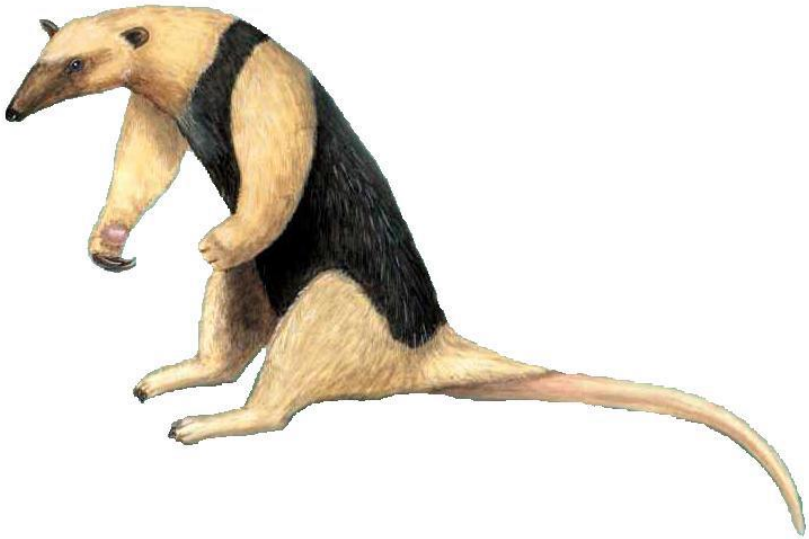
Camila Clozato Lara

Estrutura populacional em tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758): variação molecular em regiões genômicas neutras e sob-seleção.



São Paulo

2014

Estrutura populacional em tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758): variação molecular em regiões genômicas neutras e sob-seleção.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia, Genética.

Orientador:

Prof. Dr. João Stenguel Morgante

Co-orientadores:

Dra. Nadia de Moraes-Barros

Prof. Dra. Simone Sommer

São Paulo

2014

Clozato, Camila L.
Estrutura populacional em tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758): variação molecular em regiões genômicas neutras e sob-seleção.
175 pp.

Tese de Doutorado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Estruturação genética 2. Microssatélites 3. Complexo Principal de Histocompatibilidade 4. *Tamandua tetradactyla* I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).
Orientador(a)

Agradecimentos

Foram quatro anos de muitas mudanças. Agradeço ao doutorado a profunda transformação que sofri como pessoa. Pela primeira vez morei sozinha, aprendi a viver sem a família que me acompanhava até então, e que se tornou, seja pela distância ou pela saudade, cada vez mais querida.

Aos poucos, me tornei mais crítica, mais consciente do mundo ao meu redor, e mais grata pela vida que eu tive a oportunidade de experimentar. Em algum grau, tudo isso se relaciona com o doutorado, que direta e indiretamente me expôs a diversas questões. Eu nunca soube, por exemplo, que a pizza de São Paulo era tão melhor assim que a de Minas Gerais! Mas mantenho minha opinião sobre o pão de queijo.

Tenho, portanto, muitos agradecimentos a fazer. O primeiro, ao meu orientador Prof. Dr. João Morgante, que me recebeu em seu laboratório tão gentilmente, e me permitiu compartilhar de seu vasto conhecimento como pesquisador e de sua experiência de vida.

Agradeço às co-orientadoras Dra. Nadia Moraes-Barros e Prof. Dra. Simone Sommer que auxiliaram muito na elaboração das ideias e na discussão formal dos trabalhos, melhorando significativamente a qualidade dos resultados apresentados.

O trabalho não teria sido possível sem a colaboração de instituições e pesquisadores que cederam amostras ou auxiliaram nos trabalhos de campo. Agradeço às equipes dos CETAS no nordeste (BA, AL, PE, PB, CE), ao biólogo Anderson Feijó da Universidade Federal da Paraíba, à equipe do Ecopoint em Fortaleza, a Prof. Dra. Flávia Barros da Universidade Federal do Alagoas, à equipe da Pousada Aguapé no Pantanal, a Claudia Madella, ao Prof. Dr. Eduardo Eizirik e Henrique Figueiró da Pontíficia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, à Dra. Gilda Tebet do Museu de Historia Natural Capão da Imbuia em Curitiba, ao Dr. Hélio Boudet do Museu de Biologia Mello Leitão em Santa Teresa, ao Dr. Marcelo Graipel da Universidade Federal de Santa Catarina, Stella Franco e Dr. João Oliveira do Museu Nacional do Rio de Janeiro, ao Dr. Mário de Vivo do Museu de Zoologia da USP, ao Dr. Fabrício Santos da Universidade Federal de Minas Gerais. Agradeço à Flávia Miranda e José Abílio Ohana não só pelas valiosas amostras, mas também pelas frutíferas discussões e profundo interesse compartilhado pelo estudo do tamanduá-mirim.

Agradeço à bolsa de doutorado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e pela bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) realizado no Instituto de Pesquisa em Zoologia e Vida Selvagem (IZW) de Berlim, Alemanha.

Agradeço aos amigos do LABEC que me ajudaram em diversos momentos: Rodrigo Francisco, Maria Helena Maia, Anna Carolina Milo, Helena Tadiello, Márcia Pinceratti, Juliana Ferreira, Ana Pavan, Gisele Dantas, Bárbara Bitarello, Gabriela Cardoso, e Sofia Silva, que além de amiga, se tornou mais uma orientadora , me estimulando grandemente quando eu mais precisei.

Agradeço à minha família pelo apoio, carinho e suporte nas horas de neurose! Dona Maria José e Sr. Ermelindo (pra sempre), Renata (alguns conhecem como Vânia), Júlia, Maria Izabel, Marcelo, Rose, Pedro e Wilian, sou grata pela companhia de vocês ao longo desses anos.

Em 2009, na minha dissertação de mestrado, agradeci o apoio e companheirismo do meu então namorado, Caetano Oliveira. Hoje, após uma longa jornada juntos, entre tantos compromissos, viagens, despedidas, mudanças e reencontros, nos tornamos uma família. Embora seja hoje meu marido, eu o agradeço por ser meu eterno namorado, e sou grata pelo mesmo companheirismo e apoio de quando começamos a caminhar juntos, há quase dez anos atrás.

