population parameters estimates such as effective population size and inbreeding. Any chance of limitation or error was refuted and the low number of polymorphic loci probably express the low genetic diversity of the population. Low levels of genetic diversity were also observed in 386bp of D-loop ($h = 0.4032 \pm 0.0909$ e $\pi = 0.002084 \pm 0.001737$). Only two haplotypes were observed

among 23 individuals from the Jatobá population. A third haplotype was observed when in a sample from Ceará ($h = 0.4529 \pm 0.0948$ e $\pi = 0.002125 \pm 0.001757$). In the DNA barcoding study the COI gene was effective to differentiate most of armadillo species. The phylogeny did not show high support for the nodes representing subfamily level. Considering the evidences of low genetic diversity for the *T. tricinatus* Jatobá population and the menaces to species' survival it possible that a similar scenario be present in other populations. Therefore, the obtained results indicate that a larger sampling along different localities of the species' distribution is needed in order to understand the genetic diversity of *T. tricinatus*. Preserving the extant three-banded armadillo populations avoiding decline in size should be a priority in future conservation actions. Preserving the genetic diversity of the tree-banded armadillo is essential, especially for Jatobá population. This population may be an example of local extinction, or at least suffer from the negative effects of inbreeding depression and resulting impacts on its viability and survival.

1. Introdução

1.1. OS TATUS

Os xenartros modernos são um grupo diverso de mamíferos placentários neotropicais que se dividem em duas ordens. A ordem Pilosa inclui os tamanduás e preguiças e a ordem Cingulata inclui os tatus (Gaudin, 2003; Wilson e Reeder, 2005). A monofilia desse grupo é evidenciada tanto pela morfologia, pois possuem uma articulação extra entre as vértebras lombares, fusão ísquio-sacral e dentição simplificada (Engelmann, 1985; Patterson *et al.*, 1992; Gaudin, 1999; 2004; Rose *et al.*, 2005; Gaudin e McDonald, 2008; Vizcaíno, 2009), quanto pelas características moleculares (De Jong *et al.*, 1998; Van Dijk *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2001; Delsuc *et al.*, 2001, 2002; Gaudin e Wible, 2006; Hallström *et al.*, 2007). Registros fósseis destes animais sugerem que tenham surgido na América do sul (Patterson e Pascual, 1972) e todas as espécies deste grupo, extintas ou viventes, habitam as Américas, sendo que a maioria ainda é encontrada na América do Sul (Abba e Superina, 2010). Poucas ainda são encontradas na América Central e somente uma espécie é encontrada na América do Norte, o tatu *Dasypus novemcinctus* (tatu-galinha; Abba e Superina, 2010; Taulman e Robbins, 2014).

A ordem Cingulata possui apenas uma família. A família DASYPODIDAE (Grey, 1821; Gandin e Wible, 2006), com oito gêneros e 21 espécies viventes de tatus, foi a que atingiu maior sucesso evolutivo desde o Pleistoceno, entre os xenartros (Costa-Neto, 2000; Gardner, 2005).

Os integrantes da família DASYPODIDAE podem ser identificados devido à presença de uma carapaça formada por escudos dérmicos

(osteodermos; Eisenberg e Redford, 1999) que cobrem desde a cabeça até a cauda. Possuem cintas móveis transversais no meio do corpo com número variável entre as espécies. Essas cintas que separam os escudos escapular e pélvico podem ser usadas como caráter taxonômico (Emmons, 1990). Apesar de a maioria ser insetívora (formigas e cupins principalmente), algumas espécies podem ainda se alimentar de plantas, frutas, pequenos vertebrados ou até carniça (Emmons, 1990; Nowak, 1999). O tamanho do corpo desses animais varia de 11,5 (*C. truncatus*) a 90 cm (*P. maximus*). Sua dentição, quando presente, é simples e dentes de leite, incisivos, caninos e pré-molares verdadeiros estão ausentes (Vizcaíno, 2009; Kalthoff, 2011). É dividida em três subfamílias:

- Subfamília Dasypodinae (Grey, 1921): inclui as espécies do gênero *Dasypus* (*D. hybridus*, *D. kappleri*, *D. novemcinctus*, *D. pylosus*, *D. sabanicola*, *D. septemcinctus*, *D. yepesi*). Possuem orelhas grandes e rosto fino e alongado, além de quatro dígitos nas patas. Suas carapaças possuem de seis a 11 bandas móveis localizadas entre os escudos escapular e pélvico.
- Subfamília Euphractinae (Winge, 1923): possuem orelha curta, patas com quatro a cinco dígitos e carapaça com nenhuma ou uma banda móvel cervical. Compreende as espécies dos gêneros *Calyptophractus* (*C. retusus*); *Chlamyphorus* (*C. truncatus*); *Chaetophractus* (*C. nationi*, *C. vellerosus*, *C. villosus*); *Euphractus* (*E. Sexcinctus*); e *Zaedyus* (*Z. Pichiy*).
- Subfamília Tolypeutinae (Grey, 1865): inclui espécies dos gêneros *Cabassous* (*C. centralis*, *C. chacoensis*, *C. tatouay*, *C. unicinctus*);

Tolypeutes (*T. matacus*, *T. tricinctus*); e *Priodontes* (*P. maximus*).

Possuem orelhas espessas e carnudas e de quatro a cinco dígitos nas patas. Espécies do gênero *Tolypeutes* possuem de uma a quatro (geralmente três) bandas móveis entre os escudos pélvico e escapular em suas carapaças, já espécies dos gêneros *Cabassous* e *Priodontes* possuem de 11 a 14 bandas (Gardner, 2007).

1. 2. *Tolypeutes tricinctus*, O TATU-BOLA

O gênero *Tolypeutes* compreende as duas espécies de tatus que podem se fechar em formato de bola para se proteger: a espécie *Tolypeutes tricinctus* (Linnaeus, 1758), conhecida como tatu-de-três-bandas-brasileiro; e a espécie *Tolypeutes matacus* (Desmarest, 1804), também conhecida como tatu-de-três-bandas do sul. Esta proteção é útil contra predadores naturais (raposas, gatos selvagens), porém, os torna vulneráveis à captura pelo homem (Silva e Oren, 1993; Santos *et al.*, 1994; Marinho-Filho *et al.*, 1997; Noss *et al.*, 2003; Feijó e Langguth, 2013). As duas espécies diferenciam-se, dentre outras características morfológicas, pelo fato de *T. tricinctus* possuir cinco dedos nos membros anteriores e *T. matacus* apenas quatro (Nowak, 1999; Gardner, 2007). São alopátricas e suas áreas de ocorrência são separadas por cerca de mil quilômetros. Esta área que separa as duas espécies se encontra na região central do Brasil e corresponde às cabeceiras dos rios Paraná (ao sul) e Tocantins-Araguaia (ao norte; Feijó *et al.*, 2015).

T. tricinctus, conhecida também como tatu-bola (figura 1) é a única espécie de tatu endêmica do Brasil, habita a Caatinga e áreas adjacentes de

Cerrado, sendo considerada uma das espécies de tatus menos conhecidas no país (Silva e Oren, 1993; Santos *et al.*, 1994; Oliveira, 1995; Wetzel *et al.*, 2007; Superina *et al.*, 2014). Pode ser encontrada nos estados da Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Tocantins. Possui registros também em Minas Gerais e Goiás, a serem confirmados (Feijó *et al.*, 2015; figura 2). A perda e a fragmentação de habitat e a pressão de caça (Santos *et al.*, 1994; Barrientos e Cuellar, 2004; Abba e Vizcaino, 2011; Feijó e Langguth, 2013) principalmente predatória (esporte, lazer, comercial, cultural), têm ameaçado a sua existência causando uma redução de mais de 30% da população geral nos últimos anos (Abba e Superina, 2010). Sendo assim, o tatu-bola possui estatuto de ameaça e é listado como Vulnerável (VU) pela União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (Miranda *et al.*, 2014) e já é considerada como Em Perigo pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2014).

Figura 1: *T. tricinatus* fechado em forma de bola. Fonte: Abba e Superina, 2010. Fotógrafo: Joares May

T. tricinatus mede cerca de 30 cm e sua cauda cerca de 6,5 cm (Eisenberg e Redford, 1999), sendo seu peso em média 1,8 kg (Marinho-Filho *et al.*, 2002). Possui alimentação insetívoro-especialista, alimentando-se

preferencialmente de cupins mas podem ingerir também outros invertebrados e material vegetal (Guimarães, 1997). Possui hábito predominantemente crepuscular e/ou noturno (Santos, 1993) e não fossorial, apesar de possuir a capacidade de cavar tocas e de se utilizar de tocas cavadas por outras espécies eventualmente (Abba e Superina, 2010).

Possuem dimorfismo sexual, sendo os machos um pouco maiores que as fêmeas (Guimarães, 1997). Em época reprodutiva, foi observado um agrupamento formado por uma fêmea e dois machos que a perseguiram (Marini-Filho e Guimarães, 2010). O período de gestação não é descrito, mas deve ser semelhante à espécie *T. matacus* que dura em média 120 dias e apenas um filhote nasce na estação chuvosa (raramente dois; Eisenberg e Redford, 1999). A maturidade sexual é atingida com cerca de 320 dias de vida e acredita-se que o período de vida vai de 12 a 15 anos (tempo observado para *T. matacus* em cativeiro). A área de vida observada dos machos (238 ha) é bem maior que a da fêmea (122 ha), sendo um indício de territorialidade na espécie (Guimarães, 1997).

Até o início dos anos 1990 acreditava-se que essa espécie estivesse extinta, sendo redescoberta quando surgiram novos registros nos estados do Piauí, norte de Minas Gerais, Tocantins e Bahia (Marinho-Filho *et al.*, 1997; Marinho-Filho e Reis, 2008; Marini-Filho e Guimarães, 2010).

Segundo Marinho-Filho *et al.* (1997) as maiores populações conhecidas de *T. tricinatus* localizadas no Cerrado estavam restritas a duas localidades. Essas populações se encontravam na Fazenda Pratudão, no município de Correntina, BA, e na Fazenda Jatobá no município de Jaborandi, BA. A população que será estudada nesse trabalho é a população da Fazenda

Jatobá, para a qual foram obtidas amostras biológicas entre os anos de 2008 e 2009, durante estudo realizado por Bocchiglieri (2010).

Figura 2: Mapa de distribuição das duas espécies do gênero *Tolypeutes*. Fonte: CPB/ICMbio, 2014

Em um estudo de levantamento da mastofauna de médio e grande porte no local da Fazenda Jatobá, Bocchiglieri *et al.* (2010) observaram que o tatu-bola é a espécie mais abundante na área, sendo encontrado em todos os ambientes (cerrado, área de pinheiros, plantações de soja e áreas desmatadas), ao longo de todo o dia sendo mais registrado no período noturno e durante todo o período amostrado (2008-2009). Os registros ocorreram nas estradas, pois o tamanho pequeno desses animais dificulta a visualização no meio da vegetação. Foram registrados 86 indivíduos, sendo 46 no período noturno. A densidade estimada a partir dos registros noturnos foi de 1.2 ind./km².

Com a venda de parte da Fazenda em 2007, o número de veículos e pessoas aumentou na região, segundo Bocchiglieri (2010), causando um impacto negativo sobre a espécie e diminuição da população local ao longo dos últimos anos devido a atropelamentos, ao aumento da caça e ao avanço das áreas de plantio de soja (perda de habitat). Desta forma é esperado que a estimativa realizada não reflita o tamanho da população original da área da Fazenda Jatobá. A redução da população devido à perda de habitat e ao impacto antropogênico está intimamente relacionada à perda da variabilidade genética por deriva, e também ao aumento da taxa de endogamia, diminuição do número efetivo, valor adaptativo e viabilidade populacional (Frankham *et al.*, 2002). Sendo assim, o estudo da diversidade genética e de parâmetros populacionais para esta população de *T. Tricinctus* aqui proposto poderá trazer informações indispensáveis para melhor compreender a história evolutiva da espécie e para propor aplicações para a conservação biológica, como apontar populações e áreas prioritárias para preservação e promover fluxo gênico entre populações diferentes a fim de aumentar a diversidade dessas e/ou mantê-las viáveis.

1.3. DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES.

A diversidade genética permite que as populações mantenham seu valor adaptativo, sendo capazes de responder às mudanças ambientais (Moritz, 2002). O estudo da diversidade genética é muito importante para compreender, investigar e verificar as afinidades e os limites entre as espécies, detectar modos de reprodução e estrutura familiar, estimar níveis de migração e dispersão nas populações e até para ajudar na identificação de restos animais

(Avice, 1994). Tal estudo é essencial quando se fala em genética da conservação, principalmente quando se trata de populações naturais de espécies sob impacto antropogênico (Solé-Cava, 2001) e sob ameaça de extinção, como é o caso da população de *T. tricinctus* a ser estudada.

Em populações pequenas é possível observar com maior intensidade o efeito de deriva genética. Trata-se de mudanças aleatórias na composição genética de uma população finita devido ao erro amostral, afetando as frequências alélicas dessa (Templeton, 2006). Resulta em perda da diversidade genética, pela fixação de algum alelo e perda de outro, por exemplo e em diversificação entre populações idênticas quando ocorre fragmentação (Frankham *et al.*, 2002). Duas situações podem aumentar a probabilidade de perda de diversidade genética por deriva: efeito gargalo (*Bottleneck*), quando o tamanho da população é reduzido drasticamente ocorrendo perda de alelos, ou efeito fundador quando novas colônias são formada a partir de poucos indivíduos que podem não representar a composição alélica da população original (Campbell *et al.*, 1999).

