



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

ANA PAULA MELO CORRÊA

**VERIFICANDO A OCORRÊNCIA DE HIBRIDIZAÇÃO ENTRE DUAS ESPÉCIES
DE PREGUIÇA, *Bradypus tridactylus* LINNAEUS, 1758 e *Bradypus variegatus*,
SCHINZ, 1825 NO MUNICÍPIO DE MANAUS, AMAZONAS- BRASIL**

MANAUS – AM
MAIO/ 2015

ANA PAULA MELO CORRÊA

**VERIFICANDO A OCORRÊNCIA DE HIBRIDIZAÇÃO ENTRE DUAS ESPÉCIES
DE PREGUIÇA, *Bradypus tridactylus* LINNAEUS, 1758 e *Bradypus variegatus*,
SCHINZ, 1825 NO MUNICÍPIO DE MANAUS, AMAZONAS- BRASIL**

Orientador: Prof. Dr. Tomas Hrbek
Co-Orientadora: Dra Waleska Gravena

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Diversidade Biológica da
Universidade Federal do
Amazonas, como parte dos
requisitos para obtenção do
título de mestre em
Diversidade Biológica.

MANAUS – AM
MAIO/ 2015

Às minhas avós Antônia
Melo Oliveira (*In memorian*)
e Maria Tereza Corrêa (*In
memorian*), as quais tive que
me despedir ao longo do
mestrado.

“Daí ela se lembrou de como é ser forte. Ela enxugou suas lágrimas e sorriu. Sim, sorriu, porque ela sabe que algo melhor está por vir. Ela sabe”.

Tati Bernardi

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me oportunizar a realização de um desejo e permitir que eu trilhasse o meu caminho da forma que pedi. Mesmo com todos os tropeços e tristezas, sei que nunca estive sozinha.

Aos meus pais, por me permitirem realizar esse desejo. Pela ajuda financeira ao longo desses anos e principalmente pelo amor demonstrado em cada chegada e cada partida. Por terem me auxiliado em todos os problemas, compreendido o meu tempo e me fazerem enxergar a luz quando eu só vi a escuridão. Por terem acreditado na força que eu não sabia que tinha e nunca terem me deixado desistir. À minha mãe por ter segurado as pontas de ter uma filha meio inconstante e ter “voador” para Manaus para me apoiar sempre que precisei. Vocês são incondicionais e meu amor por vocês é imensurável, obrigada por serem quem são.

À minha avó Antônia Melo Oliveira (*In memoriam*) por ter feito de mim a pessoa que eu sou e ter sido tão paciente, mesmo quando eu não fui quando ela me perguntava quando voltaria para casa. Eu só não pensei que ela não estaria lá quando eu voltasse. Ao meu irmão, Paulo Corrêa Jr. e minha cunhada Talita Mello por todo apoio que me deram nessa caminhada, mas principalmente por terem me dado o bálsamo que acalma e enche de alegria meu coração, minha sobrinha e afilhada Clarissa Mello Corrêa.

Ao André Corado e a Nina, por terem me proporcionado um lar em Manaus. Às famílias Guerra e Corado pelo apoio, pelos churrascos de fim de semana e tudo quanto mais me proporcionaram nesses anos. Obrigada. À família Corrêa, pelas orações, torcida e apoio que deram aos meus pais nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Tomas Hrbek, pela compreensão nos tropeços dados e pela paciência de compartilhar seus vastos conhecimentos. À minha co-orientadora, Dra Waleska Gravena, uma das pessoas mais fofas que já conheci (e bruta também), não só pela ajuda no trabalho e conhecimentos compartilhados, mas também por ter me dado a chance de conhecer as preguiças, pela amizade e compreensão quando tudo parecia perdido, pela minha preguicinha de pelúcia e todas as conversas no estacionamento.

À amiga Priscila Azarak, anjo enviado por Deus para tornar os dias alegres. Agradeço pela companhia na vida manauara, no laboratório, em casa, nas festas. Enfim, por tudo que fizemos juntas. Pelas risadas nos fins de semana no laboratório, pela companhia e ajuda nas coletas, mas principalmente por ter sido você quando eu mais precisei. Você sabe que eu não estaria terminando esse mestrado se eu não tivesse você na minha vida. Nina também agradece a moradia de alguns dias.

Aos amigos de laboratório, com os quais tive a honra de partilhar momentos de alegria e desespero ao longo desses anos, mas que sempre ajudaram a fazer cada momento valer a pena: Joice Farias, pela amizade, pelas ajudas e por não ter me deixado sozinha nos não cumprimentos de datas; Aline Ximenes, pela companhia no laboratório e na *night*; Elciomar Oliveira, por todos os momentos de descontração, conversas sérias quando necessário e com a ajuda nas análises; Fabricio Bertuol, por ser o chato legal do laboratório; Mario Nunes, por compartilhar com todos nós seus amplos conhecimentos e ser tão paciente com nossos erros.

Aos demais colegas de laboratório pela amizade e carinho: Vinicius, Robertinha, Valéria, Israela, Guta, Zamora, Deyla, Fabinho, Jéssica, Juliana, Pedro e José. À professora Izeni por nos possibilitar os trabalhos e o carinho de nos reunir como família sempre que possível. O meu muito obrigada.

À d. Teresa Kátia, Pâmela e Laci por terem me proporcionado a oportunidade de terminar o mestrado, terem me acolhido e me ajudado no momento mais difícil desses anos em Manaus. Por terem compreendido as dificuldades vivenciadas e terem aberto as portas para mim, justo no fim de tudo. Nunca serei grata o suficiente, vocês foram anjos.

Ao programa de Pós Graduação em Diversidade Biológica, juntamente com a Universidade Federal do Amazonas pelo apoio técnico, logístico e financeiro para realização das pesquisas. À Prof. Gal, pela paciência e compreensão de todos os momentos em que a vida pessoal falou mais alto que a profissional, pelas segundas e terceiras chances dadas ao longo do mestrado. Não tenho palavras para agradecer-lá. Agradeço também aos professores que partilharam de seus conhecimentos ao longo das disciplinas cursadas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, seja com doações de amostras, seja com ajuda de custo, manual, laboratorial e mesmo os que apenas com uma conversa já me ajudavam a dar um passo a frente.

E por último, mas não menos importante, agradeço a CAPES pelo financiamento da bolsa de estudo, sem a qual não seria possível realizar esse mestrado.

Obrigada!

RESUMO

Pertencentes a Infraordem Pilosa, família Bradipodiade, as preguiças *Bradypus tridactylus* e *Bradypus variegatus* podem ser encontradas no bioma Amazônia. Apresentam caracteres diagnósticos como cor da pelagem da face e da garganta em amarelo dourado e marrom, e ausência e presença de mancha negra ao redor dos olhos, respectivamente, que as distinguem entre si. Nos fragmentos florestais da região do município de Manaus-AM, é possível observar preguiças que possuem características intermediárias entre as duas espécies. O objetivo deste trabalho foi identificar as preguiças encontradas em Manaus, verificando se há ocorrência de hibridização entre elas. Foram utilizadas um total de 32 amostras, sendo sete da região controle de *B. variegatus*, uma da região controle de *B. tridactylus* e as outras 24 pertencentes aos fragmentos florestais da cidade de Manaus, em que são identificados indivíduos de *B. variegatus*, *B. tridactylus* e *Bradypus* sp., baseando-se nas características morfológicas. Para o presente estudo foram utilizadas a região controle do DNA mitocondrial (Dloop) e 10 *loci* microssatélites do DNA nuclear. Resultados das análises moleculares de Dloop mostram a existência bem suportada de dois clados monofiléticos, separando as duas espécies de preguiça: *B. tridactylus* e *B. variegatus*, ao norte e ao sul do Rio Negro e Amazonas, respectivamente. Através da análise do programa STRUCTURE, verificou-se que o número de grupos biológicos geneticamente distintos foi de $K=2$, sendo possível distinguir indivíduos puros de cada uma das espécies, bem como foi possível observar a existência de indivíduos com diferentes proporções de associação a um dos clusters. Esses indivíduos foram identificados como híbridos, em que é possível verificar a ocorrência de geração F1, F2 e retrocruzamentos, indicando a fertilidade dos mesmos. A consequência da existência de híbridos férteis para o processo evolutivo das espécies envolvidas podem variar de insignificantes a drásticas, sendo necessários estudos que gerem informações empíricas, visando auxiliar na elaboração de estratégias de manejo, conservação e proteção dessas espécies.

Palavras-chave: Preguiça, *Bradypus*, Hibridização, Genética.

ABSTRACT

Belonging to Infraorder Hairy, Bradipodiade family, *Bradypus tridactylus* and *Bradypus variegatus* sloths can be found in the Amazon biome. They present diagnostic characters such as color of the face coat and throat which are golden yellow and brown, absence and presence of black spot around the eyes, respectively, that distinguish them from each other. In forest fragments of Manaus-AM, it is possible to observe sloths that have intermediate characteristics between the two species. The objective of this study was to identify the sloths found in Manaus, checking for the occurrence of hybridization between them. A total of 32 samples were used, seven control region of *B. variegatus*, one of the region control *B. tridactylus* and the other 24 forest fragments belonging to the city of Manaus, where we identify individuals of *B. variegatus*, *B. tridactylus* and *Bradypus* sp., based on morphological characteristics. For the present study we used the control of mitochondrial DNA region (Dloop) and 10 microsatellite *loci* of the nuclear DNA. Results of molecular analyzes of Dloop show the existence of two well-supported monophyletic clades, separating the two species of sloths: *B. tridactylus* and *B. variegatus*, in the north and south of the Rio Negro and Amazon, respectively. Through analysis of the STRUCTURE program, it was found that the number of genetically distinct groups biological was $K=2$, it is possible to distinguish pure individuals of each species, and it was possible to observe the existence of individuals association with different proportions one of the clusters. These individuals were identified as hybrids, and it is possible to can check the occurrence of F1 generation, F2 and backcross, indicating the fertility of them. The consequences of the existence of fertile hybrids to the evolutionary process of the species involved can range from insignificant to drastic, so that it is necessary studies that generate empirical information, aimed at assisting in the development of management strategies, conservation and protection of these species.

Keywords: Sloth, *Bradypus*, Hybridization, Genetic.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE TABELAS | i |
| LISTA DE FIGURAS | ii |
| INTRODUÇÃO | 14 |
| Caracterização das Espécies | 14 |
| Família Bradipodidae: O gênero <i>Bradypus</i> | 14 |
| As Espécies da Amazônia: <i>Bradypus tridactylus</i> e <i>Bradypus variegatus</i> | 16 |
| Hibridização, Introgessão e Zonas Híbridas entre Espécies..... | 19 |
| Marcadores Moleculares | 21 |
| DNA Mitocondrial : A Região Controle (Dloop)..... | 22 |
| DNA Nuclear: Os Marcadores Microssatélites | 23 |
| OBJETIVOS | 25 |
| Objetivo Geral..... | 25 |
| Objetivos Específicos | 25 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 26 |
| Obtenção das Amostras e Área de Estudo | 26 |
| Identificação Morfológica..... | 27 |
| Extração de DNA | 28 |
| Amplificação e Sequenciamento da Região Controle (Dloop)..... | 28 |
| Amplificação e Genotipagem dos Microssatélites..... | 29 |
| Teste de Transferabilidade dos <i>Primers</i> de Microssatélites | 30 |
| Análise de Dados | 30 |
| DNA mitocondrial..... | 30 |
| DNA nuclear (Microssatélites)..... | 31 |
| RESULTADOS | 32 |
| Pelos e Carrapatos como Método de Amostra Não Invasiva..... | 32 |

| | |
|---|----|
| Identificação Morfológica..... | 34 |
| Identificação Mitocondrial - Dloop | 36 |
| Identificação Nuclear – Microssatélites..... | 38 |
| DISCUSSÃO | 45 |
| Pelos e Carrapatos como Método de Amostra Não Invasiva..... | 45 |
| Hibridização e Introgressão entre <i>Bradypus variegatus</i> e <i>Bradypus tridactylus</i> | 46 |
| Prováveis Causas da Ocorrência de Hibridização entre <i>B. variegatus</i> e <i>B. tridactylus</i> | 50 |
| Implicações da Hibridização na Conservação | 52 |
| CONCLUSÃO | 54 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 55 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Informações sobre os 10 <i>loci</i> microssatélites utilizados. (N) número de indivíduos, (A) número de alelos, (He) heterozigosidade esperada e (Ho) heterozigosidade observada. $P < 0,05$ | 39 |
| Tabela 2. Proporção de associação (q) dos genótipos de cada indivíduo aos <i>clusters</i> inferidos pelo programa STRUCTURE..... | 41 |
| Tabela 3. Resultados de Identificação do presente estudo..... | 43 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécime de *B. variegatus*, em que pode-se observar a garganta de pelagem marrom e cabeça com pelos esbranquiçados e manchas negras ao redor dos olhos. (Foto: flickr.com/ozgi1).....17
- Figura 2.** Espécime de *B. tridactylus*, em que pode-se observar a garganta de pelagem amarela e a cabeça com pelos de cor amarelo dourado e ausência de manchas negras ao redor dos olhos. (Foto: J. Tascon).....17
- Figura 3.** Macho de preguiça com o *especulum* nas costas. (Foto: Ana Paula Melo).....18
- Figura 4.** Mapas de distribuição geográfica das preguiças *B. tridactylus* (A) e *B. variegatus* (B).....18
- Figura 5.** Mapa esquemático de distribuição das amostras utilizadas no presente estudo. Destaque em amarelo para os limites do município de Manaus.....27
- Figura 6.** Resultado da genotipagem (A) e sequência mitocondrial (B) obtidas a partir de amostras de sangue e tecido de bicho preguiça.....32
- Figura 7.** Resultado da genotipagem (A) e sequência mitocondrial (B) obtidas a partir de amostras de pelo de bicho preguiça.....33
- Figura 8.** Resultado da genotipagem (A) e sequência mitocondrial (B) obtidas a partir de amostras de carrapatos de bicho preguiça.....33
- Figura 9.** Indivíduo da espécie *B. variegatus*. (Foto: Ana Paula Melo Corrêa).....34
- Figura 10.** Indivíduo da espécie *B. tridactylus* (Foto: Equipe Iracema Falls, BR 174).....34
- Figura 11.** Indivíduo com características intermediárias entre as duas espécies de preguiça, *B. variegatus* e *B. tridactylus*. (Foto: Ana Paula Melo Corrêa).....35

| | |
|--|----|
| Figura 12. Árvore filogenética dos indivíduos das espécies <i>B. tridactylus</i> e <i>B. variegatus</i> gerada pelo programa MEGA5..... | 37 |
| Figura 13. Gráfico de barras gerado pelo programa BAPS, em que se observam três grupos biológicos..... | 38 |
| Figura 14. Gráfico gerado pelo programa STRUCTURE, que mostra maior probabilidade de K=2..... | 39 |
| Figura 15. Gráfico de barras gerado pelo programa STRUCTURE, mostrando a existência de dois clusters (K=2)..... | 40 |

INTRODUÇÃO

Caracterização das Espécies

A subordem Xenarthra (antiga ordem Edentata), caracterizada por possuir articulações adicionais entre as vértebras lombares (MEDRI *et al.* 2012), é atualmente subdividida em duas infraordens: Pilosa, representada por preguiças e tamanduás, caracterizada pelo corpo recoberto por pelos; e Cingulata, representada pelos tatus, caracterizada pelo corpo recoberto por uma armadura (GLASS, 1985).