Índice

Resumo ---------- Página 7

Abstract ---------- Página 9

Introdução Geral ---------- Página 11

Objetivos ---------- Página 30

Capítulo 1 - Amostras históricas e não-invasivas: um estudo de caso de erros de genotipagem em microssatélites isolados *de novo* para o tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla* L., Pilosa). ---------- Página 33

Capítulo 2 - Diversidade genética e estrutura populacional de um mamífero amplamente distribuído da América do Sul, o tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*, Pilosa). ---------- Página 60

Capítulo 3 - Diversidade de sequências e sinais de seleção no gene DRB de MHC Classe II do tamanduá mirim (*Tamandua tetradactyla*) ao longo de diferentes biomas. ---------- Página 101

Conclusão Geral ---------- Página 141

Anexos ---------- Página 146

Resumo

Este trabalho teve como objetivo principal descrever a diversidade genética e identificar a estrutura populacional de populações de tamanduá-mirim distribuídas ao longo dos biomas brasileiros através do uso de ferramentas de genética de populações e do acesso a regiões neutras e adaptativas do genoma da espécie. A amostragem de indivíduos de tamanduá-mirim é complicada pela difícil detecção do animal em trabalhos de campo, pela sua complicada captura e manipulação. Assim, fez-se necessário o uso de espécimes de museu e de amostras não-invasivas. A fim de validar o uso das mesmas para a genotipagem confiável de oito locos de microssatélites desenvolvidos para a espécie foi utilizado um método de padronização da qualidade das amostras (Índice de Qualidade, *QI*) e estimativa dos erros de genotipagem. Foi observada uma qualidade superior das amostras não invasivas (N=19) em relação às peles de museu (N=138). Foi possível também eliminar amostras com desempenho ruim (*QI*<0.7 e sucesso de amplificação maior que 75%), e garantir a confiabilidade dos resultados de microssatélites das amostras que permaneceram no estudo para análises posteriores.

Devido à grande área de distribuição da espécie de forma contínua, se tornou complicado traçar populações pré-definidas. Assim, a abordagem da genética da paisagem foi a ferramenta mais apropriada para o estudo da estrutura de populações em *T. tetradactyla* (N=176). Comparativamente, duas abordagens foram usadas: agrupamento de indivíduos pelo critério de proximidade geográfica, designado aqui como *a priori* (20 populações), e análises baseadas no indivíduo, sem informação prévia de agrupamento populacional, referida no capítulo como *a posteriori* (quatro transectos testados). Foram encontrados níveis de diversidade moderados (média de 11.38 alelos por lóco) e poucas

evidências de estruturação entre populações das localidades amostradas (K=2 na maioria dos testes). Os indivíduos que mostraram maior diferenciação foram originados da Floresta Amazônica. Esta região também demonstrou maior diversidade genética (riqueza alélica e heterozigosidade esperada) que as outras. Por outro lado, populações distribuídas ao longo da Mata Atlântica e regiões adjacentes demonstraram um padrão de isolamento por distância. Populações do Brasil central (Cerrado e Pantanal) não demonstraram diferenciação em relação às demais.

Finalmente, foi estudada a variação genética adaptativa da espécie através da diversidade do gene *DRB* do complexo MHC. Esta família gênica codifica proteínas envolvidas no reconhecimento de antígeno e ativação da resposta imune adaptativa, e são regulados por seleção natural, especialmente por pressão seletiva dirigida por patógenos. É esperado que a diversidade de patógenos seja distinta nos biomas brasileiros, sendo os ambientes florestais mais biodiversos neste quesito do que ambientes da Diagonal Seca, o que representa pressões seletivas diferentes. Assim, foi investigada a diversidade do gene *DRB* éxon 2 em indivíduos (N=65) dos diferentes biomas brasileiros através de sequenciamento de nova geração (454 GS Junior), e os resultados de distribuição dos alelos foram comparados com os microssatélites. Foi encontrada uma alta diversidade (60 alelos no nível de aminoácido e 70 alelos no nível de nucleotídeos) e assinaturas claras de seleção positiva no gene (dN/dS=2.94). Maior riqueza alélica e proporção de alelos privados foram encontradas em biomas florestados, especialmente na Floresta Amazônica. Além disso, os marcadores neutros (microssatélites), demonstraram padrões similares ao DRB, revelando a força de eventos demográficos e deriva genética que também moldaram os padrões de diversidade deste gene do MHC.

Abstract

This work aimed to describe the genetic diversity and population structure of populations of the lesser anteater distributed along Brazilian biomes through population genetic tools, accessing neutral and adaptive genomic regions of the species.

Sampling lesser anteater individuals is complicated due to infrequent detection of the animal in field works, its complicated capture and manipulation. Thus, it was necessary to use museum specimens and noninvasive samples. To validate these samples for the reliable genotyping of eight microsatellite loci developed for the species, a standardization method of the quality of samples (Quality Index, QI) and genotyping errors was used. A superior quality of noninvasive samples (N=19) compared to study skins (N=138) was observed. It was also possible to eliminate samples with a bad performance (QI<0.7 and amplification success higher than 75%), and thus guarantee the reliability of microsatellites results for samples kept in further analysis.

Due to the great and continuous distribution area of the species, it becomes difficult to delineate predefined populations. Thereby, landscape genetics approach was a better suited tool for studying the population structure of *T. tetradactyla* individuals (N=176). Comparatively, two approaches were used: grouping of individuals by a geographical proximity criterion, designated here as *a priori* (20 populations), and analysis based on individuals, without previous information of population grouping, referred here as a posteriori (four transects tested). Moderate levels of diversity were found (average of 11.38 alleles per locus), and few evidences for structuring between populations of the sampled localities (K=2 in most tests). The individuals showing the major differentiation were

originated from the Amazon Forest. This region also demonstrated higher genetic diversity (allelic richness and expected heterozygosity) than others. By the other hand, populations distributed in Atlantic Forest and adjacent regions demonstrated a pattern of isolation by distance. Populations from central Brazil (Cerrado and Pantanal) did not show distinction from the others.

Finally, the adaptive genetic variation of the species was studied through DRB gene diversity, from MHC. This gene family codes for proteins involved in the antigen recognition and activation of the adaptive immune response, and are regulated by natural selection, especially by selective pressure driven by pathogens. It is expected that the pathogen diversity is distinct in Brazilian biomes, being florested biomes more diverse than dry central Brazil environments, which represents different selective pressures. Therefore, the diversity of *DRB* exon 2 gene in individuals (N=65) from different Brazilian biomes was investigated through Next Generation Sequencing (454 GS Junior), and the results of allele distributions were compared with microsatellites.