O tamanho de uma população pode ser dado pelo número absoluto de indivíduos (número censitário), ou pelo número efetivo desta. Do ponto de vista da diversidade genética, tamanho efetivo de uma dada população pode ser estimado comparando-se ao tamanho teórico de uma população finita que perde diversidade, por efeito de deriva, na mesma taxa que a população observada (Ellegren, 2004). Porém, populações reais desviam da estrutura de uma população ideal por apresentarem reprodução desigual, alta variação no tamanho das famílias, variação no número de gerações sucessivas, sobreposição de gerações, etc. Assim, o número efetivo de uma população é

menor do que o número de adultos reprodutores (Frankham *et al.*, 2002), sendo aqueles que realmente irão contribuir geneticamente para a próxima geração (Weckworth *et al.*, 2013).

Um parâmetro interessante de estudar, principalmente em populações pequenas devido à perda de diversidade genética, é o coeficiente de endocruzamento (F). Endocruzamento é a geração de descendentes a partir do acasalamento entre indivíduos aparentados. O F é medido pela probabilidade de dois alelos em um *locus* serem idênticos por descendência (Wright, 1951). O endocruzamento aumenta a homozigotidade e expõem alelos raros e deletérios. Este processo é predominante e inevitável em populações pequenas e isoladas, o que pode levar à depressão endogâmica e à diminuição da viabilidade populacional (Frankham *et al.*, 2002).

A estimativa desses parâmetros, assim como de diversidade genética são essenciais para definir a estrutura e situação das populações, principalmente em populações de espécies ameaçadas de extinção e que sofreram, em algum momento de sua história evolutiva alguma redução populacional representativa.

1.3.1. Estimativa da diversidade genética em populações

A diversidade genética é influenciada por: mutação, recombinação, migração, deriva genética e seleção (Frankham *et al.*, 2002). Hoje, após o surgimento de técnicas moleculares que acessam diretamente o DNA e não aos seus produtos (proteínas e enzimas) e o desenvolvimento de novas ferramentas da biologia molecular é possível analisar inúmeros genes e segmentos do genoma de vários indivíduos por vez, tanto nucleares quanto do

DNA presente nas organelas. Um método bastante utilizado nos últimos anos em estudos populacionais de espécies animais é a análise combinada de múltiplos marcadores moleculares independentes oriundos tanto do núcleo quanto da mitocôndria (Arteaga *et al.*, 2012; Delsuc *et al.*, 2012).

O DNA mitocondrial (mtDNA) possui, entre outras, as vantagens de ser muito conservado (conteúdo e ordem dos genes) e de possuir maior taxa evolutiva (taxa de substituições de bases) quando comparado ao DNA nuclear (nDNA). O fato de possuir herança somente materna na maioria das espécies faz com que esses marcadores sejam eficientes para acessar padrões de migração e relações e diferenças taxonômicas entre populações de uma mesma espécie. Por outro lado, isso pode se tornar uma desvantagem, pois esses marcadores só são capazes de traçar a linhagem materna (Arias *et al.*, 2003). Os marcadores mitocondriais são muito úteis para estudos populacionais, filogenéticos, filogeográficos e de aspectos biológicos e evolutivos em diversos organismos (Wilson *et al.*, 1985; Avise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987; Arias *et al.*, 2003).

Entre os marcadores mais usados para estudos populacionais, filogenéticos e/ou filogeográficos estão o citocromo oxidase I (COI) e o citocromo b (cyt b). Já a região controle do mtDNA (marcador D-loop) não codificadora e hipervariável, além de ser usada em estudos filogeográficos (Ashton e Queiroz, 2001; Kim, *et al.*, 1999; 2002; Kierstein *et al.*, 2004), é mais indicada para estimativas de diversidade nucleotídica ou para avaliar nível de polimorfismo dentro de populações (Gonzalez *et al.* 1998).

Outro tipo de marcador muito usado em estudos de genética de populações são os marcadores microsatélites (Schlötterer, 2004). São úteis

também em construção de mapas genéticos, testes de paternidade, estimativa de distância genética, determinar tempo de divergência e medir fluxo gênico entre populações (Ellegren, 2004), etc.

Os microssatélites (sequências de DNA compostas de unidades repetitivas que possuem de um a seis pares de bases; Schlötterer, 2004) são os marcadores genéticos mais usados na genética de populações, conservação biológica e biologia evolutiva. Suas altas taxas mutacionais e sua herança mendeliana faz com que sejam os mais adequados para o estudo de estrutura populacional (Abdelkrim *et al.*, 2009). Além disso, apresentam alto grau de polimorfismo e muitos alelos por *locus*. A diversidade genética detectada por esses marcadores é maior do que a detectada por outros métodos (como eletroforese e alozimas) (Ellegren, 2004). Além do fato de que são fáceis de desenvolver e podem ser analisados a custo moderado (Väli *et al.*, 2008).

A maioria dos estudos genéticos existentes dentro do grupo dos xenarthra envolvem espécies da ordem Pilosa, principalmente as preguiças (Moraes-Barros e Arteaga, no prelo). Existem alguns estudos filogenéticos incluindo todo o grupo xenarthra (Desulc *et al.*, (2002; 2012). Entre os tatus, a espécie *D. novemcinctus* é a mais estudada em genética de populações (Prodohl *et al.*, 1996; 1998; Frutos e VanDenBussche, 2002; Loughry *et al.*, 2009; Arteaga *et al.*, 2011; 2012). As espécies de tatus com maior nível de ameaça segundo a IUCN (*Vulnerable* – VU ou *Near Threatened* – NT) são as menos estudadas e poucos dos estudos existentes abordam genética ou conservação (Superina *et al.*, 2014).

Sobre a espécie *T. tricinatus*, o maior número de estudos aborda a distribuição da espécie ou aspectos ecológicos. Poquíssimos trabalhos existem sobre morfologia, conservação, genética ou evolução (Superina *et al.*, 2014). O único estudo sobre genética populacional com a espécie *T. tricinatus* foi realizado por Moraes *et al.* (2012) com o marcador mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) e, em 30 indivíduos da população da Fazenda Jatobá (população estudada também neste trabalho), apenas um haplótipo foi observado. Esse resultado somado a essa carência de estudos na área da genética acerca de *T. tricinatus* nos levou a procurar alternativas para investigar os níveis de diversidade genética nessa população através de marcadores polimórficos. Espera-se encontrar uma baixa diversidade genética, no menor que o número censitário e presença ou ausência de sinais de redução populacional recente na composição genética da população. Além disso, a estimativa do coeficiente de endocruzamento pode dar um indício do grau de isolamento da população de estudo. Espera-se encontrar níveis de endocruzamento próximos ou similares dos estimados para populações pequenas e isoladas.

Para tanto, foi escolhida a técnica de isolamento de microssatélite por sequenciamento completo do genoma (sequenciamento de nova geração; NGS) que possui a vantagem, sobre as técnicas mais antigas, de ser capaz de selecionar um número maior de marcadores microssatélites, além de ser um método mais rápido e com alto custo-benefício (Malausa *et al.*, 2011). Isso possibilita, entre outros, o estudo da relação entre número de marcadores utilizados e índice de diversidade genética obtido. Essa técnica vem sendo bastante utilizada em estudos de genética de populações, principalmente para

desenvolvimento de marcadores, inclusive em outros xenarthra, como é o caso do estudo com a espécie de preguiça *Bradypus variegatus*. Neste último, Silva (2013) conseguiu selecionar 52 marcadores microsatélites com a técnica de NGS e apenas 8 com o método tradicional. O sequenciamento de nova geração também foi utilizado no estudo de genes do complexo MHC no tamanduá-mirim, *Tamandua tetradactyla* (Clozato, 2014).

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho incluíram:

- 2.1 Desenvolver e descrever marcadores microssatélites espécie-específicos para *T. Tricinctus*, utilizando a técnica de NGS;
- 2.2 Estimar a diversidade genética de uma população localizada no Cerrado (Fazenda Jatobá) através dos marcadores microssatélites selecionados para que seja possível inferir se a população de *T. tricinctus* está reduzindo ao longo das gerações, ou se há evidências de *bottleneck*.
- 2.3 Estimar parâmetros populacionais através desses marcadores microssatélites, como coeficiente de endocruzamento, número médio de alelos, heterozigose observada e esperada e número efetivo (N_e);
- 2.4 Estimar a diversidade genética dessa mesma população utilizando a região controle do DNA mitocondrial (D-loop). Foi escolhido por ser um marcador independente do DNA nuclear, além de apresentar-se, geralmente, mais variável que o COI;
- 2.5 Testar o poder informativo do gene mitocondrial COI através da metodologia do *DNA barcoding* na diferenciação de *T. tricinctus* de outras espécies de tatus, englobando representantes das 3 subfamílias atualmente reconhecidas.

3. Material e métodos

3.1. AMOSTRAGEM

Este trabalho teve como foco o estudo da população da Fazenda Jatobá, localizada no município de Jaborandi – BA, contudo foram também feitas saídas a campo e contatos com museus e pesquisadores a fim de ampliar o número amostral e as localidades amostradas para a espécie. Para o gênero *Tolypeutes* foram utilizadas, ao todo, 39 amostras da espécie *T. tricinctus* e uma amostra da espécie *T. matacus*.

As amostras de *T. tricinctus* da Fazenda Jatobá utilizadas neste trabalho foram coletadas pela pesquisadora Dr. Adriana Bocchiglieri durante os anos de 2007, 2008 e 2009. A Fazenda Jatobá (sede: 46°00'W e 13°56'S) está localizada em um ambiente de ecótono entre o Cerrado e a Caatinga (Felfili e Silva Júnior, 2001). Após a coleta a área foi sendo transformada em uma área fragmentada com monocultura de soja e algodão. O platô da Fazenda na época da amostragem de *T. tricinctus* era formado por um mosaico de talhões de pinheiro, faixas de Cerrado, plantios de soja, e áreas desmatadas de pinheiro e de pós-colheita (Bocchiglieri *et al.*, 2010; figura 3).

Amostras de *T. tricinctus* do estado do Ceará, na região de Caatinga, foram coletadas pela pesquisadora Flávia Miranda no ano de 2014, e uma amostra de *T. matacus* foi doada pelo pesquisador Frédéric Delsuc da Universidade de Montpellier e possui origem desconhecida. Essa amostra foi incluída nesse trabalho com o intuito de verificar se os marcadores que selecionados para *T. tricinctus* poderiam ser transferidos para a espécie

congenérica *T. matacus*. Foram obtidos também fragmentos de pele de sete exemplares, sendo cinco do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e dois da Universidade Federal da Paraíba (tabela 1). Todas essas amostras foram posteriormente doadas ao Banco de Tecidos e DNA do Laboratório de Biologia Evolutiva e Conservação de Vertebrados (LABEC – IB/USP; deliberação nº 28/200), com exceção da amostra de *T. matacus* que se encontra na Universidade do Porto, Portugal. Um mapa mostrando as localidades amostradas para *T. tricinatus* que estão descritas na tabela 1 pode ser observado na figura 4. Nele pode-se distinguir se certo local amostrado está em um ambiente de Caatinga ou Cerrado.

Figura 3: Mapa da Fazenda Jatobá (Jaborandi, BA) mostrando o padrão de vegetação e os diferentes ambientes na época da coleta de amostras. Fonte: Bocchiglieri, 2010.

A saída a campo foi realizada na Fazenda Água Azul (sede: 49°14'W e 10°24'S) no município de Pium no estado do Tocantins a fim de tentar obter amostras de *T. tricinatus* cuja ocorrência foi apontada por moradores da região e trabalhadores da fazenda. Trata-se de uma propriedade particular com vegetação original de Cerrado, mas que foi desmatada para fins pecuários.

Foram realizadas expedições às áreas da fazenda e observações nas estradas durante locomoção com automóvel. Para isso foi expedida licença de coleta SISBIO número 42354-1. A população local foi perguntada sobre a presença do tatu-bola na região, tentando excluir a possibilidade de que estivessem falando de outra espécie, como mostrando fotos do animal e perguntando se ele se curvava ligeiramente ou se fechava-se em uma bola completa.

Figura 4: Mapa com os biomas Caatinga e Cerrado mostrando os pontos amostrados para *T. tricinctus* (pontos vermelhos). Os números acima dos pontos vermelhos correspondem aos locais indicados na tabela 1.

Amostras provenientes de espécimes identificados como pertencentes a seis outras espécies de tatus e uma amostra de *M. tridactyla* (tabela 1) foram

obtidas por diferentes pesquisadores e também doadas ao Banco de Tecidos e DNA do Labec. Foram utilizadas na análise por DNA *Barcoding*, onde também foi usada uma sequência de *D. hybridus* que foi obtida do banco de dados no site do *Barcode of Life Data System (BOLD)*; número de registro: AAI9630).

A obtenção de DNA variou conforme o tipo de amostra disponível e seguiu os mesmos protocolos salinos para tecidos em etanol, protocolo recomendado pelo fabricante (Whatman tech., EUA) para sangue em cartão (FTA elute) e protocolo descrito em Moraes-Barros e Morgante (2007) para as amostras de peles de museu.

3.2. SELEÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Os marcadores microsatélites que foram utilizados neste trabalho foram gerados através da técnica de NGS, uma técnica com maior custo-benefício e capaz de selecionar maior quantidade de marcadores e mais rapidamente quando comparada a técnicas mais antigas (Malaus *et al.*, 2011).

Duas amostras foram utilizadas para a seleção inicial dos marcadores (JB20 e JB21; tabela 1). Após quantificação em espectrofotômetro portátil (Nanodrop 2000, Thermo scientific), cerca de 1µg de DNA, juntando as duas amostras, foi aliquoteado e enviado a Genoscreen em Lille, França para procura e detecção de *loci* microsatélite através de uma técnica de sequenciamento de nova geração (454 GS-FLX *Titanium*; GenoSat®; Gilles *et al.* 2011; Malausa *et al.* 2011).