As preguiças são mamíferos encontrados nas florestas tropicais da América (GILMORE *et al.* 2008) e apresentam, atualmente, duas famílias: Megalonychidae, preguiças de dois dedos e Bradipodidae, representada pelas preguiças de três dedos. A família Megalonychidae é composta por duas espécies viventes do gênero *Choloepus*, Illiger, 1811: *C. hoffmanni*, encontrada desde o norte da Nicarágua até noroeste da América do Sul, Colômbia, Venezuela, Guiana, Equador, Peru, oeste do Brasil (sudoeste do Amazonas até o norte do Mato Grosso) e Bolívia; e *C. didactylus*, com distribuição ao leste dos Andes, sul da Colômbia, Venezuela, Guianas, Equador, Peru e norte do Brasil, no bioma da Amazônia (WETZEL, 1985; MEDRI *et al.* 2012).

A família Bradipodidae, é representada por quatro espécies viventes do gênero *Bradypus*, Linnaeus, 1758: *B. torquatus*, endêmica da Mata Atlântica brasileira; *B. tridactylus*, que ocorre desde o delta do Rio Orinoco na Venezuela, terras altas do Amazonas, florestas das Guianas, Suriname até o norte do Brasil, onde pode ser encontrada em simpatria com *C. didactylus*; *B. variegatus*, com distribuição desde Honduras ao oeste da costa do Equador, Colômbia, Venezuela, leste dos Andes e através das florestas do Equador, Peru e Bolívia e nas florestas do Brasil, estando ausente nos estados do Amapá e norte do Pará, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; e *B. pygmaeus* (endêmica da Ilha Escudo de Veraguas, no Panamá) (WETZEL, 1985; EMMONS, 1997; ANDERSON & HANDLEY, 2001; CASSANO, 2006; RÉUS & SOUZA, 2007; CHIARELLO, 2008; MEDRI *et al.* 2012).

Família Bradipodidae: O gênero *Bradypus*

Conhecidas como preguiça de três dedos, por apresentarem três garras longas em cada membro anterior e posterior, a família Bradipodidae possui 8 ou 9 vértebras cervicais não fusionadas, que lhe conferem grande flexibilidade, incluindo girar a cabeça em até 270° (MEDRI *et al.* 2012).

As preguiças de modo geral, possuem metabolismo e temperatura corporal baixos (GILMORE *et al.* 2001), relacionados ao consumo de alimentos com baixo teor energético, como no caso das preguiças da família Bradipodidae, que são folívoras autênticas, alimentando-se de folhas, galhos macios e gemas laterais ou apicais de diversas espécies de plantas (PEREIRA JR., 2007; MEDRI *et al.* 2012). Os dentes e músculos são adaptados à trituração do material vegetal (CORK & FOLEY, 1991). A maxila tem 10 dentes e a mandíbula 8, sem a presença de caninos ou incisivos verdadeiros (MEDRI *et al.* 2012), apenas dentes molares (PEREIRA JR., 2007).

Segundo Medri *et al.* (2012), o baixo metabolismo das preguiças pode exercer funções adaptativas como reduzir a absorção de substâncias tóxicas presentes nas plantas. Outra adaptação relacionada à sua alimentação é o trato digestivo modificado (PEREIRA JR., 2007), que consiste em um estômago grande e dividido em quatro câmaras (nas três primeiras ocorre a fermentação e na quarta a ação de ácidos e enzimas) para digestão da vegetação com auxílio de bactérias capazes de digerir celulose (CORK & FOLEY, 1991; CASSANO, 2006; MEDRI *et al.* 2012).

O baixo metabolismo das preguiças seria ainda importante no estabelecimento de longos períodos gestacionais, intenso cuidado materno com a prole e reduzido número de filhotes por gestação, sendo consideradas estrategistas K (PEREIRA JR., 2007).

Ao contrário das preguiças-de-dois-dedos, que são estritamente noturnas, as preguiças do gênero *Bradypus* são ativas tanto durante o dia quanto durante a noite (CHIARELLO, 2008). As preguiças possuem hábito solitário, são arbóreas, raramente descem das árvores, e nadam muito bem. Vão ao solo aproximadamente uma vez a cada sete dias para urinar e/ou defecar, podendo se deslocar no chão para outras árvores (EMMONS, 1997; CASSANO, 2006; GILMORE *et al.* 2008; MEDRI *et al.* 2012). Devido à termorregulação, mostram tendência a ocupar árvores com copas expostas ao sol para ir ao topo se esquentar (EMMONS, 1997; GILMORE *et al.* 2001; MEDRI *et al.* 2012).

De acordo com Eisenberg (1981), as preguiças apresentam uma estrutura social não coesiva, não sendo completamente solitárias, apresentando dois tipos de relação: macho-fêmea, durante o acasalamento; e mãe-filhote, com cuidado parental realizado pela mãe, por aproximadamente seis meses. Após esse período, a mãe deixa o filhote na sua área de vida e

vai para outra área, evitando a competição de recursos e espaço com a prole (DO CARMO, 2002; MEDRI *et al.* 2012). Os indivíduos atingem a maturidade sexual por volta dos três ou quatro anos de idade, tendo ambos os sexos praticamente o mesmo tamanho. Após uma gestação de 106 dias (BENIRSCHKE, 2008), normalmente nasce um filhote (GILMORE *et al.* 2008; MEDRI *et al.* 2012)

Sua vida social é influenciada pelo olfato, por liberarem secreções odoríferas, provavelmente feromônios, nas glândulas anais, que são utilizadas para marcar trajetos em árvores, advertir de sua presença e possivelmente a condição sexual do indivíduo (DICKMAN, 2001 *apud* MEDRI *et al.* 2012).

Em períodos úmidos, a coloração das preguiças fica verde devido a presença de diferentes espécies de algas simbiotes que vivem em sua pelagem, que servem de alimento para mariposas, auxiliando na sua camuflagem na floresta, sendo uma relação benéfica para ambas (GILMORE *et al.* 2001; PEREIRA JR., 2007; RÉUS & SOUZA, 2007; MEDRI *et al.* 2012).

As Espécies da Amazônia: *Bradypus tridactylus* e *Bradypus variegatus*

A espécie *Bradypus variegatus* (SCHINZ, 1825), conhecida como preguiça-da-garganta marrom ou preguiça-comum, tem comprimento médio de 58 cm, sua cauda possui aproximadamente 5,8 cm e seu peso médio é 4,3 kg (MEDRI *et al.* 2012). Sua pelagem varia do marrom pálido ao marrom amarelado, com manchas esbranquiçadas na parte traseira (MEDRI *et al.* 2012), apresenta cabeça pequena, com pelos de cor esbranquiçados, em que se realça pelos de cor negra ao redor dos olhos (PLESE, 2014) (Fig. 1).

A preguiça da garganta amarela ou preguiça bentinho, *Bradypus tridactylus* (LINNAEUS, 1758), possui comprimento médio de 50 cm, sua cauda tem de 3 a 8 cm e peso médio de 3 a 6 kg (MEDRI *et al.* 2012). Sua pelagem é de cor marrom acinzentado, similar a *B. variegatus*, porém apresenta a região da testa e garganta de cor amarela (MEDRI *et al.* 2012), possui cabeça pequena, com pelos de cor amarelo dourado, não apresentando pelos de cor negra ao redor dos olhos (PLESE, 2014), sendo este um caractere diagnóstico para diferenciar da espécie *B. variegatus* (Fig.2). Apesar de ser encontrada com frequência nos fragmentos florestais e área rural da cidade de Manaus, *B. tridactylus* é uma espécie pouco estudada (DO CARMO, 2002).



Figura 1: Espécime de *B. variegatus*, em que pode se observar a garganta de pelagem marrom e a cabeça com pelos esbranquiçados e manchas de cor negra ao redor dos olhos (Foto: flickr.com/ozgi1).



Figura 2: Espécime de *B. tridactylus*, em que pode se observar a garganta de pelagem amarela e a cabeça com pelos amarelo dourado e ausência de manchas de cor negra ao redor dos olhos (Foto: J. Tascon).

Os machos de ambas as espécies apresentam uma mancha de pelos curtos de cor laranja com uma listra preta no centro da mesma, sendo considerado um dimorfismo sexual, que começa a aparecer apenas quando a preguiça está na fase juvenil (GILMORE *et al.* 2001; PEREIRA JR., 2007; MEDRI *et al.* 2012). Esta mancha é denominada *especulum* (WETZEL, 1985) (Fig. 3)



Figura 3: Macho de preguiça com o *especulum* nas costas (Foto: Ana Paula Melo Corrêa).

A distribuição geográfica dessas duas espécies vem sendo tema de discussão ao longo dos anos. A distribuição assumida nos trabalhos e pesquisas com essas espécies é a que se encontra na IUCN, que podem ser observadas na figura 4.

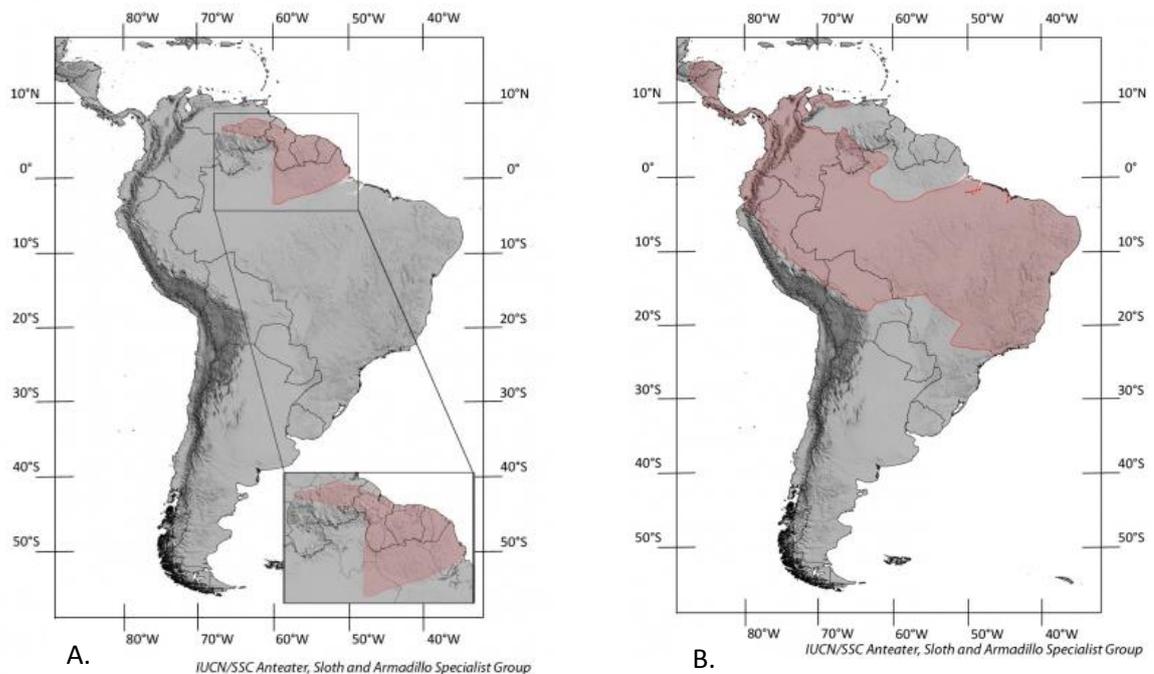


Figura 4: Distribuição geográfica das preguiças *B. tridactylus* (A) e *B. variegatus* (B).

Como pode-se observar na figura 4, as duas espécies de preguiça não ocorrem em simpatria, tendo o Rio Negro e Amazonas funcionando como barreira ao fluxo gênico entre elas, fato que podemos encontrar na literatura nos trabalhos de Gardner (2007), Aguiar & Da Fonseca (2008) e Hayssen (2009). Porém, Moraes-Barros *et al.* (2010) ao trabalhar com espécimes de museus, realizando a identificação taxonômica dos mesmos, ao verificar erros de identificação relacionados às duas espécies, afirma que *B. tridactylus* e *B. variegatus* ocorrem em simpatria, ao norte do Rio Amazonas, ou seja, na região de Manaus. Dado este já reportado por Wetzel (1985).

Gordo, Gravena e Chiesorin Neto (Comunicação Pessoal) afirmam que indivíduos da espécie *B. variegatus* não deveriam ocorrer em Manaus e antigamente apenas se encontrava a espécie *B. tridactylus* nos fragmentos florestais da cidade. Porém, assim como ocorreu na Mata Atlântica (OLIVER & SANTOS, 1991; CASSANO, 2006), na Amazônia as pessoas também tem o costume de capturar preguiças para serem mantidas como animais de estimação ou para serem utilizadas no turismo local.

Também há muitos registros de pessoas que capturam preguiças na estrada e levam para soltar nos fragmentos florestais da cidade de Manaus, como INPA, UFAM, Parque do Mindu, entre outros (DO CARMO, 2002; GORDO, GRAVENA, Comunicação Pessoal).

A principal consequência desse tipo de ação é que, atualmente, podem-se observar indivíduos de *B. variegatus* nos fragmentos florestais de Manaus e também preguiças que apresentam características morfológicas intermediárias entre as espécies *B. variegatus* e *B. tridactylus*, sendo difícil realizar uma identificação precisa dos mesmos, como por exemplo: indivíduos que apresentam cor da pelagem idêntica a *B. tridactylus* (cor da face e da garganta em amarelo dourado), porém apresentam também uma macha negra ao redor dos olhos, característica da espécie *B. variegatus*. Pensa-se que estes indivíduos possam se tratar de híbridos entre as duas espécies.

Hibridização, Introgessão e Zonas Híbridas entre Espécies

“A hibridização é um importante mecanismo evolutivo, que cria oportunidades para a adaptação e especiação, ou é apenas algum ruído evolutivo?”

(SCHWENK *et al.* 2008)

Apenas recentemente, com o avanço de técnicas moleculares, a hibridização entre os animais passou a ser vista como um evento natural, não raro e que nem sempre gera indivíduos inférteis. O uso dessas técnicas fez com que a hibridização seja vista como fonte de novas variações, novas adaptações e até de novas espécies, sendo considerada como um processo evolutivo de relevância significativa (HARRISON, 1993; BARTON, 2001; TRIGO, 2008; SCHNEIDER, 2009).

Para Schwenk *et al.* (2008), híbridos são formados quando espécies diferentes cruzam, resultando na combinação de material genético de conjunto de genes previamente isolados. Para Arnold (1997), a hibridização envolve acasalamentos, que ocorrem de forma natural, bem sucedidos, entre populações ou grupo de populações que são distinguíveis com base em um ou mais caracteres hereditários. As vantagens são que este conceito independente do conceito de espécie, as populações não necessitam estar relacionadas a categorias taxonômicas e não é necessário saber sobre a aptidão do híbrido.

De acordo com Arnold (1997), muitos autores não consideram a hibridização um processo evolutivo importante devido à redução dos níveis de viabilidade e fertilidade do híbrido. Porém, para ele, eventos raros na evolução são importantes e muitos casos de hibridização já levaram à diversificação de espécies. Pensamento esse que é comum à Schwenk *et al.* (2008), que dizem que mesmo que a frequência de hibridização seja baixa, deve continuar a ser um foco importante da biologia evolutiva, pois além de ser suficiente para causar mudanças na estrutura genômica das espécies, a hibridização também oferece um cenário natural para estudar de forma eficiente a interação entre diferenciação genética e ecológica.