A high diversity was found (60 alleles in amino acid level and 70 in nucleotide level) and clear signatures of positive selection in *DRB* (*dN/dS*=2.94). Greater allelic richness and private allele number were found in forested biomes, especially in the Amazon Florest. Besides, neutral markers (microsatellites) demonstrated similar patterns to *DRB*, revealing the strength of demographic events and genetic drift in shaping the diversity patterns in MHC.

Introdução Geral

A diversidade genética é essencial para a continuidade das espécies na natureza componente genético é um dos parâmetros utilizados para avaliar o grau de ameaça em que uma espécie se encontra (Frankham *et al*. 2002). De fato, uma grande meta-análise de espécies de diversos táxons demonstrou que a maioria dos táxons ameaçados apresenta, concomitantemente, menor diversidade genética do que seus táxons próximos não ameaçados (Spielman *et al*. 2004). Embora a baixa diversidade genética não determine necessariamente um grau de ameaça para populações ou espécies, é um dos indicadores de alerta para propósitos futuros de conservação (Noss 1990). Trabalhos que focam em diversidade genética enfatizaram, sobretudo, a variação neutra do genoma, mas hoje em dia podemos aceder com a mesma facilidade à diversidade genética neutra e à adaptativa, como apresentado em seguida.

O estudo da variação genética ao longo da distribuição geográfica de uma espécie foi, e é ainda, extensamente explorado pela disciplina da filogeografia (Avise 2000). Originalmente dedicada ao estudo do DNA mitocondrial como marcador genético, a filogeografia expandiu grandemente nos últimos anos, incorporando análises complexas, mais integrativas, de diversificação de populações ou espécies com modelos estatísticos preditivos de teste de hipótese (Knowles 2009; Hickerson *et al*. 2010). Os marcadores genéticos como ferramenta de estudo também passaram por grande desenvolvimento. Estudos nesta área fizeram uso de polimorfismos de base única (*Single Nucleotide*

Polymorphism, SNP) em regiões codificantes e intrônicas, microssatélites, e mais recentemente, de genomas parciais ou completos (Sunnucks 2000; Davey *et al.* 2011). Ainda entre as vertentes originadas da área da filogeografia, surgiu recentemente a genética da paisagem que tem como objetivo fornecer informações sobre a interação entre as características da paisagem (como a presença de barreiras físicas à dispersão, que podem ser desde rios e montanhas até fatores menos óbvios, como gradientes de umidade no ambiente ou a presença de uma rodovia extensa) e os processos micro-evolutivos (como o fluxo gênico, a deriva genética e seleção natural dentro de uma mesma espécie; Manel *et al*. 2003). Os principais enfoques da disciplina da genética da paisagem são a detecção das descontinuidades genéticas, sem a inferência *a priori* de quais e/ou quantas são as populações, e a correlação destas com a paisagem e características ambientais. Esta abordagem pode ser útil na identificação de barreiras crípticas, que podem ser barreiras ao fluxo gênico contemporâneo entre as populações sem nenhuma causa óbvia, ou de regiões de contato secundário entre populações previamente isoladas, revelando assim uma barreira ao fluxo gênico histórica (revisado em Holderegger & Wagner 2008; Storfer *et al*. 2010).

Embora o crescimento das áreas da filogeografia e genética da paisagem tenham sido constantes a nível mundial, ainda existe um atraso no conhecimento filogeográfico de táxons da América do Sul. Particularmente em relação a mamíferos, ainda que o Neotrópico apresente uma grande riqueza de espécies, até o ano de 2008 somente cerca de 7% de todos os estudos de estruturação genética foram feitos com mamíferos sul-americanos (Beheregaray 2008). Não obstante, os estudos com táxons da América do Sul podem fornecer conhecimento sobre os processos históricos subjacentes à diversificação nesta região (por exemplo, Turchetto-Zolet *et al*. 2013). O entendimento destes processos é

de grande importância, sobretudo considerando a vasta degradação das paisagens neotropicais devido à recente ação antrópica, resultado em severa perda de hábitat (Brown & Brown 1992; Carvalho *et al*. 2009). O estudo da diversidade genética neutra é, geralmente, a primeira escolha para acessar os padrões de diversidade dos táxons dessas regiões.

Diversidade genética neutra

A teoria neutra da evolução assume que a principal força evolutiva atuando na fixação de novos alelos em uma população é a flutuação aleatória das frequências alélicas em populações finitas, geração após geração, processo conhecido como deriva genética. Assim, a maioria da variação genética intra e interespecífica é neutra com relação à seleção e, portanto, diferentes alelos de um lóco possuem o mesmo valor adaptativo, sem qualquer efeito diferenciado ou direto no *fitness* de cada individuo (descrito em Kimura 1983).

O estudo da variabilidade genética com marcadores seletivamente neutros nos permite observar padrões que podem ser explicados, por exemplo, por processos demográficos sofridos pelas populações de uma espécie ao longo do tempo, tais como migrações (medidas em fluxo gênico entre populações), efeito fundador, alterações do tamanho efectivo populacional, flutações populacionais, subdivisão de populações pelo surgimento de barreiras (vicariância), ou por efeito de isolamento por distância (Hartl & Clark 2006).

Os microssatélites, ou repetições de sequência simples, são marcadores considerados neutros em sua maioria, estão frequentemente presentes em regiões genômicas não-codificadoras ao longo de todo o genoma, e se caracterizam pela sua alta

taxa de mutação associada ao alto grau de polimorfismo de tamanho, relacionado ao número variável de seus motivos repetitivos (Tautz 1989). Os marcadores microssatélites, devido ao seu elevado grau de polimorfismo, são marcadores altamente eficientes na resolução de diversas questões a respeito da biologia das espécies (Frankham *et al.* 2002), e têm sido bastante usados para estudos de populações naturais, especialmente aqueles voltados para a conservação de espécies de mamíferos (Garner *et al*. 2005). A abrangente utilidade destes marcadores os torna uma ferramenta metodológica poderosa na inferência sobre padrões de dispersão intraespecíficos, grau de divergência entre populações, o tamanho das mesmas, a diversidade genética remanescente nelas, o grau de endogamia, assim como sobre as relações de parentesco entre indivíduos, individualização de amostras, entre outros. Assim, sua utilização pode contribuir para o melhor conhecimento de alguns aspectos da biologia destas espécies que são difíceis de estudar através de observações diretas (Balloux & Lugon-Moulin 2002, revisado em Selkoe & Toonen 2006).