Após o sequenciamento foi gerada uma planilha com todos os fragmentos contendo *loci* microsatélite encontrados. A técnica de NGS resultou num total de 18451 *reads*, dos quais 1113 continham *loci*

microssatélites, agrupados em 167 segmentos homólogos. Cada grupo de fragmentos homólogos continha a indicação do fragmento apontado como ideal para o desenho de segmentos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) por possuírem regiões flanqueadoras suficientemente extensas.

A seleção dos *loci* procedeu-se a partir dos fragmentos apontados como ideais para o desenho de *primers*, dando prioridade a *loci* tetranucleotídeos e, em seguida, dinucleotídeos. Também foram considerados os *loci* pentanucleotídeos. O segundo item em consideração para a escolha dos marcadores foi o número de repetições, escolhendo-se primeiramente os marcadores com mais de cinco motivos repetidos (Temnykh *et al.*, 2001; Csencsics *et al.*, 2010). Posteriormente, marcadores com cinco motivos repetidos foram também considerados (ver item 5.1 da Seção Discussão). Além disso foram excluídos os segmentos que foram apontados como inapropriados para o desenho de *primers* pelo programa AmplifX 1.4 (Jullien, 2005) devido a possíveis interações entre os *primers*.

3.2 PADRONIZAÇÃO DAS AMPLIFICAÇÕES

Essa etapa do trabalho foi realizada no laboratório do Centro de Testagem Molecular (CTM) localizado no Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (Cibio) da Universidade do Porto, Portugal sob supervisão do Prof. Dr. Nuno Ferrand. Para isso foi concedida Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE-FAPESP, processo nº 2013/12199-6).

Tabela 1: Amostras de tatus e tamanduá-bandeira utilizadas neste trabalho com suas respectivas espécies (identificadas morfológicamente pelo coletor), datas de coleta (quando disponíveis), tipo da amostra, procedência (quando disponível) e coletor/doador (quando disponível). Os números ao lado das procedências correspondem às regiões do mapa da figura 4.

Amostra	Espécie	Data de coleta	Tipo da amostra	Procedência	Coletor/doador
JBSN	<i>T. tricinatus</i>	17/03/07	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB20	<i>T. tricinatus</i>	-	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB21	<i>T. tricinatus</i>	-	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB82	<i>T. tricinatus</i>	12/04/08	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB83	<i>T. tricinatus</i>	-	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB84	<i>T. tricinatus</i>	16/04/08	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB88	<i>T. tricinatus</i>	15/04/08	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB91	<i>T. tricinatus</i>	19/04/08	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB119	<i>T. tricinatus</i>	31/07/08	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB122	<i>T. tricinatus</i>	-	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB123	<i>T. tricinatus</i>	-	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB124	<i>T. tricinatus</i>	-	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB125	<i>T. tricinatus</i>	-	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB126	<i>T. tricinatus</i>	-	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB127	<i>T. tricinatus</i>	-	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB128	<i>T. tricinatus</i>	-	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB129	<i>T. tricinatus</i>	-	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB133	<i>T. tricinatus</i>	-	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB137	<i>T. tricinatus</i>	-	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB138	<i>T. tricinatus</i>	-	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB139	<i>T. tricinatus</i>	-	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB140	<i>T. tricinatus</i>	22/01/09	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB143	<i>T. tricinatus</i>	23/01/09	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB144	<i>T. tricinatus</i>	23/01/09	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB146	<i>T. tricinatus</i>	29/01/09	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB147	<i>T. tricinatus</i>	26/03/09	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB148	<i>T. tricinatus</i>	27/03/09	Sangue em cartão	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB149	<i>T. tricinatus</i>	13/04/09	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB158	<i>T. tricinatus</i>	-	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
JB2932	<i>T. tricinatus</i>	22/01/09	Tecido em etanol	Jaborandi, BA ⁶	Adriana Bocchiglieri
CE005	<i>T. tricinatus</i>	2014	Tecido em etanol	Crateús, CE ¹	Flávia Miranda
CE003	<i>T. tricinatus</i>	2014	Tecido em etanol	Crateús, CE ¹	Flávia Miranda
2654	<i>T. tricinatus</i>	1908	Pele de museu	Cidade da Barra, BA ⁵	Museu Zoologia USP
2655	<i>T. tricinatus</i>	1908	Pele de museu	Juazeiro, BA ⁴	Museu Zoologia USP
3134	<i>T. tricinatus</i>	1913	Pele de museu	Cidade da Barra, BA ⁵	Museu Zoologia USP
3135	<i>T. tricinatus</i>	1913	Pele de museu	Cidade da Barra, BA ⁵	Museu Zoologia USP
3136	<i>T. tricinatus</i>	1913	Pele de museu	Cidade da Barra, BA ⁵	Museu Zoologia USP
6871	<i>T. tricinatus</i>	02/2012	Pele de museu	Sento Sé, BA ³	Universidade Federal da Paraíba
7598	<i>T. tricinatus</i>	02/2012	Pele de museu	São Raimundo Nonato, PI ²	Universidade Federal da Paraíba
Tmat	<i>T. matacus</i>	-	-	-	Frédéric Delsuc
720D	<i>D. hybridus</i>	20/04/10	Tecido em etanol	Guaíba, RS	-
39214	<i>D. septemcinctus</i>	20/01/10	Tecido em etanol	Santana de Parnaíba, SP	-
MG03	<i>D. novemcinctus</i>	12/05/10	Tecido em etanol	Unaí, MG	-
MG01	<i>E. sexcinctus</i>	16/12/10	Tecido em etanol	Unaí, MG	-
VIIIP	<i>P. maximus</i>	20/04/10	Tecido em etanol	Sena Madureira, AC	-
33196	<i>C. unicinctus</i>	03/12/07	Tecido em etanol	-	-
CAB001	<i>M. tridactyla</i>	-	Tecido em etanol	-	-

Antes de proceder às amplificações, as amostras de *T. tricinatus* e a amostra de *T. matacus* foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose 0.8% e diluídas de acordo com suas concentrações. Três amostras de *T. tricinatus* com melhor qualidade e maior quantidade de DNA foram escolhidas para testar os marcadores selecionados e padronizar as reações de amplificação.

As reações individuais foram realizadas com 5 µl de QIAGEN PCR MasterMix, 0.4 µl de *primer reverse* (R; 0.25µM), 0.4 µl de *primer forward* (F; 0.025µM) com uma pequena sequência de nucleotídeos adicionada para a ligação das diferentes caudas marcadas com fluorescências (método dos *primers* marcados com cauda M-13; Oetting *et al.* 1995), 0.4 µl da cauda marcada com fluorescência (0.25µM) e 1 µl de DNA (aproximadamente 10 ng de DNA genômico) em um volume final de 10 µl. O programa de PCR consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C durante 15 min, seguida por um *touchdown* de 13 ciclos (desnaturação a 95°C por 45 seg, amplificação iniciando em 58°C por 45 seg e diminuindo 0.5°C a cada ciclo, e extensão a 72°C por 30 seg), e por 27 ciclos comuns (com desnaturação e extensão com mesma duração e temperatura dos ciclos *touchdown* , mas com amplificações ocorrendo a 52°C). Os resultados das amplificações foram testados em eletroforese com gel de agarose 2%. Os *loci* que não foram amplificados, que apresentaram bandas inespecíficas ou com tamanhos inesperados foram descartados.

Todas as amostras do gênero *Tolypeutes* foram submetidas à reação de PCR para os *loci* que apresentaram resultados positivos e sem inespecificidades. As amostras da Fazenda Jatobá foram amplificadas através

de reações múltiplas (multiplexes) e as amostras provenientes dos museus, do Ceará e a amostra de *T. matacus* através de reações individuais. As reações individuais seguiram protocolo já descrito acima. Para montagem dos multiplexes, esses *loci* foram agrupados segundo as fluorescências das sequencias adicionadas aos *primers* F e o tamanho dos produtos esperados. Além disso, a proximidade entre a temperatura de hibridação dos *primers* também foi um critério usado para compor os grupos. Esta análise foi feita com auxílio dos programas MultiPLX 1.0 (Kaplinski *et al.* 2005), e AmplifX 1.4 (Jullien, 2005) para testar possíveis interações indesejadas entre os *primers*.

As reações em multiplex foram realizadas com 5 µl de QIAGEN PCR MasterMix, 1 µl de DNA (aproximadamente 10 ng) e 1 µL de mix de *primers* em um volume final de 10 µl. O mix de *primers* é constituído de: *primers* R a 0.25µM; caudas marcadas com fluorescências (FAM, VIC, NED e PET) em mesma concentração que os *primers* R; e *primers* F com uma concentração 10 vezes menor (0.025µM). O programa foi o mesmo usado para as reações individuais, porém, com um *touchdown* de 9 ciclos, seguido por 31 ciclos comuns com amplificações ocorrendo a 54°C. O multiplex número três possui um programa de PCR ligeiramente diferente que consiste em um *touchdown* de 13 ciclos com amplificação iniciando a 62°C durante 1min e 30 seg, seguido de 32 ciclos comuns com amplicações a 56°C.

3.4. GENOTIPAGENS E ANÁLISES

Os produtos das reações de PCR foram genotipados em sequenciador automático (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer) e os fragmentos

foram analisados com auxílio do programa a GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems).

Ao término, as reações individuais com três amostras para teste de amplificação dos microssatélites e genotipagens foram repetidas para confirmação dos resultados obtidos.

Os produtos dessas mesmas PCRs individuais foram ainda purificados e sequenciados. A purificação foi realizada em um volume final de 10µL, adicionando-se 2 U das enzimas SAP (Fosfatase alcalina de camarão) e EXO (Exonuclease I) à 8µL de cada amostra. Essas amostras foram mantidas a 37 °C por 60 minutos e a 80 °C durante 13 minutos.

A reação de sequenciamento foi realizada segundo protocolo BigDye Terminator (Applied Biosystems). As reações foram submetidas a uma temperatura de desnaturação de 96 °C por 30 segundos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10 segundos, hibridação a 54 °C por 20 segundos e por último, foram mantidas a 60 °C por 4 minutos. Os produtos foram sequenciados no mesmo sequenciador usado nas genotipagens e analisados com auxílio do programa Sequencing Analysis v5.2 (Applied Biosystems) a fim de confirmar se as regiões que estavam sendo amplificadas correspondiam à *loci* microssatélites.

O teste de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi realizado com os *loci* que se mostraram polimórficos seguindo as configurações padrão do programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Este teste foi feito a fim de avaliar se havia desvio significativo entre as frequências genotípicas observadas e as frequências esperadas sob HWE.

3.5. ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DO DNA MITOCONDRIAL

3.5.1. Estudo da diversidade de *T. tricinatus* através da região controle

As amplificações foram realizadas em todas as amostras de *T. tricinatus* segundo as condições apresentadas na tabela 2, utilizando-se os *primers* BRDL-L2 (GGGAAATCAGCAATCCATCCAATAAG) e BRDL-H2 (TGCCTCGCTTTAGACTTAAGCTACGT; Moraes-Barros, *et al.*, 2006).

Após, as amplificações foram testadas em eletroforese em gel de agarose 2% e os produtos com tamanho esperado e sem inespecificidades foram purificados e sequenciados utilizando mesmas condições e protocolo descritos no item 3.4.

A edição, alinhamento e análises das sequências obtidas foram realizados com auxílio do programa BioEdit *Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999).

As estimativas das diversidades nucleotídica e haplotípica foram realizadas segundo as configurações padrão do programa Arlequin ver. 3.5 (Excoffier e Lischer 2010).

Tabela 2: Condições das reações de PCR realizadas para o D-loop em todas as amostras de *T. tricinatus*.

Estágio PCR	Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos	Reagente	Concentração
Desnaturação inicial	92	5 min	1	DNA	20 ng
Desnaturação	94	35 seg	35	Tampão	1 X
Annealing	54	40 seg		MgCl ₂	1,8 mM
Extensão	72	50 seg		dNTP's	0,2 mM
Extensão final	72	7 min	1	Primers	0,5 µM
				Taq platinum	0,075 U

3.5.2. Análise de diferentes espécies de tatus através da técnica de *barcoding*

As amostras de *T. tricinatus* provenientes do estado do Ceará e de museus e as seis amostras correspondentes às diferentes espécies de tatus foram submetidas à reação de PCR utilizando os *primers* COXI-H (5'-ACTTCAGGGTGTCCGAAGAATCA-3') e COXI-L2 (5'-TGTCTTTAGATTACAGTCTAATGC-3'; Lara-Ruiz *et al.*, 2008). As reações foram realizadas em um volume final de 10 µl seguindo as condições indicadas na tabela 3.

Os produtos de PCR que apresentaram a banda com tamanho esperado e sem inespecificidades foram purificados e sequenciados utilizando mesmas condições e protocolo descritos no item 3.4.

O alinhamento das sequências foi realizado no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Através do programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011), os valores de distância genética par a par foram calculados e a filogenia para todas as espécies analisadas utilizando o método NJ (Neighbour-joining) e adotando K2P (Kimura dois-parâmetros) como modelo evolutivo foi estimada. Esse modelo foi utilizado, pois é o recomendado segundo a metodologia do DNA *Barcoding* (Hebert *et al.*, 2003; Borisenko, *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2011). A espécie *M. tridactyla* (Tamanduá-bandeira) foi utilizada como grupo externo para estimar a árvore filogenética e a matriz de distância.