A hibridização pode se caracterizar pela ocorrência de eventos esporádicos entre espécies simpátricas, pela formação de zonas híbridas estreitas entre populações com distribuição parapátrica, ou de um intenso processo de miscigenação entre as populações parentais (HARRISON, 1993; SCHNEIDER, 2009). Zonas híbridas são locais na natureza onde duas populações de indivíduos que são distintos em função de um ou mais caracteres hereditários se sobrepõem espacialmente e temporalmente, acasalando e produzindo algum descendente fértil (ARNOLD, 1997; DIAS, 2013).

Várias zonas híbridas tem sido registradas em vertebrados, desde casos com poucos indivíduos híbridos identificados até zonas intensamente introgridas, levando a formação de *hybrid swarm* (enxame híbrido), responsável pela formação de novas espécies (SCHNEIDER, 2009). Casos de hibridização e zonas híbridas são reportados para peixes (AMADO, 2008), anuros (SIMÕES *et al.* 2012), pássaros (GRANT & GRANT, 1992) e mamíferos como:

felídeos (TRIGO, 2008; SCHNEIDER, 2009; DIAS, 2013), primatas (DETWILER *et al.* 2005; BICCA-MARQUES *et al.* 2008;), lobos (WILSON *et al.* 2009) e em recente trabalho, Gravena *et al.* (2015) encontraram ocorrência de hibridização entre botos na Amazônia.

É importante analisar as consequências evolutivas da recombinação entre genomas divergentes. Alguns genótipos híbridos frequentemente demonstram níveis equivalentes de aptidão em relação aos seus pais. Sugerindo que, ao contrário do que se pensava antigamente, esses híbridos são propensos a persistir por longos períodos de tempo, invadir novos habitats ou gerar linhagens evolutivas (ARNOLD, 1997).

O primeiro passo na investigação da hibridização é a correta identificação dos prováveis indivíduos híbridos para conhecimento dos futuros padrões evolutivos envolvidos (TRIGO, 2008). Após a identificação precisa dos prováveis híbridos, é importante conhecer a viabilidade do híbrido, verificando a existência de introgressão genética, que se refere ao fluxo gênico entre duas formas distintas, como resultado de eventos recorrentes de hibridização e retrocruzamentos (RHYMER & SIMBERLOFF, 1996).

Atualmente, com a utilização de marcadores moleculares atrelada às análises morfológicas, pode-se estudar a fundo a hibridização, a fim de identificar indivíduos híbridos e suas respectivas espécies parentais (SCHWENK *et al.* 2008; NASCIMENTO *et al.* 2012). A disponibilidade dessas técnicas moleculares aumentou o interesse em estudar fenômenos de especiação, permitindo inferências sobre os efeitos da seleção natural e resultado dos episódios de hibridização (ARNOLD, 1997; BARTON, 2001).

Marcadores Moleculares

O desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) - Reação em Cadeia da Polimerase – que multiplica em escala exponencial a quantidade de DNA de uma amostra (MULLIS & FALOONA, 1987), permitiu um avanço significativo da utilização de marcadores moleculares para diversos estudos genéticos a nível individual e populacional (PARKER *et al.* 1998).

Os marcadores moleculares estão ganhando cada vez mais uma importância nas descobertas, tendo propósito de validar, inquirir ou complementar modelos vigentes,

abordando problemas que as metodologias tradicionais não conseguem (PEREIRA JR., 2007).

Marcadores moleculares que tem sido utilizados para estudos genéticos de diversidade (PEREIRA JR., 2007), relações evolutivas entre espécies, como é o caso da hibridização, e populacionais são os que apresentam locos nucleares altamente polimórficos como os microssatélites, sequências de DNA mitocondrial, entre outros (TRIGO, 2008; SCHNEIDER, 2009). Para o presente estudo serão utilizados como marcadores moleculares a região controle do DNA mitocondrial (Dloop) e marcadores microssatélites do DNA nuclear, descritos a seguir.

DNA Mitocondrial: A Região Controle (Dloop)

O uso de marcadores moleculares tem se mostrado um importante aliado na identificação precisa de indivíduos (CASTRO, 2012). Através de sequências nucleotídicas, a identificação molecular pode ser feita utilizando fragmentos de tecido, como sangue, pelo, carne, ossos, etc. (JACQUES, 2005).

O DNA mitocondrial (DNAMt) é uma molécula circular fechada com tamanho entre 15 e 20kb, de replicação independente do DNA nuclear. É bastante utilizado em estudos genéticos por seu grande número de cópias por célula e facilidade em isolá-lo, sendo importante aliado na identificação taxonômica (JACQUES, 2005). O DNAMt possui herança estritamente materna sendo transmitido sem recombinações, o que facilita estudos relacionados à genealogia (AVISE *et al.* 1984). Essas vantagens do DNAMt facilitam a identificação de espécies.

A região controle do DNAMt, também chamada de Dloop, é a maior região não codificadora, responsável pelo controle da replicação da fita pesada e transcrição de ambas fitas do DNAMt (AVISE *et al.* 1987), também é considerada a região mais variável do genoma mitocondrial dos animais. Como essa região não possui um mecanismo de reparo efetivo, sua taxa de mutação é mais alta do que a dos genes que codificam proteínas mitocondriais, acumulando mutações, sendo altamente polimórfica (IEVORLINO *et al.* 2009), o que a torna boa ferramenta para estudos populacionais (SANTOS *et al.* 2007).

DNA Nuclear: Os Marcadores Microsatélites

Regiões microsatélites, também chamados SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*), consistem em sequências de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas em tandem, que povoam densamente os genomas eucariotos (HAMADA *et al.* 1982; GOLDSTEIN & SCHLOTTNER, 1999; CAIXETA *et al.* 2009).

Os *loci* microsatélites possuem alta taxa de mutação, exceto nas regiões flangeadoras, gerando altos níveis de polimorfismo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Essa alta taxa de mutação pode ser explicada pelo *crossing over* desigual, em que ocorre um erro no alinhamento entre cromossomos homólogos, e pelos deslizamentos da DNA polimerase, que pode resultar em deleção ou duplicação de repetições microsatélites durante a replicação (TAUTZ & RENZ, 1984).

As sequências de DNA que flanqueiam os microsatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de *primers* específicos que a amplificam, via PCR (CAIXETA *et al.* 2009). Devido à homologia das sequências flangeadoras, os *loci* desenvolvidos para uma espécie também podem ser utilizados na amplificação de sequências em espécies relacionadas (MOORE *et al.* 1991).

Os microsatélites podem ser classificados quanto ao número de nucleotídeos encontrados em cada repetição (mono, di, tri, etc.) (QUELLER *et al.* 1993) e em quatro classes de acordo com a composição, segundo Goldstein & Schlötterer (1999): perfeitos, quando as sequências de bases são repetidas sem interrupção; imperfeitos, quando uma base não se encaixa em uma ou mais repetições; interrompidos, quando ocorre inserção de bases na estrutura repetitiva ; e compostos, quando microsatélites com diferentes sequências encontram-se adjacentes.

Entre os marcadores moleculares, os microsatélites são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação polimórfica, encontrados em regiões não codificadoras do genoma e, por isso, chamados de marcadores neutros (FERREIRA & GRATTAPAGLIA).

A vantagem dos *loci* microsatélites em estudos de hibridização é que esses marcadores biparentais são altamente polimórficos, sendo variáveis o suficiente para permitir a identificação inequívoca de todos os espécimes amostrados e a realização de análises estatísticas de associação dos indivíduos às suas populações de origem (SCHNEIDER, 2009).

Técnicas moleculares tem tido um desenvolvimento significativo, contribuindo para o esclarecimento de vários aspectos da biologia, ecologia, biogeografia e evolução dos mais

variados grupos biológicos, sendo hoje consideradas ferramentas fundamentais para aquisição de novos conhecimentos (PEREIRA JR., 2007).

A utilização de marcadores moleculares na identificação individual e análise genética de populações tem se mostrado de extrema utilidade para um estudo preciso que vise gerar dados empíricos sobre os padrões de hibridização e introgressão entre espécies e suas possíveis consequências na estrutura genética e evolução (RIESEBERG & ELLSTRAND, 1993; DIAS, 2013).

Como evento natural na natureza, a hibridização não é uma ameaça à conservação das espécies, sendo considerada parte de suas histórias evolutivas. A hibridização se torna um problema quando é consequência de ações antropogênicas, sendo necessárias medidas urgentes de manejo para impedir um comprometimento da integridade genética das espécies (RHYMER & SIMBERLOFF, 1996; ALLENDORF *et al*, 2001; TRIGO, 2008). Neste contexto, a avaliação de eventos de hibridização, juntamente com análises de viabilidade dos híbridos, trazem informações de fundamental importância para a conservação das espécies (ALLENDORF *et al*, 2001).

Com isso, pode-se perceber a importância de uma correta identificação dos espécimes de preguiças encontrados em Manaus, verificando se há ocorrência de hibridização entre eles e assim, contribuir para um melhor conhecimento genético e biológico das espécies *B. tridactylus* e *B. variegatus*, necessários à conservação das mesmas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar as espécies de preguiças *Bradypus tridactylus* e *Bradypus variegatus* encontradas nos fragmentos florestais do município de Manaus, Amazonas - Brasil, verificando se há ocorrência de eventos de hibridização entre elas.

Objetivos Específicos

- Testar a utilização de pelos e carrapatos como amostras de coleta não invasiva para extração de DNA de bichos preguiça;
- Realizar teste de transferabilidade de *primers* microssatélites desenvolvidos para *B. variegatus* em *B. tridactylus*;
- Caracterizar a espécie *B. variegatus* proveniente da área controle, utilizando a região controle mitocondrial (Dloop) e marcadores microssatélites;
- Identificar indivíduos de preguiça encontrados nos fragmentos florestais em Manaus, verificando se há ocorrência de hibridização entre as duas espécies, utilizando marcadores mitocondrial (Dloop) e nuclear (microssatélites);
- Detectar a direcionalidade da hibridização;
- Verificar se há fertilidade dos indivíduos híbridos, estimando a ocorrência de endo e retrocruzamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das Amostras e Área de Estudo

Para o presente estudo foram utilizadas amostras de indivíduos de preguiça do gênero *Bradypus* coletadas em campo ou provenientes de instituições que recebem preguiças resgatadas dos fragmentos florestais de Manaus. Como é o caso do Sauim-Castanheiras, instituição da Secretaria Municipal do Meio Ambiente, que recebe animais encontrados perto de residências e auxilia no resgate da fauna quando algum empreendimento precisa derrubar um trecho de mata urbana. Os animais resgatados são levados à sede desta instituição, onde são reabilitados quando necessário e posteriormente soltos, quando possível, perto da região de onde foram resgatados.

Também foram utilizadas amostras da Coleção de Tecidos de Genética Animal (CTGA) do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) da Universidade Federal do Amazonas, coletadas ao longo dos anos por pessoas do laboratório em expedições de campo.

A coleta do material biológico, utilizado para extração de DNA, dependeu das condições em que se encontravam os animais. De animais vivos foram retiradas amostras de pelos com bulbo, ectoparasitas (carrapatos) e sangue, quando possível. De animais mortos, frescos ou congelados, foi retirado tecido epitelial, geralmente da orelha ou fígado. As amostras de pelo foram estocadas em envelopes individuais, os ectoparasitas foram guardados em frascos com álcool 95%, as amostras de sangue foram congeladas em tubos do tipo *vacutainer* com anticoagulante EDTA ou tubos com álcool 95% e as amostras de tecido foram colocadas em frascos com álcool, guardadas em freezer.

As amostras coletadas foram depositadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal do LEGAL, onde foram realizados os procedimentos laboratoriais necessários à pesquisa. Foram utilizados um total de 32 amostras, sendo sete indivíduos encontrados na margem direita do Rio Negro, considerados como *B. variegatus*, de acordo com características morfológicas e distribuição descrita para a espécie, por isso foram utilizados como indivíduos controle dessa espécie. Um indivíduo encontrado na estrada AM-10 em direção a Itacoatiara, considerado como *B. tridactylus*, de acordo com a distribuição da espécie e por estar fora dos fragmentos florestais da cidade de Manaus, foi utilizado como controle dessa espécie e, 24

indivíduos distribuídos pelos fragmentos florestais do município de Manaus, sendo identificados morfológicamente como *B. tridactylus*, *B. variegatus* ou ainda como *Bradypus* sp., quando não era possível a identificação morfológica dos mesmos (Fig. 5).

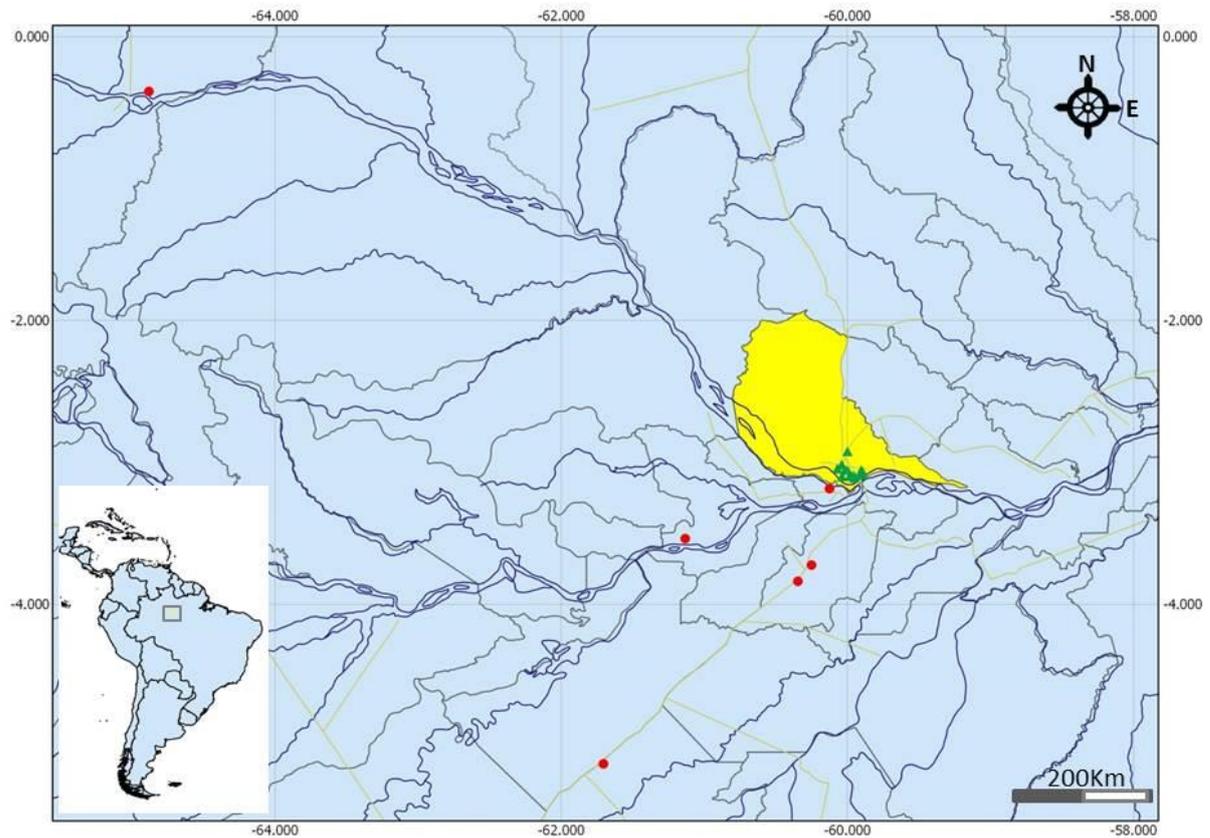


Figura 5: Mapa esquemático de distribuição das amostras coletadas. Em que bolinhas vermelhas indicam indivíduos de *B. variegatus* da área controle (Sul do Rio Negro e Amazonas) e triângulos verdes indicam indivíduos encontrados em Manaus (Norte do Rio Negro e Amazonas). Destaque em amarelo para os limites do município de Manaus.