Diversidade genética adaptativa

Normalmente, a maioria dos estudos acessa apenas a variabilidade neutra, onde se assume que essa variação é indicadora da variabilidade adaptativa. Entretanto, estudos apontam que a diversidade neutra pode não refletir acuradamente a diversidade genômica subjacente (Holderegger *et al*. 2006; Väli *et al*. 2008, Ljungqvist *et al*. 2010).

A variação genética que é controlada pela seleção natural é conhecida como diversidade genética adaptativa. Esta pode ser acessada através de experimentos de genética quantitativa ou por marcadores adaptativos que advêm de lócos de genes funcionais, cuja

variação alélica tem consequências no *fitness* de indivíduos (Sommer 2005; Holderegger *et al*. 2006).

Populações que apresentam baixa diversidade em marcadores genéticos neutros podem apresentar uma diversidade também diminuída em regiões genômicas importantes para a adaptação a mudanças ambientais, tais como alterações nas comunidades de patógenos ou mudanças climáticas. Muitos genes são potencialmente responsáveis pela habilidade evolutiva de resposta às mudanças ambientais, como genes de pigmentação ou genes do sistema imune (Höglund 2009). Exemplos de correlações positivas entre diversidade neutra e adaptativa podem ser encontrados na literatura, como foi relatado para a raposa do Ártico (*Vulpes lagopus*), que demonstrou baixa diversidade genética em suas populações continentais e insulares em microssatélites e em genes do complexo maior de histocompatibilidade (Geffen *et al*. 2007; Ploshnitsa *et al*. 2012).

De fato, os genes do complexo principal de histocompatibilidade, MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*), são exemplos clássicos de marcadores adaptativos. Constituem uma família multigênica cujos produtos são glicoproteínas de superfície celular que desempenham o importante papel de apresentar peptídeos às células T no sistema imune (Klein 1986). Este complexo de genes é composto, sobretudo, por duas subfamílias: MHC classe I e classe II. Ambas apresentam antígenos e permitem o reconhecimento de moléculas próprias e não-próprias (Acevedo-Whitehouse & Cunningham 2006). Alguns genes das classes I e II apresentam níveis extraordinários de polimorfismos sendo caracterizados por grande número de alelos de frequência intermediária e com alta ocorrência de substituições não-sinônimas dentro das regiões que codificam os sítios de ligação de antígenos (do inglês, *Antigen Binding Site* – ABS). Esse padrão é inconsistente

com um cenário de neutralidade, sugerindo a ação de seleção natural do tipo balanceadora na região (Hughes & Yeager 1998).

O uso dos genes do MHC como marcadores genéticos em organismos não-modelo tem crescido muito nos últimos anos. Alguns dos estudos visam compreender o papel da seleção e da deriva genética em moldar a diversidade das populações atuais, através da comparação de padrões revelados pelo uso de marcadores neutros, como microssatélites, e do MHC (Aguilar *et al*. 2005; Bos *et al.* 2008; Agudo *et al*. 2011). Outros estudos propõem-se a correlacionar a variação encontrada no MHC com aspectos da biologia da espécie estudada, como escolha de parceiros e reconhecimento de parentesco (Ditchkoff *et al*. 2001; Landry *et al*. 2001), ou no uso da diversidade do MHC como indicativo de viabilidade de populações de espécies ameaçadas, uma vez que estes genes estão relacionados com a resposta imune e defesa a patógenos (Langefors *et al*. 2001; Wegner *et al*. 2003).

Apesar do crescente interesse dos geneticistas de populações no complexo de genes do MHC, este é ainda pouco estudado em espécies não-modelo e o reconhecimento e caracterização dos seus alelos pode ser bastante complicado. As técnicas para detectar alelos de genes do MHC podem introduzir variações falsas (artefatos) que precisam ser identificadas e tratadas. Alguns fatores impõem dificuldades significativas na genotipagem de MHC: (i) duplicações recentes, (ii) variação no número de lócos em cada espécie e (iii) a presença de pseudogenes (Babik 2010). Apesar da existência de alguns estudos de MHC em espécies não-modelo, correlações claras sobre a diversidade nestes marcadores e seus efeitos no *fitness* de indivíduos/populações ainda não foram completamente esclarecidos

(Radwan *et al*. 2010) e as questões pendentes representam material inestimável para futuros estudos.

Pilosa: Importância histórico-evolutiva

A ordem Pilosa (Gardner 2005), linhagem das atuais preguiças arbóreas e tamanduás, juntamente com seu grupo irmão, a ordem Cingulata, os tatus, constitui a magna-ordem Xenarthra, uma das quatro linhagens basais de placentários que englobam as ordens atuais de mamíferos eutérios (Springer *et al*. 2004).

As espécies atuais de xenarthros são remanescentes de uma radiação evolutiva promovida por seu isolamento na América do Sul durante o Terciário (entre o Paleoceno e o Eoceno, cerca de 65 milhões de anos atrás), e influenciada pelas mudanças ambientais no passado (Patterson & Pascual 1972; Delsuc *et al*. 2004). Seu registro fóssil parece ser restrito ao continente americano (Delsuc *et al*. 2001). A monofilia da ordem é classicamente reconhecida, todos os pilosos fósseis e viventes exibem uma redução dental e perda do esmalte dentário (característica chave do grupo), até o extremo caso dos tamanduás, que são desdentados (Engelman 1985; Vizcaíno 2009). Apesar de ser composta por apenas 10 espécies, retêm boa parte da história evolutiva dos placentários e são, portanto, uma das prioridades para conservação da diversidade filogenética em vertebrados (Fonseca 2001). Apesar de apresentar tal importância, apenas alguns estudos foram publicados até o momento utilizando ferramentas de genética molecular, abordando, por exemplo, relações filogenéticas dentro deste e entre outros grupos de mamíferos (Arnason *et al*. 1997; De Jong 1998; Delsuc 2002), diversidade genética entre populações de uma

mesma espécie (Moraes-Barros *et al.* 2002; Moraes-Barros *et al.* 2006) ou focados em genética da conservação (Collevati *et al*. 2007; Lara-Ruiz *et al*. 2008).