A amostragem utilizada aqui reuniu pelo menos um representante de cada subfamília conhecida dentro da família Dasypodidae (Gardner, 2007).

Tabela 3: Condições das reações de PCR realizadas para o gene COI nas amostras de *M. tridactyla*, de *T. tricinatus* do Ceará e de outras espécies de tatus.

Estágio PCR	Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos	Reagente	Concentração
Desnaturação inicial	92	5 min	1	DNA	20ng
Desnaturação	94	35 seg	35	Tampão	1X
Annealing	54	40 seg		MgCl₂	1,8mM
Extensão	72	50 seg		dNTP's	0,2mM
Extensão final	72	7 min	1	Primers	0,5nM
				Taq platinum	0,075

4. Resultados

4.1. SELEÇÃO DE MICROSSATÉLITES

Com base no tipo de microsatélite, tamanho dos fragmentos e composição dos *primers*, foram selecionados 60 entre os 167 fragmentos contendo *loci* microsatélites apontados para o desenho de *primers* após a obtenção da biblioteca sequenciada.

Entre os 60 *loci* testados, havia 33 di, 25 tetra e dois pentanucleotídeos (tabela 4). Devido à falta de opção para que se completasse o conjunto de 60 *loci* pretendidos, 11 fragmentos que possuíam *loci* com somente cinco repetições, dentre os 167, foram incluídos às análises (Tabela 4). Os 60 *loci* foram testados inicialmente em reações individuais com 3 amostras teste e destes, 36 marcadores mostraram resultados positivos de amplificação (Figura 5). Onze marcadores foram descartados nesta etapa por não estarem amplificando regiões microsatélites. Esse resultado foi observado a partir da análise dos alelos, após genotipagens, no programa GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems) e confirmado quando as amplificações e genotipagens foram repetidas. Os 25 *loci restantes* foram então agrupados em três multiplexes contendo de 8 a 9 *primers* cada um (tabela 5).

4.2. ANÁLISE DA DIVERSIDADE ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES

Foi possível amplificar os marcadores microsatélites em 30 amostras do gênero *Tolypeutes* de acordo com os resultados observados na tabela 9 (anexos).

Tabela 4: *primers* que foram selecionados através de sequenciamento de nova geração com nomes dos *loci*, seqüências dos *primers* forwards (F) e reverses (R) (*primers* F com cauda M13 adicionada), motivo e número de repetições e tamanho esperado do produto de PCR.

<i>Locus</i>	<i>Primers</i>	<i>Motivo</i>	<i>Tamanho produto de PCR</i>
I9PM7	F: TTTCCCAGTCACGACGTTGTCTACCTACCTACGTACCTACCTGC R: TGGTGTGAGCATGTGTAGCA	(CCTA) ₆	90
I6QJJ	F: TTTCCCAGTCACGACGTTGAGAATTAGAGGAGAATGGATGTAGC R: CATTTGAGTATGCTGTTGTATACCT	(AC) ₁₀	140
JUXCD	F: TTTCCCAGTCACGACGTTGCGGTTCCCTCTCCCTCTTTA R: TCAGGGCTAACTGGCATAGA	(CTTTT) ₁₂	189
I7XGS	F: GATAACAATTTACACAGGCACCAAGTCTTCGCACTCTG R: GATGGAGGGATAGACGGACA	(TCCA) ₅	110
JBYS	F: GATAACAATTTACACAGGCAGGATTAAGTGTTCAGGAGCA R: CAACCTTTCTGTGTCATCTGTTTATCA	(AGAC) ₅	170
JQLM6	F: GATAACAATTTACACAGGGGTGTAAGCTACCTACCAAAACATT R: CATATGTAGTTGATATTCTTCAAACCA	(ATCT) ₁₃	241
JCN4S	F: TAATACGACTCACTATAGGGTCTCACCTGGCCTTACATTC R: TCTCACCTGGCCTTACATTC	(GA) ₇	91
cons115_3	F: TAATACGACTCACTATAGGGAGAAATTTTGACCAGACCACG R: AGAAATTTTGACCAGACCACG	(ATCC) ₈	134
JUINA	F: TAATACGACTCACTATAGGGTGAGCCCTTTTAATGGAATGA R: TGAGCCCTTTTAATGGAATGA	(TC) ₇	174
JYK77	F: TGTA AACGACG GCCAGTTCTGTGCATCTATCAAGCCA R: GATGGACAGACGGATGGAT	(ATCt) ₆	129
cons433_3	F: TGTA AACGACG GCCAGTAATTGGGGCTGTTCTTACA R: CAGCCTGTAGTGCTCCCAA	(AT) ₅	200
JW24A	F: TGTA AACGACG GCCAGTGGGTATGGGATGAATCTCATGTA R: TATGGCATAGCTCATATTATGGG	(AC) ₁₈	240
JHR7L	F: TTTCCCAGTCACGACGTTGGTGGATGGATGGACGGGT R: GATATCCACTCATGTCTTCATTCC	(ATGG) ₅	90
cons115_3	F: TTTCCCAGTCACGACGTTGTGGCTTAGAGGAGGCACTTG R: AGAAATTTTGACCAGACCACG	(ATCC) ₈	134
JU9PD	F: TTTCCCAGTCACGACGTTGAGGGAAGTTACAAAAGTAATGCAA R: GATAGATGGGTGGATGGGTG	(TATC) ₁₂	190
JS799	F: GATAACAATTTACACAGGCCTTACAATTCACCCATTCTG R: TCCTAAAATTGTGGTAATGGTTGT	(GTTTT) ₆	112
JE4RS	F: GATAACAATTTACACAGGAGAGAAATGCCAGGGGATG R: CCATCAACATCCATCTATCCA	(GATG) ₅	158
JMN7N	F: GATAACAATTTACACAGGATCCATCTATCAATCCATCCAA R: TCTCCGTTGTGACTTCATGC	(CCAT) ₇	211
JZRX8	F: TAATACGACTCACTATAGGGCGATGCACACTTTTGTGTTCT R: TTTCTTTTCACTTTTCTGCCAA	(TC) ₈	90
JUE8F	F: TAATACGACTCACTATAGGGAAGAACCCTGTCCAAAAGG R: CCTCACCAGCCCACTCAC	(GATG) ₁₃	134
JRS57	F: TAATACGACTCACTATAGGGGTGAGTACAGAAAACGCCAACA R: TCTTGGATTTCATAAACAAATTTCAA	(CTAT) ₁₀	191
JOOW1	F: TGTA AACGACG GCCAGTGTGCTGAGTGGCTCAGATTG R: GCTAACGACCGTCTCACCAT	(GTTT) ₅	115
JYRPM	F: TGTA AACGACG GCCAGTCCCCTACGGGTCAATTCTC R: GCAGGAGATGATAGATGATAGATGA	(ATCT) ₈	164
JHU81	F: TGTA AACGACG GCCAGTTTGCTTCCACAAATCCACTT R: TGGTAGAAAGATAGATGATAGATGGA	(TATC) ₁₀	290
JVAOE	F: TTTCCCAGTCACGACGTTGAACACCAGGATGCAAGCAA R: GCAGGTGTTTGTATGTTTCCA	(AC) ₈	93
cons61_2	F: TTTCCCAGTCACGACGTTGTTACACCGAATACCATTGATTG R: CCAGGAAAGACTTGTGGAAGG	(ATAG) ₅	139
I9QFW_A_1	F: TTTCCCAGTCACGACGTTGGAAAGAGAGAGGGAGGAAGAGC R: CGTAGGACATAATAGAAGCTACACGA	(GA) ₈	190
JZOO9	F: GATAACAATTTACACAGGTGCATGTGGTTTTGTTTTATTT R: AGATGATTTTCTCCAGCC	(AC) ₁₂	115
cons363_2	F: GATAACAATTTACACAGGCCTTCAATCTCCCCATCATC R: TGGATGAGAAATTGAGAATGGA	(CATC) ₉	164
cons180_2	F: GATAACAATTTACACAGGTCACTTGTATTATGGCTGGA R: TCGGGTTTAGTTTGGTCGTT	(CA) ₁₄	205
JM2MR	F: TAATACGACTCACTATAGGGACAAGCAGCTCAGCCTCACT R: GGGTCGATGCTTTGTTTTGT	(CA) ₁₅	96
JHW0M	F: TAATACGACTCACTATAGGGACACAGAGAACAAGCAGCA R: TGTTTATCCTTTGTACCAATTCTG	(GATA) ₁₅	142
JP6XL	F: TAATACGACTCACTATAGGGCTTCAGCATACCCTTGCCA R: CCTGACAGTATTGTGTTCAAGGA	(TC) ₈	208

<i>Locus</i>	<i>Primers</i>	<i>Motivo</i>	<i>Tamanho produto de PCR</i>
JRJ7R	F: TGTA AACGACG GCCAGTTCAAGGTAGGGTT CAGACATTC R: CCTCGCACAGTCAGATGAAC	(AC) ₁₅	94
JW953	F: TGTA AACGACG GCCAGTT CACATTAGCACCCCTTTGG R: TGGTGGCAAGTATATGGGAA	(TATC) ₁₄	154
JLXBX	F: TGTA AACGACG GCCAGTAAGCAGCCTGAGCACCTAGC R: CGTTTCGTCTTTCCCTACTACTTT	(TG) ₈	241
JOUWJ	F: TTTCCCAGT CACGACGTTGTCCCCACCTGACCATTGTAT R: GGAAAGGTAGGTGGTAGGAAA	(CA) ₁₃	94
cons468_2	F: TTTCCCAGT CACGACGTTGCCACACTGCTGTTGAGGAAA R: TACCTTTTCGGTGGAATGC	(TCCA) ₁₁	155
JL059	F: TTTCCCAGT CACGACGTTGACTGTTTTAAGTGCTTTCCACAT R: GCACAACTACATGCACACTCA	(GT) ₈	244
JXUQT	F: GATAACAATTT CACACAGGTCCTTTTCTATGGCTGACAACA R: TCCTTTTCTATGGCTGACAACA	(AC) ₁₂	93
I8R2A	F: GATAACAATTT CACACAGGGGCGACCTCAGTACTTGGTAA R: GGCGACCTCAGTACTTGGTAA	(TAGA) ₉	133
JZ99L	F: GATAACAATTT CACACAGGGGCTTCCCTGTCATCAGCAGT R: GCTTCCCTGTCATCAGCAGT	(CA) ₆	173
JMVTK	F: TAATACGACTCACTATAGGGAGCAGGATAAACACATAGACACAGA R: TTTAAAGTCAATTTGATTACAATGTCC	(AC) ₁₉	102
JL1LI	F: TAATACGACTCACTATAGGGCTTCACCACTAGGCCAAACC R: AGCATCCTAACAGTGCCTGG	(ATCC) ₈	155
JI8ZW	F: TAATACGACTCACTATAGGGATTCAATATTAGCTTCACTGAGTTTC T R: GGTTGCAAAGGTGTATTAGTCAA	(TATC) ₅	240
JVHON	F: TGTA AACGACG GCCAGTTAAATTACTGGCCCAGAGGG R: AACATGGCTGCCAGGACT	(CA) ₈	91
JP21V	F: TGTA AACGACG GCCAGTTCTTTGTGGGGGACATGATT R: GTCCCTTCCTAGTGGGTGGT	(GA) ₁₃	132
JE6FO	F: TGTA AACGACG GCCAGTGTTCACCACAATGCACACC R: TGCATTGTATTTCTCTTGGA	(CTAT) ₁₀	171
JPIYU	F: TTTCCCAGT CACGACGTTGCCTTTCCCTTCCCAAGCTAA R: GCCAACAATCTTCAGTAACACG	(TG) ₆	99
JR6KD	F: TTTCCCAGT CACGACGTTGCCAGAAATGAGAAGAGATGAAAA R: TTGTTCTTTGTATTCTACCTCG	(AG) ₉	142
JJKXJ	F: TTTCCCAGT CACGACGTTGTCTATGTACATTTTCCATCGCA R: TGTTTGCCAAATCATTATACCA	(TG) ₅	190
JZFWC	F: GATAACAATTT CACACAGGTCATGTGTCTTCTAATGGTTCCC R: TCATGTGTCTTCTAATGGTTCCC	(TG) ₆	97
JUTGV	F: GATAACAATTT CACACAGGCCTCTTTTCCTCCCTCCATC R: CCTCTTTTCCTCCCTCCATC	(GA) ₇	139
JIMU9	F: GATAACAATTT CACACAGGATACAGACAACACATGCGGG R: ATACAGACAACACATGCGGG	(TG) ₅	190
JZP7C	F: TAATACGACTCACTATAGGGTTTAGGAGGTCTGCGTTCA R: CTTTCTAAGACAGAGAAGGACGG	(AC) ₁₁	90
JODSW	F: TAATACGACTCACTATAGGGTGAGGATTTAATGAGCTGAGAAC R: TCACCAGCACTAAGATGTAAGACG	(AC) ₇	140
JOAGM	F: TAATACGACTCACTATAGGGAGTGTAGGGAAAATGTGAAATTGG R: TGTTTTAAAGGCCATATAGCGAA	(TG) ₅	190
JQDO4	F: TGTA AACGACG GCCAGTACCAGTACTTAAGTCTAGAAATGGCT R: TATTGCATTCCCACAGCTT	(AC) ₇	94
cons542_2	F: TGTA AACGACG GCCAGTGAAGAAGAGCAAAGGGAAACC R: GACAGTACCCTTCGTTGGAG	(AG) ₉	142
JM23Y	F: TGTA AACGACG GCCAGTCTCCTCTCTCACTGTGCCAA R: AAAGCAGACAGCAAGTGCAA	(CA) ₅	199

Vinte e nove indivíduos da Fazenda Jatobá foram amplificados em multiplexes.