Identificação Morfológica

A identificação morfológica dos indivíduos foi estabelecida com base em caracteres diagnósticos, descritos em trabalhos anteriores (WETZEL, 1985; HAYSSSEN, 2009; MEDRI *et al.* 2012) como a cor da pelagem e diferenças na face das espécies e conhecimento de campo. Indivíduos com caracteres intermediários entre as duas espécies foram assumidos

como *Bradypus* sp., possuindo apenas a identificação molecular. Sempre que possível foram feitos registros fotográficos para posteriores análises. No caso das amostras da coleção de tecidos do LEGAL, foi assumida a identificação morfológica presente nos registros da coleção.

Extração de DNA

Para realização da extração de DNA de pelos, foram utilizados de 8 a 12 bulbos capilares por indivíduo. Para sangue e tecido foi utilizado 0,3 mL e 3 mm³, respectivamente. No caso dos carrapatos, foi realizado um corte transversal na sua parte posterior, utilizando-se do sangue presente no mesmo, descartando-se a carapaça. O DNA foi isolado por digestão utilizando-se Proteinase K e CTAB 2%, seguido de lavagens com clorofórmio, álcool isoamílico e álcool 70%, segundo protocolo (DOYLE & DOYLE, 1987).

Amplificação e Sequenciamento da Região Controle (Dloop)

O DNA extraído foi amplificado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se um par de *primers* que flanqueiam parte da região controle do DNA mitocondrial, Dloop-F2 (5'-GGAAATCAGCAACCCATCC-3') e DloopBra-R2 (5'-CATGTCCTGTAACCATGAC-3'), desenvolvidos para o presente estudo. A reação de amplificação foi composta por: 1,8µL de MgCl₂ (25mM); 1,5µL de tampão *taq* buffer 10x (750 mM Tris-HCL-pH 8.8 a 25°C, 200 mM (NH₄)₂ SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20); 1,2µL de dNTPs (10mM); 1,5µL de *primer* (F); 1,5µL de *primer* (R); 0,3µL de 2,0 U *Taq* DNA polimerase; 1,0 de DNA genômico (40ng/µL) de cada indivíduo. O volume final da reação foi ajustado para 15µL com água deionizada autoclavada.

A reação foi submetida às seguintes etapas de amplificação: 92°C por 1 minuto para desnaturação das fitas complementares de DNA, seguidos de 35 ciclos de 92°C (1 minuto), 55°C para fixação dos *primers* (35 segundos), 72°C (60 segundos) para atividade da *Taq* polimerase. Após o término dos ciclos, a reação foi submetida a uma extensão final dos fragmentos amplificados do DNA a 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos amplificados foram purificados (para remoção de restos de reagentes não utilizados) utilizando-se as enzimas Exonuclease e Fosfatase Alcalina, segundo protocolo de Werle *et al.* (1994). O DNA purificado foi utilizado na reação de sequenciamento, realizada com o Kit de reação Big Dye Terminator (*Applied Biosystems*), utilizando protocolo de acordo com o fabricante. As amostras foram sequenciadas com os *primers* Dloop-F2 e DloopBra-R2, utilizados na reação de PCR, em ambas as direções.

A reação foi preparada em placas com 96 poços, específica para eletroinjeção no sequenciador. Em seguida levada ao termociclador por 25 ciclos com o seguinte perfil de temperatura: 20 segundos à 95°C com o intuito de desnaturar as fitas complementares, 15 segundos à 50°C, para a fixação do *primer* e 1 minuto à 60°C para a extensão da região a ser sequenciada.

Após esta etapa, a reação foi precipitada com EDTA 125 mM, álcool 100% e álcool 70%. Em seguida, foi colocado 10µL de formamida e posteriormente injetado no sequenciador ABI 3130 (*Applied Biosystems*).

Amplificação e Genotipagem dos Microssatélites

Para o presente estudo foram utilizados *loci* microssatélites, isolados e caracterizados por Moss *et al.* (2012) para a espécie de preguiça *Bradypus variegatus*. Esses marcadores microssatélites correspondem a 10 *loci* polimórficos (B11, B107, B111, D3, D102, D105, D113, D114, D117 e D119) de 144 a 309 pb, sendo suficientes para identificação individual, análise de estrutura populacional e paternidade, segundo os autores.

A reação de amplificação foi composta por: 1,2µL de MgCl₂ (25mM); 1,0µL de tampão *taq* buffer 10x (750 mM Tris-HCL-pH 8.8 a 25C°, 200 mM (NH₄)₂ SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20); 1,0µL de dNTPs (10mM); 0,5µL de *primer* (F); 1,0µL de *primer* (R); 0,5µL de *primer* fluorescente (PM13); 0,3µL de 2,0 U *Taq* DNA polimerase; 1,0 de DNA genômico (40ng/µL) de cada indivíduo. O volume final da reação foi ajustado para 10µL com água deionizada autoclavada.

A reação foi submetida às seguintes etapas de amplificação dos fragmentos microssatélites: 94°C por 1 minuto para desnaturação das fitas complementares de DNA, seguidos de 35 ciclos de 94°C (20 segundos), temperatura para fixação do *primer* (20 segundos) e 72°C (20 segundos) para atividade da *Taq* polimerase.

Em seguida, foram realizadas etapas para fixação do *primer* fluorescente M13 (SCHUELKE, 2000): 20 ciclos de 94°C (20 segundos), seguidos de 53°C para fixação do *primer* (20 segundos) e 72°C para extensão (30 segundos). Após o término dos ciclos, a reação foi submetida a uma extensão final dos fragmentos amplificados do DNA à 72°C por 30 minutos.

Para cada 1µL do produto de PCR, foi acrescentado 8µL de formamida e 1µL de ET-400 Rox (marcador de tamanho) para realização da reação de genotipagem, no sequenciador ABI 3130 (*Applied Biosystems*). Os resultados obtidos foram analisados no *software GeneMapper*, onde foi identificado o genótipo de cada *locus* para cada indivíduo. Na sequência foi montada uma matriz com os dados dos alelos de cada indivíduo para posteriores análises.

Teste de Transferabilidade dos *Primers* de Microsatélites

As extremidades de um *loci* microsatélite, chamadas regiões flangeadoras, apresentam sequências de DNA altamente conservadas, tornando possível a amplificação de *primers* desenvolvidos para uma espécie em espécies relacionadas (MOORE *et al.* 1991). Portanto, foi realizado um teste de tranferabilidade de *primers* de microsatélites da espécie *B. variegatus* para *B. tridactylus*. As reações de amplificação e genotipagem foram as mesmas descritas acima. Os testes foram realizados utilizando-se as temperaturas de fixação de cada *primer* para a espécie descrita.

Análise de Dados

DNA mitocondrial

As sequências geradas foram submetidas ao programa GENEIOUS (DRUMMOND *et al.* 2012), onde foram editadas e alinhadas manualmente. As sequências do gene mitocondrial *Dloop* foram utilizadas para identificação molecular dos indivíduos estudados.

Para obter informações sobre as relações filogenéticas entre os indivíduos, foi utilizado o programa MEGA 5 (TAMURA *et al.* 2011) para gerar uma árvore Neighbor-Joining (NJ) (SAITOU & NEI, 1987), baseada nas distâncias genéticas entre os indivíduos, em que se utilizou o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980).

A Análise Bayesiana de Estrutura Populacional foi implementada no programa BAPS 5.0 (CORANDER, 2008) para encontrar agrupamentos biológicos formados com as sequências obtidas, verificando a estruturação intra e interpopulacional.

DNA nuclear (Microssatélites)

Para o teste de transferabilidade, foi utilizado o programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) para obter informações sobre parâmetros genéticos como heterozigidade observada (H_o) e esperada (H_e), desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci* e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para correção dos níveis de significância foi utilizado o método de Bonferroni (RICE, 1989). Para verificação de alelos nulos, foi utilizado o programa Micro-Checker v 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.* 2004).

Foi realizada uma análise Bayesiana por meio do programa STRUCTURE 2.0 (PRITCHARD & WEN, 2003), em que foi feita a identificação do número de populações (K) geneticamente homogêneas, assumindo equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) e ausência de desequilíbrio de ligação (DL) entre os *loci* analisados dentro de cada população. As análises foram realizadas usando o modelo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) de 100.000 repetições após um período de *burn-in* de 10.000 interações, utilizando o modelo de ancestralidade “*admixture*”.

Para o valor de K selecionado foi avaliada a proporção média de adesão (q) de cada indivíduo amostrado pertencer a um dos *clusters* inferidos, em que foi assumido um valor de $q \geq 0.90$ como limite para diferenciar indivíduos puros de híbridos. Indivíduos com $q \geq 0.90$ foram assumidos como puros de *B. tridactylus* ou *B. variegatus*; indivíduos com proporção média de $q = 50\%$ de proporção de pertencer a um dos *clusters* foram assumidos como híbridos de primeira geração (F1); Indivíduos que apresentaram $q \geq 25\%$ e \leq a 75% de pertencer a algum dos *clusters* foram assumidos como híbridos de segunda geração (F2), o que indica se há fertilidade do híbrido; e indivíduos que obtiveram proporção de q variando entre 80% a 89% a algum dos *clusters* foram assumidos como resultado de retrocruzamento.

RESULTADOS

Pelos e Carrapatos como Método de Amostra Não Invasiva

Para o presente estudo foram utilizados pelos e carrapatos como amostras não invasivas para obtenção de DNA de bichos preguiça, sendo amostras de sangue e tecido utilizadas como amostras controle (Fig. 6). Os dois tipos de amostras, invasivas e não-invasivas, funcionaram bem para os marcadores utilizados, região controle do DNA mitocondrial (Dloop) e 10 *loci* microssatélites.

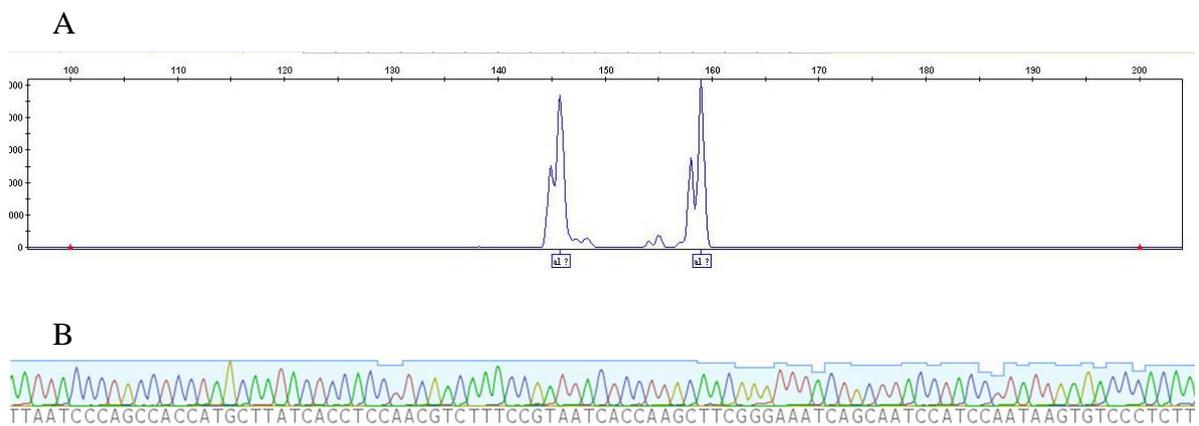


Figura 6: Resultado da genotipagem (A) e sequência mitocondrial (B) obtidas a partir de amostras de sangue e tecido de bicho preguiça.

As amostras de pelo, quando coletadas com bulbo e guardadas adequadamente, mostraram-se uma boa alternativa à coleta de amostras biológicas quando não for possível a coleta de tecido, pois amplificam bem em qualquer marcador (Fig. 7).

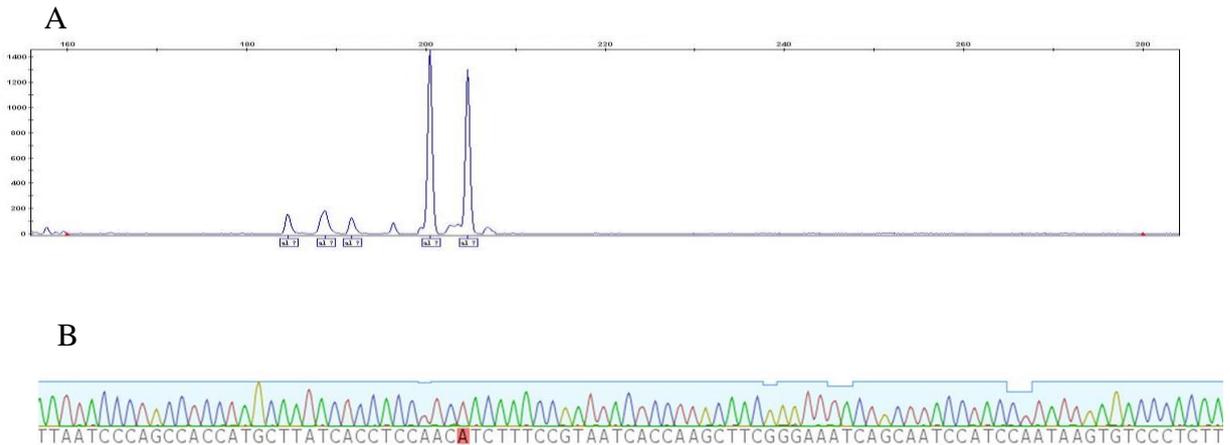


Figura 7: Resultado da genotipagem (A) e sequência mitocondrial (B) obtidas a partir de amostras de pelo de bicho preguiça.

As amostras de carrapato, também se mostraram uma boa alternativa à coleta de amostras biológicas (Fig. 8), porém neste caso recomenda-se a coleta de carrapatos fêmea, devido ao seu ciclo de vida e por necessitarem de uma quantidade maior de sangue do animal que parasitam, para alimentar os ovos. Neste caso também é necessário que o marcador utilizado seja o mais específico possível para a espécie estudada, pois há possibilidade de amplificação do DNA do carrapato caso seja um marcador de uso amplo.

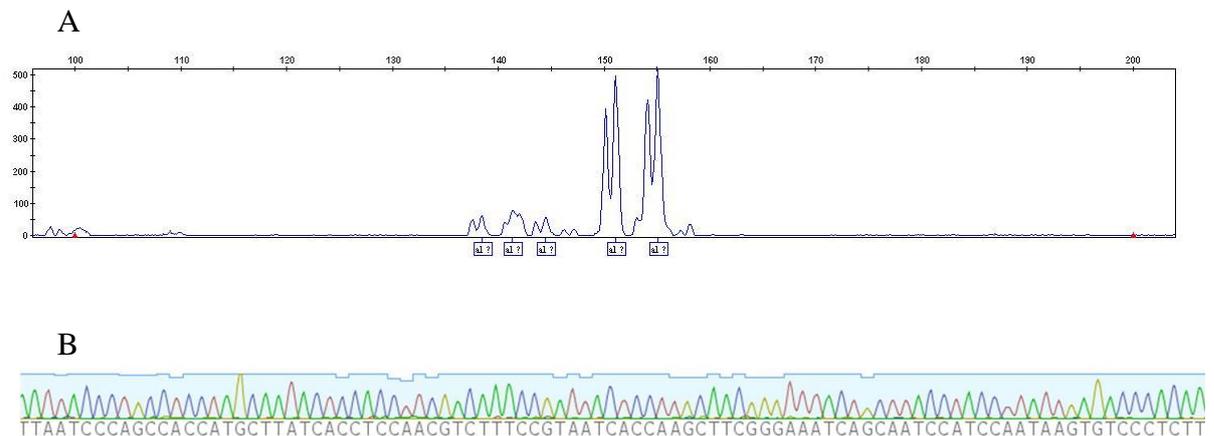


Figura 8: Resultado da genotipagem (A) e sequência mitocondrial (B) obtidas a partir de amostras de carrapatos de bicho preguiça.