Tamanduá-mirim: espécie de ampla distribuição geográfica

O tamanduá-mirim, *Tamandua tetradactyla*, também conhecido como tamanduá-de-colete, é um membro da família Myrmecophagidae, ordem Pilosa, infra-ordem Vermilíngua (animais com língua fina e alongada) (Engelman 1985). Seu gênero compreende duas espécies: *T. tetradactyla e T. mexicana*, sendo a primeira distribuída ao longo da América do Sul, leste dos Andes, e a última no sudoeste do México até oeste dos Andes. Assim, o tamanduá-mirim possui ampla distribuição geográfica, é encontrado na América do Sul da Venezuela e Trinidad ao norte da Argentina, sul do Brasil e no Uruguai (Superina *et al*. 2010, Figura 1) a elevações de até 2000 metros (Novak *et al*. 1983).

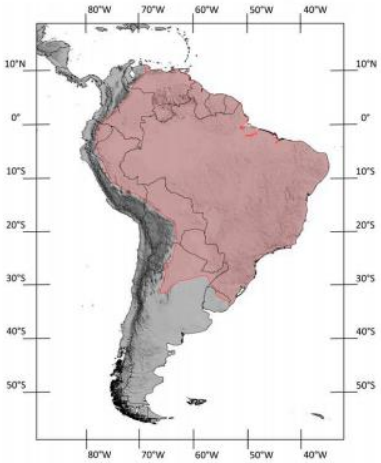


Figura 1- Mapa da distribuição atual de *Tamandua tetradactyla* na América do Sul. Extraído de Superina *et al*. 2010.

Este mamífero de médio porte, possui hábito predominantemente noturno e solitário, se alimenta de uma combinação variável de formigas e cupins dependendo da disponibilidade dessas presas no ambiente (Montgomery & Lubin 1977), com o auxílio de sua língua comprida com muco viscoso, adaptação chave de animais mirmecofágicos. Escansorial, possui uma cauda preênsil bem desenvolvida parcialmente coberta com pelagem. Embora tenha preferência por áreas florestais, é possível também encontrar tamanduás-mirins forrageando em áreas abertas de Cerrado ou vegetação rasteira (Redford, 1994), e ainda em regiões montanhosas de clima tropical (Eisenberg 1989). Os tamanduás têm gestação longa, cerca de 150 dias, e geram somente um filhote, que é alimentado pela fêmea durante seu primeiro ano de vida (Montgomery & Lubin 1977).

O seu padrão de pelagem varia com o espectro da distribuição, sendo possível encontrar espécimes de cor uniformemente clara a dourada, na porção noroeste de sua ocorrência sul-americana, até indivíduos revestidos por um colete preto que cobre seu dorso (Gardner 2008). Esta grande variação de pelagem individual e geográfica gerou a descrição de subespécies (Wetzel 1975). Atualmente estão descritas quatro subespécies para *T. tetradactyla* (Gardner 2008, revisado em Hayssen 2011):

- *T. tetradactyla nigra* Geoffroy St. Hillaire, 1803 (porção norte do Brasil, Guianas e parte da Venezuela e Colômbia):
- *T. tetradactyla quichua* O. Thomas, 1927 (porção oeste, abrangendo Acre e Peru);
- *T. tetradactyla straminea* Cope, 1889 (Brasil central, parte da Bolívia, Argentina e Paraguai);
- *T. tetradactyla tetradactyla* Linnaeus, 1758 (costa atlântica do Brasil).

Um estudo morfológico mais amplo analisou a morfologia craniana e coloração da pelagem em tamanduás através de morfometria geométrica. Os caracteres de coloração da pelagem apontaram para a divisão dos indivíduos amostrados em dois grupos: (i) um ao norte do rio Amazonas e oeste do rio Madeira, onde se distribuem animais com alta variação da coloração da pelagem; e (ii) outro grupo ao sul do rio Amazonas e leste do rio Madeira, de animais com padrão de coloração clássicos da espécie (Ohana 2011).

Outros estudos sobre a espécie são restritos principalmente a área da ecologia, ou ainda em estudos de filogenia de mamíferos (Meritt 1975; Engelman 1985; Hay *et al*., 1994; Rodrigues *et al.*, 2001; Delsuc 2001, 2002; Jimeno 2003). A espécie é considerada pela IUCN como pertencente à categoria "*Least Concern*" (menor preocupação), justificada pelo fato da espécie ser comum, presente em algumas áreas protegidas, ter grande distribuição geográfica e presumida grande população (Miranda *et al*. 2014). Órgãos como IBAMA e CITES estão em concordância com esta classificação (IBAMA - http://www.ibama.gov.br/fauna/extincao.htm; CITES – www.cites.org, acessado em 11 de Agosto de 2014). Porém, localmente, o panorama parece variar em outra direção. No estado brasileiro Rio Grande do Sul a espécie é considerada vulnerável, pois no local as áreas de florestas foram grandemente devastadas, e as respectivas populações declinaram junto com o habitat (Fontana *et al*. 2003). No estado de Mato Grosso o animal já é considerado raro em pequenas reservas de Cerrado. Inclusive, é menos visualizado em campo que o vulnerável tamanduá-bandeira, *Myrmecophaga tridactyla* (Rocha & Dalponte 2006), como também acontece no Parque Nacional das Emas, em Goiás (Rodrigues *et al.* 2002). Em outro estudo, sobre a situação dos xenartros no Uruguai, o tamanduá-mirim aparece como ameaçado devido à perda de habitat e caça esportiva (Fallabrino & Castiñeira 2006).

Alguns trabalhos realizaram o levantamento de atropelamentos de diversas espécies em grandes rodovias brasileiras, e a espécie é mostrada como um dos mamíferos mais frequentemente atropelados (Casella *et al*. 2006; Pereira *et al*. 2006; Cherem *et al*. 2007; Catzeflis & Thoisy 2012).

Como exposto, existe uma carência de estudos sobre as populações de tamanduá-mirim: somente estudos morfológicos têm sido insuficientes para o entendimento da estruturação populacional da espécie e a variabilidade genética é virtualmente desconhecida. Neste quesito, há apenas um estudo que realiza a estimativa da diversidade genética de alguns indivíduos de tamanduá-mirim distribuídos no Brasil através do marcador mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI), que descreve alta diversidade haplotípica e ausência de estruturação genética (Moraes-Barros *et al*., dados não publicados).