Um indivíduo foi excluído das análises, pois não apresentou resultado positivo de amplificação para a maioria dos *loci* devido à má qualidade do DNA (JB125). Nas amostras museológicas e do Ceará não foi possível amplificar

nenhum dos marcadores e, por isso, não foram incluídas nas análises. No teste de amplificação cruzada com a espécie *T. matacus*, cinco dos 25 *loci* foram amplificados com sucesso, e apenas um alelo diferente dos observados na população de *T. tricinatus* da Fazenda foi encontrado (tabela 9; anexos).

Tabela 5: Microssatélites que foram amplificados em *T. tricinatus* agrupados em multiplexes. Na representa o número de alelos por *locus* observado nas análises.

Multiplex	Locus	Primer F	Primer R	Motivo	Na
1	I9PM7	TCTACCTACCTACGTACCTACCTGC	TGGTGTGAGCATGTGTAGCA	CCTA	1
	I6QJJ	AGAATTAGAGGAGAATGGATGTAGC	CATTTTCGAGTATGCTGTTGTATACCT	AC	1
	I7XGS	CACCAAGTCTTCGCACTCTG	GATGGAGGGATAGACGGACA	TCCA	1
	JBYMS	CAGGATTAAGTGTTCAAGGAGCA	CAACTTTCTGTGTCATCTGTTTATCA	AGAC	1
	JUE8F	AAGAACCCCTGTCCAAAAGG	CCTCACCAGCCCCTCAC	GATG	1
	JM2MR	ACAAGCAGCTCAGCCTCACT	GGGTCGATGCTTTGTTTTGT	CA	1
	JP6XL	CTTCAGCATACCCTTGCCA	CCTGACAGTATTGTGTTCAAGGA	TC	1
	JYK77	TCTGTGCATCTATCAAGCCA	GATGGACAGACGGATGGAT	ATCT	1
	JW24A	GGGTATGGGATGAATCTCATGTA	TATGGCATAGCTCATATTATTGGG	AC	1
2	cons115_3	TGGCTTAGAGGAGGCACTTG	AGAAATTTTGACCAGACCACG	ATCC	1
	JJKXJ	TCTATGTACATTTTCCATCGCA	TGTTTGCCAAATCATTATACCA	TG	1
	JE4RS	AGAGAAATGCCAGGGGATG	CCATCAACATCCATCTATCCA	GATG	1
	JZRX8	CGATGCACACTTTTGTGTTCT	TTTCTTTTCACTTTTCTGCCAA	TC	1
	JODSW	TGAGGATTTAATGAGCTGAGAAC	TCACCAGCACTAAGATGTAAGACG	AC	1
	JW953	TCACATTAGCACCCCTTTGG	TGGTGGCAAGTATATGGGAA	TATC	2
	JQDO4	TACCAGTACTTAAGTCTAGAAATGGCT	TATTGCATTCCCACCAGCTT	AC	1
	JM23Y	CTCCTCTCTCACTGTGCCAA	AAAGCAGACAGCAAGTGCAA	CA	1
3	cons468_2	CCCACTGCTGTTGAGGAAA	TACCTTTTCGGTGGAATGC	TCCA	1
	JL059	ACTGTTTTAAGTGCTTTCCACAT	GCACAACTACATGCACACTCA	GT	1
	JMN7N	ATCCATCTATCAATCCATCCAA	TCTCCGTTGTGACTTCATGC	CCAT	1
	JZOO9	TGCATGTGGTTTTGTTTTATTT	AGATGATTTTCCTCCCAGCC	AC	1
	JHW0M	ACACAGAGAACACAAGCAGCA	TGTTTATCCTTTGTACCCAATTCTG	GATA	3
	JMVTK	AGCAGGATAAACACATAGACACAGA	TTTAAAGTCAATTTGATTACAATGTCC	AC	1
	JOOW1	GTGCTGAGTGGCTCAGATTG	GCTAACGACCGTCTCACCAT	GTTT	1
	JE6FO	GTTCAACCACAATGCACACC	TGCATTGTATTTCTCTTGGCA	CTAT	1

No esforço amostral para obtenção de indivíduos de outra população realizado na Fazenda Água Azul na cidade de Pium no estado do Tocantins nenhum indício da ocorrência da espécie foi observado, apesar de a ocorrência da espécie *T. tricinctus* ter sido confirmada por moradores e trabalhadores locais.

Na análise com os indivíduos da população da Fazenda Jatobá, apenas dois *loci* se mostraram polimórficos (JW953 e JHW0M, ambos tetranucleotídeos com 14 e 15 repetições respectivamente). Esses marcadores apresentaram dois e três alelos respectivamente (Tabela 6). Trata-se de um resultado inesperado considerando a metodologia usada e o número de marcadores que foram testados.

Os resultados após o sequenciamento dos 25 *loci* confirmaram os motivos de repetição dos marcadores, exceto para dois *loci* que foram descartados das análises após essa etapa. O *locus* cons468_2 não se tratava de um microsatélite e o JYK77 mostrou ser um microsatélite imperfeito.

Com um número tão pequeno de *loci* polimórficos disponíveis, qualquer inferência sobre a história demográfica torna-se impossível utilizando tais marcadores. Sendo assim, a estimativa dos parâmetros populacionais como N_e e F não puderam ser realizadas. A fim de obter mais *loci* informativos, procuramos resgatar alguma informação dos 35 *loci* restantes que não haviam resultado em amplificações. Eles foram novamente testados em diferentes condições através de gradientes de temperatura de hibridação e reagentes. Após a utilização de diferentes condições e em várias tentativas não foi obtido sucesso na amplificação.

Figura 5: PCR's individuais realizados com os 60 *primers* previamente selecionados. Cada grupo de quatro a partir do primeiro *slot* da figura (a) corresponde a três amostras teste e um controle branco. Foram descartados os marcadores do quarto grupo por apresentar amplificação inespecífica (flecha menor) e do sexto grupo por falha na amplificação (flecha maior), por exemplo.

Tabela 6: Heterozigotes observadas (H_o) e esperadas (H_e) sob HWE e p-valor dos testes realizados para cada *locus* polimórfico encontrado. Na representa o número de alelos por *locus*.

<i>Locus</i>	Na	H_o	H_e	p-valor
JW953	2	0.43557	0.34483	0.38290
JHW0M	3	0.18182	0.17230	1.00000

4.3. ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DO DNA MITOCONDRIAL

4.3.1. Estudo da diversidade de *T. tricinatus* através da região controle

Foram analisados 386pb do gene D-loop em 23 amostras da Fazenda Jatobá e observados dois haplótipos, com apenas dois sítios (nucleotídeos) variáveis. Uma das amostras provenientes do CE (CE005) um terceiro haplótipo foi observado e apresenta, também, dois sítios de variação em relação aos outros dois haplótipos (figura 6). A amostra CE003 apresentou

resultado positivo de amplificação, porém a sequência obtida mostrou-se muito diferente dos demais haplótipos. As amostras de museu não apresentaram resultados positivos de amplificação.

Figura 6: Parte da sequência dos haplótipos encontrados para gene D-loop (três) em 24 indivíduos da espécie *T. tricinatus*, mostrando os dois sítios polimórficos observados (retângulos).

Para os 23 indivíduos da Fazenda Jatobá foram observadas diversidades haplotípica (h) de $0,4032 \pm 0,0909$ e nucleotídica (π) de $0,002084 \pm 0,001737$. Quando o indivíduo CE005 foi incluído nas análises, as diversidades aumentaram ligeiramente para $0,4529 \pm 0,0948$ e $0,002125 \pm 0,001757$ respectivamente.

4.3.2. Análise de diferentes espécies de tatus através da técnica de *barcoding*

Todas as amostras de diferentes espécies de tatus foram amplificadas e sequenciadas com sucesso, com exceção das amostras de *T. tricinatus* CE003 e de museu. A árvore filogenética obtida (figura 7) apresentou dois clados principais suportados por altos valores de *bootstrap*, um deles agrupando todas as amostras do gênero *Dasypus*.

Figura 7: Árvore filogenética de Neighbor-Joining baseada na análise do gene COI em oito amostras de tatus identificadas morfologicamente como oito espécies diferentes pelos coletores. Os números próximos aos nós representam os valores de *bootstrap* depois de 1000 replicações. A sequência de *D. kappleri* foi obtida no banco de dados do *BOLD*.

Os valores de distância genética par a par gerados podem ser observados na tabela 7 e variaram entre as espécies de 0.005 (valor encontrado entre as espécies *D. hybridus* e *D. Septemcinctus*) a 0.231 (entre amostras das subfamílias Euphractinae e Dasypodinae).

Tabela 7: Valores de distância par a par entre as oito amostras de tatus identificadas como oito espécies diferentes e a amostra de tamanduá-bandeira (*M. tridactyla*) utilizada como grupo externo. O valor em negrito representa o único valor inesperado.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>D. hybridus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
2. <i>D. septemcinctus</i>	0,005	-	-	-	-	-	-	-
3. <i>D. novemcinctus</i>	0,068	0,066	-	-	-	-	-	-
4. <i>D. kappleri</i>	0,108	0,107	0,096	-	-	-	-	-
5. <i>C. unicinctus</i>	0,184	0,180	0,218	0,186	-	-	-	-
6. <i>T. tricinctus</i>	0,199	0,200	0,181	0,185	0,176	-	-	-
7. <i>E. sexcinctus</i>	0,215	0,217	0,219	0,231	0,213	0,199	-	-
8. <i>P. maximus</i>	0,227	0,222	0,217	0,212	0,191	0,206	0,200	-
9. <i>M. tridactyla</i>	0,192	0,189	0,187	0,191	0,219	0,234	0,244	0,254

5. Discussão

5.1 SELEÇÃO DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES E ANÁLISE DE DIVERSIDADE

A partir da técnica de NGS foram gerados 18451 *reads*. Desses, 1113 fragmentos continham *loci* microsatélites agrupados em 167 segmentos homólogos apontados como ideais para o desenho de *primers*. Esses números apresentaram-se mais baixos quando comparado a outros estudos. Em um estudo com a preguiça-de-três-dedos (*Bradypus variegatus*), utilizando a mesma metodologia, Silva (2013) obteve 15127 fragmentos que continham *loci* microsatélites a partir de 60134 *reads*. Destes 15127 *loci* microsatélites, 1115 fragmentos foram apontados como ideais para o desenho de *primers*.

Esperava-se que aproximadamente 40 dos 60 marcadores selecionados fossem polimórficos. Os marcadores selecionados foram os marcadores que mais possuíam possibilidade de serem polimórficos, segundo os critérios utilizados para a escolha. Os marcadores restantes tratavam-se de trinucleotídeos, possuíam baixo número de repetições (cinco repetições ou menos), ou ambos. Sabe-se que esse tipo de marcador não costuma ser polimórfico (Temnykh *et al.*, 2001; Csencsics *et al.*, 2010). Além disso, outros fragmentos foram excluídos após teste com o programa AmplifX 1.4 (Jullien, 2005) devido a possíveis interações entre os *primers* (*self-end-primer* e *primer-dimer*).

Após testes de amplificação foram obtidos 23 *loci* de microsatélites, a partir dos 60 *loci* testados e apenas dois mostraram-se polimórficos. Esses

números mostraram-se inferiores ao que geralmente é obtido com o uso da técnica de NGS. No estudo de Curto *et al.* (2013) com uma espécie de angiosperma (*Catha edulis*), 63 pares de *primers* foram sintetizados, sendo que 46 tiveram sucesso na amplificação. Desses 46 *loci* amplificados, 27 se mostraram polimórficos. Já no estudo de Silva (2013), foram selecionados e testados 52 marcadores microssatélites, sendo que 50 se mostraram polimórficos. Essa discrepância e as comparações realizadas acima levantaram algumas questões: seria a baixa diversidade característica da população de *T. tricinatus* da Fazenda Jatobá ou ainda da espécie como um todo?; seria apenas um viés resultante da amplificação de *loci* não correspondentes a microssatélites ou a microssatélites imperfeitos?; seria uma limitação da técnica utilizada?

A fim de responder tais questões as amplificações dos 23 *loci* selecionados foram repetidas e confirmaram os resultados observados. Sendo assim, apesar da baixa diversidade, a hipótese de as reações não estarem amplificando os *loci* corretos foi descartada, pelo menos para os 23 *loci*.

A diversidade genética revelada por dois *loci* polimórficos, que possuíam somente dois e três alelos respectivamente, mostrou-se baixa quando comparada ao tatu-galinha (*D. novemcinctus*), que é uma espécie não ameaçada, com ampla distribuição e com populações grandes e não isoladas (Abba e Superina, 2010). Os estudos com essa espécie utilizaram cinco (Loughry *et al.*, 2009; Arteaga *et al.*, 2011; Arteaga *et al.*, 2012), sete (Prodohl *et al.*, 1998) e nove (Prodohl *et al.*, 1996) marcadores e possuíam grande amostragem e mais de uma população. Todos estes estudos mostraram em média, riqueza alélica (A) de 3 a 20 alelos por *locus* e heterozigotes esperadas

(He) de 0.249 a 0.790 (Prodohl *et al.*, 1996; Prodohl *et al.*, 1998; Loughry *et al.*, 2009; Arteaga *et al.*, 2011; Arteaga *et al.*, 2012). Além disso, não apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg para as populações estudadas. Como esperado, a população de *T. tricinatus* estudada, tratando-se de uma espécie ameaçada de extinção, apresentou diversidade genética intrapopulacional e riqueza alélica menores do que o encontrado para as populações de *D. novemcinctus* (tabela 6).