Também foi observado que, apesar de nos dois casos a amplificação não ter funcionado em alguns *loci* microssatélites, as amostras de carrapato foram as que menos houve amplificação, deixando lacunas na obtenção dos resultados e por isso, as amostras que

não amplificaram para a maioria dos *primers* foram descartadas das análises realizadas no presente estudo.

Identificação Morfológica

Das 32 amostras utilizadas neste estudo, foram morfológicamente identificados nove indivíduos da espécie *B. variegatus*, sendo sete indivíduos da região controle (margem direita dos Rios Negro e Amazonas), e dois da região de Manaus, dezoito indivíduos como *B. tridactylus* e cinco indivíduos como *Bradypus* sp., encontrados na região de Manaus. A identificação foi realizada com base em caracteres diagnósticos das espécies, como cor da pelagem da garganta, padrão de manchas na face e cor da pelagem da face.

Nos indivíduos puros, a cor da pelagem da garganta de *B. variegatus* é marrom, sua face se diferencia principalmente pela mancha preta ao redor dos olhos em formato de óculos e pelagem ao redor da face na cor amarelo pálido (Fig. 9). Já os indivíduos de *B. tridactylus*, tem pelagem da garganta de cor amarela e a pelagem ao redor da face é na cor amarelo dourado. *B. tridactylus* não possui a mancha preta ao redor dos olhos (Fig. 10).



Figura 9: Indivíduo da espécie *B. variegatus*. Foto: Ana Paula Melo Corrêa, AM-70.



Figura 10: Indivíduo da espécie *B. tridactylus*. Foto: Equipe Iracema Falls, BR-174.

Indivíduos que apresentaram características intermediárias entre as duas espécies foram assumidos como *Bradypus* sp., como o exemplo do indivíduo da fig. 11, que possui pelagem da garganta de cor clara característica de indivíduos de *B. tridactylus*, pelagem da face na cor amarelo pálido e manchas negras ao redor dos olhos, como dos indivíduos de *B. variegatus*, porém não tão evidentes quanto o padrão da espécie.

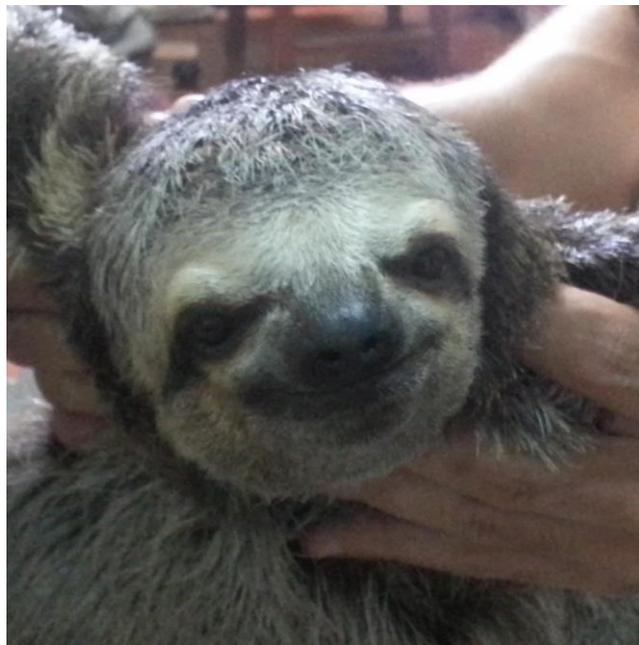


Figura 11: Indivíduo com características das duas espécies de preguiça, *B. variegatus* e *B. tridactylus*.
Foto: Ana Paula Melo Corrêa, UFAM- Manaus.

Para as análises moleculares, os indivíduos foram agrupados por localidades. A localidade 1 agrupa indivíduos encontrados na região controle da espécie *B. variegatus*, ou seja, indivíduos pertencentes ao sul do Rio Negro e Amazonas. A localidade 2 agrupa indivíduos encontrados na região de Manaus, ou seja, norte do Rio Negro e Amazonas (Fig. 5), região que teoricamente abrigaria somente indivíduos de *B. tridactylus*.

Identificação Mitocondrial - Dloop

Foram analisados 377 pb da região controle do DNAm (Dloop), amplificada para as 32 amostras utilizadas. A análise filogenética pelo método Neighbor-Joining (NJ) mostra a existência, bem suportada, de duas linhagens distintas agrupadas em dois clados: (a) norte do Rio Negro e Amazonas, ou seja, indivíduos encontrados na região de Manaus, todos com DNAm de *B. tridactylus*; e (b) Sul do Rio Negro e Amazonas, indivíduos com DNAm de *B. variegatus*. Neste último clado ainda pode-se observar a separação de duas linhagens distintas: 1- um indivíduo da AM-70 (5690) com dois indivíduos *B. variegatus* encontrados em Manaus (5688 e 5682), e 2- uma linhagem que agrupou os demais indivíduos de *B. variegatus* da região controle da espécie (Fig. 12).

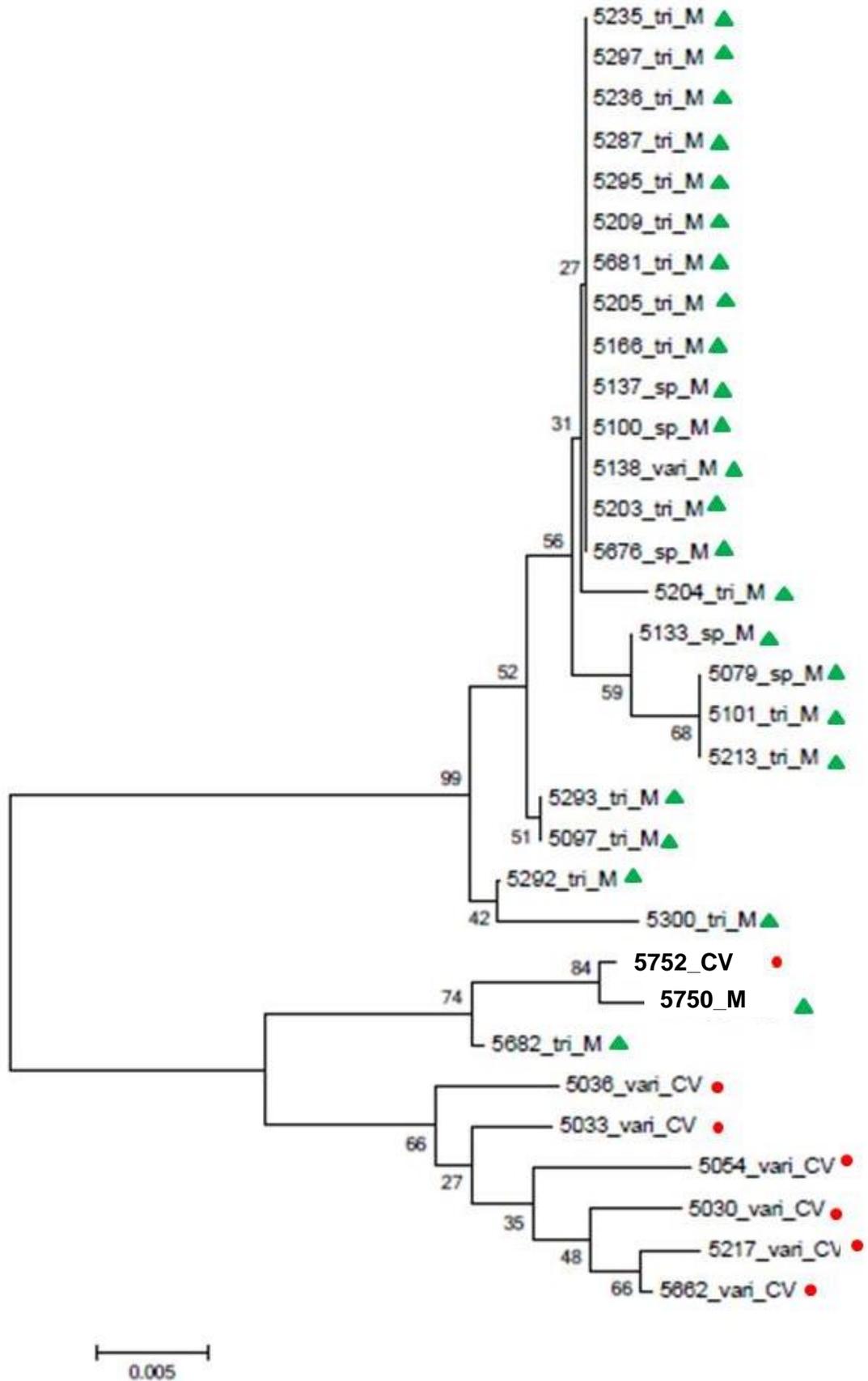


Figura 12: Árvore filogenética dos indivíduos das espécies *B. tridactylus* e *B. variegatus*. Círculos verdes indicam indivíduos encontrados na região de Manaus e círculos vermelhos indicam indivíduos encontrados na região controle da espécie *B. variegatus*.



Figura 13: Gráfico de barras gerado pelo programa BAPS, em que se observam três grupos biológicos, sendo os grupos azul e vermelho pertencentes a espécie *B. variegatus* e o grupo verde pertencente a espécie *B. tridactylus*.

Identificação Nuclear – Microssatélites

Os marcadores microssatélites desenvolvidos para *B. variegatus* foram testados na espécie *B. tridactylus*, obtendo bom resultado de amplificação. Demonstrando que podem ser utilizados para estudos populacionais da mesma. Essa transferabilidade deve estar relacionada ao grau de parentesco entre as espécies estudadas.

Foram analisados 10 *loci* microssatélites para os 32 indivíduos encontrados. Medidas de diversidade genética encontradas podem ser observadas na tabela 1. Todos os *loci* foram polimórficos para as duas espécies tendo o número de alelos por *locus* variando de 05 a 11 para *B. variegatus* e de 02 a 08 para *B. tridactylus*. Os *loci* analisados não apresentaram desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg, nem desequilíbrio de ligação. O programa Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT *et al.* 2004) não evidenciou nenhum problema relacionado a ocorrência de alelos nulos.

Tabela 1: Informações sobre os 10 *loci* microssatélites utilizados. (N) número de indivíduos, (A) número de alelos, (He) heterozigosidade esperada e (Ho) heterozigosidade observada. $P < 0,05$.

| | <i>Bradypus variegatus</i> | | | | <i>Bradypus tridactylus</i> | | | |
|------|----------------------------|----|---------|---------|-----------------------------|---|---------|---------|
| | N | A | He | Ho | N | A | He | Ho |
| B11 | 9 | 9 | 0.88889 | 0.88889 | 9 | 5 | 0.67974 | 0.66667 |
| B107 | 9 | 8 | 0.84967 | 0.88889 | 9 | 4 | 0.79085 | 0.88889 |
| B111 | 9 | 9 | 0.83660 | 0.88889 | 9 | 4 | 0.73856 | 0.77778 |
| D3 | 8 | 4 | 0.59167 | 0.75000 | 9 | 6 | 0.62745 | 0.66667 |
| D102 | 8 | 10 | 0.86667 | 0.75000 | 8 | 7 | 0.84167 | 0.50000 |
| D105 | 9 | 6 | 0.81046 | 0.33333 | 7 | 2 | 0.26374 | 0.00000 |
| D113 | 9 | 10 | 0.91503 | 1.00000 | 9 | 8 | 0.86928 | 1.00000 |
| D114 | 7 | 10 | 0.94505 | 0.71429 | 9 | 5 | 0.73203 | 0.55556 |
| D117 | 7 | 5 | 0.82418 | 0.42857 | 9 | 8 | 0.89542 | 0.55556 |
| D119 | 7 | 11 | 0.96703 | 0.71429 | 9 | 8 | 0.87582 | 0.55556 |

Através da análise bayesiana de dados de microssatélites pelo programa STRUCTURE, verificou-se que o número de grupos biológicos geneticamente distintos com maior probabilidade posterior foi de $K=2$ ($\log = -1406,83$) (Fig. 14).

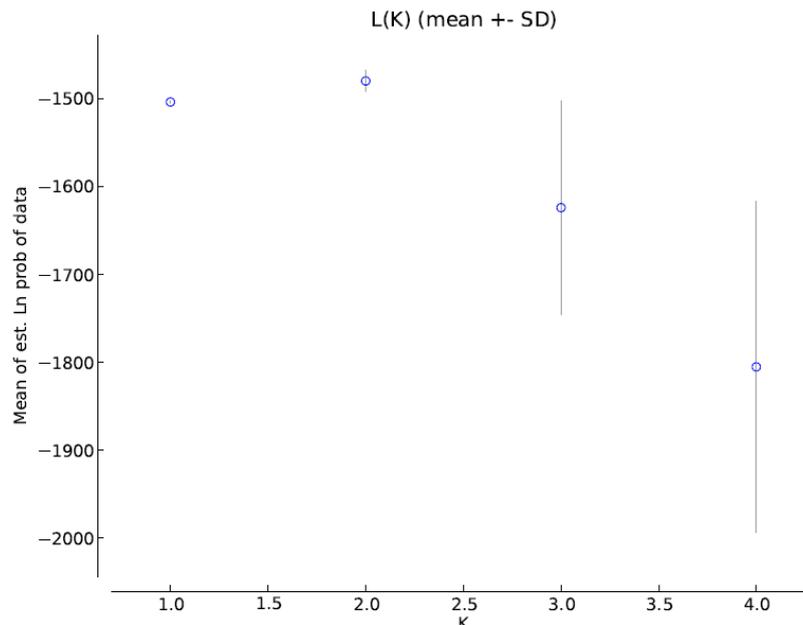


Figura 14: Gráfico de barras gerado pelo programa STRUCTURE, que mostra maior probabilidade de $K=2$.

caracterizado como pertencente à *B. tridactylus*. Nove desses indivíduos foram identificados como animais puros, e estes foram encontrados em fragmentos florestais de Manaus, os outros onze indivíduos possuíram diferentes valores de associação (q) aos genótipos puros, sendo considerados híbridos (5138, 5293, 5292, 5079, 5097, 5100, 5133, 5137, 5300, 5295 e 5297), todos também encontrados em fragmentos florestais de Manaus. Os valores de associação obtidos para cada indivíduo de cada *cluster* podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2: Proporção de associação (q) dos genótipos de cada indivíduo aos *clusters* inferidos pelo programa STRUCTURE.

| Amostra | Cluster 1 | Cluster 2 |
|-------------|-----------|-----------|
| CTGA_M_5217 | 0.044 | 0.956 |
| CTGA_M_5030 | 0.066 | 0.934 |
| CTGA_M_5033 | 0.035 | 0.965 |
| CTGA_M_5036 | 0.022 | 0.978 |
| CTGA_M_5752 | 0.013 | 0.987 |
| CTGA_M_5054 | 0.015 | 0.985 |
| CTGA_M_5662 | 0.020 | 0.980 |
| CTGA_M_5750 | 0.029 | 0.971 |
| CTGA_M_5676 | 0.047 | 0.953 |
| CTGA_M_5203 | 0.099 | 0.901 |
| CTGA_M_5682 | 0.038 | 0.962 |
| CTGA_M_5138 | 0.374 | 0.626 |
| CTGA_M_5293 | 0.405 | 0.595 |
| CTGA_M_5292 | 0.538 | 0.462 |
| CTGA_M_5079 | 0.808 | 0.192 |
| CTGA_M_5097 | 0.484 | 0.516 |
| CTGA_M_5100 | 0.888 | 0.112 |
| CTGA_M_5133 | 0.153 | 0.847 |
| CTGA_M_5137 | 0.113 | 0.887 |
| CTGA_M_5101 | 0.914 | 0.086 |
| CTGA_M_5166 | 0.938 | 0.062 |
| CTGA_M_5204 | 0.912 | 0.088 |
| CTGA_M_5205 | 0.948 | 0.052 |
| CTGA_M_5213 | 0.100 | 0.900 |
| CTGA_M_5300 | 0.815 | 0.185 |
| CTGA_M_5681 | 0.954 | 0.046 |
| CTGA_M_5209 | 0.926 | 0.074 |
| CTGA_M_5295 | 0.584 | 0.416 |
| CTGA_M_5287 | 0.927 | 0.073 |
| CTGA_M_5236 | 0.979 | 0.021 |
| CTGA_M_5235 | 0.943 | 0.057 |
| CTGA_M_5297 | 0.775 | 0.225 |

Na tabela 3 pode-se observar os resultados encontrados neste estudo, com nome da amostra, procedência, identificação morfológica, identificação nuclear e identificação mitocondrial. Ao final foram identificados: nove indivíduos de *B. variegatus*, sendo sete da região controle e dois encontrados em Manaus, nove indivíduos de *B. tridactylus* e quatorze indivíduos híbridos, todos encontrados nos fragmentos florestais da região de Manaus.