Esta tese tem como objetivo principal preencher estas lacunas de conhecimento, contribuindo para o melhor entendimento da relação entre as populações de diferentes partes da distribuição do tamanduá-mirim através do uso de ferramentas de genética de populações e do acesso a regiões neutras e adaptativas do genoma da espécie. Tendo em vista que o tamanduá-mirim ocorre em todo o território brasileiro, nos seus diferentes biomas e ecossistemas, apresentando uma distribuição contínua, se torna complicado traçar populações pré-definidas. Assim, a abordagem da genética da paisagem foi a ferramenta utilizada e mais apropriada para o estudo da variação genética e estrutura de populações em *T. tetradactyla*, que foi realizado através do uso de microssatélites isolados *de novo*. Ainda pelo mesmo motivo (ampla ocorrência), é possível que haja diferenças na variabilidade neutra e adaptativa, uma vez que a espécie se encontra adaptada a tantas paisagens

diferentes e distintas pressões seletivas. Por isso, um marcador de uma região genômica sabidamente sob seleção (MHC) foi usado para investigar a variabilidade adaptativa.

Objetivos

Objetivo Geral

Caracterizar a diversidade genética e estruturação populacional da espécie *Tamandua tetradactyla* ao longo de sua distribuição, com enfoque nos biomas brasileiros, através de marcadores neutros e não-neutros, a fim de investigar a relação entre a paisagem diversa de ocorrência da espécie e a estruturação genética de suas populações.

Objetivos Específicos

1. Amostras de *Tamandua tetradactyla* são de difícil obtenção, e frequentemente são coletadas de forma oportunista, resultando no uso de tipos diferentes de material biológico, como tecido fresco, bulbo de pelos, carcaça de atropelamento, pele de museu, entre outros. Assim, um dos objetivos deste trabalho foi padronizar a qualidade do DNA e a eficiência de sua amplificação a partir dos diferentes tipos de amostras biológicas;
2. Usando marcadores neutros do tipo microssatélite, pretendeu-se investigar a estruturação genética dentro da área de ocorrência amostrada da espécie (variabilidade genética e diferenciação geográfica), e quais os seus potenciais geradores, nomeadamente paisagem (diferentes biomas) ou isolamento por distância.
3. Utilizando como marcador não-neutro o gene *DRB* do complexo MHC de Classe II, pretendeu-se constatar os averiguar de seleção natural no gene, e verificar se existem composições alélicas distintas entre indivíduos de tamanduá-mirim de

diferentes biomas brasileiros, partindo do pressuposto que estes diferentes ambientes apresentam pressões seletivas distintas.

4. Finalmente, o ultimo objetivo foi investigar comparativamente os padrões de diversidade genética encontrados pelos marcadores neutros e não-neutros para tamanduá-mirim, e verificar se houve uma contribuição de eventos demográficos e deriva genética na riqueza e distribuição da diversidade genética adaptativa (estimada indiretamente através do gene *DRB*).

Conclusão Geral

O objetivo desta tese de doutorado foi descrever a diversidade genética e estruturação populacional da espécie *Tamandua tetradactyla* ao longo de sua distribuição, principalmente no Brasil, utilizando para isso marcadores genéticos neutros e não-neutros.

A começar pela grande variedade de tipos de amostras usadas (pele de museu, sangue, músculo, carcaça de atropelamento, pelo arrancado, etc), foi necessário um estudo formal para validar o uso de determinados materiais para etapas posteriores no estudo da variação genética da espécie. Portanto, no capítulo 1 avaliamos o potencial do uso de amostras de pele de museu (amostras históricas) e de pelo arrancado com o bulbo (amostras não-invasivas) como material biológico válido para procedimentos de biologia molecular, comparando a performance da genotipagem de microssatélites nestas amostras e em amostras frescas, com DNA íntegro. Foi possível reportar uma qualidade de resultados superior de amostras de pelo arrancado em relação às peles de museu. Através de um índice de qualidade assinalado a cada amostra e lóco, foi possível detectar e quantificar erros de genotipagem, selecionar amostras e lócos com resultados de genotipagem confiáveis para análises posteriores, e excluir resultados duvidosos.

Uma vez excluídos erros de genotipagem e amostras com qualidade duvidosa, o estudo descritivo da diversidade genética e estruturação populacional de *Tamandua tetradactyla* através de marcadores neutros pôde ser realizado.

Através de uma amostragem extensa que perpassou os principais biomas brasileiros (Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Pantanal, Cerrado e Caatinga), foi possível

correlacionar a diferenciação genética de populações/indivíduos de tamanduá-mirim com as diferentes paisagens em que a espécie ocorre.

Foram utilizadas duas abordagens distintas de análise: agrupamento de indivíduos em populações (*a priori*) e uma análise de atribuição baseada puramente em indivíduos (*a posteriori*). As análises resultaram em padrões similares, destacando principalmente uma diferenciação genética entre indivíduos provenientes da Floresta Amazônica em relação aos demais. Valores significativos de F_{ST} foram encontrados entre as populações da Amazônia e populações adjacentes na análise *a priori*, e houve uma clara distinção dos indivíduos amazônicos nos gráficos de atribuição da análise *a posteriori*. Além disso, foi possível observar uma composição genética complexa neste bioma, cujos indivíduos foram atribuídos a mais de um grupo: um *cluster* exclusivo amazônico, que demonstra maior diversidade genética em termos de riqueza alélica e heterorigozigose; e outro grupo que é similar geneticamente às populações fora da Amazônia.

A análise *a priori* também destacou uma diferenciação entre populações da Mata Atlântica do norte e do sul. Embora essa diferenciação tenha sido refletida em valores altos de F_{ST} entre estas populações, uma análise de correlação entre a distância genética e provável presença de barreiras ao fluxo gênico, corrigida pela distância geográfica entre as populações, revelou que a diferenciação encontrada é, provavelmente, produto de isolamento por distância. O padrão de atribuição genética dos indivíduos em grupos distintos da análise *a posteriori* confirmou este resultado.

Em geral, foi encontrada uma fraca estruturação genética ao longo das populações de tamanduá mirim amostradas, sobressaindo a diferenciação entre os indivíduos da Amazônia

e os demais, cuja diversidade genética também se mostrou mais elevada. Ao longo das populações da Mata Atlântica, um padrão de isolamento por distância foi encontrado. Populações dos biomas Pantanal e Cerrado não demonstraram diferenciação genética significativa em relação às demais.

O capítulo 3 foi dedicado à investigação da distribuição da diversidade genética de um marcador não-neutro, o gene DRB do MHC Classe II, região genômica conhecida por apresentar sinais clássicos de seleção positiva e/ou balanceadora. Através do uso de Sequenciamento de Nova Geração foi possível explorar a diversidade deste gene ao longo de populações de tamanduá-mirim distribuídas nos principais biomas brasileiros, e comparar esta diversidade com aquela encontrada nos marcadores microssatélites do capítulo 2.