Os níveis de diversidade genética de espécies não ameaçadas são, em sua maioria, maiores que de espécies relacionadas ameaçadas (Frankham *et al.*, 2002; Spielman *et al.*, 2004), como observamos no caso do tatu-bola e do tatu-galinha. Em casos de espécies ameaçadas de extinção e que apresentaram baixa diversidade genética acessada através de marcadores microsatélites, a quantidade de *loci* obtidos após NGS se assemelham aos obtidos para *T. tricinatus* (Waldick *et al.* 2002; Schultz *et al.* 2009). Sendo assim, os números aqui obtidos se mostram confiáveis. No caso das baleias *Eubalaena glacialis* e *E. australis*, em um estudo com 27 marcadores microsatélites, Waldick *et al.* (2002) observaram que todos os *loci* eram polimórficos na espécie não ameaçada *E. australis*, enquanto que apenas 11 eram polimórficos na espécie ameaçada *E. glacialis*. Tanto a riqueza alélica, como a heterozigose esperada foram mais baixas para *E. glacialis* ($A = 3,2$ e $He = 0,31$) do que para *E. australis* ($A = 36,9$ e $He = 0,72$).

No caso da espécie ameaçada da foca-monge-do-havaí (*Monachus schauinslandi*), Schultz *et al.* (2009) analisaram 2409 indivíduos de oito localidades diferentes e obtiveram apenas oito marcadores polimórficos a partir de 154 microsatélites amplificados. Desses 154 marcadores, 143 foram

desenvolvidos para essa espécie, 10 foram selecionados para três espécies de lobos-marinhos da Antártica (*Leptonychotes weddellii*, *Hydrurga leptonyx* e *Lobodon carcinophagus*) e um já havia sido caracterizado. A riqueza alélica foi de 3,5 enquanto que a He foi de 0,32, sendo esses maiores que no caso do tatu-bola aqui apresentado.

No teste de desvio do HWE, ambos os *loci* polimórficos apresentam um alto p-valor, mostrando que as frequências observada e esperada não são estatisticamente distintas (tabela 6), porém, com apenas dois *loci* polimórficos não é possível concluir se a população como um todo está ou não em HWE. Mais marcadores polimórficos seriam necessários para uma análise conclusiva.

Para a estimativa de diversidade genética uma maior amostragem com outras populações de outras localidades se faz necessária. As amostras museológicas poderiam ser úteis para uma melhor avaliação da diversidade genética, porém, não puderam ser amplificadas devido à baixa qualidade de DNA que foi obtido nas extrações. Além disso, o uso de outros marcadores como SNPs, pode ser mais eficiente para análises populacionais nessa espécie.

Como a bateria de fragmentos originada por NGS foi exaustivamente explorada e não é possível recuperar mais marcadores microsatélites a partir dela, uma alternativa para estudos populacionais futuros que intento realizar é utilizar *RAD_seq* (*restriction-site-associated DNA sequencing*). É uma técnica que também usa NGS, em que é possível sequenciar pequenos fragmentos de DNA adjacentes a sítios de reconhecimento de certas enzimas de restrição (Baird *et al.*, 2008; Allendorf *et al.*, 2010). Dentre as muitas vantagens dessa técnica está o fato de ser um método rápido e com alto custo benefício para

detectar centenas de marcadores polimórficos do tipo SNP (do inglês *single nucleotide polymorphism*; polimorfismo de nucleotídeo único) genotipando muitos indivíduos simultaneamente em multiplexes (Baird *et al.*, 2008). SNP é o tipo de marcador nuclear mais abundante no genoma e sua alta densidade o torna muito eficaz para o estudo da dinâmica dos genes ao longo das gerações (Berger *et al.*, 2001; Wicks *et al.*, 2001; Stickney *et al.*, 2002; Baird *et al.*, 2008). A partir de centenas de SNPs é possível obter maior poder em abordagens de genética de populações do que a partir de uma dúzia de microssatélites, assim como estimadores de diferenciação (Coates *et al.*, 2009), migração, população (Hess *et al.*, 2011) ou atribuição de paternidade (Hauser *et al.*, 2011). Sendo assim, no futuro, pretendo utilizar essa abordagem para melhor entender a diversidade genética e a estrutura das populações de *T. trilineatus*. Para isso também é necessária maior amostragem incluindo novas populações de outras localidades. Espera-se encontrar maior variação genética e alelos diferentes em diferentes populações, assim será possível verificar se há estrutura dentro e entre as populações, conhecer a real situação do táxon a fim de avaliar prioridades para conservação.

Ainda há a possibilidade de após o uso dessa técnica, em um teste com mais populações de localidades diferentes, não haja resultados diferentes dos já encontrados até agora com os marcadores mitocondriais e microssatélites em termos de diversidade genética. Isso indicará que a baixa diversidade observada até o presente é uma característica desta espécie como um todo e não só de uma ou outra população, o que nos levará a pensar quais eventos poderiam ter ocorrido para que essa espécie tenha perdido sua diversidade

genética ao longo dos anos, o que levou a tais alelos serem fixados e/ou outros perdidos.

5.3. ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DO DNA MITOCONDRIAL

5.3.1. Estudo da diversidade de *T. tricinatus* através da região controle

Uma diversidade genética maior que a encontrada para o marcador COI, porém ainda baixa era esperada para o marcador D-loop. Esse resultado foi observado e se mostrou também coerente com os estudos utilizando os 23 marcadores microssatélites: no estudo com o marcador mitocondrial citocromo oxidase I, apenas um haplótipo foi obtido em 30 indivíduos de *T. tricinatus* da Fazenda Jatobá (Moraes *et al.*, 2012) e um indivíduo do Ceará. Já com o sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial (D-loop), que geralmente apresenta mais polimorfismos, foi possível distinguir três diferentes haplótipos em 24 indivíduos (23 da Fazenda Jatobá e um do estado do Ceará). Com os marcadores microssatélites, maior variação ainda foi obtida. Em 29 indivíduos genotipados da Fazenda Jatobá foram observados sete diferentes genótipos.

A sequência correspondente à amostra CE003, ao ser comparada com o banco de dados Genbank, através do mecanismo de busca Blast, apresentou alta similaridade (91%) com outra espécie de tatu, a *ChaetophRACTUS vellerosus*. Sendo assim, desconfia-se que possa ter havido troca de amostras por parte do coletor/doador. A possibilidade de contaminação durante a extração de DNA foi descartada já que a amostra foi processada, submetida à amplificação e sequenciamento independentemente em laboratórios diferentes (Labec e Cibio) e o mesmo resultado foi obtido. É

necessária a obtenção de uma nova alíquota da amostra para proceder às análises novamente e verificar se a amostra pertence mesmo à espécie *T. tricinctus*.

Os resultados obtidos para o D-loop indicam uma baixa diversidade quando comparada aos valores totais de diversidade, considerando mais de uma população por espécie, estimados para outros Xenarthra, como o tatu-galinha (*D. novemcinctus*; Arteaga *et al.*, 2012), o tamanduá-bandeira (*M. tridactyla*; Clozato, 2009) e a preguiça-de-coleira (*B. torquatus*; Moraes-Barros *et al.*, 2006; Lara-ruiz *et al.*, 2008). São comparáveis aos dados de diversidade observados dentro de uma população de preguiça-comum *B. variegatus* do norte da Mata Atlântica ($h = 0,5000 \pm 0,1280$ e $\pi = 0,003000 \pm 0,002000$; Bahia; Moraes-Barros *et al.*, 2006) e só são maiores que os observados em populações de *B. variegatus* do sul da Mata Atlântica ($h = 0,1000 \pm 0,0090$ e $\pi = 0,000300 \pm 0,005000$ em São Paulo e $h = 0,1110 \pm 0,0960$ e $\pi = 0,000300 \pm 0,000500$ em Minas Gerais; Moraes-Barros *et al.*, 2006), em distintas localidades para *B. torquatus* ($h = 0,1754 \pm 0,0841$ e $\pi = 0,000474 \pm 0,000713$ no norte do Espírito Santo e $h = 0$ e $\pi = 0$ no nordeste da Bahia, nordeste do Espírito Santo e Rio de Janeiro ; Lara-Ruiz *et al.*, 2008) e em estudos prévios com a preguiça anã *B. pygmaeus*, sendo essa também ameaçada de extinção (Moraes-Barros *com. Pers.*; tabela 8).

Sendo assim, pode-se inferir que a população da Fazenda Jatobá possui baixa diversidade genética, confirmada por todos os marcadores testados, como esperado. Resta saber agora se essa baixa diversidade é característica da espécie como um todo ou apenas da população estudada.

Tabela 8: Comparação dos valores de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π), número de indivíduos (N) e número de haplótipos para o gene D-loop entre a espécie *T. tricinatus* aqui estudada e outras espécies de xenartros.

Espécie	N	haplótipos	h	π	Referência
<i>T. tricinatus</i>	24	3	0,4529±0,0948	0,002125±0,001757	-
<i>D. novemcinctus</i>	138	70	0,9770±0,0050	0,029000±0,00200	Arteaga <i>et al.</i> , 2012
<i>M. tridactyla</i>	77	19	0,7139±0,0538	0,003305±0,003305	Clozato, 2009
<i>B. torquatus</i>	19	9	0,9010±0,0390	0,012000±0,007000	Moraes-Barros <i>et al.</i> , 2006
<i>B. torquatus</i>	70	6	0,5797±0,0628	0,017634±0,009354	Lara-ruiz <i>et al.</i> , 2008
<i>B. pygmaeus</i>	10	1	0	0	Moraes-Barros com. Pess.
<i>B. variegatus</i>	47	6	0,6990±0,0390	0,010000±0,006000	Moraes-Barros <i>et al.</i> , 2006

A amostra do Ceará apresentou um haplótipo para o D-loop que não é compartilhado por nenhum indivíduo da Fazenda Jatobá, porém, difere muito pouco dos outros dois haplótipos, pois foram encontrados apenas dois sítios polimórficos, o que pode sugerir que a baixa diversidade seja característica da espécie como um todo, já que o gene citocromo oxidase I possui apenas um haplótipo para os indivíduos das duas localidades (Fazenda Jatobá e Ceará). Porém, estudos com mais amostras de outras populações de outras localidades são necessários para uma análise conclusiva e estão previstos para projetos futuros.

5.3.2. Análise de diferentes espécies de tatus através da técnica de *barcoding*

A árvore filogenética obtida neste trabalho não se apresentou coerente com a filogenia já encontrada na literatura para espécies de tatus. Os gêneros *Tolypeutes*, *Priodontes* e *Cabassous* pertencem à mesma subfamília (Tolypeutinae; Gardner, 2007) e, de acordo com a análise filogenética realizada por Delsuc *et al.* (2012) através de dados moleculares, estão agrupados no mesmo clado. Esse mesmo padrão não foi observado neste trabalho, onde o

gênero *Priodontes* está agrupado com o gênero *Euphractus*, que pertence à subfamília Euphractinae. Esta diferença pode ser atribuída ao fato de que Desulc *et al.* (2012) utilizaram uma combinação de dois genes mitocondriais (não incluindo o COI) e dois éxons nucleares e analisaram espécies de todos os gêneros dentro do grupo Xenarthra, o que deve possuir maior poder informativo do que utilizar apenas o gene COI. Esse mesmo padrão foi observado por Delsuc *et al.* em diversos trabalhos onde utilizaram apenas genes nucleares (Delsuc *et al.*, 2002) ou combinações de genes nucleares e mitocondriais (Delsuc *et al.*, 2001; 2003; 2013). Utilizando apenas dois genes mitocondriais (não incluindo o COI), Shapiro *et al.* (2014) também encontraram a mesma topologia observada por Delsuc *et al.* (2012), onde o gênero *Tolypeutes* (a espécie usada foi *T. matacus*) também se encontra agrupado com o gênero *Priodontes*.

Sendo assim, provavelmente o COI não possui alto poder informativo ao nível de subfamília, o que pode ser confirmado pelo baixo valor de *bootstrap* observado na árvore suportando relações entre subfamílias (figura 7). Isso sugere que a metodologia aqui testada não seria a mais adequada para estimativa de filogenias. Uma combinação de genes nucleares e mitocondriais proporcionam filogenias com mais robustez e maior resolução. Além disso, o uso de outras metodologias para estimar filogenia, mesmo usando só marcadores mitocondriais, podem ser eficientes como Máxima Verossimilhança (Felsenstein, 1981) e Análise Bayesiana (Huelsenbeck *et al.*, 2001).

Os valores de distância interespecíficos estão de acordo com o esperado para diferenciação de espécies em mamíferos (0.02; Hebert *et al.*, 2003), com exceção do observado entre as espécies *D. hybridus* e *D.*

septemcinctus (0.005). Tal baixo valor pode ser explicado por uma eventual má identificação dos espécimes coletados e atribuídos a estas espécies. Isso pode ser devido ao fato de essas espécies terem sido consideradas uma só espécie durante muitos anos sendo separadas somente em 1939 por Hamlett. Contudo, essa confusão prevaleceu até 1979 quando Wetzel e Mondolfi produziram informações adicionais acerca dessa distinção (Gardner, 2007). Segundo a descrição de distribuição das espécies de Abba e Superina (2010), o limite sul da distribuição de *D. septemcinctus* é incerto devido à semelhança morfológica com *D. hybridus*, o mesmo ocorre com o limite norte da distribuição de *D. hybridus*, sendo esta uma área de sobreposição entre as distribuições das duas espécies. A amostra de *D. septemcinctus* foi coletada no estado de São Paulo e a de *D. hybridus* no estado do Rio Grande do Sul, portanto, é provável que ambas pertençam a espécie *D. septemcinctus*, pois a espécie *D. hybridus* não ocorre no estado de São Paulo. Sendo assim, deve ter ocorrido uma falha na identificação pelo coletor. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmação da identificação.