Tabela 3: Resultados de identificação do presente estudo. Bolinhas vermelhas indicam indivíduos de *B. variegatus*, triângulos verdes indicam *B. tridactylus* e quadrados azuis indicam os híbridos encontrados.

| Amostra | Procedência | Identificação Morfológica | Identificação Nuclear | Identificação Mitocondrial |
|--------------|------------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------------|
| CTGA_M_5217● | Direita Rio Solimões | <i>B. variegatus</i> | 96% vari / 4% tri | <i>B. variegatus</i> |
| CTGA_M_5030● | BR 319 | <i>B. variegatus</i> | 93% vari / 7% tri | <i>B. variegatus</i> |
| CTGA_M_5033● | BR319 | <i>B. variegatus</i> | 97% vari / 3% tri | <i>B. variegatus</i> |
| CTGA_M_5036● | BR 319 | <i>B. variegatus</i> | 98% vari / 2% tri | <i>B. variegatus</i> |
| CTGA_M_5752● | BR AM-70 | <i>B. variegatus</i> | 99% vari / 1% tri | <i>B. variegatus</i> |
| CTGA_M_5054● | BR 319 | <i>B. variegatus</i> | 99% vari / 1% tri | <i>B. variegatus</i> |
| CTGA_M_5662● | Esquerda Rio Daraá | <i>B. variegatus</i> | 98% vari / 2% tri | <i>B. variegatus</i> |
| CTGA_M_5750● | UFAM | <i>B. variegatus</i> | 97% vari / 3% tri | <i>B. variegatus</i> |
| CTGA_M_5676■ | Coroado | <i>B. sp.</i> | 95% vari / 5% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5203■ | INPA | <i>B. tridactylus</i> | 90% vari / 10% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5682● | UFAM | <i>B. tridactylus</i> | 96% vari / 4% tri | <i>B. variegatus</i> |
| CTGA_M_5138■ | Parque das Nações | <i>B. variegatus</i> | 63% vari / 37% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5293■ | Distrito Industrial II | <i>B. tridactylus</i> | 60% vari / 40% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5292■ | Parque Rio Solimões | <i>B. tridactylus</i> | 46% vari / 54% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5079■ | INPA | <i>B. sp.</i> | 19% vari / 81% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5097■ | INPA | <i>B. tridactylus</i> | 52% vari / 48% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5100■ | INPA | <i>B. sp.</i> | 11% vari / 89% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5133■ | Cidade do Leste | <i>B. sp.</i> | 85% vari / 15% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5137■ | Corj. Rio Maracanã | <i>B. sp.</i> | 89% vari / 11% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5101▲ | INPA | <i>B. tridactylus</i> | 9% vari / 91% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5166▲ | UFAM | <i>B. tridactylus</i> | 6% vari / 94% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5204▲ | INPA | <i>B. tridactylus</i> | 9% vari / 91% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5205▲ | INPA | <i>B. tridactylus</i> | 5% vari / 95% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5213■ | Av. do Turismo | <i>B. tridactylus</i> | 90% vari / 10% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5300■ | INPA | <i>B. tridactylus</i> | 18% vari / 82% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5681▲ | UFAM | <i>B. tridactylus</i> | 4% vari / 96% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5209▲ | Saum Castanheiras | <i>B. tridactylus</i> | 7% vari / 93% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5295■ | Colônia Antônio Aleixo | <i>B. tridactylus</i> | 42% vari / 58% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5287▲ | Corj. Nova Cidade | <i>B. tridactylus</i> | 7% vari / 93% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5236▲ | Corj. Cidadão | <i>B. tridactylus</i> | 2% vari / 98% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5235▲ | Corj. Cidadão | <i>B. tridactylus</i> | 6% vari / 94% tri | <i>B. tridactylus</i> |
| CTGA_M_5297■ | AM10 | <i>B. tridactylus</i> | 22% vari / 78% tri | <i>B. tridactylus</i> |

De acordo com os resultados obtidos do DNAm, a hibridização é unidirecional, basicamente entre indivíduos machos de *B. variegatus* com fêmeas de *B. tridactylus*, pois todos os quatorze híbridos encontrados possuem DNAm de *B. tridactylus*. Dos quatorze indivíduos híbridos, quatro possuem mais de 90% do DNA nuclear de *B. variegatus* ($q > 0.90$). Os outros dez indivíduos tem DNA nuclear compartilhado entre as duas espécies, indicando que pertencem a diferentes classes genóticas e, conseqüentemente, são férteis realizando endo e retrocruzamentos.

De acordo com a proporção de associação dos indivíduos a um dos *clusters* inferidos pelo programa STRUCTURE, é possível verificar a ocorrência de dois híbridos, pertencentes a classe genotípica F1 (5292 e 5097), com proporção genotípica bem próximo de 50% pertencente a cada uma das espécies, três híbridos pertencentes a F2 (5138, 5293 e 5295) com proporção genotípica variando de 40% a 60% a cada uma das espécies, cinco híbridos resultantes de retrocruzamento com *B. variegatus* (5676, 5203, 5133, 5137 e 5213), com proporção genotípica de 85% a 90% da referida espécie e quatro híbridos resultantes de retrocruzamento com *B. tridactylus* (5079, 5100, 5300 e 5297) com proporção genotípica de 78% a 89% da referida espécie.

DISCUSSÃO

Pelos e Carrapatos como Método de Amostra Não Invasiva

A melhor amplificação foi sempre obtida das amostras de sangue e tecido. Entre os métodos não-invasivos, apesar da concentração de DNA ser mais baixa, a utilização de pelos apresentou melhor rendimento na obtenção de DNA que a de carrapato, quando comparados os produtos da PCR para diferentes os marcadores. Tanto os genótipos dos microssatélites quanto as sequências da região controle (Dloop) foram obtidos sem contaminação para os três tipos de amostras utilizadas.

Muitos trabalhos com foco em amostras não-invasivas para obtenção de DNA tem sido desenvolvidos. Isso porque os métodos não-invasivos de coleta tem se mostrado atrativos por serem de custo e dispêndio de tempo reduzidos (LACORTE *et al.* 2004) e serem relativamente de fácil coleta.

Ribeiro *et al.* (2008) também utilizando pelos como método de amostra não-invasiva, para búfalos, fez uma comparação entre diferentes protocolos de extração de DNA, comparando três regiões diferentes do animal. Como resultado, eles obtiveram que o protocolo que utiliza CTAB para extração de DNA, além de ser de baixo custo e não apresentar componentes tóxicos mostrou-se mais eficiente e a concentração de DNA obtida foi maior do que as que utilizaram fenol-clorofórmio.

A utilização de métodos de amostra não-invasiva para obtenção de DNA tem mostrado um grande potencial para os biólogos, principalmente quando se trata do estudo de espécies selvagens (WAITS *et al.* 2005), como é o caso das preguiças. Nesse caso ainda é necessária a captura do animal, porém o estresse gerado é menor, levando-se em conta que não há necessidade de coleta de sangue (amostra invasiva) e o tempo de coleta é reduzido.

Lacorte *et al.* (2004) fizeram uma comparação entre extrações de DNA de amostras não-invasivas de cavalos, utilizando pelos e células da mucosa oral (*swab*), em que os resultados de *swab* foram melhores que os obtidos por pelos, sendo mais viáveis, apesar de serem mais custosos. No caso da utilização de pelos e carrapatos o custo e dispêndio de tempo foram os mesmos, não havendo diferença nesses quesitos.

As amostras não-invasivas que mais utilizadas para estudos genéticos são: pelos (TARBELET *et al.* 1997; PILGRIM *et al.* 2005; PORTELLA, 2011), fezes

(LATHUILLIERE *et al.* 2001; PINHO *et al.* 2014) e *swab* (FERREIRA, 2012). Não foram encontrados estudos com a utilização de carrapatos como amostra não invasiva para obtenção de DNA, sendo este um método inovador que necessita ser testado em outros animais.

Hibridização e Introgessão entre *Bradypus variegatus* e *Bradypus tridactylus*

De acordo com os resultados obtidos da utilização do DNAmT, as duas espécies de preguiça da Amazônia, *B. tridactylus* e *B. variegatus*, foram agrupadas em clados separados, sendo reciprocamente monofiléticos, demonstrando que realmente se trata de duas espécies diferentes e que não há introgessão do genoma mitocondrial entre elas. Este resultado também confirma a presença de preguiças da espécie *B. variegatus* ao norte do Rio Negro como se pode observar na fig. 12, em que indivíduos encontrados em Manaus foram agrupados no clado pertencente à espécie *B. variegatus*.

As análises dos resultados obtidos pelo programa STRUCTURE, ao contrário dos resultados obtidos pelo DNAmT, mostram a evidência de ocorrência de hibridização entre as espécies *B. variegatus* e *B. tridactylus*, podendo-se perceber a intensa introgessão gênica assimétrica que ocorre entre elas, confirmando a existência de indivíduos híbridos na região de Manaus, em que se pode observar híbridos da geração F1, F2 e retrocruzantes.

Esses resultados confirmam não só a presença de preguiças da espécie *B. variegatus* ao norte do Rio Negro, ajudando a estabelecer uma correta distribuição para a espécie, concordando com dados de Wetzel (1985) e Moraes-Barros *et al.* (2010), bem como confirma que as dificuldades de identificação de indivíduos de preguiça com base nos caracteres morfológicos que se devem realmente a hibridização que ocorre entre as espécies puras, em Manaus.

Ao comparar os resultados obtidos entre o DNAmT (Dloop) e DNA nuclear (microssatélites), é possível verificar que há indivíduos que apresentam DNAmT de *B. tridactylus* e DNA nuclear com $q \geq 0.90$ de *B. variegatus* (5676, 5203 e 5213), e somente com junção dos resultados desses dois marcadores foi possível identificá-los como híbridos. Também é possível observar um indivíduo morfológicamente identificado como *B. tridactylus*, mas que possui DNAmT e nuclear de *B. variegatus* (5682). Este erro de identificação morfológica pode ter ocorrido pela falta de conhecimento da pessoa que realizou

a coleta sobre as espécies ou pela identificação ter sido baseada na distribuição das espécies, que no caso deste indivíduo foi encontrado em Manaus.

Outros casos de hibridização entre animais já foram reportados na Amazônia: entre peixes-bois (VIANNA *et al.* 2006), entre botos (GRAVENA *et al.* 2015), entre ciclídeos (AMADO, 2008), entre sapos (SIMÕES *et al.* 2012), entre felídeos (DIAS, 2013) e mais recente, foi encontrado hibridização entre primatas, também na região de Manaus (de OLIVEIRA, 2014). Estes trabalhos demonstram que a hibridização entre animais não se trata de um evento raro na natureza, seja causada por processos naturais ou não, e ocorre na Amazônia em variados grupos.

Vianna *et al.* (2006) encontraram hibridização entre peixes-bois marinho (*Trichechus manatus*) e amazônico (*Trichechus inunguis*), que vivem em simpatria, na foz do Rio Amazonas. Neste trabalho, utilizando-se análises citogenéticas e moleculares, foram identificados oito indivíduos híbridos, incluindo geração F1, F2 e retrocruzantes. Um indivíduo apresentou número de cromossomos e características morfológicas intermediários entre as duas espécies, DNAm de espécie amazônica e alelos microssatélites provenientes da espécie marinha e amazônica. Caso que também é encontrado entre as preguiças em Manaus, em que indivíduos obtiveram DNAm de *B. tridactylus* e DNA nuclear com diferentes proporções genotípicas entre as duas espécies, que indica a fertilidade dos híbridos.

Todos os indivíduos híbridos encontrados no presente estudo possuem DNAm de *B. tridactylus*, o que indica que há uma direcionalidade na hibridização, que ocorre entre fêmeas de *B. tridactylus* e machos de *B. variegatus*. Padrão que é possível observar devido à herança uniparental (materna) do genoma mitocondrial. Resultado semelhante foi obtido por Gravena *et al.* (2015), em que os híbridos encontrados entre as espécies de boto, *Inia geoffrensis* e *Inia boliviensis*, no Rio Madeira (abaixo da corredeira de Tetônio), são caracterizados por apresentarem DNAm de *I. boliviensis* e DNA nuclear compartilhado entre as duas espécies.

No caso das preguiças, é difícil ter certeza do que pode estar causando a preferência de fêmeas de *B. tridactylus* por machos de *B. variegatus*, pois além da falta de estudos e observações de campo, não se sabia sobre a ocorrência de hibridização entre estas espécies e, portanto, os estudos que existem não apresentam esse tipo de registro. O que se pode inferir é que este fato deve-se ou a algum tipo de preferência morfológica e /ou comportamental, ou apenas se deve a restrita área de vida das preguiças, principalmente devido às fragmentações florestais que ocorrem na cidade, que podem estar levando esses animais a cruzarem com o parceiro mais próximo que encontram e seja semelhante.

Também pode-se observar que é possível identificar indivíduos híbridos de geração F1, F2 e retrocruzantes, com diferentes proporções de associação do DNA nuclear entre as espécies. Dos 14 indivíduos híbridos encontrados, dois pertencem a classe genotípica F1 (5292 e 5097), três pertencem a F2 (5138, 5293 e 5295), cinco são resultado de retrocruzamentos com o parental *B. variegatus* (5676, 5203, 5133, 5137 e 5213) e quatro são resultantes de retrocruzamento com o parental *B. tridactylus* (5079, 5100, 5300 e 5297).