Foi encontrada uma alta diversidade do gene DRB, que exibiu uma variedade de alelos no nível de nucleotídeos e proteico, um provável reflexo de múltiplas cópias do gene na espécie combinada com a grande multiplicidade de ambientes que a espécie ocupa. Sinais claros de seleção positiva histórica agindo neste gene foram observados, como valores elevados de substituições não-sinônimas e maior diversidade nos códons de ligação de antígeno.

Uma maior riqueza alélica e maior número de alelos privados (exclusivos) foram observados nos biomas florestados, Mata Atlântica e Floresta Amazônica, especialmente nesta última. Possivelmente, estes ambientes também apresentam maior riqueza de espécies de patógenos (assim como riqueza de espécies em geral), o que representa uma elevada pressão do ambiente.

Além disso, os marcadores microssatélites (neutros) mostraram um padrão de diversidade genética similar ao gene DRB (não-neutro), demonstrando uma importante influência da demografia na diversidade e estrutura genética do Complexo Principal de Histocompatibilidade.

Referências

Acevedo-Whitehouse K, Cunningham A (2006) Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? *Trends in Ecology & Evolution* **21**, 433–8.

Agudo R, Alcaide M, Rico C *et al.* (2011) Major histocompatibility complex variation in insular populations of the Egyptian vulture: inferences about the roles of genetic drift and selection. *Molecular ecology*, **20**, 2329–40.

Aguilar A, Smith TB, Wayne RK (2005) A comparison of variation between a MHC pseudogene and microsatellite loci of the little greenbul (*Andropadus virens*). *BMC Evolutionary Biology* **5**, 47.

Arnason, U, Gullberg, A, Janke, A (1997) Phylogenetic analyses of mitochondrial DNA suggest a sister group relationship between Xenarthra (Edentata) and Ferungulates. *Molecular Biology and Evolution* **14**(7), 762-768.

Avise (2000). *Phylogeography*. *The history and formation of species*. Havard University Press, Massachusetts.

Babik W (2010) Methods for MHC genotyping in non-model vertebrates. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 237–51.

Balloux F & Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **11**(2), 155-165.

Beheregaray L B (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, **17**, 3754–3774.

Bos DH, Gopurenko D, Williams RN, Dewoody JA (2008) Inferring population history and demography using microsatellites, mitochondrial DNA, and major histocompatibility complex (MHC) genes. *Evolution; international journal of organic evolution*, **62**, 1458–68.

Brown KS & Brown GG (1992) Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. *In*: Whitmore TC & Sayer JA (eds.) **Tropical deforestation and species extinction**. Chapman & Hall, Londres.

Carvalho FMV, De Marco Júnior P, Ferreira LG (2009) The Cerrado into-pieces: habitat fragmentation as a function of landuse in the savannas of central Brazil. *Biological Conservation*, **142**(7), 1392-1403.

Casella J, Cáceres NC, Goulart CS, Filho ACP (2006) Uso de sensoriamento remoto e análise espacial na interpretação de atropelamentos de fauna entre Campo Grande e Aquidauana, MS. *Anais 1º Simpósio de Geotecnologias no Pantanal*, 321-326.

Catzeflis F, Thoisy, B (2012) Xenarthrans in French Guiana: a brief overview of their distribution and conservation status. *Edentata* **13**, 29-37.

Cherem JJ, Kammers M, Ghizoni-Jr IR, Martins A (2007) Mamíferos de médio e grande porte atropelados em rodovias do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. *Biotemas* **20** (3), 81-96.

Collevatti RG, Leite KCE, Miranda GHB, Rodrigues FGH (2007) Evidence of high inbreeding in a population of the endangered giant anteater, *Myrmecophaga tridactyla* (Myrmecophagidae), from Emas National Park, Brazil. *Genetics Molecular Biology* **30**, 112-120.

Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews* **12**:499-510

De Jong WW (1998) Molecules remodel the mammalian tree. *Trends in Ecology and Evolution* **13**(7), 270-275.

Delsuc F, Catzeflis FM, Stanhope MJ, Douzery EJP (2001). 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.* **268**, 1605-1615.

Delsuc F, Scally M, Madsen O, Stanhope MJ, de Jong WW, Catzeflis F, Springer MS, Douzery EJP (2002). Molecular phylogeny of living xenarthrans and the impact of character and taxon sampling on the placental tree rooting. *Molecular Biology Evolution* **19**(10), 1656-1671.

Delsuc F, Vizcaíno SF, Douzery EJP (2004) Influence of Terciary paleoenvironmental changes on the diversification of South American mammals: a relaxed molecular clock study within xenarthrans. *BMC Evolutionary Biology* **4**, 11-24.

Ditchkoff SS, Lochmiller RL, Masters RE, Hoofer SR & Van der Bussche RA (2001) Major-histocompatibility-complex-associated variation in secondary sexual traits of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): evidence for good-genes advertisement. *Evolution* **55**, 616-625.

Eisenberg JF (1989) Order Xenarthra (Edentata). In: *Mammals of the Neotropics – The northern Neotropics.* Vol.1. The University of Chicago Press, London, pp. 50-67.

Engelman GF (1985) The phylogeny of the Xenarthra. In: Montgomery GG (ed.) *The evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington.

Fallabrino A, Castiñeira E (2006) Situacion de los Edentados en Uruguay. *Edentata* **7**: 1-3.

Fonseca G. (2001) The conservation of Xenarthra will be vital for the preservation of mammalian phylogenetic diversity. *Edentata* **41**, 1-10.

Fontana CS, Bencke GA, Reis RE (eds.) (2003) *Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção do Rio Grande do Sul.* Edi-PUCRS, Porto Alegre.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, UK.

Gardner AL (2005) 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.

Gardner, A L (2008) *Mammals of South America Vol 1.* Baltimore, The John Hopkins University Press.

Garner A, Rachlow JL, Hicks JF (2005) Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations. *Conservation Biology* **19**(4), 1215-1221.

Geffen E, Waidyaratne S, Dalén L, Angerbjörn A, Vila C, Hersteinsson P, Fuglei E, White PA, Goltsman ME, Kapel CMO (2007) Sea ice occurrence predicts genetic isolation in the Arctic fox. *Molecular Ecology* **16**, 4241–4255.

Hartl DL, Clark AG (2006) **Principles of Population Genetics**. Sinauer Associates, Massachusetts.