O tatu-bola é uma das espécies prioritárias para conservação no Brasil. O maior projeto de conservação da espécie existente hoje (PAN – Plano de Ação Nacional; MMA, 2014) propõe medidas a fim de diminuir a destruição de seu habitat, extinguir a sua caça predatória e aumentar a pesquisa e as informações em todas as áreas do conhecimento (Genética, Ecologia, Biologia, etc.). As informações contidas neste trabalho acerca da situação de uma das populações remanescentes de *T. tricinatus* do ponto de vista genético visam auxiliar projetos de conservação, como esse. A baixa diversidade genética encontrada indica a necessidade de apontar as populações remanescentes e

seus habitats como prioritários para a preservação. Além disso, demonstra a necessidade de mais estudos e maior amostragem para estabelecer medidas conservacionistas para manter a variação genética evitando depressão endogâmica e aumentando fluxo gênico, por exemplo, diminuindo impactos na viabilidade e sobrevivência da população.

6. Conclusões

- 6.1 Os dados de diversidade genética obtidos tanto com marcadores microssatélites quanto com o marcador mitocondrial D-loop corroboram estudos anteriores com o gene COI, demonstrando uma baixa diversidade genética.
- 6.2 Com o desenvolvimento de marcadores microssatélites foi possível acessar maior diversidade genética na população analisada do que através do uso de marcadores mitocondriais.
- 6.3 A baixa diversidade genética observada em todos os marcadores utilizados demonstra a necessidade de propor medidas de conservação e de apontar as populações remanescentes da espécie *T. tricinatus* como prioritárias para preservação.
- 6.4 Com um número tão pequeno de *loci* polimórficos disponíveis, não foi possível estimar efetivo populacional e nem grau de endogamia.
- 6.5 O gene COI se mostrou eficiente na diferenciação entre a maioria das espécies de tatus, porém, a filogenia não mostrou suporte significativo nas relações dentro das subfamílias, sendo a metodologia empregada não adequada para estimativa de filogenias.
- 6.6 Alguns microssatélites puderam ser genotipados na espécie congênica *T. matacus*, mostrando que tais marcadores são transferíveis.

7. Referências bibliográficas

ABBA, A. M. e VIZCAINO, S. F.. Distribución de los armadillos (Xenarthra: Dasypodidae) en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Mastozool Neotrop* 18(2): 185-206, 2011.

ABBA, A. M.; SUPERINA, M.. The 2009/2010 Armadillo Red List Assessment. *Edentata: The Newsletter of the IUCN/SSA Anteater, Sloth and Armadillo Specialist Group*, Arlington, Va, v. 2, n. 11, p.135-184, 2010.

ABDELKRIM, J; ROBERTSON, B. C.; STANTON, J. A. L.; GEMMELL, N. J.. Fast, cost-effect development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *Short Technical Reports*, v. 46, n. 3, p.185-191, 2009.

ALLENDORF, F. W.; HOHENLOHE, P. A e LUIKART, G.. Genomics and the future of conservation genetics. *Nat. Rev. Genet.* 11, p. 697–709, 2010.

ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. O. e SILVESTRE, D. in *Apoidea Neotrop. Homenagem aos 90 Anos Jesus Santiago Moure* (Melo, G. A. . & Alves-dos-Santos, I.) 305–309. Ed. UNESCO, 2003.

ARTEAGA, M. C.; MCCORMACK, J. E.; EGUIARTE, L. E.; MEDELLÍN, R. A.. Genetic admixture in multidimensional environmental space: asymmetrical niche similarity promotes gene flow in armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Evolution*, Cidade do México, v. 9, n. 65, p.2470-2480, 2011.

ARTEAGA, M. C.; PIÑERO, D.; EGUIARTE L. E. *et al.*. Genetic structure and diversity of the nine-banded armadillo in Mexico. *Journal of mammalogy*, v. 92, N. 2, p. 547-559, 2012.

AVISE, J. C.. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, London, 1994.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 18, 489–522, 1987.

BAIRD, N. A.; ETTER, P. D.; ATWOOD, T. S. *et al.*. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *Plos One*, Oregon, v. 3, n. 10, p.1-7, out. 2008.

BARRIENTOS, J. e CUÉLLAR, R. L.. Área de acción de *Tolypeutes matacus* por telemetría y seguimiento por hilos en Cerro Cortado del Parque Kaa-Iya. In “Memorias: Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonía y Latinoamérica” VI Congreso, 5–10 de Septiembre de 2004, Iquitos, Perú: 111–115, 2004.

BERGER, J.; SUZUKI, T.; SENTI, *et al.*. Genetic mapping with SNP markers in *Drosophila*. *Nat Genet* v. 29, p. 475–481, 2001.

BOCCHIGLIERI, A.. *Mamíferos de médio e grande porte em uma área alterada no Cerrado: estrutura da comunidade, sobreposição de nicho e densidade*. 120 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

BOCCHIGLIERI, A.; MENDONÇA, A. R.; HENRIQUES, R. P. B.. Composição e diversidade de mamíferos de médio e grande porte no Cerrado do Brasil central. *Biota Neotrop.*, Brasília, v. 10, n. 3, p.169-176, 23 ago. 2010.

BORISENKO, A. V.; LIM, B. K.; IVANOVA, N. V. *et al.*. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 471–9, 2008.

CAMPBELL, N. A.; REECE, J. B.; MITCHELL, L. G.. *Biology*. 5. ed. Glenview, Illinois: Benjamin Cummings, 1175 p., 1999.

CLOZATO, C. L.. Diversidade genética do Tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, Xenarthra, Mammalia) no Brasil e implicações para

sua conservação. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CLOZATO, C.. *Estrutura populacional em tamanduá-mirim (Tamandua tetradactyla Linnaeus, 1758): variação molecular em regiões genômicas neutras e sob-seleção*. 175 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

COATES, B. S.; SUMERFORD, D. V.; MILLER, N. J. *et al.*. Comparative performance of single nucleotide polymorphism and microsatellite markers for population genetic analysis. *Journal of Heredity*, v. 100, p. 556–564, 2009.

COSTA-NETO, E. M. As Interações Homem/Xenarthra: Tamanduás, Preguiças e Tatus no Folclore Ameríndio. *Actual Biol.* 22, 203–213, 2000.

CSENCICS, D.; BRODBECK, S. e HOLDEREGGER, R.. Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered Dwarf Bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. *J. Hered.* 101, p. 789–93, 2010.

CURTO, M. A.; TEMBROCK, L. R.; PUPPO, P. *et al.*. Evaluation of microsatellites of *Catha edulis* (qat; Celastraceae) identified using pyrosequencing. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 49, p.1-9, 2013.

DE JONG, W. W.. Molecules remodel the mammalian tree. *TREE* 13 (7), 270-275, 1998.

DELSUC, F.; SCALLY, M.; MADSEN, O. *et al.*. Molecular phylogeny of living xenarthrans and the impact of character and taxon sampling on the placental tree rooting. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1656–71, 2002.

DELSUC, F.; CATZEFLIS, F. M.; STANHOPE, M. J. e DOUZERY, E. J.. The evolution of armadillos, anteaters and sloths depicted by nuclear and mitochondrial phylogenies: implications for the status of the enigmatic fossil Eurotamandua. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 268:1605–1615, 2001.

DELSUC, F.; STANHOPE, M. J.; DOUZERY, E. J. P.. Molecular Systematics of Armadillos (Xenarthra, Dasypodidae): Contribution of Maximum Likelihood and Bayesian Analyses of Mitochondrial and Nuclear genes. *Molecular Phylogenetic Evolution*. 28: 261-275, 2003.

DELSUC, F.; SUPERINA, M.; TILAK, M. K. *et al.*. Molecular phylogenetics unveils the ancient evolutionary origins of the enigmatic fairy armadillos. *Mol. Phylogenetic. Evol.* 62, 673–80, 2012.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics. Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. v. 3. Chicago: The University of Chicago Press, 610 p, 1999.

ELLEGREN, H.. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews*, Uppsala, v. 5, p.435-445, jun. 2004.

EMMONS, L. H.. *Neotropical Rainforest Mammals*. A Field Guide. 2. ed. Chicago: University of Chicago Press, 281 p, 1990.

ENGELMANN, G..The phylogeny of the Xenarthra. In: Montgomery, G. (ed.) *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*. Washington , D.C.: Smithsonian Institution. 51-64, 1985.

EXCOFFIER, L. e LISCHER, H. E. L.. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Eco. Res*, Berne, v. 10: 3, p. 564-567, mar. 2010.

FEIJÓ, A. e LANGGUTH, A.. Mamíferos de médio e grande porte do Nordeste do Brasil: diversidade e taxonomia, com descrição de novas espécies. *Rev Nord Biol* 22: 3-225, 2013.

FEIJÓ, A.; GARBINO, G. S. T.; CAMPOS, B. A. T. P. *et al.* Distribution of *Tolypeutes* illiger, 1811 (Xenarthra: Cingulata) with comments on its biogeography and conservation. *Zoological Science*. 32 (1): 77-87, 2015.

FELFILI, J. M.; SILVA JÚNIOR, M. C.. *Biogeografia do bioma cerrado: estudo fisionômico na Chapada do Espigão Mestre do São Francisco*. Brasília, DF: Universidade de Brasília: Depto. de Engenharia Florestal, 152 p, 2001.

FELSENSTEIN, J.. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 368-376, 1981.

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

FRUTOS, S. D. e VANDENBUSSCHE, R. A.. Genetic diversity and gene flow in nine-banded armadillos in Paraguay. *Journal of Mammalogy* 83, 815–823, 2002.

GARDNER, A. L.. Order Pilosa. In: Wilson DE, Reeder DM (eds.) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 3 ed. Baltimore, The John Hopkins University Press, p. 98-102, 2005.

GARDNER, A. L.. *Mammals of South America: Marsupials, Xenarthrans, Shrews and Bats*. University of Chicago Press, v. 1, 2007.

GAUDIN, T. J.. *The morphology of xenarthrous vertebrae (Mammalia: Xenarthra)*. Fieldiana Geol 41:1-38, 1999.

GAUDIN, T. J.. Phylogeny of the Xenarthra, in Fariña, R.A., Vizcaíno, S.F., Storch, G. (eds.), *Morphological Studies in Fossil and Extant Xenarthra (Mammalia)*: Frankfurt am Main, Seckenbergiana Biologica, 27-40, 2003.

GAUDIN, T. J.. Phylogenetic relationships among sloths (Mammalia, Xenarthra, Tardigrada): the craniodental evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 140: 255–305, 2004.

GAUDIN, T. J. e MCDONALD, G. H.. Morphology-based investigations of the phylogenetic relationships among extant and fossil xenarthans. In Vizcaino, S. F. e Loughry, W. J. (eds.): *The Biology of the Xenarthra*, 24–36. University of Florida Press, Gainesville, 2008.

GAUDIN, T. J. e WIBLE, J. R.. The phylogeny of living and extinct armadillos (Mammalia, Xenarthra, Cingulata): A craniodental analysis. In: Carrano, M.T., Gaudin, T.J., Blob, R.W., Wible, J.R. (Eds.), *Amniote Paleobiology*. The University of Chicago Press, Chicago, pp. 153–198, 2006.

GILLES, A.; MEGLECZ, E.; PECH, N. *et al.*. Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics* v. 12, 245, 2011.

GONZALEZ, S.; MALDONADO, J. E.; LEONARD, J. A. *et al.*. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular Ecology*, 7, 47–56, 1998.

GUIMARÃES, M. M.. *Área de vida, territorialidade e dieta do tatu-bola Tolypeutes tricinctus (Xenarthra, Dasypodidae), num cerrado do Brasil Central*. 1997. Tese (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 1997.

HALL, T.. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98, 1999.

HALLSTRÖM, B. M.; KULLBERG, M.; NILSSON, M. A. e JANKE, A.. Phylogenomic Data Analyses Provide Evidence that Xenarthra and Afrotheria Are Sister Groups. *Mol. Biol. Evol.* 24 (9), 2059–2068, 2007.

HAUSER, L.; BAIRD, M.; HILBORN, R. *et al.*. An empirical comparison of SNPs and microsatellites for parentage and kinship assignment in a wild sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) population. *Mol. Ecol. Resour.* 11 Suppl 1, p. 150–61 2011.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. e de WAARD, J. R.. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* v. 270, p. 313–21, 2003.

HESS, J. E., MATALA, A. P. e NARUM, S. R., Comparison of SNPs and microsatellites for fine-scale application of genetic stock identification of Chinook salmon in the Columbia River Basin. *Molecular Ecology Resources*, 11: 137–149, 2011.

HUELSENCECK, J. P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R. e BOLLBACK, J. P.. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*. 294: 2013-2314, 2001.

JULLIEN, N.. Amplifx Version 1.3. 6. URL <http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX6-Home-page>, 2005.

KALTHOFF, D. C.. Microstructure of dental hard tissues in fossil and recent xenarthrans (Mammalia: Folivora and Cingulata). *Journal of Morphology* 272: 641–661, 2011.

KAPLINSKI, L.; ANDRESON, R.; PUURAND, T. e REMM, M.. MultiPLX: automatic grouping and evaluation of PCR primers. *Bioinformatics* 21, 1701-1702, 2005.

KIERSTEIN, G.; VALLINOTO, M.; SILVA, A. *et al.*. Analysis of mitochondrial D-loop region casts new light on domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 30:2, 308-324, 2004.