Com isso, pode-se inferir que os híbridos, resultantes do cruzamento entre as duas espécies de preguiça da Amazônia, são férteis, cruzando entre si e com ambos os parentais, levando a uma intensa introgressão gênica e gerando o que se denomina de “*hybrid swarm*”. Segundo Barton (2001) a ocorrência de hibridização em que são produzidos híbridos da geração F1 férteis, certamente acontecerá retrocruzamento para um ou outro genótipo parental, ocorrendo assim a introgressão, (RHYMER & SIMBERLOFF, 1996), que pode levar à extinção de uma espécie pela substituição completa do seu genoma pelo de outra espécie mais abundante (NASCIMENTO *et al.* 2012). O resultado vai depender da aptidão do híbrido F1 e das outras gerações retrocruzantes (BARTON, 2001).

É muito provável que uma F2 ou populações retrocruzantes sejam menos aptas, tanto no ambiente parental como em novos ambientes. Isso ocorre porque esses genótipos recombinantes nunca foram testados pela seleção natural. Embora a maioria dos genótipos híbridos sejam menos aptos, podem contribuir para a adaptação, quer seja por introgressão de alelos individuais ou por estabelecimento de um genótipo recombinante (BARTON, 2001).

Os 14 indivíduos híbridos identificados no presente estudo, são encontrados na região de Manaus (Amazonas-Brasil) sendo esta, portanto, considerada uma zona híbrida e, neste caso, é muito provável que este fato se deva a um contato secundário posterior ao evento de divergência entre as espécies. As zonas de hibridização podem ser formadas em decorrência de populações que divergiram em simpatria ou parapatría pela seleção diferenciada ou podem ocorrer também pelo contato secundário entre populações que se diferenciaram em alopatria e que, posteriormente, sofreram alguma alteração nas suas áreas de distribuição, levando a ocorrência de algum tipo de sobreposição (DOBZAHANSKY, 1940; MAYR, 1942; BARTON & HEWITT, 1985; HARISSON, 1993;).

A região de Manaus, nas últimas quatro décadas, apresentou um crescimento espacial e populacional significativo devido à criação da Zona Franca em meados da década de 1960/70, ocasionando diversas transformações no espaço físico, destacando-se o progressivo e contínuo desmatamento da área urbana, seja por ocupações irregulares ou áreas regularizadas como construções de prédios e conjuntos habitacionais (ALVES &

MOLINARI, 2012), levando a formações de diversos fragmentos florestais isolados na cidade, que exercem influência direta no tamanho e na dinâmica das populações de animais que ali se encontram.

A fragmentação de hábitat é apontada como a maior ameaça para a sobrevivência de preguiças, em que o isolamento de sub-populações nos fragmentos florestais é elevado devido à pequena capacidade de locomoção das mesmas em áreas abertas e, quando o fazem podem se machucar ou serem atropeladas, sendo que populações pequenas e isoladas sofrem com a redução da variabilidade genética através de endocruzamentos e deriva genética (CASSANO, 2006), o que ocorre com frequência na cidade de Manaus e arredores, com os animais que se encontram nessa região.

Ao trabalhar com a espécie *Saguinus bicolor* na região de Manaus, de Oliveira (2014) encontrou um indivíduo com características fenotípicas de *S. midas* que apresentou DNAm de *S. bicolor*, sugerindo se tratar de um híbrido entre as duas espécies. O autor cita como a expansão populacional de Manaus e a consequente redução na área de vida desses primatas tem afetado suas populações, confirmando que a fragmentação de hábitat tem sido uma grande ameaça à sobrevivência dessa espécie, bem como pode ser a causa da hibridização que pode estar ocorrendo na área em que as duas espécies se encontram.

Detwiler *et al.* (2004) afirma que a hibridização entre os primatas africanos se trata de um evento natural, que ocorre na ausência de perturbações humanas, mas que a fragmentação de hábitat dessas espécies tem aumentado a incidência de ocorrência de hibridização, aumentando o nível de ameaça à sobrevivência das mesmas. Ou seja, ainda que a causa da hibridização seja natural, a fragmentação do hábitat das espécies de preguiça encontradas em Manaus pode estar causando um aumento no número de indivíduos híbridos, podendo ser uma ameaça à conservação de uma ou ambas as espécies.

As espécies *B. variegatus* e *B. tridactylus*, atualmente encontradas nos fragmentos florestais de Manaus, possuem hábitat, modo de vida e fenótipos semelhantes, o que possibilita um contato entre elas, pois não há barreiras ecológicas e comportamentais, ainda mais neste caso, em que as fragmentações ocorrem de forma rápida e progressiva, diminuindo a área de vida dessas espécies.

Devido a este contato e uma ineficiência na barreira pré-zigótica entre estas espécies, a ocorrência de cruzamentos entre elas é favorável, levando a uma prole fértil, como se observa nos resultados obtidos neste estudo, o que indica inexistência também de barreira pós-zigótica. Dias (2013) também encontrou na fragmentação de habitat, nesse caso natural, o

motivo para ocorrência de hibridização entre as espécies *L. pardalis* e *L. wiedii*. A fragmentação da região de savana de Beni, na Bolívia, proporcionaria um contato mais próximo entre estas espécies, em áreas isoladas pela cheia. Tal cenário, somado a uma divergência evolutiva recente e uma barreira pré zigótica ainda incipiente poderia favorecer a hibridização. O que provavelmente seja o mesmo que ocorre entre as espécies *B. tridactylus* e *B. variegatus*.

Se a hibridização tem alto preço evolutivo, a seleção natural pode favorecer a evolução dos mecanismos pré-zigóticos. Se a hibridização é menos onerosa, ou oferece algum tipo de vantagem “fitness”, o isolamento pré-zigótico pode ser fraco. Nesse caso, mesmo que ocorra em baixa frequência, a hibridização é obrigada a ter consequências duradouras para a estrutura genética (SCHWENK *et al.* 2008). No caso das preguiças do gênero *Bradypus* encontradas em Manaus, as espécies provavelmente não desenvolveram mecanismos de isolamento reprodutivo eficiente, o que possibilita a ocorrência de hibridização entre elas.

Prováveis Causas da Ocorrência de Hibridização entre *B. variegatus* e *B. tridactylus*

De acordo com os resultados obtidos com a utilização do DNAmT, os espécimes de *Bradypus tridactylus* foram agrupados no clado 1 (ao norte do Rio Negro e Amazonas) e os espécimes de *Bradypus variegatus* foram agrupados no clado 2 (ao sul do Rio Negro e Amazonas), sendo este dividido em dois outros clados: um que é representado por dois indivíduos encontrados em Manaus e um encontrado alguns quilômetros após a travessia da ponte sobre o Rio Negro, na região de Iranduba, e o outro, que agrupa os demais indivíduos de *B. variegatus* da área controle da espécie. Esse padrão encontrado aponta para algum episódio geológico que dividiu as espécies por significativo período de tempo.

Dias (2013), trabalhando com a região controle (Dloop) do DNAmT, observou uma diferenciação entre espécimes de *Leopardus pardalis* e *Leopardus wiedii*, em que as duas espécies apresentaram separação entre dois clados: Norte do Rio Amazonas e Sul do Rio Amazonas. Este resultado aponta para uma barreira geográfica, entre os indivíduos de ambas as espécies, imposta pelos rios Negro e Amazonas, o que provavelmente também ocorreu para as preguiças da Amazônia: *B. tridactylus* e *B. variegatus*.

Também pode-se observar algum tipo de estruturação entre os indivíduos de *B. variegatus*, devido a separação dos nove indivíduos em dois clados diferentes. O que nos leva a pensar que é muito provável que tenha ocorrido algum evento geológico que possibilitou uma diferenciação entre essas populações de preguiça, porém devido à pequena quantidade de amostras obtidas no local, não se pode ter certeza do porque esses três indivíduos (5752, 5750 e 5682) estarem separados em um clado diferente dos demais indivíduos da área controle da espécie.

Porém, é evidente que os dois indivíduos de *B. variegatus* encontrados em Manaus (5750 e 5682), na verdade são de origem do sul do Rio Negro e Amazonas. Sabe-se que o indivíduo 5750 é filhote de uma preguiça que foi levada para Manaus por ação antrópica da região do município de Iranduba, que fica localizado logo após a travessia da ponte sobre o Rio Negro, já grávida, e acabou ficando no fragmento florestal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Ela e o filhote são *B. variegatus* puros, que, teoricamente, não deveriam ser encontradas a norte dos rios Negro e Amazonas.

O indivíduo 5682 também foi encontrado no fragmento florestal da UFAM. Os dois indivíduos foram agrupados com um indivíduo encontrado na região de Iranduba (5752), e os três foram agrupados em um clado diferente dos demais espécimes de *B. variegatus* da região controle, o que leva a pensar que há algum tipo de barreira entre as populações desta espécie, nessa região.

Durante longos períodos do terciário, uma porção do vale amazônico, como a região entre Manaus e Óbidos, foram grandes áreas secas que permitiram uma troca de fauna entre os escudos das guianas e o escudo amazônico (MOSMANN *et al.* 1986), o que permitiu que as preguiças começassem a se dispersar em direção ao sul e outras regiões da Amazônia, o que explicaria a intensa hibridização e introgressão que ocorre entre *B. tridactylus* e *B. variegatus*.

Essa ponte entre os escudos provavelmente durou até o fim do mioceno, quando movimentos tectônicos levaram a formação do rio Solimões, separando novamente os escudos (HAFFER, 1997) e isolou as preguiças da família Bradipodidae encontradas na Amazônia. As espécies *B. tridactylus* e *B. variegatus* divergiram há aproximadamente 400 mil anos, provavelmente durante o Pleistoceno, de acordo com os resultados obtidos por Barros *et al.* (2003). De acordo com os mapas de distribuição destas espécies, *B. tridactylus* estaria restrita a região norte do Rio Negro e Amazonas e a espécie *B. variegatus* a região sul destes rios.

Porém, como foi visto nos resultados, indivíduos de *B. variegatus* são atualmente encontrados em Manaus. Isso pode ser devido à ação antrópica, como se sabe que realmente acontece na região, como pode ser algo mais antigo, e esses indivíduos terem ficado restritos a região de Manaus após a formação do Rio Negro, indicando que a divergência entre estas espécies ocorreu independente da formação dos rios e a hibridização pode ser um processo natural que vem ocorrendo há muitos anos entre elas.

Implicações da Hibridização na Conservação

Como é apontado por de Oliveira (2014), perturbações no hábitat causadas na região de Manaus levam a uma evolução em ação intensificada para as espécies encontradas nos fragmentos florestais da cidade. No caso das preguiças, a fragmentação de hábitat tem pode estar levando não só a uma redução populacional, como tem intensificado a ocorrência de hibridização entre elas.

As consequências da existência de híbridos férteis para o processo evolutivo e de especiação dos grupos envolvidos podem variar de insignificantes a drásticas, dependendo do tamanho populacional e da frequência de ocorrência desses híbridos. Na maioria das vezes, a ocorrência de hibridização representa um risco para a conservação das espécies. Quando a hibridização ocorre em pequenas populações naturais, pode levar a consequências negativas para a espécie como a depressão por exocruzamento (NASCIMENTO *et al.* 2012), competição com as espécies parentais ou até mesmo à extinção de uma ou ambas espécies envolvidas nesse processo (GALLETI JR. *et al.* 2008).

A hibridização pode representar uma fonte de trajetórias evolutivas, tendo grande impacto sobre a origem e destino de linhagens. Pode resultar na origem de novos genótipos, bem como em mudanças significativas de frequências alélicas, alterações genéticas, ecológicas e comportamentais (ARNOLD, 1997; SCHWENK *et al.* 2008). Quando comparada com mutação e recombinação, a hibridização pode resultar em mudanças rápidas e duradouras entre espécies (SCHWENK *et al.* 2008). Em maior escala, a hibridização tem sido crucial para a evolução (BARTON, 2001).

Determinar se as causas da hibridização são naturais ou antropogênicas é crucial para o manejo e conservação das espécies. Híbridos causados por processos antropogênicos devem

ser monitorados como uma potencial ameaça à integridade de biotas locais (SCHNEIDER, 2009). No caso do município de Manaus, é importante que haja um monitoramento dessas espécies e da ocorrência de hibridização, para que se possa propor e adotar estratégias de manejo adequadas. Sendo importante também saber até onde vai essa região de hibridização, se está restrita aos fragmentos florestais da cidade ou também pode estar no seu entorno.

Estudos voltados para aspectos biológicos, ecológicos, genéticos e biogeográficos são de fundamental importância para gerar informações empíricas sobre as espécies e, portanto, auxiliar na elaboração de estratégias de manejo, conservação e proteção das espécies envolvidas em processos de hibridização e introgressão.

CONCLUSÃO

Amostras não-invasivas de coleta para obtenção de DNA tem se mostrado uma alternativa interessante no que diz respeito à estudos genéticos de populações selvagens. No caso das preguiças, tanto a utilização de pelos como a de carrapatos mostraram-se de custo e dispêndio de tempo reduzidos, fácil estocagem de amostras e concentração de DNA relativamente boa para a realização dos estudos, sendo, portanto, uma alternativa viável.

A espécie *B. variegatus* ocorre ao norte do Rio Negro, sendo necessária uma correção nos mapas de distribuição da espécie, encontrando-se em simpatria com a espécie *B. tridactylus* na região de Manaus. Há ocorrência de hibridização entre as espécies, que provavelmente seja restrita aos fragmentos florestais de Manaus, em que é possível observar a existência de híbridos da geração F1, F2 e retrocruzantes, confirmando a fertilidade dos mesmos.

A hibridização encontrada é unidirecional, entre fêmeas de *B. tridactylus* e machos de *B. variegatus*. Porém ocorre de forma aleatória nos fragmentos florestais de Manaus, não havendo um padrão e não há relação com áreas de parque, não estando restrita aos fragmentos florestais da UFAM e do INPA, onde as pessoas costumam soltar as preguiças que encontram ou capturam.

Sendo um evento natural ou resultado de ação antrópica, a hibridização traz uma série de consequências evolutivas para as espécies envolvidas, estando estritamente relacionada à conservação das mesmas e requer uma série de estudos que visem gerar mais informações sobre esse processo para que, possa haver a elaboração e utilização de estratégias de manejo para as espécies envolvidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, J. M.; da FONSECA, G. A. B. Conservation Status of the Xenarthra. In: **The Biology of the Xenarthra**. VISCAÍNO, S. F.; LOUGHRY, W. J. Flórida, USA, 2008.

AMADO, M. V.; **Caracterização Genética de Populações do Peixe Ornamental Acará Disco (*Symphysodon* Spp., Cichlidae, Perciformes), Utilizando Marcadores Microssatélites**, 2008. Tese de Doutorado – (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

ALLENDORF, F. W.; LEARY, R. F.; SPRUELL, P.; WENBURG, J. K. The Problem with Hybrids: Setting Conservation Guidelines. **Trends. Ecol. Evol.**, 2001.

ALVES, N. S.; MOLINARI, D. C. Expansão Urbana e Proteção Ambiental: Reserva Particular do Patrimônio Natural Municipal (RPPN)- Manaus (AM). **Rev. Eletr. Do Curso de Geografia** – UFG, 2012.

ANDERSON, R. P.; HANDLEY, C. O. J. A New Species of Three-Toed Sloth (Mammalia: Xenarthra) from Panama, with a review of the genus *Bradypus*. **Proceedings of Biological Society of Washington**, 2001.