Hay MA, Bellem AC, Brown JL, Goodrowe KL (1994) Reproductive patterns in Tamandua (*T. tetradactyla*). *J. Zoo. Wildl. Med*. **25**, 248-258.

Hayssen V (2011) *Tamandua tetradactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae). *Mammalian Species*, **43**, 64–74.

Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J, Crandall KA, Graham CH, Johnson JB, Rissler L, Vitoriano PF, Yoder AD (2010) Phylogeography´s past, present and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**(1), 291-301.

Hoderegger R & Wagner HH (2008) Landscape genetics. *BioScience* **58**(3), 199-207.

HoldereggerR, Kamm U, Gugerli F (2006) Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology* **21**(6), 797-807.

Höglund J (2009) *Evolutionary Conservation Genetics.* Oxford University Press, New York.

Hughes a L, Yeager M (1998) Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annual review of genetics*, **32**, 415–35.

Jimeno GP (2003) Crianza artificial y manejo reprocdutivo de los Tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) en el Jardin Zoológico de Rosario, Argentina. *Edentata* **5**: 24-28.

Kimura M (1983) *The neutral theory of molecular evolution. London*. Cambridge University Press, UK.

Klein J (1986) *Natural History of the Major Histocompatibility Complex.* Wiley, New York.

Knowles L (2009) Statistical Phylogeography. *J Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **40**, 593-612

Landry C, Garant D, Duchesne P & Bernatchez L (2001) 'Good genes as heterozygosity': the major histocompatibility complex and mate choice in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Proc. R. Soc. Lond. B.* **268**, 1279-1285.

Langefors A, Lohm J, Grahn M, Andersen O & von Schantz T (2001) Association between major histocompatibility complex class IIB alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **268**, 479-485.

Lara-Ruiz P, Chiarello A, Santos FR (2008) Extreme population divergence and conservation implications for the rare endangered Atlantic Forest sloth, *Bradypus torquatus* (Pilosa: Bradypodidae). *Biological Conservation* **141**, 1332-1342.

Ljungqvist M, Åkesson M, Hansson B (2010) Do microsatellites reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? A comment on Väli *et al*. (2008). *Molecular Ecology*, **19,** 851-855.

Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* **18**(4), 189-197.

Meritt J (1975) *Readability*. United Kingdom Reading Association. London: Hodder and Stoughton.

Miranda F, Fallabrino A, Arteaga M, Tirira DG, Meritt DA, Superina M (2014) *Tamandua tetradactyla*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 09 August 2014.

Montgomery GG & Lubin YD (1977). Prey influences on movements of neotropical anteaters. In: Philips RL & Jonkel C (eds.) *Proceedings of 1975 Predator Symposium*. Missoula, University of Montana, pp. 103-131.

Moraes-Barros N, Morgante JS, Miyaki CY (2002) Genetic diversity in different populations of sloths assessed by DNA fingerprinting. *Braz. J. Biol*. **62**(3), 503-508.

Moraes-Barros N, Silva JAB, Miyaki CY, Morgante JS (2006) Comparative phylogeography of the Atlantic Forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the wide-spread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradipodidae: Xenarthra). *Genetica* **126**(1-2), 189-198.

Noss RF (1990) Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation Biology*, **4**(4), 355-364.

Novak RM (1983) *Walkers Mammals of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore e Londres. pp. 147-168.

Ohana JAB (2011) **Variação morfológica do tamanduá-mirim, Tamandua tetradactyla (Linnaeus, 1758)(Pilosa, Vermilingua).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará/Museu Paraense Emílio Goeldi.136 pp.

Patterson B & Pascual R (1972). The fossil mammal fauna of South America. In: Keast A, Erk FC and Glass BP (ed.) *Evolution, mammals and southern continents.* State University of New York Press, Albany, pp 247-309.

Pereira APFG, Andrade FAG, Fernandes MEB (2006) Dois anos de monitoramento dos atropelamentos de mamíferos na rodovia PA-458, Bragança, Pará. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi* **1**(3), 77-83.

Ploshnitsa AI, Goltsman ME, Macdonald DW, Kennedy LJ, Sommer S (2012) Impact of historical founder effects and a recent bottleneck on MHC variability in Commander Arctic foxes (*Vulpes lagopus*). *Ecology and Evolution* **2**, 165–80.

Radwan J, Biedrzycka A, Babik W (2010) Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? *Biological Conservation* **143**, 537-544.

Redford KH (1994) The Edentates of the Cerrado. *Edentata* **1**: 4-10.

Rocha EC & Dalponte JC (2006) Composição e caracterização da fauna de mamíferos de médio e grande porte em uma pequena reserva de cerrado em Mato Grosso, Brasil. *R. Árvore* **30**: 669-678.

Rodrigues FGH, Marinho-Filho JS, Santos HG (2001) Home ranges of translocated lesser anteaters (*Tamandua tetradactyla*) in the Cerrado of Brazil. *Oryx* **35**, 166-169.

Rodrigues FHG (2002) Composição e caracterização da fauna de mamíferos do Parque Nacional das Emas, Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **19**(2), 589-600.

Selkoe K, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**, 615–29.

Sommer S (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology*, **2**, 16-34.

Spielman D, Brook BW, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15261-15264.

Springer MS, Stanhope MJ, Madsen O & de Jong WW (2004). Molecules consolidate the placental mammalian tree. *Trends in Ecology and Evolution* **19**(8), 430-438.

Storfer A, Murphy MA, Spear SF, Holderegger R, Waits L (2010) Landscape genetics: where are we now? *Molecular Ecology*, **19**, 3496-3514.

Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *TREE* **15**(5):199-203.

Superina M, Miranda FR, Abba AM (2010) The 2010 Anteater Red List Assessment. *Edentata* **11**(2), 96-114.

Tautz D (1989) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Research* **17**, 6463-6471.

Turchetto-Zolet C, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, **22**, 1193–213.

Väli U, Einarsson A, Waits L, Ellegren H (2008) To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Molecular Ecology*, **17,** 3808-3817.

Vizcaíno SF (2009) The teeth of the “toothless”: novelties and key innovations in the evolution of xenarthrans (Mammalia, Xenarthra). *Paleobiology* **35**(3), 343-366.

Wegner KM, Reusch TBH & Kalbe M (2003) Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild. *Journal of Evolutionary Biology* 16, 224-232.

Wetzel RM (1975) The species of *Tamandua* Gray (Edentata, Myrmecophagidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* **88**, 95-112.