KIM, K-I.; YANG, Y-H.; LEE, S-S. *et al.*. Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Genetics*. 30: 2, 102–108, 1999.

KIM, K-I.; LEE, J-H.; LI, K. *et al.*. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Genetics*. 33:1, 19–25, 2002.

ASHTON, K. G. e QUEIROZ, A.. Molecular Systematics of the Western Rattlesnake, *Crotalus viridis* (Viperidae), with Comments on the Utility of the D-Loop in Phylogenetic Studies of Snakes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 21:2, 176–189, 2001.

LARA-RUIZ, P. e CHIARELLO, A.. Life-history traits and sexual dimorphism of the Atlantic forest maned sloth *Bradypus torquatus* (Xenarthra: Bradypodidae). *Journal of Zoology*, London. V. 267, p. 63-73, 2005.

LOUGHRY, W.; TRUMAN, R. W.; MCDONOUGH, C. M. *et al.*. Is leprosy spreading among nine-banded armadillos in the southeastern United States? *Journal Of Wildlife Disease*, Georgia, v. 45, n. 1, p.144-152, 2009.

LUO, A.; ZHANG, A.; HO, S. Y. W. *et al.* Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals. *BMC Genomics* 12, 84, 2011.

MALAUSSA, T.; GILLES, A.; MEGLÉCZ, E. *et al.*. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources*, v. 11, p. 638-644, 2011.

MARINHO-FILHO, J. S.; GUIMARÃES, M. M.; REIS, M. L. *et al.*. The discovery of the Brazilian three-banded armadillo in the Cerrado of Central Brazil. *Edentata*, Arlington, Va, v. 3, p.11-13, 1997.

MARINHO-FILHO, J. S.; RODRIGUES, F. H. G.; JUAREZ, K. M. The Cerrado mammals: diversity, ecology, and natural history. In: OLIVEIRA, P. S. ; MARQUIS, R. J. (Eds.). The Cerrados of Brazil. New York: Columbia University Press, p. 266-284, 2002.

MARINHO-FILHO, J. S. e REIS, M. L.. *Tolypeutes tricinctus* Linnaeus 1758. In: *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*, Ministério do Meio Ambiente (ed.), pp. 709–710. MMA, Brasília, Brazil, 2008.

MARINI-FILHO, O. J.; GUIMARÃES, M. M.. Comportamento Sexual de Tatu-Bola (*Tolypeutes tricinctus*, Dasypodidae). *Edentata*, Brasília, DF, v. 1, n. 11, p.76-77, 2010.

MIRANDA, F.; MORAES-BARROS, N.; SUPERINA, M; e ABBA, A.M.. *Tolypeutes tricinctus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 29 July 2014.

MMA. Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a Conservação do Tatu-bola – Portaria MMA nº 56, de 22 de Maio de 2014. Ministério do Meio Ambiente, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

MORAES, H. T.; CLOZATO, C. L.; MORGANTE, J. S. e MORAES-BARROS, N.. *Dna barcoding*: estimativa da diversidade genética e identificação molecular em espécies de xenartros. *XV Congresso Latinoamericano de Genética*, Rosário, Out. 2012.

MORAES-BARROS, N. e MORGANTE, J. S.. A simple protocol for the extraction and sequence analysis of DNA from study skin of museum collections. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 1181–1185, 2007.

MORAES-BARROS, N.; SILVA, J. A. B.; MIYAKI, C. Y. e MORGANTE, J. S.. Comparative phylogeography of the Atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*). *Genetica*, vol. 126, no. 1-2, p. 189-198, 2006.

MORAES-BARROS, N. e ARTEAGA, M. C.. Genetic diversity in Xenarthra and its relevance to patterns of Neotropical biodiversity. *Journal of Mammalogy*. No prelo.

MORITZ, C.; DOWLING, T. E. e. BROWN. W. M.. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-292, 1987.

MORITZ, C.. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary oricesses that sustein it. *Syst. Biology* 51: 238-254, 2002.

MURPHY, W. J.; EIZIRIK, E.; JONHSON, W. E. *et al.*. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature* 409: 614–618, 2001.

NOSS, A. J.; CUÉLLAR, E. S. e CUÉLLAR, R. L. S.. Hunter self-monitoring as a basis for biological research: data from the Bolivian Chaco. *Mastozool Neotrop* 10: 49-67, 2003.

NOWAK, R. M.. *Walker's Mammals of the World*. v. 1. 6. ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 836 p, 1999.

OETTING, W. S.; LEE, H. K.; FLANDERS, D. J. *et al.*. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30,450–458, 1995.

OLIVEIRA, T. G.. The Brazilian tree-banded armadillo *Tolypeutes tricinctus* in Maranhão. *Edentata* 2:18-19, 1995.

PATTERSON, B. e PASCUAL, R.. The fossil mammal fauna of South America. *In: Keast A, Erk FC, Glass B, eds. Evolution, mammals, and southern continents*. Albany, NY: State University of New York Press, 247–309, 1972.

PATTERSON, B.; SEGALL, W.; TURNBULL, W. D. e GAUDIN, T. J.. The ear region in xenarthrans (= Edentata, Mammalia). Part II. Pilosa (sloths, anteaters), palaeonodons, and a miscellany. *Fieldiana, Geology n.s.* 24: 1–79, 1992.

PRODÖHL, P. A.; LOUGHRY, W. J.; MCDONOUGH, C. M. *et al.*. Genetic maternity and paternity in a local population of armadillos assessed by microsatellite DNA markers and field data. *The American naturalist*, v.151, p.7–19, 1998.

PRODÖHL, P. A.; LOUGHRY, W. J.; MCDONOUGH, C. M. *et al.*. Molecular documentation of polyembryony and the micro-spatial dispersion of clonal sibships in the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, v.263, p.1643–9, 1996.

ROSE, K. D.; EMRY, R. J. e GINGERICH, P. D.. Xenarthra and Pholidota. In Rose, K. D. e Archibald, J. D. (eds.): *The Rise of Placental mammals. Origins and Relationships of the Major Extant Clades*, 106–126. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2005.

SANTOS, I. B.. Bionomia, distribuição geográfica e situação atual do tatu-bola *Tolypeutes tricinctus* (Linné, 1758) (Dasypodidae, Mammalia) no Nordeste do Brasil. Master's thesis, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, 1993.

SANTOS, I. B.; FONSECA, G. A. B.; RIGUEIRA, S. E. e MACHADO, R. B.. The rediscovery of the Brazilian three-banded armadillo and notes on its conservation status. *Edentata* 1: 11-15, 1994.

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

SCHULTZ, J. K.; BAKER, J. D.; TOONEN, R. J.; e BOWEN, B. W.. Extremely low genetic diversity in the endangered Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*). *J. Hered.*, p.100, 25–33 2009.

SHAPIRO, B.; GRAHAM, R. W. e LETTS, B.. A revised evolutionary history of armadillos (*Dasypus*) in North America based on ancient mitochondrial DNA. *Boreas* 44, 14–23, 2015.

SILVA, J. M. C. e OREN, D.C.. Observations on the habits and distribution of the Brazilian three-banded armadillo *Tolypeutes tricinctus*, a threatened caatinga endemic. *Mammalia* 57: p149-52, 1993.

SILVA, S. M.. *Contribuições para a conservação de Bradypus variegatus (preguiça comum): Processos históricos e demográficos moldando a diversidade nuclear*. 180 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SOLÉ-CAVA, A. M.. Biodiversidade molecular e genética da conservação. *Biologia Molecular e Evolução*, Rio de Janeiro, p.172-187, 2001.

SPIELMAN, D.; BROOK, B. W. e FRANKHAM, R.. Most factors are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:15261–15264. 2004.

STICKNEY, H. L.; SCHMUTZ, J.; WOODS, I. G. *et al.*. Rapid mapping of zebrafish mutations with SNPs and oligonucleotide microarrays. *Genome Res* 12: 1929–1934, 2002.

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

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.*. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAULMAN, J. F. e ROBBINS, L. W.. Range expansion and distributional limits of the nine-banded armadillo in the United States: an update of Taulman & Robbins (1996). *J. Biogeogr.* 1626–1630, 2014.

TEMNYKH, S.; DeCLERCK, G.; LUKASHOVA, A. *et al.*. Computational and experimental analysis of microsatellites *in* rice (*Oryza sativa* L.): *frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential*. *Genome Res.* 11, p. 1441–52 2001.

TEMPLETON, A. R.. *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. Hoboken: John Wiley & Sons, 705 p., 2006.

VÄLI, Ü.; EINARSSON, A.; WAITS, L. e ELLEGREN, H.. To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Molecular Ecology*, Uppsala, p.3808-3817, 25 jun. 2008.

VAN DIJK, M. A. M.; PARADIS, E.; CATZEFLIS, F. e DeJONG, W. W.. The Virtues of Gaps: Xenarthran (Edentate) Monophyly Supported by a Unique Deletion in Alpha A-crystallin. *Systematic Biology* 48: 94-106, 1999.

VIZCAÍNO, S. F.. The teeth of the ‘toothless’: novelties and key innovations in the evolution of Xenarthrans (Mammalia, Xenarthra). *Paleobiology* 35: 343–366, 2009.

WALDICK, R. C.; KRAUS, S.; BROWN, M. e WHITE, B. N.. Evaluating the effects of historic bottleneck events : an assessment of microsatellite variability in the endangered , North Atlantic right whale. *Mol. Ecol.* p. 2241–2249, 2002.

WECKWORTH, B. V.; MUSIANI, M.; DECESARE, N. J. *et al.*. Preferred habitat and effective population size drive landscape genetic patterns in an endangered species. *Proc. R. Soc. B.* 280: 20131756, 2013.

WETZEL, R.M.; GARDNER, A.L.; REDFORD, K.H.; EISENBERG, J.F.; Order Cingulata. In "Mammals of South America. Volume 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews and Bats" Ed by AL Gardner,. University of Chicago Press, Chicago, USA, pp. 128-156, 2007.

WICKS, S. R.; YEH, R. T.; GISH, W. R. *et al.*. Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat Genet* v. 28 p. 160–164, 2001.

WILSON, A. C.; CANN, R. L.; GEORGE, M. *et al.*. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of Linnean Society* 26: 375-400, 1985.

WILSON, D. e REEDER, D.. *Mammal Species of the World*. Johns Hopkins University Press, 2, 142 pp. (Avaible from John Hopkins University Press, 1-800-537-5487 or (410) 516-6900 <http://www.press.jhu.edu/>), 2005.

WRIGHT, S.. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.*, 15, 323–354, 1951.

Anexos

Tabela 9: Relação dos genótipos de cada indivíduo para cada *locus* selecionado. Alguns não puderam ser determinados (-).

Amostra	<i>Locus</i>															
	I9PM7		JW24A		I6QJJ		JUE8F		JM2MR		JP6XL		I7XGS		JBYMS	
JBSN	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB20	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB21	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB82	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB83	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB84	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB88	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB91	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB119	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB122	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB123	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB124	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB126	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB127	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB128	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB129	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB133	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB137	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB138	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB139	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB140	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB143	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB144	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB146	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB147	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB148	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB149	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB158	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
JB2932	107	107	249	249	160	160	158	158	111	111	229	229	131	131	190	190
Tmat	107	107	-	-	-	-	158	158	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostra			Locus													
	cons115_3		JE4RS		JZRX8		JW953		JJKXJ		JODSW		JQDO4		JM23Y	
JBSN	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB20	152	152	176	176	108	108	167	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB21	152	152	176	176	108	108	167	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB82	152	152	176	176	108	108	167	167	211	211	159	159	110	110	217	217
JB83	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB84	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB88	152	152	176	176	108	108	167	167	211	211	159	159	110	110	217	217
JB91	152	152	176	176	108	108	167	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB119	152	152	176	176	108	108	167	167	211	211	159	159	110	110	217	217
JB122	152	152	176	176	108	108	167	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB123	152	152	176	176	108	108	167	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB124	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB126	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB127	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB128	152	152	176	176	108	108	167	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB129	152	152	176	176	108	108	167	167	211	211	159	159	110	110	217	217
JB133	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB137	152	152	176	176	108	108	167	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB138	152	152	176	176	108	108	167	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB139	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB140	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB143	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB144	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB146	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB147	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB148	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB149	152	152	176	176	108	108	167	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB158	152	152	176	176	108	108	167	171	211	211	159	159	110	110	217	217
JB2932	152	152	176	176	108	108	171	171	211	211	159	159	110	110	217	217
Tmat	-	-	-	-	108	108	171	175	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostra			Locus											
	JMN7N		JOOW1		JZOO9		JHW0M		JL059		JMVTK		JE6FO	
JBSN	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB20	-	-	134	134	-	-	-	-	-	-	116	116	-	-
JB21	230	230	134	134	137	137	157	161	257	257	116	116	188	188
JB82	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB83	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB84	-	-	134	134	137	137	-	-	-	-	116	116	188	188
JB88	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB91	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB119	-	-	134	134	137	137	-	-	257	257	116	116	188	188
JB122	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB123	-	-	134	134	137	137	-	-	-	-	116	116	-	-
JB124	-	-	134	134	137	137	-	-	-	-	116	116	-	-
JB126	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB127	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB128	230	230	134	134	137	137	157	161	257	257	116	116	188	188
JB129	230	230	134	134	137	137	157	165	257	257	116	116	188	188
JB133	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB137	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB138	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB139	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB140	230	230	134	134	137	137	157	161	257	257	116	116	188	188
JB143	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JB146	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB147	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB148	-	-	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB149	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB158	230	230	134	134	137	137	157	157	257	257	116	116	188	188
JB2932	230	230	134	134	137	137	-	-	257	257	116	116	188	188
Tmat	-	-	134	134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-