ARNOLD, M. L. **Natural Hybridization and Evolution**. Oxford. University Press New York, 1997.

AVISE, J. C.; BERMINGHAM, E.; KESSLER, L. G.; SAUNDERS, N. C. Characterization of Mitochondrial DNA Variability in a Hybrid Swarm between Subspecies of blue gill Sunfish (*Lepomis macrochirus*) **Evolution**, 1984.

AVISE JOHN C, ARNOLD JONATHAN, BALE R. MARTIN BALE, BERMINGHAMF ELDREDG, LAMB,TRIP, NEIGELL JOSEPH E, REEBL CAROL A, SAUNDERS NANCY C. Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA Brigde between Population Genetics and Systematics- **Ann. Rev. Ecol. Sys.**, 18:489-522, 1987.

BARROS, M. C., SAMPAIO, I. E SCHNEIDER, H. Phylogenetic analysis of 16S mitochondrial DNA data in sloths and anteaters. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.1, p.5 - 11. 2003.

- BARTON, N. H. The role of hybridization in evolution. **Molecular Ecology**, 10, 551–568, 2001.
- BARTON, N. H.; HEWITT, G. M. Analysis of hybrid zones. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 16: 113–14, 1985.
- BENIRSCHKE, Kurt. Reproductive Parameters and Placentation in Anteaters and Sloths. In: **The Biology of the Xenarthra**. VISCAÍNO, S. F.; LOUGHRY, W. J. Flórida, USA, 2008.
- BICCA-MARQUES, J. C.; PRATES, H. M.; de AGUIAR, F. R. C.; JONES, C. B. Survey of *Alouatta caraya*, the Black-and-gold Howler Monkey, and *Alouatta guariba clamitans*, the Brown Howler Monkey, in a Contact Zone, State of Rio Grande do Sul, Brazil: Evidence for Hybridization. **Primates**, 49: 246-252, 2008.
- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de Marcadores Moleculares In: **Marcadores Moleculares**. Borém – Viçosa, 2009.
- CASSANO, C. R. **Ecologia e Conservação da Preguiça-de-Coleira (*Bradypus torquatus* Illiger, 1811) no Sul da Bahia**. 2006. Dissertação de Mestrado – (Programa de Pós-Graduação em Zoologia). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia.
- CASTRO, K. G. R. **Genética Aplicada à Ecologia de Estradas: Um Estudo na Estrada Municipal Guilherme Scatena (São Carlos, SP) e Potencial Impacto na Biodiversidade Local**, 2012. Dissertação de Mestrado – (Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP.
- CHIARELLO, A. G. Sloth Ecology: An Overview of Field Studies. In: **The Biology of the Xenarthra**. VISCAÍNO, S. F.; LOUGHRY, W. J. Flórida, USA, 2008.
- CORK, S.J.; FOLEY, W.J. **Digestive and metabolic strategies of arboreal mammalian folivores in relation to chemical defenses in temperate and tropical forests**. In: PALO, R.T.; ROBBINS, C.T. (Eds.) **Plant defenses against mammalian herbivory**. CRC Press, 1991, p.133-166.
- De OLIVEIRA, J. B. **Filogeografia e Demografia Histórica de *Saguinus bicolor* (Cebidae: Primates)**. Dissertação de Mestrado – (Programa de Pós Graduação em Ecologia) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus (AM), 2014.
- DETWILER, K. M.; BURRELL, A. S.; JOLLY, C.J. Conservation Implications of Hybridization in African Cercopithecine Monkey. **International Journal of Primatology**, vol. 26, nº 3, 2005.

DIAS, Guilherme Fernandes. **Testando Limites Interespecíficos entre *Leopardus pardalis* e *L. wiedii* na Amazônia.** Dissertação de Mestrado – (Programa de Pós Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus (AM), 2013.

DOBZHANSKY, T. Speciation as a stage in evolutionary divergence. **Am. Nat.** 74:312–321, 1940.

DO CARMO, N. A. S. **Distribuição, Densidade, Padrão de Atividades, Dieta e Parasitas de *Bradypus tridactylus* (Mammalia, Xenarthra) em Fragmento Florestal na Amazônia,** 2002. Dissertação de Mestrado – (Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais) INPA /UFAM, Manaus – AM.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull** 19: pp. 11-15, 1987.

DRUMMOND, A. J.; ASHTON, B.; BUXTON, S.; CHEUNG, M.; COOPER, A.; DURAN, C.; FIELD, M.; HELED, J.; KEARSE, M.; MARKOWITZ, S.; MOIR, R.; STONES-HAVAS, S.; STURROCK, S.; THIERER, T.; WILSON, . C. **Geneious.** v.5.6.3, 2012.

EISENBERG, J. F. The Mammalian Radiations. An Analysis of Trends in Evolution, Adaptation, and Behavior. Chicago and London: **The University of Chicago Press.** 1981.

EMMONS, L. Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide. Chicago: **Chicago Press,** 1997.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética.** Brasília–DF: EMBRAPA – CENARGEN, 1995.

FERREIRA, S. A. **Avaliação do Potencial de Amostras Cínicas de Coleta Não-invasiva para Diagnóstico Molecular da Leishmaniose Visceral Canina por PCR.** Tese de Doutorado – (Programa de Pós Graduação em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2012.

GALETTI JR, P. M., RODRIGUES, F. P., SOLÉ-CAVA, A., MIYAKI, C. Y., CARVALHO, D., EIZIRIK, E., VEASEY, E. A., SANTOS, F. R., FARIAS, I. P., VIANNA, J. A., OLIVEIRA, L. R., WEBER, L. I., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., FRANCISCO, M. R., REDONDO, R. A. F., SICILIANO, S., DEL LAMA, S. N., FREITAS, T. R.O., HRBEK, T.,

MOLINA, W. F. Genética da conservação brasileira. pp.244-274. In: **Fundamentos de Genética da Conservação**. Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., Ribeirão Preto, SP, Editora SBG, 290p, 2008.

GARDNER, A. L. **Mammals of South America**. The University of Chicago Press, Chicago and London, 2007.

GILMORE, D. P.; DA COSTA, C. P.; DUARTE, D. P. F. Sloth Biology: an Update on Their Physiological Ecology, Behavior and Role as Vectors of Arthropods and Arboviruses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2001.

GILMORE, D.; DUARTE, D. F.; da COSTA, C. P. The Physiology of Two- and Three-Toed Sloth. In: **The Biology of the Xenarthra**. VISCAÍNO, S. F.; LOUGHRY, W. J. Flórida, USA, 2008.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHÖTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. New York, NY: Oxford University Press, 1999.

GRANT PR, GRANT BR. Hybridization of bird species. *Science* 256: 193–197, 1992.

GRAVENA, W.; da SILVA, V M. F.; da SILVA, M. N. F.; FARIAS, I. P.; HRBEK, T. Living Between Rapids: Genetic Structure and Hybridization in Botos (Cetacea: Iniidae: *Inia* spp.) of the Madeira River, Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society**, 2005.

HAFFER, J. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. **Biodiversity and Conservation**, 6, 451–476, 1997.

HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. A. A Novel Repeated Element with ZDNA Forming Potential is Widely Found in Evolutionarily Diverse Eukaryotic Genomes. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, 1982.

HARRISON, R. G. **Hybrid Zones and the Evolutionary Process**: Oxford University Press: New York, 1993.

HAYSSEN, V. *Bradypus variegatus* (Pilosa: Bradipodidae). **Mamm. Species**, 2009

IERVOLINO, F.; RESENDE K. E.; HILSDORF S. W. A. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the

mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. **Journal Fisheries Research-Elsevier** 101:1-5, 2009.

JACQUES, G. S. **Identificação de Espécies Animais Usando Sequências de Genes Mitocondriais no Combate aos Crimes contra a Fauna**, 2005. Dissertação de Mestrado – (Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia) Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF.

LACORTE, G. A.; DIAS, I. M. G.; CARVALHO, M. R. S. **Extração Não-invasiva de “*Equus caballus*”:** Uma Avaliação de Métodos. V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2004.

LATHUILLIERE M.; MENARD, N.; GAUTHER-HION, A.; CROUAU-ROY, B. Testing the Reliability of Noninvasive Genetic Sampling by Comparing Analyses of Blood and Fecal Samples in Barbary Macaques (*Macaca Sylvanus*). **American Journal of Primatology**, 2001.

MEDRI, I. M.; MOURÃO, G. M.; RODRIGUES, F. H. Ordem Pilosa In: DOS REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, N. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 2a ed. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2011. p. 91-95.

MOORE, S. S.; SARGEANT, L. L.; KING, T. J.; MATTICK, J.S.; GEORGES, M.; HETZEL, G. J. The Conservation of Dinucleotide Microsatellites Among Mammalian Genomes Allows the use of Heterologous PCR Primer Pairs in Closely Related Species. **Genomis**, 1991.

MORAES-BARROS, N. DE; GIORGI, A. P.; SILVA, S.; STENGHEL, M. Reevaluation of the Geographical Distribution of *Bradypus tridactylus* Linnaeus, 1758 and *B. variegatus* Schinz, 1825. **Edentata**, 2010.

MOSMANN, R., FALKENHAIN, F. U. H., GONCALES, A. E NEPOMUCENO, F. F. Oil and gas potential of the Amazon Paleozoic basins. In: M. T. Halbouty (Ed.). Future Petroleum Provinces of the World: **Amer. Assoc. Petrol. Geol.**, v.40, 1986. Oil and gas potential of the Amazon Paleozoic basins, p.207-241

MOSS, W. E.; PEERY, M. Z.; GUTIÉRREZ-ESPELETA, G. A.; VAUGHAN, C.; HERRERA, G.; PAULI, J. N. Isolation and Characterization of 18 Microsatellite Markers for the Brown-Throated Three-Toed Sloth, *Bradypus variegatus*. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, 2012. p. 1037-1039.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase Catalyzed Chain Reaction. **Methods Enzymal**, 1987.

PARKER, P.G.; SNOWM, A. A.; SCHUGG, D.; BOOTON, C.; FUERST, P. A. What Molecules can Tell us About Populations: Choosing and Using a Molecular Marker. **Ecology**, 1998.

PILGRIM, K. L.; MCKELVEY, K. S.; RIDDE, A. E.; SCHWARTZ, M. K. Felid Sex Identification Based on Noninvasive Genetic Samples. **Molecular Ecology Notes**, 2005.

PORTELLA, T. P. **Armadilhas de Pelos como Método de Amostragem Não-invasiva para Felídeos Neotropicais: Uma Abordagem Metodológica**. Dissertação de Mestrado – (Programa de Pós Graduação em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

NASCIMENTO, M. S.; LOPES, F. R. V.; OLIVEIRA, L. R. Revisão sobre o Fenômeno da Hibridização em Cetáceos e Pinípedes. **Neotropical Biology and Conservation**. 7: 199-209, 2012.

OLIVER, W. L. R.; SANTOS, I. B. **Threatened endemic mammals of the Atlântic Forest region of South-east Brazil**. Wildlife Preservation Trust, Specil Scientific Report, 4:21-31, 1991.

PEREIRA JR., H. R. **Evolução Cromossômica na Ordem Xenarthra**, 2007. Tese de Doutorado – (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

PINHO, G. M.; da SILVA, A. G.; HRBEK, T.; VENTICINQUE, E. M.; FARIAS, I. P. Kinship and Social Behavior of Lowland Tapirs (*Tapirus terrestris*) in a Central Amazon Landscape. **Plos One**, 2014.

PLESE, Tinka. **Los Perezosos Non Son Osos**. Fundación AIUNAU, CVS, pp. 55, Colômbia, 2014.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. **Documentation for Structure Software**. Version 2. Department of Human Genetics, University of Chicago, USA 2003.

QUELLER, D. C.; STRASSMAN, L. E.; HUGHES, C. R. Microsatellites and Kinship. **Trends in Ecology**, 1993.

RÉUS, C. L.; SOUZA, C. M. D. Estrutura Populacional De *Bradypus Tridactylus* (Xenarthra , Bradypodidae) Em Fragmento Florestal Urbano No Município De Manaus, Amazonas. **Estud. Biol.** v. 29, 2007.

RIBEIRO, J. M.; GASPARINO, E.; MARQUES, D. S.; LUIZETTI, F.; SOARES, M. A. M.; ZEOULA, L. M. Método Não-invasivo na Obtenção de DNA de Búfalos. **Acta Sci. Anim. Sci.**, v. 30, p. 479-483, 2008.

Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, v.43, p.223-225.

RIESEBERG, L. H.; ELLSTRAND, N. C. What can Morphological and Molecular Markers Tell us About Plant Hybridization ? **Critical Reviews in Plant Sciences**, 1993.

RHYMER, J. M.; SIMBERLOFF, D. S. Genetic Extinction Through Hybridization and Introgression. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 1996.

SCHNEIDER, Alexandra. **Caracterização de uma Zona Híbrida entre Dois Felídeos Neotropicais Utilizando Múltiplos Locos Nucleares**. Dissertação de Mestrado – (Programa de Pós Graduação em Zoologia) – Faculdade de Biociências, Rio Grande do Sul (RS), 2009.

SCHUELKE, M. An economic Method for the Fluorescent Labeling of PCR Fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, 2000. p. 233-234.

SCHWENK, K.; BREDE, N.; STREIT, B. Introductions, Extent, Processes and Evolutionary Impact of Interspecific Hybridization in Animals. **The Royal Society**, 2008.

SIMÕES, P. I.; LIMA, A. P.; FARIAS, I. P. Restricted Natural Hybridization between two Species of Litter Frogs on a Threatened Landscape in Southwestern Brazilian Amazonia. **Conserv. Genet.**, 2012.

TABERLET, P.; CAMARRA, J.J.; GRIFFIN, S.; UHRES, E.; HANOTTE, O.; WAITS, L.P.; DUBOIS-PAGANON, C.; BURKE, T.; BOUVET, J. Noninvasive Genetic Tracking of the endangered Pyrenean Brown Bear Population. **Molecular Ecology**, v.6, p. 869-876, 1997.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 5.0. **Molecular Biology and Evolution** 24: 1596-1599, 2011.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v.12, n.10, p. 4127-4138, 1984.

TRIGO, T. C. **Hibridação e Introgressão entre Espécies de Felídeos Neotropicais (Mammalia, Carnivora)**, 2008. Tese de Doutorado – (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS.

VAN OOSTERHOUT, C.V.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS D.P.M.; SHIPLEY, P. Micro-Checker software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Mol Ecol Notes** 4:535–538, 2004.

WAITS, L.P.; PAETKAU, D. Noninvasive Genetic Sampling Tools for Wildlife Biologists: a Review of Applications and Recommendations for Accurate Data Collection. **Journal of Wildlife Management**, 69: 1419-1433, 2005.

WILSON, P. J.; GREWALL, S. K.; MALLONY, F. F.; WHITE, B. N. Genetic Characterization of Hybrid Wolves Across Ontario. **Journal of Heredity**, 2009.

WETZEL, R. M. The Identification and Distribution of Recent Xenarthra (= Edentata). In: **The Biology of the Xenarthra**. VISCAÍNO, S. F.; LOUGHRY, W. J. Florida, USA, 2008.

WERLE, E.; SCHNEIDER, C.; RENNER, M.; VÖLKER, M.; FIEHN, W. **Convenient Single-Step, One Tube Purification of PCR Products for Direct Sequencing**. Nucleic Acids Research, 1994.